UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Redistribuição *postmortem* de antidepressivos e seus produtos de biotransformação em tecidos biológicos humanos

Marcelo Filonzi dos Santos

Tese para obtenção do grau de

DOUTOR

Orientador:

Prof. Dr. Mauricio Yonamine

São Paulo

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Santos, Marcelo Filonzi dos

S237r Redistribuição postmortem de antidepressivos e seus produtos de biotransformação em tecidos biológicos humanos / Marcelo Filonzi dos Santos. -- São Paulo, 2014. 140p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Yonamine, Mauricio

 Toxicologia forense 2. Medicina legal I. T. II Yonamine, Mauricio, orientador.

615.9 CDD

Marcelo Filonzi dos Santos

Redistribuição *postmortem* de antidepressivos e seus produtos de biotransformação em tecidos biológicos humanos

Comissão Julgadora

da

Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Mauricio Yonamine

orientador/presidente

1°. examinador

2°. examinador

3°. examinador

São Paulo, _____ de ____.

APOIO FINANCEIRO

FAPESP – FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO.

PROCESSO Nº 2009/08314-9.

PROCESSO Nº 2010/06530-3.

CNPq – CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO.

PROCESSO Nº 470643/2009-9

O TRABALHO FOI CONCLUÍDO COM A EFETIVA PARTICIPAÇÃO DAS SEGUINTES INSTITUIÇÕES E COLABORADORES:

LAT/FCF/USP – Laboratório de Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Prof. Dr. Mauricio Yonamine

Msc. Marcelo Filonzi dos Santos

Saskia Carolina Seulin

Caio Caleiras Ferri

Adrian Eduardo Yamada Camara

FMUSP - Departamento de Medicina Legal, Ética Médica e Medicina Social e do Trabalho da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Profa. Dra. Vilma Leyton

Juliana Takitane

SVO/USP - Serviço de Verificação de Óbitos da Capital – Universidade de São Paulo.

Prof. Dr. Carlos Augusto G. Pasqualucci

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, José (*in memorian*) e Ivone, pelos incentivos desde a infância para a evolução constante dos estudos, estimulando e vibrando com cada vitória e fazendo as derrotas serem incapazes de impedir os sucessos.

Aos meus irmãos, Zé Roberto e Valdir, pelo apoio incondicional nos estudos, carinho, afeto e amizade.

Leonice, pela sua paciência infinita e compreensão em todos os momentos. Obrigado pelo seu companheirismo, amor e eterna inspiração.

Letícia (Lelê, minha princesa): nos estudos de Mestrado, você era uma sementinha e eu já te amava muito. Veio ao mundo, encheu a nossa casa e os lugares por onde passou com alegria, justificando o significado do seu lindo nome! Obrigado pela paciência e por ter suportado minhas ausências em alguns momentos desse trabalho. Suas dúvidas e sugestões, espontâneas e questionadas, ajudaram a minha evolução.

Ao Professor Mauricio Yonamine, registro um especial e ímpar agradecimento. Primeiro por receber um aluno com experiência profissional e acadêmica nula na área de Toxicologia e se dispor a orientá-lo a obter o grau de Doutor. Raros professores aceitariam um

desafio dessa magnitude! Obrigado pelo exemplo apresentado de como deve ser profissional ético, competente e buscando sempre a perfeição. Suas críticas, contestações, sugestões, apoio e ensinamentos contribuíram de forma concreta para a realização do aprendizado. Obrigado, também, pela amizade e paciência!

À Professora Vilma Leyton pela imensa ajuda, apoio, críticas, sugestões e por ter permitido o uso dos equipamentos pertencentes ao seu laboratório na FMUSP. Nesse ambiente de trabalho, agradeço à Juliana Takitane, por estar sempre disposta a socorrer em todos os momentos das análises toxicológicas e fora delas também.

Aos professores presentes na minha banca de qualificação: José Luiz da Costa (Zé Luiz), Tania Marcourakis e Elisabeth Nascimento. As críticas e sugestões engrandeceram e muito os resultados finais obtidos, proporcionando ótimo aprendizado e a busca de novos conhecimentos.

Aos professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Profa. Sandra Farsky, Profa.Ana Paula Loureiro, Prof. Ernani Pinto, Prof. Bruno Spinosa pelas sugestões, críticas e apoio.

Ao Banco de Sangue do Hospital Sírio Libanês pela doação das bolsas contendo sangue total. Estas foram fundamentais para validações de métodos.

Agradeço à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP-São Paulo (FCF-USP) por ter consolidada minha formação como farmacêutico e depois de uma década, em especial o Depto de Análises Clínicas e Toxicológicas, oferecer a oportunidade para a realização deste trabalho.

Aos amigos e colegas, André Valle de Bairros (Grillo), Rafael Menck, Tiago Franco, Caio Ferri, Adrian Yamada, Raphael Caio, Guilherme, Angelo, Clóvis, Samantha, Flávia Roveri, Gabriela Silveira, Beatriz (Bia), Luma, Livia Dati, Lorena Pantaleão, Sarah Carobini Franco, Cinthia, Carolina, Vânia Rodrigues, Fabiana Almeida dos Santos, Daniele Mayumi, Ligia Goes Endo, Juliana Takitane e Saskia Seulin, agradeço muito a contribuição de vocês para a concretização dos estudos.

À Dona Luzia e Dona Dalva, sempre incansáveis nas suas rotinas e proporcionaram ótimas condições para as realizações dos experimentos e demais trabalhos envolvidos, meu muito obrigado. Valtair Santana (Instituto Oscar Freire - IOF-FMUSP) agradeço às suas importantes ajudas no laboratório da Profa. Vilma. Aos funcionários do LAT, IOF e todos os envolvidos e presentes, de forma direta ou indireta na evolução e conclusão deste trabalho, obrigado.

RESUMO

SANTOS, M.F. Redistribuição *postmortem* de antidepressivos e seus produtos de biotransformação em tecidos biológicos humanos. 2014. Tese de Doutorado – Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2014.

Os antidepressivos pertencem a uma importante classe de medicamentos investigados na toxicologia forense. Em casos de amostras provenientes de cadáveres, o intervalo entre o óbito e a obtenção da espécie biológica pode proporcionar a redistribuição postmortem destes fármacos. Com o objetivo de elucidar esse fenômeno, métodos analíticos foram desenvolvidos e aplicados utilizando sangue total (ST), humor vítreo (HV) e fígado. Para as amostras de ST e HV, o método de extração escolhido e validado foi a microextração em fase líquida (LPME) trifásica. Fibras ocas constituídas de polipropileno, com a extensão de 8 cm cada, foram tratadas com o solvente orgânico dodecano (fase orgânica), resultando em um membrana com permeabilidade seletiva. No lúmen destas fibras, adicionou-se ácido fórmico 0,1 mol/L (fase aceptora). Em frasco de fundo chato com 5 mL de capacidade, pipetou-se 3,5 mL de NaOH 0,1 mol/L (fase doadora) e 0,5 mL de ST ou HV. Ao término da extração, as amostras foram introduzidas no GC-MS, sem a necessidade de reações de derivatização. O estudo com ST contemplou os antidepressivos amitriptilina (AMI), nortriptilina (NTR), imipramina (IMI), desipramine (DES), clomipramina (CLO), desmetilclomipramina (DMC), fluoxetina (FLU) e norfluoxetina (NFL). Os limites de quantificação para estas substâncias ficaram inferiores aos níveis terapêuticos (20 ng/mL). As médias dos coeficientes de variação intradia e interdia foram, respectivamente, de 9,7 e 9,8%. As curvas de calibração apresentaram linearidade entre as concentrações de 20 até 1200 ng/mL. A validação do parâmetro integridade da diluição assegurou a mensuração de quantidades superiores ao limite apresentado na curva de calibração. O método foi aplicado em sete amostras reais postmortem e em apenas um caso foi observada uma diferença significativa (300%) entre os valores quantificados no ST periférico e central. Os antidepressivos tricíclicos AMI, NTR, IMI e DES foram avaliados no HV e o efeito matriz foi detectado para os dois últimos analitos. O método foi otimizado e validado utilizando solução salina adicionada de AMI e NTR. O limite de detecção igual a 5 ng/mL, foi obtido com a redução da voltagem da fonte de íons do espectrômetro de massa para 50 eV. Coeficientes de variação foram inferiores a 15%. Os procedimentos validados foram aplicados em seis amostras reais de HV. A relação encontrada entre os valores obtidos no ST periférico e HV foi de aproximadamente 0,1. A extração acelerada por solvente (ASE) e, posteriormente, a extração em fase sólida (SPE) foram as técnicas de separação dos analitos da matriz fígado. Ao término das citadas extrações, os antidepressivos foram analisados no GC-MS. Para esta matriz sólida, são necessários mais estudos, pois os valores encontrados nos ensaios analíticos estão em desacordo com as diretrizes utilizadas na validação dos métodos.

Palavras-chave: microextração em fase líquida (LPME), toxicologia forense, cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), humor vítreo, efeito matriz.

ABSTRACT

SANTOS, M.F. *Postmortem* redistribution of antidepressants and their metabolites in human biological tissues. 2014. Tese de Doutorado – Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2014.

Antidepressants belong to an important class of drugs investigated in forensic toxicology. In cases of samples from corpses, the interval between death and obtaining the biological specimens can provide the postmortem redistribution of these drugs. Aiming to elucidate this phenomenon, analytical methods were developed and applied using whole blood (WB), vitreous humor (VH) and liver. For samples of WB and HV, the extraction method chosen and validated was the three-phase liquid phase microextraction (LPME). Hollow fibers consist of polypropylene, with a length of 8 cm each were treated with dodecane organic solvent (organic phase) resulting in a membrane with selective permeability. Into the lumen of these fibers was added formic acid 0.1 mol/ L (acceptor phase). In the vial containing 3.5 mL of NaOH 0.1 mol / L (donor phase) was spiked 0.5 ml of biological fluids (WB or VH). Subsequently, the samples were injected in GC-MS without derivatization reactions. The study of the ST included antidepressants amitriptyline (AMI), nortriptyline (NTR), imipramine (IMI), desipramine (DES), clomipramine (CLO), desmethylclomipramine (DMC), fluoxetine (FLU) and norfluoxetine (NFL). The quantification limits for these substances were below the therapeutic levels (20 ng/ml). The mean coefficients of variation and separate intradays were respectively 9.7 and 9.8%. The calibration curves showed linearity between concentrations of 20 to 1200 ng/mL. The validation of the integrity of the dilution parameter assured measurement higher than the limit shown in the calibration curve quantities. The method was applied to seven real postmortem samples and in one case a significant difference (300%) between the measured values in the peripheral and central ST was observed. The tricyclic antidepressants AMI, NTR, IMI and DES were evaluated in VH and the matrix effect was detected in the last two analytes. The method was optimized and validated using saline spiked AMI and NTR. The limit of detection (5 ng/ml) was obtained by reducing the voltage of the ion source of the mass spectrometer 50 eV. Coefficients of variation were below 15%. The procedures were validated in six real samples of HV. The relationship found between the values obtained in the peripheral ST and HV was approximately 0.1. Accelerated solvent extraction (ASE) and subsequently the solid phase extraction (SPE) were the techniques of separation of analytes liver matrix. At the end of the cited extractions, antidepressants were analyzed in GC-MS. To this solid tissue, further studies are needed, because the values found in the analytical tests were not in accordance with the guidelines used in the validation of the methods.

Keywords: liquid-phase microextraction (LPME), forensic toxicology, gas chromatographymass spectrometry (GC-MS), vitreous humour, matrix effect.

SUMÁRIO

	I.INTRODUÇAO	19
	1.1 Aspectos gerais da depressão	19
	1.2 Importância do estudo	23
	1.3. Redistribuição postmortem	25
	1.4 Toxicocinética e toxicodinâmica dos principais antidepressivos utiliza no Brasil	
	1.6 Técnicas de extração	39
2. (OBJETIVO	44
3. I	MATERIAL	46
	3.1 Equipamentos e acessórios	46
	3.2 Reagentes e Reativos	47
	3.3Amostras de sangue total	47
	3.4 Amostras de humor vítreo humano e bovino	48
	3.5 Amostras de fígado humano e bovino	48
	3.6 Comitê de ética	49
	3.7 Padrões analíticos	49
4. I	MÉTODOS	54
	4.1 Microextração em fase líquida (LPME) para AD em sangue total	54
	4.2 Condições cromatográficas	57
	4.3 Otimização do método	59
	4.4 Recuperação	60
	4.5 Precisão Inter- e intradias	60
	4.6 Lineariedade	60
	4.7 Exatidão	61
	4.8 Limites de detecção e quantificação	61
	4.9 Integridade da diluição	
	4.10Aplicações em casos reais post-mortem	62
5.]	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
6. I	MÉTODOS	81
	Microextração em fase líquida (LPME) para AD em humor vítreo	
	6.2 Condições cromatográficas	81
	6.3 Efeito matriz	
	6.4 Otimização do método	82

6.5 Recuperação 82
6.6 Precisão Inter- e intradias
6.7 Lineariedade
6.8 Exatidão
6.9 Limites de detecção e quantificação
6.10 Integridade da diluição
6.11 Estabilidade da amostra extraída
6.12 Aplicações em casos reais post-mortem
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO 86
8.MÉTODOS
8.1. Separação analítica aplicando a extração acelerada por solvente - ASE 97
8.2 Extração em fase sólida - SPE
8.3 Condições cromatográficas98
8.4 Efeito matriz
9. RESULTADOS E DISCUSSÃO
10. CONCLUSÕES
11. REFERÊNCIAS 105
Anexos

LISTA DE QUADROS

QUADROS	Página	
Quadro 1: Alguns antidepressivos comercialmente disponíveis no Brasil.	22	
Quadro 2: Fatores influentes na redistribuição postmortem de drogas.		
Quadro 3 : recomendações de alterações nas dosagens para amitriptilina e nortriptilina, com base no fenótipo CYP2D6.	30	
Quadro 4: condições de elevação e controle de temperatura do cromatógrafo gasoso.	57	
Quadro 5: Grupos dos antidepressivos e respectivos íons (m/z) utilizados no modo SIM.	57	
Quadro 6 : Íons quantificadores utilizados nos estudos de antidepressivos após LPME e análises no GC-MS.	59	

LISTA DE TABELAS

TABELAS	Página
Tabela 1: Concentrações terapêuticas dos antidepressivos no tratamento da depressão e as quantidades plasmáticas tóxicas destes fármacos.	32
Tabela 2: Influência dos AD sobre as isoenzimas do citocromo P450, suas ações nos receptores e interações com receptores.	36
Tabela 3: Coeficientes de variações (CV) inter e intradias dos antidepressivos em amostras de sangue total após LPME e análises em GC-MS.	71
Tabela 4: Heteroscedasticidade, regressão linear ponderada, equação de regressão linear e coeficiente de correlação dos antidepressivos em sangue total analisados durante a validação do método de LPME e GC-MS. Média de seis replicatas.	72
Tabela 5: Resultados de exatidão em três níveis de concentração dos antidepressivos em sangue total (baixo, médio e alto) obtidos por LPME, seguidos de análises cromatográficas por GCMS. Média de 06 replicatas em cada nível.	72
Tabela 6: Resultados da integridade da diluição dos antidepressivos em sangue total durante a validação do método por LPME e GC-MS	74
Tabela 7: Concentração de antidepressivos em sangue total de amostras <i>postmortem</i> de sangue total, obtidas da cavidade cardíaca (sangue cardíaco) e sangue femoral.	76
Tabela 8: Comparação do coeficiente de determinação (R ²), <i>slopes</i> e coeficiente de variação das curvas de calibração utilizando humor vítreo bovino, humano e solução salina.	89
Tabela 9: Parâmetros de confiabilidade para validação do método de estudo para antidepressivos em solução salina por LPME e GC-MS.	91

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS	Página
Figura 1: Fórmula estrutural da imipramina.	20
Figura 2 : Principal via de biotransformação da amitriptilina, da nortriptilina e das enzimas envolvidas.	29
Figura 3: Modelo de plasticidade do hipocampo apresentando alterações estruturais em resposta ao estresse	34
Figura 4: Modelo demonstrando a regulação da neurogênese hipocampo	35
Figura 5: Representação do sistema de extração acelerada por solvente (ASE)	42
Figura 6: estruturas químicas dos antidepressivos participantes do estudo	50
Figura 7: Frasco com fundo chato e acessórios utilizados para LPME de antidepressivos com sangue total.	55
Figura 8: Imagens representado o fluxo dos procedimentos de extração utilizando LPME e análises por GC-MS.	56
Figura 9 : Estudos das melhores concentrações do ácido fórmico para a otimização do método utilizando LPME seguida de análises em GC-MS. Média de três replicatas	65
Figura 10 : Estudos das melhores concentrações do ácido fórmico para a otimização do método utilizando LPME seguida de análises em GC-MS. Média de três replicatas.	66
Figura 11 : Estudos das melhores concentrações do ácido fórmico para a otimização do método utilizando LPME seguida de análises em GC-MS. Média de três replicatas.	67
Figura 12 : Estudos das melhores concentrações do ácido fórmico para a otimização do método utilizando LPME seguida de análises em GC-MS. Média de três replicatas.	68
Figura 13: Cromatograma obtido por LPME contendo sangue total adicionando de norfluoxetina (A), fluoxetina (B), amitriptilina (C), nortriptilina (D), imipramina (E), desipramina (F), clomipramina (G) e desmetilclomipramina (H)	69
Figura 14 : Recuperações de antidepressivos em sangue total, nos níveis baixo (50 ng/mL), médio (500 ng/mL) e alto (1000 ng/mL) em amostras de sangue total, após LPME, seguida de análises em GC-MS médio (500 ng/mL) de antidepressivos com 500 μ L sangue total, após extração por LPME e análises por GC-MS. Média de 06 replicatas (áreas relativas).	70
Figura 15 : cromatogramas obtidos após realização de microextração em fase líquida LPME e análises por GC-MS.	75

.

Figura 16 : cromatogramas obtidos após realização de microextração em fase líquida LPME e análises por GC-MS de amostra real apresentada com o número 3 da Tabela 7	78
Figura 17 – Curvas de calibrações para a amitriptilina obtidas com humor vítreo (HV) bovino, humor vítreo humano e solução salina.	86
Figura 18 – Curvas de calibrações para a nortriptlina obtidas com humor vítreo (HV) bovino, humor vítreo humano e solução salina.	87
Figura 19: Curvas de calibrações para a imipramina obtidas com humor vítreo (HV) bovino, humor vítreo humano e solução salina.	87
Figura 20: Curvas de calibrações para a desipramina obtidas com humor vítreo (HV) bovino, humor vítreo humano e solução salina	88
Figura 21: Otimização do tempo de extração para LPME utilizando solução salina e amitriptina e nortriptilina.	89
Figura 22: Otimização da velocidade de agitação para LPME utilizando solução salina e amitriptina e nortriptilina.	90
Figura 23: Otimização da temperatura de extração para LPME utilizando solução salina e amitriptina e nortriptilina.	90
Figura 24: Cromatogramas obtidos após LPME e análises instrumentais por GC-MS.a) soro fisiológico enriquecido com antidepressivos e seus análogos deuterado e os padrões internos (PI) (b) uma real humor vítreo humano (c) humano humor vítreo amostra sem qualquer adição de AD.	94

.

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT 5-hidroxitriptamina = Serotonina

AA Antidepressivo(s) atípico(s)

AD Antidepressivo (s)

ADT Antidepressivo(s) tricíclico(s)

AMI Amitriptlina

AMPc Adenosina 3′,5′monofosfato cíclico

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASE Accelerated solvent extraction – Extração acelerada por solvente

ATP Adenosine triphosphate – Adenosina trifosfato

BDNF Brain-derived neurotrophic factor - Fator neurotrófico derivado do

cérebro

CAPPesq Comissão de Ética para Análises de Projeto de Pesquisa

CLO Clomipramina

CONEP-MS Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – Ministério da Saúde

CREB *cAMP responsive element-binding protein* - Proteína ligadora ao

elemento regulado por AMPc (fator de transcrição)

DES Desipramina

DMC Desmetilclomipramina

eV Elétron-volt

FDA Food and Drug Administration – Agência norte-americana

regulamentadora dos alimentos e medicamentos

FID Flame ionization detector – Detector de ionização por chama

FLU Fluoxetina

FMUSP Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

GC Gas Chromatography – Cromatografia Gasosa

HF Hollow fiber – Fibra oca

HLB Hydrophilic-Lipophilic Balance – Balanço hidrofílico-lipofílico

(cartucho para SPE da empresa Waters®)

HPLC High performance liquid chromatography – Cromatografia líquida de

alta eficiência

IMAO Inibidor da monoaminoxidase

IMI Imipramina

.

ISRS Inibidor seletivo da recaptação da serotonina

LAT/FCF/USP Laboratório de Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências

Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - SP

LC Liquid chromatography - Cromatografia líquida

LLE Liquid-liquid extraction - Extração líquido-líquido

LOD Limit of Detection – Limite de detecção.

LOQ Limite of Quantification – Limite de quantificação.

LPME Liquid-phase microextraction - Microextração em fase líquida;

MS Mass spectrometry – Espectrometria de massas

NFL Norfluoxetina

NPD *Nitrogen-phosphorus detector*: detector de fósforo-nitrogênio

NTR Nortriptlina

P/M Parent drug/metabolite - Relação fármaco inalterado/produto de

biotransformação

PI Padrão interno

PKA Protein kinase A - Proteína quinase A

SCAN Monitoramento completo de todos os íons (m/z) no espectrômetro de

massa

SIM Select ion monitoring – Monitoramento selecionado de íons

SINITOX Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas

SPE Solid-phase extraction - Extração em fase sólida

SPME Solid-phase microextraction- Microextração em fase sólida

SVOC-USP Serviço de Verificação de Óbito da Capital – Universidade de São

Paulo.

SWGTOX Scientific Working Group for Forensic Toxicology - Grupo de Trabalho

Científico para Toxicologia Forense

UNODC United Nations Office on Drugs and Crime - Escritório das Nações

Unidas sobre Drogas e Crime

1.INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da depressão

Situações adversas e desagradáveis, como por exemplos, falecimento de um ente querido, perda da atividade profissional ou emprego, divórcio, dentre outros, podem causar reações emotivas transitórias na maioria das pessoas. Porém, se persistirem esses sinais e sintomas por tempo prolongado ou se não houver algum evento causador dessas alterações psíquicas, um distúrbio depressivo pode estar presente no indivíduo e este necessita de acompanhamento médico. Os critérios descritivos capazes de diagnosticar a depressão são apresentados com mais detalhes na 5ª versão (DSM-V) do *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* da *American Psychiatric Association* (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

Os episódios depressivos geralmente persistem por, pelo menos, duas semanas e são classificados de acordo com a gravidade como leve, moderado, grave ou grave com psicose. Depressão breve recorrente é definida como episódios depressivos de duração de alguns dias que se repetem regularmente. A depressão é muitas vezes acompanhada por sintomas somáticos característicos, incluindo anorexia, perda de peso, insônia, despertar muito cedo e retardos psicomotores. Os sintomas associados com depressão atípica incluem abusos na alimentação e longos períodos de sono, com dificuldades para o indivíduo despertar e exercer suas atividades cotidianas. Hiperatividade, mudanças bruscas de humor, ideias expansivas e elevada autoestima são os principais sintomas do paciente com mania. A alternância de episódios de mania ou hipomania e depressão são denominados transtornos bipolares. Em ambas as alterações mentais, os antidepressivos fazem parte do arsenal terapêutico (BRAYFIELD, 2014).

A herança genética, segundo estudos epidemiológicos, pode ser responsável por até 50% dos casos de depressão. Entretanto, ainda não foram identificados genes específicos ou anomalias genéticas para elucidar essa prevalência. Além desse fator, situações de estresse, traumas emotivos, infecções virais e determinados processos no desenvolvimento cerebral também podem contribuir para a etiologia da depressão (NESTLER *et al.*, 2002).

Com o objetivo de elucidar e compreender a ocorrência da depressão, na década de 1960, foram elaboradas teorias bioquímicas relacionando o metabolismo das catecolaminas (noradrenalina, adrenalina, dopamina) e esse distúrbio mental. Segundo a principal hipótese, o baixo desempenho funcional dos neurotransmissores em certos locais do cérebro é responsável pela depressão e, por outro lado, o excesso das monoaminas (dopamina,

noradrenalina, serotonina), resultaria nos episódios de mania (SCHILDKRAUT, 1965). As bases científicas para esses raciocínios são resultados de estudos prévios, realizados na década de 1950, quando ensaios farmacológicos com substâncias capazes de depletar catecolamina e indolaminas, como a reserpina, foram capazes de causar depressão (MULLER *et al.*, 1955). Pesquisas realizadas no *National Institute of Health*, apresentaram este composto químico como sendo capaz de causar pronunciada depleção dos estoques cerebrais das monoaminas (SHORE *et al.*, 1955). Por outro lado, observaram-se os efeitos terapêuticos em pacientes em uso de agentes capazes de aumentar os níveis sinápticos desses neurotransmissores. Para se obter essa estratégia, os antidepressivos foram introduzidos na terapêutica, bloqueando o transporte de neurotransmissores (recaptação) ou através da inibição da enzima mitocondrial monoaminoxidase, responsável pela desaminação oxidativa das monoaminas (RICHELSON, 2001; 2003).

O precursor do primeiro antidepressivo tricíclico foi o iminodibenzil, sintetizado no século XIX, mais precisamente no ano de 1891. Modificações nos radicais dessa molécula resultaram no fármaco imipramina (Figura 1), utilizado em 1949 pelo médico psiquiatra suíço Roland Kuhn. Inicialmente, esperavam-se efeitos no tratamento da esquizofrenia. Porém, pacientes com este distúrbio, não apresentaram qualquer evolução clínica satisfatória desse quadro psíquico, mas observou-se melhora da depressão (CAHN, 2006). Estudos posteriores, realizados pela equipe do pesquisador Axelrod, apresentaram a imipramina como um inibidor da recaptação da noradrenalina, elucidando o mecanismo de ação desse antidepressivo tricíclico (ADT) de primeira geração (HERTING *et al.*, 1961).

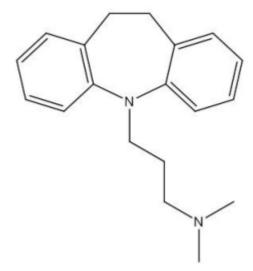


Figura 1: Fórmula estrutural da imipramina.

Em 1965, J. Schildkraut anunciou a versão da hipótese da catecolamina, na qual associou as depressões com a redução absoluta ou relativa das catecolaminas e, em especial, a noradrenalina disponível em sítios centrais de receptores adrenérgicos (SCHILDKRAUT, 1965) Na Europa, a hipótese de deficiência da serotonina apresentou maior aceitação, enquanto na América do Norte, a catecolamina destacada por J. Schildkraut, recebeu ênfase no campo da psiquiatria. A supracitada hipótese proporcionou muitas pesquisas pelas indústrias farmacêuticas, com o objetivo de descobrirem novos fármacos para os distúrbios mentais. Até os anos 1980, havia duas classes de antidepressivos: os antidepressivos tricíclicos (ADT) e os inibidores da monoaminoxidase (IMAO). Atualmente, o desenvolvimento de novos fármacos foi responsável pelo aumento significativo no número de antidepressivos, com a inclusão de novas classes e a expansão de fármacos disponíveis para uso na terapêutica, que atuam por mecanismos diversos e apresentam estruturas químicas diferenciadas. A classificação mais simples os divide em quatro grupos: os ADT, tais como a amitriptilina, a clomipramina, a imipramina, a desipramina e a nortriptilina; os inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS), representados pelo citalopram, fluoxetina, paroxetina, venlafaxina e sertralina; os IMAO, como a moclobemida; e os antidepressivos atípicos, como a bupropiona (BRUNTON et al., 2011). Resumidamente, os principais tipos de medicamentos antidepressivos podem ser classificados em quatro grupos, conforme listados abaixo:

- Antidepressivos tricíclicos (ADT).
- Inibidores da monoaminooxidase (IMAO).
- Inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS).
- Antidepressivos atípicos (AA).

