



Ana Isabel Soares Ferreira

Esquizofrenia e Análises Forenses

Desenvolvimento de um método analítico para a quantificação de fármacos psicotrópicos por LC-MS/MS

Mestrado em Química Forense

Departamento de Química

FCTUC

2011



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ana Isabel Soares Ferreira

Esquizofrenia e Análises Forenses

Desenvolvimento de um método analítico para a
quantificação de fármacos psicotrópicos por LC-MS/MS

**Dissertação apresentada para provas de Mestrado em
Química Forense**

Professor Doutor Jorge Luís Gabriel F. S. Costa Pereira

Doutor Bruno José Fernandes Oliveira Manadas

Setembro 2011

Universidade de Coimbra

***“Nada na vida deve ser temido, somente compreendido.
Agora é hora de compreender mais para temer menos!”***

Marie Curie

Agradecimentos

Esta tese de mestrado surge de uma experiência única, que passou pelo patamar profissional, não deixando de lado a componente humana.

A aprendizagem, conhecimento e pesquisa caminham lado a lado, por vezes por caminhos difíceis ... mas surpreendentes!

Nada na vida conquistamos sozinhos. Este trabalho não teria sido possível, sem o apoio, os ensinamentos, a amizade e a dedicação de algumas pessoas. Quero deste modo, expressar a todos aqueles que de muitas formas o fizeram, o meu reconhecimento e sincero agradecimento.

Professor Doutor Jorge Luís Gabriel F. S. Costa Pereira pela orientação, disponibilidade e paciência, e pelos ensinamentos transmitidos.

Doutor Bruno José Fernandes Oliveira Manadas pela oportunidade de realizar este trabalho, por todo os conhecimentos e orientação científica, pela sua disponibilidade e pela perseverança nos *dataclubs* semanais, que tão frutuosos se revelaram.

À Vera Mendes pelo acompanhamento, paciência e disponibilidade.

À minha família, especial aos meus pais, avô, Paula e Inês, pela confiança em mim depositada, pelo apoio em todos os momentos bons e menos bons que a vida académica me proporcionou, mas acima de tudo por todo o apoio incondicional, exemplo de vontade e determinação, não importando a dificuldade encontrada ao longo da minha vida e por me terem dado as asas que me permitiram voar. A vocês devo tudo o que sou!

A todos os meus amigos, “um amigo é um bem”, obrigado pela amizade, pela cumplicidade, pelo carinho, pela paciência, pelas longas conversas, pelo silêncio, o incentivo, os momentos bem passados...obrigado por existirem, por estarem sempre por perto, à distância de um “click” ou do meu “touch”... sem todos vocês teria sido mais difícil.

À Dulce Gabriel, simplesmente obrigada por tudo! Por muito que procurasse nos mais sábios livros, nunca iria encontrar palavras que definissem o quanto és

importante para mim. É reconfortante ter na vida uma amizade com tanta cumplicidade e confiança como a tua, “TChuca sou eu e tu!”.

À Tânia Firmino, pela constante presença, pela disponibilidade, por todos os “tu consegues”, que tantas vezes foram cruciais para continuar a caminhar.

Por fim, aos meus colegas/amigos de laboratório Sandra Anjo (meu lado esquerdo), Cristiana Leite e Sandro Pereira, pela amizade, pelo apoio, pela integração, pelos bons momentos e discussões biológicas.

Objectivo

No trabalho desenvolvido pretende-se analisar a evolução do peso de ratinhos submetidos ao tratamento com diferentes fármacos psicotrópicos (clozapina, citalopram e haloperidol), ao longo de diferentes dias, recorrendo a algumas ferramentas estatísticas. Este trabalho visa também desenvolver um método analítico para a quantificação destes fármacos em tecidos de ratinhos (córtex e plasma), utilizando como ferramenta analítica a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa.

Resumo

A esquizofrenia tem sido descrita como uma das piores doenças que afectam a humanidade, principalmente devido aos efeitos debilitantes que ocorrem ao longo do curso da doença.

O tratamento desta doença passa pela medicação com fármacos psicotrópicos, que quando usados regularmente e de acordo com a prescrição podem ajudar a reduzir e a controlar os sintomas incapacitantes da doença.

No entanto, alguns dos doentes não conseguem obter ajuda considerável a partir do tratamento disponível, devido aos efeitos adversos da medicação psicotrópica. Um desses efeitos desagradáveis, que é objecto de estudo neste trabalho, corresponde ao aumento de peso.

O presente trabalho, centrou-se no estudo e desenvolvimento de uma metodologia analítica por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa – LC-MS/MS, para detecção e quantificação de fármacos psicotrópicos (clozapina, haloperidol e citalopram) em córtex e em plasma de ratinhos sujeitos ao tratamento com estes fármacos. Foi também realizado um estudo sobre os efeitos adversos destes fármacos, através da análise da evolução do peso dos animais submetidos a esta medicação ao longo dos diferentes dias de tratamento.

Os resultados obtidos mostraram que foi possível desenvolver o método para a análise de amostras de córtex e plasma de ratinhos e quantificação dos fármacos em estudo nas amostras de plasma. O método proposto revela-se eficiente, rápido, simples, específico e sensível e, adicionalmente, demonstrou uma boa exactidão e precisão.

Abstract

Schizophrenia has been described as one of the worst diseases affecting the human health, mainly due to the debilitating effects that occur during its development.

The treatment is done through a therapy based on psychotropic drugs, which when used regularly and as prescribed can help in the reducing and control of the disabling symptoms of the disease. However, some patients can not get considerable help from the treatment available, due to the adverse effects of psychotropic medication. One of those unpleasant effects, which is the subject of the present study, corresponds to weight gain.

This work focused on the study and development of an analytical method based on liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS) for detection and quantification of psychotropic drugs (clozapine, haloperidol and citalopram) in the cortex and plasma of mice subjected to treatment with these drugs. It was also carried out a study on the adverse effects of these drugs, by analyzing the evolution of the weight of animals subjected to this medication over the different days of treatment.

The results show that it is possible to develop a method for the analysis of samples of cortex and plasma of mice and quantification of drugs being studied in plasma samples. The proposed methodology proves efficient, revealing that method is rapid, simple, specific and sensitive, and additionally demonstrates good accuracy and precision.

Considerações gerais

Ao longo do documento encontram-se expressões, abreviaturas e imagens em inglês, pelo facto de serem expressões ou abreviaturas de uso comum pela comunidade científica portuguesa.

No sentido de facilitar a transferência e transposição de informação entre a folha de cálculo no qual se procederam ao tratamento dos dados, recorreu-se ao símbolo “.” como separador decimal.

Lista de abreviaturas

$(F_{0.05})$ - Distribuição F de Fisher ao nível de confiança de 95%

s_{pe} - Estimativa da variabilidade puramente aleatória

$\chi^2_{0.01}$ – Valor crítico para um nível de confiança de 99%

$\chi^2_{0.05}$ – Valor crítico para um nível de confiança de 95%

ADTs - Tricyclic antidepressants

ANOVA - Analysis of variance

CE - Collision energy

CI – Citalopram

CL – Clozapina

CRM - Certified reference materials

CT – Controlo

DARI - Dopamine reuptake inhibitor

DC - Direct current

DE – Desipramina

DP – Declustering potential

EPS - Extrapiramidal symptoms

ESI - Electrospray ionization

GC - Gas chromatography

HA – Haloperidol

HA-D4 – Haloperidol-D4

HPLC - High performance liquid chromatography

ICH - International conference on harmonisation

ISO - International organization for standardization

LC - Liquid chromatography

LC-MS - Liquid chromatography – mass spectrometry

LIT - Linear ion trap

LOD - Limit of detection

LOQ - Limit of quantitation

x | Lista de abreviaturas

MAOIs - Monoamine oxidase inhibitors

MRM - Multiple reaction monitoring

MS - Mass spectrometry

p[H₀] – Valor prova

QIT - Quadrupole ion trap

RSE – Relative standard error

SCZ - Schizophrenia

SD - Standard deviation

SNC – Sistema nervoso central

SSRI - Selective serotonin reuptake inhibitor

TEAB - Triethylammonium bicarbonate buffer

TOF -Time-of-flight

TV – Test value

Índice

1. Introdução	3
2. Fundamentação	9
2.1 Esquizofrenia	9
2.1.1 O meio ambiente e a esquizofrenia	10
2.1.2 Características clínicas e conceituação da SCZ	11
2.1.3 Sintomas positivos	12
2.1.4 Sintomas negativos	13
2.1.5 Desorganização do pensamento e do comportamento	13
2.1.6 O suicídio na esquizofrenia	14
2.2 Tratamento farmacológico	15
2.2.1 Mecanismo dos neurotransmissores	16
2.2.2 Inibidor selectivo da recaptação de dopamina	19
2.2.3 Inibidores selectivos da recaptação de serotonina	20
2.2.4 Antidepressivos	20
2.2.5 Antipsicóticos	22
2.2.6 Efeitos adversos dos antipsicóticos	23
2.3 Fármacos	25
2.3.1 Clozapina	26
2.3.2 Citalopram	27
2.3.3 Haloperidol	28
2.4 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa	30
2.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	31
2.4.2 Espectrometria de Massa	32
2.5 Tratamento estatístico	39

2.5.1 Testes Estatísticos	40
2.5.2 Análise de Variância	44
2.6 Características de validação	49
2.6.1 Curva de calibração	49
2.6.2 Especificidade e selectividade	51
2.6.3 Linearidade	51
2.6.4 Exactidão	52
2.6.5 Precisão	56
2.6.6 Limite de detecção (LOD)	58
2.6.6 Limite de Quantificação (LOQ)	59
3. Materiais e Métodos	63
3.1 Materiais	63
3.2 Reagentes	63
3.3 Equipamentos	64
3.4 Procedimentos e métodos	64
3.4.1 Tratamento dos animais	64
3.4.2 Preparação das soluções dos fármacos injectados nos ratinhos	65
3.4.3 Recolha dos Tecidos	65
3.4.4 Preparação das soluções de inibidores de fosfatase e protease	66
3.4.5 Preparação de soluções para o desenvolvimento do método analítico	66
3.5 Curvas de calibração	67
3.5.1 Adição de padrão interno	68
3.6 Processo de extracção de córtex	68
3.7 Processo de extracção de plasma	69
3.8 Condições Operacionais do HPLC	69

3.9 Condições operacionais do espectrómetro de massa	70
4. Resultados e discussão.....	75
4.1 Teste simultâneo de simetria e curtose.....	75
4.2 Análise da evolução do peso.....	77
4.2.1 Grupo controlo (CT).....	77
4.2.2 Grupo clozapina (CL)	81
4.2.3 Grupo haloperidol (HA).....	84
4.2.4 Grupo citalopram (CI).....	88
4.2.5 Evolução relativa	92
4.3 Desenvolvimento do método analítico	101
4.3.1 Condições de optimização do espectrómetro de massa.....	101
4.3.2 Espectros de fragmentação.....	102
4.3.3 Condições de optimização do espectrómetro de massa acoplado à cromatografia líquida	109
4.3.4 Selectividade e especificidade	112
4.3.5 Linearidade	123
4.3.6 Limites de detecção e limite de quantificação	130
4.3.7 Precisão e exactidão	130
4.3.8 Processamento das amostras biológicas.....	133
5. Conclusão	149
Referências bibliográficas	153
Anexos.....	161

Cap. 1

Introdução

1. Introdução

O projecto apresentado foi desenvolvido na Unidade de Proteómica do Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra (CNC), que se encontra sediado no BIOCANT – Parque de Biotecnologia de Cantanhede.

O BIOCANT Park é o primeiro parque de biotecnologia em Portugal. É um empreendimento da Câmara Municipal de Cantanhede em parceria com o CNC e com a Associação Beira Atlântico Parque. O objectivo estratégico consiste em criar um grupo de biotecnologia na região centro, patrocinando, desenvolvendo e aplicando o conhecimento avançado na área das ciências da vida, apoiando iniciativas empresariais de elevado potencial.



Figura 1.1 – Fotografia das instalações do BIOCANT Park.

Este parque possui um portfolio de projectos e tecnologias próprios, que evoluíram de projectos de investigação desenvolvidos em parceria com centros de investigação fundamental e outras instituições a que se encontra ligado.

O BIOCANT conta com uma equipa de professores universitários e investigadores da Universidade de Coimbra e Universidade de Aveiro, com competências reconhecidas nas áreas de investigação e de serviços no sector da biotecnologia. Estando preparados para actuar nas áreas de descoberta de novos fármacos, identificação de novos alvos terapêuticos, diagnóstico molecular para a saúde humana, monitorização biotecnológica ambiental e controlo/valorização de produtos agro-alimentares.

A actividade de investigação e desenvolvimento é composta por oito unidades laboratoriais: Bioinformática, Biologia Celular, Biotecnologia Molecular, Engenharia de Tecidos, Genómica, Microbiologia, Sistemas Biológicos e Serviços

Avançados. É na unidade de Serviços Avançados que se insere a unidade de Proteómica do CNC. A unidade é especializada na identificação e quantificação de proteínas de amostras complexas, identificação de modificações pós-translacionais, e identificação e quantificação de moléculas e os seus metabolitos. Está focada principalmente na execução de projectos de I & D de ambos os parceiros, bem como outros colaboradores (de CNC, Biocant, outros institutos I & D e empresas privadas).

Pretende-se com este trabalho desenvolver um método analítico para a quantificação de diferentes fármacos psicotrópicos (clozapina, citalopram e haloperidol), usados no tratamento da esquizofrenia, utilizando como ferramenta analítica a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa.

Numa primeira fase foi realizado um estudo baseado na evolução do peso de ratinhos submetidos a medicação psicotrópica com três fármacos utilizados no tratamento de esquizofrenia: a clozapina, o citalopram e o haloperidol, tendo em conta a importância das interações dos diferentes fármacos no organismo. Na segunda fase, foi desenvolvido um método analítico para a quantificação destes fármacos utilizando a técnica analítica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa.

A esquizofrenia é uma doença psiquiátrica grave que afecta as emoções, o pensamento, as percepções e o comportamento. É considerada um problema de saúde pública de primeira grandeza em todo o mundo com uma prevalência de cerca de 1%.

Os objectivos gerais do tratamento para esta doença consistem em: reduzir a gravidade dos sintomas psicóticos, prevenir o reaparecimento dos episódios sintomáticos e a deterioração associada do funcionamento do indivíduo e administrar um apoio que permita ao doente um funcionamento ao máximo nível possível. Os fármacos antipsicóticos, a reabilitação e as actividades com apoio comunitário e a psicoterapia são os três componentes principais do tratamento.

Os medicamentos psicotrópicos podem ser eficazes para reduzir ou eliminar sintomas como os delírios, as alucinações e o pensamento desorganizado. Uma vez que os sintomas do surto agudo tenham desaparecido, o uso continuado dos medicamentos psicotrópicos reduz substancialmente a probabilidade de episódios futuros. No entanto, os fármacos antipsicóticos têm efeitos adversos

significativos, como sedação, rigidez muscular, tremores e aumento de peso. Estes fármacos também podem causar discinesia tardia, movimentos involuntários frequentemente dos lábios e da língua e contorções dos braços e das pernas. A discinesia tardia pode manter-se mesmo depois de se interromper a administração do fármaco. Para estes casos persistentes não existe ainda tratamento eficaz.

Cap. 2

Fundamentação

2. Fundamentação

Neste capítulo são abordados alguns conceitos relativos à esquizofrenia, nomeadamente os factores de desenvolvimento da doença, as suas principais características e sintomas. São descritos também alguns aspectos relativos ao tratamento farmacológico, ao método instrumental utilizado (LC-MS¹) e por fim, são abordados os métodos estatísticos utilizados na interpretação dos resultados.

2.1 Esquizofrenia

A esquizofrenia (SCZ²) é uma alteração psiquiátrica que afecta aproximadamente 1% da população mundial [1]. Os primeiros sintomas da doença ocorrem relativamente cedo na vida de um indivíduo, geralmente no final da adolescência ou início da idade adulta e a maioria dos doentes sofre de acentuados efeitos adversos. A esquizofrenia é uma síndrome clínica que designa um grupo de psicoses caracterizadas por alterações graves no pensamento, nas emoções e no comportamento [1].

Etimologicamente, o termo esquizofrenia significa “mente dividida” ou “dissociada”, pois nesta doença os pensamentos e os sentimentos dos doentes não se relacionam entre si de uma maneira lógica e harmoniosa. Os doentes sofrem de alucinações, delírios, diminuição da motivação, desregulação afectiva e alterações no processamento da informação, perdendo assim, o sentido da realidade e ficando incapazes de distinguir a experiência real da imaginária [2]. Embora seja uma doença que afecta homens e mulheres com igual frequência, o distúrbio manifesta-se frequentemente mais cedo nos homens (entre os 15 e 20 anos), que nas mulheres, geralmente afectadas mais tarde (entre os 20 e 30 anos) [3].

A severidade dos sintomas de longa duração do modelo crónico de SCZ provoca muitas vezes um elevado grau de deficiência dos doentes. O tratamento destes doentes através de medicação e de outros tipos de tratamentos psicossociais, podem ajudar a controlar e reduzir os sintomas angustiantes da

¹ Do inglês, Liquid Chromatography – Mass Spectrometry

² Do inglês, Schizophrenia

doença. No entanto, o tratamento por medicação nem sempre é fácil, devido aos efeitos colaterais extremamente desagradáveis e perturbadores.

As causas específicas da SCZ não são bem conhecidas, e será provavelmente o resultado da combinação de vários factores. Factores genéticos, assim como factores ambientais, desempenham um papel importante no desenvolvimento desta doença. Dentro destes factores destacam-se: hereditariedade, complicações obstétricas como asfixia e prematuridade, a idade avançada do pai, infecções virais na fase pré-natal, infecções ao nível do sistema nervoso central (SNC) durante a infância, condições de migração e crescimento em ambiente urbano, historial de consumo de drogas, alterações significativas nas relações precoces da infância e na dinâmica intrafamiliar e ainda acontecimentos de vida particularmente traumáticos [1].

2.1.1 O meio ambiente e a esquizofrenia

Os factores ambientais relacionados com a esquizofrenia são numerosos e são considerados como a principal causa da doença. Factores como: o ambiente urbano ou rural, exposições virais, o ambiente social e exposição a químicos são considerados os factores mais relevantes [4].

O nível de agregação familiar de transtorno psicótico é maior em ambientes de risco, por exemplo, em ambiente urbano ou grupo minoritário. Estes dados sugerem que a herdabilidade genética, como no caso dos gémeos, reflectam não só a influência genética mas também as interacções gene-ambiente subjacentes [2]. De acordo com a base genética para a SCZ, gémeos monozigóticos possuem uma probabilidade de cerca de 50% de desenvolverem a doença, enquanto que em gémeos dizigóticos a probabilidade é de cerca de 10 - 15% [5].

A herdabilidade refere-se à proporção da variância da responsabilidade para uma doença na população em geral que é explicada por efeitos genéticos e através de interacções com factores ambientais, que contribuem cerca de 80% de forma passiva para o desenvolvimento da SCZ [5].

A minoria étnica sob esta síndrome psicótica depende da densidade populacional a que a pessoa está inserida, isto é, quanto maior a densidade populacional menor o risco de desenvolvimento da desordem psicótica – a posição de um grupo minoritário pode ser mediada por adversidades sociais, como a

discriminação, resultado da marginalização social ou de um estado social de “derrota” [2]. No entanto, nem só as alterações cognitivas e os transtornos psicóticos tais como, os domínios neuropsicológicos como a atenção, memória, velocidade de processamento e de raciocínio estão directamente implicados na SCZ (figura 2.1).

2.1.2 Características clínicas e conceituação da SCZ

Os transtornos esquizofrénicos são caracterizados por um conjunto diversificado de sinais e sintomas que incluem: distorções características do pensamento e da percepção, alterações cognitivas, alterações motoras, avolição e apatia, dificuldade de comunicação e expressões afectivas restritas [6]. Estas anomalias são geralmente classificadas em: sintomas positivos, sintomas negativos e comportamento cognitivo associadas a mudanças de humor (figura 2.1).

É com base na avaliação deste modelo multidimensional, que se faz o diagnóstico e discrimina a resposta em relação ao tratamento desta doença.

A SCZ é caracterizada por um percurso sequencial que envolve uma fase pré-mórbida com disfunções motoras, cognitivas e sociais subtis e pouco específicas, e a fase prodrómica caracterizada por sintomas positivos. O primeiro episódio anuncia o início formal da SCZ e geralmente os primeiros anos desta doença são marcados por episódios psicóticos repetidos de duração variável. Regra geral, o declínio da doença acontece cinco anos após o primeiro episódio psicótico, seguindo-se a fase de estabilização em que os sintomas positivos tornam-se menos proeminentes, enquanto que os sintomas negativos e o estado de défice cognitivo aumentam predominantemente [6].

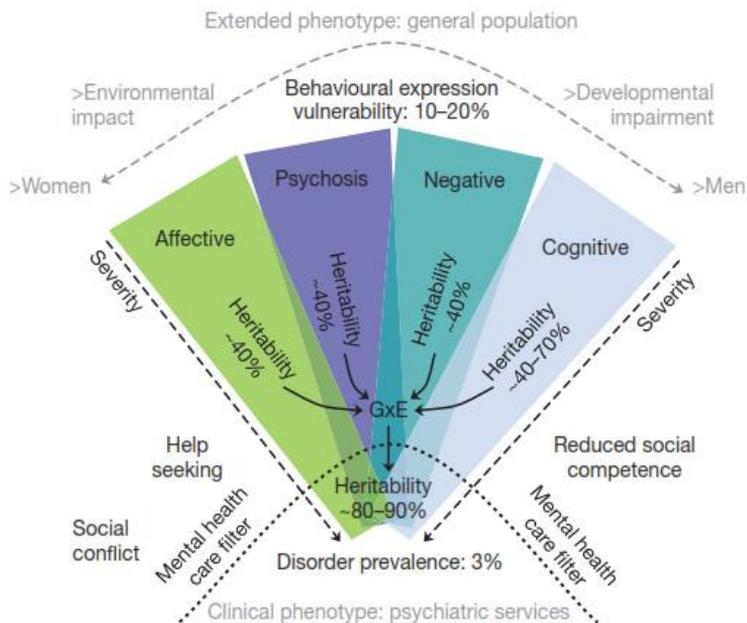


Figura 2.1 - Diagrama representativo da complexidade da desordem psicótica. Representação dos quatro parâmetros, desregulação efectiva (depressão, mania e ansiedade), sintomas psicóticos (delírios e alucinações), sintomas negativos (défice motivacional) e alterações cognitivas, caracterizam de forma geral a síndrome psicótica. Na população geral, os baixos níveis dimensionais de fenótipos representam a expressão comportamental de vulnerabilidade (10-20%), no entanto exibem moderadamente altos níveis de herdabilidade, apesar dos baixos níveis de correlação. As interações gene-ambiente originam níveis mais elevados de expressão fenotípica, que por sua vez contribuem para a probabilidade clínica de detecção por serviços psiquiátricos. Por exemplo, os níveis mais elevados de desregulação afectiva são susceptíveis a levar à procura de ajuda, ao passo que a psicose pode levar a detecção clínica através de conflitos sociais e sintomas cognitivos devido a competências sociais reduzidas. Estas descrições de diagnóstico têm maior herdabilidade, uma vez que incluem o efeito de interações gene-ambiente subjacentes à gravidade da expressão dimensional. Evidências sugerem que as influências ambientais associadas à desordem psicótica possam ter impacto no aspecto afectivo, e são normalmente mais comuns em mulheres. Por outro lado, os sintomas negativos e as dimensões cognitivas podem ser fortemente associadas com deficiências no desenvolvimento e no sexo masculino. Adaptado [2].

2.1.3 Sintomas positivos

Os sintomas positivos marcam o início formal da doença com a distorção da realidade, geralmente na adolescência ou início da idade adulta. São caracterizados por delírios, alucinações e distorções da realidade. Podem ocorrer com diferentes graus de persistência e sistematização e influenciar o funcionamento e configuração sociocultural do indivíduo de diferentes formas (figura 2.1).

As alucinações podem ocorrer ao nível de qualquer um dos cinco sentidos. Embora as alucinações auditivas sejam as mais comuns, vozes que conversam entre si ou vozes que tecem comentários sobre o doente são consideradas características, mas as vozes ameaçadoras ou acusadoras que mantêm um “diálogo” com o doente são as mais comuns [6].

A hiperactividade dopaminérgica mesolíptica parece ser a base destes sintomas, que são mais sensíveis à medicação antipsicótica [6].

2.1.4 Sintomas negativos

Os sintomas negativos envolvem dificuldades em expressar emoções e sentimentos, dificuldade na capacidade de fazer planos, dificuldade na capacidade de se expressar e incapacidade de sentir prazer. Todos estes sintomas conjugados, criam deficiências que levam a uma unidade social reduzida (figura 2.1).

Uma série de factores etiológicos podem contribuir para a expressão de sintomas negativos no contexto de SCZ. É importante distinguir os sintomas negativos primários de sintomas negativos secundários, sendo os primários sintomas fundamentalmente intrínsecos à doença e os secundários sintomas “extrínsecos” à SCZ, tais como privação ambiental e a depressão [6].

A fisiopatologia dos sintomas negativos carece da devida compreensão e continua a ser uma componente relativamente refractária e debilitante no tratamento da patologia esquizofrénica [6].

2.1.5 Desorganização do pensamento e do comportamento

A perturbação do percurso formal refere-se à progressiva fragmentação de natureza lógica, dirigida a objectos de processamento do pensamento normal e pode variar na severidade com que se manifesta consoante as circunstâncias, isto é, pode-se manifestar de forma suave ou de uma forma mais grave transmitindo incoerência na expressão de palavras [6].

A desorganização do pensamento baseia-se na escassez de conteúdo do raciocínio, que provoca uma série de alterações cognitivas e alterações no comportamento.

As deficiências na experiência afectiva e de expressão têm sido consideradas como características fundamentais na SCZ, muitas vezes precedendo em vários anos o aparecimento da psicose. Em contraste com os prejuízos afectivos (sintomas negativos) os pacientes com SCZ manifestam frequentemente alterações de humor. A depressão é um estado comum desta doença e na grande maioria dos casos ocorre paralelamente aos sintomas psicóticos [6].

Os distúrbios da actividade psicomotora podem variar desde simples movimentos de postura isolados, aos mais complexos padrões de movimento, como é observado em vários estados catatónicos.

No contexto da SCZ, a presença de sintomas catatónicos está associada a um estado mais avançado da doença, no entanto, muitos destes distúrbios de movimentos são induzidos pelos efeitos dos antipsicóticos [7].

Uma série de deficiências neurológicas são observadas na maioria dos pacientes, estas encontram-se localizadas numa área específica do cérebro, como o córtex pré-frontal dorsolateral [8]. Esta região é responsável pela memória, pensamento, emoção e por uma visão consistente do mundo, quando se encontra afectada, reflecte-se em sinais de prejuízo sensorial, motores e funções de reflexo. Além das alterações motoras discutidas anteriormente que reflectem disfunções piramidais ou extrapiramidais, as lacunas neurológicas reflectem ainda hipoalgesia, comprometimento da função olfactiva e anomalias oculares [6].

2.1.6 O suicídio na esquizofrenia

O suicídio é definido como uma morte auto-infligida, um acto intencional de acabar com a própria vida e está entre as principais causas de morte prematura no mundo. Estima-se que cerca de um milhão de pessoas morrem por suicídio em cada ano e é aproximadamente três a quatro vezes mais comum no sexo masculino do que no sexo feminino [1]. As taxas de suicídio variam de acordo com a região, sexo, idade, tempo e descendência étnica. Através de estimativas a partir de autópsias psicológicas, verifica-se que 90% dos indivíduos que morrem por suicídio possuíam transtorno psiquiátrico diagnosticável no momento da morte e aproximadamente 60% dos suicídios ocorrem em relação a transtornos depressivos [1].

Neste contexto, o suicídio é uma das principais causas de morte entre pacientes com SCZ e comparando com o risco de suicídio na população geral, verifica-se que o risco de suicídio em SCZ é relativamente mais elevado e numa faixa etária mais jovem [1].

Apesar do risco de suicídio nestes pacientes ser considerado mais elevado no início da doença, parece manter-se elevado em qualquer momento durante o curso da doença, uma vez que a SCZ é uma doença crónica.

Vários factores sociais e pessoais têm sido considerados como o desencadeamento para o comportamento suicida em pacientes com SCZ [9]. Um quociente de inteligência elevado, bem como um distinto nível de educação e um bom desempenho escolar; abuso de substâncias ilícitas que podem levar a consequências como o não cumprimento da medicação prescrita, perda de controlo, violência e problemas económicos; e históricos de transtornos depressivos, constituem factores que contribuem para o aumento deste risco.

Sendo a SCZ uma doença não homogénea e uma síndrome que engloba uma variedade de sintomas, há consequentemente, diferenças substanciais nas apreciações dos sintomas clínicos entre os pacientes [9]. Os factores de risco estão associados a sintomas típicos do núcleo da psicose, tais como delírios e alucinações, assim como com os sintomas depressivos, desânimo, agitação e sentimentos de inutilidade.

Assim, o diagnóstico e intervenção adequada baseada no uso de medicação e acompanhamento psiquiátrico contínuo são cruciais na redução do risco de suicídio.

2.2 Tratamento farmacológico

Sendo a SCZ uma doença crónica, recorrente e remitente associada a limitações significativas no funcionamento social e profissional, esta implica que o seu tratamento consista numa abordagem multi-modal incluindo medicação psicotrópica e intervenções psicossociais. A finalidade deste tratamento consiste em melhorar a qualidade de vida das pessoas atingidas com esta doença, reduzindo a morbilidade do distúrbio e diminuindo a frequência e gravidade dos episódios psicóticos [10].

Os fármacos psicotrópicos utilizados no tratamento da SCZ foram introduzidos na prática clínica na década de 1950 [11]. A partir desta data, estabeleceu-se o tratamento padrão que consiste em fornecer aos pacientes esta medicação (figura 2.2), um ambiente seguro e apoio psiquiátrico permanente.

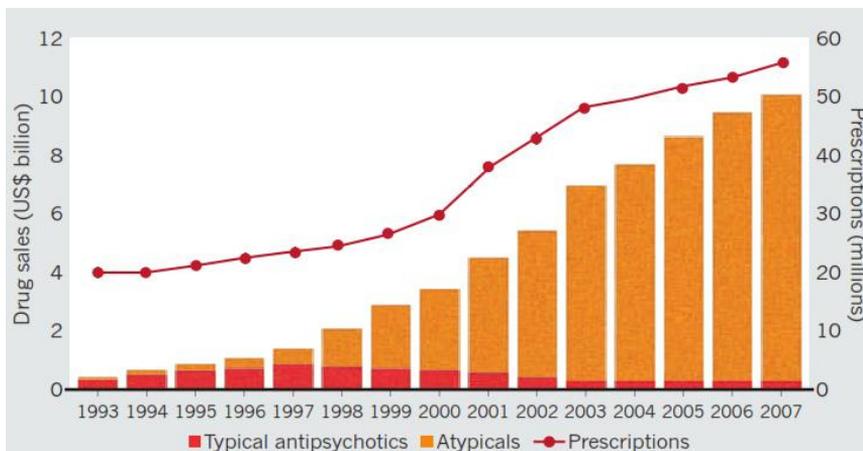


Figura 2.2 - Representação gráfica da evolução com a introdução de antipsicóticos de 2ª geração no mercado mundial de fármacos psicotrópicos para o tratamento da SCZ. Adaptado [12].

2.2.1 Mecanismo dos neurotransmissores

O sistema nervoso juntamente com o sistema endócrino é responsável pela maioria das funções de controlo do organismo. O córtex é considerado a parte mais importante do cérebro, dado que permite o “contacto com o exterior”. É o córtex que filtra e ordena todo o contacto com o exterior ao integrar a informação que nos permite ver, tocar, ouvir, falar, sentir, pensar, formular planos e ideias. O córtex está repleto de células nervosas designadas por neurónios e é aqui que cerca de um terço de todos os neurónios realizam as suas funções [13].

Os neurónios são responsáveis por receber, processar e passar a informação entre si, formando-se assim uma rede de informação. Desta forma, um neurónio ao receber um determinado impulso, processa e transmite um estímulo nervoso a outro neurónio, através de sinais eléctricos e químicos (figura 2.3). Os neurónios possuem um espaço entre si, denominado de fenda sináptica e é neste

espaço que ocorre a transferência de informação do neurónio pré-sináptico para o neurónio pós-sináptico [13].



Figura 2.3 - Representação da rede de informação neuronal, responsável pela transmissão de impulsos nervosos. (retirado de: <http://thetechjournal.com/science/neuron-implantation-can-rewire-brain-itself.xhtml>, consulta realizada em 20110710)

Os neurotransmissores químicos que transportam a informação encontram-se armazenados em vesículas neuronais, que ao receberem o impulso nervoso libertam as suas moléculas para a fenda sináptica de modo a serem captadas pelos receptores do neurónio seguinte (figura 2.4). É como se portas específicas se abrissem para receber estas moléculas, provocando assim um novo impulso nervoso no neurónio receptor [13-14].

Este conjunto de passos simples, de um impulso eléctrico seguido de trocas químicas e de novo um outro impulso eléctrico que ocorrem na sinapse, são a base de toda a actividade cerebral. É assim que cerca de 10 mil milhões de neurónios existentes no nosso cérebro comunicam entre si, constantemente numa ciranda de impulsos nervosos é um mecanismo de impressionante complexidade que nos permite pensar, agir, mover, ouvir, falar, ver, sentir, manifestar alegria ou preocupações, entre outros.

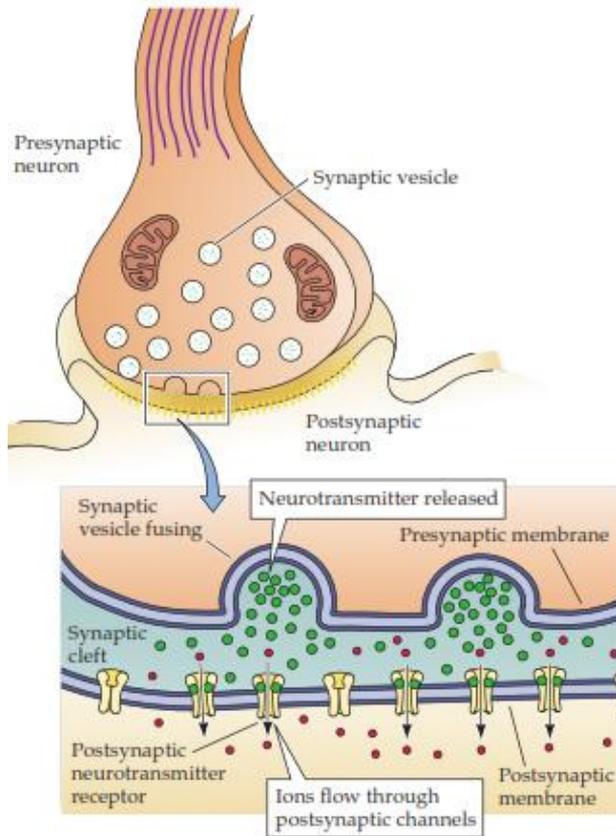


Figura 2.4 - Representação esquemática de uma sinapse química. A fenda sináptica separa a membrana pré-sináptica da membrana pós-sináptica. A liberação dos neurotransmissores das vesículas sinápticas para a fenda sináptica permite a sua recepção pelos receptores da membrana pós-sináptica. Adaptado [13].

Existem vários neurotransmissores químicos, sendo os principais a acetilcolina, endorfina, dopamina, noradrenalina, glutamato e a serotonina. Durante o processo de transferência das moléculas, estas podem ser reaproveitadas pelo mesmo neurônio que as libertou, através de auto-receptores ou podem ser rearmazenadas novamente em vesículas neuronais recém sintetizadas (figura 2.4). Os neurónios necessitam de ter sempre neurotransmissores disponíveis. Sempre que um neurotransmissor é libertado, ocorre a síntese e o armazenamento de novas moléculas bem como novas vesículas neuronais para substituir as que foram utilizadas [13-14].

Do ponto de vista neurológico, a depressão é causada por um défice de neurotransmissores que são responsáveis pela sensação de controlo, prazer e

bem-estar. Apesar da quantidade de neurotransmissores libertados ser menor, a transmissão de informação continua a processar-se normalmente, o que faz com que os neurónios receptores recebam menor quantidade de neurotransmissores, provocando um défice no sistema nervoso que leva a sintomas de desânimo, tristeza, autoflagelamento, perda ou diminuição da capacidade de fazer planos e de se expressar e falta de energia para actividades simples [15].

O tratamento com fármacos antidepressivos com estruturas químicas diferentes, consiste em produzir uma maior concentração de um ou mais neurotransmissores no sistema neuronal, através da inibição do metabolismo do bloqueio neuronal ou bloqueio de auto-receptores pré-sinápticos [16].

Neste projecto, foram utilizados fármacos psicotrópicos que actuam a nível da inibição da recaptação da dopamina e serotonina, sendo por isso estes mecanismos explicados de seguida.

2.2.2 Inibidor selectivo da recaptação de dopamina

A dopamina é um neurotransmissor inibitório, e dependendo da área em que actua apresenta funções diferentes [14]. Na base destas diferentes projecções, os neurónios dopaminérgicos podem ser organizados em quatro subsistemas: nigroestriatal, mesolímbico, mesocortical e túbero-infundibular.

O sistema dopaminérgico nigroestriatal é responsável pela regulação dos movimentos. A desregulação neste sistema pode levar a sintomas de parkinsonismo, estando, portanto, envolvido no sistema de desenvolvimento de sintomas extrapiramidais (EPS³) frequentes durante o tratamento com fármacos psicotrópicos.

Ambos os sistemas mesolímbico e mesocortical são responsáveis pela regulação do comportamento emocional, motivacional, capacidade de fazer planos, organização do pensamento, atenção e comportamento social, que fazem parte dos sintomas negativos e cognitivos da SCZ.

Por último, o sistema dopaminérgico túbero-infundibular, está envolvido na regulação endócrina, tendo como principais funções a disfunção sexual, ginecomastia, infertilidade e amenorreia [17].

³ Do inglês, Extrapiramidal Symptoms

Os receptores D1 e D2 foram os primeiros distinguidos em bases farmacológicas e bioquímicas, e ambos estão localizados em neurónios pós-sinápticos [18]. Quando são administrados fármacos inibidores selectivos da recaptção de dopamina (DARI)⁴, estes actuam através do bloqueio de auto-receptores da dopamina, não permitindo o rearmazenamento desta molécula e aumentando a síntese de dopamina. Desta forma a taxa de disparos de sinais químicos e impulsos eléctricos aumenta, com a consequente inibição dos sintomas positivos da SCZ [14].

2.2.3 Inibidores selectivos da recaptção de serotonina

A serotonina, também conhecida por 5-hidroxitriptamina (5-HT) é um neurotransmissor que está intimamente relacionado com alterações de humor, alterações afectivas e distúrbios do sono [14].

À semelhança do que acontece com a dopamina e como o próprio nome indica, a função de fármacos inibidores selectivos da recaptção da serotonina (SSRI⁵) é aumentar a concentração extracelular deste neurotransmissor.

Este mecanismo ocorre através do bloqueio dos auto-receptores no neurónio pré-sináptico, aumentando assim o nível de serotonina disponível para se ligar aos receptores pós-sinápticos. Desta forma a taxa de emissões de sinais químicos e impulsos eléctricos aumenta, combatendo os sintomas negativos e cognitivos da SCZ [11, 19].

2.2.4 Antidepressivos

A introdução clínica de fármacos psicotrópicos na década de 50 constituiu um dos grandes avanços do século XX, sendo considerada como uma “revolução psicofarmacológica”. Os antidepressivos e a sua utilização clínica trouxeram um avanço importante no tratamento e no entendimento de possíveis mecanismos subjacentes aos transtornos depressivos, tornando a depressão um problema médico passível de tratamento [11].

⁴ Do inglês, Dopamine Reuptake Inhibitor

⁵ Do inglês, Selective Serotonin Reuptake Inhibitor

Estes fármacos têm a sua principal acção no cérebro, modificando e corrigindo as transmissões neuro-químicas. Possuem a capacidade de aumentar a disponibilidade sináptica de um ou mais neurotransmissores através da acção de diversos receptores e enzimas específicas, e melhoram o estado clínico dos pacientes com distúrbios depressivos, ajudando-os no estado de humor e organização mental [15].

A imipramine e iproniazida foram os primeiros antidepressivos a serem utilizados (figura 2.5), abrindo assim portas para tratamentos específicos e progresso na prática clínica.

