

**UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR**

**DETERMINAÇÃO DE ANTIDEPRESSIVOS EM  
PLASMA E URINA: COMPARAÇÃO DE DUAS  
TÉCNICAS DE EXTRACÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade da Beira Interior para a  
obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica

**Ana Sofia Marques Domingos**

**Covilhã**

**2009**

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

## AGRADECIMENTOS

---

Para a realização deste trabalho pude contar com apoio e colaboração de muitos que a ele estiveram ligados directa ou indirectamente.

Gostaria de agradecer à minha orientadora de mestrado, Prof Doutora Eugenia Gallardo, pela sua paciência, orientação científica, a sua disponibilidade para responder às minha “dúvidas existenciais”, mas sobretudo pela sua amizade.

Queria agradecer também a todo o pessoal do laboratório de Cromatografia, pela paciência nos dias de desespero no HPLC, às Ângelas, Vanessa e ao Ângelo pela disponibilização de matriz biológica para o desenvolvimento deste trabalho. Ao pessoal dos restantes laboratórios, pela boa recepção neste centro de investigação, onde estiveram sempre disponíveis para esclarecer as minhas dúvidas e ajudar no que podiam.

Não podia deixar de agradecer à amizade e companheirismo da Rita, Carla, Liliana, Edmundo, que sempre me ajudaram e incentivaram neste trabalho.

Aos meus pais, irmãos e restante família o apoio incondicional, e pela perseverança nos dias mais difíceis.

Por fim e não menos importante ao meu namorado, que desde a licenciatura nunca me deixou desistir e me deu sempre forças para continuares e apesar da distância nunca me deixou de incentivar em mais esta etapa da minha vida.

A todos o meu muito Obrigado

Ana Sofia Domingos

## RESUMO

---

Os casos de depressão têm vindo a aumentar cada vez mais. Muitas vezes por falta de diagnóstico atempado o tratamento inicial não é eficaz, o que faz com que o número de doentes crónicos continue a aumentar, aumentando consequentemente o consumo deste tipo de medicamentos. Em Portugal, os dados publicados pela Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde I.P. (INFARMED) referem que o subgrupo farmacoterapêutico antidepressivos e psicotrópicos estava, em 2000, entre os 10 primeiros no que diz respeito aos encargos para o Serviço Nacional de Saúde.

A prescrição dos antidepressivos de nova geração, como os inibidores selectivos da recaptação da serotonina, tem sido crescente nos últimos anos, já que apresentam menos toxicidade para o organismo e um menor número de efeitos secundários. No entanto, nem sempre esta medicação é eficaz, continuando assim a prescrever-se antidepressivos tricíclicos e inibidores da monoaminoxidase, que apresentam uma elevada toxicidade e são muitas vezes usados em actos suicidas.

O objectivo a que nos propusemos com este trabalho foi desenvolver e comparar várias técnicas para a preparação de amostras, como a extracção líquido-líquido (LLE) e a extracção em fase sólida (SPE), usando diferentes solventes e tipos de enchimento para a detecção de antidepressivos em plasma e urina. Os extractos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a um detector de fotodiodos (PDA).

Foram estudados nove antidepressivos: amitriptilina, nortriptilina, clomipramina, dotiepina, mianserina, trazodona, fluoxetina, sertralina e protriptilina, tendo sido este último usado como padrão interno.

Os parâmetros estudados foram a selectividade, recuperação e limites de detecção, tendo estes parâmetros sido avaliados de acordo com as normas internacionalmente aceites para a validação de métodos bioanalíticos.

Os valores de recuperação obtidos situaram-se entre 16-82% para a LLE e 42-97% para a SPE. De um modo geral, as técnicas de SPE utilizadas demonstraram ser mais adequadas para a determinação deste tipo de compostos em fluidos biológicos, devido à presença de um número menor de interferências endógenas. Por outro lado, a simplicidade de execução desta técnica torna-a mais facilmente automatizável. Finalmente, foi ainda possível demonstrar que o tipo de equipamento analítico utilizado no decorrer deste trabalho (HPLC/PDA) é uma técnica útil e ao alcance de qualquer laboratório para uma primeira fase da optimização de processos extractivos, reservando-se técnicas mais dispendiosas [como por exemplo LC/MS (MS) ou UPLC/MS (MS)] para a posterior validação dos métodos analíticos desenvolvidos.

## **ABSTRACT**

---

---

Depression situations are increasing every year. Initial treatment measures are often non-effective, and this can be due to the lack of an early diagnosis, leading to an increase in the number of patients with chronic disease. As a consequence, the consumption of antidepressant drugs also increases. In Portugal, and according to the published data by Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde I.P. (INFARMED) referring to the year 2000, antidepressant and psychotropic medicines were included in the top 10 of the most burdensome therapeutic groups to the public treasury.

The prescription of new generation antidepressants, such as the selective inhibitors of serotonin reuptake, has increased in recent years, as these are less toxic and present fewer side effects. However, this class of drugs is not always effective, thus tricyclic antidepressants and ~~is~~ monoaminoxidase inhibitors are still being largely prescribed; the toxicity of these drugs is high, and they are often used in suicides.

The objective of this work was the development and comparison of several techniques for sample preparation, such as liquid-liquid extraction (LLE) or solid-phase extraction (SPE), for the detection of nine selected antidepressants in plasma and urine. Several different solvents and SPE cartridges (and sorbents) have been used, and extracts were analysed by high performance liquid chromatography (HPLC) coupled to a photodiode array detector (PDA).

We have studied nine antidepressants, and these were amitriptyline, nortriptyline, clomipramine, dothiepin, mianserine, trazodone, fluoxetine, sertraline and protriptyline (internal standard). The studied parameters included selectivity, absolute recovery and detection limits, and these were evaluated taking into account internationally accepted criteria for bioanalytical method validation.

The obtained recovery values were between 16-82% for LLE and 42-97% for SPE. In general, SPE-based techniques have shown more suitability for the determination of such compounds in these biological fluids due to the presence of less endogenous interferences. Moreover, this technique is more easily automated.

Finally, it was further possible to demonstrate that the instrumentation used in this study (HPLC/PDA) is an useful and accessible analytical tool to any laboratory for the first stage of optimization of extraction methods, reserving more expensive techniques [e.g. LC/MS (MS) or UPLC/MS (MS)] for the subsequent validation of the developed analytical methods.

## ÍNDICE GERAL

---

RESUMO	IV
ABSTRACT	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
ÍNDICE DE TABELAS	XIII
ABREVIATURAS	XV
JUSTIFICAÇÃO DO TEMA E OBJECTIVOS	XVIII
I - REVISÃO DA LITERATURA	XX
1. INTRODUÇÃO	1
2. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	4
2.1 ANTIDEPRESSIVOS TRICÍCLICOS	6
2.2 INIBIDORES SELECTIVOS DA RECAPTAÇÃO DA SERONOTONINA	7
2.3 INIBIDORES DA MONOAMINO-OXIDASE	8
2.4 INIBIDORES SELECTIVOS DA RECAPTAÇÃO DA SEROTONINA E NORADRENALINA	10
2.5 OUTROS ANTIDEPRESSIVOS	10
3. MECANISMO DE ACÇÃO	13
3.1 ANTIDEPRESSIVOS TRICÍCLICOS	14
3.2 INIBIDORES SELECTIVOS DA RECAPTAÇÃO DA SEROTONINA E NORADRENALINA	15
3.3 INIBIDORES SELECTIVOS DA RECAPTAÇÃO DA SERONOTONINA	16
3.4 INIBIDORES DA MONOAMINO-OXIDASE	17

3.5 ANTIDEPRESSIVOS NORADRENÉGCOS E SEROTONÉRGICOS ESPECÍFICOS (ANASES)	18
3.6 NOVAS HIPÓTESES NO MECANISMO DOS ANTIDEPRESSIVOS: DA FARMACOLOGIA SINÁPTICA PARA A FARMACOLOGIA INTERNEURONAL	19
4. ESTATÍSTICA DE CONSUMO DE ANTIDEPRESSIVOS EM PORTUGAL	21
5. FARMACOCINÉTICA	23
5.1 AMITRIPTILINA, NORTRIPTILINA, CLOMIPRAMINA E DOTIEPINA	23
5.2 SERTRALINA	24
5.3 FLUOXETINA	24
5.4 TRAZODONA	25
5.5 MIANSERINA	25
5.6 VENLAFAXINA	26
6. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS, DOSES E TOXICIDADE	27
6.1 EFEITOS ANTICOLINÉRGICOS	27
6.2 EFEITOS CARDIOVASCULARES	27
6.3 OUTROS EFEITOS	28
7. DETERMINAÇÃO DE ANTIDEPRESSIVOS EM MATRIZES BIOLÓGICAS	30
7.1 EXTRACÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO (LLE)	31
7.2 EXTRACÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE)	31
PARTE EXPERIMENTAL	41
1. INSTRUMENTAÇÃO	42
2. REAGENTES	43
3. PADRÕES	44
4. MATRIZES BIOLÓGICAS	44

5. PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES	45
6. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	47
7. IDENTIFICAÇÃO DE ANALITOS	47
8. PROCEDIMENTO DE EXTRACÇÃO	48
9. OPTIMIZAÇÃO DA FASE MÓVEL	53
10. COMPARAÇÃO DOS DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRACÇÃO	65
CONSIDERAÇÕES FINAIS	76
CONCLUSÕES	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
ANEXOS	89

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

Figura 1 - Estrutura química dos antidepressivos mais representativos de cada grupo <sup>10</sup> . .....	5
Figura 2 - Estrutura química de alguns antidepressivos tricíclicos com cadeia lateral "clássica".	6
Figura 3- Estrutura química de alguns antidepressivos Inibidores da Monoamino-Oxidase <sup>8</sup> .	9
Figura 4 - Estrutura química da mianserina.	11
Figura 5 - Estrutura química da mitrazapina <sup>14</sup> .	11
Figura 6 - Estrutura química da maprotilina.	12
Figura 7 - Esquema do mecanismo de acção dos antidepressivos tricíclicos <sup>15</sup> .	14
Figura 8 - Esquema do mecanismo de acção dos ISRSN <sup>15</sup> .	15
Figura 9 - Mecanismo de acção dos ISRS <sup>16</sup> .	16
Figura 10 - Mecanismo de acção dos IMAO <sup>15</sup> .	17
Figura 11 - Mecanismo de acção dos ANaSEs <sup>15</sup> .	18
Figura 12 - Mecanismo geral da acção das diferentes famílias de antidepressivos <sup>8</sup> .	20
Figura 13- Etapas no procedimento de extracção líquido-líquido.	31
Figura 14- Etapas no processo de extracção em fase sólida.	32
Figura 15 - Cromatograma obtido por injeção de uma mistura padrão dos antidepressivos estudados.	47
Figura 16 - Cromatogramas obtidos com a fase móvel metanol:água (70:30; v/v) para a amitriptilina, clomipramina, nortriptilina e venlafaxina.	54
Figura 17 - Cromatogramas obtidos com a fase móvel acetonitrilo:acetato de amónio 2 mM pH=3 (85:15; v/v) para a amitriptilina e clomipramina.	55
Figura 18 - Cromatogramas obtidos com a fase móvel acetonitrilo:acetato de amónio 2mM pH=3 (gradiente 1) para a amitriptilina, clomipramina, nortriptilina, venlafaxina, fluoxetina e maprotilina.	56
Figura 19 - Cromatogramas obtidos com a fase móvel acetonitrilo:acetato de amónio 2mM pH=3 (gradiente 2) para a amitriptilina, clomipramina, nortriptilina, venlafaxina, fluoxetina e maprotilina.	57
Figura 20 - Cromatogramas obtidos com a fase móvel acetonitrilo:acetato de amónio 2mM pH=3 (gradiente 3) para a amitriptilina, , nortriptilina e venlafaxina.	59

Figura 21 - Cromatogramas obtidos com a fase móvel metanol: ácido acético (54:46; v:v) para a amitriptilina, clomipramina, nortriptilina, venlafaxina, fluoxetina e matrotilina .....	60
Figura 22 - Cromatogramas obtidos com a fase móvel acetonitrilo: metanol: tampão fosfato 0.01 M pH7 (12:3:5; v/v) para a amitriptilina, clomipramina, e uma solução mistura de todos. ....	61
Figura 23 - Cromatograma da amitriptilina e nortriptilina, e da mistura destes dois analitos. ....	62
Figura 24 - Cromatograma da sertralina e fluoxetina e da mistura destes dois analitos. ....	62
Figura 26- Cromatograma da mistura dos antidepressivos obtido nas condições finais de estudo .....	63
Figura 25 - Cromatograma da mistura dos antidepressivos obtido nas condições finais de estudo. ....	63

## ÍNDICE DE TABELAS

---

Tabela 1 - Classificação dos antidepressivos monoaminérgicos de acordo com o mecanismo de acção e perspectiva histórica da sua introdução clínica (adaptado). <sup>8</sup> .....	3
Tabela 2 - Estrutura químicas e características físico-químicas de alguns antidepressivos tricíclicos. ....	7
Tabela 3 - Estruturas químicas e características físico-químicas de alguns SSRI. ....	8
Tabela 4 - Estrutura químicas e características físico-químicas de alguns IMAO.....	9
Tabela 5 - Estrutura químicas e características físico-químicas de alguns ISRSN .....	10
Tabela 6 - Estrutura química e características físico-químicas dos antagonista dos receptores serotoninérgicos 5-HT <sub>2</sub> .....	12
Tabela 7 - Consumo de antidepressivos, por substância activa, em Ambulatório no Serviço Nacional de Saúde ano de 2007 (cedido pelo INFARMED).....	21
Tabela 8 - Doses terapêuticas, tóxicas e letais de diversos antidepressivos <sup>20</sup> . ....	29
Tabela 9 - Métodos analíticos para a determinação de antidepressivos em plasma, soro, sangue, urina, fluído oral e vísceras. ....	35
Tabela 10 - Descrição dos tempos de retenção e do comprimento de onda de cada um dos antidepressivos em estudo. ....	48
Tabela 11 - Condições cromatográficas e antidepressivos identificados com as seguintes condições (experiência 1).....	53
Tabela 12 - Condições cromatográficas e antidepressivos identificados com as seguintes condições (experiência 2).....	54
Tabela 13 - Condições cromatográficas e antidepressivos identificados com a seguintes condições (experiência 3). ....	55
Tabela 14 - Condições cromatográficas e antidepressivos identificados com a seguintes condições (experiência 4). ....	57
Tabela 15 - Condições cromatográficas e antidepressivos identificados com a seguintes condições (tentativa 5). ....	58
Tabela 16 - Condições cromatográficas e antidepressivos identificados com a seguintes condições (experiência 6). ....	59
Tabela 17 - Condições cromatográficas e antidepressivos identificados com a seguintes condições (experiência 7). ....	60
Tabela 18 - Condições cromatográficas e antidepressivos identificados com a seguintes condições (experiência 8). ....	61

Tabela 19 - Condições cromatográficas e antidepressivos identificados com as seguintes condições (experiência 9). .....	63
Tabela 20 - Resumo dos analitos que não foram possíveis de identificar em amostras de plasma e urina.....	67
Tabela 21 - Valores de LOD (ng/mL) dos diferentes métodos de extracção (plasma). .	67
Tabela 22- Valores de LOD (ng/mL) dos diferentes métodos de extracção (urina).....	68
Tabela 23 - Valores para a recuperação dos diversos métodos de extracção líquido-líquido (plasma).....	70
Tabela 24 - Valores para a recuperação dos diversos métodos de extracção em fase sólida (plasma).....	71
Tabela 25 - Valores para a recuperação dos diversos métodos de extracção líquido - líquido (urina).....	72
Tabela 26 - Valores para a recuperação dos diversos métodos de extracção em fase sólida (urina).....	73
Tabela 27 - Recuperação total dos diversos métodos de extracção nas amostras de plasma.....	74
Tabela 28 - Recuperação total dos diversos métodos de extracção nas amostras de urina. ....	74

## ABREVIATURAS

---

- 5-HT - serotonina
- AC - adenil ciclase
- AMOX - amoxapina
- AMT - amitriptilina
- ANaSEs - antidepressivos noradrenérgicos e serotoninérgicos específicos
- BDNF - *brain derived neurotrophic factor*
- CIT - citalopram
- CLO - clomipramina
- CREB - *cAMP response element binding protein*
- DA - dopamina
- DDESM - didesmetilcitalopram
- DDV - N,O-didesmetilvenlafaxina
- DES - desipramina
- DESF -desmetilfluoxetina
- DESM - desmetilcitalopram
- DESMAP - desmetilmaprotilina
- DESMIA - desmetilmianserina
- DESMIR - desmetilmirtazapina
- DLLME - Microextração líquido-líquido dispersiva
- DLX - duloxetina
- DOS - dosulepina
- DOX - doxepina
- FD - detector de fluorescência
- FDA - *Food and Drug Administration*
- FID - detector de ionização de chama
- FLU - fluoxetina
- FLV - fluvoxamina
- G -proteína G
- GC - cromatográfica gasosa
- HPLC - cromatografia líquida de alta performance
- HPTLC - cromatografia em camada fina de alta eficiência

ICH - *International Conference on Harmonisation*  
IMAO - inibidores de monoamino-oxidase  
IMI - imipramina  
ISRS - inibidores selectivos da recaptação da serotonina  
ISRSNa - inibidores selectivos da recaptação serotonina noradrenégicos  
LC - cromatografia líquida  
LLE - extracção líquido-líquido  
LOD - limites de detecção  
LOF - lofepramina  
MAO - monoamino-oxidase  
MAP - maprotilina  
MEL - metilfenidato  
MIA - mianserina  
MIL - milnacipran  
MIR - mirtazapina  
MLE - microextracção líquido-líquido  
MLT - melitracen  
MOC - moclobemida  
MS - detector de espectrometria de massa  
NA- noradrenalina  
NDV - N-desmetilvenlafaxina  
NOR - nortriptilina  
NORC - norclomipramina  
NORD - nordoxepina  
NORFLU - norfluoxetina  
NSER - N-desmetilsertralina  
ODV - O-desmetilvenlafaxina  
PAR - paroxetina  
PBS - tampão fosfato-salino  
PDA - detector de fotodiodos  
pKa - Constante de dissociação  
PKA - proteína cinase A  
PKC - proteína cinase C

PKCaM- cinase dependente de cálcio e calmodulina  
REB- reboxetina  
SBSE - extracção por absorção sobre barra de agitação  
SCIT - escitalopram  
SEP - setiptilina  
SER - sertralina  
SME/BE - microextracção com método de extracção back extraction  
SPE - extracção em fase sólida  
SUL - sulpirida  
TAN - tandspirona  
TCA - antidepressivos tricíclicos  
TRI - trimipramina  
TRZ - trazodona  
VEN - venlafaxina  
VIX - viloxazina

## JUSTIFICAÇÃO DO TEMA E OBJECTIVOS

---

O consumo de medicamentos para o tratamento das depressões tem vindo a aumentar ao longo da última década. Em Portugal, os dados publicados pelo INFARMED referem que o subgrupo farmacoterapêutico antidepressivos e psicotrópicos estava, em 2000, entre os 10 primeiros no que diz respeito aos encargos para o Serviço Nacional de Saúde, atingindo os 98 milhões de euros por ano. O facto de serem bastante comercializados, não só através de farmácias mas também de forma ilegal, via internet, tem contribuído para o aumento dos casos de etiologia médico-legal suicida. Os antidepressivos são considerados o segundo grupo de substâncias medicamentosas mais pesquisado na rotina laboratorial de toxicologia. Apesar de cada vez mais se prescreverem antidepressivos de nova geração, por apresentarem menos efeitos secundários e com menos riscos de overdose, ainda são muitos os casos de suicídio/overdose com antidepressivos tricíclicos. Deste modo, é cada vez mais necessário o desenvolvimento de metodologias analíticas, rápidas e sensíveis para a sua quantificação e monitorização destes.

Todas estas razões levaram a estabelecer os seguintes objectivos para o desenvolvimento do presente trabalho:

1. Optimização da fase móvel para obter uma boa separação cromatográfica dos analitos em estudo.
2. Desenvolver técnicas diferentes técnicas de preparação de amostra, utilizando quer a extracção em fase sólida (SPE) quer a extracção líquido-líquido (LLE), para a detecção de nove antidepressivos em plasma e em urina.
3. Comparar as diferentes técnicas no que respeita à selectividade, limites de detecção e recuperação.

4. Demonstrar que o HPLC/PDA pode ser uma técnica útil e ao alcance de qualquer laboratório para uma primeira fase da optimização de processos extractivos, reservando técnicas mais dispendiosas (como por exemplo LC/MS (MS) ou UPLC/MS (MS)) para a posterior validação dos métodos analíticos.

---

# REVISÃO DA LITERATURA

---

---

## 1. INTRODUÇÃO

---

A Organização Mundial da Saúde, define a depressão como um transtorno mental comum onde predominam uma série de sintomas, como perda de interesse pelas actividades de rotina, fadiga, sentimentos de inutilidade, falta de concentração, desejos de morte, perda de auto estima, de apetite ou de peso e insónias<sup>1</sup>. Estes sintomas apresentam formas mais ou menos intensas dependendo das oscilações de humor próprias de qualquer indivíduo.

Calcula-se que este transtorno afecte cerca de 20% dos indivíduos <sup>2</sup>.

Esta patologia está associada a episódios de grande duração, altas taxas de cronicidade, recaídas e a elevada morbi-mortalidade, uma vez que os pacientes com formas graves apresentam comportamento suicida <sup>3</sup>. Estima-se que cerca de 90% dos doentes depressivos não são observados, por conseguinte não podem ser diagnosticados e tratados. Dos restantes 10-12%, a grande maioria são tratados por um médico de clínica geral, sendo apenas uma baixa percentagem vista por um psiquiatra <sup>4</sup>.

O problema de identificar e tratar os casos de depressão é importante para a qualidade de vida e produtividade dos pacientes e para os planos de saúde, uma vez que os pacientes não correctamente tratados representam um maior custo<sup>4</sup>.

Actualmente não existem evidências de que as intervenções propostas para a prevenção primária da depressão sejam eficazes, ocorrendo muitas vezes combinações terapêuticas<sup>4</sup>.

O tratamento de primeira linha consiste, para a maioria dos doentes com depressão, em medicação antidepressiva, psicoterapia ou uma combinação das duas.

Como resultado, os antidepressivos estão entre as classes de medicamentos mais frequentemente prescritas. Segundo uma Estatística do Medicamento desenvolvida pelo INFARMED (Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde I.P.) em

2006, os psicofármacos eram o segundo grupo de medicamentos mais vendidos em Portugal. No mesmo estudo os antidepressivos encontram-se entre as 100 substâncias activas com maior número de embalagens dispensadas no Serviço Nacional de Saúde (SNS)<sup>5</sup>.

O tratamento farmacológico para a depressão tem evoluído bastante desde o desenvolvimento das primeiras terapêuticas na década de 50 <sup>6</sup>. A descoberta dos dois primeiros antidepressivos, a iproniazida e a imipramina remonta a 1957. Estes dois fármacos constituem os denominados protótipos das duas primeiras famílias de antidepressivos, os inibidores de monoamino-oxidase (IMAO) e os antidepressivos tricíclicos<sup>7</sup>. Antes da descoberta dos antidepressivos, o tratamento farmacológico era realizado essencialmente com substâncias sedativas extraídas do ópio, como o laúdano, ou ainda com barbitúricos e hidrato de cloral <sup>7</sup>.

A iproniazida foi durante muito tempo utilizada como fármaco para o tratamento da tuberculose, mas em 1952 Irving J. Selikoff e Edward Robitzek, observaram que este composto era um estimulador do Sistema Nervoso Central (SNC). De facto, nos doentes tuberculosos tratados com iproniazida verificavam-se alterações a nível psicológico, apresentando grande vitalidade e aumento gradual na sua actividade social <sup>8</sup>.

A descoberta das propriedades antidepressivas da imipramina deve-se exclusivamente a Roland Kühn<sup>7</sup>. Os laboratórios Geigy terão confiado a Kühn uma molécula que supostamente devia ser um anti-histamínico com propriedades sedativas<sup>7</sup>.