Apenas o mecanismo de ação aguda dos antidepressivos (AD) não é capaz de explicar a eficácia no tratamento da depressão, pois todos os medicamentos utilizados para o tratamento da depressão necessitam de um período de várias semanas antes de se tornarem eficazes. Esse intervalo sugere a modificação da expressão de genes no cérebro e, como resultado, a alteração bioquímica necessita de um tempo para sua estabilização. Muitas teorias têm sido propostas, incluindo alterações na expressão de receptores alfa e beta-adrenérgicos, mudanças nos fatores de transcrição e/ou fatores neurotróficos e alterações morfológicas nas conectividades dos nervos monoaminérgicos e a indução da formação de novas células nervosas (IVERSEN, 2006).

No Quadro 1 são apresentados alguns antidepressivos disponíveis no Brasil, suas classes e seus respectivos nomes comerciais:

Nome genérico	Classe	Nome comercial
		Tryptanol®
Amitriptilina	ADT	Tryptil®
		Limbitrol®
Bupropiona	AA	Zyban®
Clomipramina	ADT	Anafranil®
Fluoxetina	ISRS	Prozac®
Tuoxema	ISKS	Daforin®
Imipramina	ADT	Tofranil®
Nortriptilina	ADT	Pamelor®

Quadro 1: Alguns antidepressivos comercialmente disponíveis no Brasil. ADT: antidepressivo tricíclico; AA: antidepressivo atípico; ISRS: inibidor seletivo da recaptação da serotonina.

1.2 Importância do estudo

A depressão é um transtorno mental descrito há mais de dois mil anos e já era reconhecida antes do nascimento da psiquiatria (SHORTER, 1998). Aproximadamente 350 milhões de pessoa no mundo todo são afetadas por essa desordem psíquica. É um distúrbio comum, frequentemente coexistindo com outras doenças. Na economia global, exerce um importante impacto negativo, pois o indivíduo deprimido, muitas vezes, perde a capacidade de exercer suas atividades profissionais. Além disso, a depressão pode, em situações extremas, resultar em suicídio. Por ano, aproximadamente um milhão de mortes ocorrem devido a essa trágica fatalidade. Para cada óbito consumado, ocorrem 20 ou mais tentativas sem sucesso, mas com graves consequências ao indivíduo e à sociedade (WHO, 2013). Segundo a Organização Mundial de Saúde, a depressão será a segunda principal causa das doenças, estimada para todas as idades e ambos os sexos, até ao ano 2020 (MURRAY *et al.*, 1994) (SAMPSON, 2001).

Em 2011, pesquisadores do *Toxicology Investigators Consortium* (ToxIC), vinculados ao Colégio Americano de Toxicologia Médica, registraram casos de intoxicação em 28 locais nos Estados Unidos. Nos cálculos estatísticos registrados, houve *overdose* em 48% dos pacientes, sendo 37% exposições intencionais e 11% acidentais. Os antidepressivos foram responsáveis por 16% das ocorrências (WIEGAND *ET AL.*, 2012).

Na Inglaterra e País de Gales, 80% das mortes por antidepressivos são intencionais (CHEETA *ET AL.*, 2004). Um estudo no Egito, realizado em uma unidade de emergência por intoxicação no hospital, mostrou a incidência de tentativas de suicídio e o uso de antidepressivos. Os pacientes com depressão devem ter um rigoroso acompanhamento médico para evitar tentativas de suicídio (MANDOUR, 2012).

O Brasil, quinto país mais populoso do mundo, está entre os dez países com maiores números absolutos casos de suicídio. Antidepressivos são responsáveis por quase 20% das tentativas de suicídio. Dentro dessa classe, a amitriptilina foi responsável por 62% das intoxicações (BERNARDES *et al.*, 2010).

Em toxicologia forense, o sangue é a amostra de escolha para a detecção, quantificação e interpretação das concentrações das drogas. O sangue total é a matriz biológica com a maior quantidade de informações disponíveis na literatura (BASELT, 2008). Os resultados obtidos nas investigações forenses permitem classificar a quantidade mensurada dos antidepressivos em dosagens terapêuticas ou sobredose (FLANAGAN e CONNALLY, 2005). Dados obtidos com este fluido de indivíduos vivos não podem aplicados em amostras

postmortem, pois importantes modificações bioquímicas ocorrem nesta matriz biológica nos tempos subsequentes à morte. Estas alterações nas composições sanguíneas são causadas pela redistribuição postmortem (PELISSIER-ALICOT et al., 2003) (FERNER, 2008). Este fenônemo será apresentado no item 1.3.

Nos casos em que não seja possível a obtenção de amostras de sangue, o humor vítreo (HV) desempenha um papel importante no campo da toxicologia forense. A sua localização anatômica privilegiada, inserido no ambiente ocular, proporciona proteção contra contaminações por microrganismos. Ele também é menos suscetível ao fenômeno redistribuição postmortem e é obtido através da inserção de uma agulha através da esclera. Além disso, os resultados encontrados nas análises de HV são geralmente mais representativos da concentração do fármaco em circulação no momento da morte (KARCH, STEVEN B . 2007; FERNANDEZ et al., 2013). O humor vítreo (HV) compreende 99% de água e o restante 1% é composto de sais, açúcares, fagócitos e de uma rede de colágeno (ANTONIDES et al., 2007). Embora os antidepressivos apresentem um papel importante na terapia e em casos forenses (HAYASHI et al., 2012; PIETRACCI et al., 2013), há poucos estudos disponíveis relacionando as concentrações no sangue total e a quantificação em HV. Além disso, a relação entre os resultados apresentados é variável e a maioria dos artigos descreve casos de overdose ou de acidentes. Dessa forma, há poucas informações sobre as concentrações terapêuticas no HV (JONES e POUNDER, 1987; JOHNSON et al., 2007; CANTRELL et al., 2009; STIAKAKIS et al., 2009; LEWIS et al., 2013).

O fígado também é relevante nas investigações forenses. Sua grande extensão favorece a opção de amostras para as análises. Há um banco de dados disponível para associados ao TIAFT (*The Interational Association of Forensic Toxicologists*) com valores de referência para esta matriz biológica (DRUID e HOLMGREN, 1998). Outra característica interessante do fígado é a estabilidade dos xenobióticos, pois, mesmo após a morte é observada uma discreta diminuição na concentração das substâncias exógenas pelo processo passivo da difusão (JONES e POUNDER, 1987; KARCH, STEVEN B . 2007; MOFFAT, 2011). Na redistribuição *postmortem*, os antidepressivos contidos no fígado podem ser liberados para artérias e veias pulmonares e a veia cava, e, consequentemente, a concentração destes fármacos estará aumentada (SHEPHERD *et al.*, 1992).

1.3. Redistribuição postmortem

Para melhor entendimento deste item, é necessária a apresentação das alterações ocorridas após a morte celular. Há quatro elementos-chave para a manutenção da estrutura e integridade celular. Estes incluem a manutenção da integridade das membranas celulares, a respiração aeróbia, as sínteses enzimáticas e das proteínas estruturais e preservação da integridade do material genético da célula. Com a morte celular, ocorre a liberação do conteúdo interno, incluindo xenobióticos. Cessa-se a respiração aeróbia, diminui-se a produção de adenosina trifostato (ATP) e inicia-se o metabolismo anaeróbio. O ácido lático e fosfatos inorgânicos acumulam-se no interior da célula, causando uma diminuição do pH neste ambiente. O funcionamento da bomba de sódio-potássio é dependente do consumo de energia e a diminuição do ATP disponível, resulta em falhas na eficiência deste sistema. Na continuidade das alterações morfológicas, verifica-se edema celular, a dilatação do retículo endoplasmático, resultando no desprendimento dos ribossomos desta rede membranosa e a matriz mitocondrial é destruída. Os componentes celulares são, então, progressivamente degradados com perda do conteúdo celular para o espaço externo. A sequência de eventos depende dos órgãos envolvidos. Danos celulares irreversíveis podem ocorrer no miocárdio entre 30-40 minutos após isquemia. No fígado, esse intervalo fica entre 1-2 horas, enquanto para os neurônios cerebrais, apenas 3-5 minutos são necessários para lesões permanentes (YAREMA e BECKER, 2005).

As razões para que uma droga participe da redistribuição *postmortem* podem ser agrupadas de acordo com as propriedades do elemento químico, em especial o volume de distribuição (Vd), lipofilicidade e o pKa e as alterações ocorridas no organismo após a morte, tais como a difusão passiva proveniente dos órgãos sólidos, putrefação e movimento sanguíneo (YAREMA e BECKER, 2005).

O Vd é definido como a quantidade de droga no corpo dividida pela concentração de desta no plasma, expressa em litros por quilograma (L/kg) de peso corporal. Vários fatores afetam esse parâmetro, incluindo as propriedades da substância química, idade, gênero, doenças e composição corporal (BRUNTON *et al.*, 2011). Fármacos distribuídos nos músculos, tecidos adiposos e outros constituintes intracelulares apresentam um Vd elevado e quando este é superior a 3L/kg, o potencial de ocorrência da redistribuição *postmortem* é considerável. Após a morte e lise celular, os fármacos são liberados no plasma e resultam em um aumento da concentração destes (HILBERG *et al.*, 1999).

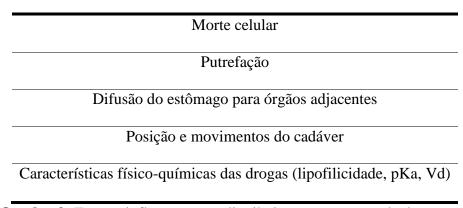
A lipofilicidade, pKa, transporte ativo e afinidade do tecido pelos fármacos também são importantes na redistribuição *postmortem*. Fármacos lipofílicos e compostos orgânicos básicos, devidos às suas propriedades físico-químicas, poderão estar concentrados em órgãos sólidos como pulmões, fígado e miocárdio. Subsequente ao óbito, essas condições favorecerão a ocorrência de um gradiente de concentração para difusão passiva. Somando-se a isso, o conteúdo aquoso celular tornar-se-á ácido. Este meio favorecerá a ionização de moléculas de drogas básicas e estes fármacos com cargas iônicas serão transportadas no fluido ácido no qual elas estão dissolvidas (HILBERG *et al.*, 1999).

Os órgãos próximos aos grandes vasos sanguíneos e coração, tais como estômago, piloro, duodeno proximal, lóbulo esquerdo do fígado e os pulmões são mais suscetíveis à redistribuição *postmortem*. Um estudo realizado em ratos comparou duas situações distintas. Um grupo permaneceu com a traqueia obstruída cirurgicamente e os animais controle preservaram este órgão aberto. Na primeira condição, foi possível detectar o ADT amitriptilina no lóbulo esquerdo do fígado, transcorridas 96 horas após a morte destes roedores. Nos ratos não submetidos aos procedimentos de oclusão, o tempo máximo para conseguir identificar o fármaco, nesta matriz biológica, foi de apenas 1,5 hora *postmortem*. Esse resultado sugere a contribuição da aspiração agonal *postmortem* para redistribuição de drogas (HILBERG *et al.*, 1999).

A decomposição do corpo pode contribuir para alterações das concentrações dos xenobióticos após a morte. Robertson e Drummer estudaram a biotransformação dos benzodiazepínicos flunitrazepam, clonazepam e nitrazepam na presença de oito espécies de bactérias entéricas, normalmente encontradas no trato gastrointestinal *postmortem*. Segundo os pesquisadores, a biotransformação foi mais rápida por microrganismos anaeróbios facultativos *Clostridium perfringens* e *Clostridium Bacillus fragilis*. A eficiência da biotransformação foi reduzida quando as reações executadas a 4°C, em comparação com as temperaturas variando entre 22-37°C (ROBERTSON e DRUMMER, 1998).

A posição do corpo após a morte e subsequentes movimentos ou alterações do cadáver por policiais e médicos podem ter efeito sobre a redistribuição *postmortem*. Estudos com animais, envolvendo o medicamento secobarbital quantificado com amostras da matriz biológica fígado, apresentam resultados distintos dependendo da posição na qual os ratos permaneceram após a morte (PARKER *et al.*, 1971).

No Quadro 2, estão inseridas de forma sucinta, as principais influências na redistribuição *postmortem*.



Quadro 2: Fatores influentes na redistribuição *postmortem* de drogas

Os antidepressivos são substâncias psicoativas de caráter básico, lipofílicos, com elevada ligação aos tecidos e com grande volume de distribuição. Com isso, conforme explicado anteriormente, podem sofrer redistribuição *postmortem*. Um dos mecanismos envolvidos neste processo é o acúmulo destes medicamentos nos pulmões *in vivo*. Após o óbito, os fármacos em concentrações elevadas nesse órgão, promovem um gradiente favorável para a difusão passiva às câmaras cardíacas esquerdas, pelo sistema venoso pulmonar. A transferência dos antidepressivos a partir de depósitos nos pulmões para a circulação pulmonar parece ocorrer mais rapidamente e em maior extensão do que a partir do fígado para a veia cava inferior. Os ADT, também podem se difundir a partir do miocárdio às câmaras cardíacas, contribuindo para o aumento da concentração mensurada no sangue obtido da cavidade cardíaca, no período subsequente à morte (MORIYA e HASHIMOTO, 1999; YAREMA e BECKER, 2005). O fenômeno da redistribuição *postmortem* foi relatado por vários antidepressivos como a amitriptilina, nortriptilina, trimipramina e dotiepina (HILBERG *et al.*, 1993; POUNDER *et al.*, 1994; MORIYA e HASHIMOTO, 1999).

A área forense também apresenta interesse na compreensão da redistribuição postmortem de fármacos antidepressivos. Pesquisas postmortem foram realizadas com antidepressivos mais comumente utilizados e antidepressivos atípicos (RODDA e DRUMMER, 2006). Em muitos casos, somente uma espécime de sangue foi avaliada, impossibilitando determinar se a redistribuição realmente ocorreu. Em casos onde amostras de sangue cardíaco e periférico foram coletadas, geralmente não foram verificadas diferenças significativas para sertralina (LOGAN et al., 1994). Diferenças foram observadas nas concentrações de paroxetina e fluoxetina de sangue coletados da cavidade cardíaca e periférica de um cadáver falecido no hospital (VERMEULEN, 1998). Estudos avaliaram o fenômeno postmortem na venlafaxina e foi possível encontrar variações nas quantificações deste IRRS com razões variando entre 1,5 a 2. Os estudos realizados não permitem concluir

definitivamente o grau em que a redistribuição *postmortem* ocorre para a classe dos antidepressivos em geral. Entretanto, a distribuição desigual em tecidos observada para esses fármacos, combinada com seu alto Vd (acima de 28L/Kg), ligação a proteínas plasmáticas (27-99%) e relativa lipossolubilidade (logP = 2,9-5,4) sugerem que esse fenômeno seja considerável (JAFFE *et al.*, 1999; RODDA e DRUMMER, 2006)

1.4 Toxicocinética e toxicodinâmica dos principais antidepressivos utilizados no Brasil.

Neste trabalho, foram selecionados os antidepressivos mais utilizados no Brasil e pertencentes à Relação Nacional dos Medicamentos Essenciais - RENAME (BRASIL, 2013) representados pelos ADT, incluindo amitriptilina, nortriptlina, clomipramina e ISRS, sendo a fluoxetina a principal representante desta classe.

Os antidepressivos tricíclicos são rapidamente absorvidos pela via oral, sendo que, após 240 minutos, a absorção é praticamente completa. A porcentagem de ligação destes fármacos às proteínas sanguíneas é elevada (75-97%), principalmente à alfa₁-glicoproteína ácida. Devido ao efeito de primeira passagem, somente pequena fração da droga administrada permanece disponível biologicamente. O tempo de meia-vida dos ADT varia entre 20 e 30 horas, sendo alcançado o estado de equilíbrio plasmático após 5 meias-vidas, o que ocorre por volta de 1 semana ou mais. Com isso, conclui-se a ausência de efeitos terapêuticos imediatos dos ADT, sendo necessário o uso contínuo pelo paciente durante algumas semanas para melhora de depressão (SILVA, 2010).

A biotransformação ocorre em uma ou mais etapas metabólicas e os produtos de biotransformação podem apresentar atividade farmacológica superior ou inferior ao fármaco inalterado ou, até mesmo, serem inativos. A biotransformação ocorre no fígado, pelo sistema do citocromo P450 (CYP), principalmente pelo CYP2D6; porém, outras isoformas também atuam nessa etapa, como CPY3A4, CPY2C19 e CPY1A2. Os ADT com aminas terciárias em suas estruturas químicas (amitriptilina, imipramina, clomipramina) são desmetilados através do CYP1A2, mas não perdem atividade farmacológica, e a hidroxilação catalizada pela CYPD2D6 é responsável pela inativação dos ADT (MOFFAT, 2011).

O polimorfismo genético das enzimas hepáticas responsáveis pela biotransformação dos ADT é descrito na literatura e é considerado importante para a eficácia do tratamento e para evitar efeitos tóxicos. A deficiência na enzima CYP2D6 resulta em fenótipos denominados metabolizadores pobres ou lentos. Os indivíduos com essa alteração genética

podem apresentar concentrações elevadas do fármaco, devido ao baixo nível de hidroxilação do medicamento (GROUP, 1999; HIEMKE e HARTTER, 2000). A Figura 2 ilustra a biotransformação da amitriptilina e da nortriptilina, envolvendo as isoenzimas CYP2D6 e CYP2C19. Pacientes com esses polimorfismos devem ser monitorados terapeuticamente, sendo necessários, em algumas situações, ajustes nas dosagens dos ADT, conforme apresentado no Quadro 3 (HICKS *et al.*, 2013).

Figura 2: Principal via de biotransformação da amitriptilina, da nortriptilina e das enzimas envolvidas.

Fenótipo	Implicação	Recomendação Terapêutica		
CYP2D6 metabolizadores	Aumento da biotransformação dos ADT em produtos menos ativos farmacologicamente.	Evitar uso de ADT devido a potencial falha na eficácia. Considerar drogas		
ultrarrápidos	Menores concentrações plasmáticas aumentarão a probabilidade de falha terapêutica.	alternativas não biotransformadas pela isoenzima CYP2D6.		
CYP2D6	Diminuição acentuada da biotransformação dos ADT em produtos menos ativos farmacologicamente.	Se a escolha do ADT é justificada, considerar a dose inicial 50% inferior à		
metabolizadores pobres	Maiores concentrações plasmáticas aumentarão a probabilidade de efeitos colaterais.	preconizada pelos guias terapêuticos. Realizar monitoramento clínico e analítico para ajuste da dosagem correta.		

Quadro 3: recomendações de alterações nas dosagens para amitriptilina e nortriptilina, com base no fenótipo CYP2D6. Adaptado de (HICKS *et al.*, 2013).

A toxicogenética pode ser aplicada na área forense. Através dos estudos moleculares dos polimorfismos das isoenzimas do citocromo P450, é possível diferenciar óbitos por suicídio, homicídio ou morte acidental, com condenações penais distintas, conforme exemplificado a seguir. Uma criança de 9 anos fazia uso de fluoxetina. Certo dia, não se sentiu bem e foi internada em estado epilético, seguido por parada respiratória e evoluindo para óbito. Nos exames toxicológicos realizados em sangue, constatou-se que concentração de fluoxetina estava elevada, sugerindo uma intoxicação aguda. Os pais adotivos foram acusados de homicídio, e desde o início das investigações, não concordavam com essa hipótese. Os indiciados solicitaram exames genéticos no cadáver da filha, os quais revelaram um polimorfismo na isoenzima CYPD26. Essa alteração resulta na expressão de um gene com baixa capacidade de biotransformar a fluoxetina, resultando em elevadas quantidades circulantes e efeitos tóxicos. A causa da morte foi dada como acidental e os pais inocentados (KARCH, STEVEN B., 2007).

O gênero determina diferenças na toxicocinética dos antidepressivos. As mulheres apresentaram concentrações plasmáticas de antidepressivos tricíclicos superiores aos indivíduos do sexo masculino. Outros parâmetros também contribuem para elucidar a diferença entre os gêneros: a diferença da massa corporal e do volume sanguíneo e variação hormonal feminina (HILDEBRANDT *et al.*, 2003).

A idade também influencia a absorção e a biotransformação dos ADT. Nos idosos, alterações fisiológicas contribuem de forma significativa para alterações na absorção dos ADT. Nestas modificações biológicas, estão incluídos os menores níveis plasmáticos de

testosterona, afetando a atividade das isoenzimas hepáticas; a redução da concentração das proteínas plasmáticas; as diminuições dos fluxos sanguíneos hepáticos e esplênicos e da função renal. Neste grupo, é comum o uso concomitante de outros medicamentos e esta situação resulta em uma toxicocinética desfavorável (LOTRICH e POLLOCK, 2005).

Para facilitar o entendimento sobre os antidepressivos os mecanismos de ação destes fármacos serão didaticamente separados em dois grupos: agudos e crônicos. Inicialmente, os mecanismos de ação agudos dos ADT serão apresentados.

Os cinco mecanismos de ações farmacológicas classificados como agudos dos ADT são: a inibição da recaptura da noradrenalina e da serotonina (5-HT) e, em menor extensão, da dopamina; o bloqueio dos receptores histamínicos H1; o bloqueio dos receptores adrenérgicos α1; o bloqueio dos canais de sódio cardíacos; e a ação anticolinérgica muscarínica (THANACOODY e THOMAS, 2005). O bloqueio da recaptura de serotonina e noradrenalina é variável entre os ADT. As aminas terciárias tricíclicas apresentam maior capacidade de inibir a recaptura de serotonina (exemplo: amitriptilina), enquanto que as aminas secundárias são mais seletivas para a noradrenalina (exemplo: nortriptilina). Na prática, essa distinção é pouco relevante, pois uma amina terciária, pela reação química de desmetilação, resultará em amina secundária, havendo, portanto, inibição de ambos neurotransmissores (SILVA, 2010).

A fluoxetina, representante dos ISRS, apresenta como mecanismo de ação aguda a inibição potente e seletiva da recaptação da serotonina na fenda sináptica, com poucos efeitos em outros mecanismos de recaptação de monoaminas ou outros receptores de neurotransmissores. Este fármaco apresenta fraca afinidade com alguns receptores opiáceos, 5HT₁ e 5HT₂ serotoninérgicos, dopaminérgico, β -adrenérgico, α_1 e α_2 -adrenérgicos, histaminérgico e muscarínico. A fluoxetina é bem absorvida após a administração oral, com picos de concentrações plasmáticas ocorrendo entre 4 e 8 horas (intervalo entre 1,5 e 12 horas). Após a administração oral de 40 mg, por adultos saudáveis, são obtidas as concentrações plasmáticas entre 15 e 55 ng/mL; essa faixa de variação é comum entre indivíduos, pois, por exemplo, a administração concomitante com alimentos resulta numa taxa de absorção mais lenta, mas não afeta a absorção total de fluoxetina (EAP e BAUMANN, 1996). No tratamento farmacológico, a ingestão diária do fármaco permite atingir o estado de equilíbrio fluoxetina-norfluoxetina de 2 a 4 semanas, mas o efeito terapêutico ótimo ocorrerá em quatro semanas ou mais após a primeira administração. A fluoxetina é extensamente biotransformada (desmetilada) no fígado pelas isoenzimas CYP2C9, 2C19 e 2D6, para o principal produto de biotransformação ativo, a norfluoxetina. A meia-vida de eliminação do fármaco não alterado é de 4 a 6 dias e é aumentada para 4-16 dias para norfluoxetina. A meia-

vida no plasma da fluoxetina apresenta considerável variação interindividual, a qual pode estar relacionada com diferenças genéticas nas eficiências das reações de desmetilação do medicamento no fígado. Por outro lado, a fluoxetina inibe CYP2D6 isoenzima e, assim, a sua própria biotransformação. O fármaco e seus produtos de biotransformação são excretados principalmente na urina, mas também nas fezes e no leite materno. A porcentagem de ligação às proteínas plasmáticas pela fluoxetina não parece ser alterada substancialmente em pacientes com cirrose hepática ou insuficiência renal, incluindo os submetidos à hemodiálise (EAP e BAUMANN, 1996; CHEER e GOA, 2001).

As concentrações terapêuticas, tóxicas e letais dos ADT e da fluoxetina são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Concentrações terapêuticas dos antidepressivos no tratamento da depressão e as quantidades plasmáticas tóxicas destes fármacos.

Meia- vida do fármaco inalterado (h)	Volume distribuição (L/kg)	Principal produto de biotransformação	Meia-vida do produto de biotransformação (h)	Concentração terapêutica plásmática (ng/mL)	Concentração tóxica plasmática (ng/mL)
8-51	6-10	Nortriptilina	19-93	50-300	>500
12-36	17	Desmetilclomipramina	70	90-250	>400
24-72	14-100	Norfluoxetina	168-240	200-1.100*	>1.000
6-20	20-40	Desipramina	12-54	50-150	>2.000*
15-90	20-57	-	-	20-375	>500
	vida do fármaco inalterado (h) 8-51 12-36 24-72 6-20	vida do fármaco inalterado (h) Volume distribuição (L/kg) 8-51 6-10 12-36 17 24-72 14-100 6-20 20-40	vida do fármaco distribuição (L/kg) (h) 8-51 6-10 Nortriptilina 12-36 17 Desmetilclomipramina 24-72 14-100 Norfluoxetina 6-20 20-40 Desipramina	vida do fármaco inalterado (h)Volume distribuição (L/kg) (h)Principal produto de biotransformaçãoMeia-vida do produto de biotransformação (h)8-516-10Nortriptilina19-9312-3617Desmetilclomipramina7024-7214-100Norfluoxetina168-2406-2020-40Desipramina12-54	vida do fármaco inalterado (h)Volume distribuição (L/kg) (h)Principal produto de biotransformaçãoMeia-vida do produto de biotransformação (h)Concentração terapêutica plásmática (ng/mL)8-516-10Nortriptilina19-9350-30012-3617Desmetilclomipramina7090-25024-7214-100Norfluoxetina168-240200-1.100*6-2020-40Desipramina12-5450-150

^{* =} soma das concentrações do fármaco inalterado e seu principal produto de biotransformação

Adaptado de (BALANT-GORGIA et al., 1991; MUSSHOFF et al., 2004; BRUNTON et al., 2011)

Os mecanismos de ação crônicos dosantidepressivos são apresentados a seguir.

As sinapses envolvendo as monoaminas são ainda consideradas o alvo imediato dos antidepressivos. Porém, recentes estudos, envolvendo transduções de sinais e expressão gênica, estão surgindo, elucidando as mudanças ocorridas com o uso crônico destas drogas em longo prazo. Teorias atuais postulam ativações de fatores de transcrição, tais como as proteínas ligadoras ao elemento regulado por AMPc AMPc/Ca²⁺ (*cAMP responsive element-binding protein* CREB) e vias neurotróficas com o aumento da neurogênese hipocampal. Quando uma monoamina neurotransmissora liga-se aos seus respectivos receptores, um sinal

será transmitido no interior da célula, principalmente através da proteína G. Essa, quando ativada, pode regular o fluxo de íons de potássio ou de cálcio ou, ainda, sistemas envolvendo o segundo mensageiro, resultando na regulação da quinases. As quinases fosforilam fatores de transcrição, controlam a expressão gênica, através de ligações a curtas sequências do ácido desoxirribonucleico (DNA). Como resultado dessa reação, ocorrerá a ativação ou a inibição da expressão de certos genes (VETULANI e NALEPA, 2000).