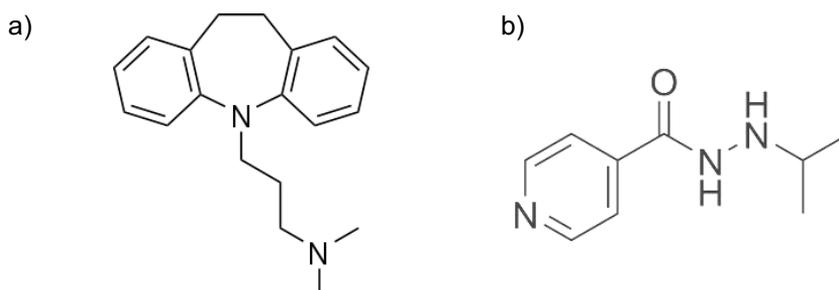


Figura 2.5 - Estrutura química da a) imipramine e b) iproniazida.

Os antidepressivos são preferencialmente classificados de acordo com o seu mecanismo de acção, sendo os principais: inibidores de monoamina oxidase (MAOIs⁶), inibidores não selectivos da recaptção de monoamina (ADTs⁷) inibidores selectivos da recaptção de serotonina (SSRI) e inibidores da recaptção de noradrenalina (NERI⁸) [20].

O avanço da pesquisa em “psicofarmacologia” de antidepressivos tem vindo a oferecer aos pacientes substâncias com perfis farmacocinéticos, de tolerância e de interacções com outros fármacos bastante diferentes entre si. No entanto, os mecanismos de acção propostos para cada um deles permanecem vinculados às teorias monoaminérgica, de aumento da oferta de neurotransmissores na fenda sináptica, e da subsensibilização de receptores pós-sinápticos [11, 19, 21-22].

⁶ Do inglês, Monoamine Oxidase Inhibitors

⁷ Do inglês, Tricyclic antidepressants

⁸ Do inglês, Norepinephrine Reuptake inhibitor

2.2.5 Antipsicóticos

A SCZ é, como referido anteriormente, tradicionalmente conceituada como uma desordem caracterizada por sintomas positivos (alucinações, delírios, comportamento bizarro) e sintomas negativos (perda ou diminuição da capacidade de fazer planos e perda ou diminuição da capacidade de socializar). É reconhecido que este estado depressivo está cada vez mais associado ao risco de suicídio e ao prejuízo do comportamento cognitivo [23].

A introdução de fármacos antidepressivos no início da década de 50 revolucionou o tratamento de distúrbios psicóticos e em particular da SCZ. O tratamento para esta doença tem vindo a evoluir e a diversificar-se, sobretudo no contexto de desenvolvimento de fármacos antipsicóticos. Os progressos significativos resultaram na disponibilidade e uso de vários fármacos que reflectem duas classes básicas de medicamentos (figura 2.2), os antipsicóticos de primeira geração e os antipsicóticos de segunda geração [24].

Os antipsicóticos de primeira geração (FGAs⁹) possuem uma alta afinidade com o receptor D2 da dopamina [25]. Existindo uma forte correlação entre as doses terapêuticas destes fármacos e a afinidade de se ligar com o receptor D2, tornando-os mais eficazes na redução dos sintomas positivos (alucinações e delírios). Estes fármacos são, todavia, pouco eficazes contra os domínios dos sintomas negativos e cognitivos também característicos da doença, possuindo ainda elevadas taxas de efeitos neurológicos colaterais como sintomas extrapiramidais e discinesia tardia [24, 26].

O desenvolvimento de antipsicóticos de segunda geração (SGAs¹⁰), surgiu no sentido de preencher as lacunas dos (APGs). Possuem menor afinidade de ocupação para os receptores dopaminérgicos, tendo um alto grau de ocupação nos receptores serotoninérgicos, ou seja, existe uma maior relação de afinidade destes fármacos com os receptores de serotonina (5-HT) em relação aos receptores D2 dopamina. Esta afinidade explica a eficácia obtida na redução dos sintomas negativos, alterações cognitivas, prevenção de recaídas, melhorias na capacidade funcional e qualidade de vida, sendo assim drasticamente menos propensos a causar sintomas extrapiramidais (EPS) e menos discinesia tardia [24].

⁹ Do inglês, First Generation Antipsychotic Drugs

¹⁰ Do inglês, Second Generation Antipsychotic Drugs

No entanto, estas vantagens têm sido consideradas como incrementais e não necessariamente como substanciais. Além disso, as preocupações com efeitos colaterais tais como (EPS) foram substituídas por outros efeitos colaterais.

A introdução de clozapina para o tratamento farmacológico da SCZ representa um avanço significativo no tratamento desta devastadora doença mental. A clozapina é um antipsicótico de segunda geração, devido à sua eficácia no tratamento de sintomas positivos e negativos e o facto de não induzir efeitos colaterais extrapiramidais [27]. Embora a clozapina seja o fármaco protótipo desta classe e o antipsicótico mais eficaz actualmente disponível, produz alguns efeitos colaterais graves, sendo o principal a agranulocitose [25].

As estratégias e formas de tratamento para a SCZ variam de acordo com a fase e gravidade da doença. A terapia farmacológica é uma pedra angular e componente essencial para o tratamento da SCZ e seu manuseamento clínico através dos diferentes estágios da doença. Embora existam várias terapias psicossociais, como terapias cognitivo-comportamental, psicoeducação e apoio de inserção social, estas só são úteis quando coadjuvantes ao tratamento farmacológico. Actualmente não é possível prever qual o fármaco antipsicótico mais adequado para um determinado paciente. As decisões sobre o consequente tratamento implicam um processo de tentativa e erro, com monitorização cuidadosa da resposta clínica, efeitos adversos e uma avaliação do risco/benefício.

Na farmacoterapia, especialmente adequada durante a fase aguda da doença, pode-se definir o cenário para o tratamento a longo prazo subsequente, apesar de todos os tratamentos farmacológicos disponíveis terem limitações na sua eficácia e estarem associados a efeitos colaterais desconfortáveis [23, 25-27].

2.2.6 Efeitos adversos dos antipsicóticos

O tratamento com medicamentos antipsicóticos implica um difícil equilíbrio entre o alívio dos sintomas psicóticos e a perturbação dos efeitos colaterais. Os eventos adversos, as restrições e as preocupações relacionadas com estes fármacos limitam a sua utilização fazendo com que o caminho a percorrer até atingir um estado estável não seja na maioria das vezes fácil. Os efeitos adversos destes fármacos são os principais responsáveis pela descontinuidade, baixa adesão, redução de qualidade de vida, da interacção e adaptação social [7].

Os efeitos colaterais podem ser divididos nas seguintes classes: i) efeitos neurológicos, que englobam sintomas de neurotoxicidade, sintomas extrapiramidais, discinesia tardia, tremor tardio, convulsões, sedação, hipotermia, acatisia, blefarospasmo e parkinsonismo; ii) efeitos hematológicos, caracterizados por eosinofilia, neutropenia e agranulocitose; iii) efeitos endocrinológicos, baseados no aumento de peso, hiperglicemia, hiperprolactinemia, ginecomastia e disfunção sexual; iv) efeitos cardiovasculares, que consistem em hipotensão, alterações electrocardiográficas e arritmias cardíacas e v) efeitos anticolinérgicos, caracterizados por dificuldades respiratórias, secura da boca e narinas, visão turva, pupilas dilatadas, obstipação intestinal e aumento da temperatura corporal. A estes efeitos estão ainda associados sintomas psiquiátricos secundários, como mania e catatonia [7].

Os efeitos colaterais, descritos na tabela 2.1, como os terapêuticos, resultantes dos antipsicóticos decorrem do bloqueio pós-sináptico de receptores nos diferentes sistemas de neurotransmissão. Cada fármaco apresenta um perfil de bloqueio de receptores, dando origem a uma frequência e gravidade diferente de efeitos colaterais.

Actualmente, não existem antipsicóticos isentos de efeitos colaterais indesejáveis, não havendo assim uma fórmula única e universal, de tratamento que precisa de ser individualizado e de uso continuado.

A detecção precoce dos efeitos adversos, a diminuição da dose, a troca por outro fármaco e suspensão de associações desnecessárias são algumas estratégias recomendadas [7, 28-29].

Tabela 2.1 – Efeitos colaterais dos antipsicóticos nos diferentes sistemas de neurotransmissão. Adaptado [30].

Neurotransmissor	Efeitos
Dopamina	Extrapiramidais e endócrinos (disfunção sexual, galactorréia, ginecomastia, hiperglicemia e alterações menstruais)
Histamina	Sedação e aumento de peso
Noradrenalina	Hipotensão postural, vertigem e taquicardia reflexa
Acetilcolina	Redução de sintomas extrapiramidais, boca seca, visão turva, obstipação intestinal, retenção urinária, distúrbio de memória, exacerbação de glaucoma de ângulo fechado e arritmias cardíacas
Serotonina	Aumento de apetite, aumento de peso, redução de sintomas extrapiramidais, efeito antiemético, aumento da atenção e da capacidade de fazer planos.

2.3 Fármacos

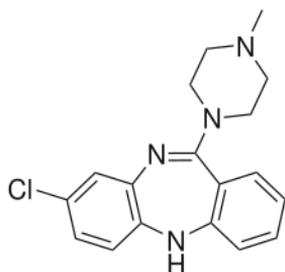
Durante os últimos anos, vários esforços têm sido feitos no sentido de melhorar a abordagem terapêutica para o tratamento da SCZ. Foram realizados vários estudos para comparar os diversos fármacos numa tentativa de compreensão e avaliação das alterações orgânicas e comportamentos decorrentes do seu uso.

Neste trabalho, foram analisados três fármacos psicotrópicos utilizados no tratamento da SCZ: a clozapina, o citalopram e o haloperidol.

2.3.1 Clozapina

A clozapina ¹¹ (2-cloro-11-(4-metil-1-piperazinil-5H-dibenzo [b,e] [1,4] diazepina), é um derivado da dibenzodiazepina e pertence à classe dos antipsicóticos de segunda geração (figura 2.6), é considerado o fármaco mais eficiente para o tratamento da SCZ, uma vez que, o principal mecanismo de acção consiste no bloqueio de receptores dos neurotransmissores dopaminérgicos e serotoninérgico [25, 27]. Devido a esta acção, este fármaco mostra-se eficaz no combate aos sintomas positivos e sintomas negativos característicos desta doença e eliminado praticamente os sintomas extrapiramidais. No entanto potencializa outros efeitos adversos, sendo o mais grave o desenvolvimento de agranulocitose [25, 27].

a)



b)

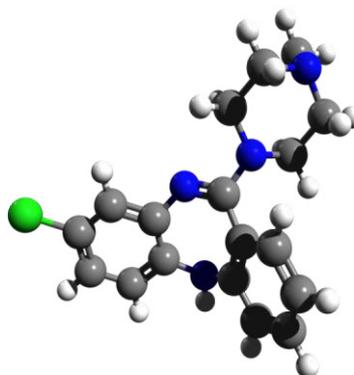


Figura 2.6 - Fórmula estrutural da clozapina (a) e respectiva estrutura tridimensional (b).

Este fármaco é prescrito a doentes esquizofrénicos em estados clínicos mais avançados. A absorção digestiva após a administração oral é rápida e completa (90 - 95%). Possui uma biodisponibilidade de 50 – 60%, devido ao efeito da primeira passagem hepática ao qual ocorre a libertação dos seus dois principais metabolitos, desmetilclozapina e N-oxido clozapina [31]. Apenas a desmetilclozapine é activa clinicamente e as suas propriedades farmacológicas assemelham-se às da clozapina, mas são consideravelmente mais fracas e de curta duração. A concentração plasmática máxima é atingida após 2 horas e a eliminação

¹¹ Nome IUPAC: 8-chloro-11-(4-methylpiperazin-1-yl)-5H-dibenzo[b,e][1,4]diazepine; CAS nbr.: 5786-21-0; F: C₁₈H₁₉ClN₄; Mw = 326.823 g/mol; SMILES: CN1CCN(CC1)C2=Nc3cc(ccc3Nc4c2cccc4)Cl

do organismo ocorre entre 6 a 26 horas, sendo que 50% é excretado na urina e 30% nas fezes [32].

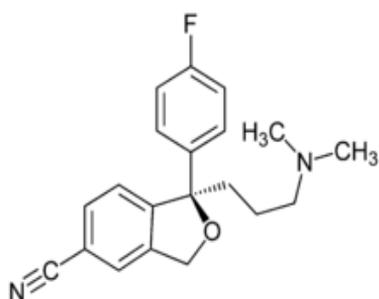
A nível clínico, a clozapina produz sedação rápida e acentuada e exerce um potente efeito antipsicótico, em comparação com antipsicóticos de primeira geração, produz menos reacções extrapiramidais e evita efeitos adversos tais como ginecomastia, amenorreia e galactorreia [33].

2.3.2 Citalopram

O citalopram¹² (1-(3-(dimetilaminopropil)-1-(4-fluorofenil)-1,3-dihidroisobenzofurano-5-carbonitrilo) é uma antidepressivo pertence à classe dos inibidores selectivos da recaptação de serotonina (SSRI). Foi pela primeira vez sintetizado em 1972 pela empresa farmacêutica Lundbeck que patenteou esta molécula antes de proceder aos ensaios clínicos (figura 2.7).

Os ensaios clínicos e desenvolvimento da molécula realizaram-se durante 15 anos, e demonstrou-se que este fármaco era eficaz no combate a ansiedade e depressão. Desde então, tem sido prescrito para o tratamento de doentes depressivos, que sofram de distúrbios de ansiedade, de sono e mudanças de humor.

a)



b)

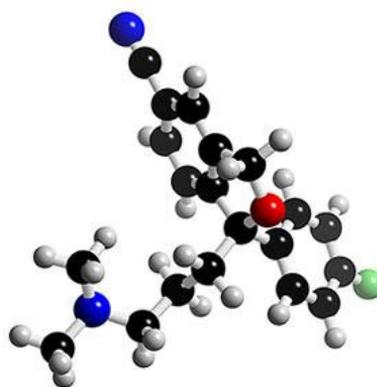


Figura 2.7 - Fórmula estrutural do citalopram (a) e respectiva estrutura tridimensional (b).

¹² Nome IUPAC: 1-[3-(dimethylamino) propyl]-1-(4-fluorophenyl)-1,3-dihydroisobenzofuran-5-carbonitrile; CAS nbr.: 59729-33-8; Fm: C₂₀H₂₁N₂FO; Mw = 324.392 g/mol; SMILES: Fc1ccc(cc1)C3(OCc2cc(C#N)ccc23)CCCN(C)C

Pertencendo este fármaco à classe dos (SSRI), o seu principal mecanismo de acção é a nível da potencialização da actividade serotoninérgica no sistema nervoso central (SNC), que resulta na inibição da recaptação da serotonina pelos receptores pré-sinápticos, aumentando assim a sua concentração [21].

A biotransformação do citalopram é principalmente hepática, com um tempo meia-vida de aproximadamente 35 horas, com a concentração plasmática no estado estacionário a ser atingida aproximadamente ao fim de uma semana.

O citalopram é metabolizado em desmetilcitalopram, didesmetilcitalopram e em citalopram-N-óxido, sendo estes metabolitos inibidores selectivos da recaptação de serotonina, embora menos potentes que o composto original.

A principal enzima metabolizadora é a CYP2C19, sendo possível ainda alguma contribuição das enzimas CYP3A4 e CYP2D6.

Este fármaco é eliminado principalmente através do fígado, em cerca de 85%, mas também parcialmente pelos rins, em cerca de 15%.

Não existe uma relação clara entre os níveis plasmáticos de citalopram e a resposta terapêutica ou os efeitos secundários [34].

2.3.3 Haloperidol

O haloperidol ¹³ (4-[4-(4-clorofenil)-4-hidroxi-1-piperidil]-1-(4-fluorofenil)-butan-1-ona), é um derivado da butirofenona e pertence à classe dos antipsicóticos de primeira geração (figura 2.8).

Foi desenvolvido nos finais dos anos 1950 pela empresa belga Janssen. Como pertence à classe dos antipsicóticos de primeira geração o seu principal mecanismo de acção ocorre a nível do sistema dopaminérgico. Possui assim afinidade com o receptor D2 da dopamina e existe uma forte correlação entre as doses terapêuticas deste fármaco e a afinidade de se ligar com o receptor D2, sendo mais eficaz na redução dos sintomas positivos (alucinações e delírios) [35].

¹³ Nome IUPAC: 4-[4-(4-chlorophenyl)-4-hydroxy-1-piperidyl]-1-(4-fluorophenyl)-butan-1-one; CAS nbr.: 52 86-8; Fm: C₂₁H₂₃ClFNO₂; Mw = 375.9 g/mol; SMILES: c1cc(ccc1C(=O)CCCN2CCC(CC2)(c3ccc(cc3)Cl)O)F

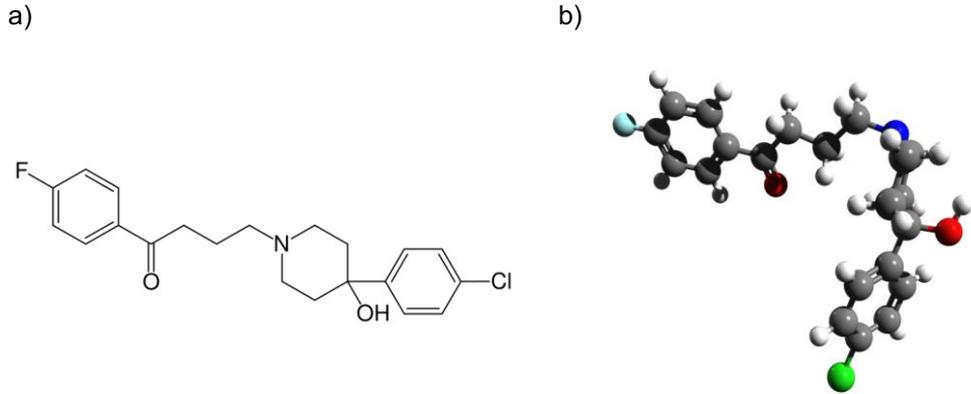


Figura 2.8 - Fórmula estrutural do haloperidol (a) e respectiva estrutura tridimensional (b).

O perfil clínico de actividade é caracterizado por efeitos antipsicóticos (redução de alucinações, distúrbios de personalidade e de raciocínio, inibição psicomotora e agitação catatónica, tensão afectiva e estados de espírito maníacos e aumento do comportamento impulsivo).

O haloperidol tem também um efeito sedativo e é terapêuticamente benéfico em certos síndromas hiperkinéticos e discinéticos.

Este fármaco é, todavia, minimamente eficaz contra os domínios dos sintomas negativos e cognitivos também característicos da doença, além disso, possui elevadas taxas de efeitos neurológicos colaterais como sintomas extrapiramidais e discinesia tardia.

O efeito antipsicótico máximo só é atingido após uma a três semanas de tratamento, enquanto que o efeito inibidor psicomotor é sentido imediatamente.

O haloperidol é rapidamente absorvido após administração oral, cerca de três horas, e a biodisponibilidade absoluta é de 60 – 70%. A concentração máxima plasmática é atingida entre 3 a 6 horas após a administração.

Este fármaco é quase completamente metabolizado no fígado, a principal via de decomposição é a clivagem da cadeia lateral de N através da desalquilação oxidativa e posterior β -oxidação da cadeia lateral carboxilada. Consequentemente, são detectados na urina metabolitos farmacologicamente inactivos, o ácido 4-fluorbenzoilpropiónico e o ácido 4-fluorfenilacético [36].

2.4 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa

A combinação da cromatografia líquida (LC¹⁴) acoplada à espectrometria de massa (MS¹⁵) tornou-se uma atractiva e interessante ferramenta. A popularidade desta combinação na análise de produtos farmacêuticos em matrizes biológicas complexas deve-se principalmente à sensibilidade e selectividade desta técnica [37].

Em grande parte das análises, os componentes de interesse estão em misturas complexas e o objectivo da cromatografia líquida consiste em separar os componentes da mistura, para posteriormente se proceder à sua identificação e quantificação [37].

Numa perspectiva qualitativa, uma das limitações da cromatografia líquida consiste na incapacidade de fornecer uma identificação inequívoca dos componentes mesmo que estes sejam completamente separados uns dos outros. A identificação é baseada na comparação do tempo de retenção do analito desconhecido com materiais de referência, determinado sob as mesmas condições experimentais. No entanto, para muitos dos compostos não existem materiais de referência, limitando assim a sua identificação [37].

Apesar de uma série de condições cromatográficas estarem disponíveis para análise, nem sempre é possível uma completa separação de todos os componentes da mistura. O poder da MS consiste no facto de fornecer informação sobre os analitos presente na amostra, através da obtenção do espectro de massa de acordo com a sua razão massa-carga (m/z), permitindo assim uma análise com elevado grau de confiança [37].

A combinação da capacidade de separação de LC com a capacidade de identificação da MS, tornou-se numa técnica muito vantajosa, principalmente no caso de misturas de compostos semelhantes ou com tempos de retenção muito parecidos.

¹⁴ Do inglês, Liquid Chromatography

¹⁵ Do inglês, Mass Spectrometry

A LC-MS oferece assim uma maior sensibilidade e selectividade, menores tempo de execução, bem como a capacidade para analisar uma ampla gama de moléculas com elevado peso molecular [38].

2.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC¹⁶) é adequada para análises de compostos hidrofílicos, termolábeis e de elevado peso molecular [38]. Esta técnica possui vantagens pela sua flexibilidade na gama de detectores selectivos, o que permite facilidade de análise de compostos, nomeadamente fármacos e os seus metabolitos [37].

Um sistema de HPLC típico consiste num reservatório de eluente, uma bomba de alta pressão com controlador de fluxo, uma coluna analítica e um detector, associado a um sistema informático de tratamento de dados (figura 2.9) [38].

Geralmente, a análise de fármacos é realizada por eluição isocrática na qual a composição de eluente é constante, apesar da eluição por gradiente, correspondente à alteração da composição de eluente durante a análise, ser necessária numa faixa de compostos com polaridades diferentes [38].

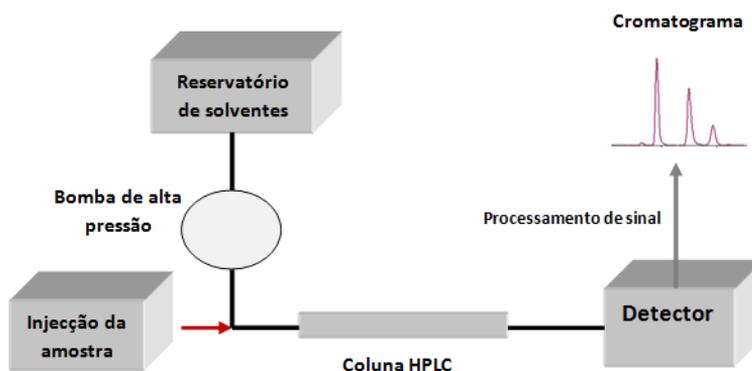


Figura 2.9 - Componentes constituintes do sistema de HPLC. Adaptado [38].

¹⁶ Do inglês, High Performance Liquid Chromatography

A estabilidade térmica numa análise por HPLC, não é tão importante como por exemplo em cromatografia gasosa (GC¹⁷). A maioria dos compostos (especialmente os metabolitos) são instáveis em amostras biológicas ou quando são submetidos a pH extremos, como por exemplo no processo de preparação da amostra, pelo que a escolha da combinação coluna/eluente é feita de acordo com o processamento da amostra, bem como de acordo com as condições de detecção [37].

A selecção do padrão interno adequado é também um passo importante. Um detector ideal de HPLC deve possuir: elevada sensibilidade, resposta específica e universal, ampla faixa linear dinâmica e resposta estável [38].

2.4.2 Espectrometria de Massa

O fundamento da espectrometria de massa (MS) é a separação em fase-gasosa das moléculas de acordo com a sua razão massa-carga (m/z). Os analitos são ionizados e separados por alterações do campo magnético e/ou electrostático em alto vácuo. O sinal captado pelo detector é convertido na abundância relativa em função da razão m/z , resultando num espectro de massa [38].

A MS fornece mais informação sobre analitos em amostras de menor quantidade do que outras técnicas, do ponto de vista quantitativo e qualitativo. É também a técnica mais confiável para a medição de massa exacta [38].

As medições exactas de massa podem ser utilizadas para auxiliar na identificação de compostos e os padrões de fragmentação molecular podem ser utilizados para identificar os analitos, quer empiricamente quer por comparação com dados publicados.

Todos os espectrómetros de massa partilham características comuns, com algumas diferenças entre si. Em alguns destes instrumentos a introdução da amostra no espectrómetro de massa é realizada através de cromatografia, noutros é realizada por inserção directa da amostra na câmara de ionização. Uma vez separados, os iões são detectados e quantificados.

Esta técnica é constituída por três componentes principais: uma fonte de ionização; o analisador de massa e o detector. Na fonte de ionização, os

¹⁷ Do inglês, Gas Chromatography

componentes de uma amostra são convertidos em iões pela acção de um agente ionizante e os iões positivos ou negativos são imediatamente acelerados em direcção ao analisador de massa. A função do analisador de massa é separar os iões de acordo com a sua razão m/z e dependendo da natureza do analisador o espectrómetro de massa pode ser classificado em várias categorias [39]. Finalmente, o detector recebe os iões que foram separados pelo analisador, transformando a corrente de iões em sinais que são posteriormente processados (figura 2.10).

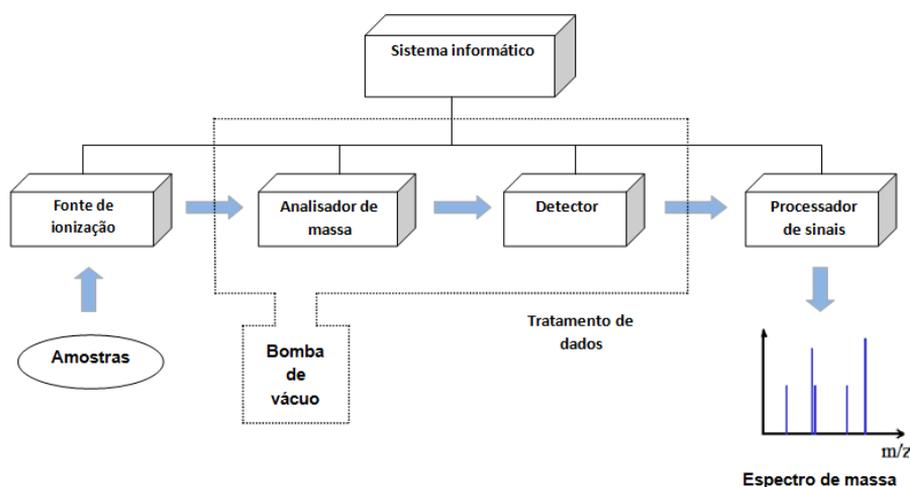


Figura 2.10 - Componentes básicos de um espectrómetro de massa. A amostra é introduzida na fonte de ionização onde os analitos são ionizados no modo positivo ou negativo, no sentido de carregar as moléculas na fase gasosa. Os iões ionizados entram no espectrómetro de massa, e são separados no analisador de massa no sentido de alcançar o detector, para se obter o espectro de massa. Adaptado [38].

O método de ionização por “electrospray” (ESI¹⁸) é actualmente um método bastante conhecido, sendo considerado o mais eficiente no caso das moléculas em estudo. Consiste num processo de ionização suave, permitindo a formação de iões em fase gasosa através de um processo delicado que torna possível a análise sensível de compostos não-voláteis e termolábeis. Por conseguinte, a utilização da fonte ESI no domínio da espectrometria de massa facilitou enormemente o estudo de biomoléculas de elevado peso molecular, assim como fármacos e os seus

¹⁸ Do inglês, Electrospray Ionization

metabolitos. Assim, a fonte ESI evoluiu com o crescimento da proteómica e com a descoberta de novos fármacos [40].

Numa fonte ESI a substância é introduzida em solução através de uma bomba de seringa ou através do fluxo de eluente de cromatografia líquida. Com taxas de fluxo tipicamente na ordem de 1 mL min^{-1} . O fluxo de solução do analito passa através da agulha de ionização que possui uma alta diferença de potencial (em relação ao contra-eléctrodo), geralmente na faixa de 2.5 – 5.5 kV.

Este processo leva à pulverização das gotas carregadas a partir da agulha com uma carga superficial da mesma polaridade que a carga sobre a agulha. As gotículas são repelidas da agulha em direcção ao analisador e enquanto atravessam o espaço entre a ponta da agulha e o cone, ocorre a evaporação do solvente assistida pelo fluxo do gás. Com a evaporação do solvente a gota encolhe até atingir o ponto em que a tensão superficial não pode mais sustentar a carga (o limite de Rayleigh), ocorrendo então a “explosão de Coulomb” [38].

Isso produz gotas mais pequenas que podem repetir o processo. Este processo depende da carga a que o electrólito está presente no eluente, com uma concentração de pelo menos 0.05 mmol L^{-1} para promover a ESI (figura 2.11) [38].

Os iões produzidos em fase gasosa são posteriormente separados pelo analisador de massa. O objectivo é separar os iões produzidos na fonte de ionização, dependendo em geral da aceleração dos iões e por isso a separação é feita de acordo com a sua razão massa-carga e não em função das suas massas.

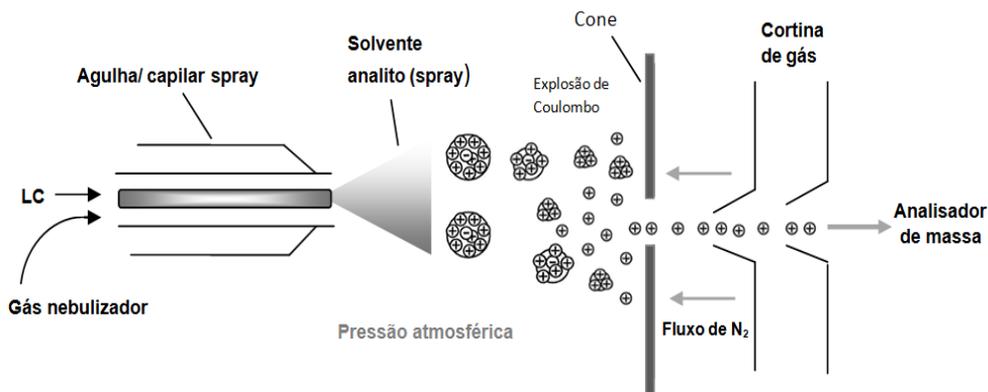


Figura 2.11 - Esquema da ionização por “electrospray” (ESI). Os analitos eluem da coluna de HPLC, e são ionizados na agulha de “electrospray” que possui uma alta diferença de potencial. Este processo leva à pulverização e repulsão das gotas carregadas a partir da agulha e em direcção ao analisador. No espaço entre a ponta da agulha e o cone ocorre a evaporação do solvente assistida pelo fluxo de azoto. Com a evaporação do solvente as gotículas encolhem até ao momento em que ocorre a explosão de Coulombo, e apenas moléculas carregadas (positivamente ou negativamente, a carga depende da sua polaridade e/ou da fonte de ionização) entra no analisador de massa. Adaptado [38].

As três principais características de um analisador são: o limite de massa, a transmissão iónica e o poder de resolução em massa. O limite de massa significa o valor mais elevado de massa que pode ser medido e geralmente é expresso em Thomson ou m/z . A transmissão é a razão entre o número de iões que chegam ao detector e os iões produzidos na fonte. O poder de resolução é a capacidade de produzir dois sinais distintos entre dois iões com uma diferença de massa pequena.

Existem diversos dispositivos para a separação de iões com diferentes valores de m/z e o analisador deve permitir a passagem de um número de iões suficiente para fornecer uma corrente de iões facilmente mensurável. O analisador de massa contido no espectrómetro de massa pode ser de diferentes tipos: quadrupolo, quadrupolo “ion-trap” (QIT¹⁹), “ion-trap” linear (LIT²⁰), “orbitrap”, tempo de voo (TOF²¹) e sector magnético (menos utilizado em aplicações actuais). Os analisadores podem ser divididos em duas grandes classes com bases em várias propriedades, os analisadores digitais que transmitem os iões com diferentes

¹⁹ Do inglês, Quadrupole Ion Trap

²⁰ Do inglês, Linear Ion Trap

²¹ Do Inglês, Time-of-flight

massas sucessivamente ao longo do tempo, como por exemplo, o analisador de quadrupolos e os analisadores ao qual é efectuada a transmissão de todos os iões simultaneamente, ao qual corresponde, por exemplo, o analisador TOF [39].

Outra característica dos analisadores de massa é a capacidade de se poder combinar diferentes analisadores em sequência a fim de aumentar a versatilidade, como por exemplo, instrumentos híbridos. O objectivo dos instrumentos híbridos consiste na combinação dos pontos fortes de cada analisador, evitando a combinação das suas fraquezas. Assim, são obtidos melhores desempenhos com estes instrumentos do que utilizando apenas um analisador isolado [38].

Neste trabalho apenas será considerado um espectrómetro de massa híbrido constituído por um analisador triplo quadrupolo e um analisador “ion-trap”.

Como o nome indica, um analisador de massa quadrupolo consiste em quatro barras paralelas, fixas em corrente continua alternando a rádio frequência (RF) que lhes é aplicada. O intervalo e resolução de massa do instrumento são definidos pelo comprimento e diâmetro das barras. Em termos simples, os iões são focalizados e passam ao longo do meio do espaço entre as barras. O movimento destes depende do campo eléctrico e é realizado de modo a que somente os iões com um determinado valor de m/z entrem em ressonância e assim possam passar para o detector. Todos os outros iões que não entram em ressonância, colidem com as barras e não são detectados [38].

O analisador de quadrupolo, (representado na (figura 2.12), não requer que todos os iões que entram no instrumento tenham a mesma energia cinética, resultando numa elevada sensibilidade. A RF pode variar entre os iões com diferentes valores de m/z , em foco no detector e em diferentes tempos, geralmente de valores mais baixos para valores mais altos de m/z e assim construir o espectro de massa [38].

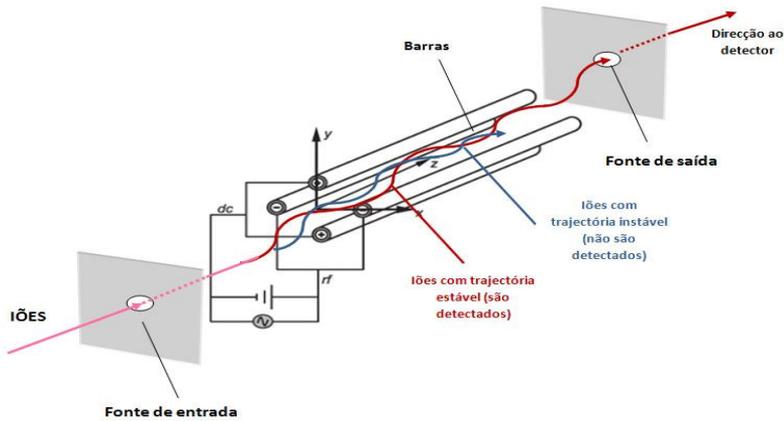


Figura 2.12 - Esquema do diagrama do quadrupolo do espectrômetro de massa. Com um certo valor de potencial DC e um certo valor de RF, os íons com determinado valor m/z possuem uma trajetória estável, passando através das barras até chegarem ao detector. Adaptado [38].

O analisador de massa “ion-trap” linear (LIT), também chamado de armadilha de íons a duas dimensões, é semelhante aos analisadores quadrupolares em que a voltagem da RF é aplicada para produzir uma trajetória de íons oscilando com o auxílio de lentes em ambas as extremidades, para repelir e manter os íons dentro do quadrupolo [41]. No LIT, os íons são aprisionados radialmente pela RF e pela corrente directa (DC²²) axial aplicada às lentes finais. A injeção de íons para o detector ocorre com a combinação entre o movimento radial e axial do ião na saída da armadilha de íons. Portanto, o uso do LIT no terceiro quadrupolo aumenta significativamente a sensibilidade do sistema triplo quadrupolo original e permite que mais do que uma fragmentação seja realizada. Esta captura de íons possui uma trajetória estável de oscilação e o movimento exacto dos íons depende da tensão individual aplicada aos íons com diferentes valores de m/z . Para detectar estes íons o potencial é alterado gradualmente com a destabilização do seu movimento [39]. Os íons são normalmente expulsos por ordem crescente de valor de m/z , num fluxo de íons focado no detector, para produzir um espectro de massa [42].

O poder da MS pode ser potenciado por ligação em série de analisadores de massa (vários estágios MS). Um dos espectrômetros de massa mais usados é o

²² Do inglês, Direct Current

triplo quadrupolo. O primeiro quadrupolo (Q1) é ajustado para os iões de m/z seleccionados, para que no segundo quadrupolo (q2) os iões sejam fragmentados por colisões de alta energia com gás (azoto ou outro tipo de gás de colisão), o terceiro quadrupolo (Q3) é usado para digitalizar os iões fragmentados e permitir a passagem de um ou mais para o detector (figura 2.13). A fragmentação pode ser variada alternando: a natureza do gás de colisão (árgon, hélio ou azoto), a energia de iões emitidos no modo Q1, temperatura e a pressão [38].

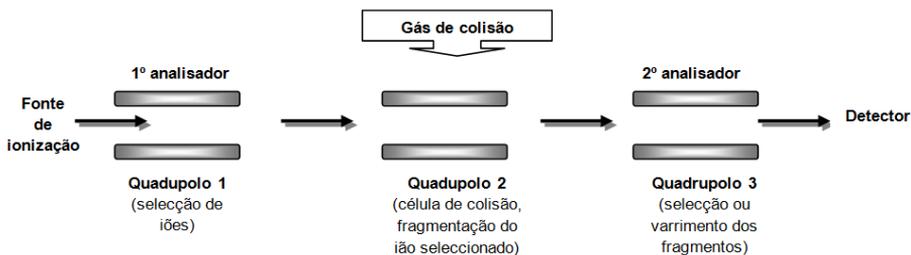


Figura 2.13 – Representação esquemática de um triplo quadrupolo. O primeiro e o último quadrupolo (Q1 e Q3) são os analisadores de massa. O quadrupolo central (q2) é a célula de colisão, utilizando uma elevada pressão para fragmentar os iões. Adaptado [38]

É possível efectuar MS/MS ou MS^n em instrumentos “ion-trap”. Todos os iões são injectados na “ion-trap”, de seguida escolhe-se um ião precursor que será destabilizado e fragmentado, obtendo-se assim um espectro m/z deste ião ao invés de um espectro total formado a partir da fragmentação da molécula precursora [38].

A técnica MS/MS é uma poderosa ferramenta analítica, pois permite a identificação do analito e ao mesmo tempo reduz a dependência do estágio pré-MS da análise [38].

Uma das características dos instrumentos híbridos é que as análises podem ser realizadas em diferentes modos de aquisição de dados. Esta escolha é feita de acordo com a composição da amostra, da mesma forma que é possível otimizar várias transições MS/MS e armazenar os parâmetros relevantes. Um exemplo deste tipo de optimização é a escolha do método monitorização de múltiplas reacções (MRM²³).

Esta técnica, empregue na análise e quantificação de fármacos e dos seus metabolitos, tem como principal característica a capacidade de seleccionar um ião

²³ Do inglês, Multiple Reaction Monitoring

precursor específico, fragmentando-o através da energia de colisão induzida no q2 e finalmente detectar um único fragmento em cada ciclo (figura 2.14). O método MRM é então um método altamente selectivo, pois permite a análise detalhada de um ou mais fragmentos de interesse. Esta abordagem permite uma maior selectividade, sensibilidade, velocidade e quantificação absoluta do analito de interesse [43].

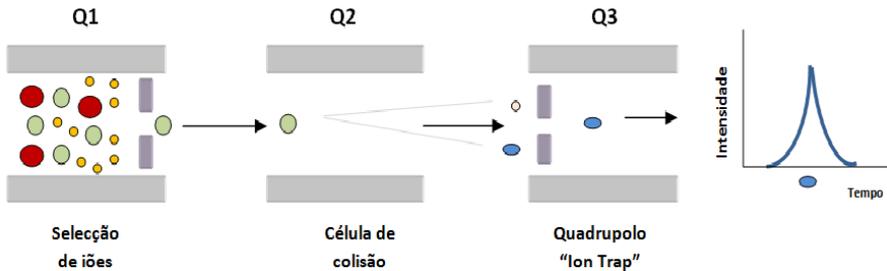


Figura 2.14 - Esquema do diagrama da monitorização de múltiplas reacções (MRM). Um valor específico de m/z é seleccionado no primeiro quadropolo (Q1), o ião seleccionado é fragmentado em (q2) através da energia de colisão e apenas um fragmento específico é seleccionado pelo terceiro quadropolo (Q3).