A sua estrutura era semelhante à da clorpromazina, mas os resultados que esta nova molécula apresentava no tratamento de psicoses eram inferiores. Kühn sugeriu então que este novo composto fosse utilizado no tratamento das depressões. Após os três primeiros casos, ficou convencido das propriedades antidepressivas da imipramina, facto que confirmou em 1957 após serem estudados quarenta doentes<sup>7</sup>.

Após esta data, surgiram outros antidepressivos, nomeadamente a amitriptilina em 1960 e a trimipramina um ano depois, surgindo assim a classe dos antidepressivos sedativos ou ansiolíticos<sup>7</sup>.

Na tabela seguinte resume-se a perspectiva histórica da descoberta dos diferentes grupos de antidepressivos.

Tabela 1 - Classificação dos antidepressivos monoaminérgicos de acordo com o mecanismo de acção e perspectiva histórica da sua introdução clínica (adaptado).<sup>8</sup>

FAMÍLIA	ABREVIATURA	1º FÁRMACO	PERÍODO
Inibidores da recaptção da serotonina (5-HT) e noradrenalina (NA), com o bloqueio da acção de diversos receptores	TCA	Imipramina	1957-1980
Inibidores irreversíveis MAO	IMAO	Fenelzina	1960-1965
Inibidores da recaptção da NA com o bloqueio de diversos receptores	-	Maprotilina	1970-1980
Antagonistas dos auto-receptores $\alpha_2$	-	Mianserina	1970-1980
Inibidores da recaptção selectiva de dopamina (DA)	SDRI	Bupropion	1980-1990
Inibidores da recaptção selectiva de 5-HT	SSRI	Fluoxetina	1980-1990
Inibidores reversíveis de MAO	RIMA	Moclobemida	1980-1995
Inibidores da recaptção de 5-HT e bloqueadores dos receptores da 5-HT <sub>2</sub>	-	Nefazodona	1985-1995
Antagonistas dos auto- e hetero- receptores $\alpha_2$ e receptores de 5-HT <sub>2</sub> e 5-HT <sub>3</sub>	NaSSA	Mirtazapina	1975-2000
Inibidores da recaptção da NA e 5-HT	NSRI	Venlafaxina	1975-2000
Inibidores da recaptção selectiva da NA	SNRI	Reboxetina	1980-2000

A introdução dos denominados antidepressivos atípicos, heterocíclicos ou de segunda geração (maprotilina, nomifensina, trazodona, mianserina, entre outros) em 1970 não aportou um grande progresso em relação aos antidepressivos clássicos, quer a nível terapêutico quer a nível de segurança<sup>8</sup>.

Por outro lado, no final da década de 80, surgiu de uma nova geração de agentes neurofarmacológicos, que constituiu uma revolução na terapia antidepressiva. Aparece assim um novo grupo de antidepressivos, os denominados inibidores selectivos da recaptção da serotonina (SSRI), sendo mais seguros e com uma melhor tolerância a

nível do organismo <sup>6,8</sup>. Caracterizam-se por apresentar uma notável diminuição dos efeitos secundários, particularmente cardiovasculares e anticolinérgicos, sendo a redução destes efeitos a principal vantagem destes fármacos <sup>7</sup>. Não está claro que possa existir um fármaco mais específico, mais eficaz e com terapêutica mais rápida, mas este facto pode ser um motivo para a continuação da investigação farmacológica <sup>7</sup>.

---

## **2. PROPRIEDADES FÍSICO -QUÍMICAS**

---

Como indicámos anteriormente, a classificação dos estados depressivos é complicada e o mesmo sucede com os antidepressivos. De facto, existem várias classificações, as classificações podem basear-se na estrutura química, no mecanismo de acção, ou em ambos.

Segundo a classificação apresentada por Moffat et al<sup>9</sup>, os antidepressivos podem ser divididos em:

- 1) Os tradicionais antidepressivos tricíclicos (TCAs), incluindo amitriptilina, clomipramina, dosulepina (dotiepina), doxepina e imipramina, entre outros.
- 2) A nova geração de antidepressivos, que inclui os inibidores selectivos da recaptação da serotonina (SSRIs) citalopram, fluoxetina, fluvoxamina, paroxentina e sertralina.
- 3) Os inibidores da monoamino-oxidase (IMAOs) como a moclobemida e a selegilina.
- 4) Os inibidores selectivos da recaptação serotonina e noradrenalina (ISRSN) que inclui a mirtazapina, a neofazodona, a duloxetina e a venlafaxina, entre outros <sup>9</sup>.

Na figura 1 encontram-se representados os antidepressivos mais característicos de cada grupo.

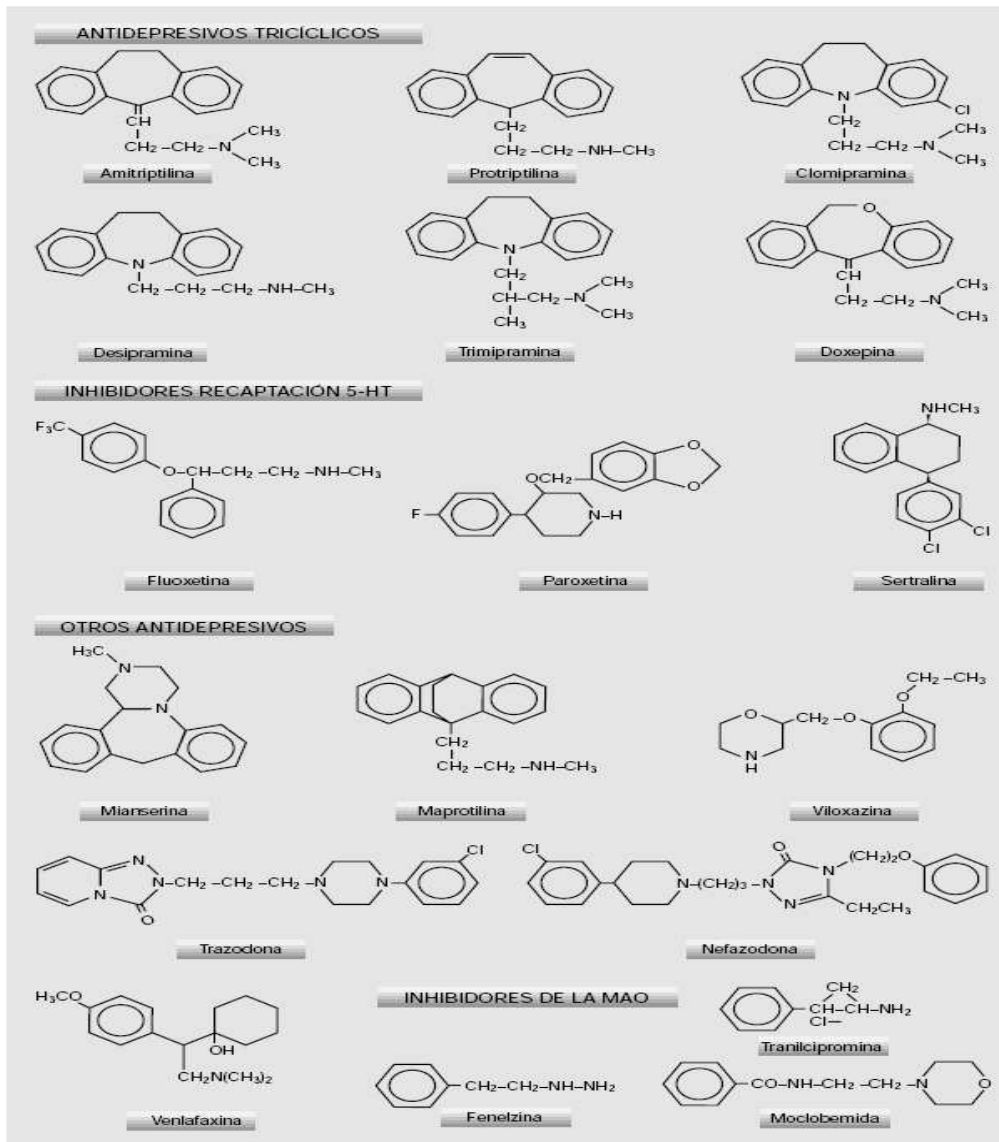


Figura 1 - Estrutura química dos antidepressivos mais representativos de cada grupo<sup>10</sup>.

De forma a facilitar a compreensão da absorção destes compostos no organismo, bem como delinear as estratégias para a extracção dos antidepressivos das matrizes biológicas, são descritas, na secção seguinte algumas das propriedades físico-químicas dos antidepressivos mais característicos de cada grupo.

## 2.1 ANTIDEPRESSIVOS TRICÍCLICOS

O nome de tricíclicos advém da sua estrutura molecular. Estes apresentam três anéis de carbono, diferenciando os diversos elementos do grupo ao nível do radical. Normalmente o radical pode ser um grupo amina secundária ou terciária. Na figura 2 encontram-se representados alguns antidepressivos tricíclicos, onde também estão patentes as suas diferenças a nível do radical.

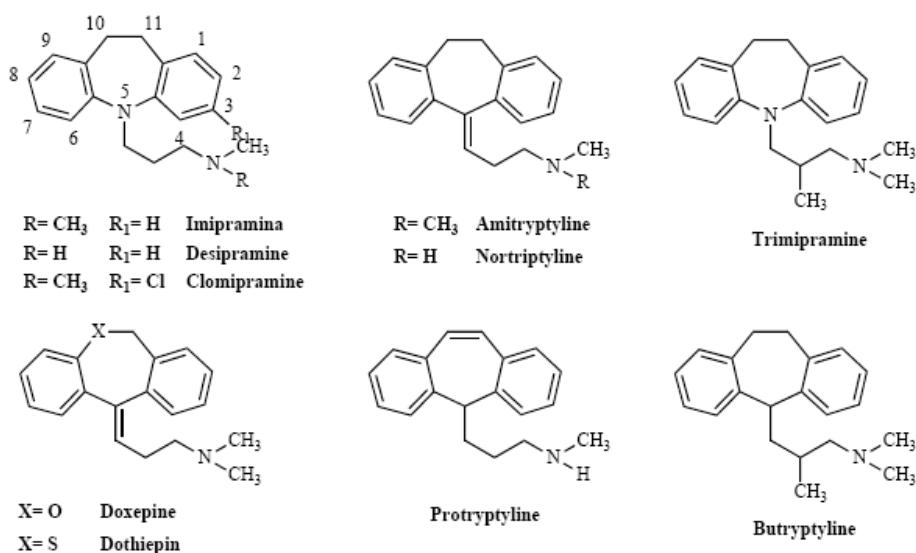
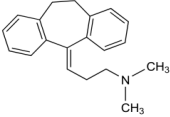
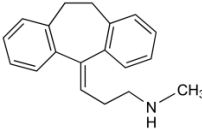
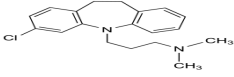
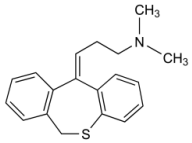


Figura 2 - Estrutura química de alguns antidepressivos tricíclicos com cadeia lateral "clássica".

Na tabela 2 são apresentadas algumas das propriedades físico-químicas dos antidepressivos mais representativos do grupo dos tricíclicos.

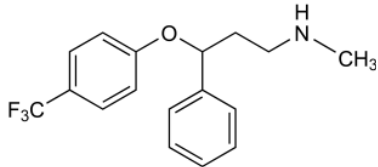
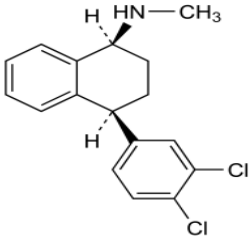
Tabela 2 - Estrutura químicas e características físico-químicas de alguns antidepressivos tricíclicos.

Antidepressivo	Estrutura química	Peso molecular (g/mol)	Aspecto	Solubilidade	pKa (25°C)
Amitriptilina		277,4	Pó de cor amarela pálido ou acastanhada	Praticamente insolúvel em água, solúvel 1 em 120 de etanol, 1 em 6 de acetona, e 1 em 8 de clorofórmio	9,4
Nortriptilina		263,4	Pó de cor branca	Solúvel 1 em 50 de água, 1 em 10 de etanol, e 1 em 5 de clorofórmio, praticamente insolúvel em éter, acetona, benzeno	9,7
Clomipramina		314,9	Pó cristalino de cor branca ou ligeiramente amarelada	Solúvel 1 em 8 de água, 1 em 5 de etanol, 1 em 3 de clorofórmio, e 1 em 100 de éter	--
Dotiepina		295,4	Pó cristalino de cor branca ou ligeiramente amarelada	Solúvel 1 em 2 de água, 1 em 8 de etanol, e 1 em 2 de clorofórmio, praticamente insolúvel em éter	--

## 2.2 INIBIDORES SELECTIVOS DA RECAPTAÇÃO DA SEROTONINA

Os inibidores selectivos da recaptação de serotonina apresentam, ao contrário dos tricíclicos uma estrutura diversificada, o que faz com que tanto o metabolismo como a disposição no organismo sejam diferentes, como por exemplo a ligação a proteínas plasmáticas, o perfil de excreção, e a concentração plasmática etc <sup>11</sup>. Na seguinte tabela encontra-se descrita a fórmula química e as propriedades físico-químicas de dois antidepressivos representativos deste grupo.

Tabela 3 - Estruturas químicas e características físico-químicas de alguns SSRI.

Antidepressivo	Estrutura química	Peso molecular (g/mol)	Aspecto	Solubilidade	pKa (25°C)
Fluoxetina		309,3	Pó cristalino de cor branca ou quase branca	Solúvel em metanol, etanol, acetonitrilo, clorofórmio e acetona; pouco solúvel em acetato de etilo, diclorometano e água (máximo de 14 g / L); insolúveis no tolueno, ciclohexano e hexano	--
Sertralina		342,7	Pó cristalino de cor branca ou quase branca	Solúvel em água 3,8 mg / mL (pH 5,3), em clorofórmio: metanol (1:1), em solução metanólica de 0,1 M de ácido clorídrico, em dimetilsulfóxido, etanol e N, N-dimetilformamida; praticamente insolúvel em solução aquosa 0,1 M de ácido clorídrico, solução aquosa 0,1 M de hidróxido de sódio, álcool isopropílico, acetona, acetato de etilo e acetonitrilo	9.48

### 2.3 INIBIDORES DA MONOAMINO-OXIDASE

Os inibidores da monoamino-oxidase (MAO) podem ser divididos tradicionalmente em 2 grandes grupos:

- a) Derivados hidrazínicos: iproniazida, isocarboxazida, fenelzina e nialamida;
- b) Derivados não hidrazínicos: tranilcipromina e pargilina <sup>10</sup>.

Na figura 3 encontra-se representado o primeiro antidepressivo descoberto (iproniazida) e os representantes dos dois subgrupos deste grupo.

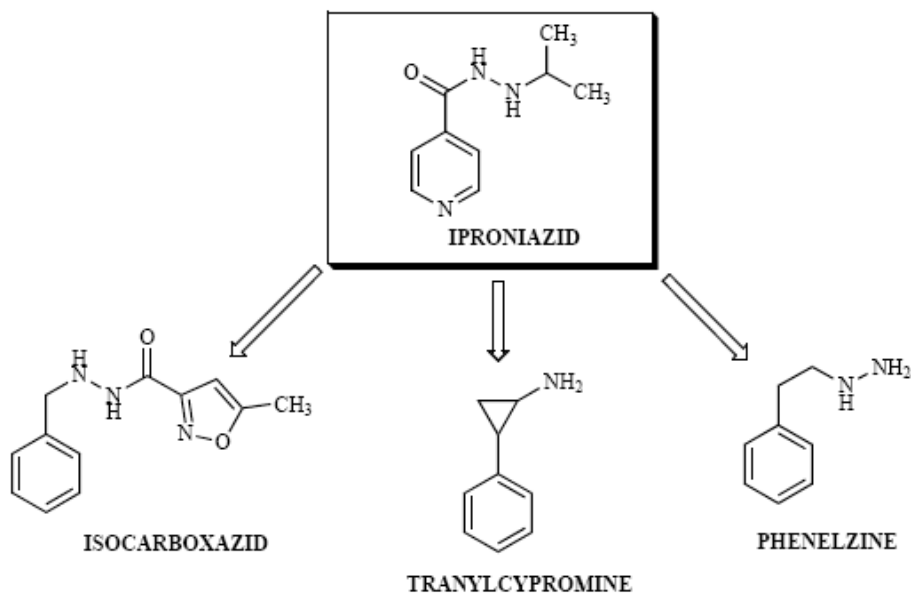


Figura 3- Estrutura química de alguns antidepressivos Inibidores da Monoamino-Oxidase<sup>8</sup>

As estruturas químicas e as características físico-químicas de um IMAO derivado hidrazínico e um derivado não hidrazínico, ambos subgrupos destes inibidores, encontram-se descritas na tabela 4.

Tabela 4 - Estrutura químicas e características físico-químicas de alguns IMAO.

Antidepressivo	Estrutura química	Peso molecular (g/mol)	Aspecto	Solubilidade	pKa (25°C)
Iproniazida		179,22	Pó cristalino de cor branca	Solúvel 1 em 5 de água e 1 em 90 de etanol; praticamente insolúvel em clorofórmio e éter	--
Tranilcipromina		133,19	Pó cristalino de cor branca	Solúvel 1 em 20 a 1 em 25 de água, e 1 em 2000 de éter; muito pouco solúvel em etanol, praticamente insolúvel em clorofórmio.	--

## 2.4 INIBIDORES SELECTIVOS DA RECAPTAÇÃO DA SEROTONINA E NORADRENALINA (ISRSN)

Como inibidores selectivos da recaptação da serotonina e noradrenalina, os representantes mais conhecidos deste grupo são a venlafaxina, duloxetine e minalciprano. Do ponto de vista estrutural, todos eles apresentam alguma diversidade<sup>12</sup>. Como se pode observar na tabela seguinte, estes compostos apenas têm em comum o grupo amina, sendo a estrutura base diferente.

Tabela 5 - Estrutura químicas e características físico-químicas de alguns ISRSN

Antidepressivo	Estrutura química	Peso molecular (g/mol)	Aspecto	Solubilidade	pKa (25°C)
Venlafaxina		277,4	Pó cristalino de cor branca ou quase branca	É solúvel em água a 572 g /L	--
Milnaciprano		246,34	--	--	--

## 2.5 OUTROS ANTIDEPRESSIVOS

Dentro deste grupo incluem-se os antidepressivos que funcionam como antagonistas ou inibidores ao nível dos receptores.

### a) Antagonistas dos auto-receptores $\alpha_2$

A mianserina (Figura 4) é um exemplo do grupo dos antagonistas dos auto-receptores  $\alpha_2$ <sup>13</sup>. Apresenta-se em forma de cristais ou de pó branco, tem uma estrutura tetracíclica e um peso molecular de 264,4 g/mol. É solúvel em água (1 / 50), em etanol (1/100) e em clorofórmio (1/20)<sup>9</sup>.

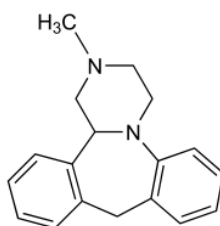


Figura 4 - Estrutura química da mianserina.

b) Antagonistas dos auto- e hetero- receptores  $\alpha_2$  e receptores de 5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>3</sub> (NaSSA)

Tal como a mianserina, a mirtazapina (Figura 5) apresenta uma estrutura tetracíclica, diferindo apenas um grupo amina. Possui um peso molecular de 265,36 g/mol<sup>69,14</sup>. É um pó branco cristalino de cor branco creme e pouco solúvel em água<sup>6</sup>.

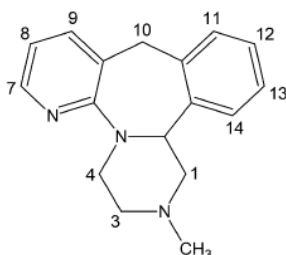


Figura 5 - Estrutura química da mitrazapina<sup>14</sup>

c) Inibidores da recaptção da Na com o bloqueio de diversos receptores

Tal como os anteriores, apresentam uma estrutura tetracíclica. O mais representativo do grupo é a a maprotilina (Figura 6). É um pó cristalino de cor branca, com um peso molecular de 277,40 g/mol e pouco solúvel em água, mas muito solúvel em metanol. Trata-se de um forte inibidor dos receptores  $\alpha_1$ , moderado dos 5-HT<sub>2</sub>, dos muscarínicos, dos H<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>, fraco dos  $\alpha_2$  e extremamente fraco dos 5-HT<sub>1</sub><sup>9</sup>.

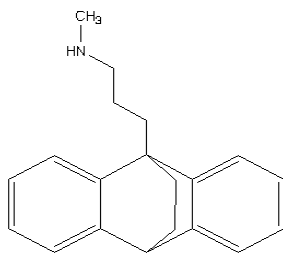


Figura 6 - Estrutura química da maprotilina

d) Antagonista dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2</sub>

Neste grupo podem incluir-se trazodona e a nefazodona. Estes fármacos são maioritariamente antagonistas dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2</sub>, embora a nefazodona também iniba a recaptção da serotonina <sup>10</sup>.

Tabela 6 - Estrutura química e características físico-químicas dos antagonista dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2</sub>.

Antidepressivo	Estrutura química	Peso molecular (g/mol)	Aspecto	Solubilidade	pKa (25°C)
Trazodona		371.9	Cristais	Solúvel 1 em 50 de etanol e metanol; muito solúvel em acetona e benzeno; ligeiramente solúvel em éter	--
Nefazodona		470.01	Pó cristalino branco	Muito solúvel em clorofórmio, solúvel em propilenoglicol, ligeiramente solúvel em polietileno glicol e água	--

---

### **3. MECANISMO DE ACÇÃO**

---

A acção farmacológica dos antidepressivos ocorre principalmente no SNC. Os antidepressivos actuam ao nível da recaptação da serotonina, noradrenalina e dopamina, e dos seus receptores <sup>8,10</sup>.

O efeito dos antidepressivos envolve basicamente a interacção entre o neurotransmissor e o receptor. Esta interacção é a consequência da acção inibitória dos sistemas de recaptação (TCA e ISRS) e de metabolização (IMAO), pelo que monoaminas aumentam na fenda sináptica, facilitando a acção ao nível dos receptores. Estes processos ocorrem rapidamente, e são detectados desde a primeira administração, porém o efeito da terapêutica só se começa a notar após algumas semanas de tratamento<sup>8</sup>.

Esta correlação sugere que o efeito dos citados antidepressivos ocorre após uma série de adaptações a nível neuronal, provocado por uma administração crónica destas drogas <sup>8</sup>.

Cada grupo de antidepressivos apresenta um modo distinto de actuar a nível da recaptação e/ou dos receptores, pelo que para uma melhor compreensão dos diferentes mecanismos estes serão descritos separadamente.

### 3.1 ANTIDEPRESSIVOS TRICÍCLICOS

Inibem igualmente a recaptação da noradrenalina e serotonina, inibindo assim o mecanismo responsável pela captação da serotonina e da noradrenalina nos neurónios adrenérgicos e serotoninérgicos. Isto é, bloqueiam a proteína de recaptação que age como transportador no terminal de nervo<sup>8</sup>. Como demonstra a figura 7, estes fármacos ligam-se aos transportadores da recaptação da serotonina e noradrenalina, impedindo a sua recaptação e subsequente degradação pela MAO. Este bloqueio dos transportadores promove o aumento da concentração dessas monoaminas na fenda sináptica, até que estas atingem valores normais.