Há três mecanismos que podem resultar na fosforilação do fator de transcrição da CREB, com consequente ligação ao elemento de resposta ao cAMP e ao cálcio (CRE - cAMP-and calcium- responsive element) no DNA. O resultado será a regulação da expressão de genes importantes para os efeitos dos AD. A CREB controla os genes da síntese de enzimas dos neurotransmissores, como a tirosina-hidroxilase, sendo esta limitante da velocidade na biossíntese das catecolaminas. Além disso, a CREB regula as proteínas envolvidas na neurogênese da célula (MALBERG e BLENDY, 2005).

O primeiro mecanismo ativa adenilil ciclase, através de estimulação da proteína G, elevando a produção de AMPc, proporcionando a ativação da proteína quinase A (PKA – *protein kinase A*) dependente do AMPc. A proteína quinase A, em seguida, movimenta-se para o núcleo e causa uma fosforilação no resíduo específico de serina na proteína CREB. O segundo mecanismo é a ativação da fosfolipase C, através dos adrenorreceptores α₁, levando à mobilização de Ca²⁺ e à subsequente ativação das quinase dependentes de Ca²⁺- calmodulina; como resultado, também haverá fosforilação da CREB. O terceiro mecanismo é iniciado por fatores neurotróficos e citocinas que regulam determinados receptores, influenciando tanto as proteínas quinases ativadas por mitógenos quanto as reguladas por sinais intracelulares, que fosforilam a proteína CREB, através de várias formas das quinases ribossômicas S6 (RSK₁₋₃) (DUMAN *et al.*, 1997; YILDIZ A *et al.*, 2002; FREY *et al.*, 2004).

A administração crônica de ADT reduz a atrofia dos neurônios no hipocampo causada por estresse repetido, pois há o aumento do fator neurotrófico derivado do cérebro BDNF (brain-derived neurotrophic factor) (YILDIZ A et al., 2002; DWIVEDI et al., 2003; MALBERG e BLENDY, 2005). Como o BDNF liga-se ao receptor tirosina-quinase B (trkB - tyrosine kinase B receptor) no cérebro, uma cascata de sinalização intracelular é iniciada, resultando na fosforilação de CREB. Além disso, o BDNF também induzirá a neurogênese (VETULANI e NALEPA, 2000; MALBERG e BLENDY, 2005; TAYLOR et al., 2005).

Outro resultado positivo do tratamento em longo prazo com os ADT é a reversão da perda de volume das células localizadas no hipocampo. O aumento da neurogênese foi observado em pacientes deprimidos, quando se aplicou a técnica de ressonância magnética e a

pesquisa de casos *postmortem*. Os mecanismos moleculares envolvidos na neurogênese são, possivelmente, mediados por CREB, BDNF e aumento do fator de crescimento semelhante à insulina – um outro fator neurotrófico. Apesar da importância desses fatores na elucidação do tratamento com ADT, mais estudos são necessários para a melhor compreensão dos mecanismos de ação destes fármacos (MALBERG e BLENDY, 2005). As Figuras 3 e 4 ilustram os possíveis mecanismos moleculares de ação dos AD.

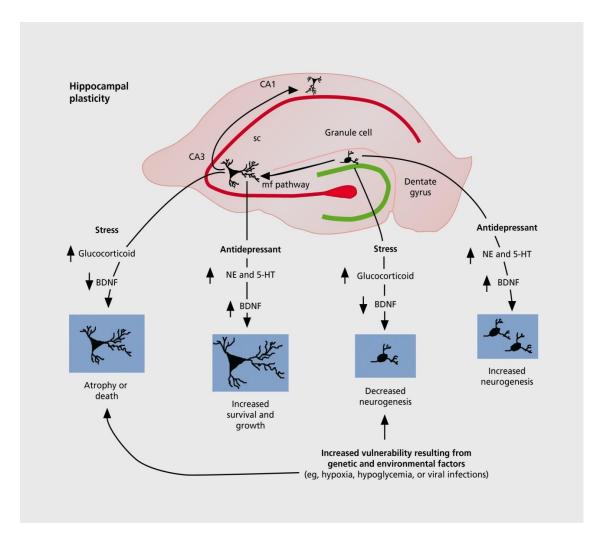


Figura 3. Modelo de plasticidade do hipocampo apresentando alterações estruturais em resposta ao estresse. Este provoca importantes efeitos sobre o hipocampo, devido à grande presença de receptores de glicocorticoides expressas nesta região do cérebro. O estresse repetido causa atrofia ou remodelação dos neurônios, diminuindo o número e o comprimento dos dendritos apicais. A administração de glicocorticoide causa efeito semelhante e a diminuição da expressão do fator neutrófico deverivado do cérebro (BDNF) pode contribuir para a atrofia das células piramidais. A administração crônica de AD pode reverter a atrofia dos neurônios e bloquear a *downregulation* da neurogênese. Retirado de (DUMAN, 2004)

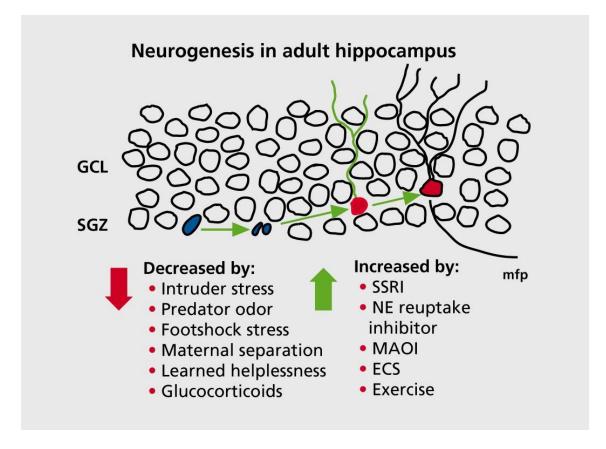


Figura 4. Modelo demonstrando a regulação da neurogênese no hipocampo. As células progenitoras neurais são restritas à zona subgranular (SGZ), localizada entre a camada de células granulares (GCL) e hilo. Estas células progenitoras dão origem a novos neurônios que migram para a camada de células granulares e amadurecer em neurônios adultos. A neurogênese é influenciada positivamente por IRSS, inibidor da recaptação da noradrenalina, terapia eletroconvulsiva, exercícios. mfp: *mossy fiber pathway* – via da fibra musgosa. Retirado de (DUMAN, 2004).

As isoenzimas do citocromo P450 (CYP) e as afinidades dos antidepressivos por diferentes neurotransmissores e receptores são as principais responsáveis pelas interações medicamentosas e os efeitos adversos destas drogas. Na Tabela 2, são apresentadas as isoenzimas CYP, os neurotransmissores e as interações dos antidepressivos com os receptores.

Tabela 2: Influência dos AD sobre as isoenzimas do citocromo P450, suas ações nos receptores e interações com receptores.

Antidepressivos	CYP inibida pelo AD	CYP responsáveis pela	Neurotransmissores			Interações com os receptores		
		biotransformação do AD	NA	5-HT	DA	H1	MA	α_1
Amitriptilina		2D6, 2C19, 2C9, 1A2, 3A4	3+	4+	1+	4+	3+	3+
Clomipramina		2C19, 3A4, 2D6	3+	4+	1+	3+	3+	3+
Fluoxetina	2D6	2D6, 2C9, 2C19	1+	4+	0	1+	1+	1+
Imipramina		2D6, 2C19, 1A2, 3A4	3+	4+	1+	4+	2+	2+
Nortriptilina		2D6, 3A4	4+	2+	0	1+	1+	2+

NA: noradrenalina; 5-HT: serotonina, DA: dopamina; H1: receptor H1 histamina; MA: receptor muscarínico; α₁: receptor alfa1-adrenérgico. O sinal 4+ representa forte interação e 1+ interação muito fraca. A ausência de sinal simboliza interação desprezível.

Devem ser avaliadas, cuidadosamente, potenciais interações medicamentosas entre diferentes fármacos e com as enzimas inibidas e/ou com as que participam da biotransformação dos ADT. Nestes critérios, devem ser contempladas a potência e a concentração de fármaco inibidor ou indutor das isoenzima, bem como a saturação destas, a extensão da biotransformação do fármaco por esta via biológica, a presença de produtos de biotransformação com atividade farmacológica, o polimorfismo genético, o perfil do paciente (idosos, insuficiência hepática) e a probabilidade de uso simultâneo (SPROULE *et al.*, 1997).

As diferentes afinidades dos AD com os neurotransmissores, tais como noradrenalina, serotonina e dopamina, e as interações com os receptores, conforme apresentado no Quadro 3, são responsáveis pelos diferentes efeitos adversos destes fármacos. Os efeitos colaterais causados pela afinidade ao receptor 5-HT são distúrbios gastrointestinais e náuseas, disfunção sexual, além dos efeitos adversos extrapiramidais (STAHL, 1998; RICHELSON, 2001). Além disso, a administração concomitante de IMAO com AD, que inibem a recaptação da serotonina, pode causar óbitos, resultantes da síndrome da serotonina (BOYER e SHANNON, 2005). A inibição da recaptação da noradrenalina pode resultar em hipertensão, tremores e taquicardia, enquanto o bloqueio do transporte da dopamina resulta em ativação psicomotora e agravamento da psicose. São comuns também os efeitos de sedação e ganho de peso, devido à atividade anti-histamínica. Hipotensão postural, tonturas e taquicardia reflexa são causadas pelo bloqueio dos receptores α₁ adrenérgico. A atividade anticolinérgica muscarínica dos ADT é vinculada aos efeitos de boca seca, constipação, retenção urinária, visão turva, aumento da pressão intraocular, aumento da frequência cardíaca e hipertermia (RUDORFER

e POTTER, 1999; RICHELSON, 2001). Sintomas cardiovasculares são os efeitos colaterais mais importantes para os ADT, nos quais estão inseridas hipotensão ortostática, tontura e taquicardia reflexa. Distúrbios da condução, como resultados do bloqueio dos canais de sódio no miocárdio, refletem em mudanças no eletrocardiograma. Hipertensão arterial e taquicardia podem ter origem no estado hiperadrenérgico, induzido pela inibição da recaptação deste neurotransmissor; consequentemente, poderá haver hipotensão, devido à depleção desta catecolamina (HARRIGAN e BRADY, 1999). Em concentrações terapêuticas, os efeitos adversos mais comuns são hipotensão ortostática e taquicardia, com risco acentuado em pacientes idosos (BRUNTON et al., 2011). Na ocorrência de uma overdose, os efeitos cardiovasculares podem ser fatais (HARRIGAN e BRADY, 1999; GLAUSER, 2000; KERR et al., 2001; THANACOODY e THOMAS, 2005) Pacientes, em especial os idosos, com problemas cardíacos apresentam maior risco de morte súbita, devido ao uso de ADT (COHEN et al., 2000; ROOSE, 2003; RAY et al., 2004). Diante do quadro desfavorável destes pacientes com problemas cardiovasculares, alguns pesquisadores sugerem o uso de ISRS como melhor alternativa para o tratamento da depressão (GLASSMAN, 1998; COHEN et al., 2000; ROOSE, 2000; 2001). Porém, hemorragias e efeitos cardiovasculares podem ocorrer devido ao efeito da serotonina no músculo liso vascular, enquanto medicamentos betabloqueadores, como o propranolol, podem interagir com os ISRS (GOERINGER et al., 2000).

Os ISRS apresentam menor cardiotoxicidade e maior margem de seguraça. Os efeitos adversos mais reportados são neurológicos, psiquiátricos e gastrointestinais (HIEMKE e HARTTER, 2000). São também relatadas reações alérgicas, mania, perda de peso, diminuição da libido, náuseas, ansiedade e insônia. As maiores interações medicamentosas da fluoxetina envolvem os aminoácidos L-dopa e L-triptofano, anorexígenos, anticonvulsivantes, antidepressivos, ansiolíticos, bloqueadores do canal de cálcio, saís de lítio e drogas de abuso (MESSIHA, 1993), incluindo o 3,4-metilenodioximetanfetamina ("ectasy") (RIETJENS *et al.*, 2012). Esse ISRS não deve ser administrado concomitantemente com IMAO, pois a interação entre os fármacos pode causar hipertermia, convulsões e coma. Deve-se aguardar período de cinco semanas antes de administrar qualquer IMAO, caso o paciente necessite fazer uso deste medicamento e estiver sendo utilizada a fluoxetina. Antiarrítmicos, antipsicóticos, betabloqueadores e ADT, cujas vias de biotransformação envolvam as isoenzimas inibidas pela fluoxetina, devem ter a dosagem reduzida e os pacientes devem ser monitorados (STOKES e HOLTZ, 1997; CHEER e GOA, 2001; SPINA *et al.*, 2003). Recentes estudos sugerem a existência de pensamentos suicidas em indivíduos que fazem uso

dos ISRS (CIPRIANI *et al.*, 2005) (LICINIO e WONG, 2005). A FDA, órgão norte-americano de regulamentação de medicamentos, divulgou uma advertência quanto aos riscos de suicídio dos pacientes utilizando essa classe de antidepressivos (WHITTINGTON *et al.*, 2004).

1.6 Técnicas de extração

Nas análises toxicológicas dos antidepressivos, é de fundamental importância a coerência e a conciliação entre as matrizes biológicas disponíveis e a situação de cada caso a ser investigado. Por exemplo: em uma análise em urina foi constatada a presença de antidepressivos. Apenas com essa informação laboratorial, não é possível relacionar com certeza absoluta estes medicamentos sendo os responsáveis pelas alterações no eletrocardiograma de um indivíduo atendido no pronto-atendimento de um centro de intoxicação. Para melhores elucidações e informações mais conclusivas, a quantificação dos AD deve ser realizada em amostras de soro ou plasma. Porém, para um imunoensaio rápido de triagem, a urina é a amostra de escolha mais indicada, devido à maior facilidade de coleta, ao elevado volume disponível, à alta concentração dos analitos de interesse e a disponibilidade de métodos analíticos já validados publicados na literatura. A obtenção dessa matriz pode ser dificultada na emergência clínica, devido à retenção urinária, um dos sintomas da intoxicação por ADT (KERR et al., 2001) e em casos postmortem, pois a urina nem sempre está disponível nessas situações (FLANAGAN e CONNALLY, 2005).

Na emergência clínica e no monitoramento terapêutico de fármacos, o plasma e soro são as matrizes biológicas de escolha, evitando-se o sangue total e o hemolisado, pois em diversos casos, a concentração do fármaco nas hemácias é diferente da concentração no plasma (GUPTA, 1992). Nos casos *postmortem*, conforme explicado anteriormente, deve-se obter sempre que possível o sangue total colhido na região periférica, por ser menos suscetível à redistribuição (COOK *et al.*, 2000). Nas amostras de sangue total *postmortem*, dificilmente não haverá hemólise e presença de coágulos nessa matriz.

Na toxicologia analítica, é necessária a separação dos analitos de interesse da matriz biológica antes de submetê-los às identificações em equipamentos. Dentre as técnicas de separação, destacam-se as seguintes:

- extração líquido-líquido (LLE);
- extração em fase sólida (SPE);
- microextração em fase sólida (SPME) e
- microextração em fase líquida (LPME).

Na LLE, o objetivo é transferir os analitos de interesse da matriz para outro líquido imiscível com esta, removendo os interferentes e outros compostos sem interesse. Em linhas gerais, adiciona-se em um recipiente adequado o solvente orgânico junto à matriz biológica e eleva-se o pH para 9-10 com hidróxido ou carbonato de sódio ou borato de potássio. A

alcalinização favorecerá a formação de moléculas neutras (apolares) dos antidepressivos, permanecendo estas na fase apolar (solvente orgânico) e separando-as das moléculas ionizadas (fase polar). Os ADT, devido às suas semelhanças físico-químicas, podem ser extraídos por essa técnica, o que não ocorre com os ISRS, IMAO e outras classes de antidepreesivos (DUVERNEUIL *et al.*, 2004). Os solventes mais utilizados são n-heptano, álcool isoamílico, éter dietílico, acetato de etila (GUPTA, 1992). É técnica mais antiga e ainda a mais utilizada nos laboratórios analíticos e apresenta as seguintes desvantagens:

- os solventes utilizados necessitam apresentar elevada pureza, elevando os custos para a aquisição destes;
- devido à necessidade de agitação, há o risco inerente da formação de emulsões entre as fases, resultando em separação incompleta;
- apresentam, muitas vezes, mais de uma etapa, deixando os métodos extensos e entediantes;
 - o analista fica em contato com solventes de considerável toxicidade;
- os resíduos orgânicos gerados são da grandeza de litros e devem ser descartados de forma segura, para evitar a contaminação ao meio ambiente e seres vivos (WALKER e MILLS, 2002).

Na extração em fase sólida (SPE), são utilizados cartuchos. Na parte interna destes há uma fase sólida estacionária constituída por diferentes sorbentes, resultando em mecanismos distintos de separação dos analitos, como, por exemplo, partição (fase normal e fase reversa), troca iônica e exclusão. Para obter essa classificação, os processos físico-químicos que ocorrem durante a separação devem ser conhecidos. As principais forças químicas e físicas presentes entre as moléculas dos analitos e os sorbentes são as ligações de hidrogênio, interações dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido, dipolo induzido-dipolo induzido e interações iônicas. O SPE deve remover compostos interferentes e não interessantes às análises, com reprodutibilidade aceitável dos resultados (HUCK e BONN, 2000). Basicamente há quatro procedimentos comuns a todos os métodos utilizados em SPE:

- condicionamento do cartucho;
- carregamento da amostra;
- lavagem e remoção dos interferentes e
- eluição dos analitos desejados.

As principais desvantagens são os elevados custos para a aquisição dos cartuchos, possibilidade das partículas de complexos biológicos bloquearem os poros dos cartuchos e o tempo necessário para realizar cada etapa descrita acima. Uma importante vantagem deste

procedimento é a possibilidade de técnicas *online*, nas quais a automação do SPE otimiza os procedimentos (PETRIDES *et al.*, 2014).

SPME e LPME são procedimentos de extração miniaturizados e podem ser classificados como "técnicas verdes" ou "solventless" devido ao fato de utilizarem quantidade reduzida de solventes orgânicos, com baixos volumes a serem manipulados e descartados (ALVES et al., 2007; ESRAFILI et al., 2007; SILVA et al., 2009; DE FREITAS et al., 2010; JAFARI et al., 2011; GHAMBARIAN et al., 2012; MASTROGIANNI et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013; FILONZI et al., 2014).

A principal desvantagem da SPME é a fibra utilizada possuir elevado custo e ser frágil, com uma vida útil limitada e a técnica apresentar baixos valores de recuperações absolutas (1-10%). Na LPME, a recuperação é superior, não há o efeito *carryover*, pois a fibras podem ser descartadas ao término de cada extração devido ao seu reduzido custo para aquisição (PEDERSEN-BJERGAARD e RASMUSSEN, 2005). O SPME já possui protocolos validados para procedimentos automatizados (MASTROGIANNI *et al.*, 2012), enquanto o LPME, por ser uma técnica relativamente recente, ainda é manual (FILONZI *et al.*, 2014).

Nos últimos anos, tem sido observada uma tendência em análises toxicológicas o emprego de técnicas de preparação de amostras que valorizem a simplicidade e praticidade, a menor manipulação da amostra e a diminuição do volume de solventes orgânicos, características tanto da LPME como da extração acelerada por solvente (ASE). A LPME pode ser uma alternativa de tratamento de amostra onde outras técnicas miniaturizadas são incompatíveis, como no caso da utilização da microextração em fase sólida (SPME) em matrizes biológicas mais complexas. Alguns especialistas também reconhecem que a utilização da ASE é promissora nos casos de análise de vísceras e outras amostras *postmortem* e tem sido pouco explorada (FLANAGAN, 2007; ABEND *et al.*, 2003; COOPMAN *et al.*, 1998). Nesse caso, alguns parâmetros analíticos como temperatura e pressão de extração e composição do solvente extrator devem ser otimizados para melhorar a eficiência de recuperação e purificação dos analitos de interesse.

A ASE combina o aumento de temperatura e pressão com solventes para melhorar a eficiência do processo de extração comparada com as técnicas convencionais. Amostras sólidas ou semissólidas são colocadas em uma célula, e esta é submetida à passagem de solvente pressurizado, enquanto o sistema é mantido sob aquecimento controlado. O aumento da temperatura acelera a extração cinética, pois o solvente aquecido é menos viscoso, aumentando o contato com a amostra de interesse e as ligações e interações responsáveis pela

ligação dos analitos à matriz biológica, tais como pontes de hidrogênio, interações dipolodipolo e *van der Waals* são mais facilmente quebradas. A elevação da pressão mantém o solvente aquecido no estado líquido durante o processo, mesmo com a temperatura superior à temperatura de ebulição. A combinação dessas características permite utilizar solventes não orgânicos e técnicas mais rápidas e eficientes nos procedimentos de extração. Mesmo com essas qualidades interessantes nas análises toxicológicas, a ASE ainda é pouco utilizada. Como resultado pode-se obter extrações mais rápidas com significante redução do volume de solvente normalmente utilizado em processos convencionais (RICHTER, 2000; SHEN e SHAO, 2005; POPOT *et al.*, 2006; FLANAGAN *et al.*, 2007; LAU *et al.*, 2010). Um esquema do sistema de extração acelerada por solvente pode ser visualizado na Figura 5.

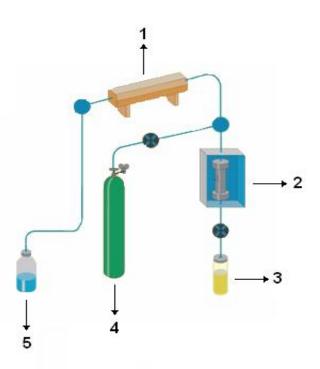


Figura 5 – Representação do sistema de extração acelerada por solvente (ASE). (1) Bomba; (2) Célula de Extração; (3) Recipiente de Coleta; (4) Nitrogênio; (5) Solvente.

<u>Objetivo</u>

Objetivo 44

2. OBJETIVO

O objetivo do trabalho foi o desenvolvimento, validação e aplicação de métodos analíticos utilizando procedimentos recentes de preparação de amostras, tais como a microextração em fase líquida (LPME) e extração acelerada por solvente (ASE), seguidas por análises qualitativas e quantitativas com tecnologias de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS). Os analitos de interesse foram antidepressivos e seus principais produtos de biotransformação em sangue total, humor vítreo e fígado de cadáveres para um melhor entendimento do fenômeno da redistribuição *postmortem* de antidepressivos em tecidos biológicos humanos.

<u>Material</u> 46

3. MATERIAL

3.1 Equipamentos e acessórios

 Equipamento de cromatografia em fase gasosa, modelo GC-2010, acoplado a um espectrômetro de massa modelo GCMS-QP2010[®], ambos da Shimadzu Corporation – Tóquio, Japão. Gases especiais para cromatografia em fase gasosa: nitrogênio e hélio (Air Products[®]);

- Coluna capilar HP-5MS (Agilent, *Little Falls*, EUA), composta com 5% fenilmetil-siloxano, de 30 metros de comprimento, 250 μm de diâmetro interno e 0,10 μm de espessura do filme;
- Agitador magnético com aquecimento multiestações da marca IKATM, modelo RT 10 *Power*;
- Fibras de microextração em fase líquida (hollow fiber) de polipropileno, com 600 μm diâmetro interno, 200 μm espessura de parede e 0,20 μm tamanho do poro, adquirido da Membrana TM, (Wuppertal, Alemanha);
- pHmetro Micronal®, modelo B474;
- Ultrassom Ultracleaner®, modelo 1600 A;
- Balança Analítica SartoriusTM (Goettingen, Alemanha);
- Balança Semi-Analítica *Shimadzu*TM BL 2200H (Tóquio, Japão).
- Equipamento para extração acelerada por solvente, modelo ASE 100
 Accelerated Solvent Exctractor, da marca Dionex® (Sunnyvale, CA, USA);
- Equipamento para automação de extração em fase sólida, modelo GX-274
 ASPEC, do fabricante Gilson® (Middleton, WI, USA);
- Cartuchos para extração em fase sólida OASIS-HLB (60mg. 3 mL)
 contendo adsorvente de fase mista, com uma parte hidrofóbica
 (divinilbenzeno) e outra hidrofílica (N-vinil-pirrolidina), adquiridos do
 fabricante Waters® (Milford, MA, USA);

<u>Material</u> 47

 Terra diatomácea aquirida da DIONEX Corporation (Sunnyvale, CA, EUA);

- Termobloco com função de aquecimento e secagem de amostras Reacti-Therm III da Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EUA);
- Kits de imunoensaio *Triage* 8TM da ALERE (San Diego, CA, EUA).

3.2 Reagentes e Reativos

- Metanol para análise da marca Merck[®];
- Hidróxido de sódio da marca Merck[®];
- Ácido fórmico da marca Merck[®];
- Dodecano da marca Sigma-Aldrich®;
- Fosfato de potássio monobásico da marca Merck®;
- Fosfato de potássio dibásico da marca Merck®;
- Cloreto de sódio da marca Merck®.

3.3Amostras de sangue total

Foram utilizadas 06 (seis) bolsas com sangue total, doadas pelo Banco de Sangue do Hospital Sírio Libanês. Cada unidade continha, em média, o volume de 400 mL, incluindo sangue total e solução conservante de CPD (citrato,fosfato e dextrose). Previamente à doação, os seguintes exames sorológicos foram realizados: Sífilis, Anti-HBC, Anti-HCV, Anti-HIV, Anti-HTLV-I e II, em consonância com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 57, de Dezembro de 2010, a qual exige a aplicação destes ensaios antes dos procedimentos transfusionais de sangue e seus componentes (BRASIL, 2010). Os resultados destes testes eram, obrigatoriamente, não reativos.

O sangue total foi separado em alíquotas de 13 mL, armazenado em tubos cônicos plásticos com 15 mL de capacidade total, congelado e armazenado em freezer –20°C. Antes do uso, os líquidos foram descongelados a temperatura ambiente (20-25°C) e agitados vigorosamente para ressuspensão.

Em conformidade com Decreto-Lei nº 3.689 de 3 de Outubro de 1941, no qual está inserido Código de Processo Penal, Art. 162, Decreto-Lei, 3.689 de 3 de Outubro de 1941, as

autópsias foram realizadas com, no mínimo, 06 (seis) horas após o óbito (BRASIL, 1941). Na prática, o tempo transcorrido entre o óbito e a coleta das matrizes biológicas foi de, no mínimo, 24 (vinte e quatro) horas. No Serviço de Verificação de Óbitos da Capital de São Paulo (SVO), em obediência à Lei Estadual nº 10.095 de 3 de Maio de 1968, Art.4º, ¶ 1, as necropsias realizadas nesse serviço são de indivíduos falecidos de morte natural no Município da Capital, sem atestado médico ou com atestado de moléstia mal definida (SÃO PAULO (ESTADO), 1968).

Para a obtenção das 7 (sete) amostras de sangue total de cadáveres, em dias e horários previamente acordados, dois integrantes do nosso grupo de pesquisa permaneceram com os profissionais do SVO durante período integral de realização das necropsias nas datas definidas. Em todos os cadáveres trabalhados nesse intervalo de tempo, amostras de urinas foram colhidas destes e submetidas ao teste de imunoensaio denominado *Triage 8*TM. Em casos positivos neste exame de triagem, amostras de sangue total da veia femoral esquerda e direita e da cavidade cardíaca foram colhidas, com a ajuda de médicos patologistas do serviço.

3.4 Amostras de humor vítreo humano e bovino.

Procedimentos semelhantes aos explicados no item 3.3 foram aplicados para a coleta de 6 (seis) amostras de humor vítreo humano, com o diferencial de, em amostras não-reativas no exame de triagem, essa matriz biológica foi obtida com objetivo de serem aplicadas como "branco" no desenvolvimento do método. Em todos resultados dos testes prévios (positivo ou negativo), os fluidos biológicos foram colhidos com a ajuda de médicos patologistas do SVO.