2.5 Tratamento estatístico

Em quase todos os estudos, são feitas análises estatísticas para uma melhor interpretação dos dados obtidos. O teste de significância entre grupos de controlo e os grupos teste é muito importante para mostrar a validade do conceito de pesquisa [44].

No presente trabalho, pretende-se processar dados relativos a alterações de peso de animais sujeitos a administração de fármacos psicotrópicos, quantificar a presença destes fármacos em córtex e plasma e avaliar a evolução farmacocinética, tendo em conta a importância das interações dos diferentes fármacos no organismo.

Um dos efeitos adversos do tratamento com fármacos psicotrópicos é o aumento de peso [45]. Para uma melhor percepção deste efeito foi efectuada uma análise de evolução do peso dos ratinhos ao longo dos diferentes dias de tratamento com os diferentes fármacos.

O tratamento estatístico destes dados passa por duas vertentes complementares, a análise estatística descritiva e de estimativa e análise multivariada de factores e respectivas interacções.

2.5.1 Testes Estatísticos

A análise estatística de resultados parte de um certo conjunto de pressupostos essenciais e que condicionam drasticamente os resultados, nomeadamente, a ausência de erros sistemáticos, erro aleatório com distribuição normal e erro não correlacionado [46].

2.5.1.1 Procedimento

Os testes estatísticos servem para auxiliar na tomada de decisões e interpretação dos resultados tendo em conta alguns critérios. Qualquer teste estatístico depende do nível de confiança ao qual se pretende tirar conclusões e do número de graus liberdade em cada caso específico [47].

Os testes estatísticos devem ser efectuados com base numa certa sequência lógica de procedimento.

(i) Formulação do problema

Em primeiro lugar, dever-se-á analisar o problema de forma a racionalizar e traduzir a questão experimental para a lógica estatística, ou seja, saber o que se pretende provar.

(ii) Escolha do teste

Com base no que se pretende verificar o teste é escolhido atendendo à distribuição estatística que melhor se adequa a este tipo de teste. As distribuições estatísticas mais comuns para efectuar testes estatísticos são: a distribuição normal, a distribuição *t*-student, a distribuição *F*-Fisher e a distribuição qui-quadrado.

(iii) Estabelecimento do nível da confiança

O nível de significância com o que se pretende tirar conclusões tem que ser estabelecido *a priori*. Permite prever qual o erro máximo admissível para se tirar conclusões erradas por rejeição abusiva (α).

Regra geral, o nível de significância refere-se a $\alpha = 0.05$ podendo também ser inferior com um valor de $\alpha = 0.01$, permitindo tirar conclusões mais definitivas.

No caso de testes que impliquem decisões críticas, tais como escolher o melhor modelo de calibração ou tirar pontos da curva de calibração, o nível de significância de referência é o valor $\alpha = 0.01$.

(iv) Hipóteses de trabalho

A formulação de hipóteses serve para explicar o problema. Estas hipóteses são submetidas a testes, devem ser antagónicas, e universais.

A hipótese nula deve ser formulada no sentido de não haver diferença. A hipótese alternativa incide sobre a diferença significativa. Esta é estabelecida de forma a abranger o universo complementar da hipótese nula [46].

2.5.1.2 Diagnóstico de valores discrepantes

Valores discrepantes são valores que não pertencem a uma determinada distribuição. Dado que as estimativas paramétricas são sensíveis a valores “contaminados”, estes valores “outliers” produzem em geral erros de estimativa quer na posição (enviesamento) quer na dispersão (aumento da imprecisão). Antes de efectuar qualquer estimativa é portanto necessário verificar a presença de valores anómalos ao conjunto de dados em estudo, de modo a evitar erros de estimativa [46].

Existem diversos testes estatísticos que podem ser efectuados, sendo os mais significativos os que comparam a posição do valor duvidoso em relação à estimativa central [46]. De entre os testes mais utilizados conta-se o teste de Grubbs, recomendado pelas normas ISO²⁴. Este teste pressupõe *a priori* que a distribuição em causa é normal [46]. A rejeição abusiva de valores experimentais de

²⁴ Do inglês, International Organization for Standardization

um conjunto de dados não constitui, em geral, um erro muito significativo no caso de o número de valores ser relativamente grande ($m > 10$). Como tal o nível de significância utilizado em geral é de 5% ($\alpha = 0.05$). Um determinado valor pode ser considerado discrepante se a sua distância à estimativa central exceder um valor múltiplo do desvio padrão global. Como hipótese nula (H_0) assume-se que o valor em causa ($x_?$) não difere significativamente da estimativa central. O valor a calcular é:

$$G = \frac{\max |x_i - \bar{x}|}{s_x} = \frac{|x_? - \bar{x}|}{s_x} \quad (2.1)$$

em que \bar{x} é a média e s_x o desvio padrão dos n valores experimentais (incluindo o valor em causa, $x_?$).

Este valor só é excluído se exceder o valor crítico tabelado a 95% de confiança e para n valores experimentais (Anexo A.1) [46].

2.5.1.3 Teste de Normalidade

Os testes estatísticos como a simetria e curtose, usados na caracterização de distribuições permitem tirar conclusões quanto à normalidade, assim como verificar se uma determinada distribuição está em concordância com um comportamento previamente estabelecido [46].

O teste de simetria e curtose assume como hipótese nula que a distribuição é simétrica, o que equivale dizer que a simetria da respectiva variável normalizada ($z_i = (x_i - \mu)/\sigma$) não deve exercer um determinado valor crítico, considera-se a equação correspondente à simetria,

$$\alpha_3 = \left| \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \left(\frac{x_i - \mu}{\sigma} \right)^3 \right| \leq m_{c(z,3)} \Rightarrow \text{aceitar } H_0 \quad (2.2)$$

onde " α_3 " representa o valor de simetria (3º momento da variável normalizada), " x_i " representa o valor experimental, " μ " corresponde ao valor esperado (média aritmética) e " σ " representa o desvio padrão, valores críticos inerentes ao 3º

momento da variável normalizada ($m_{c(z,3)}$) podem ser consultados na tabela em anexo. (Anexo A.2)

O teste de curtose assume como hipótese nula que a distribuição curtose 3 (apresenta um perfil de uma distribuição normal). O que equivale a dizer que a curtose da respectiva variável normalizada deve encontrar-se dentro dos limites. (Anexo A.2)

$$m_{c(z,4)}^L \leq \alpha_4 = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \left(\frac{x_i - \mu}{\sigma} \right)^4 \leq m_{c(z,4)}^U \quad (2.3)$$

onde " α_4 " representa o valor de curtose (4º momento da variável normalizada), " x_i " representa o valor experimental, " μ " corresponde ao valor esperado (média aritmética) e " σ " representa o desvio padrão.

Contudo estes testes só por si, por vezes, conduzem a resultados falsos e pouco conclusivos. Para se testar a normalidade de uma população é conveniente efectuar um teste conjunto de simetria e curtose onde se assume como hipótese nula que a distribuição é normal – simétrica ($\alpha_3 = 0$) e com curtose ($\alpha_4 = 3$),

$$T_{sc} = \frac{(\alpha_3)^2}{Var[\alpha_3]} + \frac{(\alpha_4 - 3)^2}{Var[\alpha_4]} \leq \chi_{\alpha(2)}^2 \quad (2.4)$$

As variâncias dos 3º e 4º momentos normalizados são estimados por,

$$Var[\alpha_3] \approx \frac{6(N-2)}{(N+1)(N+3)} \quad (2.5)$$

$$Var[\alpha_4] \approx \frac{24N(N-2)(N-3)}{(N+1)^2(N+3)(N+5)} = \frac{4 \cdot N(N-3) \cdot Var[\alpha_3]}{(N+1)(N+5)}$$

Através do teste qui-quadrado (χ^2) pode-se caracterizar o tipo de distribuição experimental comparando a frequência dos resultados obtidos com a frequência prevista para uma determinada distribuição. Como hipótese inicial assume-se que a distribuição em causa corresponde à qual se compara. O valor calculado,

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i} = \sum_{i=1}^n \frac{(O_i - n \times p_i)^2}{n \times p_i} \leq \chi_{\alpha}^2(\nu) \quad (2.6)$$

deve ser inferior ao valor crítico da distribuição χ^2 correspondente ($\alpha = 0.05, \nu = n$), onde “ O_i ” representa a frequência dos resultados obtidos e “ E_i ” corresponde à frequência prevista, (Anexo A.3) [46].

Se uma variável apresenta uma distribuição normal, o somatório do quadrado da respectiva variável aleatória normalizada deve seguir uma distribuição qui-quadrado

$$x \sim \mathbb{N}[\mu, \alpha^2] \Rightarrow \sum_{i=1}^n \left(\frac{x_i - \mu}{\sigma} \right)^2 = \sum_{i=1}^n z_i^2 \sim \chi_{(n-1)}^2 \quad (2.7)$$

ou seja, uma distribuição x diz-se normal se, para o nível de confiança de 95%, a correspondente distribuição do quadrado da variável normalizada esteja compreendida entre

$$\chi_{0.95(n-1)}^2 \leq \sum_{i=1}^n z_i^2 \leq \chi_{0.05(n-1)}^2 \quad (2.8)$$

onde, “ z_i ” corresponde à variável normalizada.

2.5.2 Análise de Variância

A Análise de Variância (ANOVA²⁵) é uma ferramenta estatística importante para distinguir as diversas contribuições sobre a variância total observada. A ANOVA permite distinguir dentro da variabilidade total de diversos conjuntos de valores experimentais as contribuições puramente aleatórias e a contribuição sistemática entre amostras. Deste modo, permite verificar se as amostras (ou

²⁵ Do inglês, Analysis of Variance

factores) exercem um efeito significativo fazendo com que estes se sobreponham à componente aleatória contribuindo para diferenças significativas entre si [46].

A ANOVA permite comparar em simultâneo várias médias (níveis diferentes do factor) e estimar as diversas contribuições de variabilidade: puramente aleatória (estimada dentro de cada amostra), variabilidade entre amostras, entre outras.

Como pressupostos assume-se que as distribuições em causa são normais e independentes e que existe homogeneidade de variância (variabilidade interna) [46].

Existem três abordagens diferentes desta análise: ANOVA de uma via ou de factor único, ANOVA de duas vias ou de dois factores sem réplicas e com réplicas.

De um modo geral, a ANOVA de factor único estuda o efeito de um factor (aqui designado A) sobre a variabilidade do sistema em análise, enquanto a ANOVA de factor duplo sem réplicas destina-se a verificar o efeito simultâneo de dois factores (A e B).

Na primeira abordagem, a soma de quadrados total (SS_T) pode ser decomposta nas componentes puramente aleatória (SS_{pe}) e na componente devida ao factor (SS_A),

$$SS_T = SS_{pe} + SS_A \quad (2.9)$$

A ANOVA de factor duplo sem réplicas permite a decomposição da variabilidade total (T) em três componentes: a puramente aleatória (pe), a devida ao factor linha (factor A) e a devida ao factor coluna (factor B) de acordo com a equação,

$$SS_T = SS_{pe} + SS_A + SS_B \quad (2.10)$$

Nestas duas abordagens a matriz de dados deve ser rectangular, sem omissões de valores, e estar organizada em N linhas e M colunas, sendo o número total de valores dado por $N \times M$.

A ANOVA de factor duplo com réplicas permite a decomposição da variabilidade total (T) em quatro componentes: a puramente aleatória (*pe*), devido ao factor linha (factor A), devido ao factor coluna (factor B) e ao termo de interacção entre factores (AB),

$$SS_T = SS_{pe} + SS_A + SS_B + SS_{AB} \quad (2.11)$$

Neste caso a matriz de dados contém o factor A nas linhas e o factor B nas colunas sendo que cada conjunto de Q linhas reflecte o número de réplicas. A matriz de dados é igualmente uma matriz rectangular contendo N×Q linhas e M colunas, sem omissões de valores [46].

2.5.2.1 Factor único

A ANOVA de factor único estuda o efeito de um factor (aqui designado A) sobre a variabilidade do sistema em análise. Segundo esta abordagem estatística, a soma de quadrados total (SS_T) pode ser decomposta nas componentes puramente aleatória (SS_{pe}) e na componente devida ao factor (SS_A),

$$SS_T = SS_{pe} + SS_A \quad (2.12)$$

Dividindo os termos desta equação pelos respectivos graus de liberdade, (N.M-1), (N(M-1)) e (N-1), obtêm-se as variâncias totais, puramente aleatória e devida ao factor

$$\sigma_T^2 = \sigma_{pe}^2 + \sigma_A^2 \quad (2.13)$$

O teste ANOVA pretende verificar se o factor em causa (A) é responsável por introdução de variabilidade nos dados além da contribuição puramente aleatória.

No caso de o factor não possuir efeito, a contribuição do factor em causa aproxima-se da componente puramente aleatória; caso contrário o factor manifesta-se através da sua contribuição específica (σ_A^2), sendo esta superior à contribuição aleatória.

A hipótese nula (H_0) vai no sentido de que o factor não apresenta qualquer efeito sobre a variabilidade observada, enquanto que a hipótese alternativa (H_1) sugere que o factor apresenta efeito sobre a variabilidade observada nos dados.

O valor de prova ($\alpha = p[H_0]$) traduz a probabilidade de aceitação da hipótese nula e fornece uma importante indicação sobre o efeito do factor²⁶ [46].

2.5.2.2 Factor duplo sem réplicas

Esta abordagem destina-se a verificar o efeito simultâneo de dois factores. Neste caso em concreto, a ANOVA permite a decomposição da variabilidade total (T) em três componentes: a puramente aleatória (pe), a devida ao factor linha (factor A) e a devida ao factor coluna (factor B) de acordo com a equação,

$$SS_T = SS_{pe} + SS_A + SS_B \quad (2.14)$$

Dividindo os termos desta equação pelos respectivos graus de liberdade ($N \cdot M - 1$), $N(M-1)$, $(N-1)$ e $(M-1)$ obtêm-se a equação,

$$\sigma_T^2 = \sigma_{pe}^2 + \sigma_A^2 + \sigma_B^2 \quad (2.15)$$

permitindo a individualização de cada uma das contribuições da variabilidade. Deste modo, podem ser testados individualmente os efeitos dos factores A e B, designados de “F”, através das hipóteses:

²⁶ Valores de prova superiores a 0.05 indicam franca aceitação de H_0 enquanto que valores inferiores a 0.01 sugerem a sua rejeição. Valores intermédios revelam que a aceitação de H_0 é dúbia podendo ser utilizado o valor de referência de 0.03 como termo de desempate – superior a 0.03 aceitação dúbia, inferior a 0.03 rejeição dúbia.

A hipótese nula (H_0) vai no sentido de que o factor F não apresenta qualquer efeito sobre a variabilidade observada enquanto que a hipótese alternativa (H_1) sugere que o factor apresenta efeito sobre a variabilidade observada nos dados.

O valor de prova ($\alpha = p[H_0]$) traduz a probabilidade de aceitação da hipótese nula e fornece uma importante indicação sobre o efeito do factor [46].

2.5.2.3 Factor duplo com réplicas

Neste caso a matriz de dados contém o factor A nas linhas e o factor B nas colunas sendo que cada conjunto de Q linhas reflecte o número de réplicas. Neste caso a ANOVA permite a decomposição da variabilidade total (T) em quatro componentes: a puramente aleatória (*pe*), a devida ao factor linha (factor A), a devida ao factor coluna (factor B) e ao termo de interacção entre factores (AB),

$$SS_T = SS_{pe} + SS_A + SS_B + SS_{AB} \quad (2.16)$$

Dividindo os termos desta equação pelos respectivos graus de liberdade (N.M.Q-1), N.M.(Q-1), (N-1), (M-1) e (N-1)(M-1) obtêm-se a equação da variabilidade total (σ_T^2) em função das contribuições dos factores e respectiva interacção

$$\sigma_T^2 = \sigma_{pe}^2 + \sigma_A^2 + \sigma_B^2 + \sigma_{AB}^2 \quad (2.17)$$

onde “*pe*” designa a contribuição puramente aleatória (pure error), “A”, “B” referem-se às contribuições dos primeiro e segundo factores e “AB” é o termo de variabilidade que contabiliza a interacção dos dois factores em estudo, permitindo a individualização de cada uma das contribuições da variabilidade.

De igual modo podem ser testados individualmente os efeitos dos factores A e B e respectiva interacção AB através das hipóteses:

- a hipótese nula (H_0) vai no sentido de que o factor F não apresenta qualquer efeito sobre a variabilidade observada.

- a hipótese alternativa (H_1) sugere que o factor apresenta efeito sobre a variabilidade observada nos dados.

O valor de prova ($\alpha = p[H_0]$) traduz a probabilidade de aceitação da hipótese nula e fornece uma importante indicação sobre o efeito do factor [46].

2.6 Características de validação

A validação de um método analítico confere uma garantia de qualidade operacional e de desempenho analítico. Através deste processo procura-se demonstrar que o método analítico em causa é adequado para a análise de um determinado analito numa certa matriz a um determinado nível de concentração, conduzindo a resultados fiáveis com boa exactidão e precisão [48].

Este processo é fundamental para dar credibilidade ao método analítico desenvolvido. São diversos os passos que envolvem este processo de qualificação entre os quais: curvas de calibração, especificidade e selectividade, linearidade, exactidão, precisão, limite de detecção e limite de quantificação [48].

2.6.1 Curva de calibração

A calibração pretende traduzir através de uma expressão matemática o comportamento dos valores experimentais permitindo não só obter parâmetros que exprimam o seu comportamento, retendo assim, a informação global essencial [data reduction] como prever novas situações [data simulation] e permitir tirar conclusões estatisticamente fundamentais [statistical tests] [46].

Assim, este é o procedimento fundamental para uma análise quantitativa de fenómenos e na sua racionalização.

Os métodos analíticos são essencialmente comparativos – a grandeza medida em laboratórios deve ser relacionada com os respectivos valores de cada padrão utilizado na calibração. Numa fase inicial do trabalho analítico, a resposta do equipamento quantificador (y_i) é avaliada com base na submissão de um certo

conjunto de padrões de concentração conhecida (x_i) que garante a rastreabilidade do processo

$$y_i \simeq \eta_i = f(x_i) \quad (2.18)$$

que representa a curva da calibração.

A quantificação das amostras passa pela situação inversa – com base nos respectivos valores obtidos pelo equipamento (y_i), são estimadas as concentrações (\hat{x}_i) recorrendo à operação inversa da calibração

$$\hat{x}_i = g(y_i) = f^{-1}(x_i) \quad (2.19)$$

Desta forma conclui-se que a calibração deve seguir os critérios estatísticos correctos para evitar desta forma, estimativas incorrectas que inviabilizem o trabalho analítico.

Geralmente, assume-se que o sinal instrumental seja directamente proporcional à concentração dos padrões utilizados. Por esta razão, tem sido utilizada para modelação da resposta analítica com polinómios.

Independentemente do grau do polinómio em causa, estes modelos são lineares (em relação aos seus parâmetros) o que traz grandes vantagens estatísticas – a estimativa por mínimos quadrados estão correctas (posição e dispersão) [46].

Regra geral, a curva de calibração é representada através de polinómios até segundo grau (para situações que apresentam uma ligeira curvatura),

$$\eta(x_i) = \theta_0 + \theta_1 \cdot x_i + \theta_2 \cdot x_i^2 \quad (2.20)$$

embora as situações mais frequentes, envolvam apenas os polinómios de primeiro grau.

$$\eta(x_i) = \theta_0 + \theta_1 \cdot x_i \quad (2.21)$$

2.6.2 Especificidade e selectividade

Em análises farmacológicas, a soma de teste de controlo combinada com a especificidade são usadas para a avaliação [49]. Uma definição mais pragmática e desfazendo a ideia de que muitas vezes estes parâmetros são erradamente tomados como sinónimos quando de facto estes correspondem a conceitos diferentes, a especificidade diz respeito à capacidade que o método analítico possui em responder exclusivamente a um só analito (a uma só espécie), enquanto que a selectividade dá uma indicação da capacidade do método analítico em responder preferencialmente a um determinado analito apresentando no entanto influência de outros componentes da amostra no sinal determinado [49]. Sendo estas características de importância crucial e de base fundamental para um bom procedimento analítico. Sendo assim, estes parâmetros de desempenho estão relacionados com a capacidade de quantificar correctamente um determinado analito na presença de outras substâncias da matriz da amostra.

Em HPLC, estes parâmetros geralmente são avaliados através da capacidade da resolução cromatográfica, da eficiência de separação e do factor de assimetria [46].

Esta técnica subdivide a especificidade de selectividade, de identificação. Que consiste na capacidade de discriminação entre compostos estruturalmente similares; especificidade instrumental, que consiste na capacidade de distinguir sinais muito próximos (ex: dificuldade na resolução de sinais sobrepostos, distinção sinal/ruído, etc); e impurezas – contribuição devidas à presença de outras espécies [46].

2.6.3 Linearidade

A dependência da linearidade em relação ao sinal da concentração do analito é amplamente relevante em análises farmacocinéticas. A linearidade de um procedimento analítico é a sua capacidade (dentro de um determinado intervalo) para obter resultados directamente proporcionais à concentração (quantidade) do analito da amostra [49].

A correlação entre o sinal medido (área ou altura do pico) e a concentração da espécie a ser quantificada, muito raramente é conhecida *a priori*. Na maioria dos

casos, a relação matemática entre o sinal e a concentração da espécie de interesse deve ser determinada empiricamente a partir dos sinais medidos para as concentrações conhecidas desta espécie. Esta relação matemática pode ser expressa por uma equação de recta, designada de curva de calibração [50].

A variável da linearidade pode então, ser descrita pelas expressões matemáticas $y = f(x)$, se a linha recta atravessar a origem ou pela expressão $y = f(x) + \delta$, se a linha recta não atravessar a origem.

A expressão $y = f(x) + \delta$ pode ser reescrita como:

$$\hat{y}_i = \phi x_i + \delta \quad (2.22)$$

onde \hat{y}_i e x_i representam a resposta estimativa experimental e a concentração analítica respectivamente e ϕ e δ representam a sensibilidade da análise e a intercepção respectivamente [51].

Embora somente dois pontos definam uma recta, na prática a linha deve ser composta por um mínimo de cinco pontos e não incluir o ponto zero na curva, devido a possíveis erros associados. Numa curva de calibração, a linearidade é verificada através da análise do valor do coeficiente de correlação (R^2), este parâmetro permite uma estimativa de qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1.0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor é a incerteza. No entanto, é extremamente importante ressaltar que não existe um " R^2 - teste" para verificar a linearidade da calibração, isto é, não é possível dizer que $R^2 = 0.999$ é mais linear que $R^2 = 0.997$ [51].

2.6.4 Exactidão

Representa o grau de concordância entre o valor experimental, obtido por medições repetidas e o valor de referência estabelecido como verdadeiro [50]. Tem sido apontado que a exactidão é um dos aspectos cruciais em qualquer método analítico. A determinação deste parâmetro permite estimar o grau de erros sistemáticos que afectam em método em particular [51].

O valor obtido (μ) em geral refere-se a uma estimativa paramétrica para um grande número de medições ($n \rightarrow \infty$),

$$\mu = \lim_{n \rightarrow \infty} (\hat{L}) \quad (2.23)$$

em que \hat{L} representa uma estimativa do valor central da população L_i obtido através de uma amostra de pequenas dimensões ($n \ll \infty$),

$$\hat{L} = E [L_i] \quad (2.24)$$

A exactidão mede a proximidade do valor obtido (μ) em relação ao valor correcto (valor correcto, que pode ser o valor real ou um valor tomado como referência) (τ) e pode ser diagnosticada através de:

Erro absoluto (Δ) - diferença entre o valor obtido e o valor correcto,

$$\Delta = \mu - \tau \quad (2.25)$$

Erro relativo (%RE) – quociente entre o erro absoluto e o valor correcto

$$\%RE = 100 \times \frac{\Delta}{\tau} = 100 \times \left(\frac{\mu - \tau}{\tau} \right) \quad (2.26)$$

Taxa de recuperação (%RI) – uma amostra contendo o teor inicial X_0 é dopada com o teor X_{add} ,

$$\%RI = 100 \times \left(\frac{X_{found} - X_0}{X_{add}} \right) \quad (2.27)$$

As taxas de recuperação próximas de 100% indicam a ausência de erros sistemático.

A exactidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança, ou seja, encontra-se sempre associada a valores de precisão).

O número de ensaios varia segundo a legislação adoptada e também com as características de pesquisa. A ICH²⁷ recomenda um mínimo de nove réplicas e três níveis de concentração (baixo, intermédio e alto) para estimar a exactidão do método. Os resultados devem ser convertidos em erro relativo ou devem ser representados numa carta de controlo com indicações do intervalo de confiança a 95%. Esta carta de controlo reflecte a concordância entre a média de uma série de resultados de vários ensaios e um valor de referência [46].

2.6.4.1 Materiais de referência certificados

Há diversos tipos de materiais de referência que podem ser adquiridos no mercado de reagentes analíticos para permitir efectuar a avaliação da exactidão do método analítico, estes materiais correspondem a uma substância com uma ou mais propriedades suficientemente bem estabelecidas para serem utilizadas na calibração de equipamentos [46].

Os materiais de referência certificados (CRM²⁸) são materiais de referência acompanhados de um certificado, emitido pelo organismo que o preparou, que possui um valor de concentração de uma dada substância, ou uma grandeza para cada parâmetro e uma incerteza associada, sendo por isso um processo tecnicamente válido e rastreável [46].

Os CRM são fornecidos por organismos e confiáveis, tais como:

- NIST (National Institute of Standards and Technology, USA);
- NSB (National Bureau of Standards, USA);
- IRMN (Institute for Reference Materials and Measurements, UE);
- EPA (Environmental Protection Agency, USA)
- NWR (National Water Research, Can);
- LGC.

O valor obtido na análise de um CRM deve ser comparado com o valor do respectivo certificado, e encontra-se dentro do intervalo de incerteza deste.

²⁷ Do inglês, International Conference on Harmonisation

²⁸ Do inglês, *Certified Reference Materials*

2.6.4.2 Comparação de métodos

Consiste na comparação dos resultados obtidos empregando-se o método em desenvolvimento e os resultados conseguidos através de um método de referência, avaliando assim o grau de proximidade entre os resultados obtidos pelos dois métodos, ou seja, o grau de exactidão do método testado em relação ao de referência [50].

As análises são efectuadas em duplicata, utilizando os dois métodos em separado (o método em desenvolvimento e o método de referência), sobre as mesmas amostras, numa faixa de concentrações ao qual se pretende validar o método [50].

2.6.4.3 Ensaios de recuperação

Os testes de recuperação permitem avaliar a exactidão do método de um modo muito vantajoso, sem recorrer a materiais certificados, utilizando apenas soluções de padrão da amostra. Assim, é possível testar a resposta na presença da própria matriz da amostra em causa, situação esta, que é vantajosa, uma vez que normalmente não existem materiais certificados com matrizes idênticas ou similares aquela em que estamos interessados[46].

Através da representação gráfica da concentração recuperada em função da concentração adicionada, obtêm-se a variação linear que pode ser ajustada por um polinómio de primeiro grau conhecido por função de recuperação.

$$x_{rec} = a_f + b_f \times x_{add} \quad (2.28)$$

Esta função permite uma interpretação do tipo de erros sistemático cometido no método: a ordenada na origem (a) está relacionada com um erro sistemático constante, enquanto que, o declive (b) está relacionado com um erro sistemático proporcional [46].

2.6.5 Precisão

A precisão é o método analítico que indica o grau de concordância entre os valores obtidos com as repetições de medições de ensaios analíticos sob condições específicas. A determinação deste parâmetro é um dos passos básicos do processo para alcançar a repetibilidade e a reprodutibilidade do método de validação [51].

Avaliar a precisão implica expressar numericamente o erro aleatório ou o grau de dispersão de um conjunto de medições individuais por meio do desvio padrão (s),

$$s = \sqrt{\frac{SS}{v}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (L_i - \bar{L})^2}{(n - 1)}} \quad (2.29)$$

e coeficiente de variação (%CV)

$$\%CV = 100 \times \frac{s}{\bar{L}} \quad (2.30)$$

A ICH recomenda a determinação de três níveis de precisão: repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade [46].

2.6.5.1 Repetibilidade

A repetibilidade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efectuadas sobre as mesmas condições de medição, chamadas condições de repetibilidade, isto é, mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo equipamento usado sob as mesmas condições, mesmo local e repetições em curtos intervalos de tempo [50].

O número mínimo de réplicas para efectuar um teste de repetibilidade deve ser superior a dez e estas devem cobrir a gama de trabalho. A ICH recomenda efectuar este estudo pelo menos a três tipos de concentração: baixa, intermédia e alta [46].

2.6.5.2 Precisão intermediária

A precisão intermédia refere-se a uma estimativa de dispersão que não pode ser classificada como repetibilidade nem como reprodutibilidade [46].

Indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias, diferentes analistas, diferentes equipamentos ou a combinação destes factores [50].

Esta análise é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório e, como tal, é a mais aconselhável a ser adoptada, sendo assim, o objectivo da validação da precisão é verificar se no mesmo laboratório o método utilizado fornece os mesmos resultados.

2.6.5.3 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade refere-se à dispersão de resultados do método e é obtida através de estudos interlaboratoriais, reflectindo erros aleatórios de quantificação à escala mundial [50].

Sendo este um teste que apenas é possível em estudos de colaboração entre laboratórios, permite avaliar a concordância dos resultados entre ensaios dependentes e/ou independentes sobre a mesma amostra e/ou padrão em condições operacionais muito bem definidas. A reprodutibilidade traduz assim, a precisão do método quando efectuado sob condições variadas (mudança de operador, local, equipamento, etc.) e deve ser considerada em situações como a padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos, como por exemplo, farmacopeias [46].

É uma medida da imprecisão global do método analítico dado que é obtida através dos resultados publicados por diversos laboratórios independentes que executam esse mesmo método, em condições operacionais similares, efectuando análises sobre o mesmo conjunto de amostras [46].

2.6.6 Limite de detecção (LOD)

O limite de detecção (LOD²⁹) é comumente definido como a menor quantidade de analito numa amostra e que possa ser confiavelmente detectado, mas não necessariamente quantificada por um método analítico específico [51].

Este valor limite de concentração permite a detecção do analito, no entanto a quantificação poderá estar sujeita a erros significativos, assim esta concentração limite é essencialmente específica para verificar a presença/ausência do analito na amostra [46].

O LOD pode ser estimado através de:

- (i) Método visual – é utilizado para determinar o limite de detecção utilizando a matriz com adição de concentrações conhecidas da substância de interesse, de tal modo que se possa fazer a distinção entre o ruído de sinal analítico pela visualização da menor concentração visível (detectável) [50].
- (ii) Réplicas de brancos ($m_B \geq 10$) - estimativa do valor médio do sinal do branco (\bar{y}_B) e respectivo desvio padrão ($s_{\bar{y}_B}$).

$$X_{LD} = G (\bar{y}_B + 3.3 \times s_{\bar{y}_B}) \quad (m_B \geq 30) \quad (2.31)$$

$$X_{LD} = G (\bar{y}_B + 2 \times t_{\alpha(m_B-1)}^u \times s_{\bar{y}_B}) \quad (m_B < 30) \quad (2.32)$$

- (iii) Equação da curva de calibração – recorrendo ao valor de intercepção da recta e respectiva incerteza

$$X_{LD} = G (\theta_0 + 3.3 \times s_{\bar{y}_B})$$

²⁹ Do inglês, Limit of Detection

- (iv) Estimativa com base no desvio padrão residual (σ_{fit}) do ajuste da curva de calibração através de mínimos quadrados e a sensibilidade (dY/dX),

$$X_{LD} = 3.3 \times \frac{\sigma_{fit}}{(dY/dX)} \quad (2.33)$$

- (v) Quociente sinal/ruído da linha de base – concentração que corresponde a um sinal proporcional a um determinado factor do quociente sinal/ruído (em geral 3/1) [46].

2.6.6 Limite de Quantificação (LOQ)

O limite de quantificação (LOQ³⁰) é definido como a menor concentração de analito que pode ser detectado com um nível aceitável de precisão e exactidão [51].

É de ressaltar que a determinação do LOQ representa um compromisso entre as concentrações, a precisão e a exactidão exigidas. Isto significa que, quando se descreve o nível de concentração do LOQ, a medição torna-se menos precisa.

À semelhança do LOD, também o LOQ pode ser determinado de várias formas:

- (i) Método visual
- (ii) Réplicas de brancos ($m_B \geq 10$) - é a concentração de analito capaz de originar um sinal equivalente a,

$$X_{LQ} = G (\bar{y}_B + 10 \times s_{\bar{y}_B}) \quad (m_B \geq 30) \quad (2.34)$$

$$X_{LQ} = G (\bar{y}_B + 6 \times t_{\alpha(m_B-1)} \times s_{\bar{y}_B}) \quad (m_B < 30) \quad (2.35)$$

³⁰ Do inglês, Limit of Quantitation

- (iii) Equação da curva de calibração - estimativa com base no desvio padrão residual (σ_{fit}) e a sensibilidade (dY/dX),

$$X_{LQ} = 10 \times \frac{\sigma_{fit}}{(dY/dX)} \quad (2.36)$$

- (iv) Quociente sinal/ruído da linha de base – concentração que corresponde a um sinal proporcional a um determinado factor do quociente sinal/ruído (em geral 10/1) [46].

Cap. 3

Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

Este capítulo contém toda a informação pertinente sobre o trabalho desenvolvido no que diz respeito aos materiais, equipamentos, procedimentos e métodos desenvolvidos.

3.1 Materiais

Sendo um trabalho de cariz analítico, foram utilizados balões volumétricos de 25 mL classe A, tubos de 1.5 mL e 2 mL (VWR[®]) e *Vials* 0.3 mL (VWR[®]). Relativamente ao material de pesagem foram utilizadas espátulas.

3.2 Reagentes

Todos os reagentes utilizados na preparação de soluções eram quimicamente puros, nomeadamente: metanol (CH₃OH, Mw = 32.04 g/mol, Sigma-Aldrich), água Milli-Q purificada pelo equipamento Biocel, série FSKN82851F, TEAB³¹ (Sigma-Aldrich), inibidores de fosfatases (Roche) e inibidores de proteases (Roche).

Os fármacos utilizados foram: clozapina (C₁₈H₁₉ClN₄, Mw = 326.82 g/mol, BIOTREND, Chemical AG), citalopram (C₂₀H₂₁N₂FO, Mw = 324.39 g/mol, BIOTREND, Chemical AG) e haloperidol (C₂₁H₂₃ClFNO₂, Mw = 375.90 g/mol, BIOTREND, Chemical AG). Como padrões internos foram utilizados a desipramina (C₁₈H₂₂N₂, Mw = 266,38 g/mol, Sigma-Aldrich) e haloperidol – D4 (C₂₁H₁₉D₄ClFNO₂, Mw = 379.84 g/mol, LGC Standard)

Os reagentes utilizados na fase móvel, eram quimicamente puros, nomeadamente: ácido fórmico (CH₂O₂, Mw = 46.03 g/mol, Fluka), acetonitrilo (C₂H₃N, Mw = 41.05 g/mol, Riedel de Haën LC-MA) e água (Sigma-Aldrich).

³¹ Do inglês, Triethylammonium bicarbonate buffer

3.3 Equipamentos

No desenvolvimento deste trabalho foram utilizados os seguintes equipamentos para a preparação de soluções e processamento das amostras: balança analítica CP 124S (Sartorius); micropipetas *Research Plus* (Eppendorf); Vortex IKA® modelo MS3 basic; microcentrifuga, modelo QS 7000 (Edward Instrument Co), centrifuga *Mini Spin Plus* (Eppendorf); evaporador rotativo *Concentrador Plus/Vacufuge® Plus* (Eppendorf); thermomixer *comfort* (Eppendorf) e um sonicador, modelo Vibra cell 75041 (Bioblock Scientific).

Para análise das amostras foi utilizado um sistema LC Ultimate™ 3000 (LC Packings, Dionex) acoplado a uma fonte ESI Turbo V e a um espectrómetro de massa híbrido triplo quadrupolo/linear “ion-trap” 4000 QTrap, operado através do sistema “Analyst 1.5” (Applied Biosystems/MDS Sciex).

3.4 Procedimentos e métodos

Nesta secção encontra-se a descrição dos métodos utilizados no decorrer do trabalho, para o desenvolvimento do método analítico para a quantificação de fármacos psicotrópicos em córtex e em plasma de animais.

3.4.1 Tratamento dos animais

Para este estudo foram utilizados ratinhos adultos C57BL/6J (Charles River, Laboratories International, Inc.). Os animais com pesos compreendidos entre 18.0 – 28.4 g ($n = 105$), encontravam-se alojados em grupos de cinco por caixa com *ad libitum* acesso a comida e água.

Os animais foram injectados intraperitonealmente com medicação psicotrópica (clozapina, citalopram e haloperidol) e uma solução controlo de soro fisiológico (0.13% HCl a 5 M) por períodos de 1, 2, 4, 8, 15 e 30 dias. Cada grupo de tratamento era composto por cinco ratinhos para cada fármaco. Antes da fase de exposição à medicação, os animais sofreram um período de habituação correspondente a uma semana. No início da administração de cada fármaco, cada animal passou a estar alojado individualmente numa caixa [52].

O haloperidol e a clozapina foram administrados a 1 mg/kg e 20 mg/kg de peso corporal respectivamente [52-53]. O citalopram foi administrado a 10 mg/kg de peso corporal [54].

3.4.2 Preparação das soluções dos fármacos injectados nos ratinhos

Foram preparadas por três vezes, soluções padrão de 5 mL para cada um dos fármacos (clozapine 100 mM, citalopram 50 mM e citalopram 10 mM) (BIOTREND, Chemical AG) em etanol absoluto. Tendo sido necessário aquecer as soluções de haloperidol e citalopram até 60 °C para uma total dissolução.

As soluções de concentração final que foram administradas aos animais foram diluídas em 0.13% de HCl a 5 M e soro fisiológico. Os cálculos foram efectuados de forma a se administrar um volume final de 100 µL para cada animal com 25 g.

3.4.3 Recolha dos Tecidos

Após os diferentes tempos de exposição, os animais foram anestesiados com Ketamina e Xilazina [53].

Depois de anestesiado, o animal foi colocado sobre uma placa de esferovite. Posteriormente, foi colhido sangue por punção cardíaca e colocado num tubo com anticoagulante. Centrifugou-se durante dois minutos a $12\ 000 \times g$. Pipetou-se o sobrenadante (plasma) para outro tubo com anticoagulante medindo a quantidade onde posteriormente adicionaram-se os inibidores de proteases e fosfatases, dependendo do volume do plasma. As amostras foram colocadas em tubos com K₂EDTA.

Para a recolha do córtex, foi retirado o cérebro e colocou-se em papel de alumínio. Com o auxílio de um bisturi e uma pinça de pontas curvas, isolou-se o córtex pré-frontal. Estas amostras foram colocadas em solução TEAB (500 mM) com inibidores de proteases e fosfatases.

Todas as amostras foram colocadas em azoto líquido até serem armazenadas no sistema de congelação a -80 °C.

Seguindo um programa de tratamento, as primeiras amostras a serem recolhidas foram as do grupo correspondente ao dia 4, seguindo-se a recolha do

grupo de dia 8, posteriormente procedeu-se à colheita do grupo do dia 15, seguindo-se o grupo do dia 2 e por fim, a recolha do grupo do dia 1.

3.4.4 Preparação das soluções de inibidores de fosfatase e protease

As soluções com inibidores de fosfatases e proteases (Roche) foram preparadas de acordo com as instruções do fabricante:

Preparação de solução de inibidores de proteases: (25 vezes concentrada) = 1 comprimido + 2 mL água Milli-Q.

Preparação de solução de inibidores de fosfatases: (10 vezes concentrado) = 1 comprimido + 1 mL água Milli-Q.

3.4.5 Preparação de soluções para o desenvolvimento do método analítico

Foram preparadas soluções padrão para cada um dos fármacos (clozapina, citalopram e haloperidol) e para os respectivos padrões internos (haloperidol – D4 e desipramina).

3.4.5.1 Preparação da solução de clozapina

Pesou-se 7.8 mg de clozapina (BIOTREND, Chemical AG) ($M_w = 326.82 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, grau de pureza 99.03%). A solução foi preparada em metanol (Sigma-Aldrich) num balão volumétrico de 25 mL, de seguida foi distribuída por tubos de 1.5 mL e armazenada a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. ($C_{\text{final}} = 312 \text{ }\mu\text{g/mL}$).

3.4.5.2 Preparação da solução de citalopram

Pesou-se 4.7 mg de citalopram “hydrobromide” (BIOTREND, Chemical AG) ($M_w = 405.30 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, grau de pureza 99.80%). A solução foi preparada em água num balão volumétrico de 25 mL, posteriormente foi aquecida para uma melhor dissolução, de seguida foi distribuída por tubos de 1.5 mL e armazenada a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. ($C_{\text{final}} = 188 \text{ }\mu\text{g/mL}$).