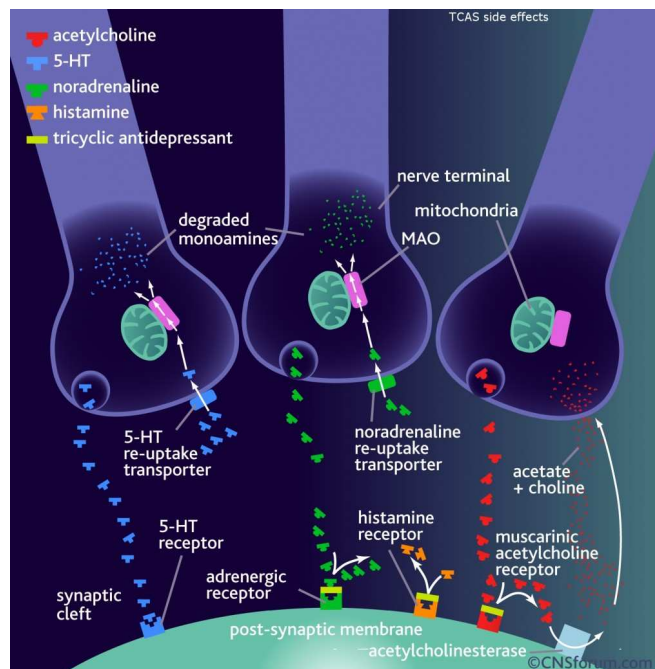


Figura 7 - Esquema do mecanismo de ação dos antidepressivos tricíclicos<sup>15</sup>

### 3.2 INIBIDORES SELECTIVOS DA RECAPTAÇÃO DA SEROTONINA E NORADRENALINA

#### (ISRSN)

Quanto ao mecanismo de acção dos ISRSN, este baseia-se no bloqueio da recaptação da serotonina e da noradrenalina por ligação aos seus transportadores nas células pré-sinápticas, conduzindo a um aumento da concentração de ambos os neurotransmissores na fenda sináptica (Figura 8).

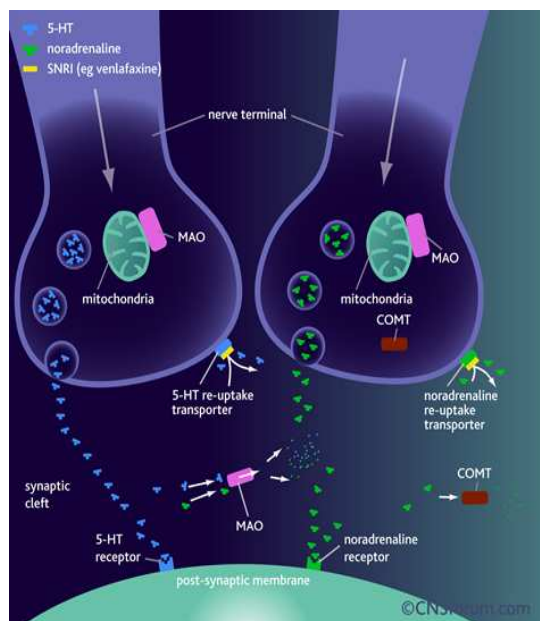


Figura 8 - Esquema do mecanismo de acção dos ISRSN<sup>15</sup>.

### 3.3 INIBIDORES SELECTIVOS DA RECAPTAÇÃO DA SEROTONINA (ISRS)

O mecanismo de acção dos SSRI ocorre, tal como o próprio nome indica, ao nível da recaptação da serotonina pelas células pré-sinápticas.

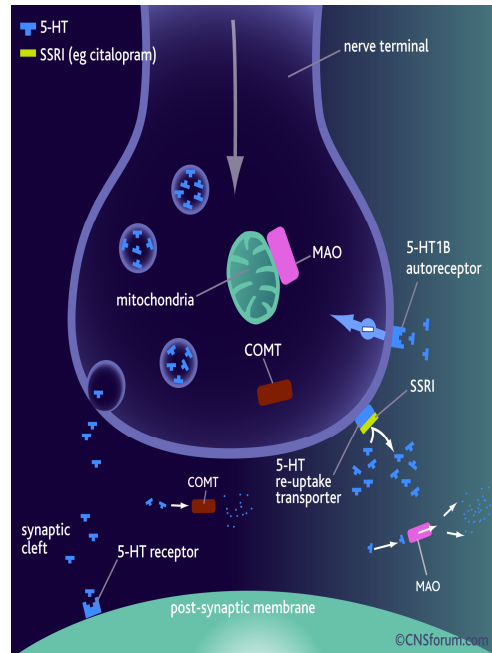


Figura 9 - Mecanismo de acção dos ISRS<sup>16</sup>.

Como se pode observar na Figura 9, os ISRS ao ligar-se ao transportador de recaptação da serotonina inibem a sua recaptação e consequente degradação. Este bloqueio na recaptação provoca uma acumulação de serotonina na fenda sináptica, levando por sua vez a um aumento na estimulação das células pós-sinápticas do cérebro.

Apesar do mecanismo descrito, pequenas quantidades de serotonina continuam a ser degradadas na fenda sináptica, o que significa que o bloqueio dos transportadores não é total<sup>17</sup>.

### 3.4 INIBIDORES DA MONOAMINO-OXIDASE (IMAO)

A monoamine-oxidase (MAO) é uma enzima envolvida no metabolismo das monoaminas, tais como a serotonina e a noradrenalina. Esta apresenta dois subtipos de enzima (MAOA e MAOB) e converte as monoaminas no seu aldeído intermediário via ácido carboxílico. A maioria dos IMAO liga-se de forma não selectiva, ou seja tanto se ligam ao subtipo MAOA ou MAOB, sendo a sua ligação é irreversível<sup>10</sup>.

Recentemente, é que se vieram a desenvolver os inibidores selectivos da forma A da MAO, que se diferenciam pelo facto da inibição enzimática ser reversível. O inibidor da MAOA mais utilizado a nível terapêutico é a moclobemida, existindo também a brofaromina e a toloxatona<sup>10</sup>.

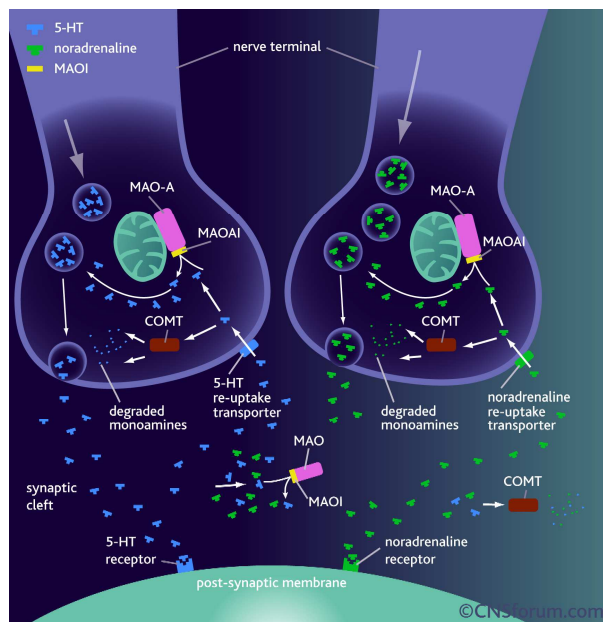


Figura 10 - Mecanismo de acção dos IMAO<sup>15</sup>.

Como demonstrado na Figura 10, os inibidores de MAO, ao ligarem-se a esta inibem-na, prevenindo assim a degradação das monoaminas. Tal facto promove a disponibilidade de uma maior quantidade de monoaminas na fenda sináptica. Como os doentes depressivos têm falta de monoaminas, este mecanismo de inibição aumenta o nível destas na fenda sináptica até valores normais<sup>15</sup>.

### 3.5 ANTIDEPRESSIVOS NORADRENÉGCOS E SEROTONÉRGICOS ESPECÍFICOS (ANASEs)

Os antidepressivos noradrenégcos e serotonérgicos específicos (ANASEs), têm um duplo mecanismo que aumenta a concentração da serotonina e da noradrenalina na fenda sináptica para valores normais<sup>18</sup>.

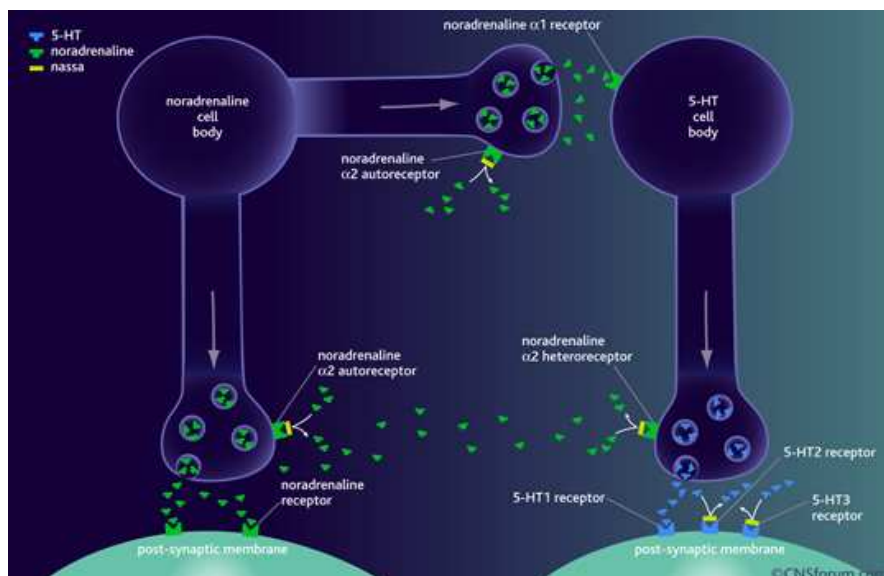


Figura 11 - Mecanismo de acção dos ANASEs<sup>15</sup>.

Estes fármacos ligam-se e inibem os autoreceptores  $\alpha_2$  e os heteroreceptores  $\alpha_2$  da noradrenalina.

Os ANASEs também bloqueiam os receptores 5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>3</sub> na membrana pós-sináptica, passando a neurotransmissão a ser mediada pelo 5-HT<sub>1</sub><sup>15</sup>. Estes receptores estão acoplados à proteína G, excepto o 5-HT<sub>3</sub>, que é um canal iónico activado por ligandos. Todos eles são activados pela ligação da serotonina, e podem apresentar uma resposta excitatória (5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>3</sub>) ou inibitória (5-HT<sub>1</sub>). Estes receptores influenciam vários processos biológicos e neurológicos, como é o caso da agressividade e ansiedade, do apetite, da cognição, da aprendizagem, da memória, do humor, das náuseas, do sono e dos processos de termorregulação<sup>19</sup>.

### 3.6 NOVAS HIPÓTESES NO MECANISMO DOS ANTIDEPRESSIVOS: DA FARMACOLOGIA SINÁPTICA PARA A FARMACOLOGIA INTERNEURONAL

O aumento de monoaminas na fenda sináptica produz uma série de alterações intracelulares neuroquímicas, que influenciam decisivamente o efeito da terapêutica. Os efeitos intracelulares dos antidepressivos, tornou possível que fosse proposta a hipótese de que estas drogas, após aumentar a acção das monoaminas (os primeiros mensageiros) nos seus receptores correspondentes, iram ter um ponto de convergência nas proteínas cinases (PKA, PKC, PKCaM), independentemente da via de tradução de sinal que os segundos mensageiros desencadeiam (AMPc, diacilglicerol-DAG, etc.). As proteínas cinases são consideradas terceiros mensageiros, e segundo esta hipótese, iriam controlar a expressão génica através da fosforilação dos factores de transcrição, que podem ser considerados como quartos mensageiros (Figura 12)<sup>8</sup>.

De acordo com esta hipótese, SSRI, TCA e os SNRI teriam um mecanismo comum, excepto na acção sobre a fenda sináptica, no qual modulam através de expressão genética a síntese de certas substâncias, tais como proencefalina, neurotensina, BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*)<sup>1</sup> ou enzimas, como a tirosina-hidroxilase. Em suma, esta acumulação de substâncias provocaria mudanças de adaptação funcional, o que tende a compensar as eventuais anomalias presentes na depressão<sup>8</sup>.

Tudo isto constituiu um enorme avanço para a compreensão do que poderia ser o início da psicofarmacologia deste novo milénio, capaz de mudar de uma farmacologia superficial e sináptica para uma psicofarmacologia intracelular <sup>8</sup>.

---

<sup>1</sup> O BDNF é uma neurotrofina com um papel fundamental no desenvolvimento do sistema nervoso e no funcionamento do cérebro adulto, regulando a sobrevivência e diferenciação neuronais e a formação e manutenção das sinapses.

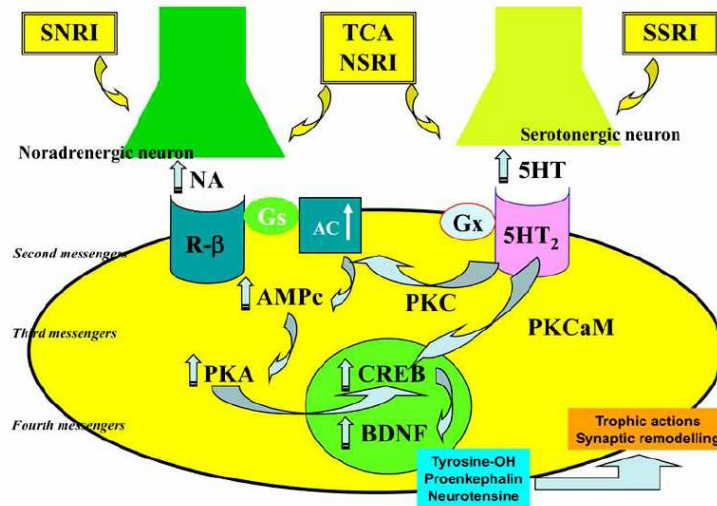


Figura 12 - Mecanismo geral da acção das diferentes famílias de antidepressivos <sup>8</sup>.

Abreviaturas da figura: TCA (antidepressivos tricíclicos); NSRI (inibidores selectivos da recaptação da noradrenalina e serotonina); SNRI (inibidores selectivos da recaptação da noradrenalina); SSRI (inibidores selectivos da recaptação da serotonina); NA (noradrenalina); 5HT (serotonina); G (proteína G); AC (adenil ciclase); PKA (proteína cinase A); PKC (proteína cinase C); PKCaM (cinase dependente de cálcio e calmodulina); CREB (cAMP response element binding protein); BDNF (brain derived neurotrophic factor)

#### 4. ESTATÍSTICA DE CONSUMO DE ANTIDEPRESSIVOS EM PORTUGAL

Segundo uma estatística de consumo de antidepressivos em Portugal gentilmente cedida pelo INFARMED, no ano de 2007 os antidepressivos SSRI estão entre os mais vendidos, verificando-se ainda a prevalência significativa de antidepressivos tricíclicos e IMAO. Na seguinte tabela estão apresentados os antidepressivos vendidos a nível nacional, e os encargos que estes representam no SNS.

Tabela 7 - Consumo de antidepressivos, por substância activa, em Ambulatório no Serviço Nacional de Saúde ano de 2007 (cedido pelo INFARMED).

Substância activa	Número de embalagens	Encargos para o Sistema Nacional de Saúde (€)	Valor PVP (€)
Fluoxetina	671.204	12.734.267	19.277.972
Escitalopram	605.352	12.000.898	17.361.966
Sertralina	551.892	12.251.475	20.389.991
Venlafaxina	510.082	10.297.515	17.972.237
Paroxetina	385.901	9.490.457	15.879.589
Trazodona	358.267	4.277.378	6.230.930
Mirtazapina	266.228	5.470.067	8.182.532
Amitriptilina	234.217	383.613	604.498
Clomipramina	143.538	1.090.314	1.582.255
Fluvoxamina	96.871	2.132.016	3.066.388
Tianeptina	93.621	1.033.444	1.521.557
Dosulepina	85.234	712.323	1.047.345
Maprotilina	80.781	358.077	585.449
Mianserina	60.270	1.010.960	1.430.285
Duloxetina	59.345	1.749.274	2.548.304
Hiperiçao	26.175	143.542	251.070
Amitriptilina + Perfenazina	25.662	56.091	124.370
Milnaciprano	24.290	393.107	560.520

ASPECTOS GERAIS DOS ANTIDEPRESSIVOS

Oxitriptano	24.281	258.432	621.258
Moclobemida	23.305	305.169	597.860
Trimipramina	19.812	88.754	130.767
Imipramina	18.595	27.299	45.233
Nortriptilina	13.947	36.713	57.264
Pirlindol	8.614	228.070	330.422
Reboxetina	7.872	159.153	230.118
Citalopram	6.227	49.930	74.884
Bupropiom	3.201	60.603	89.240
Viloxazina	16	87	151
<b>Total</b>	<b>4.404.800</b>	<b>76.799.028</b>	<b>120.794.454</b>

Com base nestes dados e na disponibilidade dos padrões no laboratório, foi feita a escolha dos antidepressivos em estudo. Nos tópicos seguintes, apenas se fará a descrição dos antidepressivos estudados no presente trabalho.

---

## 5. FARMACOCINÉTICA

---

Como foi referido no tópico anterior, apenas vão ser referidas as características dos antidepressivos em estudo: amitriptilina, nortriptilina, clomipramina, dotiepina, sertralina, fluoxetina, trazodona, mianserina e venlafaxina. Para explicar melhor a farmacocinética destas substâncias, estas irão ser agrupadas de acordo com o seu mecanismo de acção.

### 5.1 AMITRIPTILINA, NORTRIPTILINA, CLOMIPRAMINA E DOTIEPINA

Os antidepressivos tricíclicos são fármacos que, de forma geral, possuem uma boa absorção por via oral, e ligam-se fortemente às proteínas plasmáticas (80-95%), pelo que a sua biodisponibilidade é geralmente baixa.

Na forma livre, o fármaco alcança rapidamente os diferentes tecidos, e o seu volume aparente de distribuição é alto (10-50 L/Kg). A sua elevada lipossolubilidade, possibilita que atravessem a barreira placentária e passem para o leite materno, onde podem alcançar elevadas concentrações. Sofrem um efeito de primeira passagem de intenso, onde se formam os principais metabolitos.

O metabolismo dos antidepressivos tricíclicos ocorre por duas vias fundamentais: a N-demetilação e a hidroxilação do anel aromático, originando metabolitos que, em geral, mantêm a sua actividade biológica ou parte dela. A inactivação ocorre por glucuronização dos metabolitos oxidados para dar origem a derivados que são excretados na urina <sup>9,10</sup>.

Os metabolitos são a nortriptilina (também pode ser administrado como fármaco), a hidroxinortriptilina, a monodesmetilclomipramina e a desmetildotiepina, metabolitos estes da amitriptilina, nortriptilina, clomipramina e dotiepina respectivamente<sup>9,10</sup>.

A sua semi-vida de eliminação é elevada, podendo situar-se entre 10 e 20 horas. Devido a esta elevada semi-vida, são suficientes 1 a 2 tomas diárias do fármaco para atingir o efeito terapêutico desejado<sup>10</sup>.

## 5.2. SERTRALINA

É absorvida lentamente após a administração oral, atingindo a sua concentração máxima no plasma ao fim de 4,5-8,4 horas após a ingestão. O equilíbrio é alcançado cerca de uma semana após a primeira toma.

Distribui-se amplamente por todo o organismo e apresenta uma elevada disponibilidade, com valores superiores a 44%. Liga-se fortemente (98,5%), às proteínas plasmáticas, e o seu volume de distribuição é alto (25 L/Kg).

A sertralina e o seu metabolito N-desmetilsertralina (inactivo em modelos de depressão *in vivo*) são extensivamente metabolizados. A sertralina sofre N-demetilação, desaminação oxidativa e consequentemente redução, hidroxilação e conjugação com o ácido glucurónico. A N-desmetilsertralina sofre processos de desaminação oxidativa e subsequente redução, hidroxilação e conjugação com o ácido glucurónico.

São ambos excretados na urina (0,2% na forma inalterada) e nas fezes. Na urina aproximadamente entre 40-45% da dose administrada é excretada ao fim de 9 dias. Podem também ser secretados no leite materno <sup>9,11</sup>.

## 5.3 FLUOXETINA

É rapidamente absorvida após a administração e metabolizada no fígado por demetilização. O metabolito primário é a norfluoxetina, que é excretada por via urinária. Pode ainda ocorrer uma reacção de O-dealquilização que produz trifluorometilfenol e ácido hipúrico.

Apresenta uma elevada biodisponibilidade (80%), e liga-se fortemente às proteínas plasmáticas (95%). O volume de distribuição também é elevado.

Cerca de 80% da dose administrada são excretados na urina, menos de 10% na forma inalterada. Aproximadamente 15% são excretados nas fezes. A fluoxentina é distribuída de igual modo por todo o organismo e é ainda secretada no leite materno<sup>9,11</sup>.

#### 5.4 TRAZODONA

A trazodona absorve-se completamente após administração por via oral, e tem uma forte ligação às proteínas plasmáticas, cerca de 90%.

Metaboliza-se extensivamente por hidroxilação e oxidação.

Cerca de 75% da dose diária é excretada na urina na forma de metabolitos, e num prazo de 72 horas, 15% da dose é eliminada nas fezes. Menos de 1% da dose é excretada de forma inalterada. Os metabolitos excretados em maior quantidade na urina são derivados do ácido propiónico (ácido 3-oxo-1,2,4-triazolo[4,3-*a*]piridina-2-propiónico), *p*-hidroxitrazodona, derivados do dihidrodiol e os conjugados com ácido glucurónico e com sulfato. No plasma o metabolito maioritário é o 1-(3-clorofenil)piperazina (metabolito activo), mas apenas 1% é excretado na urina<sup>9</sup>.

#### 5.5 MIANSERINA

A mianserina é rapidamente absorvida após a administração oral. Tem uma elevada união a proteínas plasmáticas (90%) e, apresenta um volume de distribuição de 13L/kg. Os metabolitos maioritários são a *N*-desmetilmianserina, 8-hidroxi mianserina (ambos activos *in vivo*) e a *N*-óxido mianserina.

Cerca de 30-40% da dose administrada é excretada na urina em 24 horas, e um total de 70% é excretado ao longo de vários dias, principalmente na forma de metabolitos conjugados. Apenas 5% é excretado de forma inalterada. A mianserina atravessa a barreira hemato-encefálica e a placenta, e pode ser encontrada no leite materno.

## 5.6 VENLAFAXINA

Absorve-se facilmente após a administração oral. O efeito de primeira passagem ocorre no fígado, e um dos produtos originados é o metabolito activo *O*-desmetilvenlafaxina. São também produzidos dois metabolitos menos activos, a *N*-desmetilvenlafaxina e *N,O*-didesmetilvenlafaxina.

A venlafaxina e o seu metabolito *O*-desmetilvenlafaxina ligam-se aproximadamente 30% a proteínas plasmáticas. O volume de distribuição é de 6,8 L/Kg para a venlafaxina e 5,7 L/Kg para a *O*-desmetilvenlafaxina.

É excretada predominantemente na urina, principalmente na forma de metabolitos (30% a *O*-desmetilvenlafaxina, 6-19% a *N,O*-didesmetilvenlafaxina e 1% a *N*-desmetilvenlafaxina), e apenas de 1 a 10% na forma inalterada. Aproximadamente 2% são excretados nas fezes <sup>9</sup>.

---

## 6. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS, DOSES E TOXICIDADE

---

Cerca de um 5% dos indivíduos em terapia com antidepressivos sofre efeitos secundários. De forma geral, os antidepressivos que bloqueiam a recaptção da serotonina, apresentam menos efeitos secundários que os chamados clássicos (TCA e IMAO).

Os efeitos secundários mais comuns são os seguintes:

### 6.1 EFEITOS ANTICOLINÉRGICOS

Numerosos antidepressivos bloqueiam os receptores colinérgicos muscarínicos, o que provoca, dependendo da dose, da idade e da susceptibilidade do paciente, secura da boca, retenção urinária, obstipação e visão turva. A síndrome anticolinérgica central, com desorientação, delírios e alucinações, depende da acção de bloqueio sobre os receptores muscarínicos centrais, e pode ser mais ou menos intensa<sup>10</sup>.

Como alguns destes efeitos são também sintomas da depressão, por vezes é difícil distinguir quando se trata da doença ou do efeito dos antidepressivos.