A disponibilização das matrizes biológicas bovina ocorreu junto a abatedouros regionais. Após o abate do animal, retirou-se delicadamente o olho da cavidade ocular e imediatamente congelado. No momento do uso, este foi descongelado e com o auxílio de uma agulha hipodérmica 40x12 (18G x 1 ½) e uma seringa descartável com volume 5mL descartável, todo o líquido intraocular foi drenado.

3.5 Amostras de fígado humano e bovino.

Segmentos do lóbulo direito de fígado humano foram acondicionados em embalagens plásticas estéreis e individuais logo após a autópsia no serviço de óbitos. Na parte externa destes frascos, uma identificação numeral foi aderida e congelada, permanecendo no freezer

até o momento da análise. Para estudos comparativos com replicatas bovinas, adquiriu-se em casa de carnes ("açougues") porções de aproximadamente 300g já seccionadas.

3.6 Comitê de ética

O presente trabalho foi aprovado pelo CONEP sob o número 830/2009 e devidamente autorizado após aprovação SVOC-USP, CAPPesq e FCF-USP, conforme apresentados no item Anexo deste documento.

3.7 Padrões analíticos

Soluções, em metanol, na concentração de 1 mg/mL de amitriptilina (AMI), nortriptilina (NTR), imipramina (IMI), desipramina (DES), fluoxetina (FLU), norfluoxetina (NFL), clomipramina (CLO) e desmetilclomipramina (DMC) foram adquiridos da *Cerilliant* Analytical Reference Standards (Round Rock, TX, USA). Os padrões deuterados amitriptilina-d3 (AMI-d3), nortriptilina-d3 (NTR-d3), imipramina-d3 (IMI-d3), desipramina-d3 (DES-d3), fluoxetina-d6 (FLU-d6), norfluoxetina-d6 (NFL-d6), clomipramina-d3 (CLO-d3) e desmetilclomipramina-d3 (DMC-d3), todos na concentração de 100 μg/mL, em metanol, também foram adquiridos da *Cerilliant* Analytical Reference Standards (Round Rock, TX, USA).

As concentrações das soluções de trabalho dos padrões não-deuterados foram de 100 μg/mL, utilizando metanol como solvente. Para os padrões deuterados, com exceção da amitriptilina, cuja concentração foi de 1 μg/mL, a concentração foi de 10 μg/mL. As estruturas químicas dos antidepressivos são apresentadas na Figura 6.

Figura 6: estruturas químicas dos antidepressivos participantes do estudo. (a) Amitriptlina, (b) nortriptlina, (c) desipramina, (d) imipramina, (e) clomipramina, (f) desmetilclomipramina, (g) fluoxetina, (h) norfluoxetina.

Na continuidade dos estudos a serem aduzidos neste trabalho, propondo facilitar a apresentação dos resultados, posterior discussão e entendimento das conclusões, o documento foi dividido em partes, conforme descrito abaixo:

- PARTE I: contempla método, resultados e discussão relacionados à metodologia desenvolvida para sangue total com antidepressivos e seus principais produtos de biotransformação;
- PARTE II: contempla método, resultados e discussão relacionados à metodologia desenvolvida para humor vítreo com antidepressivos e seus principais produtos de biotransformação;
- PARTE III: contempla método, resultados e discussão relacionados à metodologia desenvolvida para fígado com antidepressivos e seus principais produtos de biotransformação com fígado e antidepressivos.

PARTE I

<u>Métodos</u>

4. MÉTODOS

4.1 Microextração em fase líquida (LPME) para AD em sangue total

Em um frasco de fundo chato, com capacidade para 5 mL, contendo um agitador magnético de 10 mm por 3 mm, adicionou-se 500 µL de sangue total em 3,5 mL de NaOH 0,1 mol/L (fase doadora). Para cada extração, foram utilizadas duas fibras ocas porosas, medindo 8 cm cada. Após o procedimento extrativo, estas foram inutilizadas, evitando, o fenômeno carry over ou arraste, em língua pátria. As concentrações dos padrões deuterados, em 1 mL de sangue total, foram: amitriptilina-d3 10 ng; nortriptilina-d3 e desipramina-d3 250 ng; norfluoxetina-d6, fluoxetina-d6, imipramina-d3 e clomipramina-d3 100 ng. O sistema da LPME escolhido foi o denominado trifásico. Antes da extração, as fibras foram submersas durante 20 segundos em um tubo de cônico de 15 mL contendo o solvente imiscível em água dodecano (hidrocarboneto pertencente à família dos alcanos). Com este procedimento, as paredes (interna e externa) da fibra adquire permeabilidade seletiva. Na sequência, no lúmen da fibra foi inserido, com o auxílio de microponteira, o líquido aceptor (ácido fórmico, na concentração de 0,1 mol/L). As moléculas dos antidepressivos deste estudo, que apresentam o pKa alcalino, com valores entre 9,10 (norfluoxetina) e 10,47 (nortriptilina), diluídos em o NaOH 0,1 mol/L, permanecem, a maior parte delas, na forma molecular e são capazes de atravessar a camada orgânica dos poros da fibra. Ao entrar em contato com o líquido aceptor ácido, muitas destas moléculas são capazes de se carregar positivamente, mudando para a forma ionizada. Nessa conformação, não possuem as características físico-químicas favoráveis para retornar à matriz biológica pela membrana interna da fibra. Assim, o líquido aceptor funciona como armadilha, aprisionando e concentrando os analitos. O sistema foi mantido sob agitação magnética, na velocidade de 1200 rpm, por trinta (30) minutos, na temperatura de 55°C para aumentar a velocidade de transferência dos analitos para a fase extratora (PEDERSEN-BJERGAARD e RASMUSSEN, 2005). Após o período de extração, o líquido aceptor foi retirado com o auxílio de uma microponteira, evaporado na temperatura de 40°C, sob fluxo de nitrogênio, ressuspendido em 30 μL de metanol e 2 μL foram injetados no equipamento de cromatografia gasosa acoplado ao espectrômetro de massa. Reações adicionais de derivatizações não foram necessárias para as análises. Os procedimentos realizados nas extrações são apresentados na Figura 7.

<u>Métodos</u> ____55

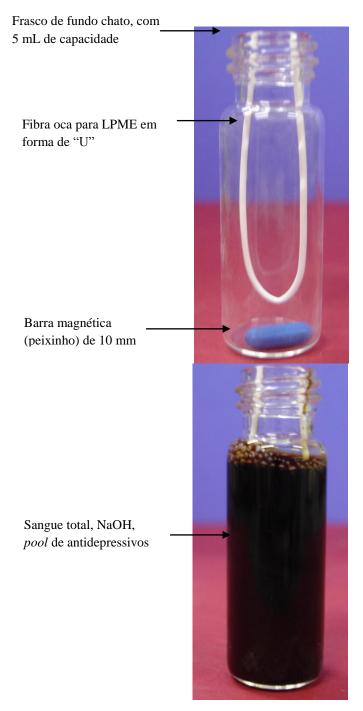
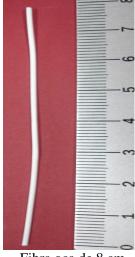


Figura 7: Frasco com fundo chato e acessórios utilizados para LPME de antidepressivos com sangue total.

<u>Métodos</u> _56



Fibra oca de 8 cm tratada com dodecano



Ácido fórmico 0,1 mol/L (fase aceptora)



500 μL de ST 3,5mL NaOH 0,1 mol/L



30 minutos agitação 55°C







2 μL da solução ressuspendida em metanol são injetadas no GC-MS

Figura 8: Imagens representado o fluxo dos procedimentos de extração utilizando LPME e análises por GC-MS.

<u>Métodos</u> 57

4.2 Condições cromatográficas

As injeções foram realizadas no modo *splitless*. O gás de arraste foi hélio, com fluxo constante a 0,6 mL/min (5,9 psi de pressão). A temperatura do injetor foi selecionada em 220°C. A coluna utilizada foi a HP-5MS de 30 metros de comprimento, 250 μm de diâmetro interno e 0,10 μm de espessura do filme.

As condições de aquecimento na coluna, dentro do forno do GC, são apresentadas no Quadro 4:

Temperatura inicial = 125°C					
Rampa	Aumento da temperatura final °C/minuto (°C)		Permanência nessa temperatura (minutos)		
1	50	190	0		
2	5	225	3		
3	50	230	1		

Tempo total de separação cromatográfica: 13 minutos

Quadro 4: condições de elevação e controle de temperatura do cromatógrafo gasoso

Para identificar os analitos, após análises no GC-MS no modo *full scan*, utilizou-se o modo SIM. Devido à proximidade do tempo de separação cromatográfica entre alguns analitos, foi necessária a utilização do modo SIM, reunindo os antidepressivos em três grupos e monitorando seguintes íons (m/z), com *dwell* 0.20s, apresentados no Quadro 5.

Antidepressivos	Intervalo de monitoramento (min)	m/z	
Norfluoxetina e Norfluoxetina-d6	4,0-6,0	104/134/191 e 140	
Fluoxetina e Fluoxetina-d6	4,0-0,0	104/148/309 e 315	
Amitriptilina e Amitriptilina-d3		115/189/215 e 61	
Nortriptilina e Nortriptilina-d3	7,0-9,5	215/220/263 e 266	
Imipramina e Imipramina-d3	7,0-9,3	193/234/280 e 283	
Desipramina e Desipramina-d3		193/234/266 e 269	
Clomipramina e Clomipramina-d3	0.5.12.40	228/242/314 e 317	
Desmeticlomipramina	9,5-13,40	229/242/300	

Quadro 5: Grupos dos antidepressivos e respectivos íons (m/z) utilizados no modo SIM.

Nos cálculos das integrais das áreas obtidas nos cromatogramas, sempre que possível, o íon quantificador escolhido foi o molecular. Quando este não permitia uma boa resolução, optou-se sempre pelo maior m/z, possibilitando maior especificidade do analito avaliado. O íon mais abundante, para os antidepressivos tricíclicos, é o m/z de 58. Isso foi observado particularmente em relação à amitriptilina. Outros trabalhos publicados reportam a quantificação por esse íon (LEE *et al.*, 2008; PAPOUTSIS *et al.*, 2012).

Particularmente, para o padrão AMI-d3, o íon m/z 61 foi o quantificador, pelos seguintes motivos:

- * o custo para aquisição deste isótopo da AMI é extremamente elevado e
- * mesmo em altas concentrações deste PI no ST (500 ng/mL), o cromatograma obtido quantificando o íon molecular não apresentou boa resolução.

Essa estratégia permitiu, devido à abundância desse íon (m/z = 61), desenvolver o estudo com a AMI-d3 na concentração 10 ng/mL.

No Quadro 6, são apresentados os m/z. Na presença do íon molecular quantificador dos antidepressivos, acrescentou-se a observação "(molecular)".

Antidepressivos	Ion quantificador (m/z)			
Norfluoxetina-d6	140			
Norfluoxetina	134			
Fluoxetina-d6	315 (molecular)			
Fluoxetina	309(molecular)			
Amitriptilina-d3	61			
Amitriptilina	202			
Nortriptilina-d3	266 (molecular)			
Nortriptilina	263 (molecular)			
Imipramina-d3	283 (molecular)			
Imipramina	280(molecular)			
Desipramina-d3	269 (molecular)			
Desipramina	266 (molecular)			
Clomipramina-d3	317 (molecular)			
Clomipramina	314(molecular)			
Desmetilclomipramina	229			

Quadro 6: Íons quantificadores utilizados nos estudos de antidepressivos após LPME e análises no GC-MS

4.3 Otimização do método

Para otimizar a eficiência da extração, cada parâmetro foi avaliado de forma independente, e apenas uma variável foi modificada em cada conjunto de experimentos (análises monovariáveis). Não se alteraram os demais parâmetros pertinentes à LPME. Os seguintes parâmetros foram analisados: a escolha da fase orgânica (n-hexiléter, octanol, undecano ou dodecano), a escolha de uma fase receptora (ácido fórmico e ácido clorídrico, nas concentrações de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, ou 0,5 mol/L), o tempo de extração (5, 15, 30, 45, 60, ou 90 minutos), a velocidade de agitação magnética (250, 500, 1000, ou 1200 rpm), e a temperatura de extração (25, 35, 45, 55, 65, ou 75 ° C). Triplicatas de sangue total contendo 500 μL cada e 500 ng/mL de cada analito foram submetidos a condições acima descritas. Ao

término das identificações e quantificações analíticos, os picos cromatográfico médios absolutos foram avaliados e mensurados.

4.4 Recuperação

Recuperação, um termo analítico utilizado para quantificar a porcentagem dos analitos presente no final do procedimento de extração no sangue total, foi estudada. É quantificado pela adição, após os procedimentos de extração de uma quantidade conhecida dos analitos, em uma amostra branca do sangue total. Compara-se esse valor (não-extraído) com as quantidades obtidas após a extração (extraído), sendo a primeira classe denominada 100%. Três níveis de concentração dos antidepressivos foram analisados (50, 500 e 1000 ng/mL) de acordo com o método descrito anteriormente em seis replicatas.

4.5 Precisão Inter- e intradias

Os estudos de precisão e exatidão foram desenvolvidos em experimentos com amostras de sangue total contendo concentrações de 50, 500 e 1000 ng/mL de todos os analitos em três dias diferentes e consecutivos. As análises foram realizadas em três repetições para cada dia. Precisão, definido como o desvio-padrão relativo, foi determinado por repetições intra- e interdias. Em cada análise, seis replicatas foram utilizadas.

4.6 Linearidade

A linearidade do método foi obtida pelos cálculos das amostras de sangue total contendo todos os analitos, em seis repetições, nas seguintes concentrações para cada analito: 20, 200, 400, 600, 800, 1000 e 1200 ng/mL. Na sequência, estudos de heteroscedasticidade foram aplicados (ALMEIDA *et al.*, 2002)

4.7 Exatidão

Segundo a *Scientific Working Group for Forensic Toxicology* (SWGTOX, 2013), a exatidão pode ser definida, em porcentagem, como o grau de concordância entre a média dos resultados obtidos experimentalmente e o valor verdadeiro e conhecido de uma amostra. Deve ser aplicada em todos os métodos quantitativos, utilizando três níveis diferentes de concentração (baixo, médio e alto), no mínimo em três replicatas.

A fórmula a ser aplicada nos cálculos é:

Exatidão (%) na concentração $_x$ = [média obtida nos cálculos da concentração $_x$ - concentração nominal $_x$] x 100 Concentração nominal de x

O valor máximo aceitável é \pm 20% em cada concentração, exceto em casos onde a exatidão dos analitos preciso ser maior (exemplo: etanol). Nessa situação, o limite é \pm 10%.

4.8 Limites de detecção e quantificação

Utilizando-se o guia de validação da SWGTOX, o limite de detecção é a menor concentração estimada de um analito na amostra que se pode, com segurança, ser diferenciada do branco da matriz e identificada pelo método analítico. Para o limite de quantificação, defini-se como a menor concentração estimada de um analito na amostra que pode ser quantificada seguramente com valores de precisão e exatidão aceitáveis.

Para os estudos do limite de detecção (LOD), em seis replicatas, de bolsas de sangue distintas, foram adicionadas concentrações decrescentes dos antidepressivos: 100, 50, 20, 10 e 5 ng/mL. O LOD foi considerado como a menor contração capaz de produzir uma resposta no GC-MS, maior ou igual a três vezes o ruído das amostras brancas e, ao mesmo tempo, alcançado critérios pré-definidos de identificação e quantificação, incluindo o tempo de retenção, formato do pico, relação massa/carga.

Com o objetivo de determinar o limite de quantificação (LOQ), em seis replicatas de sangue total obtidos de bolsas de sangue distintas, foram adicionadas concentrações decrescentes dos antidepressivos: 100, 50, 20, 10 e 5 ng/mL. A menor concentração utilizada que ficou conforme com a curva de calibração previamente estabelecida e que obedeceu aos critérios de precisão, exatidão e identificação aceitáveis, foi a estimada.

4.9 Integridade da diluição

Nas análises de rotina, é possível encontrar amostras com concentrações acima para a curva de calibração (ou seja, em casos de *overdose* letal). Então, para obter resultados confiáveis, uma diluição da amostra é necessária. Integridade da diluição foi demonstrada pela adição na matriz biológica dos analitos em três níveis elevados (4000, 8000 e 12000 ng/mL). O sangue total foi utilizado para diluir essas concentrações elevadas, até obter 1000 ng/mL dos antidepressivos. Esse valor final obtido está contemplado na lineariedade do método e pode, com segurança, quantificar valores elevados. As análises foram realizadas em triplicata para cada concentração. Exatidão e precisão devem estar dentro dos critérios aceitáveis, dentro de ± 15% (PETERS *et al.*, 2007).

4.10 Aplicações em casos reais post-mortem

O método otimizado e validado foi aplicado para a identificação e quantificação de sete amostras de sangue total de cadáveres atendidos no SVO (Serviço de Verificação de Óbitos). Inicialmente realizou-se a triagem, com um método de imunoensaio (Triage 8 – Alere), cujo *cut-off* para antidepressivos tricíclicos é 1000 ng/mL, utilizando-se a urina como matriz biológica. Em casos positivos para o teste, colheu-se amostras de sangue total, provenientes da cavidade cardíaca e feia femoral. As amostras ficaram armazenadas em freezer a – 20°C até o momento da análise.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante a LPME trifásica, o uso de um solvente orgânico para preencher os poros da fibra é essencial. As características fundamentais deste líquido é ser imiscível com as fases doadoras e receptoras, apresentar baixa volatilidade para garantir perda mínima de solvente durante os procedimentos de extração, ser compatível e inerte com a fibra de polipropileno e ter afinidade com os analitos de interesse. Os valores de log para o coeficiente de partição octanol/água (Log P) dos antidepressivos avaliados nesse trabalho varia entre 3,55-4,88. Com base nestas considerações, quatro solventes orgânicos (n-hexil-éter, octanol, undecano e dodecano) foram avaliados LPME. Individualmente escolhidos para o tratamento das fibras, cada um foi analisado em triplicada. O solvente orgânico com melhores resultados obtidos nos experimentos visando à otimização do método foi dodecano (dados não mostrados). O hidrocarboneto escolhido está de acordo com publicações prévias (ESRAFILI et al., 2007).

Reações químicas de derivatização, resultando em procedimentos adicionais, não foram necessárias, diferentemente de outros pesquisadores que avaliaram estes analitos e os caracterizam empregando técnicas de cromatografia gasosa (KUDO *et al.*, 2009 ; KHRAIWESH *et al.*, 2011; PIETRACCI *et al.*, 2013).

Os valores de pH das amostras e soluções doadoras e aceptoras são importantes na LPME trifásica. Os analitos devem ser utilizados nas suas formas neutras, permitindo que eles sejam extraídos pelos poros com permeabilidade seletiva da fibra. Para analitos básicos, tais como os AD, o pH da solução de amostra devem ser elevadas (preferencialmente 3 unidades superiores ao valores de pKa dos analitos), enquanto que a fase receptora deve ser ácida (de preferência três unidades abaixo do pKa valores dos analitos) (HALVORSEN *et al.*, 2003). Estas condições foram obtidos utilizando NaOH 0,1 mol/L (fase dadora) e para a fase aceptora, os experimentos são mostrados no próximo parágrafo.

O próximo estudo foi a verificação da melhor fase aceptora. Dois ácidos foram avaliados: ácido clorídrico e ácido fórmico. O ácido orgânico obteve o melhor rendimento (dados não mostrados) e optou-se por utilizá-lo nos procedimentos subsequentes. Decidido o ácido, as concentrações deste foram variadas, conforme aduzido na Figura 9.

Resultados e discussão 65

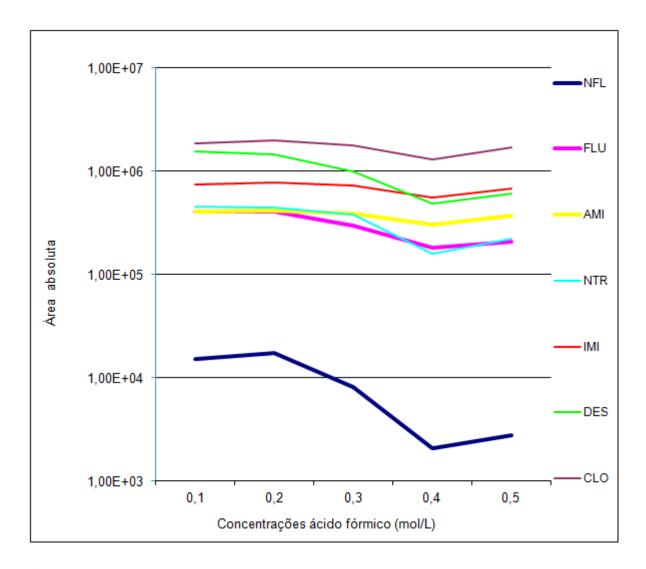


Figura 9 – Estudos das melhores concentrações do ácido fórmico para a otimização do método utilizando LPME seguida de análises em GC-MS. Média de três replicatas.

Analisando a figura acima, pode-se observar uma tendência na diminuição das áreas absolutas dos antidepressivos com o aumento da concentração do ácido fórmico e consequente diminuição do pH intralúmen da fibra de polipropileno. Baseando nos conceitos apresentados anteriormente (HALVORSEN *et al.*, 2003), parece existir um intervalo ótimo para a fase aceptora e pH mais baixos podem prejudicar as extrações por LPME. Utilizando e aferindo os dados gerados nos experimentos, a concentração da fase aceptora foi de 0,1 mol/L.

Na Figura 10, são apresentados os resultados para diferentes tempos de extração da LPME utilizando sangue total e antidepressivos, seguida de análises por GC-MS.

Resultados e discussão 66

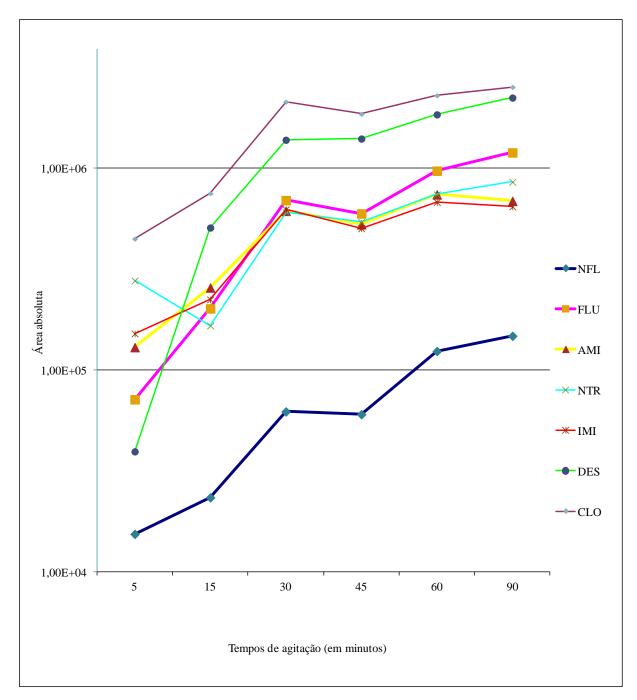


Figura 10 – Estudos das melhores concentrações do ácido fórmico para a otimização do método utilizando LPME seguida de análises em GC-MS. Média de três replicatas.

A Figura 10 permite relacionar maior tempo de extração e melhor separação dos analitos, pois houve um acréscimo na área absoluta com períodos mais prolongados de contato entre as fibras de LPME e a matriz biológica avaliada. De fato, o procedimento de extração por LPME é um processo de equilíbrio e é necessário um tempo de suficiente para permitir a separação dos analitos entre as fases líquidas. Porém, ao triplicar o tempo de 30 para 90 minutos, a eficiência da extração não acompanhou essa progressão. Ao dobrar o intervalo de 15 para 30 minutos, todos os analitos apresentaram novas áreas superiores a razão

2. Com isso, consolidando um método não entediante e o mais ágil possível, o tempo de extração eleito para os propósitos deste trabalho foi 30 minutos.

O próximo parâmetro avaliado e otimizado foi a velocidade de agitação magnética proporcionada ao *vial* contendo sangue total e os analitos no procedimento de extração. A exposição da Figura 11 possibilita algumas conclusões.

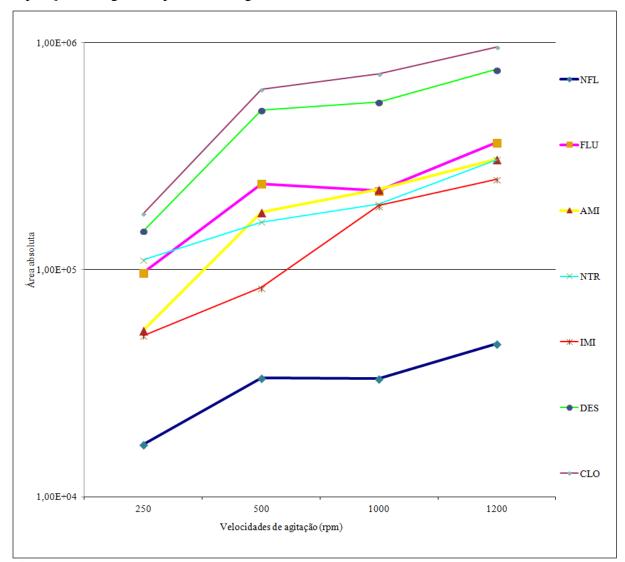


Figura 11 – Estudos das melhores concentrações do ácido fórmico para a otimização do método utilizando LPME seguida de análises em GC-MS. Média de três replicatas.

A principal contribuição da velocidade de agitação para LPME é a efetiva transferência dos analitos entre as fases. A cinética de extração pode ser acelerada por agitação, facilitando a difusão do analito presente na fase doadora, atravessando o solvente orgânico e atingido a fase aceptora. Os resultados propostos na Figura 11 indicam a associação da cinética aumentada em conjunto com maiores velocidade de agitação. Publicações prévias sugerem o aparecimento de bolhas na fibra de polipropileno com

velocidades de agitação superiores (ESRAFILI *et al.*, 2007; JAFARI *et al.*, 2011). Porém, tal ocorrência não foi evidenciada nos experimentos executados e a maior velocidade de agitação (1200 rpm) foi selecionada. Essa escolha não acarretou qualquer aumento no tempo de extração.

O último parâmetro para a otimização do método foi a temperatura de extração. Essa variável foi modificada através de um dispositivo presente no agitador multiestações utilizado. Os resultados são exibidos na Figura 12.

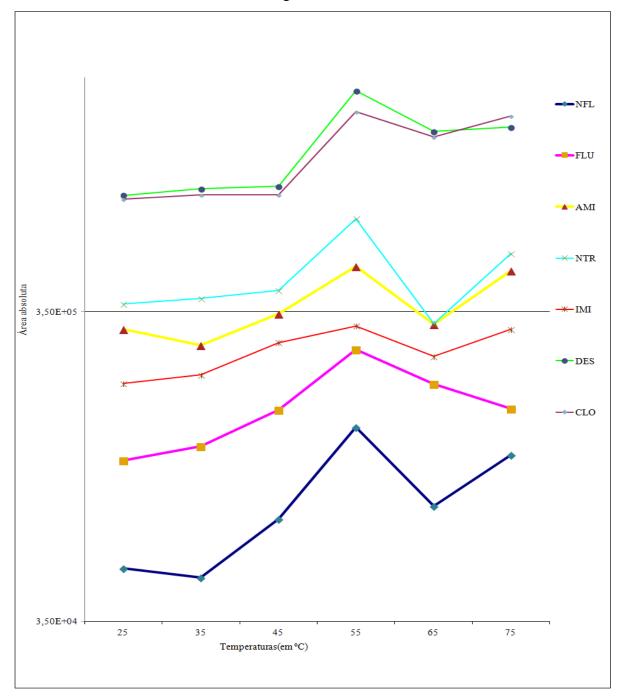


Figura 12 – Estudos das melhores concentrações do ácido fórmico para a otimização do método utilizando LPME seguida de análises em GC-MS. Média de três replicatas.