3.4.5.3 Preparação da solução de haloperidol

Pesou-se 3.3 mg de haloperidol (BIOTREND, Chemical AG) ($M_w = 375.86 \text{ g.mol}^{-1}$). A solução foi preparada em metanol (Sigma-Aldrich, Química S.A) num balão volumétrico de 25 mL, de seguida foi distribuída por tubos de 1.5 mL e armazenada a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. ($C_{\text{final}} = 132 \text{ } \mu\text{g/mL}$).

3.4.5.4 Preparação da Solução de desipramina

Pesou-se 9.7 mg de desipramina “hydrobromide” (Sigma-Aldrich) ($M_w = 309.9 \text{ g.mol}^{-1}$, grau de pureza 98%). A solução foi preparada em água num balão volumétrico de 25 mL, de seguida foi distribuída por tubos de 1.5 mL e armazenada a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. ($C_{\text{final}} = 388 \text{ } \mu\text{g/mL}$).

3.4.5.5 Preparação da solução de haloperidol-D4

A solução de haloperidol-d4 (LGC Standads) ($M_w = 380.10 \text{ g.mol}^{-1}$) já se encontrava preparada. De acordo com o folheto do fabricante foi preparada em 1 mL de metanol. ($C_{\text{final}} = 0.10 \text{ mg/mL}$).

3.4.5.6 Preparação da solução TEAB

Foi preparada uma solução TEAB 0.5 M através de uma diluição 1:1 a partir de uma solução padrão de concentração 1.0 M.

3.5 Curvas de calibração

Os fármacos foram quantificados utilizando curvas de calibração com dez concentrações conhecidas: 3; 10; 50; 100; 250; 500; 1000; 2500; 5000 e 7000 nM. Estas soluções foram preparadas a partir de diluições das soluções padrão de cada fármaco. A cada uma das soluções conhecidas foi adicionado 50 μL de solução de padrão interno (haloperidol-D4 e desipramina a $0.5 \text{ } \mu\text{M}$).

3.5.1 Adição de padrão interno

O método de padronização interna consiste na preparação de soluções padrão de concentrações conhecidas da substância de interesse, às quais se adiciona a mesma quantidade conhecida de um composto chamado padrão interno [50].

Após análise instrumental dessas soluções, procedesse à análise através da representação gráfica, representando a razão das áreas (área da substância/área do padrão interno que tem concentração constante) com a concentração (variada) da substância de interesse, este processo é designado por curva de calibração. A amostra também é analisada após a adição da mesma quantidade conhecida do padrão interno. Através da razão de áreas obtidas no cromatograma obtém-se a concentração da substância na amostra [50].

Um bom padrão interno apresenta as seguintes características: deve ser semelhante à substância a ser quantificada, possuir um tempo de retenção próximo da substância, não reagir com a substância ou outro componente da matriz, deve ser estável nas condições da análise, não pode co-eluir com outros componentes da amostra (analitos ou impurezas). Este último requisito não é necessário quando a detecção é feita por espectrometria de massa, na qual cada composto produz um espectro característico. O método de padronização interna é extremamente útil, e surge para compensar vários tipos de erros sistemáticos.

3.6 Processo de extracção de córtex

A cada amostra de córtex com pesos compreendidos entre 23.6 mg e 78.8 mg foram adicionados 50 μ L de padrão interno (haloperidol-D4 a 1 μ M e desipramina a 6 nM) e 150 μ L de TEAB a 0.5M. Efectuou-se a precipitação de proteínas através da adição de 3 volumes de metanol. A amostra foi rapidamente agitada com a ajuda de um vórtex e centrifugada durante 10 min a $14.000 \times g$. Posteriormente foi recolhido o sobrenadante para um novo tubo, e colocado no evaporador rotativo a uma temperatura de 45 °C até ocorrer a evaporação total do solvente.

Posteriormente a amostra foi ressuspensa em 100 μL de água e centrifugada durante 2 min a $14.000 \times g$. Sendo posteriormente injectado 1 μL no sistema LC-MS/MS [55-56].

3.7 Processo de extracção de plasma

A 100 μL de cada amostra de plasma de ratinho foram adicionados 25 μL de padrão interno (haloperidol-D4 e desipramina a 0.5 μM). Efectuou-se a precipitação de proteínas através da adição de 3 volumes de metanol. A amostra foi rapidamente agitada com a ajuda de um vórtex, seguindo-se uma agitação contínua durante 5 min a 1000 rpm's e de seguida uma centrifugação durante 10 min a $14.000 \times g$. De seguida, foi recolhido o sobrenadante para um novo tubo, e colocado no evaporador rotativo a uma temperatura de 45 $^{\circ}\text{C}$ até o solvente evaporar totalmente.

Posteriormente a amostra foi ressuspensa em 50 μL de água, para uma melhor dissociação das partículas, a amostra foi colocada no sonicador durante 1 min a 20% amplitude e centrifugada durante 2 min a $14.000 \times g$. Sendo posteriormente injectado 19 μL no sistema LC-MS/MS [55].

3.8 Condições Operacionais do HPLC

As análises cromatográficas foram realizadas num sistema LC Ultimate™ 3000 (LC Packings, Dionex). Nos primeiros testes optou-se por usar uma coluna ACCLAIM Polar Advantage II C18 (150 \times 2.1 mm, 3 μm). O fluxo cromatográfico foi definido a 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ e o tempo de corrida de 11 min.

Para a análise das amostras biológicas, córtex e plasma, foi utilizando uma coluna GEMINI C18 (50 \times 2.0 mm, 3 μm) e uma coluna de guarda GEMINI C18 (4 \times 3 mm). O fluxo cromatográfico foi definido a 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ e o tempo de corrida de 11 min.

A separação dos componentes foi realizada de igual forma para ambos os tecidos, em modo gradiente, com mistura das soluções de 0.1% de ácido fórmico em água (fase móvel A) e de 0.1% de ácido fórmico em acetonitrilo (fase móvel B) de acordo com o programa descrito na tabela 3.1.

Após a injeção de cada uma das amostras, foi injectado um branco para a limpeza do sistema, à semelhança das amostras, também o branco foi injectado em modo gradiente com tempo de corrida de 9 min, seguindo o programa descrito na tabela 3.2.

As análises das amostras foram realizadas com injektor automático à temperatura de 5 °C.

Tabela 3.1 - Composição da fase móvel para o tempo de corrida definido para a análise de amostras.

Tempo de corrida (min)	Composição da Fase Móvel (% v/v)	
	Fase Móvel A	Fase Móvel B
0.0	98.0	2.0
10.5	50.0	50.0
11.0	0.0	100.0

Tabela 3.2 - Composição da fase móvel para o tempo de corrida definido para o branco.

Tempo de corrida (min)	Composição da Fase Móvel (% v/v)	
	Fase Móvel A	Fase Móvel B
0.0	0.0	100.0
1.9	0.0	100.0
2.0	98.0	2.0
9.0	98.0	2.0

3.9 Condições operacionais do espectrómetro de massa

O sistema LC encontra-se acoplado a uma fonte ESI Turbo V e a um espectrómetro de massa híbrido triplo quadrupolo/linear “ion-trap” 4000 QTrap, operado através do sistema “Analyst 1.5” (Applied Biosystems/MDS Sciex).

Na análise de córtex, a fonte de ionização operou em modo positivo definida a 5500 V, o gás nebulizador 1 (GS1) foi de 35 psi, o gás nebulizador 2 (GS2) foi de 40 psi e a temperatura de 600 °C.

No caso do plasma, a fonte de ionização operou em modo positivo a 3000 V, o gás nebulizador 1 (GS1) foi de 35 psi, o gás nebulizador 2 (GS2) foi de 50 psi e a temperatura de 600 °C.

Os fármacos foram quantificados utilizando o método de monitorização de múltiplas reacções (MRM), adquirido no modo triplo quadrupolo, à resolução de uma unidade, tanto em Q1 como Q3. Os parâmetros do espectrómetro de massa foram os mesmos para todas as transições MRM: cortina de gás (CUR) 30 psi, potencial de entrada (EP) 10 eV, célula de colisão de potencial de saída (CXP) 10 eV e o gás de colisão (CAD) 6 psi.

As transições MRM foram adquiridas de acordo com diferentes energias de colisão (CE) (tabela 4.33).

As áreas dos picos foram integradas usando o programa MultiQuant v2.0.2 (Applied Biosystems).

Cap. 4

Resultados e discussão

4. Resultados e discussão

Neste capítulo serão apresentados os resultados experimentais obtidos, bem como as respectivas estimativas e discussões quando pertinentes.

Cada animal foi submetido a uma dose diária de 4 $\mu\text{L/g}$ do respectivo fármaco (desde o dia zero d0).

As experiências (inoculações) decorreram durante um período de 30 dias após a fase inicial de adaptação dos animais em cativeiro isolado.

Nos dias programados (1, 2, 4, 8, 15 e 30) foram pesados e sacrificados animais para recolha de amostras de córtex e plasma.

Sendo que cada animal tem uma massa corporal própria, as comparações em termos de massa foram efectuadas com valores normalizados em relação ao dia 0 (d0). Deste modo, as variações em massa passam a ser grandezas relativas.

4.1 Teste simultâneo de simetria e curtose

Para verificar se a distribuição em estudo está em concordância com a componente previamente estabelecida, realizou-se o teste simultâneo de simetria e curtose para tirar conclusões sobre a normalidade dos dados em estudo.

O teste foi efectuado para os diferentes dias de tratamento (1, 2, 4, 8, 15 e 30) de acordo com os diferentes fármacos (clozapina, haloperidol e citalopram) e solução veículo (soro fisiológico). Os resultados inerentes ao teste simultâneo de simetria e curtose encontram-se descritos na tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Resultados obtidos para o teste simultâneo de simetria e curtose.

		controle	clozapina	haloperidol	citalopram
Dia 1	N	32	35	30	34
	α_3	0.093	0.495	-0.126	-0.338
	α_4	1.419	2.722	-0.138	0.236
	Var (α_3)	0.156	0.145	0.164	0.148
	Var (α_4)	0.474	0.450	0.490	0.458
	Tsc	4.306	18.152	0.136	0.893
Dia 2	N	38	40	39	39
	α_3	-1.660	0.575	-0.249	0.113
	α_4	3.237	0.256	-0.440	-0.374
	Var (α_3)	0.135	0.129	0.132	0.132
	Var (α_4)	0.429	0.415	0.422	0.422
	Tsc	44.862	2.716	0.927	0.430
Dia 4	N	27	27	30	29
	α_3	-0.293	-0.109	-0.126	-0.074
	α_4	-1.060	-0.411	-0.138	0.074
	Var (α_3)	0.179	0.179	0.164	0.169
	Var (α_4)	0.517	0.517	0.490	0.499
	Tsc	2.656	0.393	0.136	0.043
Dia 8	N	23	22	25	24
	α_3	-0.176	-0.241	-0.162	0.105
	α_4	-0.363	-0.983	-0.251	-0.691
	Var (α_3)	0.202	0.209	0.190	0.196
	Var (α_4)	0.553	0.562	0.535	0.544
	Tsc	0.392	2.000	0.256	0.935
Dia 15	N	18	16	20	19
	α_3	0.362	0.463	-0.212	-0.311
	α_4	-0.879	-0.354	-0.474	0.024
	Var (α_3)	0.241	0.260	0.224	0.232
	Var (α_4)	0.595	0.606	0.579	0.587
	Tsc	1.845	1.029	0.588	0.417
Dia 30	N	13	8	15	14
	α_3	0.498	-1.060	0.254	0.846
	α_4	0.133	1.780	-0.659	0.917
	Var (α_3)	0.295	0.364	0.271	0.282
	Var (α_4)	0.608	0.497	0.609	0.610
	Tsc	0.870	9.464	0.951	3.912

onde, N – representa o número de animais, α_3 – simetria; α_4 – curtose; T_{sc} – teste simultâneo de simetria e curtose; $\chi^2_{0.05} = 5.991$ – valor crítico para um nível de confiança de 95% e $\chi^2_{0.01} = 9.221$ – valor crítico para um nível de confiança de 99%.

Pela análise dos resultados apresentados na tabela 4.1 verifica-se que os dados em estudo possuem uma distribuição normal, cerca de 91%. Verificada a normalidade dos dados é possível proceder ao estudo mais detalhado recorrendo a um teste paramétrico correspondente ao teste ANOVA.

4.2 Análise da evolução do peso

Nesta fase inicial, apenas será analisada a evolução do peso relativo dos animais submetidos aos diferentes tratamentos.

4.2.1 Grupo controlo (CT)

Considerando como referência a pesagem do respectivo animal no dia 0 (d0), foi estimada a evolução do seu peso relativo referente ao dia 1 (d1), valores descritos na tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Valores obtidos para o grupo CT, referentes ao primeiro dia de tratamento (38 animais).

d0	d1														
1.00	0.98	1.00	0.98	1.00	0.99	1.00	0.96	1.00	0.99	1.00	0.10	1.00	1.01	1.00	1.01
1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.98	1.00	1.00	1.00	1.03	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
1.00	0.99	1.00	0.98	1.00	0.90	1.00	1.03	1.00	1.01	1.00	1.03	1.00	1.03	1.00	1.00
1.00	0.99	1.00	1.00	1.00	0.90	1.00	1.03	1.00	1.04	1.00	0.10	1.00	1.00		
1.00	0.97	1.00	0.99	1.00	0.90	1.00	0.10	1.00	1.03	1.00	0.10	1.00	1.01		

Os resultados obtidos pelo estudo ANOVA de factor único dos valores correspondentes ao grupo de controlo (tabela 4.2) encontram-se na tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Resultados ANOVA do efeito da evolução do peso entre os dias d0 e d1.

Contribuição	SQ	gl	MQ	F	p[H0]	$F_{0.05}$
Entre grupos	0.000756	1	0.000756	1.40	0.241	3.97
Dentro de grupos	0.039972	74	0.00054			
Total	0.040728	75				

SQ – Soma de quadrados, gl – graus liberdade, MQ – média quadrática (variância), F – Valor experimental, p[H0] – valor de prova, $F_{0.05}$ – valor crítico da distribuição de Fisher referente ao nível de confiança de 95%.

Da tabela 4.3, comparando o valor teste (TV) de 1.40 e o valor crítico ($F_{0.05}$) de 3.97, correspondente à distribuição F de Fisher ao nível de confiança de 95%, verifica-se que estatisticamente não existem diferenças significativas entre o dia inicial (d0) e o primeiro dia de tratamento (d1). Considerando o valor prova (p[H0]) que traduz a probabilidade de aceitação da hipótese nula (H0), existem 24% de probabilidade da H0 ser válida, logo esta pode ser aceite com confiança. Isto significa, portanto, não existem diferenças entre o período de tratamento considerado.

Na tabela 4.4 estão compilados os valores obtidos referentes à evolução do peso relativo entre os dias d0 e d2.

Tabela 4.4 – Evolução do peso no grupo CT entre os dias d0 e d2 (33 animais).

d0	d2												
1.00	0.98	1.00	1.01	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.99	1.00	0.10	1.00	1.02
1.00	0.99	1.00	1.09	1.00	1.00	1.00	1.07	1.00	1.02	1.00	0.97	1.00	1.01
1.00	0.96	1.00	1.01	1.00	1.03	1.00	1.02	1.00	1.02	1.00	1.02	1.00	1.01
1.00	1.00	1.00	1.03	1.00	1.03	1.00	1.02	1.00	1.05	1.00	0.99		
1.00	1.04	1.00	1.00	1.00	1.01	1.00	1.03	1.00	1.02	1.00	1.00		

O tratamento ANOVA destes resultados (tabela 4.4) revela que existe uma diferença significativa entre os dias d0 e d2 (TV = 10.79; $F_{0.05}(1;64) = 3.99$; p[H0] = 0.001; $s_{pe} = 0.018$). Pelos valores obtidos destaca-se que a tendência é para um aumento de peso de 1.4%, aproximadamente.

Considerando como referência a pesagem do respectivo animal em d0, foi estimada a evolução do peso relativo referente ao dia 4 (d4), valores apresentados na tabela 4.5.

Tabela 4.5 – Valores obtidos referentes à variação de peso relativamente ao quarto dia de tratamento, para o grupo controle (28 animais).

d0	d4	d0	d4								
1.00	0.99	1.00	0.99	1.00	0.98	1.00	1.01	1.00	1.03	1.00	1.04
1.00	1.11	1.00	0.99	1.00	1.05	1.00	1.05	1.00	0.10	1.00	0.99
1.00	1.02	1.00	1.03	1.00	1.02	1.00	1.03	1.00	1.04	1.000	1.02
1.00	1.03	1.00	1.05	1.00	1.02	1.00	1.03	1.00	1.01		
1.00	1.03	1.00	0.99	1.00	1.03	1.00	1.03	1.00	1.05		

O tratamento ANOVA destes resultados permitiu evidenciar a diferença significativa de peso entre os dias d0 - d4, iniciada em d2 ($TV = 22.13$; $F_{0.05}(1;54) = 4.01$; $p[H_0] = 0.000$; $s_{pe} = 0.019$) – a tendência continua a ser no sentido do aumento de peso – ganho de 2.3% sobre d0.

Considerando como referência a pesagem do respectivo animal no dia 0 (d0), foi estimada a evolução do peso relativo referente ao dia 8 (d8), (tabela 4.6).

Tabela 4.6 – Evolução do peso entre de o início e o oitavo dia de tratamento do grupo CT (23 animais).

d0	d8								
1.00	1.04	1.00	1.04	1.00	0.10	1.00	1.05	1.00	1.06
1.00	1.02	1.00	1.04	1.00	1.07	1.00	1.05	1.00	1.00
1.00	1.03	1.00	1.04	1.00	1.01	1.00	1.09	1.00	1.07
1.00	1.07	1.00	1.03	1.00	1.08	1.00	1.05		
1.00	1.02	1.00	1.07	1.00	1.04	1.00	1.04		

A ANOVA revelou, uma vez mais que os animais apresentam um ganho de peso relativamente ao início do estudo ($TV = 73.50$; $F_{0.05}(1;44) = 4.06$; $p[H_0] = 0.000$; $s_{pe} = 0.017$) – os dados mostram que os animais continuam com a tendência para ganhar peso – 4.3% de aumento em relação a d0.

A tabela 4.7 encontram-se sistematizados os valores obtidos para a evolução do peso relativo entre o início do estudo (d0) e o dia 15 (d15).

Tabela 4.7 – Valores obtidos para a evolução de peso relativo até ao décimo quinto dia de tratamento do grupo CT (18 animais).

d0	d15	d0	d15	d0	d15	d0	d15
1.00	1.06	1.00	1.05	1.00	1.02	1.00	1.03
1.00	1.07	1.00	1.02	1.00	0.10	1.00	1.03
1.00	1.06	1.00	0.99	1.00	1.05	1.00	1.11
1.00	1.08	1.00	1.00	1.00	1.02		
1.00	1.10	1.00	1.01	1.00	1.08		

Pela análise da tabela anterior (tabela 4.7) continua-se a verificar, até ao décimo quinto dia de tratamento, uma tendência para aumento de peso relativo nos animais do grupo de controlo ($TV = 25.65$; $F_{0.05}(1;34) = 4.13$; $p[H_0] = 0.000$; $s_{pe} = 0.025$) – representando um ganho total de peso de 4.2%.

Comparativamente aos valores referentes a d8 (ganho de 4.3% entre d0 - d8), verifica-se que, de facto, o peso médio estabilizou – análise ANOVA não revela diferenças entre d8 e d15.

Na tabela 4.8 encontram-se sistematizados os valores relativos à evolução do peso entre os dias inicial (d0) e o final do tratamento (d30).

Tabela 4.8 – Evolução do peso relativo entre o início de tratamento (d0) e o trigésimo dia de tratamento (d30), do grupo CT (13 animais).

d0	d30	d0	d30	d0	d30
1.00	0.10	1.00	1.00	1.00	1.03
1.00	1.04	1.00	1.00	1.00	1.00
1.00	0.97	1.00	1.02	1.00	1.07
1.00	0.10	1.00	0.10		
1.00	1.02	1.00	1.04		

A análise ANOVA de factor único revela que não existe agora uma diferença significativa no peso dos animais entre o início do tratamento e o final do tratamento ($TV = 3,84$; $F_{0.05}(1;24) = 4.26$; $p[H_0] = 0.062$; $s_{pe} = 0.018$).

Neste caso, fica patente que o grupo controlo apresentou um ligeiro aumento de peso até 4.3% nos primeiros 8 dias, manteve o peso constante entre os dias 8 e 15 e no período final voltou a recuperar o peso inicial (peso médio d30

aproximadamente mais 1.4% do peso inicial).

Para uma melhor percepção da evolução do peso nos animais submetidos ao tratamento com a solução veículo (CT), representou-se graficamente a evolução do peso dos animais do grupo CT (figura 4.1).

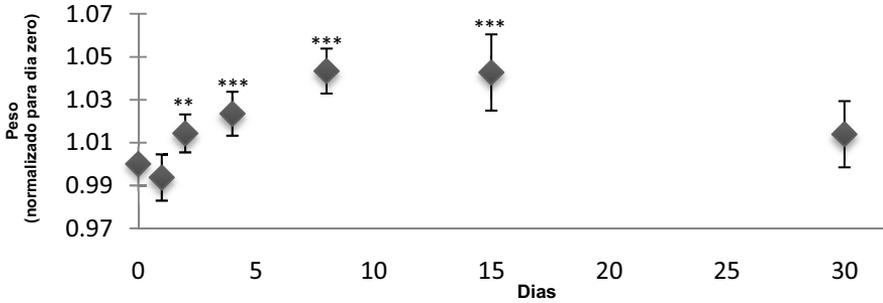


Figura 4.1 – Evolução do peso nos animais do grupo submetido à administração da solução veículo, **p[H0] < 0.01 – probabilidade de aceitação da hipótese nula inferior a 1% e ***p[H0] < 0.001 - probabilidade de aceitação da hipótese nula inferior a 0.1%,

4.2.2 Grupo clozapina (CL)

De igual modo considerando como referência a pesagem do respectivo animal no dia 0 (d0). Foi estimada a evolução do peso relativo ao grupo de animais tratados com clozapina (CL) referente ao dia 1 (d1), valores descritos na tabela 4.9.

Tabela 4.9 – Evolução do peso relativo entre os dias d0 - d1 no grupo CL (40 animais).

d0	d1														
1.00	0.93	1.00	0.92	1.00	0.97	1.00	0.97	1.00	0.97	1.00	1.01	1.00	0.93	1.00	0.93
1.00	0.97	1.00	0.96	1.00	0.96	1.00	0.95	1.00	0.98	1.00	0.96	1.00	0.94	1.00	0.93
1.00	0.94	1.00	0.95	1.00	0.97	1.00	0.94	1.00	0.96	1.00	0.97	1.00	0.93	1.00	0.95
1.00	0.95	1.00	0.99	1.00	0.96	1.00	0.99	1.00	0.97	1.00	0.96	1.00	0.97	1.00	0.94
1.00	0.95	1.00	0.95	1.00	1.00	1.00	0.86	1.00	0.97	1.00	0.94	1.00	0.96	1.00	0.95

A análise ANOVA permitiu evidenciar uma alteração significativa no peso dos animais ao fim do primeiro dia de tratamento ($TV = 146.72$; $F_{0,05}(1;80) = 3.96$; $p[H0] = 0.000$; $s_{pe} = 0.018$) – este conjunto baixou o seu peso em cerca de 4.8% em relação ao dia inicial.

A tabela 4.10 contém a informação recolhida para a comparação entre o dia

0 (d0) e dia 2 (d2).

Tabela 4.10 – Evolução do peso relativo para o segundo dia de tratamento com CL (35 animais).

d0	d2												
1.00	0.91	1.00	0.93	1.00	0.86	1.00	0.94	1.00	0.94	1.00	0.91	1.00	0.91
1.00	0.94	1.00	0.93	1.00	0.94	1.00	0.88	1.00	0.90	1.00	0.90	1.00	0.91
1.00	0.86	1.00	0.94	1.00	0.85	1.00	0.93	1.00	0.91	1.00	0.93	1.00	0.89
1.00	0.92	1.00	0.91	1.00	0.94	1.00	0.93	1.00	0.89	1.00	0.91	1.00	0.89
1.00	0.89	1.00	0.95	1.00	0.92	1.00	1.02	1.00	0.87	1.00	0.90	1.00	0.93

Ao segundo dia de tratamento mantém-se a diferença estatística no peso relativo deste grupo ($TV = 259.93$; $F_{0.05}(1;76) = 3.97$; $p[H_0] = 0.000$; $s_{pe} = 0.023$) – o decréscimo de peso atinge um valor médio de 8.3%.

A tabela 4.11 apresenta a evolução do respectivo animal entre os dias 0 (d0) e 4 (d4).

Tabela 4.11 – Evolução do peso relativo entre os dias d0 - d4 para o grupo CL (30 animais).

d0	d4	d0	d4	d0	d4	d0	d4	d0	d4	d0	d4
1.00	0.94	1.00	0.96	1.00	0.899	1.00	0.96	1.00	0.88	1.00	0.96
1.00	0.93	1.00	0.91	1.00	0.000	1.00	0.98	1.00	0.94	1.00	0.90
1.00	0.92	1.00	0.93	1.00	0.927	1.00	0.94	1.00	0.91	1.00	0.94
1.00	0.00	1.00	0.90	1.00	0.867	1.00	0.91	1.00	0.93	1.00	0.78
1.00	0.89	1.00	0.98	1.00	0.921	1.00	0.91	1.00	0.94	1.00	0.92

Considerando o período d0 - d4, verifica-se ainda a diferença de peso em relação ao início do tratamento ($TV = 137.12$; $F_{0.05}(1;56) = 4.01$; $p[H_0] = 0.000$; $s_{pe} = 0.027$) – ao quarto dia de tratamento com clozapina os ratos continuam a apresentar uma perda de peso significativa de 8.2%.

Analisando o período d2 - d4 a ANOVA não encontra diferenças significativas, o que evidencia a manutenção do peso durante este período.

A tabela 4.12 reporta a evolução relativa do peso entre os dias d0 e d8.

Tabela 4.12 – Evolução do peso entre os dias d0 - d8 para o grupo CL (27 animais).

d0	d8										
1.00	0.00	1.00	0.90	1.00	0.96	1.00	0.94	1.00	0.00	1.00	0.00
1.00	0.93	1.00	0.00	1.00	0.99	1.00	0.98	1.00	0.98	1.00	0.97
1.00	0.93	1.00	0.97	1.00	0.91	1.00	0.95	1.00	0.97		
1.00	0.91	1.00	0.94	1.00	0.00	1.00	0.97	1.00	0.94		
1.00	0.96	1.00	0.98	1.00	0.91	1.00	0.93	1.00	0.97		

Este conjunto de resultados evidencia a diferença de peso entre estes dois dias ($TV = 78.70$; $F_{0.05}(1;42) = 4.07$; $p[H_0] = 0.000$; $s_{pe} = 0.019$) – a perda média de peso observada agora é de apenas 5.0% o que corresponde a a uma recuperação de cerca de 3.2% do peso inicial.

Os valores referentes ao período d0 - d15 encontram-se sistematizados na tabela 4.13.

Tabela 4.13 – Evolução do peso entre os dias d0 - d15 no grupo CL (22 animais).

d0	d15	d0	d15	d0	d15	d0	d15	d0	d15
1.00	0.00	1.000	0.93	1.00	0.93	1.00	0.00	1.00	0.00
1.00	0.00	1.000	0.98	1.00	0.91	1.00	0.88	1.00	0.89
1.00	0.00	1.000	0.89	1.00	0.90	1.00	0.92		
1.00	0.97	1.000	0.00	1.00	0.91	1.00	0.86		
1.00	0.92	1.000	0.88	1.00	0.85	1.00	0.86		

Neste período de tempo a diferença de peso é ainda notória ($TV = 101.61$; $F_{0.05}(1;30) = 4.17$; $p[H_0] = 0.000$; $s_{pe} = 0.026$) e agrava-se um pouco mais – com a média final a atingir uma perda máxima de 9.2% o que revela que entre os dias d8 e d15 houve uma nova perda de peso.

Os valores obtidos entre os dias d0 e d30 constam na tabela 4.14.

Tabela 4.14 – Evolução do peso relativo entre os dias d0 - d30 para o grupo CL (17 animais).

d0	d30	d0	d30	d0	d30	d0	d30
1.00	0.00	1.00	0.91	1.00	0.00	1.00	0.00
1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.90	1.00	0.00
1.00	0.00	1.00	0.88	1.00	0.88		
1.00	0.00	1.00	0.90	1.00	0.83		
1.00	0.87	1.00	0.00	1.00	0.88		

Para o grupo CL observa-se uma perda efectiva de peso ao longo do período estudado ($TV = 153.73$; $F_{0.05}(1;14) = 4.60$; $p[H_0] = 0.000$; $s_{pe} = 0.019$) – os animais apresentam uma redução média de peso de 12.0%.

Apesar de uma ligeira oscilação intermédia, este tratamento é consistente em provocar uma perda efectiva de peso sendo as médias observadas 95.2, 91.7, 91.8, 95.0, 90.6 e 88.0% do peso inicial nos dias d1, d2, d4, d8, d15 e d30, respectivamente.

Para uma melhor percepção da evolução do peso dos animais submetidos ao tratamento com clozapina, representou-se graficamente a evolução do peso dos animais do grupo CL (figura 4.2).

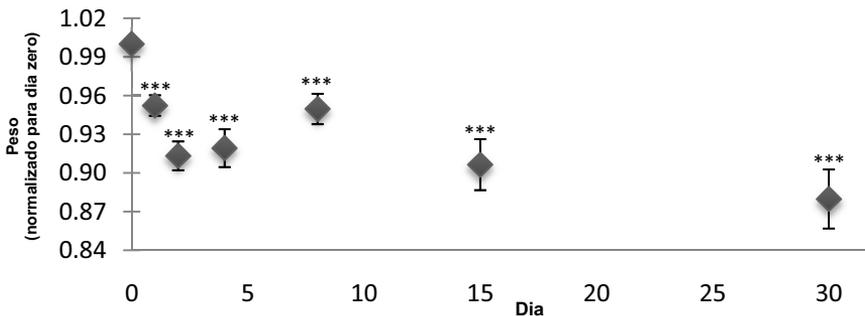


Figura 4.2 – Evolução do peso nos animais do grupo submetido à administração do fármaco CL, *** $p[H_0] < 0.001$ - probabilidade de aceitação da hipótese nula inferior a 0.1%.

4.2.3 Grupo haloperidol (HA)

Considerando como referência a pesagem do respectivo animal no dia 0 (d0), foi estimada a evolução do peso relativo referente ao grupo de animais tratados com haloperidol (HA) no dia 1 (d1), valores apresentados na tabela 4.15.

Tabela 4.15 – Valores obtidos para o grupo HA, referentes ao primeiro dia de tratamento (40 animais).

d0	d1														
1.00	1.03	1.00	1.01	1.00	1.01	1.00	1.01	1.00	1.03	1.00	1.04	1.00	1.03	1.00	1.02
1.00	1.04	1.00	1.01	1.00	0.99	1.00	0.96	1.00	1.00	1.00	0.99	1.00	1.01	1.00	0.98
1.00	1.01	1.00	1.03	1.00	1.02	1.00	1.05	1.00	1.01	1.00	1.01	1.00	1.03	1.00	1.02
1.00	1.00	1.00	1.02	1.00	0.98	1.00	0.99	1.00	1.02	1.00	1.02	1.00	1.02	1.00	1.01
1.00	1.04	1.00	1.04	1.00	1.03	1.00	0.99	1.00	1.01	1.00	1.01	1.00	1.01	1.00	1.01

A análise ANOVA de um factor permitiu evidenciar uma alteração significativa no peso ao fim do primeiro dia de tratamento ($TV = 20.14$; $F_{0.05}(1;78) = 3.96$; $p[H_0] = 0.000$; $s_{pe} = 0.013$). Constataram-se diferenças significativas neste primeiro dia de tratamento verificando-se um aumento de peso de cerca de 1.3% em relação à condição inicial.

Considerando como referência a pesagem do respectivo animal no dia 0 (d0), foi estimada a evolução do peso relativo referente ao dia 2 (d2), valores apresentados na tabela 4.16.

Tabela 4.16 – Valores obtidos para o grupo HA, referentes ao segundo dia de tratamento (35 animais).

d0	d2												
1.00	0.97	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.16	1.00	1.05	1.00	1.05	1.00	1.04
1.00	1.03	1.00	1.02	1.00	1.00	1.00	1.04	1.00	1.00	1.00	1.03	1.00	1.01
1.00	1.03	1.00	1.04	1.00	1.03	1.00	1.00	1.00	1.06	1.00	1.02	1.00	1.02
1.00	1.04	1.00	0.10	1.00	1.01	1.00	0.99	1.00	1.05	1.00	1.03	1.00	1.02
1.00	1.04	1.00	1.01	1.00	1.02	1.00	0.99	1.00	1.04	1.00	1.01	1.00	1.03

A análise ANOVA de uma só via permitiu evidenciar uma alteração significativa ao fim do segundo dia de tratamento ($TV = 23.84$; $F_{0.05}(1;68) = 3.98$; $p[H_0] = 0.000$; $s_{pe} = 0.022$). Verificaram-se diferenças significativas, constatando-se um aumento de peso de cerca de 2.5% entre o dia 0 e o dia 2.

Considerando como referência a pesagem do respectivo animal no dia 0 (d0), foi estimada a evolução do peso relativo referente ao dia 4 (d4), valores na tabela 4.17.

Tabela 4.17 – Valores obtidos para o grupo (HA), referentes ao quarto dia de tratamento (30 animais).

d0	d4										
1.00	1.03	1.00	0.99	1.00	1.03	1.00	1.06	1.00	1.02	1.00	1.04
1.00	1.00	1.00	1.03	1.00	1.06	1.00	0.98	1.00	1.07	1.00	1.01
1.00	1.03	1.00	1.04	1.00	1.03	1.00	1.02	1.00	1.00	1.00	1.04
1.00	0.98	1.00	1.00	1.00	1.03	1.00	1.08	1.00	1.03	1.00	1.04
1.00	1.02	1.00	0.97	1.00	1.03	1.00	1.03	1.00	1.08	1.00	1.04

A análise ANOVA de um só factor demonstra que à semelhança do que aconteceu no segundo dia de tratamento, também no quarto dia de tratamento houve uma evolução de peso ($TV = 30.45$; $F_{0.05}(1;68) = 4.01$; $p[H_0] = 0.000$; $s_{pe} = 0.019$). Constatou-se um aumento do peso dos animais cerca de 2.5%.

Considerando como referência a pesagem do respectivo animal no dia 0 (d0), foi estimada a evolução do peso relativo referente ao dia 8 (d8), valores na tabela 4.18.

Tabela 4.18 – Valores obtidos para o grupo (HA), referentes ao oitavo dia de tratamento (25 animais).

d0	d8								
1.00	1.00	1.00	1.08	1.00	1.05	1.00	1.08	1.00	0.94
1.00	0.99	1.00	1.02	1.00	1.03	1.00	1.04	1.00	0.99
1.00	1.06	1.00	1.03	1.00	0.99	1.00	0.99	1.00	1.07
1.00	0.99	1.00	1.03	1.00	1.02	1.00	1.03	1.00	1.11
1.00	0.95	1.00	1.08	1.00	1.03	1.00	1.08	1.00	1.01

Este conjunto de resultados evidencia a diferença de peso entre o dia 0 (d0) e o dia 8 (d8), ($TV = 10.03$; $F_{0.05}(1;48) = 4.04$; $p[H_0] = 0.000$; $s_{pe} = 0.029$). Verifica-se um aumento de peso cerca 2.6%.

Considerando como referência a pesagem do respectivo animal no dia 0 (d0), foi estimada a evolução do peso relativo referente ao dia 15 (d15), valores na tabela 4.19

Tabela 4.19 – Valores obtidos para o grupo (HA), referentes ao décimo quinto dia de tratamento (10 animais).

d0	d15	d0	d15	d0	d15	d0	d15
1.00	1.06	1.00	1.02	1.00	1.01	1.00	0.96
1.00	0.99	1.00	0.92	1.00	1.02	1.00	0.98
1.00	1.02	1.00	0.94	1.00	0.96	1.00	1.04
1.00	1.05	1.00	0.95	1.00	1.02	1.00	1.02
1.00	1.08	1.00	0.98	1.00	0.99	1.00	1.03

Neste período de tempo a diferença de peso é ainda notória ($TV = 101.61$; $F_{0.05}(1;30) = 4.17$; $p[H_0] = 0.000$; $s_{pe} = 0.026$) e agrava-se um pouco mais – agora a média final atinge uma perda máxima de 9.2% o que revela que entre os dias d8 e d15 ouve uma nova perda de peso.

Neste período de tempo não se verificaram grandes alterações no peso dos animais. ($TV = 0.04$; $F_{0.05}(1;38) = 4.10$; $p[H_0] = 0.848$; $s_{pe} = 0.029$), ou seja, d0 - d15: igualdade de peso; ganho de peso aproximadamente de 0.2% o que leva a uma recuperação do peso inicial.

Considerando como referência a pesagem do respectivo animal no dia 0 (d0), foi estimada a evolução do peso relativo referente ao dia 30 (d30), valores apresentados na tabela 4.20.

Tabela 4.20 – Valores obtidos para o grupo HA, referentes ao trigésimo dia de tratamento (15 animais).

d0	d30	d0	d30	d0	d30
1.00	1.05	1.00	0.99	1.00	0.91
1.00	0.92	1.00	1.01	1.00	0.96
1.00	0.96	1.00	0.96	1.00	1.08
1.00	0.95	1.00	1.01	1.00	1.04
1.00	0.97	1.00	0.10	1.00	1.08

Neste período de tempo não se verifica aumento de peso em relação ao dia 0 (d0), ($TV = 0.17$; $F_{0.05}(1;28) = 4.20$; $p[H_0] = 0.684$; $s_{pe} = 0.037$), ou seja, verifica-se uma igualdade de peso, peso final consiste em aproximadamente 99.4% do peso inicial, mantendo assim o peso inicial.

Em resumo, de acordo com a análise ANOVA de um factor, os animais do grupo tratado com haloperidol não apresentam uma variação líquida de peso entre

o início do tratamento (d0) e o final (d30). Contudo, observou-se que a administração deste fármaco induziu a um ligeiro ganho de peso nos primeiros 4 dias.

Para uma melhor percepção da evolução do peso dos animais submetidos ao tratamento com haloperidol, representou-se graficamente a evolução do peso dos animais do grupo HA (figura 4.3).

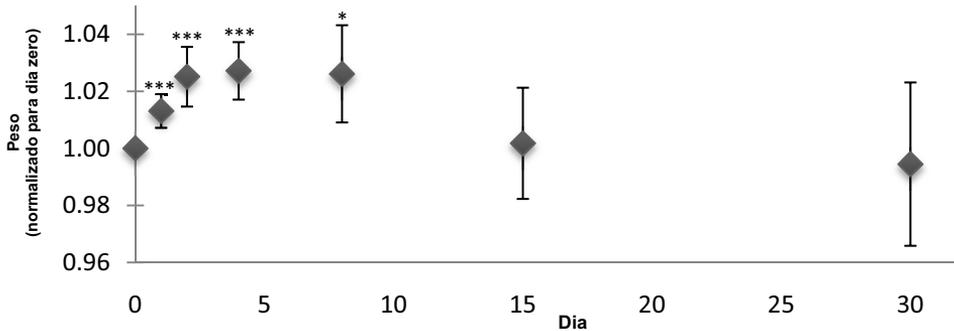


Figura 4.3 – Evolução do peso nos animais do grupo submetido à administração do fármaco haloperidol, *p[H0] < 0.05 - probabilidade de aceitação da hipótese nula inferior a 5% e ***p[H0] < 0.001 - probabilidade de aceitação da hipótese nula inferior a 0.1%.

4.2.4 Grupo citalopram (CI)

Analisando o grupo de animais tratados com citalopram (CI), e considerando, uma vez mais, como referência a pesagem do respectivo animal no dia 0 (d0), foi estimada a evolução do peso relativo referente ao dia 1 (d1), valores na tabela 4.21.