### 6.2 EFEITOS CARDIOVASCULARES

Os mais frequentes são a hipotensão postural, as palpitações e a taquicardia, apesar de também poder aparecer depressão directa do miocárdio. A hipotensão postural deriva da inibição dos receptores  $\alpha_1$ - adrenérgicos, enquanto a taquicardia se deve à inibição da recaptção de noradrenalina e do efeito muscarínico.

A hipotensão e a produção de arritmias podem limitar o uso de antidepressivos, sobretudo em doentes cardíacos. Nesses doentes, são preferencialmente utilizados os inibidores selectivos da recaptção da serotonina, nos quais os efeitos secundários de

índole cardiovascular são em princípio menos graves, apresentando no entanto maior número de efeitos secundários a nível gastrointestinal.

### 6.3 OUTROS EFEITOS

Têm-se descrito com alguma frequência problemas ao nível da memória, estados de confusão, sobretudo em pessoas de idade. Também estão descritos casos de aumento de peso, excesso de sudação e outras reacções mais específicas, como hepatite alérgica, erupção cutânea, fotossensibilidade e priapismo.

Por último, os inibidores da recaptção da serotonina, podem apresentar de um modo geral como efeitos secundários, anorexia, grande intolerância gastrointestinal e disfunção eréctil.

Devido à tendência suicida de alguns doentes depressivos, a frequência de sobredosagens é elevada. De facto, a OMS calcula que o número de suicídios provocados pela terapia com antidepressivos é de 850.000 mortes por ano<sup>1</sup>. Os sintomas de intoxicação representam um aumento exponencial dos efeitos secundários anteriormente apresentados. A toxicidade cardiovascular manifesta-se como taquicardia sinusal ou supraventricular, que pode produzir morte súbita. A toxicidade neurológica manifesta-se por excitação, convulsões, movimentos coreanos, depressão respiratória e coma<sup>10</sup>. Na seguinte tabela são apresentados os valores referidos pela Associação Internacional de Toxicologistas Forenses (TIAFT), para os antidepressivos em estudo. Refira-se que são valores aproximados, uma vez que a maioria dos dados são obtidos através de estudos de casos.

Tabela 8 - Doses terapêuticas, tóxicas e letais de diversos antidepressivos<sup>20</sup>.

Antidepressivo	Dose terapêutica (µg/mL)	Dose tóxica (µg/mL)	Dose letal ((µg/mL)
Amitriptilina	0,05-0,2	-	-
Nortriptilina	0,07-0,02	0,25-0,5	1,5-2
Dotiepina	0,02-0,15	0,8	5-19
Clomipramina	0,09-0,25	0,4*	1-2*
Sertralina	0,05-0,25	0,29-1,6	--
Fluoxetina	0,1- 0,45	1,5-2	0,9-5.0*
Venlafaxina	0,2-0,75	1-1,5*	6,6*
Mianserina	0,015-0,07	0,5-5	2*
Trazodona	0,5-2,5	4	12-15

\*corresponde a valores para o metabolito activo

---

## 7. DETERMINAÇÃO DE ANTIDEPRESSIVOS EM MATRIZES BIOLÓGICAS

---

A preparação das amostras para que possam ser introduzidas num sistema analítico é um procedimento crucial na análise química moderna, representando a maior parte do trabalho e custo do laboratório. De facto, a presença de interferentes na matriz pode mascarar ou interferir com a análise dos compostos de interesse, pelo que devem ser eliminados ou minimizados pela preparação da amostra, originando cromatogramas mais limpos. Por outro lado, a vida dos equipamentos analíticos (nomeadamente as colunas cromatográficas) é prolongada pelo uso de amostras mais limpas, gastando-se menos tempo na sua manutenção<sup>21</sup>.

Existem várias técnicas para preparação das amostras, incluindo a centrifugação, a filtração, a precipitação, a extracção líquido-líquido, a extracção em fase sólida, e a microextracção em fase sólida <sup>22</sup>.

Uma vez que o presente trabalho incidiu sobre duas técnicas de extracção, serão precisamente estas sobre as quais nos vamos centrar nesta revisão bibliográfica. Para facilitar a compreensão deste capítulo, será realizada uma pequena introdução sobre a extracção líquido-líquido e a extracção em fase sólida.

## 7.1 EXTRACÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO (LLE)

É sem dúvida a técnica de preparação de amostra mais utilizada a nível laboratorial. Trata-se de uma técnica simples que se baseia na diferença de solubilidade do analito entre a matriz onde este se encontra e o solvente de extracção. Desta forma, o solvente ideal será aquele que é capaz de extrair a maior quantidade de analito possível, reduzindo ao mínimo o número de interferências (Figura 13). Para que este objectivo seja alcançado, utilizam-se habitualmente vários passos de extracção com diferentes solventes ou misturas de solventes.

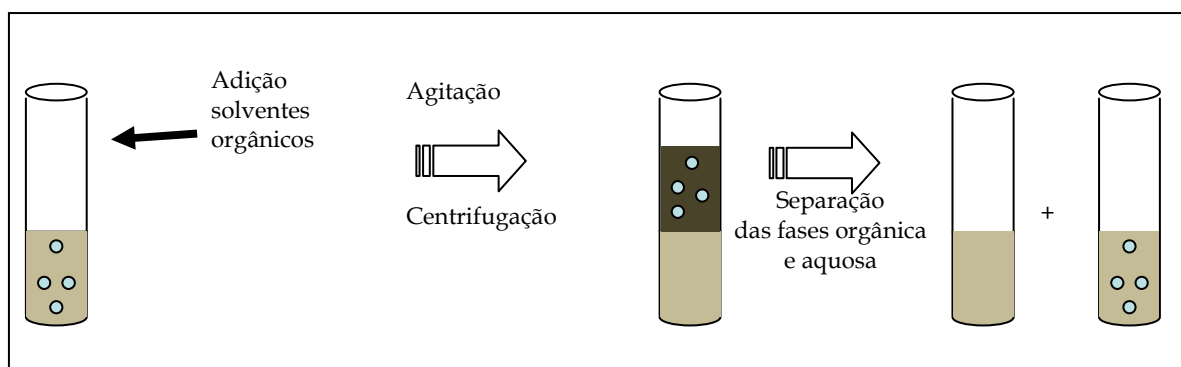


Figura 13- Etapas no procedimento de extracção líquido-líquido.

Os solventes mais utilizados na extracção de antidepressivos incluem o tetracloreto de carbono ( $\text{CCl}_4$ )<sup>23</sup>, a mistura de hexano:álcool isoamílico em diferentes proporções, e.g. (92:8, v:v)<sup>12</sup>, (99:1, v:v)<sup>6</sup>, éter dietílico<sup>24</sup> e hexano<sup>25</sup>.

## 7.2 EXTRACÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE)

A SPE foi introduzida em meados dos anos 70. Este conceito, similar à cromatografia líquida de baixa pressão, é a base para a designação de uma técnica prática de preparação de amostras, consistindo em pequenas colunas descartáveis de extracção preenchidas com uma variedade de enchimentos. Esta técnica é mais sensível e mais prática, proporcionando muitas vezes extracções mais eficientes e selectivas que a

tradicional LLE <sup>26</sup>. A separação dos compostos existentes na amostra fundamenta-se no equilíbrio de distribuição do analito entre as duas fases envolvidas no processo extractivo: uma fase sólida, constituída por um sólido adsorvente, e uma fase líquida, a amostra que contém o analito <sup>27</sup>.

O processo de extracção consiste basicamente na passagem de uma amostra líquida (por aplicação de pressão positiva ou vácuo) através de uma coluna de extracção. Os analitos são adsorvidos no material de enchimento por vários mecanismos diferentes, sendo removidos com um solvente apropriado após terminado o processo. O principal objectivo da SPE é a remoção quantitativa do analito a partir da solução em que se encontra, eliminando no mesmo processo interferentes da matriz (substâncias proteicas, sais, ureia, ácidos gordos, etc.), e a sua posterior concentração num pequeno solvente adequado à análise cromatográfica<sup>21</sup> (Figura 14).

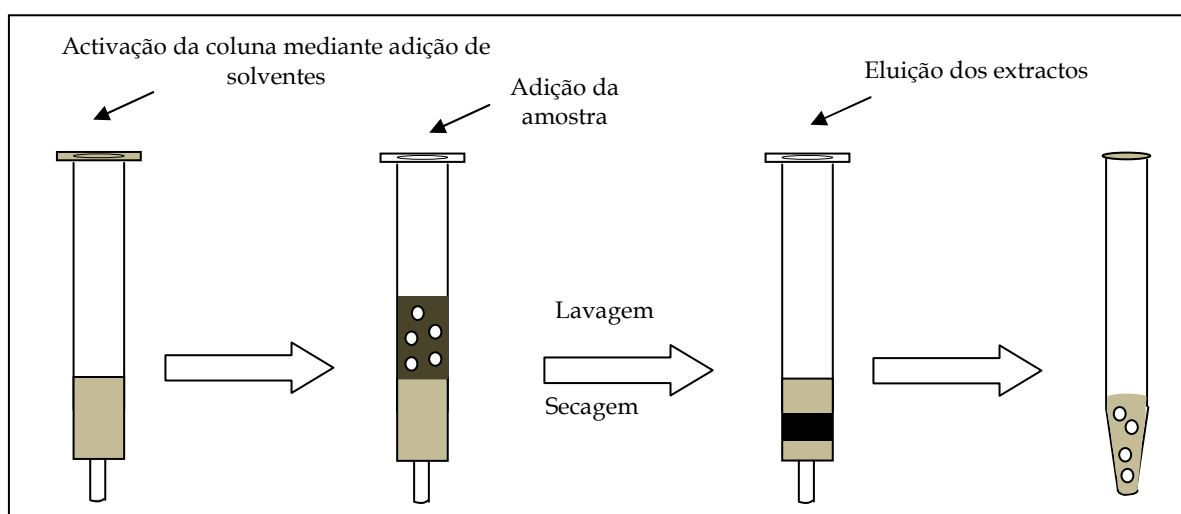


Figura 14- Etapas no processo de extracção em fase sólida.

Existem quatro tipos de mecanismos extractivos: fase reversa, fase normal, troca iónica, e exclusão molecular<sup>27</sup>. O modo de separação mais utilizado na SPE é o de fase reversa, em que a fase estacionária utilizada é apolar, isto é, as partículas adsorventes são hidrofóbicas, como por exemplo a sílica ligada a grupos octadecilsilano ( $C_{18}$ ) e

octilsilano (C<sub>8</sub>)<sup>28</sup>. Os solventes de eluição são em regra apolares, podendo também ser utilizados solventes polares como metanol ou acetonitrilo<sup>27,29</sup>.

Por outro lado, na SPE de fase normal a fase estacionária é polar, e.g. alumina e alguns tipos de sílica gel, florisil, cianopropilsilano (CN), aminopropilsilano<sup>28</sup>. A eluição dos analitos é favorecida com a utilização de solventes polares que permitam a quebra das ligações entre o grupo funcional do composto e a superfície da fase estacionária<sup>27</sup>.

Num terceiro mecanismo, SPE de troca iónica, as partículas sólidas do adsorvente contêm grupos funcionais de troca aniónica ou catiónica responsáveis pelas interações electrostáticas que ocorrem entre os compostos iónicos, ou susceptíveis de sofrerem ionização, e o adsorvente com um grupo funcional de carga oposta. Soluções ácidas, básicas, ou tampões de força iónica elevada, constituem os solventes de eluição<sup>27,29</sup>.

Na SPE por exclusão molecular o mecanismo de separação baseia-se na dimensão do analito, nas dimensões dos poros da fase estacionária e na capacidade das suas moléculas para penetrarem nos poros. Em geral, é um método utilizado em combinação com fases estacionárias de fase reversa e de troca iónica<sup>27</sup>.

Vários métodos para a determinação de antidepressivos em amostras biológicas têm vindo a ser utilizados ao longo do tempo, surgindo cada vez mais novas técnicas de extracção e/ou de identificação. De facto, as metodologias utilizadas para a determinação destas substâncias são muito vastas, desde técnicas muito simples como reacções colorimétricas<sup>9</sup>, espectrometria<sup>30-33</sup>, até técnicas mais complexas como os imunoensaios<sup>34</sup>, ou a electroforese capilar<sup>35</sup>. No entanto, as técnicas mais utilizadas foram, são e serão as técnicas cromatográficas.

Foi efectuada uma revisão bibliográfica deste tipo de técnicas e dos procedimentos de extracção utilizados para a determinação destes compostos em matrizes biológicas (Tabelas 9, 10 e 11). A base de dados pública Pubmed foi utilizada para esta pesquisa,

tendo esta sido limitada a artigos científicos publicados desde o ano 2000 até à actualidade. As palavras-chave utilizadas nesta pesquisa foram as seguintes:

- *determination of antidepressants in plasma;*
- *determination of antidepressants in hair;*
- *determination of antidepressants and biological matrices;*
- *determination of antidepressants in serum;*
- *determination of antidepressants in urine;*
- *antidepressants and chromatography;*
- *antidepressants and HPLC;*
- *antidepressants and LC;*
- *antidepressants and GC;*
- *antidepressants and extraction;*
- *analytical determination of antidepressants.*

Tabela 9 - Métodos analíticos para a determinação de antidepressivos em plasma, soro, sangue, urina, fluido oral e vísceras.

Referência (Autor e ano)	Analito (s)	Amostra (quantidade)	Técnica de preparação da amostra	Sistema cromatográfico e de detecção		LOD/LOQ (µg/mL ou ng/mL)	Recuperação
Liu <i>et al.</i> (2006) <sup>24</sup>	VEN, ODV, NDV, DDV	Plasma (0,5mL)	LLE	LC	MS	0,4 ng/mL /3,5 ng/mL para a VEN, 0,2 ng/mL /2,2 ng/mL para a ODV, 0,3 ng/mL /2,7 ng/mL para a NDV, 0,2 ng/mL /1,9 ng/mL para a DDV	> 77% para todos os compostos
Patel <i>et al.</i> (2008) <sup>25</sup>	TRZ, m-clorofenilpiperazina	Plasma (0,5mL)	LLE	LC	MS/MS	10,0 ng/mL/ n.d. para a TRZ, 0,20 ng/mL/ n.d. para a m- clorofenilpiperazina	79,7% para a para a m- clorofenilpiperazina , 53,1 % para a TRZ
Mercolini <i>et al.</i> (2007) <sup>36</sup>	DLX	Plasma (0,5 mL)	SPE	HPLC	UV	0,7 ng/mL / 2.0 ng/mL	>90%
Mandrioli <i>et al.</i> (2006) <sup>37</sup>	SER, NSER	Plasma (0,25mL)	SPE	HPLC	UV	2,5 ng/mL /7,5 ng/mL para ambos os analitos	>94% para ambos os compostos
Yazdi <i>et al.</i> (2008) <sup>23</sup>	AMT, NOR	Plasma (0,5mL)	DLLME	GC	FID	0,5 µg/mL /n.d para a AMT e 10 µg/mL/n.d para a NOR	Apresenta um intervalo de valores de 54,76– 74,02
Juan <i>et al.</i> (2005) <sup>38</sup>	FLU, CIT, PAR, VEN	Plasma (0,5 mL)	SPE	LC	MS	0,5 ng/mL/ n.d para a FLU, 0,3 ng/mL/n.d para o CIT, 0,3 ng/mL/n.d para a PAR, 0,1 ng/mL para a VEN	> 95% para todos os compostos
Shinozuka <i>et al.</i> (2006) <sup>39</sup>	IMI, AMT, DES, TRI, NOR, CLO, AMOX, LOF, DOS, MAP, MIA, SEP, TRZ, FLV, PAR, MIL, SUL, TAN, MEL e MLT	Plasma (1mL)	SPE	LC	MS	0,03-0,63 µg/mL / 0,10-1,0 µg/mL	69 - 102%.
Chaves <i>et al.</i> (2006) <sup>40</sup>	SER, MIR, FLU, CIT, PAR, IMI, NOR, AMT e DES	Plasma (1 mL)	SBSE	LC	UV	Apresenta um interval de valores de n.d /10,0 - 40,0 ng/mL	52- 110%

<b>Uddin et al (2008)</b> <sup>41</sup>	AMT, DOX, CLO, IMI	Urina (100 µL ) Plasma (50 µL)	SPE	HPLC	UV	0,08-1,17 ng/mL /0,28-3,91 ng/mL	92,8-108,7%
<b>Bagheri et al (2008)</b> <sup>42</sup>	CIT	Plasma (0,5 mL)	SME/BE	HPLC	FD	0,3 ng/mL /0,8 ng/mL	n.d.
<b>Kovacevic et al (2006)</b> <sup>43</sup>	FLU, NORFLU	Plasma (1 mL)	LLE	LC	MS	n.d /0,0025 µg/ml para a FLU n.d /0,01µg/ml para a NORFLU	90,75-94,48% para a FLU e 69,09-83,43% para a NORFLU
<b>Patel et al. (2008)</b> <sup>44</sup>	VEN, ODV	Plasma (0,2 mL)	LLE	LC	MS/MS	n.d / 2.00 ng/ml para ambos	93,2 - 101%
<b>Wenzel et al (2005)</b> <sup>45</sup>	SER, AMT, MIR, DESMIR	Sangue femoral e coração, urina, bÍlis, conteúdo gástrico (0,5 mL de cada amostra), fígado, músculo, cérebro, rins e pulmões (0,5mg de cada amostra)	LLE	LC; GC	MS/MS; MS	1 ng/mL/ n.d para a MIR e 4 ng/mL/n.d para a MIR	84,9% para a MIR e 70% para a DESM
<b>Castro et al (2008)</b> <sup>46</sup>	AMT, IMI, CLO, CIT, SER, FLU, FLV, VEN, NOR, DES, NORC, NORFLUO e	Fluído oral (0,2 mL) plasma (0,2 mL)	SPE	LC	MS/MS	n.d / 2 ng/mL para todos excepto n.d/10ng/mL para a CLO no fluído oral, n.d/2ng/mL para todos excepto n.d/4ng/mL para a AMT e NOR e n.d/10 ng/mL para a CLO E FLV no plasma.	49% -72%
<b>Patel et al (2009)</b> <sup>47</sup>	SER, NVD	Plasma (0,3 mL)	LLE	LC	MS/MS	n.d/0,5 ng/mL	73,7 - 85,7%
<b>Fernandes et al (2006)</b> <sup>48</sup>	FLU, NORFLU	Plasma (1 mL)	SPME	HPLC	UV	n.d/ 25 ng/mL	1,94 - 10,54 %

<b>Silva et al (2008)</b> <sup>49</sup>	MIR, CIT, PAR, DLX, FLU, SER	Plasma (0,5 mL)	SPME	LC	UV	5 - 20 ng/mL, /20 - 50 ng/mL para os vários analitos	5,3- 43,5%
<b>Margalho et al (2007)</b> <sup>50</sup>	AMT, NOR	Sangue e conteúdo gástrico (1 mL cada amostra)	SPE	GC	MS	9 ng/mL/ 100 ng/mL para a AMT 6 ng/mL /100ng/mL para a NOR	65% para a AMT e 63% para a NOR
<b>Castaing et al (2007)</b> <sup>51</sup>	FLU, PAR, SER, FLV, CIT, MIL, VEN, MIR, NORFLU, DESM, DDESM, NDV, DESMIR	Sangue (0,5 mL)	LLE	LC	MS	--/5 ng/mL para todos os compostos excepto para a VEN e DVN que é de 20 ng/mL	70-90% excepto para a DESM DVN, MIL, <70% para a DDESM
<b>Kirchherr et al (2006)</b> <sup>52</sup>	AMT, CIT, CLO, DES, DOX, FLU, FLV, IMI, MAP, MIA, MIR, MOC, NORC, NORD, NORFLU, NOR, ODV, PAR, REB, SER, TRZ, TRI, VEN, VIX	Soro (0,1mL)	LLE	LC	MS/MS	n.d./ 0,23 - 12,7 ng/mL para os diversos antidepressivos	Encontra-se no intervalo de 92 - 111% para os diversos antidepressivos
<b>Wózniakiewicz et al (2008)</b> <sup>53</sup>	AMT, DES, DOX, IMI, NORD, NOR	Soro (1 mL)	LLE e MAE	HPLC	DAD	0,05/0,15 para a NORD, 0,01/0,05 para a NOR, 0,05/0,15 para a DES, 0,03/0,11 para a AMT, 0,02/0,06 para a IMI, 0,01/0,04 para a DOX	94-105%
<b>Gunnar et al (2004)</b> <sup>54</sup>	AMT, VEN, FLV, TRI, IMI, DOX, MIA, FLU, CLO, CIT, SER, NOR, MIR	sangue (1 mL)	LLE	GC	MS	25 ng/mL excepto para a VEN, CLO, IMI, MIA, SER, MIR e CIT que é <10 ng/mL / 50 ng/mL excepto VEN, IMI, MIA, SER, MIR e CIT que é de 25 ng/mL	n.d.
<b>Martínez et al (2005)</b> <sup>55</sup>	TRZ	sangue (2,5 mL)	SPE	GC	NPD	0,033µg/mL/0,109µg/mL	87-91%
<b>Kłys et al (2009)</b> <sup>56</sup>	VEN	sangue (5mL),	LLE	LC	MS/MS	0,01µg/mL/ 0,05µg/mL	69%

<p><b>Frahnert <i>et al</i> (2003)<sup>57</sup></b></p>	<p>MIR, VEN, ODV, FLV, FLU, NORFLU, SER, CIT, AMT, NOR, IMI, DES, DOX, NORD, CLO, NORC, TRI, MIA, MAP, REB, MOC</p>	<p>Soro (1 mL)</p>	<p>SPE</p>	<p>HPLC</p>	<p>UV</p>	<p>n.d</p>	<p>75-99%</p>
---	---	--------------------	------------	-------------	-----------	------------	---------------

Tabela 10 - Métodos analíticos para a determinação de antidepressivos em cabelo.

Referência (Autor e ano)	Analito (s)	Amostra (quantidade)	Técnica de preparação da amostra	Sistema cromatográfico e de detecção		LOD/LOQ (ng/mg)	Recuperação
Doherty <i>et al</i> (2007) <sup>58</sup>	SER, PAR, SCIT	Cabelo (200 mg)	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Klys <i>et al</i> (2005) <sup>59</sup>	CLO, NORC	Cabelo (50 mg)	SPE	LC	MS	0,5 ng/mg; 0,5 ng/mg para ambos analitos	91-93%
Wille <i>et al</i> (2008) <sup>60</sup>	MIR, VIX, VEN, CIT, MIA, REB, FLU, FLV, SER, MAP, MLT, PAR, NSER, DESMAP, DESF, DESMIA, DESMIR, DESM e DDESM	Cabelo (± 2 cm)	SPE	GC	MS	n.d/0,025-0,0625 ng/mg	51-106%
Smyth <i>et al</i> (2006) <sup>61</sup>	CIT, FLU, MIR, PAR, SER, e VEN	Cabelo (200mg)	LLE	LC	MS/MS	n.d	n.d
Shen <i>et al</i> (2002) <sup>62</sup>	AMT, DOX	Cabelo (10-20 mg)	LLE	GC	MS	n.d	N.D
Polenova <i>et al</i> (2001) <sup>63</sup>	AMT	Cabelo (n.d)	MLE	HPTLC	n.d	n.d	90%
Müller <i>et al</i> (2000) <sup>64</sup>	MAP	Cabelo (50 mg)	SPE	LC	MS/MS	n.d	n.d
Klys <i>et al</i> (2009) <sup>56</sup>	VEN, MOC	Cabelo (20mg)	LLE	LC	MS/MS	0,01ng/mg/ 0,05ng/mg para ambos	98% para a VEN e 99% para a MOC

Tabela 11 - Métodos analíticos utilizados na monitorização de antidepressivos durante a gravidez .