A temperatura é um parâmetro importante e pode influenciar de extração. Através da maior agitação das moléculas, ocorre a melhor difusão do analito para a fase receptora. No entanto, temperaturas elevadas podem causar a perda de solvente, e o rendimento da extração pode ser diminuído. No presente estudo, a melhor eficiência da extração foi alcançada a 55°C. Nos estudos de otimização, o analito desmetilclomipramina não estava presente, pois sua aquisição no comércio foi prejudica por procedimentos burocráticos de importação de produtos controlados pertencentes à RDC 344/98. Um cromatograma contendo todos os analitos não-deuterados utilizados neste estudo é apresentado na Figura 13.

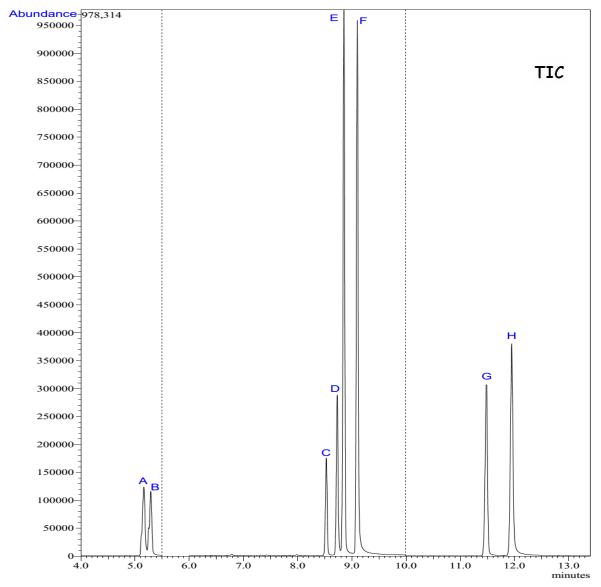


Figura 13: Cromatograma obtido por LPME contendo sangue total adicionando de norfluoxetina (A), fluoxetina (B), amitriptilina (C), nortriptilina (D), imipramina (E), desipramina (F), clomipramina (G) e desmetilclomipramina (H). Após a extração, os analitos foram analisados por GC-MS.

Com o método otimizado, foram aplicados estudos de validação. Inicialmente, realizou-se a avaliação da recuperação. Os resultados são agrupados e registrados na Figura 14.

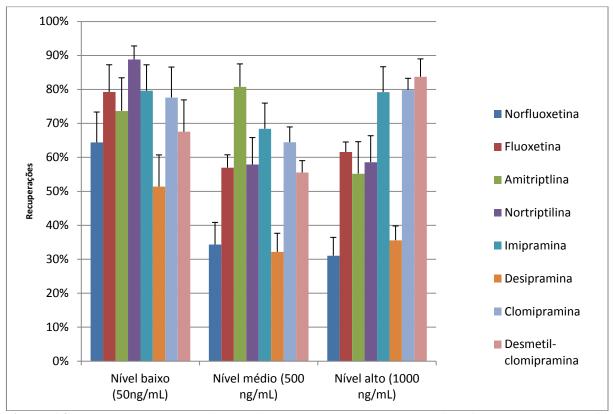


Figura 14 – Recuperações de antidepressivos em sangue total, nos níveis baixo (50 ng/mL), médio (500 ng/mL) e alto (1000 ng/mL) em amostras de sangue total, após LPME, seguida de análises em GC-MS médio (500 ng/mL) de antidepressivos com 500 μL sangue total, após extração por LPME e análises por GC-MS. Média de 06 replicatas (áreas relativas).

Os valores de recuperação dos antidepressivos em sangue total utilizando a técnica de LPME variaram entre 32% e 89%. Em comparação com dados prévios publicados, observa-se recuperações superiores ao trabalhado apresentado por Halvoren *et al* (2003) (HALVORSEN *et al.*, 2003) e semelhante ao grupo de Bardtsu *et al* (2007) (BARDSTU *et al.*, 2007). Esse último, porém, apesar de trabalhar antidepressivos e LPME, realizou os ensaios com água substituindo a matriz biológica. O menor valor apresentado foi para o antidepressivo norfluoxetina. Esse achado está em acordo com as características da extração por LPME, pois compostos polares (dentre os oitos analitos, a norfluoxetina é a mais polar) apresentou rendimento inferior devido às propriedades do método (PEDERSEN-BJERGAARD e RASMUSSEN, 2005). O coeficiente de variação ficou inferior a 10% em todos os níveis, contemplando o conjunto dos antidepressivos utilizados.

Para certificar que o método desenvolvido é preciso, foram aplicados estudos de coeficiente de variação (CV), obtido pela divisão do desvio-padrão com a média das áreas relativas dos antidepressivos e respectivos deuterados. O critério de aceitação utilizado foi valores inferiores a 10%. Para os estudos de precisão intra- e interdias, realizaram-se experimentos com os antidepressivos em três níveis: baixo (50 ng/mL), médio (500 ng/mL) e alto (1000 ng/mL). Foram analisados três dias consecutivos e em cada, 06 (seis) replicatas. Os resultados são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Coeficientes de variações (CV) inter e intradias dos antidepressivos em amostras de sangue total após LPME e análises em GC-MS.

Analito	Nível Baixo (50 ng/mL)		Nível Médio (500 ng/mL)		Nível Alto	
Allalito					(1000 ng/mL)	
	CV	CV	CV	CV	CV	CV
	intradia	interdias	intradia	interdias	intradia	interdias
Norfluoxetina	5,3%	6,8%	4,4%	8,6%	6,4%	2,3%
Fluoxetina	6,9%	6,6%	5,5%	9,0%	2,8%	9,8%
Amitriptilina	5,1%	4,2%	5,9%	1,6%	6,4%	3,4%
Nortriptilina	5,2%	1,9%	5,1%	9,4%	4,0%	3,8%
Imipramina	4,6%	5,9%	3,9%	8,9%	2,6%	0,7%
Desipramina	6,6%	1,3%	8,0%	9,7%	3,7%	10,0%
Clomipramina	5,6%	9,8%	2,4%	0,6%	1,6%	5,0%
Desmetilclomipramina	6,8%	7,8%	9,7%	1,8%	6,8%	4,5%

Os resultados acima permitem concluir que o método, nas condições otimizadas, é preciso, com coeficiente de variação, incluindo as condições interdias, abaixo de 10%. Nos experimentos, diferentes membros da equipe estiveram envolvidos nas pipetagens dos volumes necessários para os procedimentos de extração e quantificação.

Esse parâmetro analítico foi um dos mais complicados a ser obtido e aceito dentro dos valores estabelecidos de validação. Uma possível explicação para isso é o próprio método de extração LPME. Por ser uma técnica ainda totalmente manual, na qual incluem micropipetagens e volumes reduzidos, reduzidas variações entre os experimentos, resultam em altos coeficientes de variação.

A linearidade do método foi o foco da próxima avaliação. Utilizando-se de sete (07) concentrações dos antidepressivos em sangue total (20, 200, 400, 600, 800, 1000 e 1200 ng/mL), foram obtidas equações da reta, com posteriores cálculos de regressão e heteroscedasticidade. Para os cálculos estatísticos e posterior classificação, foram utilizados cálculos da distribuição de F(ALMEIDA *et al.*, 2002). Na Tabela 4, encontram-se os valores obtidos.

Tabela 4: Heteroscedasticidade, regressão linear ponderada, equação de regressão linear e coeficiente de correlação dos antidepressivos em sangue total analisados durante a validação do método de LPME e GC-MS. Média de seis replicatas.

Antidepresssivo	Heteros- cedasticidade?	Regressão linear ponderada	Equação de regressão linear	Coeficiente de correlação
Norfluoxetina	Sim	$1/x^2$	y = 1,68335x + 0,04166	$r^2 = 0.99969$
Fluoxetina	Sim	$1/y^2$	y = 0.01890x - 0.04707	$r^2 = 0.99974$
Amitriptilina	Sim	$1/x^2$	y = 0.00695x + 1.41425	$r^2 = 0.99293$
Nortritptilina	Não		y = 0.00309x + 0.12627	$r^2 = 0.99405$
Imipramina	Sim	$1/x^2$	y = 0.01162x - 0.01742	$r^2 = 0.99663$
Desipramina	Sim	$1/x^2$	y = 0.00056x + 0.11621	$r^2 = 0.99644$
Clomipramina	Não		y = 0.00746x + 0.14142	$r^2 = 0.99395$
Desmetil- clomipramina	Não		y = 0.01228x + 0.21194	$r^2 = 0.99257$

Pode-se concluir, baseando-se na Tabela 4, o fenômeno da heteroscedasticidade foi encontrado nos antidepressivos norfluoxetina, fluoxetina, amitriptilina, imipramina e desipramina. Uma explicação para esse achado analítico é a grande magnitude das concentrações dos antidepressivos utilizadas para obter a lineariedade, onde pequenas variações nos resultados obtidos, principalmente nas concentrações mais baixas, podem resultar em grandes erros nos cálculos das concentrações. Diante disso, tornam-se indispensáveis os cálculos de heteroscedasticidade, pois o método aqui apresentado, também é capaz de detectar pequenas concentrações dos antidepressivos no sangue total, incluindo dosagens subterapêuticas. Para efeitos comparativos, não foi possível localizar estudos anteriores realizados nos quais a heteroscedasticidade com antidepressivos foi mensurada.

Para a exatidão, os resultados obtidos são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Resultados de exatidão em três níveis de concentração dos antidepressivos em sangue total (baixo, médio e alto) obtidos por LPME, seguidos de análises cromatográficas por GCMS. Média de 06 replicatas em cada nível.

A n4: domno soirro s	Nível baixo	Nível médio	Nível alto		
Antidepressivos	(50 ng/mL)	(500 ng/mL)	(1000 ng/mL)		
Norfluoxetina	3,4%	4,2%	4,1%		
Fluoxetina	6,0%	6,1%	3,8%		
Amitriptilina	3,8%	4,4%	6,4%		
Nortritptilina	6,3%	5,2%	4,3%		
Imipramina	0,7%	5,5%	6,9%		
Desipramina	3,2%	3,4%	7,1%		
Clomipramina	5,3%	4,6%	4,0%		
Desmetil- clomipramina	6,4%	4,8%	5,1%		

Comparando-se com a literatura disponível (PAPOUTSIS *et al.*, 2012), conclui-se que os valores obtidos estão de acordo com os publicados previamente. Os resultados obtidos estão conformes aos preconizados pela SWTOX (SWGTOX, 2013), garantindo a exatidão do método estudado está conforme. Não foi encontrando uma tendência nas concentrações dos antidepressivos analisados, na qual o acréscimo da concentração resultaria em maior ou menor exatidão.

Para os limites de detecção e quantificação, foram obtidos, respectivamente, os valores de 10 ng/mL e 20 ng/mL dos antidepressivos em sangue total. Tais quantidades contemplam doses sub-terapêuticas, pois segundo a literatura especializada (BRUNTON *et al.*, 2011), as concentrações dos antidepressivos que permitem classificá-las como terapêutica, tóxica e letal, são, respectivamente, em ng/mL: 100-250, 500 e 1000. Há exceções nas dosagens terapêuticas para a nortriptilina (50-150 ng/mL), desipramina e imipramina (150-250 ng/mL), fluoxetina e norfluoxetina (100-300 ng/mL).

Um dos objetivos do desenvolvimento e validação de métodos analíticos é sua aplicabilidade nas rotinas das emergências hospitalares e em casos forenses. As concentrações sanguíneas nesses ambientes podem estar elevadas, extrapolando a linearidade do método disponível. Sabendo dessa situação e da importância da correta mensuração da concentração dos antidepressivos na matriz biológica sangue, foram contemplados nesse trabalho, estudos do parâmetro denominado integridade da diluição. O primeiro procedimento foi a obtenção de uma curva de linearidade com concentrações de 400, 800 e 1200 ng/mL. A seguir, em replicatas contendo elevadas concentrações dos antidepressivos (4000, 8000 e 12000 ng/mL), utilizou-se o próprio sangue total isento de quaisquer AD para a diluição destas até a quantidade dos analitos pertencer ao intervalo de linearidade do método (PETERS *et al.*, 2007). Os valores alcançados nessas análises são mostrados Tabela 6.

Tabela 6: Resultados da integridade da diluição dos antidepressivos em sangue total durante a validação do método por LPME e GC-MS

Analitos	NFL	FLO	AMI	NTR	IMI	DES	CLO	DMC
CV (%)								
4000 (ng/mL)	4,6	6,1	2,5	5,7	2,4	2,4	0,9	9,3
8000 (ng/mL)	4,9	0,7	4,3	5,0	1,8	8,6	6,0	1,5
12000 (ng/mL)	8,2	5,3	8,6	7,9	1,3	3,4	0,8	6,9
Exatidão(%)								
4000 (ng/mL)	-4,3	-3,0	-7,8	1,9	5,1	0,1	-1,5	-7,2
8000 (ng/mL)	-4,6	-5,4	-9,5	-2,3	-9,7	-10,1	10,1	-8,6
12000 (ng/mL)	-1,7	8,5	3,9	5,7	13,2	-1,4	-12,2	-1,8

NFL: norfluoxetina; FLU: fluoxetina; AMI: amitriptilina; NTR: nortriptilina; IMI: imipramina; DES: desipramina; CLO: clomipramina; DMC: desmetilclomipramina. CV = coeficiente de variação

Os resultados obtidos permitem concluir que a integridade da diluição pode ser aplicada na rotina dos centros de intoxicações ou onde seja necessária a quantificação de concentrações elevadas de antidepressivos em sangue total.

Publicação prévia relata a estabilidade dos antidepressivos contidos em amostras de sangue total colhido de vasos periféricos e armazenadas na forma congelada por um ano a – 20°C (HOLMGREN *et al.*, 2004). Com isso, novos estudos contemplando a estabilidade dos AD em sangue total não proporcionariam conhecimentos inéditos para a pesquisa e não foram realizados nesse trabalho.

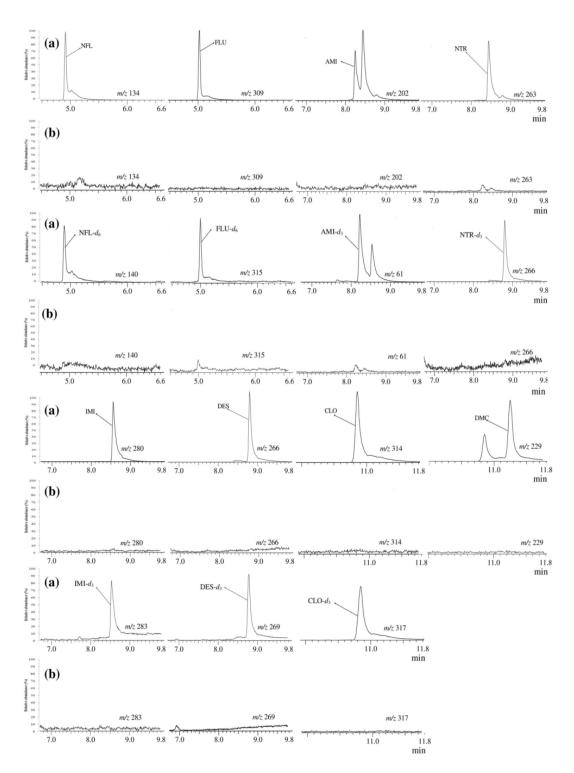


Figura 15: Cromatogramas obtidos após realização de microextração em fase líquida LPME e análises por GC-MS. Os itens "a" representam uma amostra de sangue adicionada de AD e respectivos padrões internos (PI) deuterados e "b" representa outra amostra de sangue total sem quaisquer adições de AD e PI. A concentração de todos os AD pipetados foi de 500 ng/mL de sangue total. As concentrações dos PI foram 100 ng/mL para a norfluoxetina-d6 (NFL-d6), fluoxetina-d6 (FLU-d6) imipramina-d3 (IMI-d3), desipramina-d3 (DES-d3)e clomipramina-d3 (CLO-d3); 10 ng/mL para a amitriptlina-d3 (AMI-d3)e 250 ng/mL para a nortriptilina-d3 (NTR-d3).

Validado o método, aplicou-se em amostras reais de sangue *post-mortem* de cadáveres necropsiados no SVO. Os resultados das análises são mostrados na Tabela 7.

Tabela 7: Concentração de antidepressivos em sangue total de amostras *postmortem* de sangue total, obtidas da cavidade cardíaca (sangue cardíaco) e sangue femoral.

Caso	Antidanrassiva	Sangue da cavidade	Sangue da veia		
Caso	Antidepressivo	cardíaca (ng/mL)	femoral (ng/mL)		
Caso 1	Nortriptilina	145	80		
Caso 2	Nortriptilina	129	78		
Casa 2	Amitriptilina	116	101		
Caso 3	Nortriptilina	227	139		
Caso 4	Imipramina	288	259		
Caso 4	Desipramina	126	91		
Caso 5	Amitriptilina	104	108		
Caso 6	Nortriptilina	332	97		
Casa 7	Amitriptilina	1218	910		
Caso 7	Nortriptilina	2581	1361		

Os resultados apresentados na Tabela 7 não permitem concluir a ocorrência do fenômeno da redistribuição *postmortem* de antidepressivos em sangue total nesses casos. Nos casos 1, 2, 6 a nortriptilina isoladamente presente nas amostras, sugere-se o uso deste fármaco, disponível comercialmente e não como produto de biotransformação da amitriptilina. Nas referidas amostras reais, o caso 6, forneceu um resultado no qual a concentração desse antidepressivo no sangue da cavidade cardíaca foi maior do que 300%, quando comparado à amostra obtida da veia femoral. Esse dado é semelhante ao encontrado na literatura para a amitriptrilina (DRUMMER e GEROSTAMOULOS, 2002; YAREMA e BECKER, 2005; REIS et al., 2007). No caso 7, as concentrações de amitriptilina e nortriptilina ficaram próximas (amitriptilina, sangue femoral) e superiores aos limites de uma intoxicação letal (nortritptilina nas amostras de sangue total da cavidade cardíaca e veia femoral e amitriptilina, na cavidade cardíaca), sugerindo uma overdose por esse antidepressivo. Porém, sem investigações forenses por autoridades policiais competentes que permitam esclarecer esse caso, nada pode ser concluído. Um estudo toxicocinético analisando amitriptilina e nortriptilina contidas em amostras de sangue periférico (veia cava inferior) e central (cardíaco) foi publicado anteriormente a este estudo. Os tempos de coleta, após a

morte dos animais, foram monitorados. Os resultados dos tempos *antemortem* e *postmortem* foram controlados. A comparação entre as amostras obtidas 6 minutos após o sacrifício dos ratos já aponta um possível fenômeno *postmortem*, pois a quantidade dos antidepressivos no sangue cardíaco era superior à mensurada nessa matriz obtida na veia cava inferior. Porém, após 10 horas da morte dos animais, houve uma acentuada elevação dos valores para o sangue da contido nas vias periféricas e os resultados, quando comparados aos fluidos biológicos do sangue cardíaco, foram semelhantes (HILBERG *et al.*, 1993). O intervalo mínimo entre o óbito e a coleta das amostras pelas técnicas de autópsias, conforme descrito no item 'Material', foi de 24 horas, o que pode justificar os resultados encontrados nesse trabalho.

Os cromatogramas obtidos nas identificações e quantificações são expostos na forma da Figura 16.

O presente estudo validou um método possível de detectar oito AD simultaneamente empregando técnicas de LPME e GC-MS. Publicações anteriores foram realizadas com grupos de quatro (GHAMBARIAN *et al.*, 2012) ou dois (DE FREITAS *et al.*, 2010; JAFARI *et al.*, 2011) analitos ao mesmo tempo.

A relação "fármaco inalterado" e seu "produto de biotransformação", apresentada com sigla derivada da língua inglesa P/M (parent drug/metabolite), é um importante achado analítico na área forense e/ou nos serviços de emergências, pois um elevado valor P/M pode ajudar a elucidar uma dosagem aguda. Por outro lado, uma relação com baixo valor de P/M pode indicar uso crônico (MUSSHOFF et al., 2010). O trabalho desenvolvido e aqui exposto abrange quatro fármacos inalterados, amitriptilina, imipramina, clomipramina e fluoxetina e seus principais produtos de biotransformação, nortriptilina, desipramina, desmetilclomipramina e norfluoxetina. Com isso, os procedimentos validados podem ser aplicados em rotinas analíticas.

Resultados e discussão

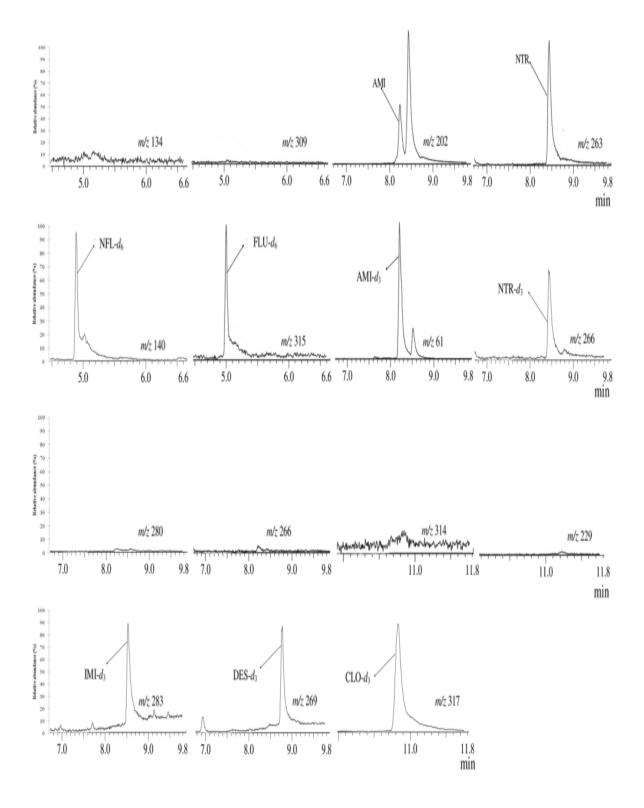


Figura 16: Cromatogramas obtidos após realização de microextração em fase líquida LPME e análises por GC-MS de amostra real apresentada com o número 3 da Tabela 7. As quantificações de AMI e NTR foram, respectivamente, 116 e 227 ng/mL. Todos os sete PI foram identificados. Os cromatogramas demonstram a ausência de NFL, FLU, IMI, DES, CLO e DMC.

PARTE II

<u>Métodos</u>

6. MÉTODOS

6.1 Microextração em fase líquida (LPME) para AD em humor vítreo

Os parâmetros para a LPME dos AD em humor vítreo foram os mesmos aplicados com estes analitos em sangue total (item 5.1) com duas exceções:

- a) O sistema foi mantido sob agitação magnética, na velocidade de 1000 rpm e
- b) O tempo de agitação foi de 10 (dez) minutos.

6.2 Condições cromatográficas.

As condições cromatográficas foram as mesmas apresentadas no item 5.2, excetuandose o íon quantificador da AMI que nessa matriz biológica foi o m/z 215, diferentemente do aplicado com o sangue total (m/z=202).

6.3 Efeito matriz

O efeito matriz é um fenômeno amplamente estudado e divulgado nas metodologias envolvendo cromatografia líquida. Para a cromatografia gasosa, porém, a literatura é escassa. O humor vítreo apresenta volume reduzido e elevada dificuldade de obtenção, por consequência, muitos trabalhos aplicando essa matriz biológica, realizam ensaios de otimização e validação com solução salina ou água destilada.

Com base em ambos conceitos acima expostos, inicialmente foi estudada a possível presença do efeito matriz nas extrações e confirmações analíticas. Nas análises comparativas, envolvendo curvas de calibração com posteriores análises estatísticas, utilizou-se humor vítreo humano e bovino e solução salina. Os analitos amitriptilina e nortriptilina não foram influenciados pelo efeito matriz. Porém, os antidepressivos imipramina e desipramina, mesmo com resultados comparativos com humor vítreo bovino, apresentaram esse fenômeno. Com isso, a otimização e a validação do método abaixo descrito, foram realizadas com solução salina contendo amitriptilina e nortriptlina.

6.4 Otimização do método

Para a otimização do método, foram comparados três parâmetros importantes da LPME: tempo, velocidade de agitação e temperatura de extração. A condição a ser analisada foi variável durante o experimento e os dois outros parâmetros permaneceram sem alterações.

Os tempos de agitação analisados foram 1, 5, 10, 20, 40 e 60 minutos. A velocidade de agitação foi estudada em quatro situações: 500, 800, 1000 e 1200 rpm. O melhor aquecimento para as extrações foi definido após comparações entre os resultados nos experimentos submetidos às temperaturas de 25°C, 35°C, 45°C, 55°C, 65° e 75°C.

6.5 Recuperação

Recuperação, um termo analítico utilizado para quantificar a porcentagem dos analitos presente no final do procedimento de extração na solução salina, foi estudada. É quantificado pela adição, após os procedimentos de extração de uma quantidade conhecida dos analitos, em uma amostra branca da solução salina. Compara-se esse valor (não-extraído) com as quantidades obtidas após a extração (extraído), sendo o primeiro grupo denominado 100%. Seis replicatas em três concentrações crescentes de antidepressivos, denominados nível baixo, médio e alto, cujas quantidades eram, respectivamente, 15, 100 e 180 ng/mL, foram analisadas nesse parâmetro.

6.6 Precisão interdia e intradia

Os estudos de precisão foram desenvolvidos em experimentos com seis replicatas de solução salina contendo concentrações de 15, 100 e 180 ng/mL dos analitos em três dias diferentes e consecutivos. Precisão, definido como o desvio-padrão relativo, foi determinado por repetições intradia e interdia.

6.7 Linearidade

A linearidade do método foi obtida pelos cálculos de seis replicatas contendo solução salina, nas seguintes concentrações para cada analito: 5, 40, 80, 120, 160 e 200 ng/mL. Na sequência, estudos de heteroscedasticidade foram aplicados (ALMEIDA *et al.*, 2002).

6.8 Exatidão

As mesmas diretrizes apresentadas no item 5.8 foram seguidas para essa matriz biológica.

6.9 Limites de detecção e quantificação

Utilizando-se o guia de validação da SWTOX, o limite de detecção é a menor concentração estimada de um analito na amostra que se pode, com segurança, ser diferenciada do branco da matriz e identificada pelo método analítico. Para o limite de quantificação, defini-se como o a menor concentração estimada de um analito na amostra que pode ser quantificada seguramente com valores de precisão e exatidão aceitáveis.

Para os estudos do limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ), em seis replicatas de solução salina, foram adicionadas concentrações decrescentes dos antidepressivos: 50, 20, 10, 5 e 1ng/mL.

O LOD foi considerado como a menor contração capaz de produzir uma resposta no GC-MS, maior ou igual a três vezes o ruído das amostras brancas e, ao mesmo tempo, alcançado critérios pré-definidos de identificação e quantificação, incluindo o tempo de retenção, formato do pico, relação massa/carga.

Para o LOQ, a menor concentração utilizada em conformidade com a curva de calibração previamente estabelecida e obedecendo aos critérios de precisão, exatidão e identificação aceitáveis, foi a estimada.

6.10 Integridade da diluição

Amostras com concentrações superiores ao limite de quantificação obtido na curva de calibração podem ser encontradas nas investigações forenses *postmortem*. Resultados confiáveis devem ser obtidos através da diluição das matrizes biológicas analisadas. A integridade da diluição foi validada com a adição na solução salina dos analitos em três níveis elevados (600, 1500 e 2100 ng/mL). A solução salina foi utilizada para diluir essas concentrações elevadas, até obter 150 ng/mL dos antidepressivos. Esse valor final obtido está contemplado na lineariedade do método. Realizando esse procedimento, é possível quantificar, com credibilidade, amostras com valores acima da linearidade do método. As

análises foram realizadas em triplicata para cada concentração. Exatidão e precisão obedeceram aos critérios aceitáveis, estipulados em \pm 15%.