Tabela 4.21 – Valores obtidos para o grupo CI, referentes ao primeiro dia de tratamento (40 animais).

d0	d1												
1.00	1.02	1.00	1.00	1.00	1.01	1.00	1.01	1.00	1.02	1.00	0.90	1.00	1.01
1.00	0.99	1.00	0.99	1.00	1.00	1.00	0.10	1.00	1.04	1.00	0.98	1.00	1.00
1.00	0.98	1.00	1.01	1.00	0.99	1.00	1.01	1.00	0.10	1.00	1.00	1.00	1.03
1.00	0.97	1.00	0.99	1.00	1.07	1.00	1.02	1.00	1.03	1.00	0.97	1.00	1.01
1.00	0.10	1.00	0.97	1.00	1.00	1.00	1.01	1.00	1.02	1.00	0.98	1.00	0.99

Através do estudo da ANOVA, não se verificam diferenças significativas

entre o tratamento do dia 0 (d0) e o dia 1 (d1), ($TV = 0.13$; $F_{0.05}(1;78) = 3.96$; $p[H_0] = 0.722$; $s_{pe} = 0.016$)

Considerando como referência a pesagem do respectivo animal no dia 0 (d0), foi estimada a evolução do peso relativo referente ao dia 2 (d2), valores na tabela 4.22.

Tabela 4.22 – Valores obtidos para o grupo CI, referentes ao segundo dia de tratamento (34 animais).

d0	d2												
1.00	0.10	1.00	1.00	1.00	1.09	1.00	0.99	1.00	0.97	1.00	0.10	1.00	0.98
1.00	1.00	1.00	1.05	1.00	0.10	1.00	1.04	1.00	0.98	1.00	1.02	1.00	0.97
1.00	1.01	1.00	1.00	1.00	1.01	1.00	0.10	1.00	0.95	1.00	1.03	1.00	0.97
1.00	1.02	1.00	0.99	1.00	1.03	1.00	1.02	1.00	0.97	1.00	0.99	1.00	0.10
1.00	0.99	1.00	0.10	1.00	1.00	1.00	1.02	1.00	1.02	1.00	0.98		

Da análise dos resultados verifica-se que estatisticamente não se evidenciam diferenças significativas de peso entre o dia 0 (d0) e o dia 2 (d2), ($TV = 0.17$; $F_{0.05}(1;66) = 3.98$; $p[H_0] = 0.684$; $s_{pe} = 0.014$)

Considerando como referência a pesagem do respectivo animal no dia 0 (d0), foi estimada a evolução do peso relativo referente ao dia 4 (d4), (tabela 4.23).

Tabela 4.23 - Valores obtidos para o grupo CI, referentes ao quarto dia de tratamento (30 animais).

d0	d4										
1.00	0.99	1.00	1.04	1.00	0.99	1.00	0.00	1.00	1.02	1.00	1.01
1.00	1.02	1.00	1.03	1.00	1.05	1.00	1.00	1.00	1.01	1.00	1.02
1.00	0.99	1.00	1.02	1.00	1.03	1.00	1.01	1.00	1.04	1.00	1.03
1.00	1.01	1.00	1.05	1.00	1.06	1.00	0.96	1.00	1.00	1.00	0.99
1.00	0.10	1.00	1.03	1.00	1.04	1.00	1.01	1.00	1.00	1.00	1.00

Da tabela 4.23 verifica-se que estatisticamente não se evidenciam diferenças significativas de peso entre o dia 0 (d0) e o dia 4 (d4), ($TV = 0.29$; $F_{0.05}(1;58) = 4.01$; $p[H_0] = 0.595$; $s_{pe} = 0.132$).

Considerando como referência a pesagem do respectivo animal no dia 0 (d0), foi estimada a evolução do peso relativo referente ao dia 8 (d8), (tabela 4.24).

Tabela 4.24 – Valores obtidos para o grupo CI, referentes ao oitavo dia de tratamento (25 animais).

d0	d8								
1.00	1.05	1.00	1.02	1.00	0.00	1.00	1.06	1.00	1.04
1.00	1.02	1.00	1.04	1.00	1.03	1.00	0.99	1.00	1.09
1.00	1.02	1.00	1.09	1.00	1.02	1.00	1.00	1.00	1.06
1.00	0.10	1.00	1.06	1.00	1.00	1.00	1.05	1.00	0.98
1.00	1.03	1.00	1.05	1.00	1.05	1.00	1.09	1.00	1.07

A ANOVA permitiu verificar que os animais apresentam um aumento de peso em relação ao primeiro dia de tratamento (d0), ($TV = 29.01$; $F_{0.05}(1;46) = 4.05$; $p[H_0] = 0.000$; $s_{pe} = 0.021$), os dados mostram que os animais possuem uma tendência para o ganho de peso de cerca de 3.3%.

Considerando como referência a pesagem do respectivo animal no dia 0 (d0), foi estimada a evolução do peso relativo referente ao dia 15 (d15), (tabela 4.25).

Tabela 4.25 – Valores obtidos para o grupo CI, referentes ao décimo quinto dia de tratamento (20 animais).

d0	d15	d0	d15	d0	d15	d0	d15
1.00	1.06	1.00	0.00	1.00	1.08	1.00	1.09
1.00	1.02	1.00	1.05	1.00	1.01	1.00	1.12
1.00	1.09	1.00	1.11	1.00	0.97	1.00	1.12
1.00	1.04	1.00	1.06	1.00	1.06	1.00	1.05
1.00	1.09	1.00	1.05	1.00	1.02	1.00	1.06

Até ao décimo quinto dia de tratamento continua-se a verificar uma tendência de aumento de peso ($TV = 43.98$; $F_{0.05}(1;36) = 4.11$; $p[H_0] = 0.000$; $s_{pe} = 0.028$). A percentagem de aumento de peso entre o dia zero (d0) e o dia 15 (d15) é de cerca de 6.0%

Considerando como referência a pesagem do respectivo animal no dia 0 (d0), foi estimada a evolução do peso relativo referente ao dia 30 (d30), (tabela 4.26).

Tabela 4.26 – Valores obtidos para o grupo CI, referentes ao trigésimo dia de tratamento (15 animais).

d0	d30	d0	d30	d0	d30
1.00	0.00	1.00	1.07	1.00	1.07
1.00	1.04	1.00	0.99	1.00	1.17
1.00	1.090	1.00	0.99	1.00	1.06
1.00	0.99	1.00	1.10	1.00	1.07
1.00	1.03	1.00	1.01	1.00	1.01

A análise ANOVA de factor único revela que continua a haver um aumento de peso ($TV = 11.87$; $F_{0.05}(1;36) = 4.23$; $p[H_0] = 0.002$; $s_{pe} = 0.036$), sendo a percentagem média de aumento de peso de cerca de 4.7%, verificando-se uma ligeira perda de peso em relação ao período anterior d0 - d15.

De acordo com a análise ANOVA de um factor único, este fármaco produz uma tendência para aumentar o peso dos ratinhos:

- não há diferenças significativas entre o dia 0 e o dia 1 (d0 - d1 = 0.13%);
- não há diferenças significativas entre o dia 0 e o dia 2 (d0 - d2 = 0.14%);
- ganho de peso (d0 - d4 = 1.8%);
- ganho de peso (d0 - d8 = 3.3%);
- ganho de peso (d0 - d15 = 6.0%);
- perda de peso entre o dia 15 e o dia 30 (d0 - d30 = 4.7%).

Para uma melhor percepção desta análise da evolução do peso dos animais submetidos ao tratamento com citalopram, efectuou-se uma representação gráfica (figura 4.4).

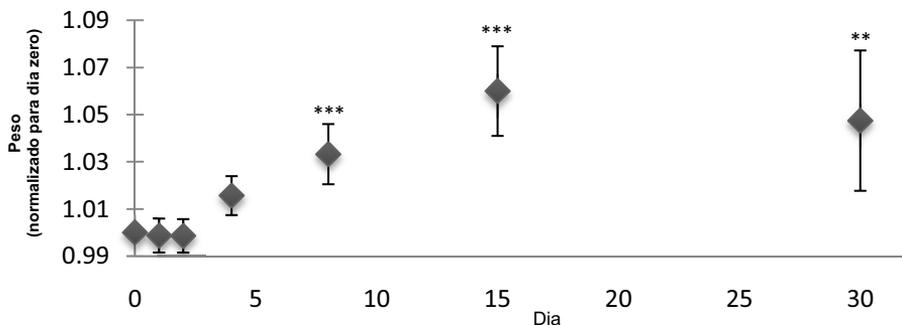


Figura 4.4 – Evolução do peso nos animais do grupo submetido à administração do fármaco citalopram, ** $p[H_0] < 0.01$ - probabilidade de aceitação da hipótese nula inferior a 1% e *** $p[H_0] < 0.001$ - probabilidade de aceitação da hipótese nula inferior a 0.1%.

4.2.5 Evolução relativa

O estudo anterior permitiu avaliar a evolução temporal do peso dos animais com administração dos diferentes fármacos. Importa agora proceder a uma análise comparativa entre os tratamentos realizados, tendo ainda em conta a respectiva evolução temporal.

Para se obter o efeito do fármaco através desta análise comparativa, reportada aos diferentes períodos de tratamento (d1, d2, d4, d8, d15 e d30), foi realizada a normalização dos valores da massa em relação ao valor inicial e as comparações são agora realizadas entre os diferentes tratamentos.

4.2.5.1 Dia 1

A tabela 4.27 reporta o conjunto de valores obtidos para cada um dos tratamentos ao nível do primeiro dia do estudo.

Tabela 4.27 – Valores obtidos para todos os fármacos no tratamento do dia 1.

CT	CL	HA	CI	CT	CL	HA	CI	CT	CL	HA	CI
0.983	0.929	1.027	1.024	0.902	1.000	1.030	1.000	0.996	0.958	1.019	0.966
1.004	0.974	1.038	0.988	0.962	0.926	1.011	1.012	0.992	0.942	1.011	0.983
0.989	0.939	1.012	0.984	1.000	0.954	0.955	0.992	1.012	0.930	1.034	1.008
0.992	0.952	1.000	0.974	1.029	0.937	1.045	1.012	1.000	0.939	1.007	1.004
0.967	0.952	1.036	0.996	1.030	0.992	0.992	1.023	1.031	0.927	1.026	1.025
0.984	0.927	1.011	1.000	0.996	0.857	0.989	1.013	1.000	0.970	1.020	1.008
1.000	0.956	1.012	0.988	0.988	0.967	1.032	1.024	1.009	0.961	1.008	0.992
0.980	0.945	1.034	1.013	1.027	0.981	1.004	1.039	1.012	0.926	1.017	0.991
1.004	0.958	1.019	0.993	1.012	0.957	1.008	0.996	1.000	0.926	0.982	1.009
0.991	0.946	1.037	0.973	1.036	0.967	1.017	1.028	1.004	0.951	1.020	0.992
0.985	0.971	1.008	1.007	1.026	0.971	1.013	1.016		0.936	1.008	0.996
0.978	0.962	0.992	1.000	0.996	1.008	1.035	0.903		0.947	1.013	0.988
0.898	0.972	1.024	0.988	1.009	0.962	0.985	0.984		0.945		
0.902	0.957	0.984	1.016	1.034	0.969	1.011	1.004				

CT – controlo, CL – clozapine, HA – haloperidol, CI – citalopram.

Numa primeira abordagem através do teste ANOVA global evidenciou-se a diferença significativa entre os quatro tratamentos realizados ($TV = 43.52$; $F_{0.05}(3;155) = 2.66$; $p[H_0] = 0.000$; $s_{pe} = 0.025$).

No sentido de verificar qual o tratamento que introduz maior diferença realizou-se um tratamento ANOVA iterativo ao qual se vai removendo sucessivamente o tratamento que mais se afasta da média global.

Analisando as médias obtidas em cada grupo (CT = 0.994, CL = 0.952, HA = 1.013 e CI = 0.999) e sendo a média global 0.989, os valores do tratamento CL são aqueles que mais divergem do grupo.

Refazendo o teste ANOVA verifica-se ainda que existem diferenças significativas nos pesos entre tratamentos ($TV = 6.30$; $F_{0.05}(2;155) = 3.08$; $p[H_0] = 0.003$; $s_{pe} = 0.025$). A média global passa a ser 1.002 sendo o grupo HA com uma média de 1.013, aquele que mais se destaca.

Após a remoção do grupo HA do estudo deixam de se verificar diferenças entre os tratamentos ($TV = 0.63$; $F_{0.05}(1;76) = 3.97$; $p[H_0] = 0.431$; $s_{pe} = 0.028$).

Assim, o primeiro dia de tratamento dos grupos clozapina e haloperidol diferem dos restantes – com o tratamento com clozapina a evidenciar uma diminuição do peso (0.952), com haloperidol (1.013) o peso aumenta enquanto que os grupos controlo e citalopram são equivalentes (0.996).

4.2.5.2 Dia 2

Considerando agora o comportamento relativo ao peso dos animais ao segundo dia de tratamento, os resultados obtidos encontram-se sistematizados na tabela 4.28.

Tabela 4.28 – Valores obtidos para todos os fármacos no tratamento do dia 2.

CT	CL	HA	CI	CT	CL	HA	CI	CT	CL	HA	CI
0.984	0.908	1.027	0.996	0.993	0.939	1.004	1.000	1.021	0.908	1.000	0.945
0.993	0.939	1.004	1.000	1.029	0.836	1.033	1.008	1.046	0.885	1.031	0.974
0.959	0.875	1.033	1.013	1.030	0.942	1.033	1.031	0.974	0.889	1.007	1.017
1.004	0.919	0.984	1.015	1.008	0.920	1.033	1.000	1.018	0.933	1.036	1.025
1.039	0.893	1.022	0.985	1.004	0.935	1.062	0.992	0.988	0.911	1.044	0.992
1.011	0.933	0.992	1.004	1.070	0.876	0.978	1.039	1.004	0.899	1.042	0.982
1.089	0.932	1.034	1.016	1.024	0.929	1.018	0.996	1.020	0.913		0.982
1.008	0.940	1.041	1.000	1.020	0.930	1.080	1.016	1.013	0.907		0.967
1.033	0.905	1.004	0.992	1.026	1.021	1.025	1.016	1.013	0.892		0.965
1.004	0.951	0.971	0.996	0.991	0.940	1.015	0.971		0.887		0.996
0.984	0.908	1.027	0.996	1.022	0.904	1.066	0.984		0.934		

Ao fim do segundo dia de tratamento a média global é de 0.986 sendo os respectivos valores de 1.014 para o grupo CT, 0.913 no que diz respeito ao grupo CL, 1.027 para o grupo HA e 0.999 para o grupo CI. O teste ANOVA identifica diferenças entre tratamentos ($TV = 125.73$; $F_{0.05}(3;128) = 2.68$; $p[H_0] = 0.000$; $s_{pe} = 0.027$).

Uma vez mais, o grupo CL é o que mais se destaca. Após a remoção do grupo CL ainda subsiste a diferença entre os tratamentos ($TV = 11.30$; $F_{0.05}(2;94) = 3.09$; $p[H_0] = 0.000$; $s_{pe} = 0.024$) dos quais o tratamento HA é o grupo que mais se distingue da nova média global de 1.013.

Contudo, após a remoção do grupo HA continua a persistir a diferença entre os tratamentos com os grupos CT e CI ($TV = 7.96$; $F_{0.05}(1;65) = 3.99$; $p[H_0] = 0.006$; $s_{pe} = 0.023$).

Ao nível do segundo dia, o estudo utilizando o teste ANOVA permitiu verificar que todos os tratamentos são estatisticamente distintos. Ordenando agora os grupos por ordem crescente de massa verificasse a seguinte sequência de valores, 0.913 para o grupo CL, 0.999 relativo ao grupo CI, 1.014 para o grupo CT e 1.027 para os animais tratados com o grupo HA – o fármaco HA induz um aumento de peso superior ao controlo enquanto que CL e CI tendem a baixar a massa corporal.

4.2.5.3 Dia 4

Considerando como referência o comportamento dos fármacos durante o tratamento do dia 4 foi avaliada a diferença entre estes, valores apresentados na tabela 4.29.

Tabela 4.29 – Valores obtidos para todos os fármacos no tratamento do dia 4.

CT	CL	HA	CI	CT	CL	HA	CI	CT	CL	HA	CI
0.989	0.937	1.027	0.993	1.051	0.867	1.062	1.054	1.036	0.942	1.000	1.004
1.107	0.932	1.004	1.016	1.020	0.921	1.033	1.029	1.008	0.955	1.031	1.000
1.017	0.920	1.033	0.992	1.024	0.955	1.033	1.056	1.048	0.903	1.075	1.014
1.028	0.885	0.984	1.012	1.031	0.979	1.033	1.036	1.043	0.940	1.038	1.018
1.030	0.963	1.022	0.996	1.009	0.943	1.062	1.004	0.992	0.781	1.007	1.029
0.992	0.906	0.992	1.043	1.048	0.905	0.978	1.008	1.022	0.920	1.036	0.991
0.992	0.933	1.034	1.029	1.030	0.905	1.018	0.962			1.044	1.004
1.034	0.896	1.041	1.016	1.025	0.883	1.080	1.009			1.042	
1.052	0.958	1.004	1.047	1.032	0.943	1.025	1.021				
0.992	0.899	0.971	1.030	1.028	0.908	1.015	1.012				
0.984	0.927	1.028	0.988	0.996	0.933	1.066	1.041				

Ao quarto dia de tratamento obtiveram-se os seguintes valores médios: 1.023, 0.919, 1.027 e 1.016 correspondendo respectivamente aos grupos, CT, CL, HA e CI. O teste ANOVA é peremptório a salientar a diferença entre tratamentos ($TV = 91.05$; $F_{0.05}(3;111) = 2.68$; $p[H_0] = 0.000$; $s_{pe} = 0.029$). Com uma média global de 0.997, o grupo que mais se afasta deste valor é o grupo CL.

Após a eliminação deste grupo do conjunto a média global passa para 1.022 e deixam de se evidenciar diferenças significativas entre os restantes tratamentos ($TV = 1.61$; $F_{0.05}(2;84) = 3.11$; $p[H_0] = 0.205$; $s_{pe} = 0.025$).

Ordenando a sequência dos valores médios das pesagens obteve-se: (0.919) CL < (1.016) CI ~ (1.023) CT ~ (1.027) HA.

4.2.5.4 Dia 8

Considerando como referência o comportamento dos fármacos durante o tratamento do dia 8, foi avaliada a diferença entre estes, valores apresentados na tabela 4.30.

Tabela 4.30 – Valores obtidos para todos os fármacos no tratamento do dia 8.

CT	CL	HA	CI	CT	CL	HA	CI	CT	CL	HA	CI
1.042	0.934	1.004	1.051	1.070	0.992	1.075	1.049	1.048	0.971	1.031	1.008
1.016	0.929	0.992	1.016	0.996	0.909	1.054	1.025	1.044	0.940	1.079	1.037
1.025	0.910	1.061	1.020	1.070	0.912	1.025	1.020	1.059	0.968	0.939	1.085
1.065	0.963	0.989	0.996	1.013	0.942	0.993	1.000	1.000	0.956	0.989	1.061
1.024	0.903	0.950	1.026	1.075	0.982	1.019	1.047	1.070		1.056	0.978
1.037	0.966	1.078	1.020	1.044	0.951	1.029	1.059			1.105	1.070
1.043	0.944	1.016	1.035	1.052	0.969	1.079	0.988			1.013	
1.035	0.983	1.033	1.091	1.047	0.929	1.036	1.000				
1.032	0.955	1.025	1.064	1.090	0.984	0.985	1.050				

Ao oitavo dia de tratamento subsistem as diferenças entre tratamentos ($TV = 41.23$; $F_{0.05}(3;90) = 2.71$; $p[H_0] = 0.000$; $s_{pe} = 0.032$). Em termos médios as respectivas estimativas são 1.043 para o grupo CT, 0.950 no que diz respeito ao grupo CL, 1.026 para o grupo HA, 1.033 corresponde ao grupo CI e uma média global de 1.014.

Após a eliminação do tratamento com CL do conjunto de tratamentos a média global passa para 1.034 e deixa de se verificar a diferença significativa ($TV = 1.63$; $F_{0.05}(2;69) = 3.13$; $p[H_0] = 0.203$; $s_{pe} = 0.033$).

Nesta fase do estudo é possível retirar conclusões idênticas – diferença significativa entre o tratamento com o fármaco CL (clozapina) em relação aos restantes. Os outros dois fármacos não apresentam efeitos significativos quando comparados com a evolução do peso do grupo de controlo sendo a sequência ordenada de massas relativas: (0.950) CL < (1.026) HA ~ (1.033) CI ~ (1.043) CT.

4.2.5.5 Dia 15

Considerando como referência o comportamento dos fármacos durante o tratamento do dia 15, foi estimada a diferença entre estes, valores apresentados na tabela 4.31.

Tabela 4.31 – Valores obtidos para todos os fármacos no tratamento do dia 15.

CT	CL	HA	CI	CT	CL	HA	CI	CT	CL	HA	CI
1.061	0.974	1.055	1.057	0.992	0.908	0.940	1.059	1.084	0.864	0.988	1.091
1.070	0.929	0.992	1.019	1.004	0.902	0.947	1.051	1.031	0.887	0.956	1.121
1.055	0.938	1.017	1.091	1.008	0.908	0.978	1.076	1.029		0.967	1.119
1.076	0.975	1.054	1.040	1.016	0.850	1.011	1.008	1.110		1.036	1.048
1.101	0.894	1.079	1.093	0.996	0.884	1.022	0.971			1.024	1.058
1.052	0.876	1.019	1.045	1.045	0.917	0.985	1.059			1.025	
1.022	0.934	0.920	1.113	1.016	0.862	1.020	1.021				

Estimativas médias das massas relativas por grupo são: 1.043 para o grupo CT, 0.906 no que diz respeito ao grupo CL, 1.002 para o grupo tratado com HA, 1.060 relativamente ao grupo CI e a média global o valor é de 1.006.

A análise destes resultados continua a indicar que existe uma diferença significativa entre os tratamentos ($TV = 53.02$; $F_{0.05}(3;90) = 2.74$; $p[H_0] = 0.000$; $s_{pe} = 0.039$) sendo o tratamento com o grupo CL aquele que mais diverge do grupo.

Após a sua remoção do conjunto inicial a média global converge para 1.034, contudo, continuam a evidenciar-se diferenças significativas entre os níveis testados ($TV = 11.40$; $F_{0.05}(3;90) = 3.17$; $p[H_0] = 0.000$; $s_{pe} = 0.039$) o que leva à exclusão do tratamento com o grupo HA.

Quando se comparam apenas os grupos CT e CI a média global passa a ser 1.052 e deixam de se notar diferenças significativas entre tratamentos ($TV = 1.95$; $F_{0.05}(1;35) = 4.12$; $p[H_0] = 0.172$; $s_{pe} = 0.038$).

Para esclarecer melhor o efeito obtido com os grupos CL e HA, foi ainda verificada a diferença entre os grupos CL e HA tendo o teste ANOVA revelado que estes resultados são de facto distintos ($TV = 51.11$; $F_{0.05}(1;34) = 4.13$; $p[H_0] = 0.000$; $s_{pe} = 0.040$).

Após esta verificação é possível estabelecer a sequência ordenada de médias de massa corporal relativa: (0.906) CL < (1.002) HA < (1.043) CT ~ (1.060) CI.

4.2.5.6 Dia 30

Considerando agora os resultados obtidos no último dia do tratamento, resultados na tabela 4.32.

Tabela 4.32 – Valores obtidos para todos os fármacos no tratamento do dia 30.

CT	CL	HA	CI	CT	CL	HA	CI	CT	CL	HA	CI
0.996	0.873	1.050	1.037	1.004	0.884	0.992	0.988	1.031		0.911	1.170
1.039	0.914	0.924	1.089	1.000	0.825	1.007	0.988	1.004		0.960	1.057
0.970	0.867	0.958	0.987	1.018	0.876	0.985	1.096	1.066		1.084	1.065
0.996	0.897	0.951	1.026	0.996		1.008	1.008			1.044	1.012
1.016	0.903	0.971	1.068	1.044		0.996	1.073			1.076	

No último dia do estudo realizado as estimativas médias obtidas foram: 1.014, 0.880, 0.994, 1.047 correspondendo respectivamente aos grupos, CT, CL, HA e CI. A média global é de 0.996 tendo sido evidenciadas diferenças entre tratamentos ($TV = 26.86$; $F_{0.05}(3;46) = 2.81$; $p[H_0] = 0.000$; $s_{pe} = 0.043$).

De igual modo, prosseguiu-se com o estudo do conjunto após a remoção do grupo referente ao tratamento com CL continuando-se a evidenciar uma diferença significativa entre níveis de factor ($TV = 5.04$; $F_{0.05}(2;39) = 3.24$; $p[H_0] = 0.011$; $s_{pe} = 0.045$).

Sendo a média global deslocada para 1.018, o tratamento HA é o que agora mais se destaca. Após a sua eliminação, a análise de variância apresenta algumas dificuldades em evidenciar inequivocamente diferenças significativas entre tratamentos ($TV = 4.48$; $F_{0.05}(2;39) = 4.24$; $p[H_0] = 0.044$; $s_{pe} = 0.041$).

Comparando ainda os tratamentos CL e HA verificou-se que estes são estatisticamente distintos ($TV = 43.90$; $F_{0.05}(1;21) = 4.33$; $p[H_0] = 0.000$; $s_{pe} = 0.041$).

A ordenação das alterações dos pesos pode assim ser apresentada da seguinte forma: $(0.880) CL < (0.994) HA < (1.014) CT \leq (1.047) CI$.

Em termos de observações globais sobre este estudo verifica-se que, no fim do tratamento, o grupo de controlo (CT) permanece com massa corporal similar ao inicial (valores próximos de 1.014).

O fármaco que produz maior impacto é o CL (clozapina) – desde o primeiro dia de tratamento destacou-se dos restantes no sentido da redução do peso tendo chegado a apenas 0.88 (perda de 12.0% de massa).

Os restantes fármacos testados, HA (haloperidol) e CI (citalopram), mantiveram-se em alguns casos próximos do grupo de controlo terminando HA nitidamente abaixo da média do controlo enquanto que CI por vezes esteve acima

deste último.

Se considerarmos a evolução da estimativa da incerteza puramente aleatória (s_{pe}) obtida na comparação dos conjuntos CT e CI, d1 (0.028), d2 (0.023), d4 (0.025), d8 (0.027), d15 (0.038) e d30 (0.041), verifica-se que a diferença significativa foi apenas evidenciada no dia d2 que corresponde à situação onde a dispersão de valores é menor, deixando a entender que ambos são muito próximos e por isso difíceis de discriminar.

Para uma melhor percepção desta análise comparativa entre os tratamentos realizados, tendo ainda em conta a respectiva evolução temporal, efectuou-se uma representação gráfica dos pesos normalizados em relação ao dia zero em função dos diferentes fármacos usados (clozapina, haloperidol e citalopram) e solução veículo (figura 4.5).

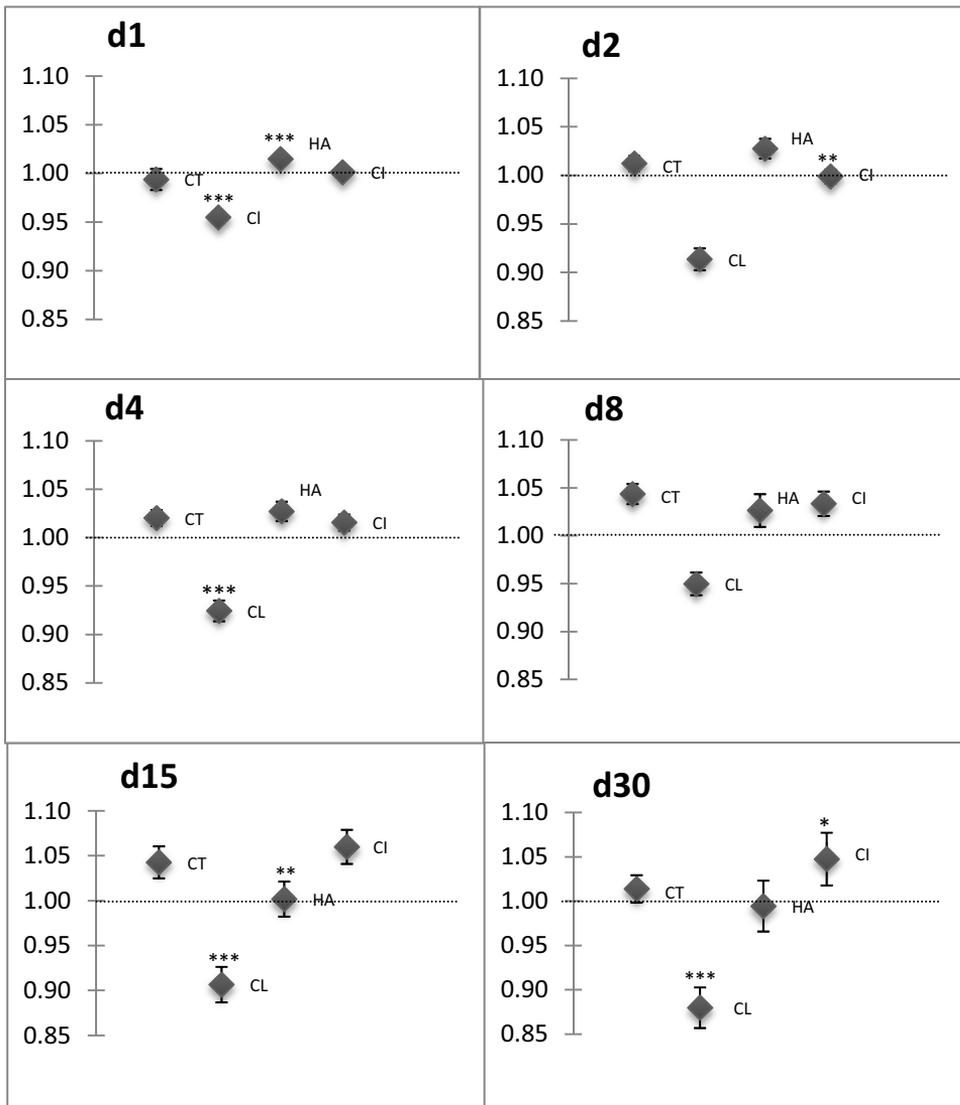


Figura 4.5 – Efeito dos fármacos nos diferentes períodos de tratamento. d1, d2, d4, d8, d15 e d30 correspondem à representação dos tratamentos para os dias 1, 2, 4, 8, 15 e 30, respectivamente. A análise estatística foi realizada pelo estudo da ANOVA, * $p[H_0] < 0.05$ – probabilidade de aceitação da hipótese nula inferior a 5%; ** $p[H_0] < 0.01$ – probabilidade de aceitação da hipótese nula inferior a 1% e *** $p[H_0] < 0.001$ - probabilidade de aceitação da hipótese nula inferior a 0.1%.

4.3 Desenvolvimento do método analítico

Nesta secção será apresentado e discutido o desenvolvimento do método analítico para a quantificação dos diferentes fármacos através da análise por LC-MS/MS [55, 57-59].

4.3.1 Condições de optimização do espectrómetro de massa

Na fase inicial deste processo, foram efectuadas optimizações nas condições operacionais, estabelecendo assim condições ideais para cada uma das moléculas (clozapina, haloperidol, citalopram, haloperidol-D4 e desipramina).

Para a aquisição dos espectros de fragmentação é necessário proceder à correcta ionização e separação da molécula a analisar, do solvente e/ou aductos que possam interferir na análise. O parâmetro DP³² permite assim isolar o analito de aductos e obter o ião molecular.

A figura 4.6 mostra as condições ideais de DP para cada uma das moléculas.

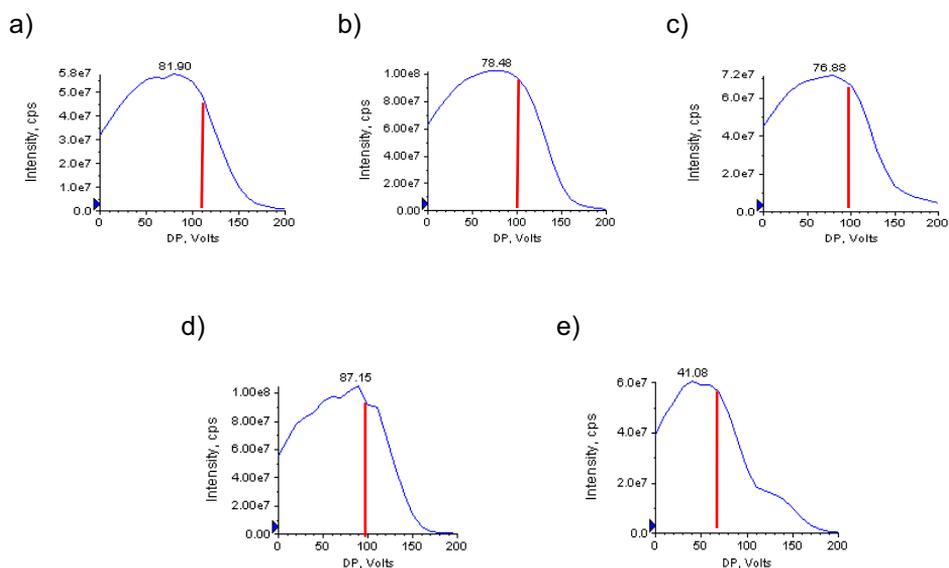


Figura 4.6 – Representação das condições de optimização do parâmetro DP para cada uma das moléculas, correspondendo respectivamente: a) clozapina, DP=110 V; b) haloperidol, DP=100 V; c) citalopram, DP=100 V, d) haloperidol-D4, DP=100 V; e) desipramina, DP=70 V.

³² Do inglês, Declustering Potential

4.3.2 Espectros de fragmentação

Para o desenvolvimento do método, foram também adquiridos espectros de fragmentação para cada uma das moléculas. Estes espectros reflectem a fragmentação do ião molecular e é característico da sua estrutura. As soluções padrão foram injectadas no sistema por infusão directa através de uma bomba de injeção (Harvard Apparatus), com uma seringa de 1.00 mL e um fluxo de 9 $\mu\text{L}/\text{min}$. Todas as aquisições foram efectuadas com o espectrómetro de massa a operar no modo positivo.

A figura 4.7 mostra o espectro de fragmentação para a molécula da clozapina.

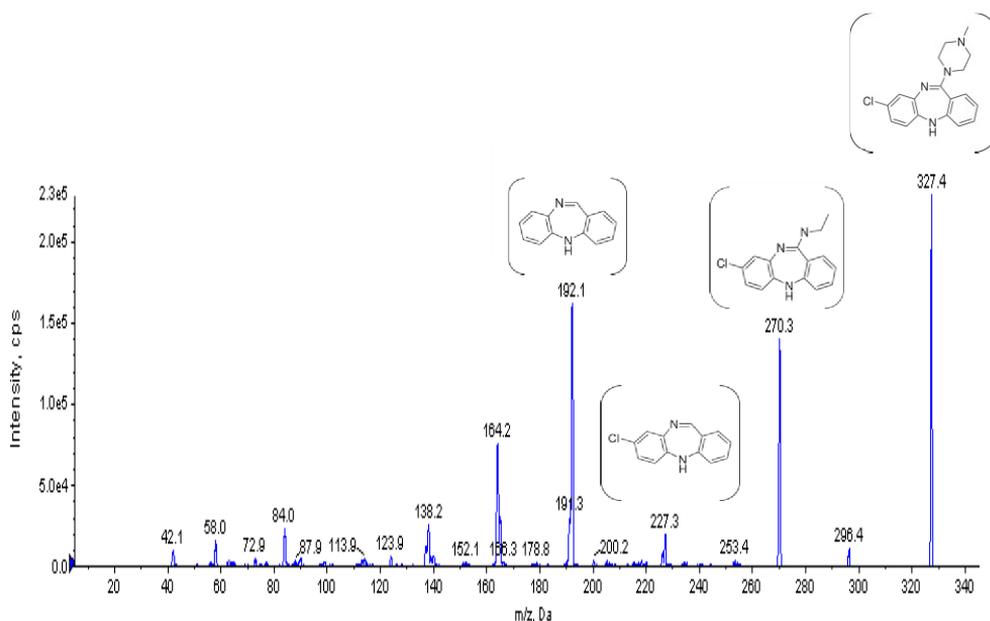


Figura 4.7 – Somatório dos espectros de fragmentação da clozapina $[M + H]^+$, adquiridos variando a energia de colisão entre 5 e 125 V, com ilustração dos principais fragmentos.

Na análise deste espectro verifica-se um pico intenso de m/z 327.2, correspondente ao ião molecular da clozapina. Observam-se dois fragmentos com picos de maior intensidade, (m/z 270.3 e 192.1), correspondendo respectivamente a $C_{15}H_{12}ClN_3$ e $C_{13}H_8N_2$ [60]. Esta molécula possui cloro na sua constituição e na natureza é possível encontrar de forma estável, dois dos nove isótopos do cloro, um de massa 35 e outro de massa 37 Da na proporção de 3:1.

A abundância relativa de isótopos na molécula ou num fragmento resulta assim nas suas distribuições estatísticas, como se pode observar na figura 4.8.

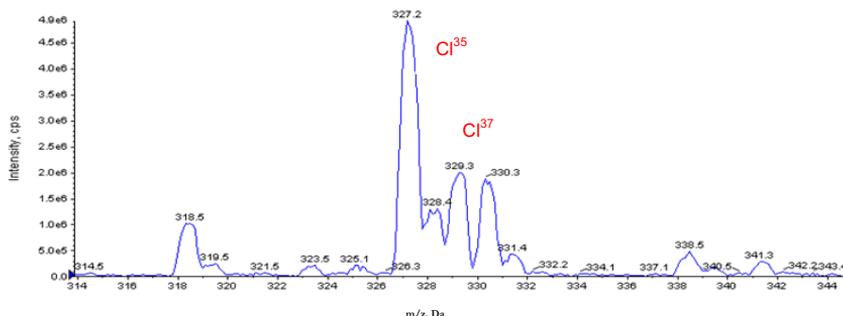


Figura 4.8 – Espectro de massa da clozapina evidenciando a respectiva distribuição isotópica.

Na figura 4.9 está representado a fragmentação da clozapina com indicação dos fragmentos principais ilustrados na figura 4.7.

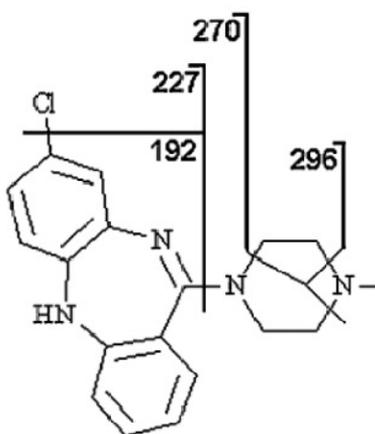


Figura 4.9 – Estrutura molecular da clozapina e respectivos fragmentos.

O espectro de fragmentação do haloperidol (figura 4.10) evidencia um pico com m/z 376.4 correspondente ao ião molecular e, à semelhança da molécula anterior, também esta possui um cloro na sua constituição, evidenciado na distribuição isotópica da molécula do haloperidol (figura 4.11). Os iões mais abundantes da fragmentação do haloperidol são: 165.1, 123.1 e 95.1, correspondentes a $F-C_6H_4-C(=O)-CH_2CH_2CH_2$, $F-C_6H_4-C=O$ e $F-C_6H_4$ [60] (figura 4.10).

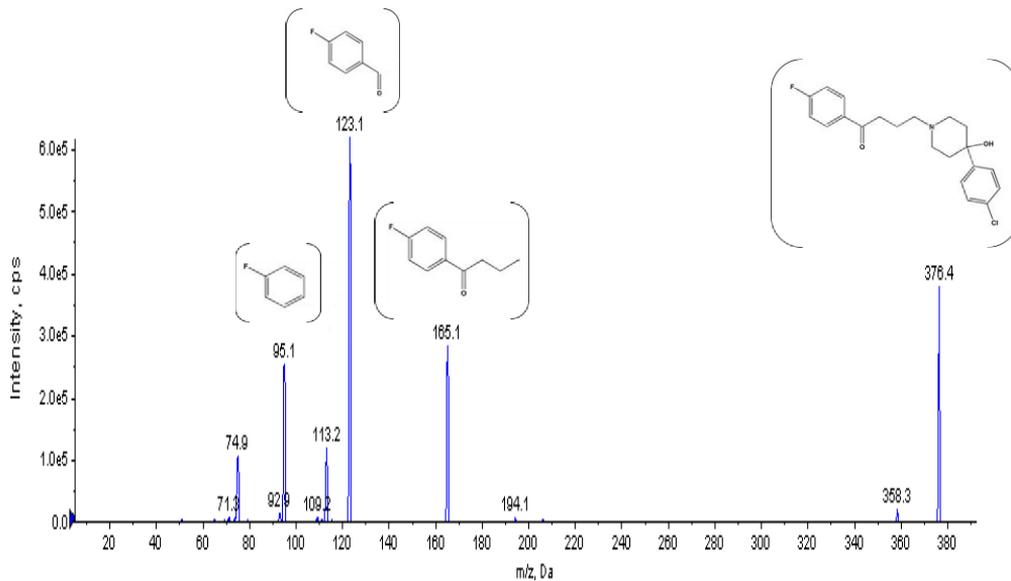


Figura 4.10 - Somatório dos os espectros de fragmentação do haloperidol $[M + H]^+$, adquiridos variando a energia de colisão entre 5 e 125 V, com ilustração dos principais fragmentos.