Referência (Autor e ano)	Analito (s)	Amostra (quantidade)	Técnica de preparação da amostra	Sistema cromatográfico e de detecção		LOD/LOQ (ng/mL)	Recuperação
Kim <i>et al</i> (2005) <sup>65</sup>	FLU, NORFLU	Leite materno (100 µL), sangue (100 µL), sangue do cordão umbilical (100 µL)	n.d	GC e LC	MS e MS/MS	n.d /1ng/mL para ambos com GC/MS n.d /0,1 ng/mL para a FLU e n.d /0,5 ng/mL NORFLU com o ensaio LC/MS/MS	n.d
Hostetter <i>et al</i> (2000) <sup>66</sup>	FLV, SER, NSER, VEN, ODV	Soro, sangue do cordão umbilical, líquido amniótico (n.d)	SPE	HPLC	UV	2.0 ng/mL/n.d	n.d
Loughhead <i>et al</i> (2006) <sup>67</sup>	CIT, SCIT, FLU, FLV, PAR, SER, VEN	Líquido amniótico (n.d)	SPE	HPLC	UV	2.0 ng/mL/n.d	n.d

**Abreviaturas utilizadas nas tabelas:** amitriptilina (AMT), amoxapina (AMOX), citalopram (CIT), clomipramina (CLO), cromatografia em camada fina de alta eficiência (HPTLC), cromatografia gasosa (GC), cromatografia líquida (LC), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), desipramina (DES), desmetilcitalopram (DESM), desmetilfluoxetina (DESF), desmetilmaprotilina (DESMAP), desmetilmianserina (DESMIA), desmetilmirtazapina (DESMIR), detector de ionização de chama (FID), detector de fluorescência (FD), didesmetilcitalopram (DDESM), *Microextração líquido-líquido dispersiva* (DLLME), dosulepina (DOS), doxepina (DOX), duloxetina (DLX), escitalopram (SCIT), detector de espectrometria de massas (MS), extracção em fase sólida (SPE), extracção líquido-líquido (LLE), extracção por microondas (MAE), microextração líquido-líquido (MLE), extracção por absorção sobre barra de agitação (SBSE), fluoxetina (FLU), fluvoxamina (FLV), imipramina (IMI), lofepramina (LOF), maprotilina (MAP), melitracen (MLT), metilfenidato (MEL), mianserina (MIA), microextração com método de *back extraction* (SME/BE), milnacipran (MIL), mirtazapina (MIR), moclobemida (MOC), N,O-didesmetilvenlafaxina (DDV), N-desmetilsertralina (NSER), N-desmetilvenlafaxina (NDV), resultados não apresentados (n.d.) norclomipramina (NORC), nordoxepina (NORD), norfluoxetina (NORFLU), nortriptilina (NOR), O-desmetilvenlafaxina (ODV), paroxetina (PAR), reboxetina (REB), sertralina (SER), setiptilina (SEP), sulpirida (SUL), tandspirona (TAN), trazodona (TRZ), trimipramina (TRI), detector de ultra- violeta (U.V), venlafaxina (VEN), viloxazina (VIX).

---

## PARTE EXPERIMENTAL

---

---

## 1. INSTRUMENTAÇÃO

---

### 1.1. SISTEMA CROMATOGRÁFICO

Utilizou-se um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) 600 da Waters (Mildford, MA, USA), acoplado a um detector de fotodiodos (PDA) do modelo 2996 da Waters (Mildford, MA, USA). A separação cromatográfica foi efectuada com uma coluna de fase reversa Xterra®MS C<sub>18</sub> de dimensões 150x 0.5 µm x 4.6 mm i.d., da Waters (Mildford, MA, USA). Foi usado um injector manual com uma válvula rheodyne modelo 7725i e um loop de 20 µL da Waters (Mildford, MA, USA).

### 1.2. MATERIAL GERAL DE LABORATÓRIO

- Balança analítica modelo CP225 da Sartorius;
- Vortéx Mixer modelo 230V da Labnet International;
- Medidor de pH modelo 744 pH meter da Metrohm;
- Sistema de purificação de água Milli-Q Advantage A10® system da Millipore;
- Placa de agitação magnética modelo ASINCRO, J.P da Selecta;
- Micropipetas automáticas Gilson e Eppendorf:
  - 10µL - BC51382 da Gilson;
  - 100 µL - BC50621 da Gilson;
  - 1000 µL - Bc50244 da Gilson;
  - 2500 µL - 378461 da Eppendorf Reference;
  - 5000 µL - 206190 da Eppendorf Research;
- Câmara frigorífica refrigeração a 4°C da Dagard;
- Sistema de extracção WAT200683 da Waters (USA);
- Bomba de vácuo Modelo DOA-P505-BN da GAST (USA);
- Câmara de congelação Electrolux Inspire;

- Sistema de ultrasons Transonic 460/H, da Elma (Alemanha);
- Toxitubes<sup>®</sup>A da Varian;
- Colunas de extracção Bond Elut Certify<sup>®</sup> C<sub>18</sub>, 500 mg da Varian;
- Colunas de extracção Oasis HLB<sup>®</sup> 10 mg, e Oasis MCX<sup>®</sup> 30 mg da Waters;
- Tubos de vidro de 10 mL e respectivas tampas, da Schott<sup>®</sup>;
- Balões volumétricos de 5, 10, 100, 250, 1000 mL.

---

## 2. REAGENTES

---

- Acetonitrilo LiChrosolv<sup>®</sup>, Merck;
- Ácido acético (CH<sub>3</sub>COOH) pro analysi, Fluka;
- Ácido clorídrico (HCl) 37% pro analysi, Carlo Erba;
- Água Milli-Q;
- Álcool Isoamílico pro analysi, Sigma Aldrich;
- Cloreto de potássio (KCl);
- Cloreto de sódio (NaCl);
- Diclorometano pro analysi, Merck;
- Dihidrogenofosfato de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), Sigma Aldrich;
- Éter dietílico pro analysi, Merck;
- Fosfato de potássio dibásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), Pancreac;
- Hexano pro analysi, J.T Baker;
- Hidróxido de amónio pro analysi (NH<sub>4</sub>OH), J.T Baker;
- Hidróxido de sódio (NaOH), Sigma Aldrich;
- Isopropanol pro analysi, Sigma Aldrich;
- Metanol LiChrosolv<sup>®</sup>, Merck;

---

### 3. PADRÕES

---

- Cloridrato de amitriptilina, pureza  $\geq 98\%$ , Sigma Aldrich, (St. Louis, MO, USA);
- Cloridrato de nortriptilina, pureza  $\geq 98\%$ , Sigma Aldrich, (St. Louis, MO, USA);
- Cloridrato de clomipramina, pureza  $\geq 98\%$ , Sigma Aldrich, (St. Louis, MO, USA);
- Cloridrato de dotiepina, pureza  $\geq 98\%$ , LCG - Promochem (Middlesex, UK);
- Cloridrato de fluoxetina, pureza  $\geq 98\%$ , Sigma Aldrich, (St. Louis, MO, USA);
- Cloridrato de mianserina, pureza  $\geq 98\%$ , Sigma Aldrich, (St. Louis, MO, USA);
- Cloridrato de sertralina, pureza  $\geq 98\%$ , gentilmente cedido pela Pfizer (Groton, USA) e pela Bluepharma (Coimbra, Portugal);
- Cloridrato de Trazodona, pureza  $\geq 98\%$ , Sigma Aldrich, (St. Louis, MO, USA);
- Cloridrato de Venlafaxina, pureza  $\geq 98\%$ , Sigma Aldrich, (St. Louis, MO, USA);
- Cloridrato de Protriptilina, pureza  $\geq 98\%$ , Sigma Aldrich, (St. Louis, MO, USA)

A protriptilina foi usada como padrão interno (P.I.), devido ao facto de não ser comercializada em Portugal. Por outro lado, apresenta um bom comportamento cromatográfico e não interfere com os outros antidepressivos nem com as matrizes biológicas utilizadas.

---

### 4. MATRIZES BIOLÓGICAS

---

O plasma e a urina foram as matrizes utilizadas na realização deste trabalho. No caso das amostras de plasma, utilizaram-se bolsas excedentes de transfusões provenientes do Instituto Português do Sangue. As amostras de urina foram obtidas de voluntários do *staff* do laboratório. Ambas as amostras foram conservadas refrigeradas a 4°C.

---

## 5. PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES

---

### 5.1. SOLUÇÕES PADRÃO

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

Para balões volumétricos de 5 mL, foram pesados 5 mg de cada um dos padrões e adicionado metanol até perfazer um volume final de 5 mL. Obteve-se assim uma concentração final de 1 mg/mL, sendo esta solução armazenada a 4°C e protegida da luz. A partir desta solução foram efectuadas diluições sucessivas com metanol para obter as soluções de trabalho de 50 e 5 µg/mL. No caso da protriptilina, a solução de trabalho foi preparada numa concentração 50 µg/mL. Também estas soluções foram armazenadas a 4°C ao abrigo da luz. Refira-se que, foi preparada uma solução a 1µg/mL para cada um dos compostos. Ao passo que, as restantes soluções são uma mistura de todos os analitos com excepção do padrão interno.

### 5.2. OUTRAS SOLUÇÕES

#### 5.2.1. TAMPÃO DIHIDROGENOFOSFATO DE POTASSIO 25 mM, PH 7

Para um volume final de 1000 mL foram pesados 1,7g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 0,291g de NaOH, tendo sido adicionada água Milli-Q até perfazer um volume final de 1000mL.

#### 5.2.2. TAMPÃO FOSFATO SALINO (PBS) PH 7

Para um volume final de 1000 mL pesaram-se 200mg de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 200mg de KCl, 8g de NaCl e 1,15g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , para um balão volumétrico e aferiu-se com água Milli-Q.

**5.2.3. ÁCIDO CLORÍDRICO 0,1 M**

Para um volume final de 100 mL mediram-se 827 $\mu$ L de HCl 37%, para um balão volumétrico e aferiu-se com água Milli-Q.

**5.2.4. HIDRÓXIDO DE AMÓNIO 4,5M**

Para um volume final de 250 mL mediram-se 43,3 mL de NH<sub>4</sub>OH 25%, para um balão volumétrico e aferiu-se com água Milli-Q.

**5.2.5. HIDRÓXIDO DE SÓDIO 0,5M**

Para um volume final de 100 mL pesaram-se 2 g de NaOH para um balão volumétrico e aferiu-se com água Milli-Q.

**5.2.6. ÁCIDO ACÉTICO 0,1M**

Para um volume final de 100mL mediram-se 2,84 mL de CH<sub>3</sub>COOH 50%, e aferiu-se com água Milli-Q.

**5.2.7. FOSFATO DE POTÁSSIO DIBÁSICO 0,1M**

Para um volume final de 500 mL pesaram-se 6,80g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> para um balão volumétrico e aferiu-se com água Milli-Q.

## 6. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

As condições cromatográficas foram optimizadas previamente. Sendo as condições finais as que a seguir se descrevem. Como fase móvel foi utilizada uma mistura de acetonitrilo e tampão dihidrogenofosfato de potássio 25mM, com proporções de 40:60 (v:v), em modo isocrático e com um fluxo constante de 0,6mL/minuto. O tempo total de corrida cromatográfica foi de 35 minutos. O comprimento de onda escolhido para a detecção dos analitos foi de 230 nm e o volume de injeção utilizado foi de 20µL.

## 7. IDENTIFICAÇÃO DOS ANALITOS

Os analitos foram identificados com base no seu tempo de retenção (tr) e espectro de absorção no ultravioleta (U.V.). A Figura 15 representa o cromatograma obtido por injeção de 20 µL de uma mistura padrão de todos os analitos a 5 µg/mL.

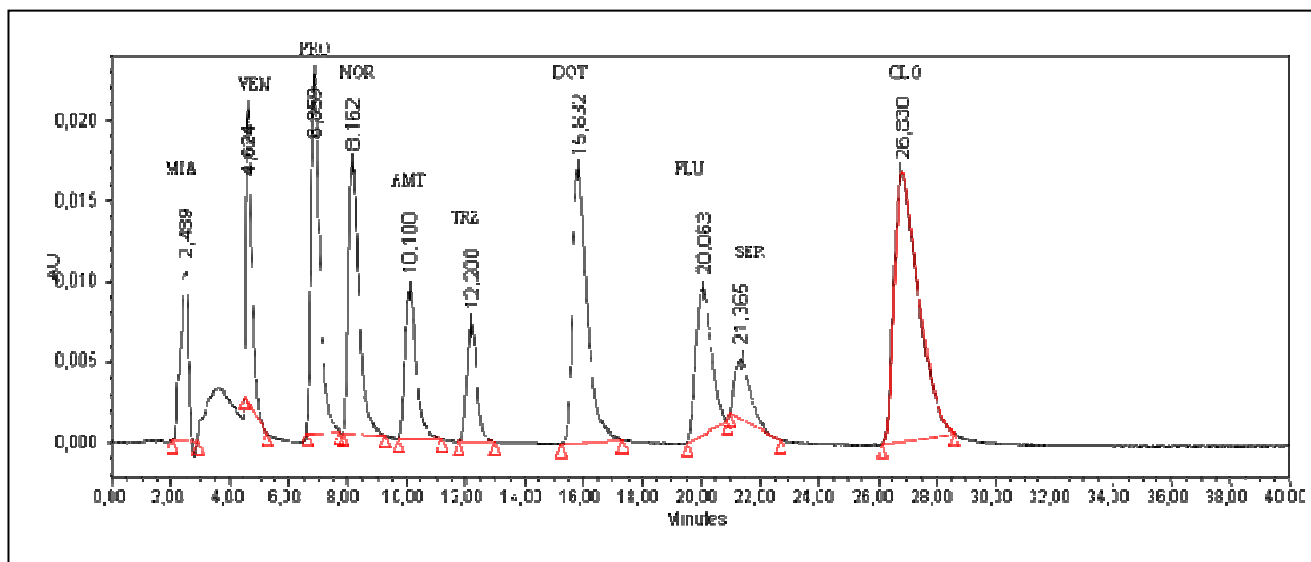


Figura 15 - Cromatograma obtido por injeção de uma mistura padrão dos antidepressivos estudados.

Na seguinte tabela (Tabela 11) apresentam-se os tempos de retenção e os comprimentos de onda máxima de absorção para cada um dos compostos de estudado.

Tabela 10 - Descrição dos tempos de retenção e do comprimento de onda de cada um dos antidepressivos em estudo.

Analito	Tempo de retenção (minutos)	Comprimento de onda máximo (nm)
Mianserina (MIA)	2,72	231
Venlafaxina (VEN)	4,62	224
Protriptilina (PRT)	6,86	290
Nortriptilina (NOR)	8,17	238
Amitriptilina (AMT)	10,11	238
Trazodona (TRZ)	12,42	211
Dotiepina (DOT)	15,96	228
Fluoxetina (FLU)	20,07	225
Sertralina (SER)	21,37	271
Clomipramina (CLO)	26,93	213

Contudo, foi seleccionado como comprimento de onda para efectuar a análise 230 nm apesar de não ser o comprimento de onda máximo, devido ao facto de que todos os analitos apresentavam picos bem definidos.

---

## 8. PROCEDIMENTOS DE EXTRACÇÃO

---

Como foi referido anteriormente, foram utilizados diversos protocolos para a extracção dos analitos a partir das amostras biológicas, utilizando quer a SPE, quer a LLE. Deste modo, no que respeita à SPE forma empregues vários tipos de colunas de extracção, ao passo que na LLE forma testados diversos solventes ou combinação de solventes. Apresentam-se em seguida os vários procedimentos utilizados.

### 8.1. MÉTODO 1

A 500  $\mu\text{L}$  de plasma foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de padrão interno (solução a 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Após adição de 500  $\mu\text{L}$  de NaOH 0,5 M, a amostra foi vigorosamente agitada em vórtex durante 30 segundos. Os analitos foram extraídos com 1,5 mL de uma mistura de hexano:álcool isoamílico (97:3; v:v) durante 15 minutos. As amostras foram então centrifugadas a 3000 rpm durante 5 minutos. Recolheu-se 1 mL da fase orgânica ao qual se adicionaram 75  $\mu\text{L}$  de ácido acético 25mM. A mistura foi agitada por movimentos de inversão/rotação durante 5 minutos, após o que se seguiu uma centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos. Recolheu-se a fase orgânica que foi eliminada, ficando assim com a fase aquosa. O excesso de fase orgânica removido por evaporação com azoto, e adicionou-se 25  $\mu\text{L}$  de fase móvel injectando-se em seguida 20  $\mu\text{L}$  no sistema cromatográfico.

### 8.2. MÉTODO 2

Adicionaram-se 100  $\mu\text{L}$  de hidróxido de amónia 4,5 M a a 500  $\mu\text{L}$  de plasma/urina e 10  $\mu\text{L}$  de padrão interno e homogeneizou-se em vórtex durante 30 segundos. Os analitos foram extraídos com 5 mL de hexano durante 10 minutos. As amostras foram então centrifugadas a 1811 g durante 5 minutos. Recolheu-se a fase orgânica e evaporou-se à secura em azoto. Reconstituiu-se em 50  $\mu\text{L}$  de fase móvel injectando-se em seguida 20  $\mu\text{L}$  no sistema cromatográfico.

### **8.3. MÉTODO 3**

Adicionaram-se 100  $\mu\text{L}$  de hidróxido de amónio 25% a 500  $\mu\text{L}$  de plasma e 10  $\mu\text{L}$  de padrão interno e homogeneizou-se em vórtex durante 30 segundos. Os analitos foram extraídos com 2 mL de éter dietílico durante 10 minutos. As amostras foram então centrifugadas a 3000 rpm durante 3 minutos. Recolheu-se a fase orgânica e evaporou-se à secura sob corrente de azoto. Reconstituiu-se em 50  $\mu\text{L}$  de fase móvel injectando-se em seguida 20  $\mu\text{L}$  no sistema cromatográfico.

### **8.4. MÉTODO 4**

A 1 mL de urina adicionou-se 10  $\mu\text{L}$  de padrão interno e 1 mL de tampão PBS, a mistura foi transferida para um Toxitube® A e agitada vigorosamente durante 30 segundos. Após extracção por movimentos de inversão/rotação durante 20 minutos, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm durante 10 minutos. A fase orgânica foi recolhida e evaporada à secura sob corrente de azoto. O extracto foi reconstituído em 50  $\mu\text{L}$  de fase móvel injectando-se em seguida 20  $\mu\text{L}$  no sistema cromatográfico.

### **8.5. MÉTODO 5: COLUNAS OASIS HLB® 10 mg**

A 500  $\mu\text{L}$  de amostra foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de tampão PBS e 10  $\mu\text{L}$  de padrão interno. Após agitar durante 30 segundos em vórtex, as amostras foram transferidas para as colunas de SPE previamente acondicionadas com 1 mL de metanol e 1 mL de água Milli-Q. Após a passagem das amostras as colunas foram lavadas com 1 mL metanol 5%, sendo posteriormente secadas sob vácuo total durante 10 minutos. Os analitos foram eluídos com 1 mL de metanol, que foi evaporado à secura sob corrente de azoto. Os extractos foram reconstituídos em 50  $\mu\text{L}$  de fase móvel e 20  $\mu\text{L}$  foram injectados no sistema cromatográfico.

**8.6. MÉTODO 6: COLUNAS OASIS HLB® 10 mg**

A 500 µL de amostra foram adicionados 500 µL de tampão PBS e 10 µL de padrão interno. Após agitar durante 30 segundos em vórtex, as amostras foram transferidas para as colunas de SPE previamente acondicionadas com 1 mL de metanol e 1 mL de água Milli-Q. Após a passagem das amostras as colunas foram lavadas com 1 mL de uma solução com 70% de metanol e 2% hidróxido de amónio 25%, sendo posteriormente secadas sob vácuo total durante 10 minutos. Os analitos foram eluídos com 500 µL de uma solução de 70% de metanol e 2% de ácido acético. Os extractos foram reconstituídos em 50 µL de fase móvel e 20 µL foram injectados no sistema cromatográfico.

**8.7. MÉTODO 7: COLUNAS OASIS MCX® 30 mg**

A 500 µL de amostra foram adicionadas 8mL de tampão PBS e 10 µL de padrão interno. Após agitar durante 30 segundos em vórtex, as amostras foram transferidas para as colunas de SPE previamente acondicionadas com 2 mL de metanol e 2 mL de água Milli-Q. Após a passagem das amostras as colunas foram lavadas com 2 mL de ácido clorídrico 0,1M, 2 mL de metanol e 2 mL de hexano sendo posteriormente secadas sob vácuo total durante 10 minutos. Os analitos foram eluídos com 2 mL de uma solução de diclorometano: isopropanol: amónia (78:20:2; v/v). Os extractos foram reconstituídos em 50 µL de fase móvel e 20 µL foram injectados no sistema cromatográfico.

**8.8. MÉTODO 8: COLUNAS BOND ELUT CERTIFY® 30 mg**

A 500 µL de amostra foram adicionados 2 mL de água, 1 mL de dihidrogenofosfato de potássio 0,1M e 10 µL de padrão interno. Após agitar durante 30 segundos em vórtex, as amostras foram transferidas para as colunas de SPE previamente acondicionadas com 2 mL de metanol e 2 mL de dihidrogenofosfato de potássio 0,1M. Após a passagem das amostras as colunas foram lavadas com 3 mL de água Milli-Q, 1 mL de ácido acético 0,1M e 2 mL sendo posteriormente secadas sob vácuo total durante 10 minutos. Os analitos foram eluídos com 3 mL de uma solução de diclorometano: isopropanol: amónia (78:20:2; v/v). Os extractos foram reconstituídos em 50 µL de fase móvel e 20 µL foram injectados no sistema cromatográfico.

## 9. OPTIMIZAÇÃO DA FASE MÓVEL

Como já foi referido anteriormente, foi necessário otimizar a composição da fase móvel com o objectivo de melhorar a separação cromatográfica dos vários compostos. Deste modo, foi necessário experimentar várias fases móveis até obtermos a separação pretendida. Assim, numa primeira fase, cada analito foi injectado isoladamente, de forma a conhecer o tempo de retenção e o espectro de absorção no ultravioleta. Descrevem-se de seguida as fases móveis estudadas e os resultados obtidos com cada uma (Tabelas 11 -19 e Figuras 16 - 25).

Tabela 11 - Condições cromatográficas e antidepressivos identificados com as seguintes condições (experiência 1).

Antidepressivos identificados	Fase móvel e fluxo (mL/min)	Observações
AMT CLO NOR VEN	metanol: água (70:30; v/v) 0,6 mL/min	Os tempos de retenção dos antidepressivos em estudo eram muito próximos e a linha de base pouco estável (Figura 14).

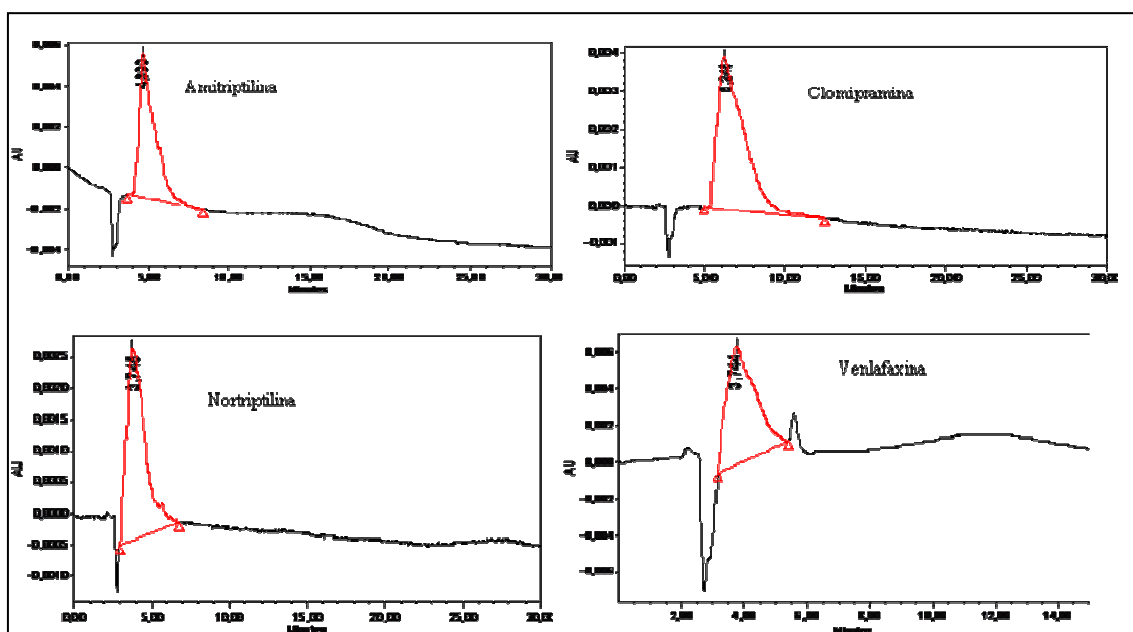


Figura 16 - Cromatogramas obtidos com a fase móvel metanol:água (70:30; v/v) para a amitriptilina, clomipramina, nortriptilina e venlafaxina.