6.11 Estabilidade da amostra extraída

As rotinas laboratoriais da toxicologia analítica são, muitas vezes, realizadas com diversas amostras. Estas devem ser extraídas, diluídas nos solventes adequados e, posteriormente, analisadas por equipamentos cromatográficos. O objetivo da validação da estabilidade da amostra extraída é assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos, nos quais a influência do tempo e temperatura ambiente decorrente entre a extração dos analitos da matriz biológica e a sua introdução nos aparelhos analíticos não afetará a interpretação real da concentração presente nas amostras. Nesses experimentos, dez replicatas foram injetadas, cada uma delas, dez vezes no equipamento. Os *vials* contendo as amostras permaneceram sequencialmente enumeradas no amostrador automático à temperatura ambiente. A concentração dos analitos foi de 150 ng/mL e o coeficiente de variação entre as análises, incluindo-se a primeira e a décima, foi estatisticamente avaliado. Os desvios padrão relativos foram inferiores a 10%.

6.12 Aplicações em casos reais post-mortem

Após a otimização e validação do método, o método foi aplicado em seis amostras de humor vítreo humano, provenientes de cadáveres atendidos no SVO. A urina foi a espécime biológica de escolha para a realização da triagem, aplicando-se um método de imunoensaio (Triage8 – Alere). O *cut-off* do método para antidepressivos tricíclicos nessa matriz biológica, segundo o fabricante, é de 1000 ng/mL. As amostras ficaram armazenadas em freezer a – 20°C até o momento da análise.

Resultados e discussão

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O efeito matriz foi o primeiro assunto abordado nos estudos de otimização e validação. Curvas de calibração utilizando humor vítreo humano, bovino e solução salina foram construídas após extrações por LPME utilizando esses fluidos. As concentrações foram 5, 40, 80, 120, 160 e 200 ng/mL. Para cada ponto da curva, foram utilizadas seis replicatas. O Teste *t* de Student (α=0,05) bicaudal homocedástico foi o cálculo estatístico aplicado para comparação das curvas obtidas, confrontando-se os valores obtidos em cada ponto da equação da reta do humor vítreo humor e solução salina e, em outra comparação, a primeira matriz biológica e o humor vítreo bovino. Os resultados são apresentados nas Figuras 17 a 20.

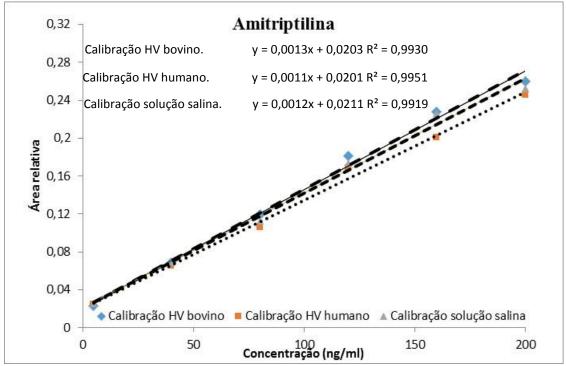


Figura 17 — Curvas de calibrações para a amitriptilina obtidas com humor vítreo (HV) bovino, humor vítreo humano e solução salina. As equações da reta e os respectivos coeficientes de determinações são apresentados para cada fluido nesta figura.

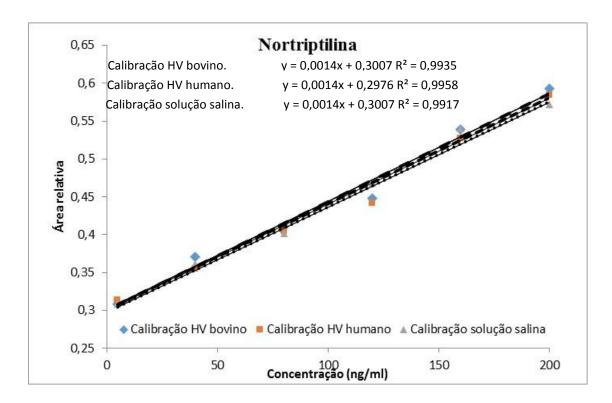


Figura 18: Curvas de calibrações para a nortriptlina obtidas com humor vítreo (HV) bovino, humor vítreo humano e solução salina. As equações da reta e os respectivos coeficientes de determinações são apresentados para cada fluido nesta figura.

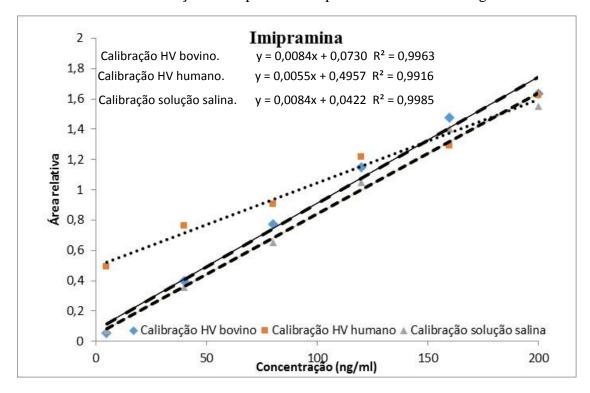


Figura 19: Curvas de calibrações para a imipramina obtidas com humor vítreo (HV) bovino, humor vítreo humano e solução salina. As equações da reta e os respectivos coeficientes de determinações são apresentados para cada fluido nesta figura.

Resultados e discussão 88

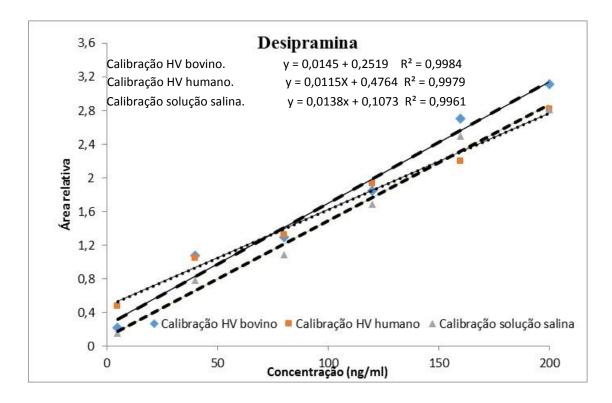


Figura 20: Curvas de calibrações para a desipramina obtidas com humor vítreo (HV) bovino, humor vítreo humano e solução salina. As equações da reta e os respectivos coeficientes de determinações são apresentados para cada fluido nesta figura.

As Figuras 17 e 18 representando, respectivamente, amitriptilina e nortriptilina, possibilitaram concluir, a ausência de efeito matriz para estes analitos. Os antidepressivos imipramina e desipramina, porém, apresentam o efeito matriz e, mesmo utilizando amostras biológicas de origem animal, humor vítreo bovino, não foi possível desprezar o efeito matriz. O coeficiente de variação entre as curvas de calibração foi calculado e é apresentado na Tabela 8.

Tabela 8: Comparação do coeficiente de determinação (R ²), slopes e coeficiente de variação
das curvas de calibração utilizando humor vítreo bovino, humano e solução salina.

Antidepressivo	Slope HVB	R ² HVH	Slope HVH	R ² HVH	Slope SS	R ² SS	CV (%) slopes HVB/HVH/SS
Amitriptilina	0,0013	0,9930	0,0011	0,9951	0,0012	0,9919	8,3%
Nortriptilina	0,0014	0,9958	0,0014	0,9935	0,0014	0,9917	0,1%
Imipramina	0,0084	0,9963	0,0055	0,9916	0,0084	0,9985	22,5%
Desipramina	0,0145	0,9984	0,0115	0,9979	0,0138	0,9961	11,8%

HVB: humor vítreo bovino. HVH: humor vítreo humano. SS: solução salina. CV (%) slopes HVB/HVH/SS quantificação do coeficiente de quantificação entre os slopes obtidos com as curvas de calibração utilizando humor vítreo bovino, humano e solução salina.

O efeito matriz foi elucidado e identificado em dois analitos. Amitriptlina e nortriptilina não apresentaram esse fenômeno e com estes dois antidepressivos os estudos de otimização, apresentados nas Figuras 21, 22 e 23 e validação foram concluídos, para posterior aplicação em casos reais.

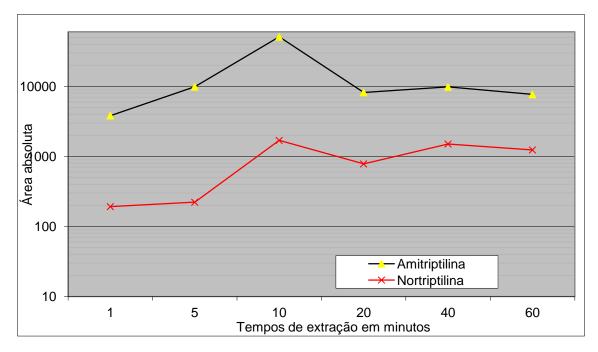


Figura 21: Otimização do tempo de extração para LPME utilizando solução salina e amitriptina e nortriptilina.

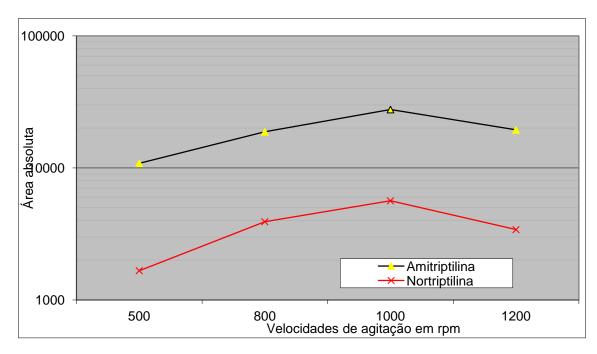


Figura 22: Otimização da velocidade de agitação para LPME utilizando solução salina e amitriptina e nortriptilina.

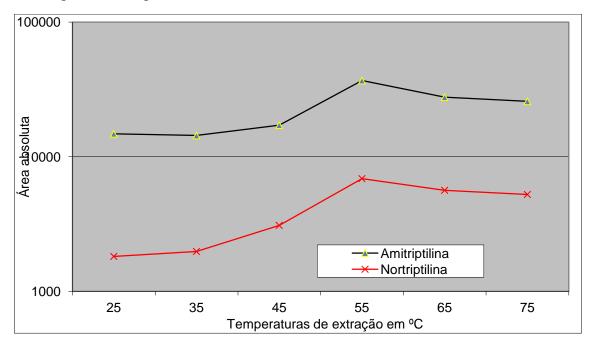


Figura 23: Otimização da temperatura de extração para LPME utilizando solução salina e amitriptina e nortriptilina.

O tempo de extração otimizado para os estudos em humor vítreo, comparando-o com o obtido em sangue total, foi menor, reduzindo-se de 30 para 10 minutos. A menor viscosidade do líquido estudado pode justificar esse resultado. O mesmo raciocínio pode ser aplicado para explicar a menor velocidade de agitação otimizada. A melhor temperatura foi a mesma entre ambas pesquisas envolvendo sangue total e humor vítreo.

Os estudos de validação foram executados e analisados. Os resultados são abaixo aduzidos na Tabela 9.

Tabela 9: Parâmetros de confiabilidade para validação do método de estudo para antidepressivos em solução salina por LPME e GC-MS.

Parâmetros	Amitriptilina	Nortriptlina
Precisão intradia (RSD%)		
CQ baixo	6,1	6,6
CQ médio	5,6	3,1
CQ alto	1,7	3,3
Precisão interdia (RSD%)		
CQ baixo	8,1	7,1
${ m CQ}_{ m m\acute{e}dio}$	12,9	3,5
CQ alto	12,9	5,6
Exatidão intradia (%)		
CQ baixo	92,2	109,2
CQ médio	99,4	108,4
$ m CQ_{alto}$	109,4	106,7
Recuperação (%)		
CQ baixo	97,6	84,6
$ m CQ_{m\'edio}$	88,5	60,3
CQ alto	73,8	62,0
LOD (ng/ml)	1,0	1,0
LOQ (ng/ml)	5,0	5,0
Estabilidade da amostra	2.0	7.0
extraída (RSD%)	2,0	7,9
Exatidão da integridade da		
diluição (%)		
600 ng/ml	104,8	110,0
1500 ng/ml	100,0	108,9
2100 ng/ml	97,0	93,3
Heteroscedasticidade	Sim	Não

RSD desvio-padrão relativo, *CQ* controle de qualidade, *LOD* limite de deteçção, *LOQ* limite de quantificação, *CQ* _{baixo} 15 ng/ml, *CQ* _{médio} 100 ng/ml, *CQ* _{alto} 180 ng/ml, *Estabilidade da amostra extraída* RSD da primeira e 10^a análise da mesma replicata no período de 22 horas à temperatura ambiente (25°C).

O coeficiente de variação do método ficou abaixo de 15%, assegurando análises precisas e confiáveis. A exatidão ficou em conformidade com os guias internacionais utilizados (SWGTOX, 2013). A recuperação para a amitriptlina apresentou uma maior porcentagem em concentrações mais baixas e para a nortriptlina não é possível assegurar esse comportamento, embora a diferença entre o nível alto e médio seja superior a 10%. Entre os níveis médio e baixo essa diferença foi reduzida.

Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) ficaram, respectivamente, em 1 e 5 ng/mL. A redução da voltagem da fonte de íons, alterando-se de 70 para 50 eV, pode ter contribuído aumentar a sensibilidade desse método, quando comparado ao anteriormente descrito e publicado, utilizando sangue total. A menor energia de ionização resulta em moléculas menos fragmentadas (HOFFMANN e STROOBANT, 2007) e isso, proporcionou quantificar os íons moleculares e com maiores massas, pois os espectros de massas dos antidepressivos tricíclicos, são, via de regra, abundantes no m/z 58 e com baixa presença nos íons moleculares.

A estabilidade da amostra extraída foi verificada e o coeficiente de variação abaixo de 10% assegura a conformidade desse resultado e permitindo aplicar essa metodologia na rotina analítica.

Para o fenômeno da heteroscedasticidade, confirmaram-se os resultados prévios obtido em sangue total para a amitriptilina e nortriptilina, sendo detectado na primeira e ausente na última.

Validado o método, os antidepressivos foram quantificados em amostras reais de humor vítreo de cadáveres necropsiados no SVO. Os resultados das análises são mostrados na Tabela 9.

Tabela 9: Quantificação e relação entre a quantidade mensurada de antidepressivos no humor vítreo e sangue total periférico obtido em veias femorais em seis casos *postmortem*

Caso	AMI- HV (ng/ml)	AMI- STP (ng/ml)	AMI- HV/STP (%)	Média AMI HV/STP	RSD AMI HV/FVB	NTR- HV (ng/ml)	NTR- STP (ng/ml)	NTR- HV/STP (%)	Méida NTR HV/STP	RSD NTR HV/STP
		_		(%)	(%)		_		(%)	(%)
1	-	-	-			6.3	80.0	7.9		
2	10.9	101.0	10.9			10.9	139.0	7.8		
3	-	-	-	9.9	14.1	8.9	97.0	9.3	9.1	12.1
4	11.9	134.4	8.9			5.7	58.3	9.8		
5	-	-	-			5.4	51.5	10.7		
6	-	-	-			6.5	72.1	9.0		

AMI-HV concentração de amitriptilina em humor vítreo, AMI-STP concentração de amitriptilina em sangue total periférico, AMI-HV/STP relação entre as quantidades obtidas de amitriptilina em HV and STP, Média AMI HV/STP média da AMI-HV/STP, RSD AMI HV/STP desviopadrão relativo dos valores entre AMI-HV/STP. NTR é a sigla para nortriptilina e as siglas mencionadas para a amitriptina são as mesmas para a NTR.

A principal via farmacocinética de absorção das drogas na membrana ocular e, consequentemente estas ficarem difundidas no humor vítreo, é através da difusão passiva. Fármacos inalterados e/ou seus produtos de biotransformação somente não ligados às proteínas plasmáticas são capazes de atravessar essa barreira delgada (COX et al., 2007; FERNANDEZ et al., 2013). Consequentemente, as concentrações de substâncias com elevada afinidade para as proteínas plasmáticas serão diminuídas. Os antidepressivos tricíclicos estão contidos nesse grupo. As propriedades físico-químicas destes incluem volume elevado de distribuição, são lipofílicos e apresentam uma redistribuição postmortem considerável. Particularmente, a percentagem de ligação às proteínas plasmáticas de amitriptilina e nortriptilina são 91-97% e 90-95%, respectivamente (MOFFAT, 2011). O banco de dados para confirmar essa possível correlação é escassa e os resultados são inconclusivos (CANTRELL et al., 2009; STIAKAKIS et al., 2009; LEWIS et al., 2013), (JONES e POUNDER, 1987; JOHNSON et al., 2007). Com o objetivo de fornecer mais informações sobre a concentração de antidepressivos em HV que permitem a comparação destes analitos com os valores obtidos no sangue total, um método analítico foi validado pela aplicação da técnica de LPME seguido de análise e quantificação por GC-MS.

Os nossos resultados demonstraram médias da relação entre as concentrações quantificadas em HV e ST de antidepressivos AMI e NTR, respectivamente, 9,9 e 9,1%. Conforme descrito anteriormente, somente moléculas não ligadas às proteínas plasmáticas, podem realizar o processo de difusão passiva e penetrar a membrana ocular. Os resultados mostraram na Tabela 9 estão de acordo com esta definição. Os seis casos reais analisados são provenientes de mortes não relacionadas à *overdose* e em conformidade com a prescrição médica, pois as quantidades mensuradas no sangue total estão no contidos nos níveis terapêuticos destes antidepressivos. Comparando com o caso de intoxicação grave por AMI (STIAKAKIS *et al.*, 2009), a magnitude da razão para AMI foi de 12,9% e 14,9% NTR, e as amostras biológicas foram obtidas 19h após a morte.

Importante observar que os casos apresentados na Tabela 9 (numeração de 1 a 6) não são, necessariamente, coincidentes com os apresentados previamente na Tabela 7 (numeração de 1 a 8). Houve algumas situações nas quais foram possíveis as obtenções de amostras de sangue total periférico e total, mas não humor vítreo e outras com somente HV e ST periférico. Dessa forma, comparativos entre as quantificações dos AD em ST periféricos podem não ser exatamente as mesmas.

A Figura 24 ilustra cromatogramas obtidos após análises de humor vítreo de casos reais.

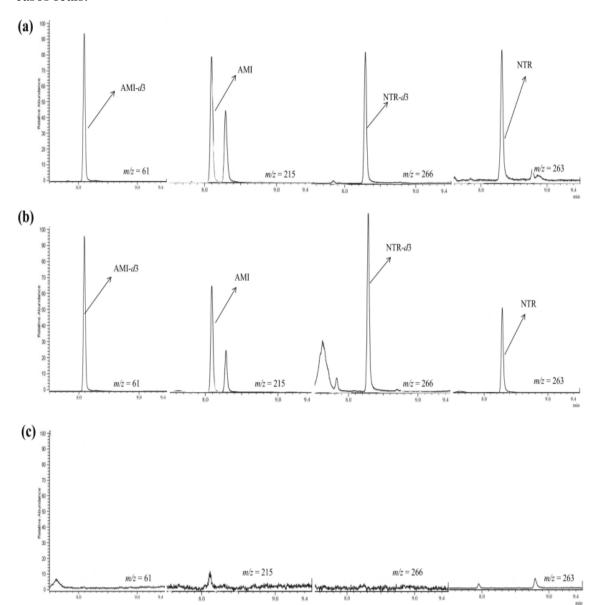


Figura 24: Cromatogramas obtidos após LPME e análises instrumentais por GC-MS. a) soro fisiológico enriquecido com antidepressivos e seus análogos deuterado e os padrões internos (PI) (b) uma real humor vítreo humano (c) humano humor vítreo amostra sem qualquer adição de AD. A concentração de todos os AD adicionados foi de 100 ng/mL. As concentrações dos PI cravada foram 10 ng/mL para AMI-d3, 200 ng/mL para NTR-d3. O item (b) é o caso de 4 presente na Tabela 9, confirmando a presença de AMI e NTR nas concentrações de 11,9 e 5,7 ng/mLl, respectivamente.

PARTE III

<u>Métodos</u>

8.MÉTODOS

8.1. Separação analítica aplicando a extração acelerada por solvente - ASE

As análises com fígado foram realizadas obedecendo aos seguintes procedimentos:

- 500 mg de fígado humano e bovino;
- 500, 750 e 1000 ng/g dos antidepressivos (norfluoxetina, fluoxetina, amitriptilina, nortriptilina, imipramina, desipramina, clomipramina e desmetilclomipramina) adicionados às matrizes biológicas.

No equipamento destinado à extração acelerada por solvente (*Dionex* ASE-100), conectou-se o tampão fosfato de potássio 0,1 mol/L, pH 6.0 e em um célula de aço, com volume de 10 mL, o fragmento do fígado foi adicionado adequadamente em papel inerte e terra diatomácea. As condições do equipamento foram:

- Temperatura 120°C;
- Tempo estatístico 1 minuto;
- Tempo de purga 1 minuto;
- 1 ciclo estático.

Resumidamente, a fração seccionada da matriz biológica sólida contida na célula de extração entrou em contato com o tampão fosfato de potássio de forma automática. Transcorridos 5 minutos de aquecimento a 120°C e um minuto de ciclo estático. Na etapa seguinte, o extrato foi retirado pela injeção contínua de nitrogênio por um minuto e um ciclo estático. O volume total do extraído foi de 12 mL.

8.2 Extração em fase sólida - SPE

Na solução resultante da extração descrita no item 8.1 foi aplicada a extração em fase sólida com cartuchos Oasis HLB (Waters Technologies), utilizando-se o sistema de extração em fase sólida automatizado GX-274 ASPEC (Gilson®). Este foi configurado para no primeiro passo condicionar os cartuchos com 2 mL de metanol e 2 mL de água MilliQ com fluxos, respectivamente, de 4 e 3 mL/min. Após o condicionamento, o

extrato da ASE foi pipetado nos cartuchos de SPE sob fluxo de 1,5 ml/min. A retirada de impurezas e interferentes adsorvidos ao cartucho foi realizada utilizando-se 2 mL de solução água/metanol (95:5) sob fluxo de 4 mL/min. A eluição foi realizada com 2 mL de metanol. Na continuidade dos procedimentos, os analitos foram concentrados após evaporação sob fluxo de nitrogênio gasoso e temperatura do bloco de aquecimento mantido a 40°C. Após completa retirada do metanol utilizado na eluição, 30 μL deste mesmo álcool foram utilizados para ressuspender os analitos e, desta solução, 2 μL foram introduzidos no GC-MS.

8.3 Condições cromatográficas

As condições cromatográficas e os analitos pesquisados nessa matriz biológica foram idênticos aos apresentados no item 4.2.

8.4 Efeito matriz

Conforme explicado no item 6.3 e, sendo o fígado humano uma matriz biológica nobre e difícil obtenção, foram necessários estudos iniciais comparando os resultados obtidos com órgãos humano e bovino para conclusão das pesquisas.

Resultados e discussão

Resultados e discussão 100

9. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos com amostras humanas e bovinas, cujos valores foram utilizados para a criação de curvas de calibração ficaram não conformes, com coeficientes de variação elevados e coeficiente de regressão inferior a 0,90 (dados não mostrados). Novos estudos devem ser realizados, modificando, principalmente as condições do ASE, pois o SPE para os antidepressivos já é consagrado na área da toxicologia analítica (SASAJIMA *et al.*, 2010; PROENCA *et al.*, 2013).

Conclusões

Conclusões 102

10. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados e discutidos permitem importantes conclusões.

- A microextração em fase líquida LPME, seguida de análises instrumentais por GC-MS, mostrou ser uma técnica rápida, simples, economicamente viável (cada fibra tem o valor de centavos de Real) é eficiente para quantificar ADT e ISRS em sangue total. Procedimentos prévios de preparo de amostras com esta matriz biológica não são necessários. Foi possível, sem qualquer etapa adicional, trabalhar com sangue coagulado e hemolisado. Reações químicas adicionais para derivatização também não foram necessárias;
- A linearidade obtida contempla níveis terapêuticos, tóxicos e letais de AD. Para concentrações muito elevadas, a técnica da integridade da diluição possibilitou mensurar esses valores;
- Embora trabalhos científicos prévios evidenciarem a redistribuição *postmortem* dos AD, não foi possível concluir a existência desse fenômeno com as amostras obtidas e analisadas. Somente em um caso, do total de sete amostras analisadas, foi constatada a diferença entre o sangue total obtido da veia periférica (femoral) e esta matriz coletada da região central (cardíaca). Estudos comparativos em condições controladas após a morte e com padronização dos intervalos de coleta parecem ser importantes para elucidar alterações nas amostras dos cadáveres;
- O efeito matriz foi identificado em 50% dos analitos avaliados com humor vítreo bovino e humano e solução salina. A otimização e a validação do método foram realizadas com solução salina adicionada dos AD sem a influência desse interferência analítica;

Conclusões 103

• A redução da voltagem da fonte de íons do espectrômetro de massas possibilitou um importante aumento na sensibilidade analítica. Comparando-se os LOQ obtido com sangue total (20 ng/mL) e humor vítreo (5 ng/mL), observa-se um aumento de 400%;

- O tempo de extração para o humor vítreo foi reduzido em aproximadamente
 70% quando confrontado com o período otimizado para o sangue total;
- A relação entre as concentrações verificadas no humor vítreo e sangue total foi de aproximadamente 0,1. Essa informação pode contribuir o banco de dados com matrizes alternativas ao sangue total;
- Não foi possível validar o método utilizando a matriz biológica sólida fígado.
 Mais estudos são necessários para a conclusão desse método e posterior aplicação em casos reais;
- A manipulação e descarte de solventes orgânicos é drasticamente reduzida com o uso da técnica de LPME. Enquanto em análises convencionais por extrações líquido-líquido, por exemplo, são utilizados 5-10 mL de éter etílico para cada extração, na técnica miniaturizada esse volume é suficiente para preparar aproximadamente 100 fibras, possibilitando 50 extrações. Além disso, não são gerados resíduos líquidos que devem ser acondicionados e descartados adequadamente.

Referências

11. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. M.; CASTEL-BRANCO, M. M.; FALCAO, A. C. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 774, n. 2, p. 215-222, 2002.
- ALVES, C. et al. Analysis of tricyclic antidepressant drugs in plasma by means of solid-phase microextraction-liquid chromatography-mass spectrometry. **J Mass Spectrom**, v. 42, n. 10, p. 1342-1347, 2007.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, A. Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5. Fifth edition. 2013.
- ANTONIDES, H. M.; KIELY, E. R.; MARINETTI, L. J. Vitreous fluid quantification of opiates, cocaine, and benzoylecgonine: comparison of calibration curves in both blood and vitreous matrices with corresponding concentrations in blood. **J Anal Toxicol**, v. 31, n. 8, p. 469-476, 2007.
- BALANT-GORGIA, A. E.; GEX-FABRY, M.; BALANT, L. P. Clinical pharmacokinetics of clomipramine. **Clin Pharmacokinet**, v. 20, n. 6, p. 447-462, 1991.
- BARDSTU, K. F. et al. Supported liquid membranes in hollow fiber liquid-phase microextraction (LPME)--practical considerations in the three-phase mode. **J Sep Sci,** v. 30, n. 9, p. 1364-1370, 2007.
- BASELT, R. C. **Disposition of toxic drugs and chemicals in man**. 8th ed. / Randall C. Baselt. Foster City, Ca: Biomedical Publications, 2008.
- BERNARDES, S.; TURINI, C.; MATSUO, T. Perfil das tentativas de suicídio por sobredose intencional de medicamentos atendidas por um Centro de Controle de Intoxicações do Paraná, Brasil. **Cad. Saúde Pública,** v. 26, n. 7, p. 1366-1372, 2010.
- BOYER, E. W.; SHANNON, M. The serotonin syndrome. **N Engl J Med,** v. 352, n. 11, p. 1112-1120, 2005.
- BRASIL. Código de Processo Penal, Art.162 Decreto-Lei, nº 3.689, de 03 de Outubro de 1941. **D.O.U. Diário Oficial da União**, 1941.
- BRASIL, M. D. S. Resolução RDC nº 57, de 16 de dezembro de 2010. **D.O.U. Diário** Oficial da União; Poder Executivo, de 17 de dezembro de 2010.
- BRASIL, R.-. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais : Rename 2013.** MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE CIÊNCIA, 2013.
- BRAYFIELD, A. **Martindale : the complete drug reference**. London: Pharmaceutical Press Royal Pharmaceutical Society of Great Britain., 2014.