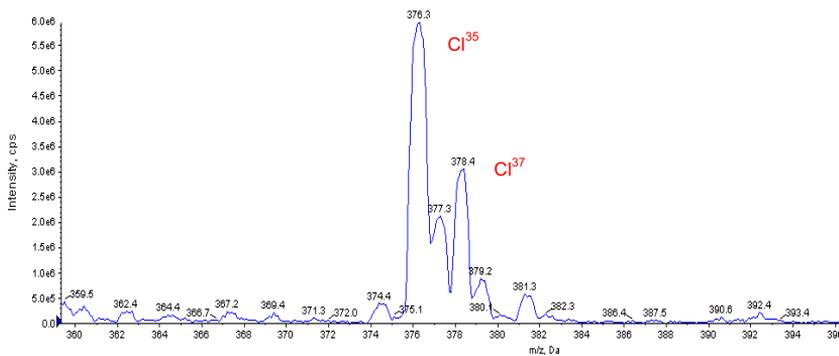


Figura 4.11 – Espectro de massa do haloperidol evidenciando a respectiva distribuição isotópica.

Na figura 4.12 encontra-se representada a fragmentação do haloperidol com indicação dos fragmentos principais ilustrados na figura 4.10.

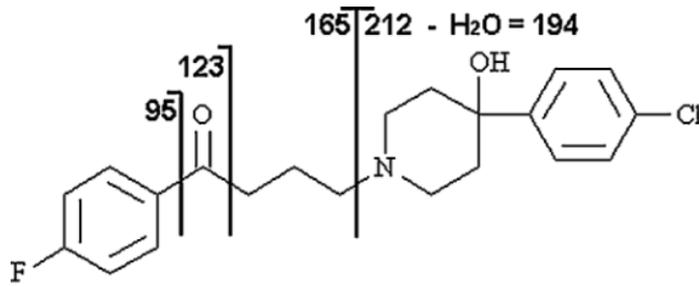


Figura 4.12 - Estrutura molecular do haloperidol e respectivos fragmentos.

O mesmo processo foi aplicado para a molécula do citalopram, obtendo-se o respectivo espectro de fragmentação (figura 4.13).

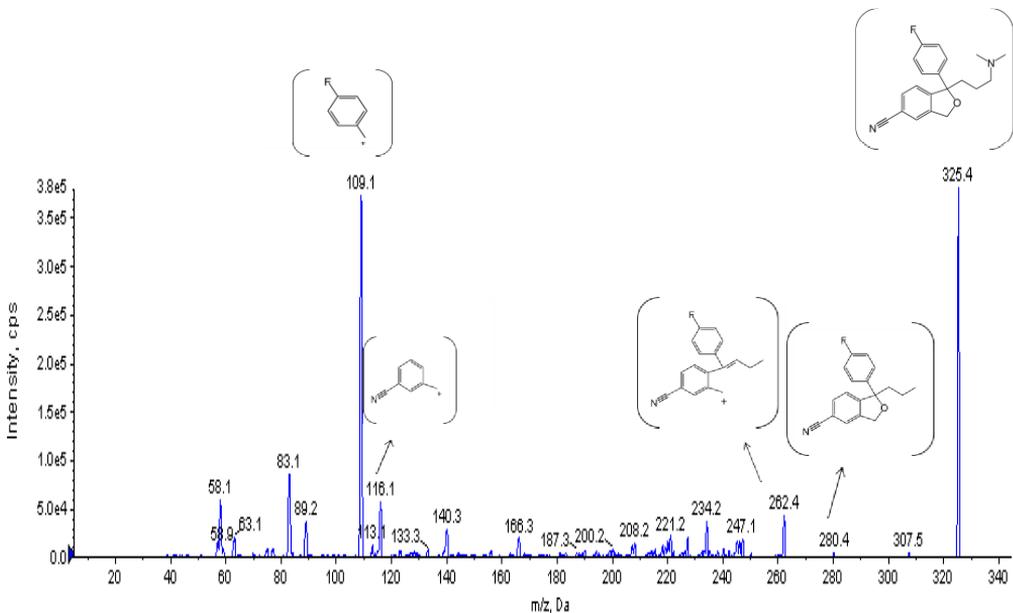


Figura 4.13 - Somatório dos espectros de fragmentação do citalopram $[M + H]^+$, adquiridos variando a energia de colisão entre 5 e 125 V, com ilustração dos principais fragmentos.

O pico de maior intensidade, 325.4, corresponde ao valor de m/z do ião moléculas, adquirido em modo positivo com DP de 100 V. Observam-se iões fragmentos de baixa intensidade (280.4, 262.4 e 116.1). O ião 280.4 corresponde à

perda de uma dimetilamina (C_2H_7N), os iões seguintes, 262.4 e 116.1, correspondem respectivamente a $C_{18}H_{13}NF$ e C_8H_6N . O ião fragmento relativo ao pico mais intenso de 109.1 corresponde a C_7H_6F [60-61].

Na figura 4.14 encontra-se representado a fragmentação do haloperidol com indicação dos principais fragmentos que foram ilustrados na figura 4.13.

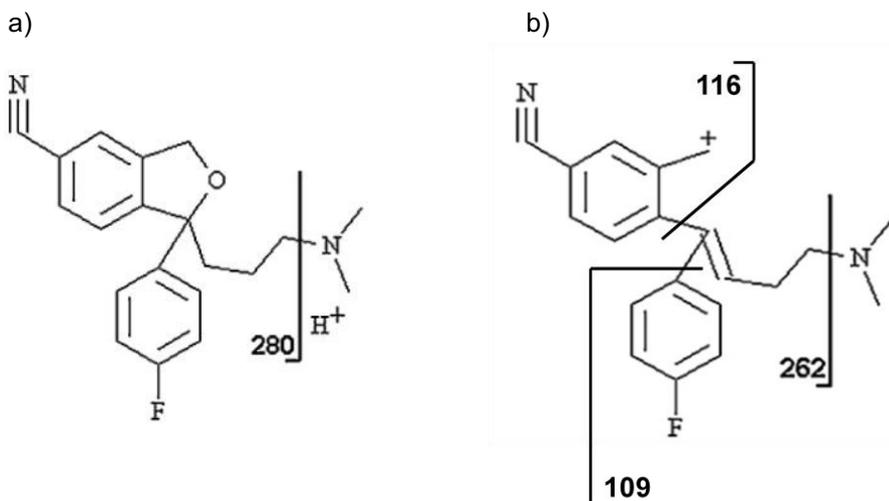


Figura 4.14 - Estrutura molecular do citalopram e respectivos fragmentos. a) ($[M+H]^+$, m/z 325.4), b) ($[M+H]^+$, m/z 307.5),

O espectro de fragmentação da molécula de haloperidol-D4, utilizada neste estudo como padrão interno (figura 4.15) é muito semelhante ao espectro de fragmentação do haloperidol (figura 4.10), no entanto a massa difere devido à substituição de quatro hidrogénios por quatro deutérios, sendo o valor de m/z de 380.4. Assim, os fragmentos correspondentes aos picos de maior intensidade correspondem a uma estrutura semelhante à do haloperidol. De forma idêntica ao haloperidol, o espectro do ião molecular do haloperidol-D4 também evidencia a presença dos isótopos do cloro (figura 4.16).

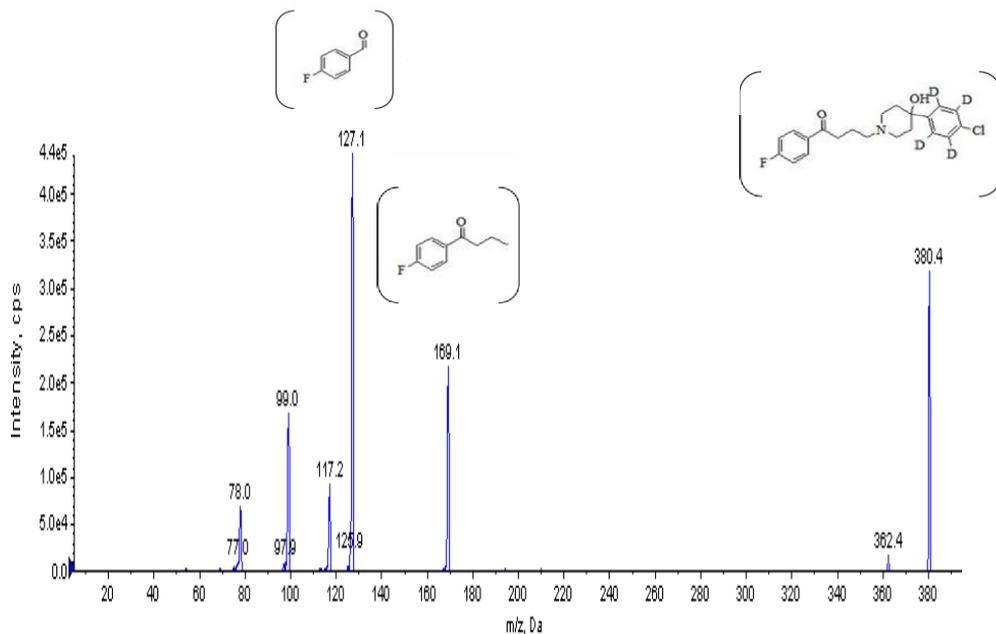


Figura 4.15 – Somatório dos espectros de fragmentação do haloperidol-D4 $[M+H]^+$, adquiridos variando a energia de colisão entre 5 e 125 V, com ilustração dos principais fragmentos.

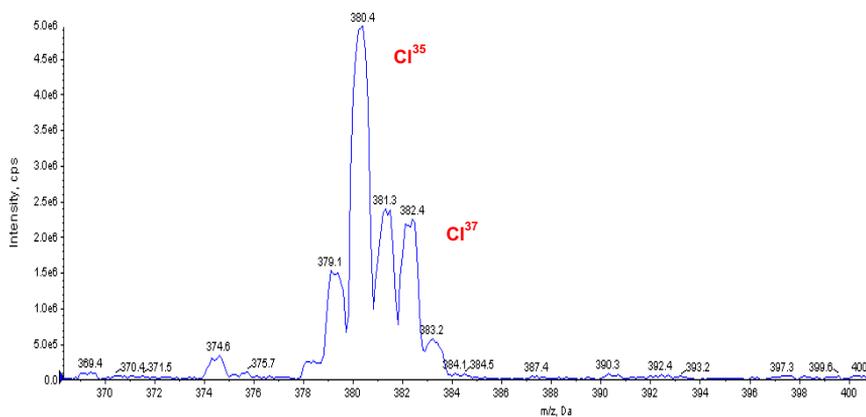


Figura 4.16 – Espectro de massa do haloperidol-D4 evidenciando a respectiva distribuição isotópica.

Na figura 4.17 está representado a fragmentação do haloperidol-D4 com indicação dos fragmentos principais que foram ilustrados na figura 4.15.

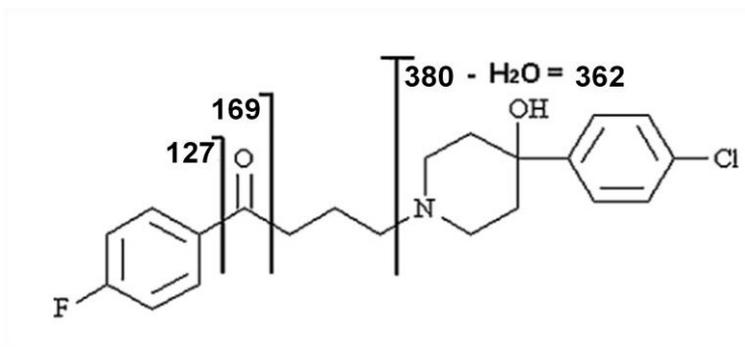


Figura 4.17 - Estrutura molecular do haloperidol-D4 e respectivos fragmentos.

A figura 4.18 corresponde ao espectro de fragmentação da desipramina, usada neste estudo como padrão interno.

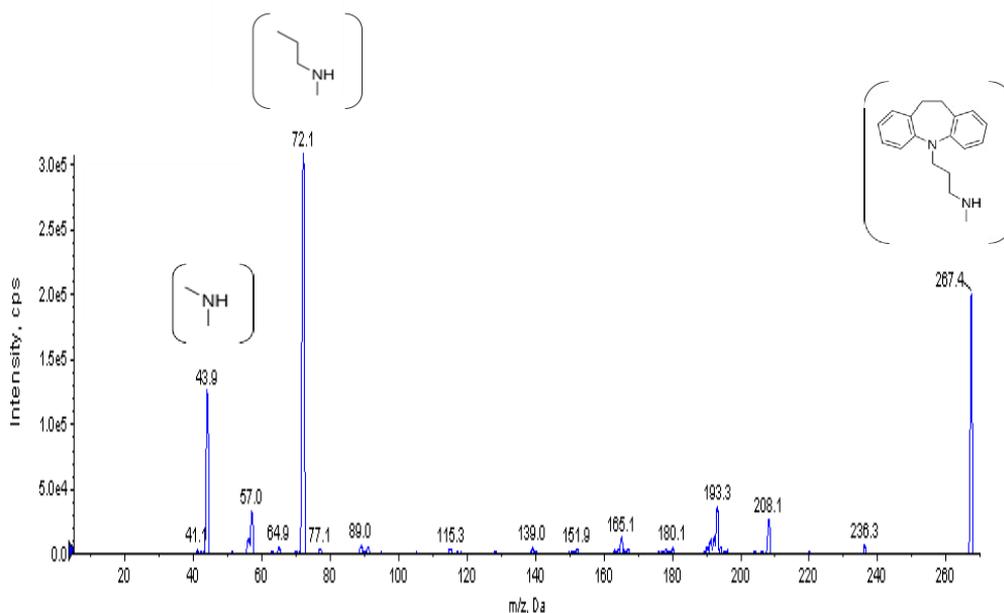


Figura 4.18 – Somatório dos espectros de fragmentação da desipramina $[M+H]^+$, adquiridos variando a energia de colisão entre 5 e 125 V, com ilustração dos principais fragmentos.

O pico com o valor m/z de 267.4 corresponde ao ião molecular da desipramina. Os iões fragmentos obtidos para esta molécula correspondem aos dois picos mais intensos 72.1 e 43.9, relativos a: $C_4H_{10}N$ e C_2H_7N , respectivamente [62].

Na figura 4.19 encontra-se representada a fragmentação da desipramina com indicação dos fragmentos principais que foram ilustrados na figura 4.18.

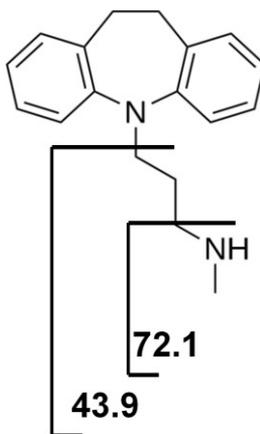


Figura 4.19 - Estrutura molecular da desipramina e respectivos fragmentos.

4.3.3 Condições de otimização do espectrômetro de massa acoplado à cromatografia líquida

O método de aquisição e dados no modo MRM é extremamente selectivo e sensível. No entanto é necessário otimizar diversos parâmetros do espectrômetro de massa de forma a obter a melhor relação sinal/ruído, especificidade e sensibilidade. Um destes parâmetros é a energia de colisão que, tal como na optimização de DP, foi ajustada para se obterem as condições ideais para cada uma das moléculas.

Foram assim adquiridos vários espectros de fragmentação com diferentes CE³³ para as respectivas transições MRM. A tabela 4.33 representa as transições adquiridas para as moléculas em estudo (clozapina, haloperidol e citalopram) na análise de amostra de córtex e plasma.

³³ Do inglês, Collision Energy

Tabela 4.33 – Transições adquiridas para as moléculas em estudo com as respectivas CE.

	CE (eV)	Fragmento (m/z)	Tecido
Clozapina (327.8)	35	84.0	C/P
	35	270.3	C/P
	35	296.1	P
	45	227.3	C/P
	60	192.2	P
	65	58.1	P
	65	192.2	C/P
	70	42.1	P
	92	164.1	C/P
Haloperidol (376.1)	35	165.1	C/P
	35	165.2	P
	35	194.1	P
	55	123.0	C/P
	95	113.2	C
	100	95.0	C
	120	75.1	P
Citalopram (325.2)	25	262.1	C/P
	25	280.1	P
	35	116.1	C/P
	35	109.0	C/P
	36	156.1	P
	40	234.1	P
	45	166.1	P
	75	58.1	P
	85	89.2	C/P
95	83.2	C/P	

Transição utilizada no: C – Córtex; P – Plasma

Para os compostos usados como padrões internos foi efectuado o mesmo estudo de optimização. As CE para as respectivas transições MRM são apresentadas na tabela 4.34.

Tabela 4.34 - Transições adquiridas para as moléculas utilizadas como padrão interno com as respectivas CE.

	CE (eV)	Fragmento (m/z)	Tecido
Haloperidol-D4 (380.3)	35	167.2	C
	35	169.2	P
	55	127.2	C
	60	127.1	P
	95	117.1	C
	95	99.1	P
	100	99.0	C
Desipramina (267.4)	30	72.1	P
	35	72.1	C
	35	208.2	C/P
	55	193.2	C/P
	55	43.9	C/P
	70	57.2	C
	70	50.0	P

Transição utilizada no: C – Córtex; P – Plasma

Após a optimização destes parâmetros, procedeu-se à optimização da temperatura da fonte de ionização. Verificou-se que à medida que se aumentava a temperatura, a intensidade de sinal acompanhava este aumento (figura 4.20).

Desta forma a temperatura escolhida para o desenvolvimento do método foi a mais elevada, ou seja, 600 °C.

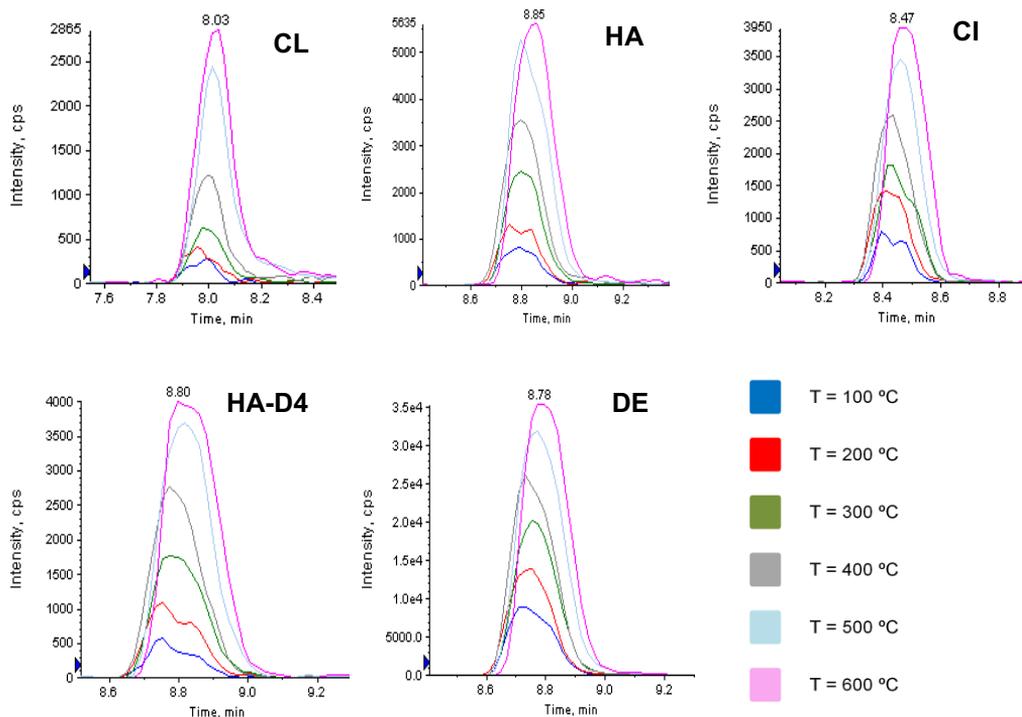


Figura 4.20 – Cromatogramas referentes à optimização da temperatura. Cada um dos cromatogramas corresponde à sobreposição das transições mais intensas para cada uma das moléculas com as respectivas temperaturas, CL – clozapina, HA – haloperidol, CI – citalopram, HA-D4 – haloperidol-D4 e DE – desipramina. A temperatura varia entre 100 °C e 600°C.

4.3.4 Selectividade e especificidade

Para testar a selectividade e especificidade do método, foram realizadas análises a amostras de córtex e plasma de animais.

Ambos os tecidos foram recolhidos de animais não sujeitos a qualquer tipo de tratamento com medicação psicotrópica e foram processados através do mesmo processo de extracção definido para as amostras biológicas.

O córtex utilizado para este estudo foi recolhido de um rato, enquanto que o plasma, foi recolhido de um ratinho.

Todas as análises foram efectuadas utilizando o método MRM, que permite um aumento de selectividade e sensibilidade na quantificação dos analitos de interesse nas amostras. Neste modo de aquisição, o primeiro quadrupolo selecciona apenas do ião precursor, que é fragmentado no segundo quadrupolo. No

terceiro quadrupolo ocorre apenas a monitorização do ião escolhido, obtendo-se assim o espectro de intensidade.

O objectivo deste estudo consistiu em avaliar se algum dos tecidos possui algum componente com o mesmo tempo de retenção e com as mesmas transições que os fármacos em estudo e respectivos padrões internos, no sentido de avaliar os possíveis interferentes. Os resultados obtidos foram comparados com o cromatograma resultante da injeção de soluções de fármacos (500 fmol³⁴) a cada um dos tecidos.

A escolha do padrão interno obedece ao critério de selecção de moléculas o mais parecidas possíveis com as moléculas em estudo, (estrutura similar e mesmas funções orgânicas, mas com diferente massa molecular). No presente trabalho foram escolhidos como padrões internos o haloperidol deuterado (haloperidol-D4) e a desipramina, que é um antidepressivo.

Quanto à separação cromatográfica, a optimização dos parâmetros cromatográficos teve em atenção: a obtenção da melhor separação possível dos componentes a analisar; bem como a minimização da adsorção das moléculas e dos padrões internos na coluna cromatográfica, de forma a diminuir a largura dos picos cromatográficos; assim como obter picos o mais simétricos possível.

Numa primeira fase foi utilizada uma coluna ACCLAIM Polar Advantage II C18 (150 × 2.1 mm, 3 µm) (figura 4.21). No entanto, testes realizados com uma coluna de menor dimensão, GEMINI C18 (50 x 2.0 mm, 3 µm) e uma coluna de guarda GEMINI C18 (4 x 3 mm), permitiram obter menor ruído, e melhor separação cromatográfica (figura 4.25).

A figura 4.21 representa o cromatograma obtido com o método MRM para todas as moléculas com as diferentes transições.

³⁴ Símbolo utilizado para femtomole, unidade SI de quantidade igual a 10⁻¹⁵ moles.

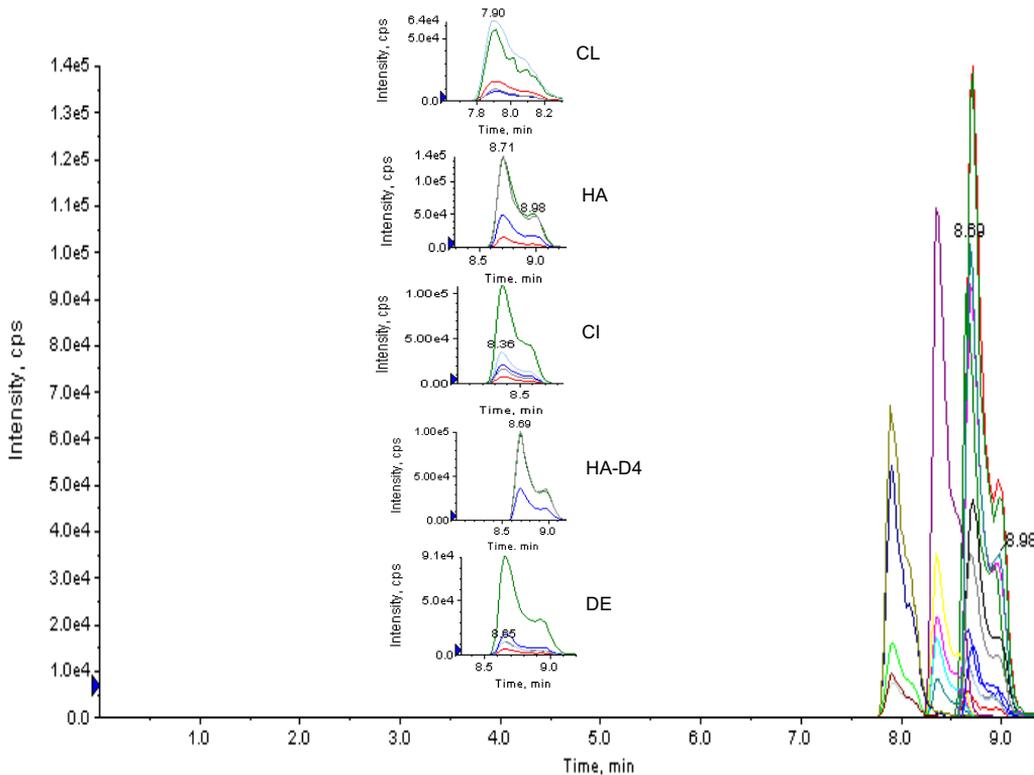


Figura 4.21 – Cromatograma com as diferentes transições para cada molécula adquiridas em método MRM. Injeção de 50 fmol de cada fármaco, CL – clozapina, HA – haloperidol, CI – citalopram, HA-D4 – haloperidol-D4 e DE – desipramina. Resultados obtidos utilizando uma coluna cromatográfica ACCLAIM Polar Advantage II C18 (150 × 2.1 mm, 3 µm).

Através da análise deste cromatograma, verificou-se o tempo de retenção e as respectivas intensidades para todas as transições de cada uma das moléculas em estudo.

Na análise à amostra de córtex de um animal não sujeito a qualquer tipo de tratamento (figura 4.22), não se verificou a presença de qualquer componente no córtex que possua o mesmo tempo de retenção ou os mesmos fragmentos que as moléculas em estudo. O pico intenso com tempo de retenção de 2.67 min, corresponde a um componente encontrado neste tecido que possui uma transição igual à desipramina, no entanto com tempo de retenção diferente.

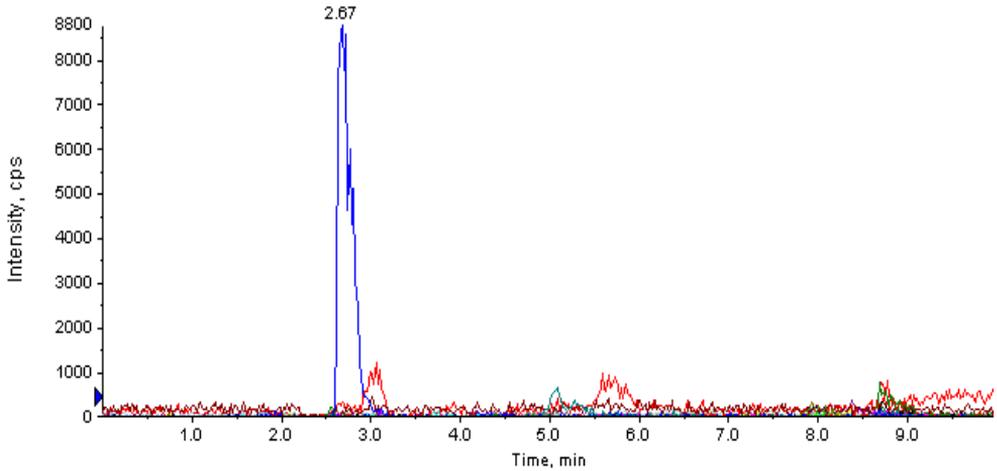


Figura 4.22 – Cromatograma obtido para uma amostra de córtex. Animal não foi sujeito a qualquer tipo de medicação. Sendo usado como coluna cromatográfica, uma GEMINI C18 (50 x 2.0 mm, 3 μ m) e uma coluna de guarda GEMINI C18 (4 x 3 mm).

A figura 4.23 demonstra um cromatograma de uma amostra de córtex de rato, ao qual foram adicionados 500 fmol de cada um dos fármacos e respectivos padrões internos.

Com a obtenção destes dois cromatogramas, pretende-se fazer um estudo comparativo entre os efeitos da matriz biológica de uma amostra de córtex que não sofreu a adição de qualquer componente, com uma amostra de córtex ao qual se adicionaram 500 fmol dos fármacos psicotrópicos em estudo.

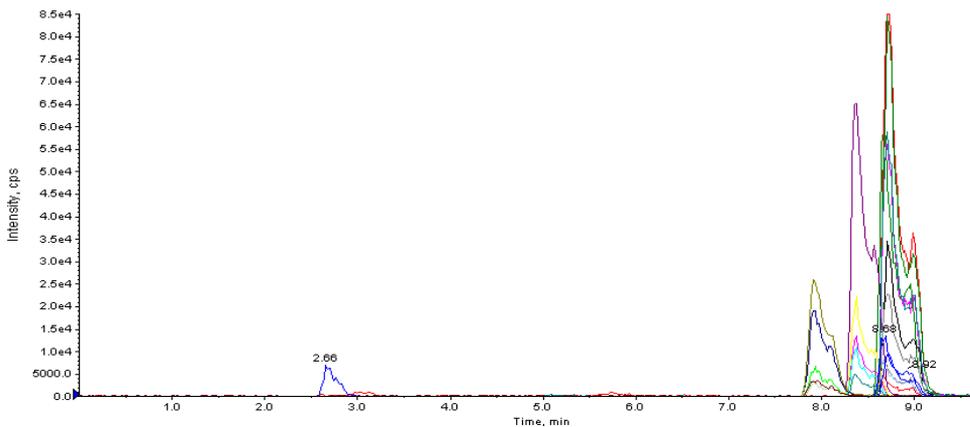


Figura 4.23 – Cromatograma de uma amostra de córtex de rato, ao qual foi injectado no sistema 5 fmol de cada um dos fármacos e respectivos padrões internos, Resultados obtidos utilizando uma coluna cromatográfica ACCLAIM Polar Advantage II C18 (150 x 2.1 mm, 3 μ m).

À semelhança do procedimento realizado com a amostra de córtex, também no plasma se procedeu à obtenção de dois cromatogramas, com a finalidade de comparar os efeitos de matriz de uma amostra que não foi submetida ao tratamento com fármacos psicotrópicos. Numa amostra apenas se adicionou padrão interno (figura 4.24) e noutra amostra foi efectuada a adição de 5 pmol³⁵ de cada um dos fármacos e respectivos padrões internos a 100 µL de plasma (figura 4.25).

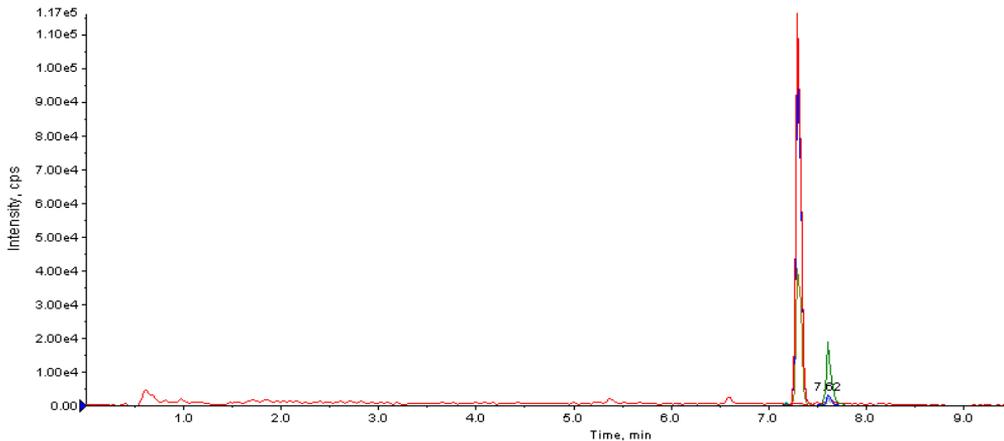


Figura 4.24 – Cromatograma da análise de uma amostra de plasma com a adição de padrão interno. O animal não foi sujeito a qualquer tipo de medicação. Resultados obtidos com uma coluna cromatográfica, uma GEMINI C18 (50 x 2.0 mm, 3 µm) e uma coluna de guarda GEMINI C18 (4 x 3 mm).

³⁵ Símbolo utilizado para picomole, unidade SI de quantidade igual a 10⁻¹² moles.

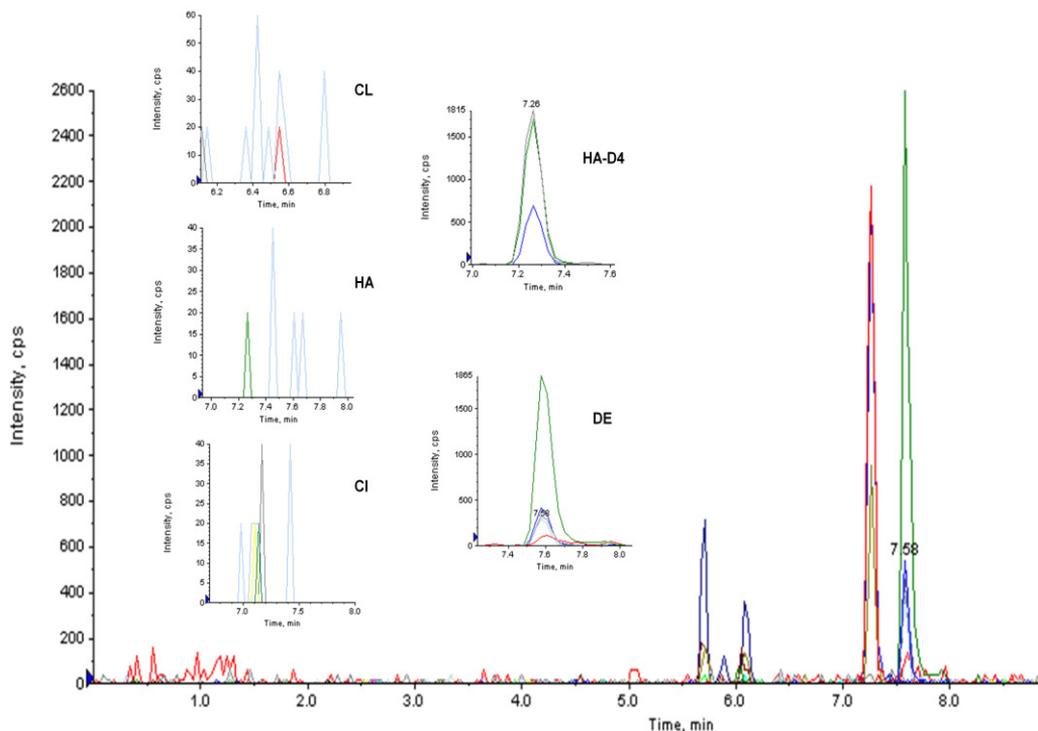


Figura 4.25 – Cromatograma de uma amostra de plasma, à qual foi injectado no sistema 100 fmol de cada um dos fármacos em estudo e respectivos padrões internos. Resultados obtidos usando uma coluna cromatográfica, GEMINI C18 (50 x 2.0 mm, 3 μ m) e uma coluna de guarda GEMINI C18 (4 x 3 mm).

Na análise do cromatograma correspondente à amostra de plasma sem qualquer tipo de adição dos fármacos psicotrópicos em estudo (figura 4.24), apenas se verificam dois picos intensos correspondentes aos padrões internos, o haloperidol-D4 com tempo de retenção de 7.30 min e a desipramina com tempo de retenção de 7.62 min. Desta forma, não existe nenhum componente no plasma que possua a mesma transição com os mesmos tempos de retenção que os fármacos em estudo (clozapina, haloperidol e citalopram).

No que diz respeito à análise do cromatograma da amostra de plasma à qual se adicionaram 5 pmol de cada um dos fármacos psicotrópicos (clozapina, haloperidol e citalopram) (figura 4.25), verificam-se picos correspondentes aos tempos de retenção característicos das moléculas em estudo.

Com esta análise comparativa, comprovou-se que não existe qualquer interferência da matriz biológica na análise dos fármacos propostos para este

estudo. Este resultado está de acordo com um estudo publicado para a determinação de citalopram em plasma de rato, utilizando como ferramenta analítica LC-MS/MS [58].

O passo seguinte no desenvolvimento deste método analítico consistiu no estudo da optimização do processo de extracção dos tecidos. Aos testes efectuados anteriormente, ao qual se adicionaram quantidades conhecidas de fármacos em ambos os tecidos, foram efectuadas análises comparativas. Estas consistiram na comparação entre tecidos controlo, ou seja, amostras de córtex e plasma que não foram sujeitas a qualquer adição de fármacos psicotrópicos, com amostras às quais se adicionaram os fármacos em estudo com processos de extracção diferentes.

A figura 4.26 apresenta os cromatogramas respectivos à adição de 500 fmol de fármacos em amostras de córtex, seguindo-se o processo de extracção que consistiu na precipitação de proteínas com a adição de 3 volumes de metanol. Posteriormente efectuou-se uma extracção líquido-líquido através da adição de 4 volumes de clorofórmio com o objectivo de verificar em que fase (clorofórmio ou metanol) se encontram os fármacos e ainda verificar se através deste passo se diminui a complexidade da amostra biológica. Paralelamente aos resultados obtidos com as diferentes extracções, efectuou-se também a comparações com uma amostra de córtex que não foi sujeita a adição de nenhum fármaco, servindo esta amostra como controlo.

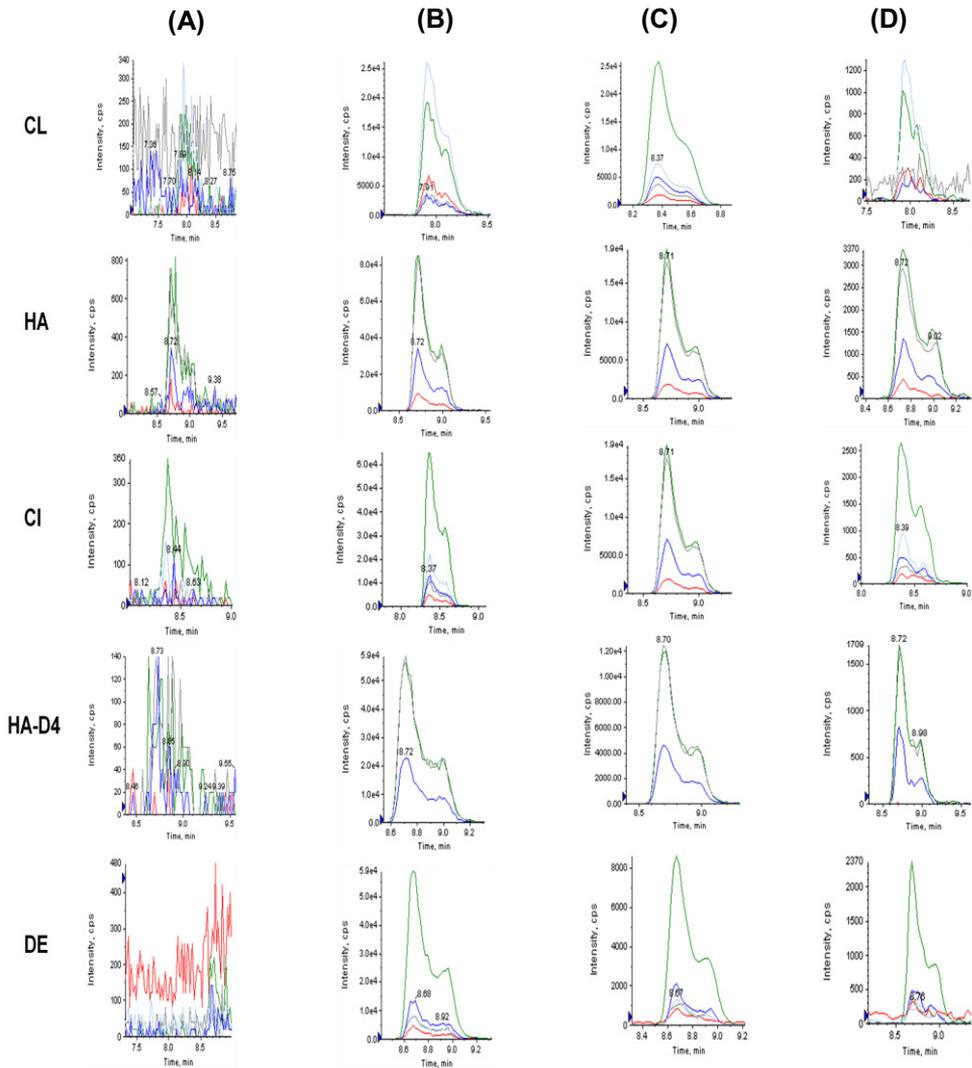


Figura 4.26 – Cromatogramas utilizando o método MRM para a otimização do processo de extração de uma amostra de córtex. A figura mostra os cromatogramas obtidos para cada molécula, relativos à situação controle, na qual a amostra não sofreu qualquer adição dos fármacos em estudo (A), referentes ao processo ao qual não se efectuou extração líquido-líquido (B) e ao processo ao qual se realizou extração líquido-líquido, diferenciando-se a fase do cloróformio (C) da fase do metanol (D). CL, HA, CI, HA-D4 e DE correspondem respectivamente às moléculas de: clozapina, haloperidol, citalopram, haloperidol-D4 e desepamina. Resultados obtidos utilizando uma coluna cromatográfica ACCLAIM Polar Advantage II C18 (150 × 2.1 mm, 3 µm).