Como se pode observar nos cromatogramas da Figura 16, os tempos de retenção dos diferentes analitos encontram-se entre os 3 e os 6 minutos. Esta proximidade de tempos de retenção não possibilita uma boa separação cromatográfica, pelo que esta fase móvel foi rejeitada.

Tabela 12 - Condições cromatográficas e antidepressivos identificados com as seguintes condições (experiência 2).

Antidepressivos identificados	Fase móvel e fluxo (mL/min)	Observações
AMT	acetoneitrilo: acetato de amónia 2mM pH=3 (85:15; v/v) 0,4mL/min	Os tempos de retenção são muito próximos (Figura 15).
CLO		
NOR		
VEN		
FLU		
MAP		

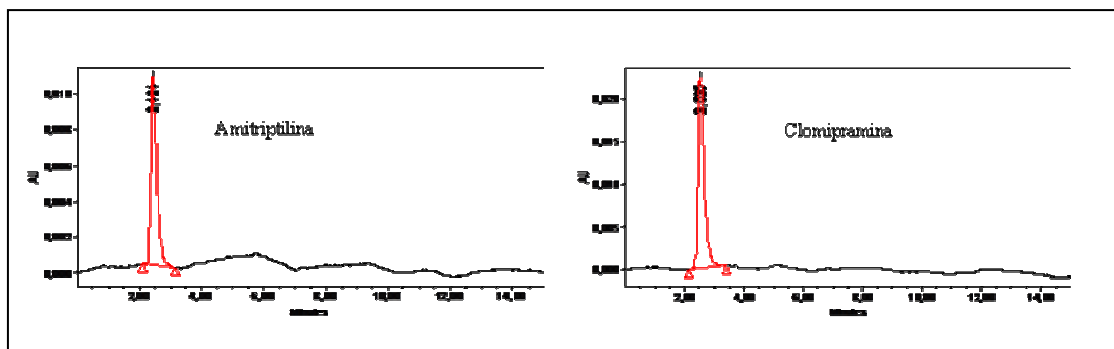


Figura 17 - Cromatogramas obtidos com a fase móvel acetoneitrilo:acetato de amónio 2 mM pH=3 (85:15; v/v) para a amitriptilina e clomipramina.

Como se pode observar na Figura 17, os picos referentes à amitriptilina e à clomipramina apresentam tempos de retenção muito próximos, este facto não possibilita uma boa separação cromatográfica. A linha de base apresenta grandes oscilações, o que poderia causar interferências na identificação dos analitos.

Tabela 13 - Condições cromatográficas e antidepressivos identificados com as seguintes condições (experiência 3).

Antidepressivos identificados	Fase móvel e fluxo (mL/min)	Observações
AMT CLO NOR VEN FLU MAP	acetoneitrilo: acetato de amónio 2 mM pH=3 (gradiente 1) 0,4mL/min	Tempos de retenção muito próximos. Não apresenta boa resolução cromatográfica. (Figura 16)

GRADIENTE 1		
Tempo (min)	%acetato de amónio 2 mM pH=3	%acetoneitrilo
0-0,5	85	15
0,5-4	30	70
4-12	50	50
12-15	85	15

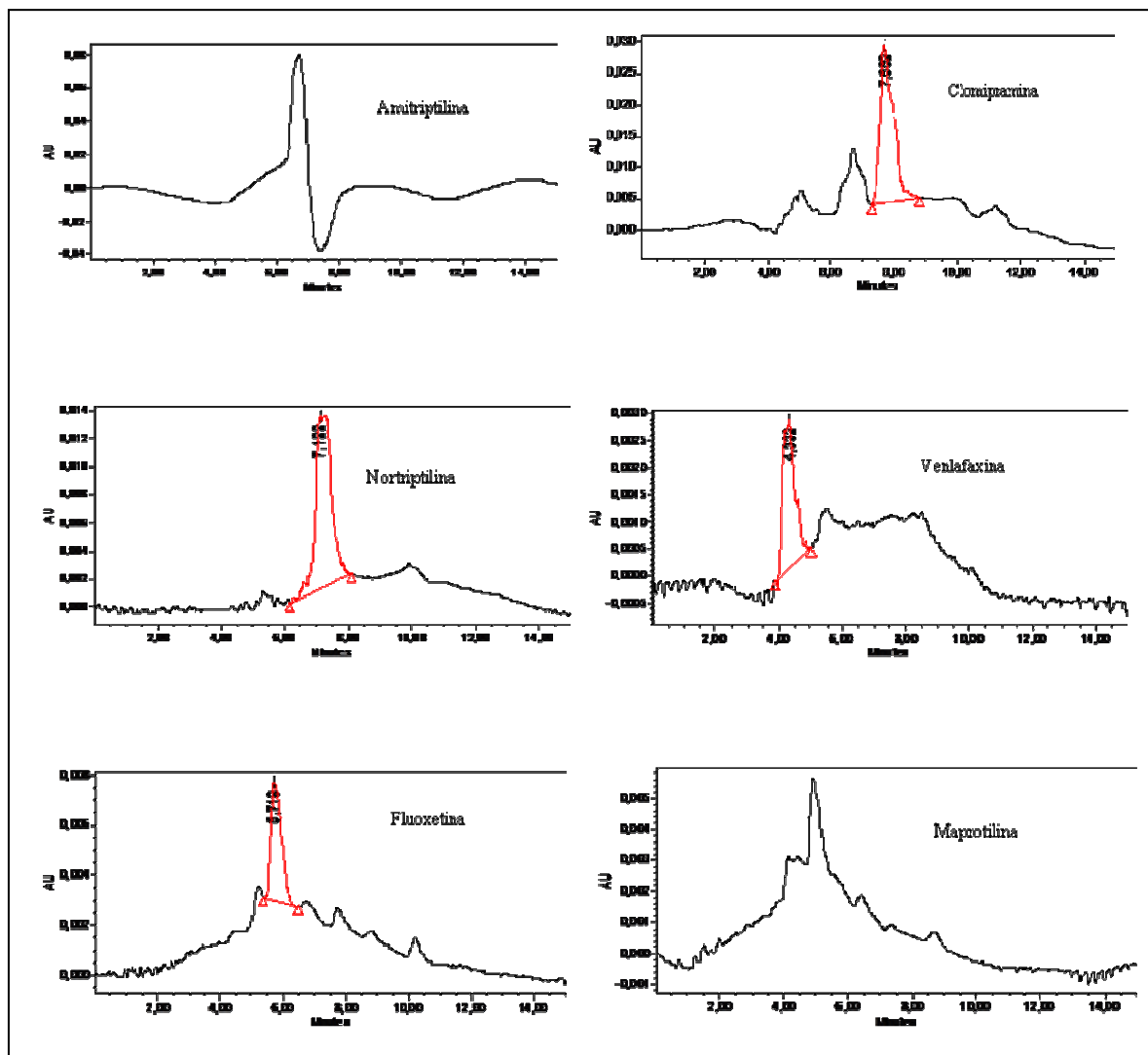


Figura 18 - Cromatogramas obtidos com a fase móvel acetonitrilo:acetato de amônio 2mM pH=3 (gradiente 1) para a amitriptilina, clomipramina, nortriptilina, venlafaxina, fluoxetina e maprotilina.

Na Figura 18 pode-se observar que, os cromatogramas apresentados não apresentam uma linha de base estável, e os picos são mal definidos. Além disso, os tempos de retenção dos diferentes analitos são próximos, desta forma não é uma boa fase móvel e não pode ser utilizada no nosso estudo.

Tabela 14 - Condições cromatográficas e antidepressivos identificados com a seguintes condições (experiência 4).

Antidepressivos identificados	Fase móvel e fluxo (mL/min)	Observações
AMT CLO NOR VEN FLU MAP	acetonitrilo: acetato de amônio 2mM pH3 (gradiente 2) 0,4mL/min	Tempos de retenção muito próximos (Figura 17)

GRADIENTE 2		
Tempo (min)	% acetato de amônio 2 mM pH=3	% acetonitrilo
0-1	50	50
1-4	50	50
4-11	70	70
12-13	50	50
13-15	50	50

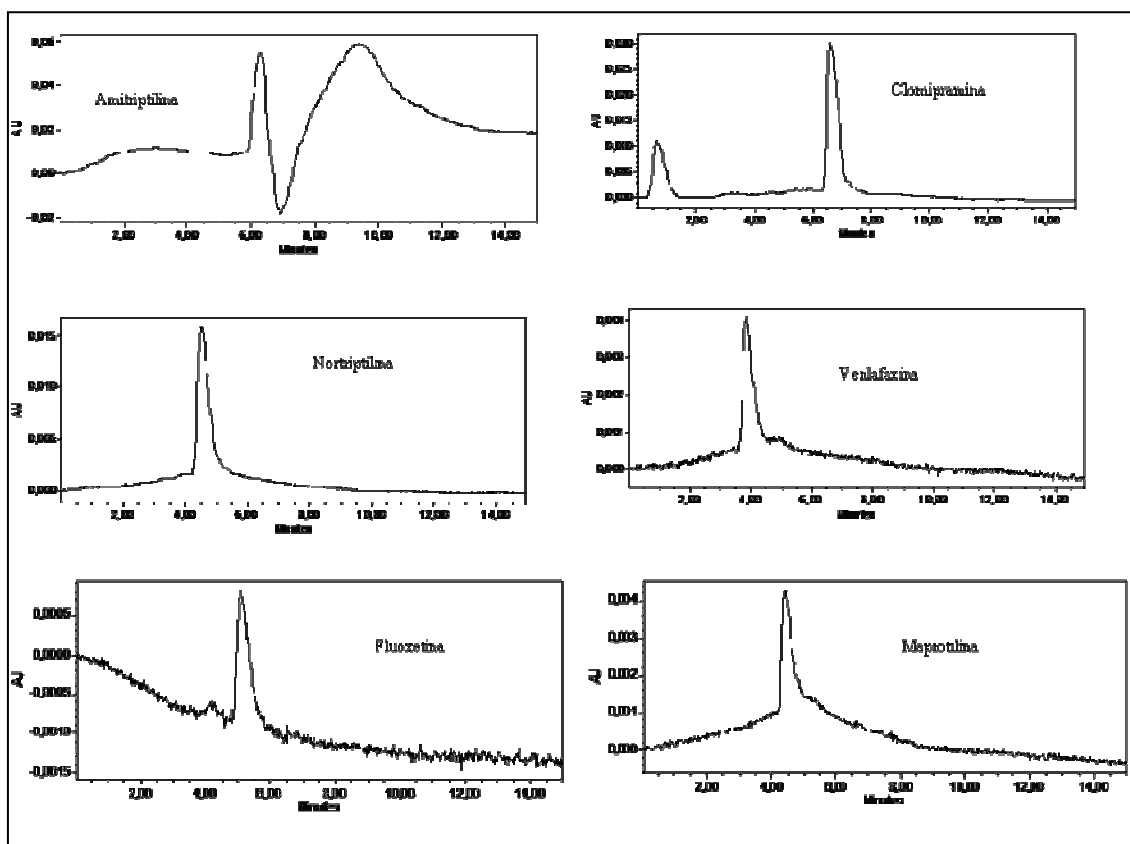


Figura 19 - Cromatogramas obtidos com a fase móvel acetonitrilo:acetato de amônio 2mM pH=3 (gradiente 2) para a amitriptilina, clomipramina, nortriptilina, venlafaxina, fluoxetina e maprotilina.

A linha de base dos cromatogramas apresentados na Figura 19 é um pouco mais estável do que a apresentada na figura anterior, mas ainda não a ideal. Os tempos de retenção continuam próximos, como se pode comprovar nos cromatogramas da AMT, NOR, VEN, FLU e MAP; deste modo, também não apresenta uma boa separação cromatográfica.

Tabela 15 - Condições cromatográficas e antidepressivos identificados com as seguintes condições (tentativa 5).

Antidepressivos identificados	Fase móvel e fluxo (mL/min)	Observações
AMT NOR VEN	acetonitrilo: acetato de amónio 2mM pH 3 (gradiente 3) 0,4mL/min	Para este gradiente injectaram-se estes três antidepressivos, uma vez que apresentavam os tempos de retenção próximos (Figura 18)

GRADIENTE 3		
Tempo (min)	% acetato de amónio 2 mM pH=3	% acetonitrilo
0-0,4	50	50
0,4-2	50	50
2-12	70	30
12-14	60	40
14-16	50	50
16-18	50	50

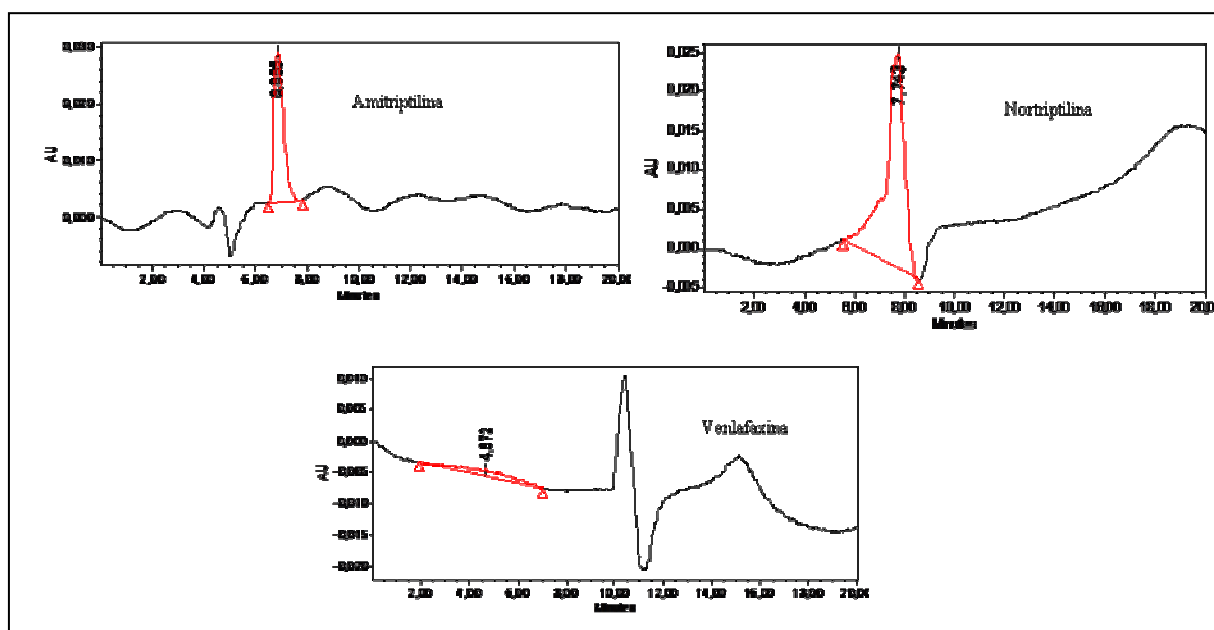


Figura 20 - Cromatogramas obtidos com a fase móvel acetoneitrilo:acetato de amônio 2mM pH=3 (gradiente 3) para a amitriptilina, , nortriptilina e venlafaxina.

A linha de base dos cromatogramas apresentados na Figura 20 é menos estável que no gradiente apresentado anteriormente. Por outro lado, os tempos de retenção continuam próximos como se pode observar nos cromatogramas.

Tabela 16 - Condições cromatográficas e antidepressivos identificados com a seguintes condições (experiência 6).

Antidepressivos identificados	Fase móvel e fluxo (mL/min)	Observações
AMT CLO NOR VEN FLU MAP	metanol: ácido acético (54:46; v:v) 0,25 mL/min	Os picos apresentaram uma boa resolução, mas os tempos de retenção continuam muito próximos (figura 19).

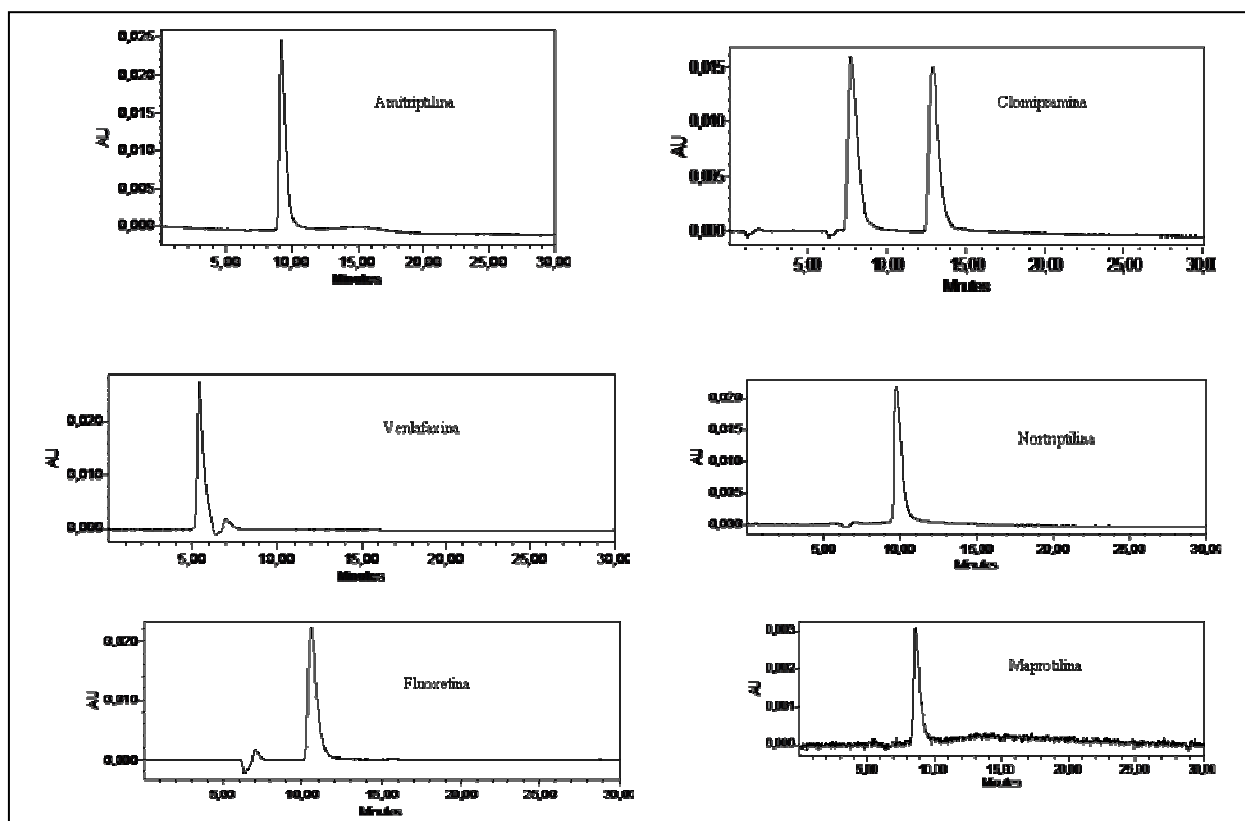


Figura 21 - Cromatogramas obtidos com a fase móvel metanol: ácido acético (54:46; v:v) para a amitriptilina, clomipramina, nortriptilina, venlafaxina, fluoxetina e matrotilina

Como se pode observar na Figura 21, os tempos de retenção são próximos, o que não possibilita uma boa separação cromatográfica. A resolução dos picos é boa e a linha de base encontra-se bastante estável, observando-se apenas algumas oscilações no tempo de retenção da maprotilina.

Tabela 17 - Condições cromatográficas e antidepressivos identificados com a seguintes condições (experiência 7).

Antidepressivos identificados	Fase móvel e fluxo (mL/min)	Observações
AMT CLO NOR VEN FLU MAP	acetonitrilo: metanol: tampão fosfato 0.01 M pH=7 (12:3:5; v/v) 0,6 mL/min	Os analitos apresentaram tempos de retenção bastante próximos (Figura 20).

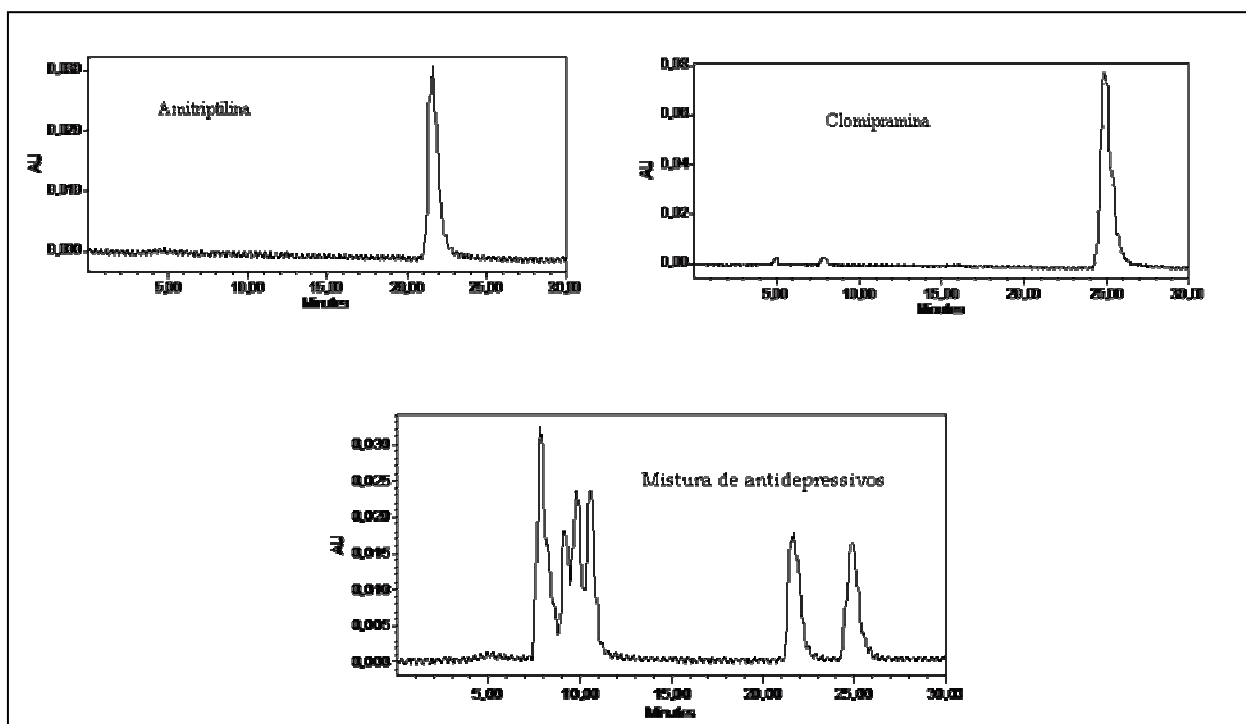


Figura 22 - Cromatogramas obtidos com a fase móvel acetonitrilo: metanol: tampão fosfato 0.01 M pH7 (12:3:5; v/v) para a amitriptilina, clomipramina, e uma solução mistura de todos.

Como se pode observar na Figura 22, os tempos de retenção da amitriptilina e da clomipramina são bastante próximos, mas quando se injectou a mistura foi possível a separação cromatográfica destes picos. O mesmo já não se verificou com os restantes analitos que apresentavam tempos de retenção próximos.

Tabela 18 - Condições cromatográficas e antidepressivos identificados com a seguintes condições (experiência 8).

Antidepressivos identificados	Fase móvel e fluxo (mL/min)	Observações
AMT CLO NOR VEN FLU MAP	acetonitrilo: tampão fosfato 0.01 M pH7 (35:65; v/v) 0,6 mL/min	Os antidepressivos tricíclicos apresentam tempos de retenção próximos (Figura 21).