- BRUNTON, L. L. et al. **Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics**. 12th ed. / editor, Laurence L. Brunton; associate editors, Bruce A. Chabner, Bjorn C. Knollmann. New York, N.Y.; London: McGraw-Hill, 2011
- CAHN, C. Roland Kuhn, 1912–2005. **Neuropsychopharmacology Nature Publishing Group,** v. 31, p. 1096, 2006.
- CANTRELL, F. L. et al. Fatal fluoxetine intoxication with markedly elevated central blood, vitreous, and liver concentrations. **J Anal Toxicol**, v. 33, n. 1, p. 62-64, 2009.
- CHEER, S. M.; GOA, K. L. Fluoxetine: a review of its therapeutic potential in the treatment of depression associated with physical illness. **Drugs**, v. 61, n. 1, p. 81-110, 2001.
- CHEETA, S. et al. Antidepressant-related deaths and antidepressant prescriptions in England and Wales, 1998-2000. **Br J Psychiatry**, v. 184, p. 41-47, 2004.
- CIPRIANI, A.; BARBUI, C.; GEDDES, J. R. Suicide, depression, and antidepressants. **BMJ**, v. 330, n. 7488, p. 373-374, 2005.
- COHEN, H. W.; GIBSON, G.; ALDERMAN, M. H. Excess risk of myocardial infarction in patients treated with antidepressant medications: association with use of tricyclic agents. **Am J Med,** v. 108, n. 1, p. 2-8, Jan 2000.
- COOK, D. S.; BRAITHWAITE, R. A.; HALE, K. A. Estimating antemortem drug concentrations from postmortem blood samples: the influence of postmortem redistribution. **J Clin Pathol,** v. 53, n. 4, p. 282-285, 2000.
- COX, D. et al. Distribution of phencyclidine into vitreous humor. **J Anal Toxicol,** v. 31, n. 8, p. 537-539, 2007.
- DE FREITAS, D. F. et al. Three-phase, liquid-phase microextraction combined with high performance liquid chromatography-fluorescence detection for the simultaneous determination of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma. **J Pharm Biomed Anal,** v. 51, n. 1, p. 170-177, 2010.
- DRUID, H.; HOLMGREN, P. Compilations of therapeutic, toxic, and fatal concentrations of drugs. **J Toxicol Clin Toxicol**, v. 36, n. 1-2, p. 133-134; author reply 135-136, 1998.
- DRUMMER, O. H.; GEROSTAMOULOS, J. Postmortem drug analysis: analytical and toxicological aspects. **Ther Drug Monit**, v. 24, n. 2, p. 199-209, 2002.
- DUMAN, R. S. Neural plasticity: consequences of stress and actions of antidepressant treatment. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 6, n. 2, p. 157-169, 2004.
- DUMAN, R. S.; HENINGER, G. R.; NESTLER, E. J. A molecular and cellular theory of depression. **Arch Gen Psychiatry**, v. 54, n. 7, p. 597-606, 1997.

DUVERNEUIL, C. et al. Liquid chromatography/photodiode array detection for determination of strychnine in blood: a fatal case report. **Forensic Sci Int,** v. 141, n. 1, p. 17-21, 2004.

DWIVEDI, Y. et al. Altered gene expression of brain-derived neurotrophic factor and receptor tyrosine kinase B in postmortem brain of suicide subjects. **Arch Gen Psychiatry**, v. 60, n. 8, p. 804-815, 2003.

EAP, C. B.; BAUMANN, P. Analytical methods for the quantitative determination of selective serotonin reuptake inhibitors for therapeutic drug monitoring purposes in patients. **J Chromatogr B Biomed Appl,** v. 686, n. 1, p. 51-63, 1996.

ESRAFILI, 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. **Anal Chim Acta**, v. 604, n. 2, p. 127-133, 2007.

FERNANDEZ, P. et al. Chromatographic determination of drugs of abuse in vitreous humor using solid-phase extraction. **J Appl Toxicol**, v. 33, n. 8, p. 740-745, 2013.

FERNER, R. E. Post-mortem clinical pharmacology. **Br J Clin Pharmacol,** v. 66, n. 4, p. 430-443, 2008.

FILONZI, M. et al. Determination of antidepressants in whole blood using hollow-fiber liquid-phase microextraction and gas chromatography—mass spectrometry. **Forensic Toxicol,** v. 32, n. 2, p. 214-224, 2014.

FLANAGAN, R.; CONNALLY, G. Interpretation of analytical toxicology results in life and at postmortem. **Toxicol Rev.**, v. 24, n. 1, p. 51-62, 2005.

FLANAGAN, R. et al. **Fundamental of analytical toxicology**. 2nd. Wiley-Interscience, 2007.

FREY, B. N. et al. [Neuropatological and neurochemical abnormalities in bipolar disorder]. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 26, n. 3, p. 180-188, 2004.

GHAMBARIAN, M.; YAMINI, Y.; ESRAFILI, A. Three-phase hollow fiber microextraction based on two immiscible organic solvents for determination of tricyclic antidepressant drugs: comparison with conventional three-phase hollow fiber microextraction. **J Chromatogr A,** v. 1222, p. 5-12, 2012.

GLASSMAN, A. H. Cardiovascular effects of antidepressant drugs: updated. **J Clin Psychiatry**, v. 59 Suppl 15, p. 13-18, 1998.

GLAUSER, J. Tricyclic antidepressant poisoning. **Cleve Clin J Med,** v. 67, n. 10, p. 704-706, 709-713, 717-709, 2000.

GOERINGER, K. E. et al. Postmortem forensic toxicology of selective serotonin reuptake inhibitors: a review of pharmacology and report of 168 cases. **J Forensic Sci**, v. 45, n. 3, p. 633-648, 2000.

GROUP, D. U. A. Clomipramine dose-effect study in patients with depression: clinical end points and pharmacokinetics. Danish University Antidepressant Group (DUAG). **Clin Pharmacol Ther,** v. 66, n. 2, p. 152-165, 1999.

GUPTA, R. N. Drug level monitoring: antidepressants. **J Chromatogr**, v. 576, n. 2, p. 183-211, 1992.

HALVORSEN, T. G. et al. Liquid-phase microextraction combined with liquid chromatography—mass spectrometry. Extraction from small volumes of biological samples. **J Sep Sci**, v. 26, p. 1520-1526, 2003.

HARRIGAN, R. A.; BRADY, W. J. ECG abnormalities in tricyclic antidepressant ingestion. **Am J Emerg Med**, v. 17, n. 4, p. 387-393, 1999.

HAYASHI, D. et al. A simple and reliable method for quantifying plasma concentrations of tetracyclic antidepressants using monolithic silica solid-phase extraction tips. **Forensic Toxicol,** v. 30, p. 98-105, 2012.

HERTING, G.; AXELROD, J.; WHITBY, L. G. Effect of drugs on the uptake and metabolism of H3-norepinephrine. **J Pharmacol Exp Ther,** v. 134, p. 146-153, 1961.

HICKS, J. K. et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guideline for CYP2D6 and CYP2C19 genotypes and dosing of tricyclic antidepressants. **Clin Pharmacol Ther,** v. 93, n. 5, p. 402-408, 2013.

HIEMKE, C.; HARTTER, S. Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. **Pharmacol Ther,** v. 85, n. 1, p. 11-28, 2000.

HILBERG, T. et al. An animal model of postmortem amitriptyline redistribution. **J** Forensic Sci, v. 38, n. 1, p. 81-90, 1993.

HILBERG, T.; ROGDE, S.; MORLAND, J. Postmortem drug redistribution--human cases related to results in experimental animals. **J Forensic Sci**, v. 44, n. 1, p. 3-9, 1999.

HILDEBRANDT, M. G. et al. Are gender differences important for the clinical effects of antidepressants? **Am J Psychiatry**, v. 160, n. 9, p. 1643-1650, 2003.

HOFFMANN, E. D.; STROOBANT, V. Mass spectrometry: principles and applications. 3rd. Chichester, West Sussex, England; Hoboken, NJ: J. Wiley, 2007. xii, 489 p.

HOLMGREN, P. et al. Stability of drugs in stored postmortem femoral blood and vitreous humor. **J Forensic Sci**, v. 49, n. 4, p. 820-825, 2004.

HUCK, C. W.; BONN, G. K. Recent developments in polymer-based sorbents for solid-phase extraction. **J Chromatogr A,** v. 885, n. 1-2, p. 51-72, 2000.

IVERSEN, L. Neurotransmitter transporters and their impact on the development of psychopharmacology. **Br J Pharmacol**, v. 147 Suppl 1, p. S82-88, 2006.

JAFARI, M. T.; SARAJI, M.; SHERAFATMAND, H. Electrospray ionization-ion mobility spectrometry as a detection system for three-phase hollow fiber microextraction technique and simultaneous determination of trimipramine and desipramine in urine and plasma samples. **Anal Bioanal Chem,** v. 399, n. 10, p. 3555-3564, 2011.

JAFFE, P. D. et al. A study involving venlafaxine overdoses: comparison of fatal and therapeutic concentrations in postmortem specimens. **J Forensic Sci**, v. 44, n. 1, p. 193-196, 1999.

JOHNSON, R. D.; LEWIS, R. J.; ANGIER, M. K. The distribution of fluoxetine in human fluids and tissues. **J Anal Toxicol**, v. 31, n. 7, p. 409-414, 2007.

JONES, G. R.; POUNDER, D. J. Site dependence of drug concentrations in postmortem blood--a case study. **J Anal Toxicol**, v. 11, n. 5, p. 186-190, 1987.

KARCH, S. B. **Drug abuse handbook**. 2nd ed. Boca Raton, Fla.; London: CRC, 2007.

_____. **Postmortem toxicology of abused drugs**. Nes York - USA: CRC Press, 2007.

- KERR, G. W.; MCGUFFIE, A. C.; WILKIE, S. Tricyclic antidepressant overdose: a review. **Emerg Med J**, v. 18, n. 4, p. 236-241, 2001.
- KHRAIWESH, A. et al. Development and validation of an EI-GC/MS method for the determination of sertraline and its major metabolite desmethyl-sertraline in blood. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 879, n. 25, p. 2576-2582, 2011.
- KUDO, K. et al. Construction of calibration-locking databases for rapid and reliable drug screening by gas chromatography-mass spectrometry. **Forensic Toxicol,** v. 27, p. 21-31, 2009.
- LAU, E. V.; GAN, S.; NG, H. K. Extraction techniques for polycyclic aromatic hydrocarbons in soils. **Int J Anal Chem,** v. 2010, p. 398381, 2010.
- LEE, X. P. et al. Determination of tricyclic antidepressants in human plasma using pipette tip solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **J Sep Sci**, v. 31, n. 12, p. 2265-2271, 2008.
- LEWIS, R. J. et al. Analysis of sertraline in postmortem fluids and tissues in 11 aviation accident victims. **J Anal Toxicol**, v. 37, n. 4, p. 208-216, 2013.
- LICINIO, J.; WONG, M. L. Depression, antidepressants and suicidality: a critical appraisal. **Nat Rev Drug Discov**, v. 4, n. 2, p. 165-171, 2005.
- LOGAN, B. K.; FRIEL, P. N.; CASE, G. A. Analysis of sertraline (Zoloft) and its major metabolite in postmortem specimens by gas and liquid chromatography. **J Anal Toxicol,** v. 18, n. 3, p. 139-142, 1994.
- LOTRICH, F. E.; POLLOCK, B. G. Aging and clinical pharmacology: implications for antidepressants. **J Clin Pharmacol**, v. 45, n. 10, p. 1106-1122, 2005.
- MALBERG, J. E.; BLENDY, J. A. Antidepressant action: to the nucleus and beyond. **Trends Pharmacol Sci**, v. 26, n. 12, p. 631-638, 2005.
- MANDOUR, R. A. Antidepressants medications and the relative risk of suicide attempt. **Toxicol Int,** v. 19, n. 1, p. 42-46, 2012.
- MASTROGIANNI, O. et al. Determination of venlafaxine in post-mortem whole blood by HS-SPME and GC-NPD. **Forensic Sci Int,** v. 215, n. 1-3, p. 105-109, 2012.
- MESSIHA, F. S. Fluoxetine: adverse effects and drug-drug interactions. **J Toxicol Clin Toxicol**, v. 31, n. 4, p. 603-630, 1993

MOFFAT, A. C. Clarke's analysis of drugs and poisons: in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. 4th ed. / edited by Anthony C. Moffat ... [et al.]. London: Pharmaceutical, 2011.

MORIYA, F.; HASHIMOTO, Y. Redistribution of basic drugs into cardiac blood from surrounding tissues during early-stages postmortem. **J Forensic Sci**, v. 44, n. 1, p. 10-16, 1999.

MULLER, J. C. et al. Depression and anxiety occurring during Rauwolfia therapy. **J Am Med Assoc,** v. 159, n. 9, p. 836-839, 1955.

MURRAY, C. J.; LOPEZ, A. D.; JAMISON, D. T. The global burden of disease in 1990: summary results, sensitivity analysis and future directions. **Bull World Health Organ,** v. 72, n. 3, p. 495-509, 1994.

MUSSHOFF, F. et al. Fatal blood and tissue concentrations of more than 200 drugs. **Forensic Sci Int,** v. 142, n. 2-3, p. 161-210, 2004.

MUSSHOFF, F.; STAMER, U. M.; MADEA, B. Pharmacogenetics and forensic toxicology. **Forensic Sci Int,** v. 203, n. 1-3, p. 53-62, 2010.

NESTLER, E. J. et al. Neurobiology of depression. **Neuron**, v. 34, n. 1, p. 13-25, 2002.

OLIVEIRA, A. F.; DE FIGUEIREDO, E. C.; DOS SANTOS-NETO, A. J. Analysis of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma by liquid-phase microextraction and injection port derivatization GC-MS. **J Pharm Biomed Anal**, v. 73, p. 53-58, 2013.

PAPOUTSIS, I. et al. A fully validated method for the simultaneous determination of 11 antidepressant drugs in whole blood by gas chromatography-mass spectrometry. **J Pharm Biomed Anal,** v. 70, p. 557-562, 2012.

PARKER, J. M.; WINEK, C. L.; SHANOR, S. P. Post-mortem changes in tissue levels of sodium secobarbital. **Clin Toxicol**, v. 4, n. 2, p. 265-272, 1971.

PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Bioanalysis of drugs by liquid-phase microextraction coupled to separation techniques. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci,** v. 817, n. 1, p. 3-12, 2005.

PELISSIER-ALICOT, A. L. et al. Mechanisms underlying postmortem redistribution of drugs: a review. **J Anal Toxicol**, v. 27, n. 8, p. 533-544, 2003.

PETERS, F. T.; DRUMMER, O. H.; MUSSHOFF, F. Validation of new methods. **Forensic Sci Int,** v. 165, n. 2-3, p. 216-224, 2007.

- PETRIDES, A. K. et al. The development and validation of a turbulent flow-liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the simultaneous quantification of citalopram, sertraline, bupropion and hydroxybupropion in serum. **Clin Biochem**, v.45, n.15, p.73-79, 2014.
- PIETRACCI, E. et al. Simultaneous determination of new-generation antidepressants in plasma by gas chromatography—mass spectrometry. **Forensic Toxicol,** v. 31, p. 124-132, 2013.
- POPOT, M. A. et al. Use of accelerating solvent extraction for detecting non-steroidal anti-inflammatory drugs in horse feces. **J Anal Toxicol**, v. 30, n. 5, p. 323-330, 2006.
- POUNDER, D. J.; HARTLEY, A. K.; WATMOUGH, P. J. Postmortem redistribution and degradation of dothiepin. Human case studies and an animal model. **Am J Forensic Med Pathol,** v. 15, n. 3, p. 231-235, 1994.
- PROENCA, P. et al. UPLC-MS/MS determination in blood of a mixed-drug fatal intoxication: a case report. **Forensic Sci Int,** v. 227, n. 1-3, p. 85-89, 2013.
- RAY, W. A. et al. Cyclic antidepressants and the risk of sudden cardiac death. **Clin Pharmacol Ther,** v. 75, n. 3, p. 234-241, 2004.
- REIS, M. et al. Reference concentrations of antidepressants. A compilation of postmortem and therapeutic levels. **J Anal Toxicol**, v. 31, n. 5, p. 254-264, 2007.
- RICHELSON, E. Pharmacology of antidepressants. **Mayo Clin Proc,** v. 76, n. 5, p. 511-527, 2001.
- _____. Interactions of antidepressants with neurotransmitter transporters and receptors and their clinical relevance. **J Clin Psychiatry**, v. 64 Suppl 13, p. 5-12, 2003.
- RICHTER, B. E. Extraction of hydrocarbon contamination from soils using accelerated solvent extraction. **J Chromatogr A**, v. 874, n. 2, p. 217-224, 2000.
- RIETJENS, S. J. et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA): interindividual differences due to polymorphisms and drug-drug interactions. **Crit Rev Toxicol,** v. 42, n. 10, p. 854-876, 2012.
- ROBERTSON, M. D.; DRUMMER, O. H. Postmortem distribution and redistribution of nitrobenzodiazepines in man. **J Forensic Sci**, v. 43, n. 1, p. 9-13, 1998.
- RODDA, K. E.; DRUMMER, O. H. The redistribution of selected psychiatric drugs in post-mortem cases. **Forensic Sci Int,** v. 164, n. 2-3, p. 235-239, 2006.
- ROOSE, S. P. Considerations for the use of antidepressants in patients with cardiovascular disease. **Am Heart J, v.** 140, n. 4 Suppl, p. 84-88, 2000.
- _____. Depression, anxiety, and the cardiovascular system: the psychiatrist's perspective. **J Clin Psychiatry**, v. 62 Suppl 8, p. 19-22; discussion 23, 2001.

- _____. Treatment of depression in patients with heart disease. **Biol Psychiatry**, v. 54, n. 3, p. 262-268, 2003.
- RUDORFER, M. V.; POTTER, W. Z. Metabolism of tricyclic antidepressants. **Cell Mol Neurobiol,** v. 19, n. 3, p. 373-409, 1999.
- SAMPSON, S. M. Treating depression with selective serotonin reuptake inhibitors: a practical approach. **Mayo Clin Proc**, v. 76, n. 7, p. 739-744, 2001.
- SÃO PAULO (ESTADO). LEI Nº 10.095, DE 3 DE MAIO DE 1968. **Diário Oficial do Estado de São Paulo**, 1968.
- SASAJIMA, Y. et al. Simultaneous Determination of Antidepressants by Non-aqueous or Quasi-non-aqueous Capillary Electrophoresis. **Analytical Sciences**, v. 26, p. 693-698, 2010.
- SCHILDKRAUT, J. J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. **Am J Psychiatry**, v. 122, n. 5, p. 509-522, 1965.
- SHEN, J.; SHAO, X. A comparison of accelerated solvent extraction, Soxhlet extraction, and ultrasonic-assisted extraction for analysis of terpenoids and sterols in tobacco. **Anal Bioanal Chem,** v. 383, n. 6, p. 1003-1008, 2005.
- SHEPHERD, M. F.; LAKE, K. D.; KAMPS, M. A. Postmortem changes and pharmacokinetics: review of the literature and case report. **Ann Pharmacother,** v. 26, n. 4, p. 510-514, 1992.
- SHORE, P. A.; SILVER, S. L.; BRODIE, B. B. Interaction of reserpine, serotonin, and lysergic acid diethylamide in brain. **Science**, v. 122, n. 3163, p. 284-285, 1955.
- SHORTER, E. A History of Psychiatry: From the Era of the Asylum to the Age of Prozac. Wiley, 1998.
- SILVA, B. J.; LANCAS, F. M.; QUEIROZ, M. E. Determination of fluoxetine and norfluoxetine enantiomers in human plasma by polypyrrole-coated capillary in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-fluorescence detection. **J Chromatogr A, v.** 1216, n. 49, p. 8590-8597, 2009.
- SILVA, P. Farmacologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.
- SPINA, E.; SCORDO, M. G.; D'ARRIGO, C. Metabolic drug interactions with new psychotropic agents. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 17, n. 5, p. 517-538, 2003.
- SPROULE, B. A. et al. Selective serotonin reuptake inhibitors and CNS drug interactions. A critical review of the evidence. **Clin Pharmacokinet**, v. 33, n. 6, p. 454-471, 1997.

STAHL, S. M. Mechanism of action of serotonin selective reuptake inhibitors. Serotonin receptors and pathways mediate therapeutic effects and side effects. **J Affect Disord**, v. 51, n. 3, p. 215-235, 1998.

STIAKAKIS, I. et al. Disputed case of homicide by smothering due to severe amitriptyline intoxication of the victim. **J Forensic Leg Med,** v. 16, n. 5, p. 280-283, 2009.

STOKES, P. E.; HOLTZ, A. Fluoxetine tenth anniversary update: the progress continues. **Clin Ther,** v. 19, n. 5, p. 1135-1250, 1997.

SWGTOX, S. W. G. F. F. T. Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) standard practices for method validation in forensic toxicology. **J Anal Toxicol**, v. 37, n. 7, p. 452-474, 2013.

TAYLOR, C. et al. Mechanisms of action of antidepressants: from neurotransmitter systems to signaling pathways. **Cell Signal**, v. 17, n. 5, p. 549-557, 2005.

THANACOODY, H. K.; THOMAS, S. H. Tricyclic antidepressant poisoning : cardiovascular toxicity. **Toxicol Rev,** v. 24, n. 3, p. 205-214, 2005.

VERMEULEN, T. Distribution of paroxetine in three postmortem cases. **J Anal Toxicol**, v. 22, n. 6, p. 541-544, 1998.

VETULANI, J.; NALEPA, I. Antidepressants: past, present and future. **Eur J Pharmacol**, v. 405, n. 1-3, p. 351-363, 2000.

WALKER, V.; MILLS, G. A. Solid-phase extraction in clinical biochemistry. **Ann Clin Biochem,** v. 39, n. Pt 5, p. 464-477, 2002.

WHITTINGTON, C. J. et al. Selective serotonin reuptake inhibitors in childhood depression: systematic review of published versus unpublished data. **Lancet,** v. 363, n. 9418, p. 1341-1345, 2004.

WHO, World Health Organization - The 20th anniversary of world mental health day. 2013. Disponível em: < http://www.who.int/mediacentre/news/notes/2012/mental_health_day_20121009/en/ Acessado em 31/01/2015.

WIEGAND, T. J. et al. The Toxicology Investigators Consortium Case Registry--the 2011 experience. **J Med Toxicol**, v. 8, n. 4, p. 360-377, 2012.

YAREMA, M. C.; BECKER, C. E. Key concepts in postmortem drug redistribution. **Clin Toxicol (Phila)**, v. 43, n. 4, p. 235-241, 2005.

YILDIZ A; GÖNÜL A; L, T. Mechanism of actions of antidepressants: beyond the receptors. **Bulletin of Clinical Psychopharmacology**, v. 12, n. 4, p. 194-200, 2002.

<u>Anexos</u>



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO

Parecer CEP/FCF/134/2009 Protocolo CEP/FCF/526 CAAE: 0026.018.015-09

I - Identificação:

Projeto de Pesquisa: Redistribuição postmortem de substâncias psicoativas em tecidos

biológicos humanos

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Maurício Yonamine Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP

Área Temática Especial: -Patrocinadores: FAPESP

II - Sumário Geral do Protocolo:

A concentração de agentes tóxicos encontrada em amostras postmortem é complexa e afetada não só pela condição de deterioração do corpo, mas também por um processo conhecido como redistribuição postmortem, em que substâncias são transferidas, após a morte, de áreas de alta concentração para áreas de baixa concentração. Em geral, concentrações mais elevadas são encontradas no sangue situado nos sítios centrais (como o sangue coletado da cavidade cardíaca) em comparação aos níveis verificados nos vasos periféricos (como a veia femoral). Em outros casos, o tempo entre a morte e o exame postmortem é suficiente para que algumas substâncias que normalmente estariam presentes no sangue não estejam mais disponíveis neste fluido biológico. Exemplos incluem corpos exumados, casos de suicídio em que se levaram dias para encontrar o corpo e cadáveres já em processo de decomposição. Assim, quando amostras sanguíneas não estão disponíveis para coleta, os médicos legistas têm poucas alternativas além de coletar amostras de tecidos não convencionais, para análise toxicológica. Nesses casos, para interpretação dos resultados das análises, é fundamental que existam na literatura científica informações a respeito. Infelizmente, tais informações ainda são escassas e há necessidade de mais estudos sobre esse assunto. Desta forma, no presente projeto, será estudada a redistribuição postmortem de substâncias psicoativas (cocaína, opiáceos e barbitúricos) através da análise de espécimes biológicos (sangue, humor vítreo, encéfalo, músculo, fígado e medula óssea) coletados de vítimas atendidas pelo Instituto Médico Legal de São Paulo (IML-SP). Métodos analíticos serão desenvolvidos visando a detecção dessas substâncias nas diversas amostras citadas. Inicialmente, técnicas mais recentes de preparação de amostras como a extração acelerada por solvente (ASE) e a microextração em fase líquida (LPME) serão levadas em consideração. Os analitos serão identificados por cromatografia em fase-gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). Os resultados serão avaliados quanto às concentrações encontradas, histórico da vítima e tempo decorrido entre a morte e autópsia (coleta de amostras).

Os objetivos do presente estudo são: o desenvolvimento e aplicação de métodos de identificação de substâncias psicoativas (cocaína, opiáceos e barbitúricos) em amostras postmortem (sangue, humor vítreo, encéfalo, fígado e medula óssea). Serão avaliadas as



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS Comitê de Ética em Pesquisa

técnicas de microextração em fase líquida (LPME) e extração acelerada por solvente (ASE). Os analitos serão identificados e quantificados por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).

Tipo de estudo: transversal Descrição da Casuística:

Amostras biológicas postmortem serão coletadas de cerca de 50 cadáveres atendidos no Instituto Médico Legal de São Paulo com histórico de morte suspeita com envolvimento das substâncias psicoativas de interesse (cocaína, morfina e fenobarbital). Esse número foi baseado na quantidade de casos analisados em trabalhos semelhantes reportados na literatura, os quais utilizam cerca de 9 a 13 casos por substância (LUCKENBILL et al., 2008; RODDA & DRUMMER, 2006).

Os critérios de inclusão dos participantes são: pessoas de ambos os sexos, idade acima de 18 anos, com suspeita de que houve uso das substâncias psicoativas de interesse ou que a morte tenha ocorrido devido ao uso dessas substâncias.

Os critérios de exclusão são: pessoas com idade inferior a 18 anos ou sem histórico de uso das substâncias mencionadas.

Projeto com participação estrangeira (Centro de Ciências Forenses da Universidade de Bournemouth, Reino Unido).

III - Situação do Protocolo: APROVADO em reunião de 28/10/2009.

O pesquisador deverá aguardar a aprovação do presente protocolo da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, antes de iniciar a pesquisa.