À semelhança do que aconteceu com a amostra de córtex, também com a amostra de plasma se optimizou o processo de extração (figura 4.27). Foram

adicionadas 5 pmol de cada um dos fármacos a uma amostra de plasma e efectuaram-se as diferentes extracções. Os resultados obtidos foram comparados com uma amostra controlo, que não foi sujeita a qualquer tipo de adição de fármaco, contendo apenas 12.5 pmol de padrão interno.

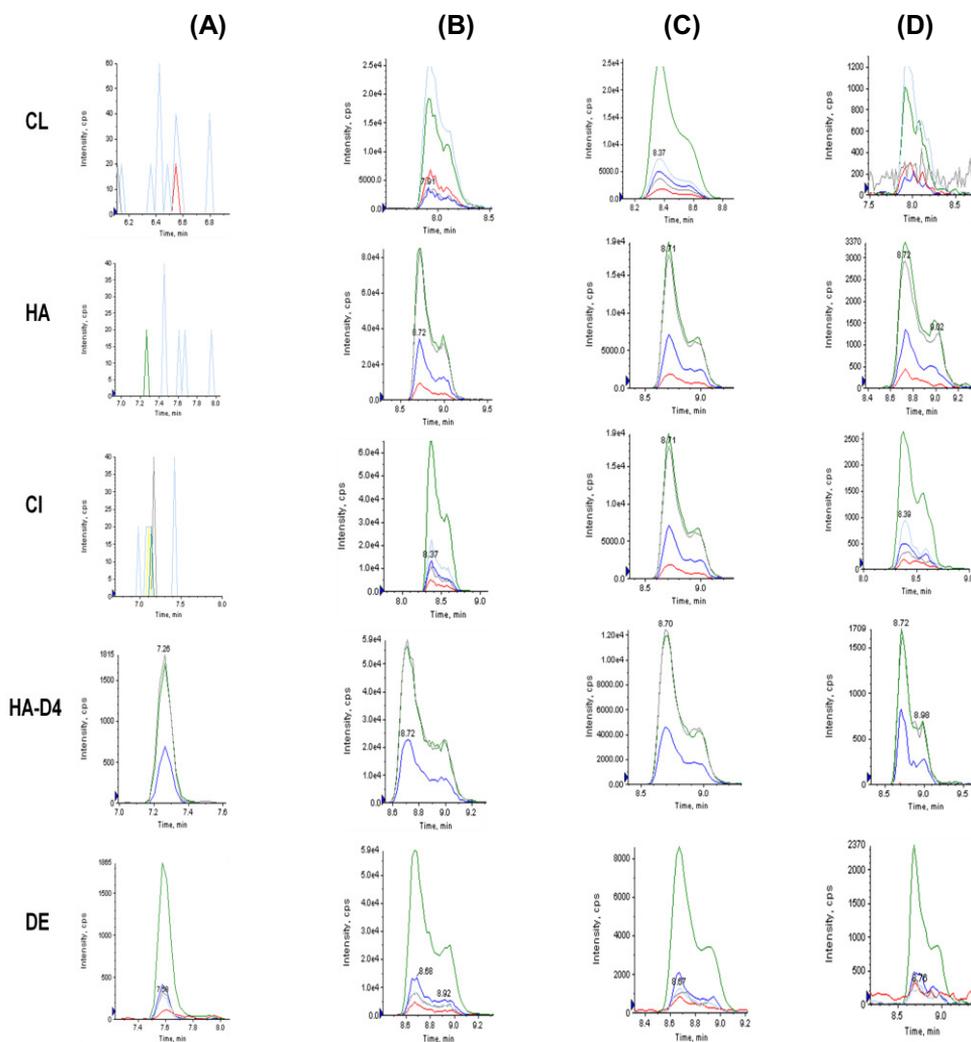


Figura 4.27 – Cromatogramas utilizando o método MRM para a optimização do processo de extracção de uma amostra de plasma. A figura mostra os cromatogramas obtidos para cada molécula, relativos à situação controlo, ao qual a amostra não sofreu qualquer adição dos fármacos em estudo (A), referentes ao processo ao qual não se efectuou extracção líquido-líquido (B) e ao processo com extracção líquido-líquido, diferenciando-se a fase do clorofórmio (C) da fase do metanol (D). CL, HA, CI, HA-D4 e DE correspondem respectivamente às moléculas de: clozapina, haloperidol, citalopram, haloperidol-D4 e desepamina. Resultados obtidos usando uma coluna cromatográfica, GEMINI C18 (50 x 2.0 mm, 3 µm) e uma coluna de guarda GEMINI C18 (4 x 3 mm).

Através da análise destes resultados podemos observar os tempos de retenção associados a cada molécula e respectivas intensidades para cada uma das transições. No que diz respeito ao processo de extracção, verificou-se que os fármacos se encontram principalmente na fase do clorofórmio, sendo encontrada apenas uma quantidade vestigial de fármaco na fase do metanol. Comparando as intensidades de sinal do processo sem extracção líquido-líquido com o processo ao qual se efectuou esta extracção, verifica-se que a intensidade de sinal é maior no caso em que não se efectuou a extracção.

O passo seguinte consiste em comparar estes dois processos, no sentido de se verificar se através do processo de extracção líquido-líquido se consegue diminuir a complexidade da amostra e aumentar a sensibilidade do método.

A figura 4.28 representa a sobreposição entre os dois processos na extracção de uma amostra de córtex, ao qual foi escolhido para cada um dos fármacos a transição com maior intensidade de sinal.

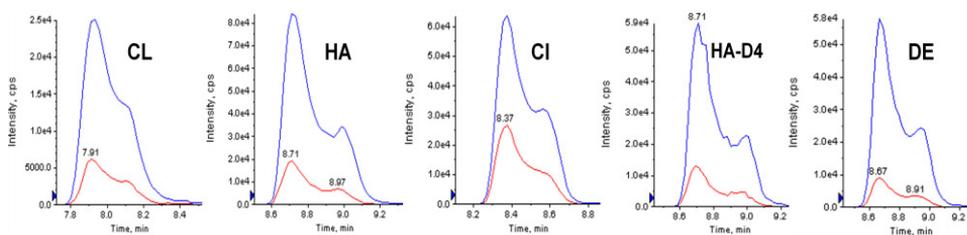


Figura 4.28 – Cromatogramas obtidos na análise de uma amostra de córtex, ao qual se adicionaram 500 fmol de cada fármaco. Este conjunto de cromatogramas representa a sobreposição do processo de extracção onde não foi efectuada extracção líquido-líquido (linha azul) com o processo onde foi realizado a extracção líquido-líquido - fase do clorofórmio (linha vermelha). As transições representadas dizem respeito a: CL – 327.8/270.3; HA – 376.1/127.0; CI - 325.2/109.2; HA-D4 – 380.3/169.2 e DE – 267.4/72.1.

A tabela 4.35 mostra a percentagem de recuperação calculada para cada um dos fármacos e respectivos padrões internos entre estes dois processos de extracção de uma amostra de córtex, obtidas através das diferenças entre as áreas de ambos.

Tabela 4.35 – Percentagens de recuperação obtidas na análise de uma amostra de córtex, utilizando a extracção líquido-líquido.

	Recuperação (%)
CL	22.9
HA	20.4
CI	38.5
HA-D4	13.0
DE	19.8

CL- clozapina, HA – haloperidol, CI – citalopram, HA-D4 – haloparidol-D4, DE – desipramina

O mesmo procedimento comparativo foi efectuado para a amostra de plasma (figura 4.29) e calcularam-se as respectivas percentagens de recuperação (tabela 4.36).

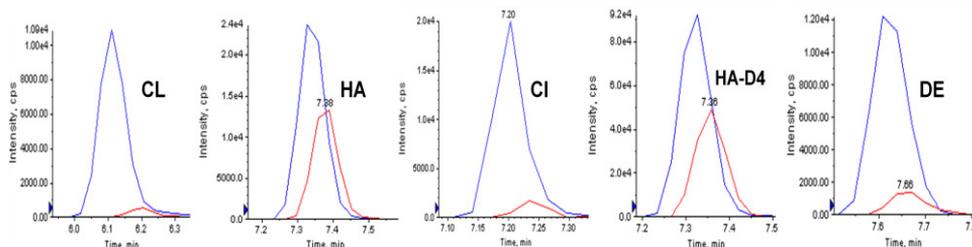


Figura 4.29 – Cromatogramas obtidos na análise de uma amostra de plasma, à qual se adicionaram 100 fmol de fármaco. Este conjunto de cromatogramas representa a sobreposição do processo de extracção onde não foi efectuada extracção líquido-líquido (linha azul) com o processo onde foi realizado a extracção líquido-líquido - fase do clorofórmio (linha vermelha). As transições representadas dizem respeito a: CL – 327.8/270.3; HA – 376.1/123.0; CI - 325.2/109.2; HA-D4 – 380.3/169.2 e DE – 267.4/72.1.

Tabela 4.36 – Percentagens de recuperação obtidas na análise de uma amostra de plasma, utilizando o processo de extracção líquido-líquido.

	Recuperação (%)
CL	4.6
HA	54.6
CI	8.6
HA-D4	47.5
DE	11.7

CL- clozapina, HA – haloperidol, CI – citalopram, HA-D4 – haloparidol-D4, DE – desipramina

Através da análise destes resultados, observam-se reduzidas percentagens de recuperação indicando assim perdas durante o processo de extracção líquido-líquido. Desta forma, o processo de extracção não é vantajoso na análise das amostras de córtex e plasma, pelo que não foi utilizado nos ensaios seguintes.

4.3.5 Linearidade

A análise da linearidade foi construída com base em curvas de calibração para cada uma das transições apresentadas anteriormente, com dez concentrações conhecidas. Os pontos correspondentes às concentrações foram produzidos em *triplicata* e as curvas foram ajustadas de forma a se obter melhores resultados a nível de linearidade. Para este efeito, consideraram-se os valores da razão entre a área do pico correspondente ao fármaco e a área do pico correspondente ao padrão interno.

Tendo em conta as melhores transições, ou seja, as transições mais intensas correspondentes a cada uma das moléculas, foram seleccionadas as três melhores curvas de calibração para cada um dos fármacos.

4.3.5.1 Curvas de calibração para a clozapina

As curvas de calibração para a clozapina, foram construídas com as seguintes concentrações: 32.68; 81.71; 163.41; 326.82; 817.06 e 1634.12 ng/mL (tabela 4.37). Na figura 4.30 encontram-se representadas as três curvas de calibração obtidas para a clozapina correspondentes às transições mais intensas.

Tabela 4.37 – Valores referentes à razão entre a área do pico da clozapina e a área do padrão interno, e respectivas concentrações conhecidas, utilizados na construção das curvas de calibração deste fármaco.

Concentrações (ng/mL)	Curvas		
	1	2	3
32.68	0.05	0.07	0.01
	0.04	0.06	0.01
	0.05	0.06	0.01
81.71	0.12	0.16	0.04
	0.13	0.17	0.04
	0.13	0.17	0.03
163.41	0.27	0.37	
	0.28	0.38	0.08
	0.28	0.37	0.08
326.82	0.55	0.74	
	0.57	0.77	0.16
	0.56	0.81	0.16
817.06	1.38	1.95	0.41
	1.38	1.92	0.39
	1.49		0.44
1634.12	2.55	3.36	0.70
	2.48	3.34	0.73
	2.41	3.27	0.69

Da tabela 4.37 obtiveram-se as seguintes curvas de calibração:

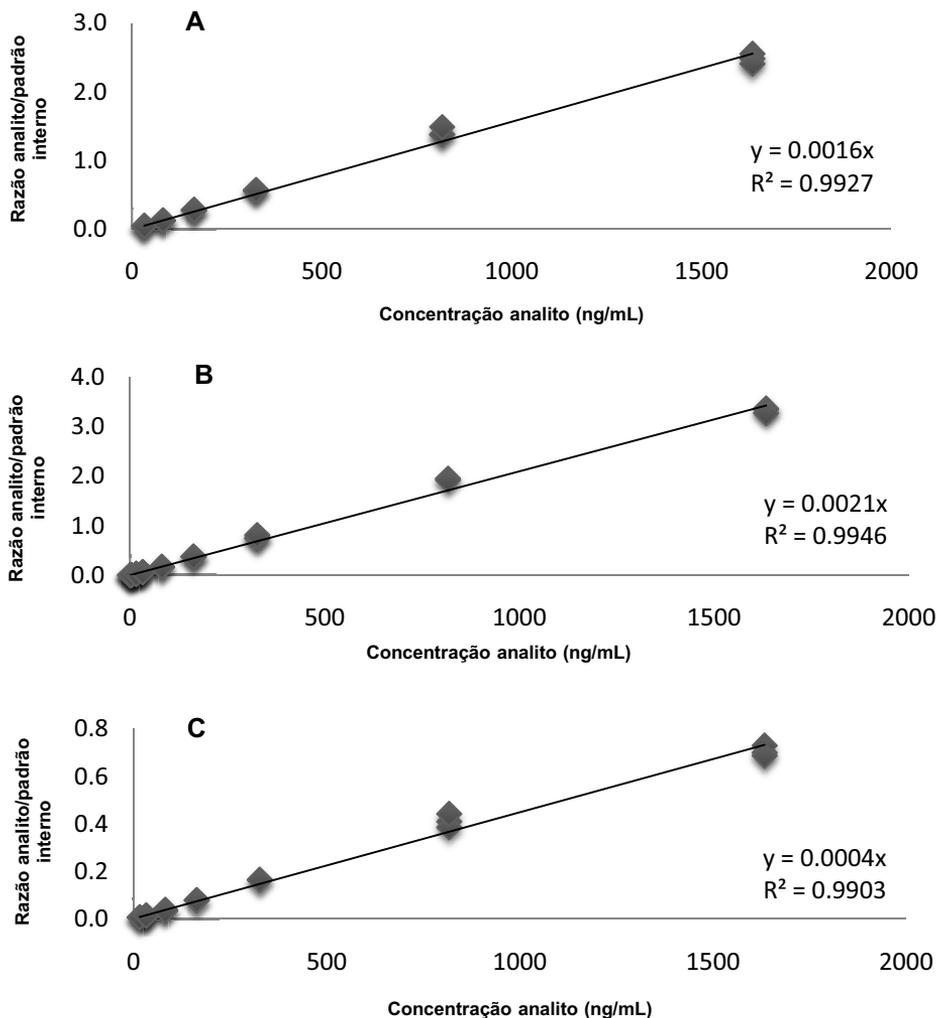


Figura 4.30 – Curvas de calibração obtidas para a solução de clozapina. (A) Curva 1, correspondente à transição 327.3 – 192.2; (B) Curva 2, correspondente à transição 327.3 – 270.3 e (C) Curva 3 correspondente à transição 327.3 – 227.1.

Para todas as curvas da clozapina foram registados os valores da sensibilidade e o erro padrão associado (tabela 4.38).

Tabela 4.38 – Valores obtidos para a sensibilidade e o respectivo erro associado.

Curva	Sensibilidade	RSE(%)
1	0.00154	2.0
2	0.00205	2.0
3	0.00044	2.7

4.3.5.2 Curvas de calibração para o haloperidol

As concentrações consideradas para o haloperidol foram as seguintes: 18.90; 37.59; 93.98; 187.95 e 375.90 ng/mL (tabela 4.39).

Tabela 4.39 – Valores referentes à razão entre a área do pico do haloperidol e a área do padrão interno, e respectivas concentrações conhecidas utilizados na construção das curvas de calibração deste fármaco.

Concentrações (ng/mL)	Curvas		
	1	2	3
3.76	0.02	0.03	0.01
	0.03	0.03	0.01
	0.03	0.03	0.01
18.80	0.13	0.12	0.04
	0.12	0.12	0.04
	0.13	0.12	0.04
37.59	0.27	0.27	0.09
	0.27	0.27	0.09
	0.29	0.27	0.09
93.98	0.67	0.65	0.20
	0.69	0.65	0.22
	0.65	0.64	0.21
187.95			0.41
	1.38	1.33	0.44
	1.38	1.33	0.43

Da tabela 4.39 obtiveram-se as três curvas de calibração obtidas para esta molécula correspondentes às transições mais intensas (figura 4.31).

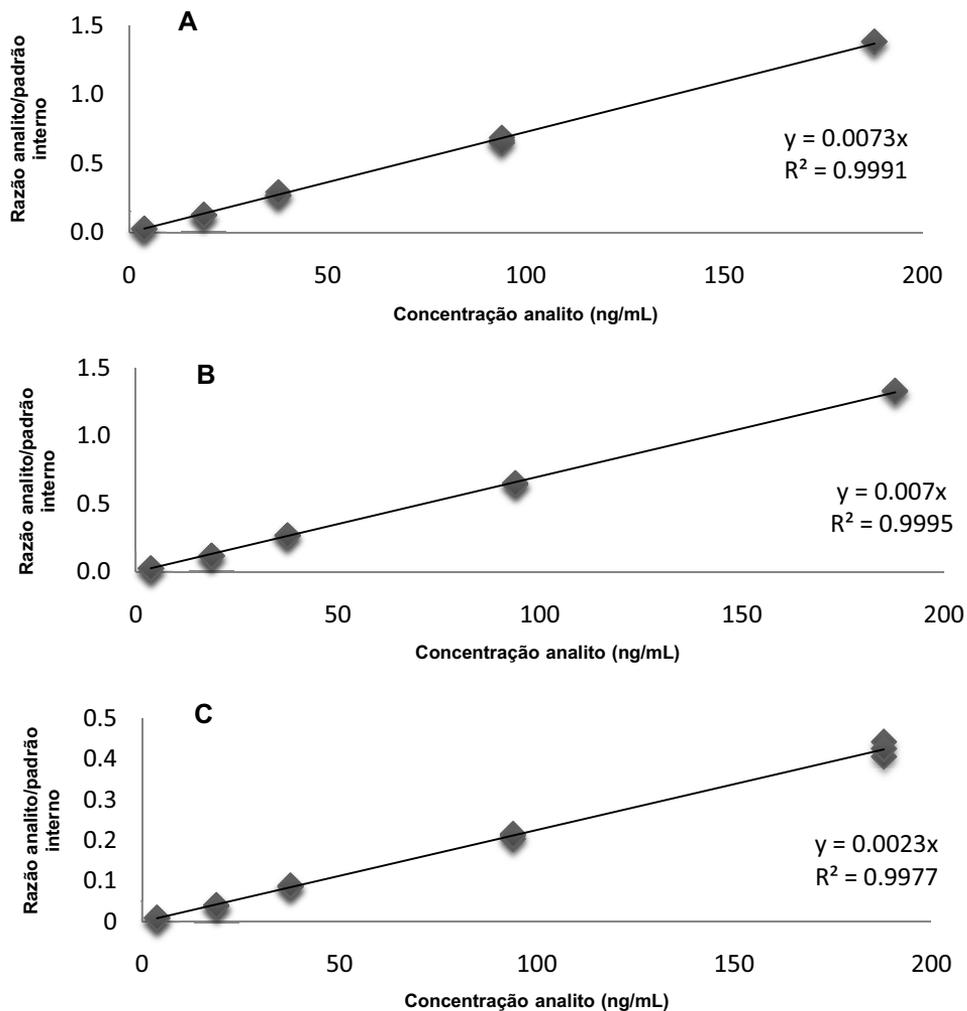


Figura 4.31 – Curvas de calibração obtidas para a solução de haloperidol. (A) Curva 1, correspondente à transição 376.2 – 123.0; (B) Curva 2, correspondente à transição 376.2 – 165.1 e (C) Curva 3, correspondente à transição 376.2 – 123.2.

Procedeu-se ao registo dos valores da sensibilidade e o erro associado (tabela 4.40) para todas as curvas do haloperidol.

Tabela 4.40 – Valores obtidos para a sensibilidade e o respectivo erro padrão associado para o haloperidol.

Curva	Sensibilidade	RSE(%)
1	0.00734	1.5
2	0.007077	1.5
3	0.002258	1.9

4.3.5.3 Curvas de calibração para o citalopram

No caso do citalopram, a primeira curva foi construída com as seguintes concentrações: 3.24; 16.22; 32.44; 81.10 e 162.20 ng/mL. Para as restantes curvas (curva 2 e 3) as concentrações foram as seguintes: 0.97; 3.24; 16.22; 32.44 e 81.10 ng/mL (tabela 4.41).

Tabela 4.41 – Valores referentes à razão entre a área do pico do citalopram e a área do padrão interno, e respectivas concentrações conhecidas utilizados na construção das curvas de calibração deste fármaco.

Concentrações (ng/mL)	Curvas		
	1	2	3
0.97		0.07	0.03
		0.09	0.03
		0.10	0.03
3.24		0.25	0.07
	0.05	0.27	0.10
	0.05	0.29	0.10
16.22	0.24	1.32	0.40
	0.24	1.34	0.44
	0.24	1.21	0.46
32.44	0.54	2.61	0.83
	0.53	2.77	0.87
	0.48	2.67	0.93
81.10		6.88	2.19
	1.40	7.19	2.39
	1.41	7.44	2.42
162.20	2.60		
	2.69		
	2.81		

A figura 4.32 representa as três curvas de calibração obtidas para esta molécula correspondentes às transições mais intensas, obtidas através da tabela 4.41.

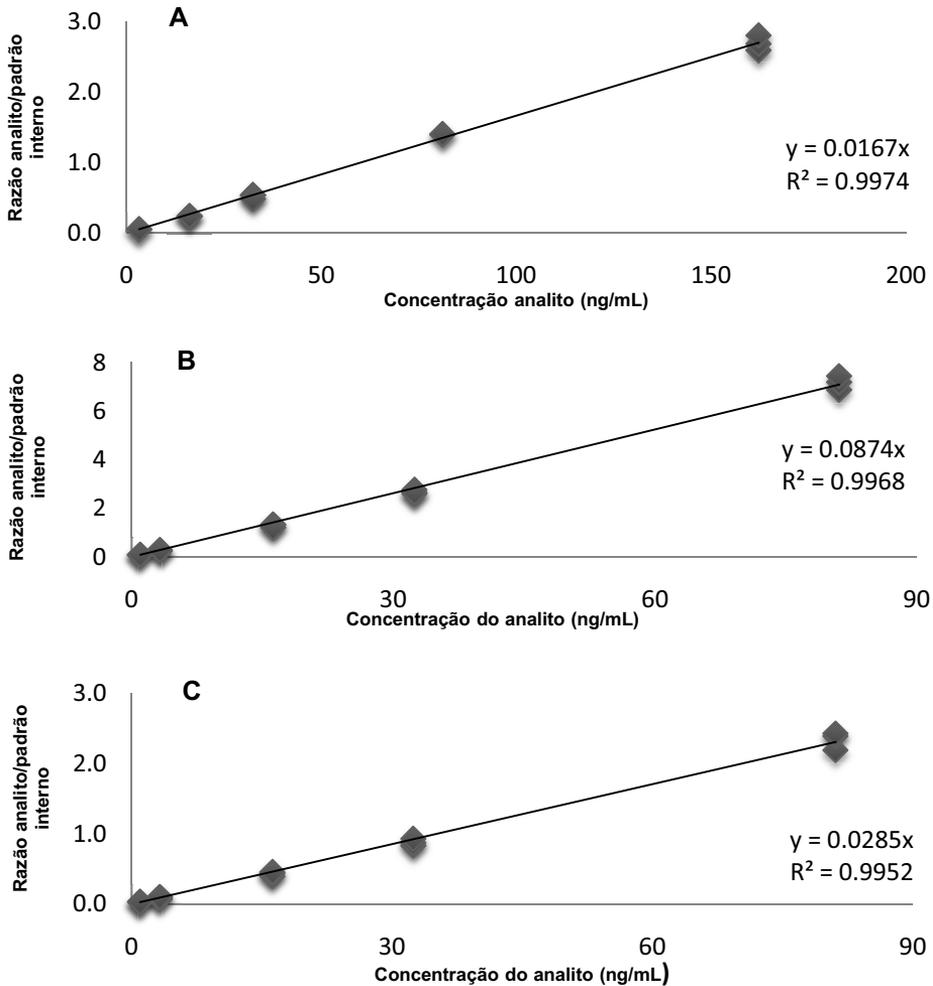


Figura 4.32 – Curvas de calibração obtidas para a solução de citalopram. (A) Curva 1, correspondente à transição 325.3 – 83.2; (B) Curva 2, correspondente à transição 325.3 – 109.0 e (C) Curva 3, correspondente à transição 325.3 – 262.1.

Para todas as curvas do citalopram foram registados os valores da sensibilidade e o erro associado (tabela 4.42).

Tabela 4.42 – Valores obtidos para a sensibilidade e o respectivo erro padrão associado para o citalopram.

Curva	Sensibilidade	RSE(%)
1	0.0168	0.8
2	0.0886	0.5
3	0.0288	1.3

4.3.6 Limites de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção é definido como a menor quantidade de analito numa amostra e que possa ser detectado. Estatisticamente, o limite de detecção foi determinado através da equação da recta de calibração, recorrendo ao valor da intercepção da recta e respectiva incerteza (tabela 4.40).

O limite de quantificação é definido como a menor concentração de analito que pode ser detectado com um nível aceitável de precisão e exactidão, à semelhança do limite de detecção, o limite de quantificação foi determinado através da equação da curva, recorrendo ao valor da intercepção da recta e a respectiva incerteza (tabela 4.43).

Tabela 4.43 – Concentrações correspondentes aos limites de detecção e quantificação para cada uma das moléculas.

	Curvas	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
CL	1	53.24	159.73
	2	52.22	156.66
	3	75.20	225.61
HA	1	2.48	7.45
	2	1.66	4.97
	3	4.53	13.59
CI	1	4.60	13.92
	2	2.12	6.10
	3	2.61	7.83

CL- clozapina, HA – haloperidol, CI – citalopram

4.3.7 Precisão e exactidão

A determinação da exactidão permite estimar o grau de erros sistemáticos que afectam o método. A exactidão mede a proximidade do valor obtido em relação ao valor real e taxas de recuperação próximas de 100% indicam a ausência de erros sistemáticos.

A avaliação da precisão foi efectuada através da expressão numérica do erro aleatório ou grau de dispersão de um conjunto de medições individuais por meio do desvio padrão (SD³⁶) e do coeficiente de correlação (CV) [63].

Para a obtenção destes resultados, foi utilizado a mesma gama de concentrações usadas nas curvas de calibração.

As tabelas 4.44, 4.45 e 4.46 representam os valores obtidos a nível de percentagens de CV e percentagem de recuperação para cada um dos fármacos.

Tabela 4.44 – Valores referentes ao controlo de qualidade para a clozapina.

		Concentrações de controlo de qualidade (ng/mL)					
		32.68	81.71	163.41	326.82	817.06	1634.12
Curva 1	M	0.047	0.126	0.276	0.563	1.415	2.482
	SD	0.002	0.003	0.009	0.010	0.062	0.072
	%CV	4.0	2.3	3.4	1.7	4.4	2.9
	%RI	93.5	100.7	110.1	112.1	112.8	98.9
Curva 2	M	0.064	0.168	0.374	0.774	1.935	3.324
	SD	0.003	0.007	0.002	0.035	0.021	0.048
	%CV	4.5	4.2	0.5	4.5	1.1	1.5
	%RI	95.6	100.3	111.8	115.6	115.6	99.3
Curva 3	M	0.014	0.037	0.079	0.165	0.413	0.706
	SD	0.000	0.002	0.000	0.000	0.029	0.022
	%CV	2.6	6.5	0.2	0.1	7.0	3.1
	%RI	99.0	102.5	55.4	76.7	115.5	99.1

M – média, SD – desvio padrão, %CV – percentagem de coeficiente de correlação, %RI – percentagem de recuperação.

³⁶ Do inglês, Standard Deviation

Tabela 4.45 – Valores referentes ao controlo de qualidade para o haloperidol.

		Concentrações de controlo de qualidade (ng/mL)				
		3.76	18.80	37.59	93.98	187.95
Curva 1	M	0.026	0.126	0.276	0.667	1.381
	SD	0.001	0.002	0.014	0.019	0.000
	%CV	3.9	1.6	4.9	2.8	0.0
	%RI	92.7	91.3	99.9	96.7	100.1
Curva 2	M	0.025	0.118	0.267	0.648	1.329
	SD	0.000	0.000	0.002	0.005	0.004
	%CV	1.3	0.4	0.7	0.8	0.3
	%RI	95.2	88.7	100.3	97.4	99.9
Curva 3	M	0.009	0.039	0.087	0.210	0.424
	SD	0.001	0.001	0.002	0.006	0.018
	%CV	11.9	3.2	2.1	2.9	4.3
	%RI	103.4	92.8	102.5	99.0	100.0

M – média, SD – desvio padrão, %CV – percentagem de coeficiente de correlação, %RI – percentagem de recuperação.

Tabela 4.46 – Valores referentes ao controlo de qualidade para o citalopram.

		Concentrações de controlo de qualidade (ng/mL)					
		0.97	3.24	16.22	32.44	81.10	162.20
Curva 1	M		0.050	0.237	0.518	1.401	2.697
	SD		0.005	0.002	0.032	0.007	0.106
	%CV		9.6	0.8	6.1	0.5	3.9
	%RI		91.1	86.7	95.0	102.7	98.9
Curva 2	M	0.085	0.269	1.290	2.681	7.172	
	SD	0.010	0.023	0.070	0.079	0.283	
	%CV	11.8	8.4	5.5	3.0	4.0	
	%RI	99.0	93.5	89.7	93.2	99.8	
Curva 3	M	0.030	0.089	0.429	0.877	2.334	
	SD	0.003	0.016	0.031	0.049	0.127	
	%CV	8.4	18.2	7.2	5.6	5.5	
	%RI	106.8	95.3	91.9	93.8	99.9	

M – média, SD – desvio padrão, %CV – percentagem de coeficiente de correlação, %RI – percentagem de recuperação.

Na apreciação dos resultados obtidos, verifica-se que o método desenvolvido é preciso, uma vez que para todos os fármacos em estudo os valores percentuais de coeficiente de variação (CV) obtidos são inferiores a 20%.

No que diz respeito ao estudo da exactidão, os valores obtidos relativamente às taxas de recuperação, encontram-se próximos de 100%, tendo esta condição uma margem de erro de 20%, podendo assim variar entre 80% e 120%. Verifica-se, portanto, a ausência de erros sistemáticos.

4.3.8 Processamento das amostras biológicas

Depois de otimizados os métodos de processamento das amostras e aquisição de dados, procedeu-se ao processamento das amostras biológicas (correspondentes ao córtex e plasma) dos animais sujeitos a tratamentos com os respectivos fármacos psicotrópicos.

Grupos de cinco animais foram sujeitos à injeção de medicação psicotrópica (clozapina, haloperidol e citalopram) e à injeção de uma substância salina – grupo controlo, consoante os seguintes períodos de tratamento: um, dois, quatro, oito e quinze dias.

As amostras foram processadas seguindo uma ordem específica, primeiro procedeu-se ao processamento de todas as amostras controlo, seguindo-se as amostras sujeitas ao tratamento com a clozapina, depois haloperidol e por último citalopram.

Na análise dos resultados obtidos para as amostras de córtex dos animais sujeitos apenas a injeções com a solução salina – controlo, verificou-se a existência de grandes quantidades de fármacos existentes no córtex - elevada intensidade de sinal para todas as transições de cada um dos fármacos (figura 4.33).

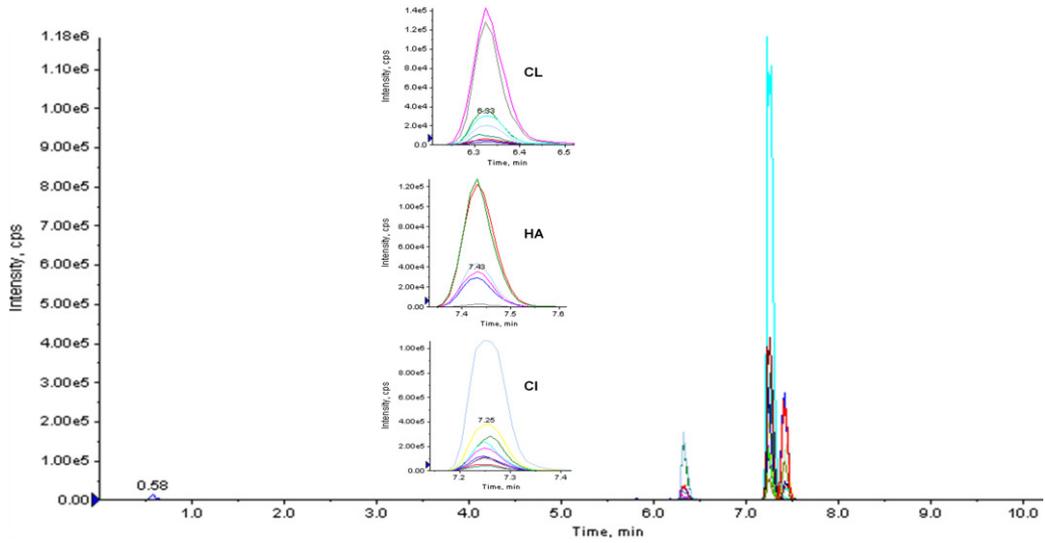


Figura 4.33 - Cromatograma obtido através da análise de uma amostra de córtex de um animal sujeito ao tratamento com solução controlo, dia 1.

Apesar do resultado não ser o esperado (dado que o desenvolvimento do método não detectou interferências – figura 4.22), procedeu-se à análise de uma amostra de córtex de um animal sujeito à medicação com clozapina (figura 4.34).

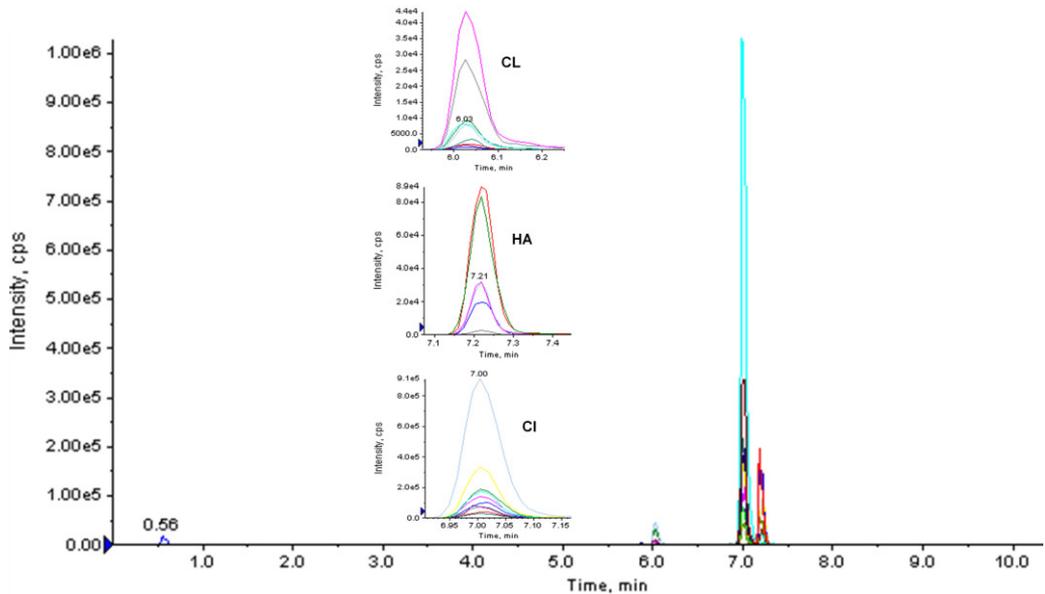


Figura 4.34 – Cromatograma obtido através da análise de uma amostra de córtex de um animal sujeito ao tratamento com clozapina, dia 1.

Através da análise dos cromatogramas obtidos para o processamento de todos as amostras de córtex de animais sujeitos ao tratamento com clozapina (dados não apresentados), mais uma vez a situação não se demonstrou em linha com os resultados obtidos no desenvolvimento do método. Apesar de se tratar de animais sujeitos à medicação com clozapina, o cromatograma mostra intensidades de sinal correspondentes às moléculas de citalopram e haloperidol, superiores às de clozapina, indicando assim a possibilidade de contaminação das amostras.

De seguida procedeu-se à análise do grupo de animais sujeitos ao tratamento com haloperidol (figura 4.35).

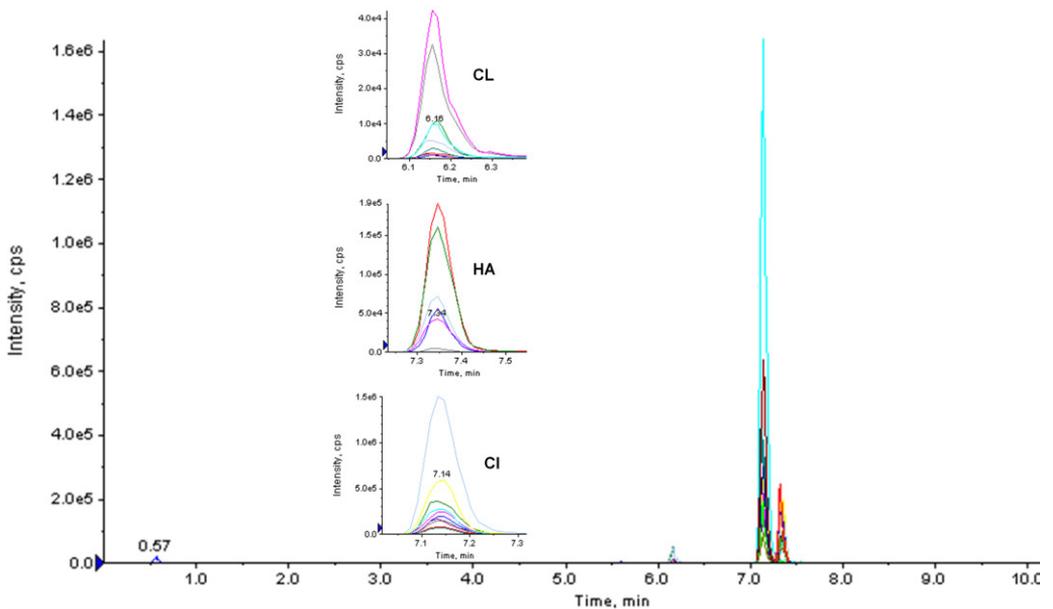


Figura 4.35 – Cromatograma obtido na análise de uma amostra de córtex de um animal sujeito ao tratamento com haloperidol, dia 1.

À semelhança do que se verificou com o fármaco anterior, na análise de amostras do grupo de animais sujeitos ao tratamento com haloperidol (figura 4.35), observa-se uma grande intensidade de sinal para todas as transições de cada um dos fármacos, apesar de estes animais terem sido apenas sujeitos ao tratamento com haloperidol.

A análise dos resultados obtidos para os animais que foram injectados com solução de citalopram são semelhantes aos resultados anteriores (figura 4.36), observando-se uma vez mais a presença dos outros fármacos.