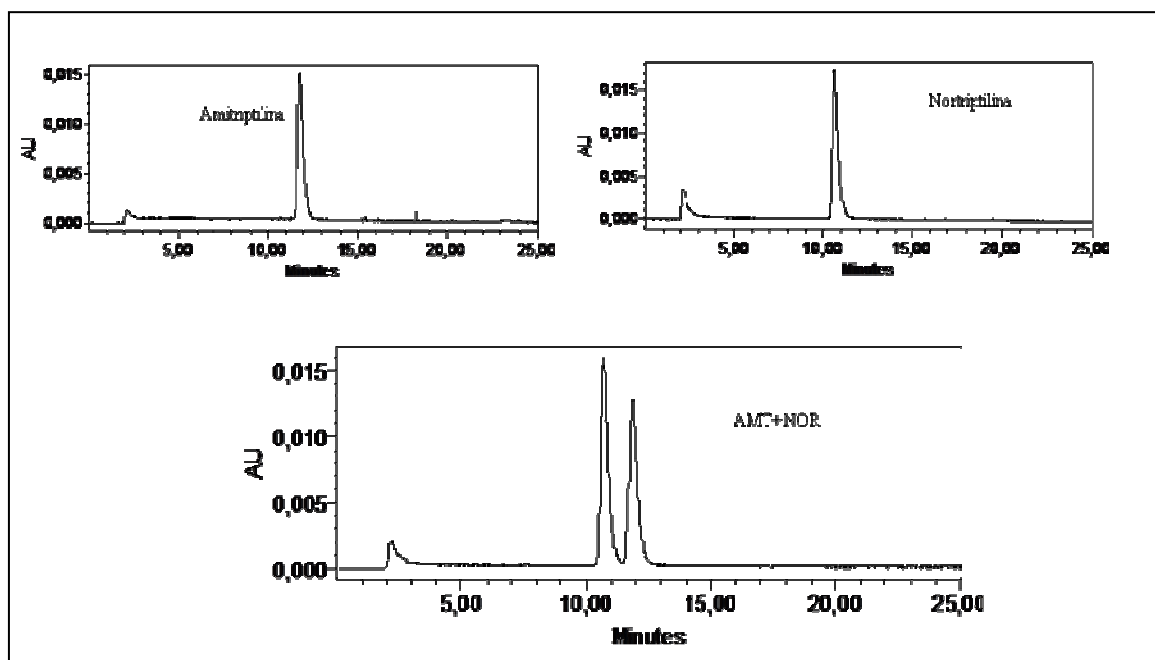


Figura 23 - Cromatograma da amitriptilina e nortriptilina, e da mistura destes dois analitos.

Como se pode observar nesta figura, existe uma boa separação cromatográfica da amitriptilina e da nortriptilina, não ocorrendo a mesma situação com a sertralina e a fluoxetina (Figuras 23 e 24). Com o intuito de separar estes dois analitos foram tentados vários gradientes, mas sem êxito.

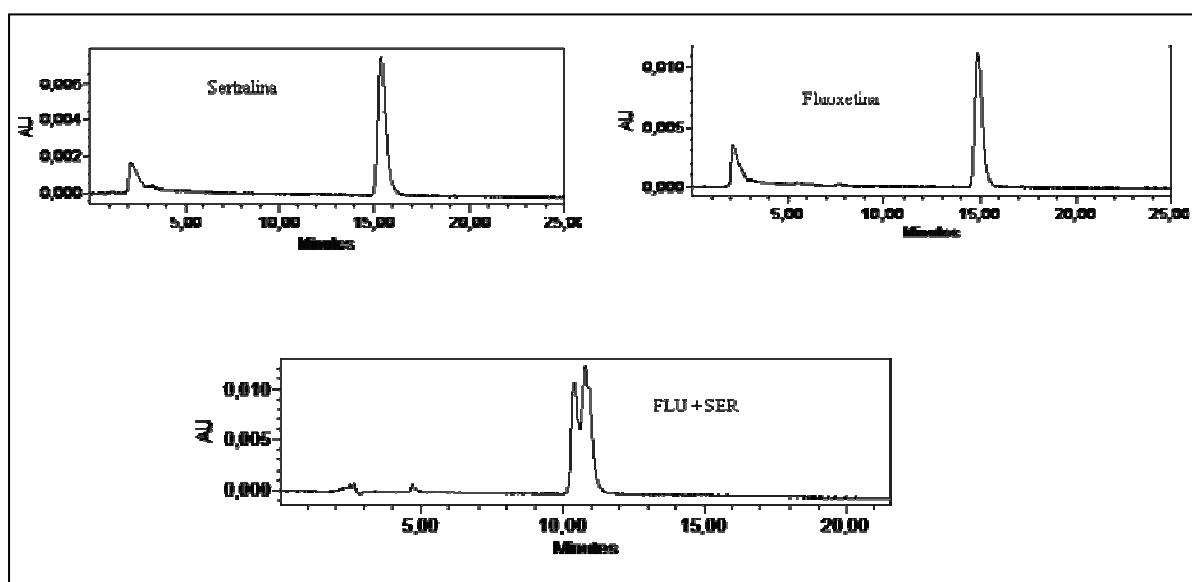


Figura 24 - Cromatograma da sertralina e fluoxetina e da mistura destes dois analitos.

Tabela 19 - Condições cromatográficas e antidepressivos identificados com as seguintes condições (experiência 9).

Antidepressivos identificados	Fase móvel e fluxo (mL/min)	Observações
AMT CLO NOR VEN FLU MAP SER TRI MIR DOT TRZ	acetonitrilo: tampão dihidrogenofosfato de potássio 25 mM pH 7 (40:60; v/v)	Boa separação cromatográfica para os principais antidepressivos. Foram excluídos alguns antidepressivos porque tinham tempos de retenção coincidentes. Assim como foi referido anteriormente, o critério de inclusão foi tendo em conta o nível de consumo nacional.

Como se pode verificar na Figura 25, existe uma boa resolução dos diferentes analitos, bem como tempos de retenção diferentes, o que possibilita uma boa separação cromatográfica.

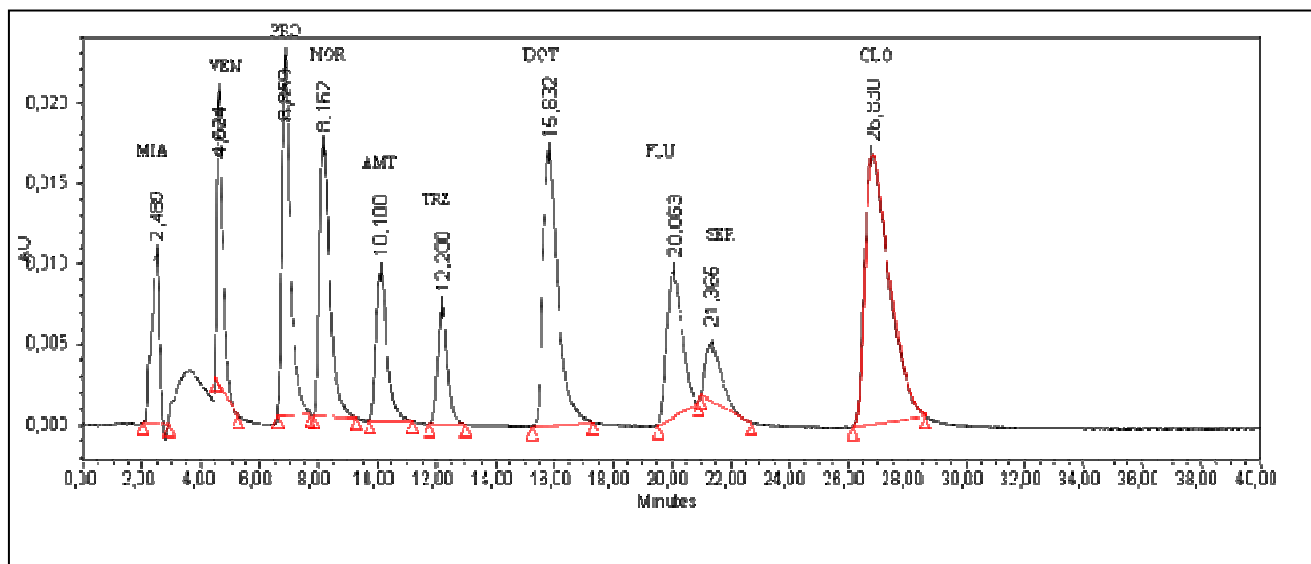


Figura 26 - Cromatograma da mistura dos antidepressivos obtido nas condições finais de estudo.

Uma vez seleccionada a fase móvel, os métodos de extracção anteriormente descritos foram aplicados as amostras de plasma e urina. No entanto, não foi possível aplicar todos os métodos de estudo a ambas matrizes. De facto, o método número 4, que utiliza Toxitubes® A para efectuar a extracção, não foi utilizado para as amostras de plasma, uma vez que este tipo de extracção é mais utilizado quando se trabalha com matrizes mais limpas, como a urina e a saliva. Deste modo, este método foi apenas utilizado para a amostra de urina.

Por outro lado, não foi possível utilizar os métodos 1 e 3 para a amostra de urina, já que ambos apresentava pouca selectividade quando aplicados à detecção de antidepressivos nesta matriz.

---

## 10. COMPARAÇÃO DOS DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRACÇÃO

---

A fiabilidade dos resultados analíticos é um pré-requisito para uma correcta interpretação dos resultados quer a nível de estudos científicos quer no trabalho de rotina. Em qualquer das situações, estes erros podem levar a resultados pouco fiáveis, a falsas interpretações e até a conclusões injustificadas<sup>68</sup>.

Deste modo, a utilização de novas técnicas exige um cuidadoso desenvolvimento do método, bem como a sua subsequente validação

No presente trabalho foram apenas estudados alguns destes parâmetros [selectividade, recuperação e limites de detecção (LOD)], uma vez que o objectivo a que nos propusemos foi a comparação de técnicas de preparação da amostra para a detecção de antidepressivos utilizando instrumentação analítica simples e ao alcance de qualquer laboratório.

Existem várias normas internacionalmente aceites para a validação de métodos bioanalíticos. Apesar da validação propriamente dita não pertencer ao âmbito deste trabalho, o estudo dos parâmetros atrás referidos e a sua avaliação foram efectuados de acordo com os critérios estabelecidos por organizações como a FDA<sup>69</sup> e a ICH<sup>70</sup>.

### 10.1 SELECTIVIDADE

A selectividade é a capacidade de um método distinguir e determinar inequivocamente os analitos em presença dos outros componentes que eventualmente podem estar presentes na amostra. Estes componentes podem incluir metabolitos, impurezas, outras substâncias, constituintes da matriz, etc, existindo vários métodos para avaliar a selectividade<sup>68</sup>. Um dos procedimentos normalmente utilizado para estabelecer a selectividade de um método é demonstrar a ausência de resposta cromatográfica de uma matriz branca, isto é, na qual os analitos que se pretendem determinar não estão

presentes. Para o estudo deste parâmetro é habitual analisar-se amostras brancas de 6 origens diferentes, apesar de Dadgar et al.<sup>71</sup> preconizarem a análise de amostras brancas de 10 a 20 procedências. Os cromatogramas obtidos após análise destas amostras deverão então ser visualmente inspeccionados nos intervalos de detecção que compreendem o tempo de retenção dos analitos de interesse<sup>72</sup>, para garantir a ausência de resposta. No estudo da selectividade de um método destinado à quantificação de mais de um analito, deverão ser incluídos todos os analitos, para verificar a ausência de interferências<sup>69</sup>.

A selectividade de cada um dos métodos descritos, e que são parte integrante do trabalho que agora apresentamos, foi avaliada da forma que a seguir se descreve. Foram preparadas 20 alíquotas de amostra branca (plasma e urina) de 10 origens diferentes. O método foi directamente aplicado a 10 destas alíquotas, enquanto que as restantes 10 foram fortificadas com uma mistura padrão dos antidepressivos em estudo à concentração de 2,5 µg/mL. Os cromatogramas obtidos foram então comparados, avaliando-se a existência ou não de interferentes nos tempos de retenção dos diferentes analitos. Este número de amostras brancas foi escolhido com base na relativamente alta selectividade do detector escolhido (PDA), que obtém um espectro de absorção no UV para cada composto detectado, permitindo a sua identificação. Na Tabela 20 estão apresentados os compostos que não foram possíveis de detectar com os diferentes métodos uma vez que apresentavam interferências.

Tabela 20 - Resumo dos analitos que não foram possíveis de identificar em amostras de plasma e urina.

MATRIZ	MÉTODO 1	MÉTODO 2	MÉTODO 3	MÉTODO 4	MÉTODO 5	MÉTODO 6	MÉTODO 7	MÉTODO 8
<b>Plasma</b>	VEN AMT	MIA NOR CLO	MIA VEN NOR AMI FLU SER	--	MIA VEN	MIA	MIA	MIA VEN AMT
<b>Urina</b>	--	MIA VEN CLO	--	MIA	VEN	NOR AMT	CLO	VEN AMT

## 10.2 LIMITES DE DETECÇÃO (LOD)

Segundo a FDA, o LOD é definido como a concentração mais pequena de analito, claramente distinguível de uma amostra branca, que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada<sup>69</sup>.

Esta determinação foi efectuada em triplicado para cada método testado, analisando concentrações decrescentes de analito até que deixasse de ser possível a identificação do analito. Os valores de LOD encontram-se expressos nas Tabelas 21 e 22.

Tabela 21 - Valores de LOD (ng/mL) dos diferentes métodos de extracção (plasma).

ANALITO	MÉTODO 1	MÉTODO 2	MÉTODO 3	MÉTODO 5	MÉTODO 6	MÉTODO 7	MÉTODO 8
<b>MIA</b>	250	--	--	--	--	--	--
<b>VEN</b>	--	100	--	--	200	150	--
<b>NOR</b>	100	--	--	400	200	150	200
<b>AMT</b>	--	100	--	250	200	150	--
<b>TRZ</b>	30	100	400	75	200	150	200
<b>DOT</b>	30	100	400	75	200	150	200
<b>FLU</b>	30	100	--	75	200	150	200
<b>SER</b>	150	100	--	400	200	150	200
<b>CLO</b>	250	--	400	400	200	150	200

Tabela 22- Valores de LOD (ng/mL) dos diferentes métodos de extracção (urina).

ANALITO	MÉTOD	MÉTOD	MÉTOD	MÉTOD	MÉTOD	MÉTOD
	2	4	5	6	7	8
VEN	--	100	--	400	400	--
NOR	400	100	400	--	400	200
AMT	400	250	400	--	400	--
TRZ	400	100	400	400	400	200
DOT	400	100	400	400	400	200
FLU	400	200	400	400	400	200
SER	400	200	400	400	400	200
CLO	--	200	400	400	--	200

Os valores de LOD são de certo modo aceitáveis, tendo em conta que o detector utilizado foi um PDA. De facto, apesar de relativamente selectivo (uma vez que permite a obtenção de um espectro UV para cada composto), este detector é pouco sensível, especialmente quando comparado com os espectrómetros de massa. No entanto, a sensibilidade foi considerada adequada para o estudo que nos propusemos realizar, a comparação de vários procedimentos de extracção para a determinação de antidepressivos em amostras biológicas. Voltamos a salientar que o equipamento utilizado é acessível à maioria dos laboratórios, permitindo a detecção de concentrações terapêuticas, tóxicas e letais de vários antidepressivos. Por outro lado, o rastreio deste tipo de substâncias pode ser efectuado usando este tipo de instrumentação, podendo estas ser posteriormente confirmadas e quantificadas com recurso a técnicas mais sensíveis

### 10.3 RECUPERAÇÃO

A recuperação ou rendimento de extracção de um analito é a relação percentual entre a resposta obtida do detector a partir de uma quantidade de analito adicionado e posteriormente extraído da matriz biológica e a resposta desse detector para a quantidade de analito teoricamente presente (sem extracção). A recuperação indica portanto a eficácia da extracção de um método analítico. A recuperação do analito não precisa de ser 100%, desde que seja reprodutível e o método apresente precisão adequada<sup>69</sup>. No entanto, este parâmetro deverá ser otimizado antes da validação do método, mas tal optimização não pertence ao âmbito do presente estudo<sup>69</sup>.

Para calcular a recuperação dos métodos descritos, foram fortificadas por triplicado amostras de plasma e urina a três concentrações diferentes (uma baixa, uma intermédia e uma alta). Estas concentrações variaram com a sensibilidade de cada método. O padrão interno foi apenas adicionado no fim da extracção. As relações de áreas foram comparadas com as obtidas após adição de todos os analitos (e padrão interno) aos extractos obtidos após análise de amostras brancas de plasma e urina branco (correspondentes a uma recuperação de 100%).

A recuperação foi calculada por aplicação da seguinte fórmula:

$$\text{Recuperação} = \frac{\frac{\text{área do pico do analito sujeito à extracção}}{\text{área do pico padrão interno}}}{\frac{\text{área do pico do analito não sujeito à extracção}}{\text{área do pico padrão interno}}} \times 100$$

Os valores de recuperação obtidos para os diferentes métodos de extracção estudados encontram-se descritos nas Tabelas 23-28.

Tabela 23 - Valores para a recuperação dos diversos métodos de extracção líquido-líquido (plasma).

ANALITO	MÉTODO 1			MÉTODO 2			MÉTODO 3		
	Recuperação (%)			Recuperação (%)			Recuperação (%)		
	2,5 µg/mL	1µg/mL	0.1 µg/mL	2,5µg/mL	1µg/mL	0.25 µg/mL	2,5µg/mL	1µg/mL	0.5 µg/mL
MIA	39,59	77,30	67,41	--	--	--	--	--	--
VEN	--	--	--	64,62	68,58	41,52	--	--	--
NOR	40,87	30,97	38,93*	--	--	--	--	--	--
AMT	--	--	--	90,59	80,54	91,14	--	--	--
TRZ	26,38	30,84	17,12	57,90	68,70	43,52	82,87	92,68	71,80
DOT	32,16	17,15	9,95	93,98	84,70	41,45	84,98	70,70	84,77
FLU	26,85	16,48	89,35	63,87	73,25	46,97	--	--	--
SER	28,51	25,31	23,47*	61,80	65,70	46,28	--	--	--
CLO	13,03	19,49	21,62*	--	--	--	70,10	90,98	91,16

\* valores calculados para a concentração de 0,5 µg/mL

Tabela 24 - Valores para a recuperação dos diversos métodos de extracção em fase sólida (plasma).

ANALITO	MÉTODO 5			MÉTODO 6			MÉTODO 7			MÉTODO 8		
	Recuperação (%)			Recuperação (%)			Recuperação (%)			Recuperação (%)		
	2,5µg/mL	1µg/mL	0.25 µg/mL	2,5µg/mL	1µg/mL	0.25 µg/mL	2,5µg/mL	1µg/mL	0.25 µg/mL	2,5µg/mL	1µg/mL	0.4 µg/mL
MIA	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
VEN	--	--	--	75,13	49,87	74,04	83,08	65,24	67,42	--	--	--
NOR	93,70	82,38	73,88	74,93	56,15	58,95	95,99	57,56	78,25	87,32	92,11	88,09
AMT	81,33	80,67	77,40	64,28	47,92	52,34	93,72	95,91	90,59	--	--	--
TRZ	100,68	75,09	67,38		34,12	50,40	92,38	87,62	89,20	83,79	89,15	86,72
DOT	107,89	72,78	70,34	77,92	62,87	98,88	99,94	96,27	88,79	87,82	86,04	77,63
FLU	104,38	74,88	56,12	70,90	66,02	99,45	95,30	86,98	98,50	80,39	71,01	73,50
SER	67,86	58,23	68,12	71,30	73,68	97,67	97,36	81,55	64,50	80,96	76,39	98,44
CLO	96,58	82,45	83,03	76,97	63,17	48,67	93,27	91,03	93,85	93,16	70,18	97,61

Tabela 25 - Valores para a recuperação dos diversos métodos de extracção líquido - líquido (urina).

ANALITO	MÉTODO 2			MÉTODO 4		
	Recuperação (%)			Recuperação (%)		
	2,5 µg/mL	1 µg/mL	0.4 µg/mL	2,5 µg/mL	1 µg/mL	0.25 µg/mL
VEN	--	--	--	81,06	93,06	63,72
NOR	57,42	84,35	53,69	79,72	67,96	80,54
AMT	--	--	--	72,81	44,02	78,64
TRZ	60,48	66,29	51,32	92,70	82,82	65,96
DOT	58,84	54,57	63,96	73,97	80,23	79,31
FLU	57,35	67,56	58,17	69,54	61,74	76,71
SER	64,08	77,05	83,88	68,77	45,87	54,37
CLO	--	--	--	74,61	57,04	69,21

Tabela 26 - Valores para a recuperação dos diversos métodos de extracção em fase sólida (urina).

ANALITO	MÉTODO 5			MÉTODO 6			MÉTODO 7			MÉTODO 8		
	Recuperação (%)			Recuperação (%)			Recuperação (%)			Recuperação (%)		
	2,5 µg/mL	1 µg/mL	0,4 µg/mL	2,5 µg/mL	1 µg/mL	0,4 µg/mL	2,5 µg/mL	1 µg/mL	0,4 µg/mL	2,5 µg/mL	1 µg/mL	0,4 µg/mL
VEN	--	--	--	79,53	64,18	98,42	97,20	75,60	85,17	--	--	--
NOR	74,00	90,39	46,80	--	--	--	87,39	84,19	81,56	99,02	99,66	88,50
AMT	70,52	33,84	20,08	--	--	--	83,32	86,95	71,40	--	--	--
TRZ	60,55	86,55	57,52	62,72	89,07	70,38	78,51	94,00	78,36	87,77	97,16	72,37
DOT	65,43	59,34	32,26	83,10	96,35	71,03	81,63	86,45	86,87	92,45	82,24	95,55
FLU	69,81	93,46	65,33	82,09	83,77	83,89	70,24	91,96	96,71	88,19	98,65	89,39
SER	49,64	68,43	74,73	82,49	93,20	77,00	94,54	71,47	90,61	92,65	99,00	92,48
CLO	75,42	78,77	79,08	93,12	--	--	--	--	--	96,10	97,81	95,51

Tabela 27 – Recuperação total dos diversos métodos de extracção nas amostras de plasma.

ANALITO	Método 1	Método 2	Método 3	Método 5	Método 6	Método 7	Método 8
	Recuperação (%)	Recuperação (%)	Recuperação (%)	Recuperação (%)	Recuperação (%)	Recuperação (%)	Recuperação (%)
	± d.p.	± d.p.	± d.p.	± d.p.	± d.p.	± d.p.	± d.p.
MIA	61,43±19,55	--	--	--	--	--	--
VEN	--	58,24± 14,61	--	--	66,35±14,28	71,91±9,73	--
NOR	35,92±5,25	--	--	83,32±2,10	65,54±10,13	76,78±19,23	89,18 ± 2,57
AMT	--	87,42±5,97	--	79,80±9,95	54,85±8,46	93,41±2,67	--
TRZ	24,78±7,00	56,71±12,63	82,45±10,44	81,05±17,43	46,59±11,07	89,73±2,42	86,55± 2,68
DOT	19,75±11,33	73,37±28,04	80,15±8,18	83,67±21,01	79,89±18,09	95,00±5,68	83,83±5,44
FLU	44,23±39,42	63,87±13,32	--	78,46±24,33	78,79±18,05	95,30±5,95	74,97±4,86
SER	25,99±3,56	63,75±10,27	--	64,74±5,64	72,49±14,59	89,45±16,44	85,26±11,64
CLO	16,26±4,47	--	80,54±12,11	87,35±8,00	62,94±14,15	92,72±1,49	86,98±14,72

\* desvio padrão (d.p.)

Tabela 28 – Recuperação total dos diversos métodos de extracção nas amostras de urina.