Cabe ao pesquisador:

- Comunicar ao CEP:
 - eventuais modificações no projeto aguardando a apreciação e aprovação do CEP;
 - a interrupção do projeto.
- Apresentar relatórios: parcial (após 50% da execução do projeto) e final.

São Paulo, 29 de outubro de 2009.

Profa. Dra. Élvira Maria Guerra Shinohara Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa CEP/FCF/USP

weccashino la a



COMISSÃO DE PESQUISA PARA ANÁLISE DE PROJETOS DE **PESQUISA**

DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA - FMUSP

PARECER DO RELATOR

Projeto: Distribuição postmortem de substâncias psicoativas em tecidos biológicos humanos Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Vilma Leyton Pesquisador Executante:

Projeto 0352/09

Trata-se de projeto previamente aprovado pela CONEP (parecer no. 830/2009) que visa o estabelecimento da distribuição de drogas no organismo após a morte permitindo, assim, que os legistas possam valorar as concentrações que encontram nos diversos tecidos. Este projeto será desenvolvido em cooperação entre o Laboratório de Toxicologia do Departamento de Medicina Legal, Ética Médica, e Medicina Social da FMUSP, o Instituto Médico Legal, e o Centro de Ciências Forenses da Universidade de Bournemouth (Reino Unido).

Há, ainda, adendo datado de abril/2011, solicitando a inclusão da Profa. Thais Mauad, e sua declaração de concordância em participar como colaboradora, datada de 20 de abril de 2011, razão pela qual o projeto passa por esta Comissão de Pesquisa; inclusão de amostras a serem coletadas a partir de casos de óbitos provenientes do HC/FMUSP, que também ocorrerão, conforme a mesma declaração, sob responsabilidade da Profa. Mauad.

Considerando a relevância do projeto para o esclarecimento de mortes em que exista suspeita do uso de drogas, tendo-se em vista a análise favoravel e anterior da CONEP, e que a solicitação para o adendo apenas inclui o acesso a novas fontes de material sob responsabilidade de docente efetivo deste departamento, recomenda-se a ratificação do presente pedido para o devido andamento do projeto.

SP. 27/05/2011

Ciência:

Profa. Dra. Marisa Dolhnikoff Presidente da Comissão de Pesquisa Departamento de Patologia - FMUSP

APROVADO NA 🔫 SS REULIÃO DO CONSELUD LO DEPARTMENTO DE PATOLOGIA DA FMUSP

Circle de Dapaytamente

四15/5



Hospital das Clínicas da FMUSP Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa CAPPesq

Nº Protocolo: 0352/09

Título: DISTRIBUIÇÃO POSTMORTEM DE SUBSTÂNCIAS PSICOATIVAS EM

TECIDOS BIOLÓGICOS HUMANOS

Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Vilma Leyton

Pesquisador Executante: Victor Alexandre Percinio Gianvecchio

Departamento: MEDICINA LEGAL, ÉTICA MÉDICA, SOCIAL E MEDICINA DO

TRABALHO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA** na sessão datada de 17/08/2011, do(s) documento(s) abaixo mencionado(s):

•Carta datada de 12/06/11 - Il Adendo ao Projeto de junho de 2011

A CAPPesq em obediência à Resolução CNS 196/96, solicita ao pesquisador (a) s elaboração de relatório parcial e final.

No caso de relatório parcial é necessário informar o tempo previsto para a conclusão do protocolo e breve resumo dos resultados obtidos.

CAPPesq, 19 de Agosto de 2011

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO

Coordenador Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq



APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 03/06/2009, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº 0352/09, intitulado: "DISTRIBUIÇÃO POSTMORTEM DE SUBSTÂNCIAS PSICOATIVAS EM TECIDOS BIOLÓGICOS HUMANOS", apresentado pelo Departamento de MEDICINA LEGAL, ÉTICA MÉDICA, MEDICINA SOCIAL E DO TRABALHO, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Informamos que tendo em vista tratar-se de pesquisa com cooperação estrangeira a mesma só poderá ser iniciada após aprovação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa-CONEP.

Pesquisadores Responsáveis: PROFA. DRA. VILMA LEYTON

Pesquisador (a) Executante: VICTOR ALEXANDRE PERCINIO GIANVECCHIO

CAPPesq, 03 de junho de 2009.

8-4-

PROF. DR. EDUARDO MASSAD Presidente Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo — SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

matc

1



PARECER CONSUBSTANCIADO - CAPPESQ - HCFMUSP

Título: Distribuição postmortem de substâncias psicoativas em tecidos biológicos humanos

Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Vilma Leyton

Instituição onde será realizada: Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – Departamento de Medicina Legal, Ética Médica, Medicina Social e do Trabalho

Área Temática: Pesquisa com Cooperação Estrangeira

PROTOCOLO CAPPESQ Nº 0352/09

Neste estudo será estudada a distribuição postmortem de drogas psicoativas em tecidos humanos obtidos nas situações em que foram utilizadas pela vitima ou houve suspeita de que contribuíram para a morte.

O presente estudo propõe a investigação de como as concentrações das substâncias psicoativas (opiáceos, cocaína, barbitúricos e outras drogas de interesse médico legal, bem como seus produtos de biotransformação) em tecidos não convencionais (humor vítreo, músculo, encéfalo, fígado, cabelo e osso) estão relacionadas às concentrações das mesmas em amostra convencional (sangue). Para tal, será desenvolvida metodologia analítica utilizando a técnica de imunoensaio "Biochip Array".

As amostras biológicas serão coletadas de cadáveres examinados no Instituto de Medicina Legal de São Paulo, com autorização do responsável havendo autorização da Comissão Científica do Instituto Médico Legal.

A pesquisa contará com a colaboração de um pesquisador do Centro de Ciências Forenses da Universidade de Bournemouth do Reino Unido e de outro da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

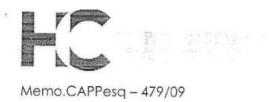
O estudo é original e de grande relevância no nosso meio, pois poderrá contribuir para o esclarecimento das causas duvidosas de morte e reduzir as causas classificadas pelo CID como mal definidas.

Foi apresentado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que se encontra adequado para a pesquisa.

Diante do exposto a CAPPesq de acordo com as atribuições definidas na Res. 196/96 manifesta-se pela aprovação do projeto.

6-4

PROF. DR. EDUARDO MASSAD Presidente da Comissão Ética para Análise de Projetos de Pesquisa 03.06.09



São Paulo, 01 de Dezembro de 2009.

Ilma. Sra.
Profa. Dra. Vilma Leyton
DD Pesquisador
Departamento de Medicina Legal, Ética Médica, Medicina Social e do
trabalho

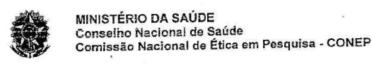
Por determinação do Senhor Presidente Prof. Dr. Eduardo Massad, encaminhamos para conhecimento cópia do parecer nº 830/2009, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP/MS referente à <u>APROVAÇÃO</u> do Protocolo de Pesquisa nº 0352/09 – intitulado "Distribuição postmortem de substâncias psicoativas em tecidos biológicos humanos".

<u>Trata-se de parecer referente resposta às considerações feitas ao Parecer</u>

<u>CONEP nº 598/2009</u>.

Atenciosamente,

Rita Martinez Secretária Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq



PARECER Nº 830/09

Registro CONEP 15490 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

CAAE - 0327.0.015.000-09

Processo nº 25000.517980/2009-87

Projeto de Pesquisa: "Distribuição postmortem de substâncias psicoativas em tecidos

biológicos humanos". Pesquisador Responsável: Dra. Vilma Leyton

Instituição: HCFMUSP - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da

Universidade de São Paulo (CENTRO ÚNICO)

CEP de origem: HCFMUSP

Área Temática Especial: Pesquisa com cooperação estrangeira

Patrocinador: Não informado.

Sumário geral do protocolo

Quando as substâncias químicas são introduzidas no organismo por vias convencionais de administração - oral, parenteral ou inalatória, se distribuem nos tecidos, onde podem exercer ação farmacológica e, subsequentemente, sofrerem processo de

biotransformação para serem eliminadas.

A incidência de morte associada ao uso de substâncias psicoativas é um problema que vem crescendo nos últimos anos e, muitas vezes, os toxicologistas são convocados por autoridades para auxiliar na interpretação de resultados de análises toxicológicas que são realizadas para auxiliar no estabelecimento da causa de morte, o que representa um grande desafio para esses profissionais. As amostras biológicas mais comumente coletadas durante a autópsia para análise toxicológica são sangue, urina e conteúdo estomacal. Nos casos em que sangue e urina estejam indisponíveis para análise, o patologista deve fazer uso de espécimes menos convencionais, como humor vítreo e tecido muscular, entre outros.

A coleta de amostras postmortem é complexa e comprometida não só pela condição de deterioração do corpo, mas também por um processo conhecido como distribuição postmortem, em que substâncias são transferidas, após a morte, de áreas de alta concentração para áreas de baixa concentração. Em diversos casos, o tempo entre a morte e o exame postmortem é suficiente para que algumas substâncias que normalmente estariam presentes no sangue, por exemplo, não estejam mais disponíveis neste fluído biológico. Exemplos incluem corpos exumados, casos de suicídio em que houve transcurso de vários dias para encontrar o corpo e, o mesmo encontra-se em processo de decomposição.

Assim, quando amostras sanguíneas não estejam disponíveis para coleta, os médicos legistas têm poucas alternativas além de coletar amostras de tecidos não convencionais, para análise toxicológica. Nesses casos, para interpretação dos resultados das análises, é fundamental que existam na literatura científica informações a respeito. Infelizmente, tais informações ainda são escassas e há necessidade de mais estudos sobre esse assunto.

O presente estudo propõe a investigação de como as concentrações das substâncias em estudo (Cannabis, opiáceos, anfetamínicos e benzodiazepinicos bem Larry selle prod for the immigration of the decisions in the son and one a first the contract of the contract

SIM TO THE PROPERTY OF A STATE OF

Cont. Parecer CONEP nº 830/2009

convencional (sangue) e quão sólida é esta relação para que possa prover informações válidas na investigação toxicológica.

O objetivo deste estudo é o de "desenvolver metodologia analítica, utilizando a técnica de imunoensaio "Biochip Array" da empresa Randox, para verificação da presença de substâncias psicoativas em materiais biológicos não convencionais, coletados de cadáveres; e estudar a distribuição postmortem de cocaína, barbitúricos, opióldes, e outras drogas de interesse forense em tecidos biológicos humanos coletados nos casos em que foram utilizadas pela vítima ou houve suspeita de que contribulram como fator de causa de morte".

Serão coletadas amostras de sangue, músculo da panturrilha, humor vítreo, fragmento de costela, figado, cabelo e encéfalo de cadáveres em que exista a suspeita de que houve uso das substâncias psicoativas em estudo ou que a morte tenha ocorrido devido ao uso dessas substâncias. A quantidade de tecido a ser removido do cadáver será limitada a pequenas porções suficientes para os procedimentos analíticos. As coletas dos materiais serão realizadas pelos médicos legistas do IML de São Paulo envolvidos no

As amostras que apresentarem resultados positivos para qualquer um dos grupos de drogas nos testes de triagem serão analisadas quantitativamente e estudada as suas redistribuições nos diversos tecidos por meio da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-MS) ou da Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (CLAD) para os estudos de distribuição postmortem.

Local de realização

Trata-se de um projeto nacional e unicêntrico, com colaboração estrangeira. Além do Brasil, o Reino Unido participará do estudo. Haverá colaboração entre o Centro de Ciências Forenses, Universidade de Bournemouth, do Reino Unido, e o Instituto Médico Legal de São Paulo da Universidade de São Paulo. É apresentado documento de aprovação do Comitê de Ética da Universidade de Bournemouth, do Reino Unido (páginas 23-24, numeração do CEP).

O número total de sujeitos de pesquisa é de 50, todos no centro em teia. Os Laboratórios da Universidade de São Paulo que participarão da pesquisa serão o Laboratório de Toxicologia do Departamento de Medicina Legal, Ética Médica e Medicina Social e do Trabalho da FMUSP e o Laboratório de Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

Apresentação do protocolo

O orçamento financeiro detalhado (página 26, numeração do CEP) apresenta o valor de custo total do estudo previsto em R\$ 71.500,00 e é declarado que o projeto será submetido à apreciação da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo -FAPESP. Além disso, na página 11 (numeração do CEP) é informado que as análises necessárias para o desenvolvimento do projeto serão realizadas no Centro de Ciências Forenses da Universidade de Bournemouth por meio de suporte financeiro préprio.

Foram apresentados os endereços eletrônicos para acesso dos currículos dos

pesquisadores brasileiros envolvidos no estudo (página 25, numeração do CEP).

É apresentada autorização da Comissão Científica do Instituto Médico Legal, datada de 24/04/2008, para realização do estudo em tela (página 14, numeração do CEP).

Consta um "Termo de Consentimento para coleta de tecidos", bastante conciso, que será apresentado e devidamente assinado por familier responsávei que guarde carentesco direio com o islecido, sulcho de posquise (páginas 17-19, numeração do Cont. Parecer CONEP nº 830/2000

Considerações sobre a análise das respostas ao Parecer CONEP № 598/2009, relativo so projeto de pesquisa em questão:

1. O estudo reveste-se de grande relevância, pois poderá contribuir para o esclarecimento de causas duvidosas de inúmeras mortes, atualmente catalogadas como "mal definidas". Porém, é necessário que seja estruturado um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) uma vez que serão utilizados cadáveres para fins científicos, obedecendo aos itens contemplados na Resolução CNS 198/98 (item IV.1."a", "b", "f", "g", "h" e "i" e item IV.2."a", "b", "c" e "d"). Cabe lembrar que o TCLE é um documento no qual o pesquisador comunica, ao responsável o possível sujeito, como será a pesquisa para a qual está sendo convidado, fornecendo a ele (a) todos os esclarecimentos necessários para decidir livremente sa quer participar ou não. Solicita-se, portanto, a apresentação de um TCLE tendo como referencia o capítulo IV da Resolução CNS 196/96: em linguagem clara e acessível, descrevendo claramente a justificativa, os objetivos. os procedimentos, os desconfortos e riscos possíveis, os benefícios esperados, os métodos alternativos existentes, a forma de acompanhamento e assistência bem como seus responsáveis, a garantia de sigilo, as formas de ressarcimento de despesas decorrentes da participação na pesquisa, formas de indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa. Solicita-se adequação.

Resposta: Foi elaborado e apresentado novo TCLE atendendo adequadamente à

solicitação da CONEP.

Análise: Pendência atendida.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, de acordo com as atribulções definidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protosolo aprovado.

Brasilia, 20 de novembro de 2009.

Gyselle Saddi Tannous Coordanadora da CONEP/CNS/MS

Comissão de Élica para Análisa de

Projeto de Pesouisa Californi infrast

3/3

dsfir



APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 07/10/2009, APROVOU o(s) documento(s) abaixo mencionado(s) no Protocolo de Pesquisa nº 0352/09, intitulado: "DISTRIBUIÇÃO POSTMORTEM DE SUBSTÂNCIAS PSICOATIVAS EM TECIDOS BIOLÓGICOS HUMANOS" apresentado pelo Departamento de ME DICINA LEGAL, ÉTICA MÉDICA, MEDICINA SOCIAL E DO TRABALHO.

 Resposta do pesquisador responsável ao do Parecer CONEP 598/09 datado de 28.08.09 – Estruturação de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Pesquisador (a) Responsável: Profa. Dra. Vilma Leyton

CAPPesq, 07 de Outubro de 2009

Prof. Dr. Eduardo Massad Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

The same

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovidio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO SERVIÇO DE VERIFICAÇÃO DE ÓBITOS DA CAPITAL

Manifestação prévia a respeito dos aspectos técnicos relacionados á obtenção de material de estudo para pesquisa científica

Título da Pesquisa: Distribuição postmortem de substâncias psicoativas em tecidos biológicos humanos

Pesquisador Executante: Saskia Carolina Seulin, Rafael Menck de Almeida, Marcelo Filonzi dos Santos, Livia Rentas Sanches e Victor Alexandre Percinio Gianvecchio

Pesquisador Responsável: Prof. Dra. Vilma Leyton, Prof. Dr. David Osselton e Prof. Dr. Mauricio Yonamine

Em relação aos aspectos técnicos relacionados à obtenção de material de estudo para pesquisa científica mencionada acima, informamos não haver impedimento do ponto de vista técnico e nem risco de mutilação.

São Paulo, 23 de março de 2011.

Prof. Dr. Carlos Augusto Pasqualucci Diretor SVOC-USP



APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 20/04/2011, APROVOU o(s) documento(s) abaixo mencionado(s) referente ao Protocolo de Pesquisa nº 0352/09, intitulado: "DISTRIBUIÇÃO POSTMORTEM DE SUBSTÂNCIAS PSICOATIVAS EM TECIDOS BIOLÓGICOS HUMANOS" apresentado pelo Departamento de MEDICINA LEGAL, ÉTICA MÉDICA E MEDICINA SOCIAL E DO TRABALHO

Carta datada de 31/03/2011-adendo ao projeto de pesquisa

Comentário do relator (a): Trata-se de protocolo em andamento que solicita a aprovação de adendo ao projeto de pesquisa. Houve ainda a inclusão de manifestação do Diretor do SVOC-USP informando não haver impedimentos do ponto de vista técnico e tampouco risco de mutilação dos cadáveres incluídos na pesquisa. Com relação ao adendo houve solicitação dos seguintes itens: inclusão de novo serviço colaborador da pesquisa, a saber, o Serviço de Verificação de Óbitos da Capital — USP, e dois pesquisadores desse serviço (Dr. Carlos Augusto Pasqualucci e Dr. Reinaldo Ayer de Oliveira). Esta inclusão justifica a manifestação favorável à pesquisa do Diretor do SVOC-USP; inclusão de outros cinco pesquisadores executantes (alunos de pós-graduação e de aprimoramento técnico). Foi mencionado que três alunos (dois doutorandos e um mestrando) estão recebendo bolsa de agências de fomento, e existe um aprimorando com bolsa de treinamento técnico da FAPESP. Tendo em vista a grande quantidade de trabalho de bancada dessa pesquisa, existe necessidade real de incremento dos recursos humanos para o preparo das amostras e realização dos testes; inclusão de outras duas classes de fármacos na pesquisa (barbitúricos e antidepressivos) na lista de substâncias psicoativas de interesse. Os barbitúricos já haviam sido incluídos na pesquisa inicial. Considerando que não haverá necessidade de maior quantidade de material biológico, ou da coleta de

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP da Diretoria Clinica do Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovidio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo – SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br

outros tipos de amostras, a pesquisa dessas duas classes de fármacos, que são de fato muito utilizados, poderá trazer benefícios à pesquisa. Também é importante salientar que a investigação dessas duas categorias suplementares não utilizará metodologia laboratorial distinta daquela já detalhada na pesquisa; atualização da seção de material e métodos no item que se refere à coleta de urina, com inclusão de um imunoensaio comercial. Esta etapa de triagem será benéfica ao andamento da pesquisa; informação sobre a obtenção de auxílio à pesquisa, além de duas bolsas de doutorado e uma de apoio técnico da FAPESP, além de uma bolsa de mestrado do CNPq. O outorgado é um dos colaboradores da pesquisa. Dr. Maurício Yonamine, docente da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

Pesquisador (a) Responsável: Profa. Dra. Vilma Leyton

Pesquisador (a) Executante: Alexandre Percinio Gianvecchio

CAPPesq, 20 de Abril de 2011

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO Coordenador

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEI LEGAL
1. NOME: .:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE №:
2.RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) Documento de Identidade:
Data de nascimento://
Endereço:
Bairro: Cidade:
CEP: Telefone: ()
DADOS SOBRE A PESQUISA
1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA Distribuição postmortem de substâncias psicoativas em tecidos biológicos humanos
PESQUISADORA: Profa. Dra. Vilma Leyton
CARGO/FUNÇÃO: Professora Doutora
INSCRIÇÃO NO CONSELHO REGIONAL CRF-8 N° 6.108
UNIDADE DA FMUSP: Departamento de Medicina Legal, Ética Médica e Medicina Social e do Trabalho – Instituto Oscar Freire.

RISCO MÍNIMO	X	RISCO MÉDIO	
RISCO BAIXO		RISCO MAIOR	

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 12 meses

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Essas informações estão sendo fornecidas para explicar ao Sr. (Sra) quais são os objetivos desta pesquisa e solicitar autorização para que sejam coletadas amostras de seu familiar falecido para uma pesquisa que está sendo feita por pesquisadores da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Existem substâncias que são chamadas psicoativas que fazem parte de remédios e de drogas que se forem usadas pelas pessoas em grandes quantidades, podem causar a morte. Os médicos legistas ainda não sabem como essas substâncias ficam em cada órgão e essa pesquisa vai ajudar os médicos a dar um atestado de óbito correto.

Essa pesquisa tem como objetivo estudar essas substâncias psicoativas em alguns órgãos do corpo. É muito importante, pois poderá ajudar o médico legista esclarecer as causas de mortes que são difíceis de diagnosticar, pois muitas vezes, só examinando o corpo não é suficiente e é necessário também fazer exames de laboratório.

Agora vamos explicar ao Sr. (Sra) como será feita a pesquisa:

Quando o médico estiver examinando os órgãos de dentro do corpo, ele vai separar pedacinhos de 1 centímetro de alguns órgãos (cérebro, osso e músculo) além de sangue e humor vítreo e colocar em frascos que vão ser identificados só por números e não com o nome. Esses materiais vão ser levados para o laboratório e colocados na geladeira para depois serem analisados.

Essa coleta de material não vai causar dano estético (marcas, cicatrizes) para o corpo do seu parente.

Espera-se que esta pesquisa possa beneficiar no futuro muitas famílias que poderão ter os laudos da autópsia com a causa da morte bem definida, não só no Brasil como também em outros países. Esses tipos de estudos ainda são muito raros no mundo inteiro.

Em qualquer etapa da pesquisa, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra. Vilma Leyton que pode ser encontrada na Av. Dr. Arnaldo, 455, Cerqueira Cesar - São Paulo - SP, CEP: 01246-903 Fone: (11) 3061-8414. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) - Rua Ovídio Pires de Campos, 225 - 5º andar - tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramai 26 - E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

Esclarecemos que você terá a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo.

Garantimos que o seu parente não será identificado em nenhum momento e que o Sr. (Sra.) poderá ter acesso aos resultados dos exames.

Os pesquisadores se comprometem a utilizar os dados e os materiais coletados do teu parente somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Distribuição postmortem de substâncias psicoativas em tecidos biológicos humanos" Eu discuti com a Dra. Vilma Leyton sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento.

Assinatura do representante legal	Data	,	1	

(Somente para o responsável do projeto	2)			
Declaro que obtive de forma apropriada	e volun	tária o	Consentimento Livre	9
Esclarecido do representante legal para	a partic	ipação	neste estudo.	
			-	
Assinatura do responsável pelo estudo I	Data _	1	1	

Premiações



Certificamos que o trabalho: DETERMINAÇÃO DE ANTIDEPRESSIVOS EM AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL POR LPME E GC-MS de autoria de MARCELO FILONZI SANTOS; CAIO CALEIRAS FERRI; SASKIA CAROLINA SEULIN*; CARLOS AUGUSTO GONÇALVES PASQUALUCCI e MAURÍCIO YONAMINE, obteve o 2º Lugar na Modalidade Pôster no Congressos Genival Veloso de França 2012, no período de 19 a 21 de setembro de 2012.

Fortaleza - CE, 21 de setembro de 2012.





Ribeirão Preto - SP 30 de setembro a 03 de outubro de 2012

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho

DETERMINAÇÃO DE ANTIDEPRESSIVOS EM SANGUE TOTAL POR HF-LPME E GC-MS dos autores Marcelo Filonzi dos Santos, Caio Caleiras Ferri, Saskia C.Seulin, Vilma Leyton, Carlos Augusto G.Pasqualucci, Mauricio Yonamine.

obteve o 3º Lugar na categoria pôster no 3º Encontro Nacional de Química Forense – ENQFor promovido pelo Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP/USP).

Ribeirão Preto, 30 de setembro de 2012.

Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis

Presidente do 3º ENDEor

Dr. Hélio Buchmüller Lima

Presidente da APCF

<u>Publicação</u>

JAPT

ORIGINAL ARTICLE

Determination of antidepressants in whole blood using hollow-fiber liquid-phase microextraction and gas chromatography—mass spectrometry

Marcelo Filonzi dos Santos · Caio Caleiras Ferri · Saskia Carolina Seulin · Vilma Leyton · Carlos Augusto Gonçalves Pasqualucci · Daniel Romero Muñoz · Mauricio Yonamine

Received: 14 January 2014/Accepted: 6 February 2014 © Japanese Association of Forensic Toxicology and Springer Japan 2014

Abstract A hollow-fiber liquid-phase microextraction (HF-LPME), used in three-phase mode, and combined with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), was developed to quantify antidepressants and their major metabolites (amitriptyline, nortriptyline, imipramine, desipramine, clomipramine, desmethylclomipramine, fluoxetine, and norfluoxetine) in whole blood samples, using their deuterated analogs as internal standards. The HF-LPME system comprised a disposable 8-cm polypropylene porous hollow fiber, 4.0 ml of sample solution (0.5 ml of blood added to 3.5 ml of 0.1 M NaOH: donor phase), dodecane (organic phase), and 0.1 M formic acid (acceptor phase) for extraction. After stirring the system, the acceptor phase was evaporated under a nitrogen stream and resuspended in 30 µl of methanol. Derivatization was not required. A 2.0μl aliquot of this solution was injected into a GC-MS system. The method was validated after the optimization of several parameters that may influence the extraction efficiency. The limits of quantification for all antidepressants were below the therapeutic levels (20.0 ng/ml). The average intraday and interday precisions were within 9.7 and 9.8 %, respectively, for all analytes. The calibration curves were linear in the concentration range of 20-1,200 ng/ml.

M. F. dos Santos (⊠) · C. C. Ferri · M. Yonamine Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Av. Professor Lineu Prestes, 580 13B, São Paulo, SP 05508-000, Brazil e-mail: filonzi@usp.br

S. C. Seulin · V. Leyton · D. R. Muñoz Faculty of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

C. A. G. Pasqualucci
 Death Verification Service, University of São Paulo, São Paulo,
 Brazil

Published online: 26 February 2014

The developed method was applied to seven actual postmortem samples. Tricyclic antidepressants were detected in all of the analyzed cases. To our knowledge, this is the first demonstration of usefulness of HF-LPME for analysis of antidepressants in postmortem forensic cases.

 $\begin{tabular}{ll} \textbf{Keywords} & Hollow-fiber liquid-phase microextraction \\ (HF-LPME) & Antidepressants & GC-MS & Whole blood \\ Amitriptyline & Fluoxetine \\ \end{tabular}$

Introduction

Depression, a common mental disorder, is considered to affect about 350 million people around the world. It is one of the most widespread illnesses, often coexisting with other psychiatric conditions. Depression is causing a serious global economic problem because sufferers often lose the ability to work. In addition, depression may ultimately result in suicide [1]. Antidepressant drugs are widely used for the treatment of different types of depression and other psychiatric disorders; these drugs are frequently encountered during emergency toxicology screening and forensic medical examinations [2, 3].

In 2011, the Toxicology Investigators Consortium (ToxIC) of the American College of Medical Toxicology registered intoxication cases at 28 sites in the United States. Pharmaceutical overdoses occurred in 48 % of patients; 37 % were intentional exposures and 11 % were unintentional exposures. Antidepressants were reported in 16 % of the cases [4]. In England and Wales, 5,602 deaths involving antidepressants occurred during the period from 1993 to 2004, accounting for approximately 15 % of all deaths due to poisonings. Of the antidepressants involved, tricyclic antidepressants were most prevalent [5].