ANALITO	Método 2	Método 4	Método 5	Método 6	Método 7	Método 8
	Recuperação (%)	Recuperação (%)	Recuperação (%)	Recuperação (%)	Recuperação (%)	Recuperação (%)
	± d.p.	± d.p.	± d.p.	± d.p.	± d.p.	± d.p.
VEN	--	79,28±14,75	--	80,71±17,15	85,99±10,82	--
NOR	65,15±16,73	76,07±7,04	82,19±22,02	--	85,79±2,92	95,73±6,26
AMT	--	65,16±18,53	41,48±26,07	--	80,56±8,14	--
TRZ	59,36±7,54	80,49±13,52	68,21±15,96	74,06±13,55	83,62±8,99	85,77±12,52
DOT	59,13±4,70	77,84±3,38	52,34±17,66	83,49±12,67	84,98±2,91	90,08±6,96
FLU	61,03±5,67	69,33±7,49	76,20±15,12	83,25±1,01	86,30±14,11	92,08±5,72
SER	75,00±10,06	56,34±11,58	59,04±13,05	84,23±8,24	83,01±12,34	94,71±3,72
CLO	--	66,95±9,00	77,76±2,03	93,12±0,00	--	96,47±1,19

Os valores de recuperação foram em geral mais elevados para as técnicas de SPE que para as técnicas de LLE (42-97% *versus* 16-82%). Estes valores mais baixos de recuperação podem dever-se, não só ao método utilizado, como também a eventuais perdas durante as várias manipulações a que as amostras foram sujeitas. Na avaliação destas recuperações deve ter-se em conta o facto de que se tratam de multi-métodos, e consequentemente a sua capacidade de extrair eficazmente todos os analitos presentes é limitada. No entanto, estes valores baixos de recuperação não assumem grande relevância, uma vez que são compensados pela presença do padrão interno.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

Não queremos terminar a discussão deste trabalho sem efectuar uma reflexão final. Tendo em conta os resultados obtidos, verificámos que utilizando uma metodologia analítica simples e acessível à maior parte dos laboratórios, como é o HPLC-PDA, é possível otimizar e desenvolver um método analítico. Sendo esta optimização um processo normalmente muito laborioso e dispendioso para o próprio laboratório, tanto em termos de recursos materiais (solventes e reagentes), como também em termos de recursos humanos.

Qualquer dos métodos aqui apresentados, mas principalmente os que utilizam a SPE, pode ser validado ulteriormente usando qualquer outra técnica cromatográfica (não necessitando em princípio de mais optimizações) e implementado na rotina de análise de um laboratório de Toxicologia. Por razões óbvias, se a técnica cromatográfica for a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa, essa transferência da metodologia fica ainda mais simplificada.

Salientamos no entanto o facto de que é imperativo efectuar uma optimização aprofundada de qualquer técnica de preparação de amostras com o fim de garantir a maior eficiência possível na extracção dos analitos a partir da matriz. Por outro lado, esta optimização prévia do processo extractivo irá facilitar a própria validação da metodologia, e conseqüentemente a fiabilidade dos resultados.

---

## CONCLUSÕES

---

1. Foi desenvolvido e otimizado um método cromatográfico rápido e simples para a identificação simultânea de nove antidepressivos em amostras de plasma e urina.
2. Foram desenvolvidas e comparadas diversas técnicas de extracção líquido-líquido e em fase sólida para a detecção de nove antidepressivos em amostras de plasma e urina. Tendo em conta os resultados obtidos, podemos afirmar que todas as metodologias de extracção utilizadas com excepção de o método 3, foram consideradas adequadamente sensíveis, tendo apresentado valores aceitáveis de recuperação.
3. De modo geral, as técnicas de SPE demonstraram ser mais adequadas para a determinação destes antidepressivos nos fluidos biológicos estudados, devido não só à presença de menos interferentes, como também à sua simplicidade e facilidade de automatização.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

1. Organização Mundial de Saúde 2009  
<[http://www.who.int/mental\\_health/management/depression/definition/en/](http://www.who.int/mental_health/management/depression/definition/en/)>.  
Consultado em 29/6/2009.
2. Linder MW, Keck PE. Standards of laboratory practice: antidepressant drug monitoring. *Clinical Chemistry* 1998;44(5):1073-1084.
3. Esrafilı A, Yamini Y, Shariati S. Hollow fiber-based liquid phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography for extraction and determination of some antidepressant drugs in biological fluids. *Analytica Chimica Acta* 2007;604:127-133.
4. Observatório do Medicamento e dos Produtos de Saúde. Evolução do Consumo de Antidepressivos em Portugal Continental de 1995 a 2001: Impacto das medidas reguladoras. INFARMED. 2002.online em [http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/MONITORIZACAO\\_DO\\_MERCADO/OBSERVATORIO/INTRODUCAO\\_DE\\_FICHEIROS/rel\\_antidepressivos.pdf](http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/MONITORIZACAO_DO_MERCADO/OBSERVATORIO/INTRODUCAO_DE_FICHEIROS/rel_antidepressivos.pdf) consultado em 10/6/2009
5. INFARMED. Estatística do medicamento 2006. 2007 Documento online em [http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/PUBLICACOES/TEMATICOS/ESTATISTICA\\_MEDICAMENTO/EstMed-2006.pdf](http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/PUBLICACOES/TEMATICOS/ESTATISTICA_MEDICAMENTO/EstMed-2006.pdf) Consultado em 10/6/2009.
6. Malfará WR, Bertucci C, Queiroz MEC, Carvalho SAD, Bianchi MLP, Cesarino EJ, Crippa JA, Queiroz RHL. Reliable HPLC method for therapeutic drug monitoring of frequently prescribed tricyclic and nontricyclic antidepressants. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2007;44(955-962).
7. Léo H, Galinowski A, Poirier M-FH, F., Krebs M-O, Chauchot F, Olié J-P. Antidépresseurs. Historique. *EMC-Psychiatrie* 2004;1:243-245.
8. López-Muñoz F, Alamo C. Monoaminergic Neurotransmission: The History of the Discovery of Antidepressants from 1950s Until Today. *Current Pharmaceutical Design* 2009;15(14):1563-1586.

9. Moffat AC, Osselton MD, Widdop B. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons Pharmaceutical Press; 2003.
10. Florez J. Farmacología humana. Barcelona: MASSON, S.A.; 1998.
11. DeVane CL. Metabolism and Pharmacokinetics of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors. *Cell Mol Neurobiol* 1999;19(4):443-66.
12. Duverneuil C, de la Grandmaison GL, de Mazancourt P, Alvarez JC. A high-performance liquid chromatography method with photodiode-array UV detection for therapeutic drug monitoring of the nontricyclic antidepressant drugs. *Ther Drug Monit* 2003;25(5):565-73.
13. Grodner B, Pachecka J. A simpler and faster capillary electrophoresis method for determination of mianserin enantiomers in human serum. *Acta Pol Pharm* 2006;63(1):9-14.
14. Mandrioli R, Mercolini L, Ghedini N, Bartoletti C, Fanali S, Raggi MA. Determination of the antidepressant mirtazapine and its two main metabolites in human plasma by liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta* 2006;556(2):281-288.
15. The Lundbeck Institute  
<[http://www.cnsforum.com/imagebank/item/Drug\\_SSRI\\_2/default.aspx](http://www.cnsforum.com/imagebank/item/Drug_SSRI_2/default.aspx)>.  
Consultado em 16/6/2009.
16. Pharmamotion. documento online em  
<<http://pharmamotion.com.ar/differences-between-tricyclic-antidepressants-and-selective-serotonin-norepinephrine-reuptake-inhibitors-mechanism-of-action/>>.  
Consultado em 16/6/2009.
17. Cashman JR, Voelker T, Johnson R, Janowsky A. Stereoselective inhibition of serotonin re-uptake and phosphodiesterase by dual inhibitors as potential agents for depression. *Bioorg Med Chem* 2009;17(1):337-43.
18. Howstuffworks. Documento online em .  
<<http://health.howstuffworks.com/healthillness/treatment/medicine/medications/antidepressant3.htm>>. Consultado em 16/6/2009.

19. Nichols DE, Nichols CD. Serotonin receptors. *Chem Rev* 2008;108(5):1614-41.
20. The international Association of Forensic Toxicologist. 2004. Therapeutic and toxic drug concentrations list. documento online em <<http://www.tiaft.org/tmembers/ttv/ttvidx.php>>. Consultado em 30/6/2009.
21. Barroso M. Determinação de estricnina em sangue: Comparação de duas metodologias de análise. [Tese de Mestrado]. Coimbra; 2004.
22. Sosa A, Lenardon A, Mattassini ML. Screening of pesticides via solid-phase extraction and gas chromatography. *J Chromatogr Sci* 2003;41(2):92-5.
23. Yazdi AS, Razavi N, Yazdinejad SR. Separation and determination of amitriptyline and nortriptyline by dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography flame ionization detection. *Talanta* 2008;75:1293-1299.
24. Liu W, Cai H, Li H. High performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-MS/ESI) method for simultaneous determination of venlafaxine and its three metabolites in human plasma. *Journal of Chromatography B* 2007;850:405-411.
25. Patel BN, Sharmab N, Sanyal M, Shrivastava PS. High throughput and sensitive determination of trazodone and its primary metabolite, m-chlorophenylpiperazine, in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 2008;871:44-54.
26. Futagami K, Narazaki C, Kataoka Y, Shuto H, Oishi R. Application of high-performance thin-layer chromatography for the detection of organophosphorus insecticides in human serum after acute poisoning. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1997;704(1-2):369-73.
27. Thurman E, Mills M. Solid-phase extraction: Principles and practice. New York: John Wiley & Sons, Inc. 1998.
28. Sigma Aldrich 2009 documento online em <<http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>>. Consultado em 1/7/2009.

29. Simpson NJ. Solid-phase extraction: Principles, techniques, and applications. New York: CRC 2000.
30. Misiuk W, Tykocka A. Sensitive extractive spectrophotometric methods for the determination of nortriptyline hydrochloride in pharmaceutical formulations. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2007;55(12):1655-61.
31. Misiuk W. Extractive spectrophotometric methods for the determination of doxepin hydrochloride in pharmaceutical preparations using titanium (IV) and iron (III) thiocyanate complexes. *Farmaco* 2005;60(1):61-9.
32. Misiuk W. Spectrophotometry assay of imipramine and desipramine using ammonium metavanadate and its application to pharmaceutical preparations. *J Pharm Biomed Anal* 2000;22(1):189-96.
33. Mohamed GG, El-Dien FAFN, Mohamed NA. Utility of 7,7,8,8-tetracyanoquinodimethane charge transfer reagent for the spectrophotometric determination of trazodone, amineptine and amitriptyline hydrochlorides. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 2007;68(5):1244-1249.
34. Asselin WM, Leslie JM. Use of the EMITtox serum tricyclic antidepressant assay for the analysis of urine samples. *J Anal Toxicol* 1990;14(3):168-71.
35. Dell'Aquila C. Separation of tricyclic antidepressants by capillary zone electrophoresis with N,N,N',N'-tetramethyl-1,3-butanediamine (TMBD) as an effective electrolyte additive. *J Pharm Biomed Anal* 2002;30(2):341-50.
36. Mercolini L, Mandrioli R, Cazzolla R, Amore M, Raggi MA. HPLC analysis of the novel antidepressant duloxetine in human plasma after an original solid-phase extraction procedure. *Journal of Chromatography B* 2007;856:81-87.
37. Mandrioli R, Saracino MA, Ferrari S, Berardi D, Kenndler E, Raggi MA. HPLC analysis of the second-generation antidepressant sertraline and its main metabolite N-desmethylsertraline in human plasma. *Journal of Chromatography B* 2006;836:116-119.
38. Juan H, Zhiling Z, Huande L. Simultaneous determination of fluoxetine, citalopram, paroxetine, venlafaxine in plasma by high performance liquid

chromatography–electrospray ionization mass spectrometry (HPLC–MS/ESI). *Journal of Chromatography B* 2005;820:33–39.

39. Shinozuka T, Terada M, Tanaka E. Solid-phase extraction and analysis of 20 antidepressant drugs in human plasma by LC/MS with SSI method. *Forensic Science International* 2006;162:108–112

40. Chaves AR, Silva SM, Queiroz RHC, M. LF, Queiroz MEC. Stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with UV detection for determination of antidepressants in plasma samples. *Journal of Chromatography B* 2007;850 295–302.

41. Uddin MN, Samanidou VF, Papadoyannis IN. Development and validation of an HPLC method for the determination of benzodiazepines and tricyclic antidepressants in biological fluids after sequential SPE. *J. Sep. Sci.* 2008;31:2358 – 2370.

42. Bagheri H, Khalilian F, Babanezhad E, Es-haghi A, Rouini M-R. Modified solvent microextraction with back extraction combined with liquid chromatography–fluorescence detection for the determination of citalopram in human plasma. *Analytica Chimica Acta* 2008;610 211–216.

43. Kovacevic I, Pokrajac M, Miljkovic B, Jovanovic D, Prostran M. Comparison of liquid chromatography with fluorescence detection to liquid chromatography–mass spectrometry for the determination of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma. *Journal of Chromatography B* 2006;830:372–376.

44. Patel BN, Sharma N, Sanyal M, Shrivastav PS. Liquid chromatography tandem mass spectrometry assay for the simultaneous determination of venlafaxine and O-desmethylvenlafaxine in human plasma and its application to a bioequivalence study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2008;47:603–611.

45. Wenzel S, Aderjan R, Mattern R, Pedal I, Skopp G. Tissue distribution of mirtazapine and desmethylmirtazapine in a case of mirtazapine poisoning. *Forensic Science International* 2006;156:229–236.

46. Castro Ad, Concheiro M, Quintela O, Cruz A, López-Rivadulla M. LC–MS/MS method for the determination of nine antidepressants and some of their main metabolites in oral fluid and plasma. Study of correlation between venlafaxine

concentrations in both matrices. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2008 48:183-193.

47. Patel BN, Sharma N, Sanyal M, Shrivastav PS. Analysis of second-generation antidepressant drug, sertraline and its active metabolite, N-desmethyl sertraline in human plasma by a sensitive and selective liquid chromatography-tandem mass spectrometry method. *Journal of Chromatography B* 2009;887:221-229.

48. Fernandes C, Neto AJS, Rodrigues JC, Alves C, Lanças FM. Solid-phase microextraction-liquid chromatography (SPME-LC) determination of fluoxetine and norfluoxetine in plasma using a heated liquid flow through interface. *Journal of Chromatography B* 2007;847:217-223.

49. Silva BJG, Lanças FM, Queiroz MEC. In-tube solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography (in-tube SPME/LC) analysis of nontricyclic antidepressants in human plasma. *Journal of Chromatography B* 2008;862(1-2):181-188.

50. Margalho C, Barroso M, Gallardo E, Monsanto P, Vieira DN. Massive intoxication involving unusual high concentration of amitriptyline. *Hum Exp Toxicol* 2007;26(8):667-70.

51. Castaing N, Titier K, Receveur-Daurel M, Le-Déodic M, Le-bars D, Moore N, Molimard M. Quantification of Eight New Antidepressants and Five of their Active Metabolites in Whole Blood by High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology* 2007;31.

52. Kirchherr H, Kühn-Velten WN. Quantitative determination of forty-eight antidepressants and antipsychotics in human serum by HPLC tandem mass spectrometry: A multi-level, single-sample approach. *Journal of Chromatography B* 2006;843:100-113.

53. Wózniakiewicz M, Wietecha-Posłuszny R, Garbacik A, Kóscielniak P. Microwave-assisted extraction of tricyclic antidepressants from human serum followed by high performance liquid chromatography determination. *Journal of Chromatography A* 2008;1190:52-56.

54. Gunnar T, Mykkänen S, Ariniemi K, Lillsunde P. Validated semiquantitative/quantitative screening of 51 drugs in whole blood as silylated derivatives by gas chromatography-selected ion monitoring mass spectrometry and gas chromatography electron capture detection. *Journal of Chromatography B* 2004;806:205–219.
55. Martínez MA, Ballesteros S, Sánchez de la Torre C, Almarza E. Investigation of a Fatality Due to Trazodone Poisoning: Case Report and Literature Review. *Journal of Analytical Toxicology* 2005;29.
56. Kłys M, Kowalski P, Rojek S, Gross A. Death of a female cocaine user due to the serotonin syndrome following moclobemide–venlafaxine overdose. *Forensic Science International* 2009;184 e16–e20.
57. Frahnert C, Rao ML, Grasmäder K. A nalysis of eighteen antidepressants, four atypical antipsychotics and active metabolites in serum by liquid chromatography: a simple tool for therapeutic drug monitoring. *Journal of Chromatography B* 2003;794:35–47.
58. Doherty B, O'Donnell F, Smyth WF, Leslie JC, Ramachandran VN, Boyd NS, Hack CJ, O'Kane E, McClean S. A study of the analytical behaviour of selected psychoactive drugs using liquid chromatography, ion trap mass spectrometry, gas chromatography and polarography and the construction of an appropriate database for drug characterisation. *Talanta* 2007;72(2):755-761.
59. Kłys M, Ścisłowski M, Rojek S, Kołodziej J. A fatal clomipramine intoxication case of a chronic alcoholic patient: Application of postmortem hair analysis method of clomipramine and ethyl glucuronide using LC/APCI/MS. *Legal Medicine* 2005;7:319–325.
60. Wille SM, De Letter EA, Piette MH, Van Overschelde LK, Van Peteghem CH, Lambert WE. Determination of antidepressants in human postmortem blood, brain tissue, and hair using gas chromatography-mass spectrometry. *Int J Legal Med* 2008.
61. Smyth WF, Leslie JC, McClean S, Hannigan B, McKenna HP, Doherty B, Joyce C, O'Kane E. The characterisation of selected antidepressant drugs using electrospray ionisation with ion trap mass spectrometry and with quadrupole time of-flight mass

spectrometry and their determination by highperformance liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2006;20:1637-1642.

62. Shen M, Xiang P, Wu H, Shen B, Huang Z. Detection of antidepressant and antipsychotic drugs in human hair. *Forensic Sci Int* 2002;126(2):153-61.

63. Polenova TV, Borzenko AG, Marutsenko IV, Revelsky IA. Screening of Psychotropic Drugs in Human Hair Based on High-Performance Thin-Layer Chromatography and Microliquid Extraction. *Journal of Chromatographic Science* 2001;39.

64. Müller C, Vogt S, Goerke R, Kordon A, Weinmann W. Identification of selected psychopharmaceuticals and their metabolites in hair by LC/ESI-CID/MS and LC/MS/MS. *Forensic Science International* 2000;113:415-421.

65. Kim J, Riggs KW, Misri S, Kent N, Oberlander TF, Grunau RE, Fitzgerald C, Rurak DW. Stereoselective disposition of fluoxetine and norfluoxetine during pregnancy and breast-feeding. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2005;61(2):155-163.

66. Hostetter A, Ritchie JC, Stowe ZN. Amniotic Fluid and Umbilical Cord Blood Concentrations of Antidepressants in Three Women. *Society of Biological Psychiatry* 2000;48:1032-1034.

67. Loughhead AM, Fisher AD, Newport DJ, Ritchie JC, Owens MJ, DeVane CL, Stowe ZN. Antidepressants in Amniotic Fluid: Another Route of Fetal Exposure. *Am J Psychiatry* 2006;163:145-147.

68. Peters FT, Drummer OH, Musshoff F. Validation of new methods. *Forensic Science International* 2007;165(2-3):216-224.

69. Food and Drug Administration: U.S. Department of Health and Human Services. Guidance for industry, bioanalytical method validation. 2001 Documento online em

<<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf>>. Consultado em 26/6/2009.

70. International Conference on Harmonization Validation of analytical methods Methodology ICH Q2 Documento online em <<http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>>. Consultado em 2005 26/6/2009.
71. Dadgar D, Burnett PE, Choc MG, Gallicano K, Hooper JW. Application issues in bioanalytical method validation, sample analysis and data reporting. *J Pharm Biomed Anal* 1995;13(2):89-97.
72. Bressolle F, Bromet-Petit M, Audran M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1996;686(1):3-10.

---

# ANEXOS

---

- O presente trabalho foi apresentado em formato de poster no XXI Congresso Internacional de Medicina Legal no dia 30/5/2009, com o seguinte abstract.

**COMPARATIVE STUDY OF TWO EXTRACTION METHODS FOR THE DETERMINATION OF ANTIDEPRESSANTS IN PLASMA AND URINE BY LIQUID CHROMATOGRAPHY.**

Domingos A., Gallardo E., Queiroz J.A.

CICS - Health Science Research Centre, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

Depression is a common and major psychiatric disorder affecting as many as 20% of individuals within their lifetime. In Portugal, and according to the INFARMED, the consumption of antidepressants has increased in the recent decades [1]. Despite of the increase in the prescription of new generation antidepressants, suicidal and/or overdose situations involving tricyclic antidepressants are still common.

The main goal of this work was to evaluate two extraction procedures, using solid-phase extraction (SPE) and liquid-liquid extraction (LLE) for the detection of nine antidepressants (amitriptyline, clomipramine and principal metabolite, dotiepine, fluoxetine, mianserine, nortriptyline, sertraline, trazodone and venlafaxine) in plasma and urine samples. Several parameters have been optimized, including extraction solvents (n-hexane, isoamylic alcohol, dichloromethane, Toxitube®A) and SPE cartridges, in order to obtain maximum sample cleanup efficiency. Selectivity, detection limits and recovery of all procedures were evaluated according to internationally accepted criteria.

Recovery values ranged from 16-80 % for LLE and 60-98% for SPE. In general, SPE techniques have demonstrated to be more adequate for the determination of antidepressants in biological fluids due to the presence of lower amounts of interfering endogenous substances and to the simplicity and ease of automation presented.

[1]. Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, IP. Consumo de Antidepressivos, por Substância Activa, em Ambulatório no âmbito do Sistema Nacional de Saúde 2007.

- o Este trabalho vai também ser apresentado no IV Annual CICS Symposium 2009, como *short communication* para o qual foi enviado o seguinte *abstract*.

**ANALYTICAL APPROACHES FOR THE ANALYSIS OF NINE SELECTED ANTIDEPRESSANTS IN PLASMA AND URINE USING LIQUID CHROMATOGRAPHY-DIODE ARRAY DETECTION**

Domingos A., Queiroz J.A, Gallardo E.

CICS - Health Science Research Centre, Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal

The consumption of antidepressant drugs has increased over the last decade. In fact, in 2000 the IMS Health reports that these medicines represent the third therapeutic group worldwide, and account for 4.2% of the global pharmaceutical market.

In Portugal, and according to the published data by Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento (INFARMED) referring to the year 2000, antidepressant and psychotropic medicines were included in the top 10 of the most burdensome therapeutic groups to the public treasury, involving a cost of 98 million Euro.

Despite of the increase in the prescription of new generation drugs, suicidal and/or overdose situations involving tricyclic antidepressants are still common. These facts are alarming, since for instance in the USA, approximately 3.4% of people with major depression commit suicide; on the other hand, up to 60% of all people who commit suicide have a depression or another mood disorder.

The aim of this work was the comparison of several sample preparation techniques such using liquid-liquid extraction (LLE) or solid-phase extraction (SPE) with different packing materials and solvents for the detection of selected antidepressants in plasma

and urine. The extracts were analysed by liquid-chromatography with diode array detection.

The studied analytes were amitriptyline, clomipramine, dothiepin, fluoxetine, mianserine, nortriptyline, sertraline, trazodone and venlafaxine. Protriptyline was used as internal standard.

Several parameters have been optimized, including extraction solvents and SPE cartridges, in order to obtain maximum sample cleanup efficiency. Selectivity, detection limits and recovery of all procedures were evaluated according to internationally accepted criteria.

Recovery values ranged from 16-82 % for LLE and 42-97% for SPE. In general, SPE techniques have demonstrated to be more adequate for the determination of antidepressants in biological fluids due to the presence of lower amounts of interfering endogenous substances. In addition, less steps are needed to accomplish the same degree of sample purification, and automation is more easily achieved.

*Keywords:* Antidepressants; Liquid chromatography; Sample preparation; Toxicology.