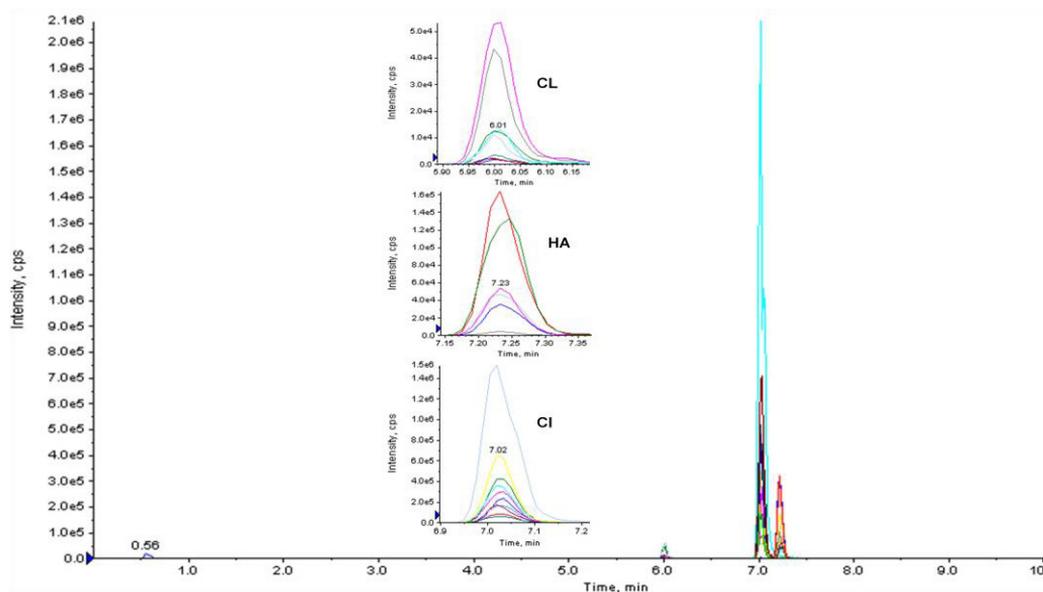


Figura 4.36 – Cromatograma obtido através da análise de uma amostra de córtex de animal sujeito ao tratamento com citalopram, dia 1.

Os resultados obtidos na análise deste tecido não se encontram em linha com o método desenvolvido (onde não se verificam transições contaminantes) e não permitem quantificar os fármacos presentes no córtex após os diferentes dias de tratamento.

No sentido de se identificar uma possível origem da aparente contaminação, procederam-se à análise de diversas soluções utilizadas na preparação das amostras, das quais se incluem: i) soluções com inibidores de proteases e fosfatases (figura 4.37), ii) tampão TEAB (figura 4.38) e analisou-se igualmente uma amostra de córtex de rato sem adição de TEAB e inibidores de protease e fosfatase (figura 4.39).

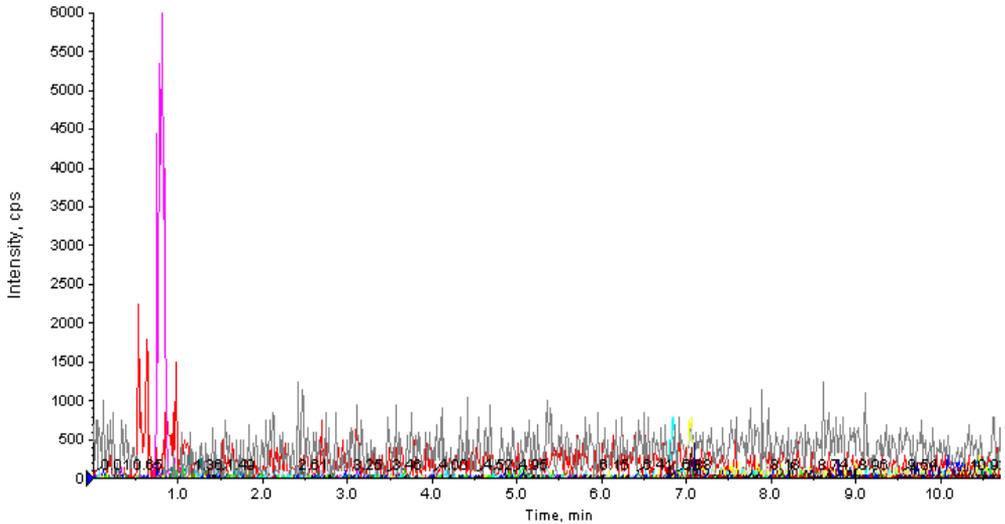


Figura 4.37 – Cromatograma das soluções de inibidores de proteases e inibidores de fostatases.

A análise da solução com inibidores de proteases e fosfatases não revela qualquer componente com transições que interfiram com as moléculas em estudo.

De igual modo, a análise do tampão TEAB (figura 4.38) também não apresenta transições que interfiram com o método desenvolvido

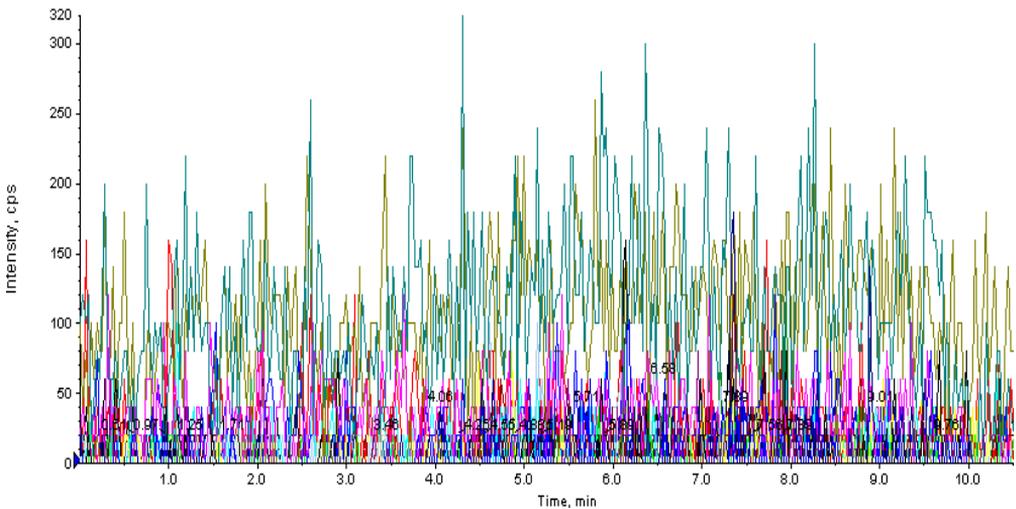


Figura 4.38 – Cromatograma da solução de TEAB.

Por último, a análise de um córtex de ratinho que não sofreu qualquer tipo de tratamento e ao qual não foi adicionada a solução de inibidores de fosfatases, solução de inibidores de proteases e solução tampão TEAB (figura 4.39). Os resultados permitem observar apenas ligeiras interferências que não se encontram na ordem de grandeza dos observados nos ratinhos tratados com fármacos (figuras 4.33, 4.34, 4.35, 4.36)

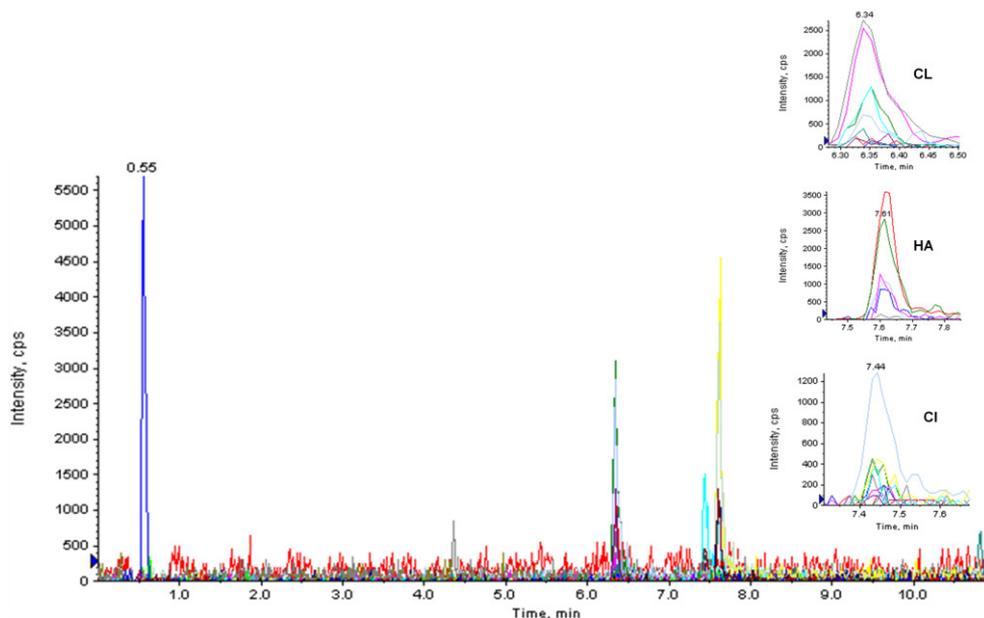


Figura 4.39 – Cromatograma obtido na análise de uma amostra de córtex de ratinho, ao qual não foi adicionado solução de inibidores de proteases e solução de inibidores de fosfatases e solução TEAB.

O procedimento da preparação das amostras de plasma foi efectuado de forma semelhante ao das amostras de córtex, e seguiu a mesma ordem de processamento, ou seja, primeiro foram processadas todas as amostras tratadas com solução controlo, seguindo-se as amostras tratadas com os fármacos psicotrópicos em estudo, clozapina, haloperidol e citalopram respectivamente.

Na análise de plasma de um animal tratado com solução salina (grupo controlo) ao fim de um dia tratamento (figura 4.40), verifica-se a presença de componentes com os mesmos tempos de retenção que as moléculas dos fármacos em estudo, no entanto com intensidades de sinal reduzidas.

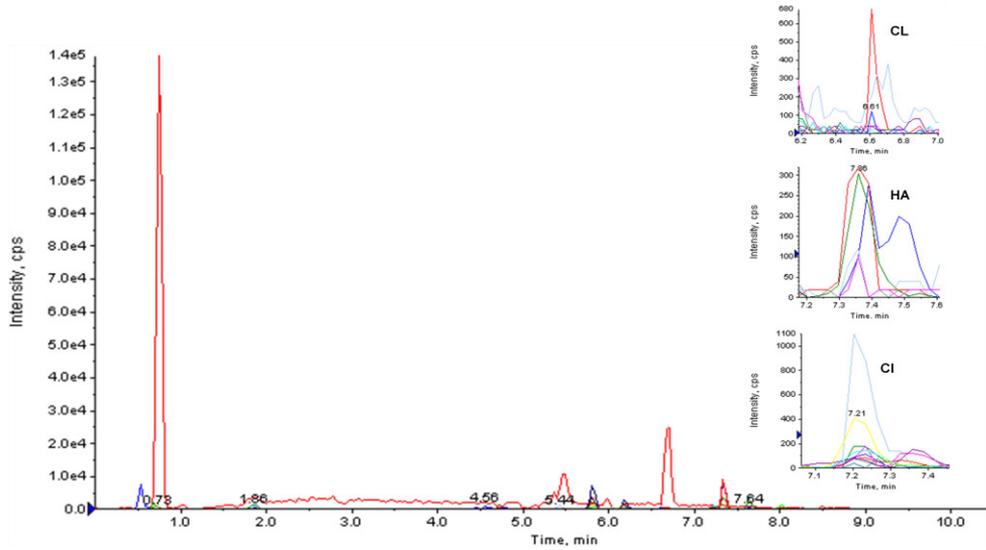


Figura 4.40 – Cromatograma obtido na análise de uma amostra de plasma de um animal sujeito ao tratamento com solução controle, dia 1.

Os cromatogramas das amostras biológicas correspondentes a animais que foram sujeitos ao tratamento com clozapina, revelaram a presença desta molécula através da existência de picos intensos correspondentes às mesmas transições e mesmos tempos de retenção característicos da clozapina (figura 4.41).

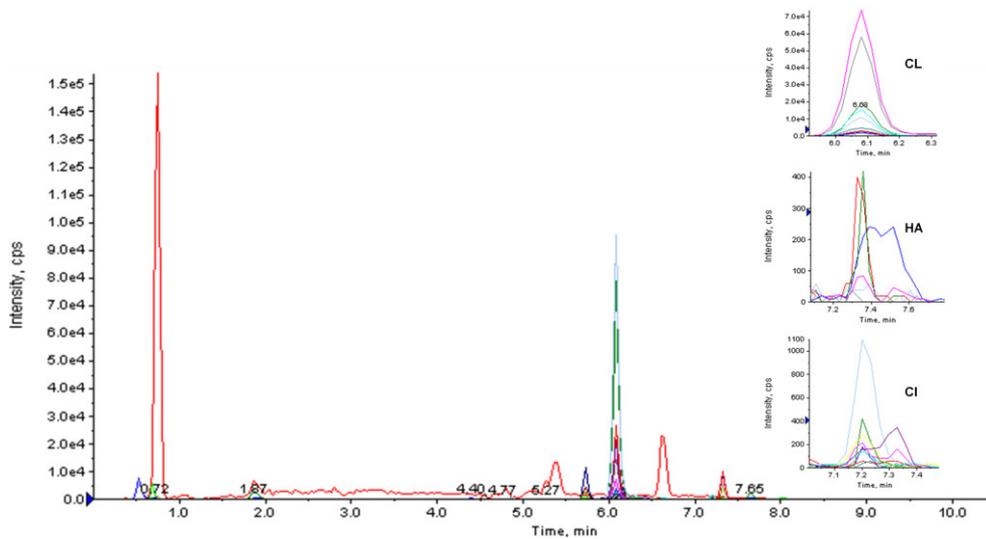


Figura 4.41 – Cromatograma obtido na análise de uma amostra de plasma de um animal sujeito ao tratamento com clozapina, dia 1.

Esta amostra apresenta uma boa intensidade de sinal para os picos correspondentes à clozapina, neste tecido a presença de haloperidol e citalopram é bastante reduzida.

Resultados semelhantes foram obtidos para amostras de plasma de ratinhos tratados com haloperidol (figura 4.42) e citalopram (figura 4.43) onde é notória a presença dos fármacos nas respectivas amostras e observa-se uma reduzida contaminação das restantes transições para os outros fármacos.

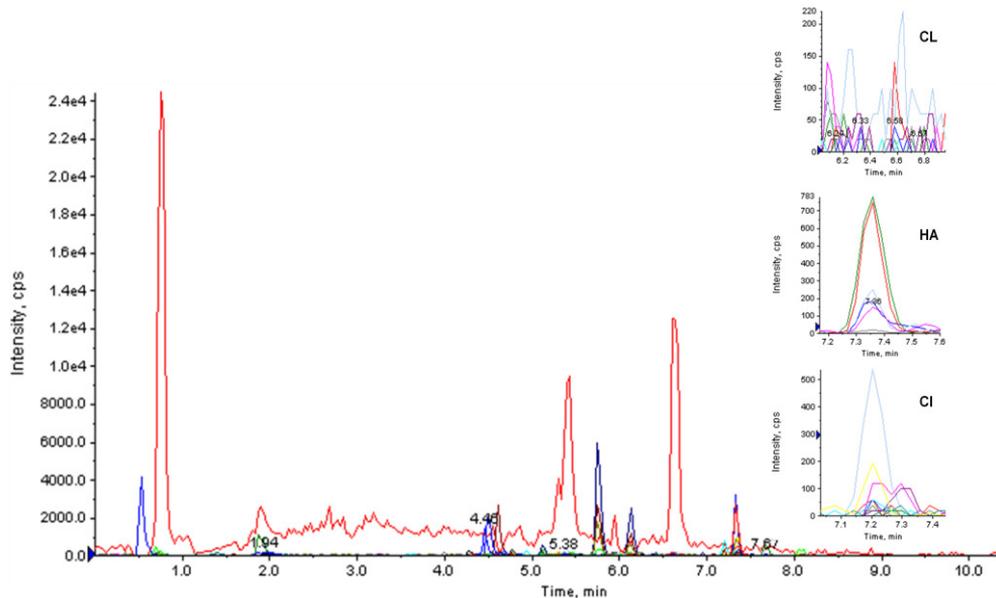


Figura 4.42 – Cromatograma obtido através da análise de uma amostra de plasma de um animal sujeito ao tratamento com haloperidol, dia 1.

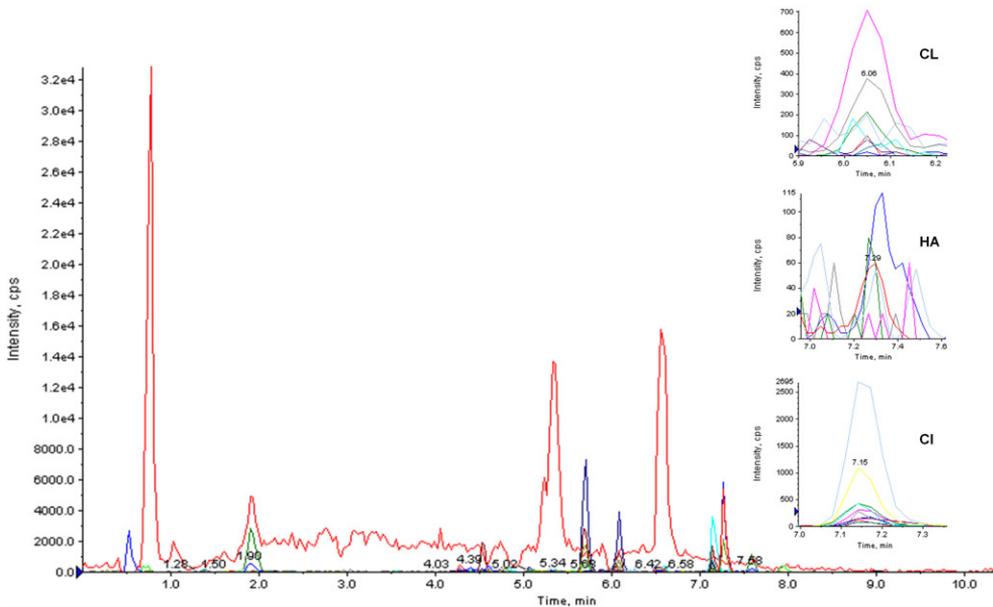


Figura 4.43 – Cromatograma obtido na análise de uma amostra de plasma de um animal sujeito ao tratamento com citalopram, dia 1.

Após a análise prévia dos valores experimentais quanto à existência de valores discrepantes, procedeu-se à quantificação dos fármacos presente no plasma.

Para este efeito foram considerados os valores médios das concentrações de fármacos presentes nas amostras de tecido correspondentes aos diferentes dias de tratamento, tendo em conta as melhores transições, ou seja, as transições mais intensas correspondentes a cada uma das moléculas.

Foi possível detectar e quantificar os fármacos (clozapina, haloperidol e citalopram), em plasma de ratinhos durante os diferentes dias de tratamento.

Na análise dos resultados obtidos, relativamente à quantidade de fármaco presente em plasma de animais que foram submetidos ao tratamento com clozapina, verificou-se a obtenção de maior quantidade nos dias 1 e 8. Observando-se uma diminuição em relação a estes dois dias de tratamento e os restantes de cerca de 50% para os dias 4 e 15 e de cerca de 60% para o dia 2 (figura 4.44).

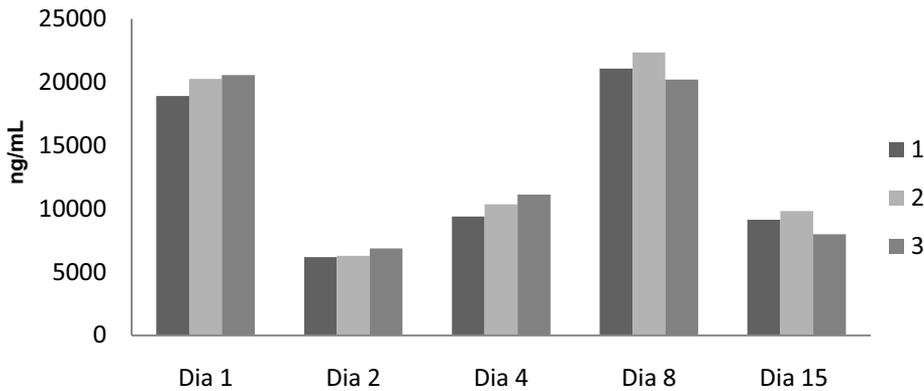


Figura 4.44 – Grupo de animais sujeito à administração de clozapina durante os respectivos dias de tratamento. Resultados obtidos para a quantificação de clozapina em plasma de ratinho. 1- corresponde à transição 327.3 – 192.2; 2 - corresponde à transição 327.3 – 270.3 e 3 - corresponde à transição 327.3 – 227.1.

Comparando os resultados obtidos para o grupo de animais tratados com clozapina, com o grupo de animais que apenas esteve sujeito ao tratamento com uma solução salina (controlo), verifica-se uma redução significativa da quantidade de clozapina presente nestes animais (cerca de 20 vezes menos), não sendo consideradas significativas. É no entanto possível associar estes resultados a possíveis contaminações ocorridas durante o processo de recolha dos tecidos (figura 4.45).

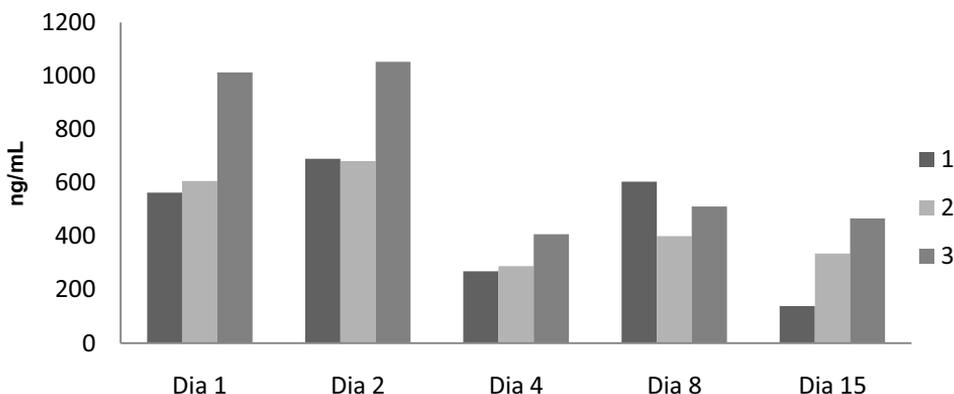


Figura 4.45 – Grupo de animais sujeito à administração da solução controlo durante os respectivos dias de tratamento. Resultados obtidos para a quantificação de clozapina em plasma de ratinho. 1- corresponde à transição 327.3 – 192.2; 2 - corresponde à transição 327.3 – 270.3 e 3 - corresponde à transição 327.3 – 227.1.

Na análise dos resultados obtidos para o grupo de animais submetidos ao tratamento com haloperidol (figura 4.46), verifica-se que a quantidade de fármaco presente no plasma teve um aumento gradual até ao oitavo dia de tratamento. No décimo quinto dia de tratamento, verifica-se uma diminuição de cerca de 50% relativamente ao oitavo dia de tratamento.

Na comparação deste grupo de animais, com os animais que apenas foram submetidos ao tratamento com uma solução salina (controlo), verificou-se uma diminuição na quantidade de fármaco presente nas amostras de plasma, cerca de sete vezes menor para os dias 1, 2 e 15, cinco vezes menor para o dia 8 e dez vezes menor para o dia 4. Mais uma vez, se verifica a presença de contaminantes presentes no plasma para este grupo de animais (figura 4.47).

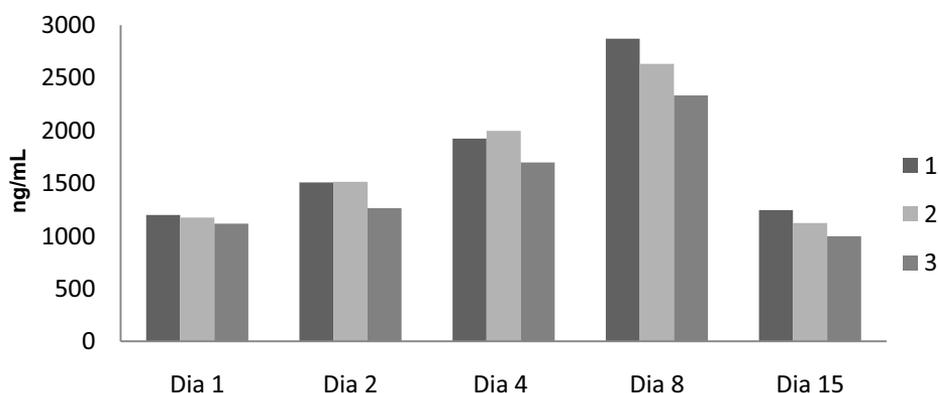


Figura 4.46 – Grupo de animais sujeito à administração de haloperidol durante os respectivos dias de tratamento. Resultados obtidos para a quantificação de haloperidol em plasma de ratinho. 1 - corresponde à transição 376.2 – 123.0; 2 - corresponde à transição 376.2 – 165.1 e 3 - corresponde à transição 376.2 – 123.2.

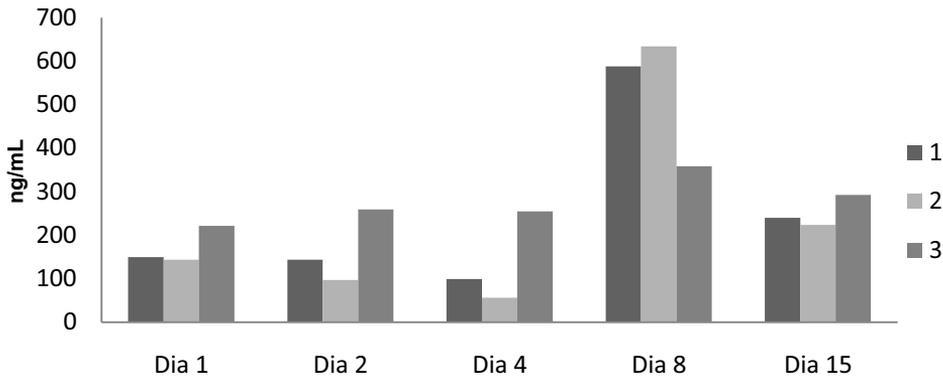


Figura 4.47 - Grupo de animais sujeito à administração da solução controlo durante os respectivos dias de tratamento. Resultados obtidos para a quantificação de haloperidol em plasma de ratinho. 1 - corresponde à transição 376.2 – 123.0; 2 - corresponde à transição 376.2 – 165.1 e 3 - corresponde à transição 376.2 – 123.2.

Na análise dos resultados obtidos para o grupo de animais sujeitos ao tratamento com citalopram, não se verifica variabilidade nos diferentes dias de tratamento, à excepção do dia 8, ao qual se observa um aumento na quantidade de fármaco presente de cerca de 80% em relação aos restantes dias (figura 4.48).

Analisando os resultados obtidos para o grupo controlo (apenas sujeito ao tratamento com uma solução salina), verifica-se a diminuição da quantidade de fármaco presente nas amostras de plasma, em média cerca de 70%, para os dias 1, 2 e 4. Para os dias 8 e 15, não se verificam diminuições significativas. Facto que apontam para uma maior contaminação neste dia de recolha de tecidos (figura 4.49).

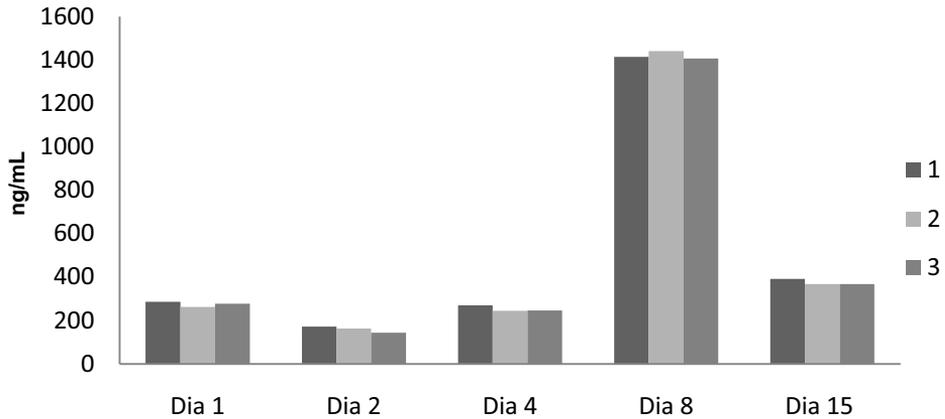


Figura 4.48 – Grupo de animais sujeito à administração de citalopram durante os respectivos dias de tratamento. Resultados obtidos para a quantificação de citalopram em plasma de ratinho. 1 - corresponde à transição 325.3 – 83.2; 2 - corresponde à transição 325.3 – 109.0 e 3 - corresponde à transição 325.3 – 262.1.

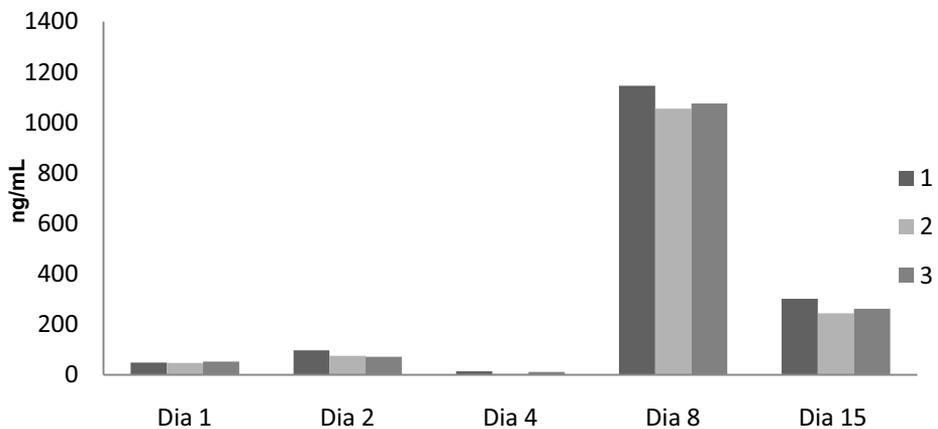


Figura 4.49 - Grupo de animais sujeito à administração da solução controlo durante os respectivos dias de tratamento. Resultados obtidos para a quantificação de citalopram em plasma de ratinho. 1 - corresponde à transição 325.3 – 83.2; 2 - corresponde à transição 325.3 – 109.0 e 3 - corresponde à transição 325.3 – 262.1.

Assim, em termos de quantidade de fármacos (clozapina, haloperidol e citalopram) presente nas amostras de plasma de ratinhos, verifica-se que não existe similaridade entre os diferentes fármacos, ou seja, todos os fármacos apresentam perfis diferentes ao longo dos diferentes dias de tratamento.

Cap. **5**

Conclusão

5. Conclusão

No presente trabalho foi desenvolvido um método, para a identificação e quantificação de fármacos psicotrópicos em tecidos de ratinho, utilizando como ferramenta analítica a LC-MS/MS. Foi também realizado um estudo sobre os efeitos adversos destes fármacos, através da análise da evolução do peso dos animais submetidos a esta medicação.

A análise estatística relativa à evolução do peso de animais submetidos ao tratamento com os diferentes fármacos psicotrópicos (clozapina, haloperidol e citalopram) revelou diferenças significativas entre os mesmos, isto é, cada fármaco apresenta um perfil independente na evolução do peso, não se observando, portanto, similaridade entre eles.

O método desenvolvido para a detecção e identificação de fármacos psicotrópicos em córtex e plasma de ratinhos mostrou-se ser eficiente e selectivo.

Os resultados obtidos mostraram um bom controlo analítico, permitindo a detecção de baixas quantidades de fármacos (3 fmol) correspondendo respectivamente 1.66 e 2.12 ng/mL de haloperidol e citalopram. Para a clozapina o limite de detecção foi de 100 fmol correspondente a 52.22 ng/mL. O limite de quantificação para os três fármacos foi de 156.66, 4.97 e 6.10 ng/mL relativo a clozapina, haloperidol e citalopram respectivamente.

Relativamente à precisão do método, os coeficientes de variação obtidos são todos inferiores a 20%. No caso da exactidão, as taxas de recuperação são próximas de 100%, apresentando os valores compreendidos dentro do intervalo \pm 20%.

O método desenvolvido é selectivo e específico dado que, não ocorreram interferências nos tempos de retenção dos fármacos em relação aos componentes da amostra biológica.

Em termos de condições cromatográficas, optou-se por uma coluna de menor dimensão uma vez que nos permitiu obter menor ruído de sinal e diminuição da largura dos picos comparativamente à coluna de maior dimensão.

O método MRM desenvolvido para a análise dos fármacos em estudo é sensível e específico, não havendo interferência por parte da matriz biológica. No

entanto, os resultados obtidos na análise das amostras de córtex de ratinhos submetidos ao tratamento com fármacos psicotrópicos, revelaram a existência de interferências para todas as transições obtidas para cada um dos fármacos em todos os grupos de tratamento (clozapina, haloperidol, citalopram e controlo).

O método desenvolvido para a detecção e quantificação de fármacos psicotrópicos em amostras de plasma, mostra-se bastante útil e de grande interesse na resolução de questões forenses. Sendo o suicídio uma das principais causas de morte em doentes com esquizofrenia, a análise a amostras de sangue (plasma sanguíneo) poderá ser crucial em termos toxicológicos para a determinação da presença de distúrbios neurológicos.

Referências bibliográficas

Referências bibliográficas

1. Carlborg, A., et al., *Suicide in schizophrenia*. Expert Rev Neurother, 2010. **10**(7): p. 1153-64.
2. van Os, J., G. Kenis, and B. Rutten, *The environment and schizophrenia*. Nature, 2010. **468**(7321): p. 203-212.
3. Aleman, A., R.S. Kahn, and J.P. Selten, *Sex differences in the risk of schizophrenia: evidence from meta-analysis*. Arch Gen Psychiatry, 2003. **60**(6): p. 565-71.
4. Weiss, A., R. Mavohed, and H. Dym, *Schizophrenia: Current Therapy and Review*. J Oral Maxillofac Surg 2011. **69**: p. 192-198.
5. Tandon, R., M.S. Keshavan, and H.A. Nasrallah, *Schizophrenia, "just the facts" what we know in 2008. 2. Epidemiology and etiology*. Schizophr Res, 2008. **102**(1-3): p. 1-18.
6. Tandon, R., H.A. Nasrallah, and M.S. Keshavan, *Schizophrenia, "just the facts" 4. Clinical features and conceptualization*. Schizophr Res, 2009. **110**(1-3): p. 1-23.
7. Muench, J. and A.M. Hamer, *Adverse effects of antipsychotic medications*. Am Fam Physician, 2010. **81**(5): p. 617-22.
8. Dobbs, D., *Schizophrenia: The making of a troubled mind*. Nature, 2010. **468**(7321): p. 154-6.
9. Carlborg, A., et al., *Attempted suicide predicts suicide risk in schizophrenia spectrum psychosis*. Nord J Psychiatry, 2010. **64**(1): p. 68-72.
10. Tandon, R., H.A. Nasrallah, and M.S. Keshavan, *Schizophrenia, "just the facts" 5. Treatment and prevention. Past, present, and future*. Schizophr Res, 2010. **122**(1-3): p. 1-23.
11. Lopez-Munoz, F. and C. Alamo, *Monoaminergic neurotransmission: the history of the discovery of antidepressants from 1950s until today*. Curr Pharm Des, 2009. **15**(14): p. 1563-86.
12. Abbott, A., *Schizophrenia: The drug deadlock*. Nature, 2010. **468**(7321): p. 158-9.
13. Purves, D., et al., *Neuroscience* 3th ed. 2004, Sunderland, Massachusetts, USA Sinauer Associates, Inc.
14. Cooper, J., F. Bloom, and R. Roth, *The Biochemical Basis of Neuropharmacology* 2003, Oxford Oxford University Press.
15. DePaulo, R. and A. Hortiz, *Understanding Depression* 2000: John Wiley & Sons, Ltd.

16. Richelson, E., *Synaptic effects of antidepressants*. J Clin Psychopharmacol, 1996. **16**(3 Suppl 2): p. 1S-7S; discussion 7S-9S.
17. Marcus, M., *Mechanism of action of antipsychotic drugs: focus on the nucleus accumbens and the prefrontal cortex*, in Karolinska Institutet 2005: Stockholm, Sweden.
18. Spano, P.F., S. Govoni, and M. Trabucchi, *Studies on the pharmacological properties of dopamine receptors in various areas of the central nervous system*. Adv Biochem Psychopharmacol, 1978. **19**: p. 155-65.
19. Yildiz, A., A. Gonul, and L. Taman, *Mechanism of actions of antidepressants: beyond the receptors* Bull Clin Psychopharmacol 2002. **12**: p. 194-200.
20. Lenox, R. and A. Frazer, *Mechanism of action of antidepressants and mood stabilizers in Neuropsychopharmacology: The Fifth generation of progress*, K. Davis, J. Coyle, and C. Nemeroff, Editors. 2002, American College of Neuropsychopharmacology.
21. Moreno, R. and M. Soares, *Psicofarmacologia de antidepressivos* Rev Bras Psiquiatr 1999. **21**: p. 24-40.
22. Lieberman III, J., *History of the use of antidepressants in primary care*. J Clin Psychiatry, 2003. **7**: p. 6-10.
23. Wright, P. and L. O'Flaherty, *Antipsychotic drugs: atypical advantages and typical disadvantages*. J Psych Med, 2003. **20** (1): p. 24-27.
24. Dazzan, P., et al., *Different effects of typical and atypical antipsychotics on grey matter in first episode psychosis: the AESOP study*. Neuropsychopharmacology, 2005. **30**(4): p. 765-74.
25. Miyamoto, S., et al., *Treatments for schizophrenia: a critical review of pharmacology and mechanisms of action of antipsychotic drugs*. Mol Psychiatry, 2005. **10**(1): p. 79-104.
26. Meltzer, H., *Mechanism of action of atypical antipsychotic in Neuropsychopharmacology: The fifth generation of progress*, K. Davis, D. Coyle, and J. Nemeroff, Editors. 2002, American College of Neuropsychopharmacology.
27. Duncan, G.E., S. Zorn, and J.A. Lieberman, *Mechanisms of typical and atypical antipsychotic drug action in relation to dopamine and NMDA receptor hypofunction hypotheses of schizophrenia*. Mol Psychiatry, 1999. **4**(5): p. 418-28.
28. van Kuilenburg, A.B., et al., *Clinical implications of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency in patients with severe 5-fluorouracil-associated toxicity: identification of new mutations in the DPD gene*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(12): p. 4705-12.
29. Abreu, P., G. Bolognesi, and N. Rocha, *Prevenção e tratamento de efeitos adversos de antipsicóticos* Rev Bras Psiquiatr, 2000. **22**(Supl I): p. 41-44.

30. Richelson, E., *Preclinical pharmacology of neuroleptics: focus on new generation compounds*. J Clin Psychiatry, 1996. **57 Suppl 11**: p. 4-11.
31. Schaber, G., et al., *Isolation and identification of clozapine metabolites in patient urine*. Drug Metab Dispos, 2001. **29**(6): p. 923-31.
32. Schaber, G., et al., *Pharmacokinetics of clozapine and its metabolites in psychiatric patients: plasma protein binding and renal clearance*. Br J Clin Pharmacol, 1998. **46**(5): p. 453-9.
33. Labesfal, *Ozapim*, in *Infarmed 2010*. Consultado em Junho 2011.
34. Azevedo, L., *Citalopram* in *Infarmed 2008*. Consultado em Junho de 2011.
35. Granger, B. and S. Albu, *The haloperidol story*. Ann Clin Psychiatry, 2005. **17**(3): p. 137-40.
36. Ratiopharm, L., *Haloperidol* in *Infarmed 2010*. Consultado em Junho 2011.
37. Ardrey, R., *Liquid Chromatography - Mass Spectrometry: An introduction* 2003, West Sussex John Wiley & Sons Ltd.
38. Flanagan, R., et al., *Fundamentals of Analytical Toxicology* 2007, West Sussex, England John Wiley & Sons, Ltd.
39. Dass, C., *Fundamentals of Contemporary Spectrometry* 2007: John Wiley & Sons, Inc.
40. Manisali, I., D.D.Y. Chen, and B.B. Schneider, *Electrospray ionization source geometry for mass spectrometry: past, present, and future*. Trac-Trends in Analytical Chemistry, 2006. **25**(3): p. 243-256.
41. Hoffmann, E. and V. Stroobant, *Mass Spectrometry - Principles and Applications*. 3th ed. 2007, West Sussex John Wiley & Sons, Inc.
42. Hopfgartner, G., et al., *Triple quadrupole linear ion trap mass spectrometer for the analysis of small molecules and macromolecules*. J Mass Spectrom, 2004. **39**(8): p. 845-55.
43. Kitteringham, N.R., et al., *Multiple reaction monitoring for quantitative biomarker analysis in proteomics and metabolomics*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2009. **877**(13): p. 1229-39.
44. Kawase, M., et al., *Note in statistical treatment of medical and pharmaceutical data*. J Biosci Bioeng, 2005. **100**(1): p. 116-8.
45. von Wilmsdorff, M., et al., *The impact of antipsychotic drugs on food intake and body weight and on leptin levels in blood and hypothalamic ob-r leptin receptor expression in wistar rats*. Clinics 2010. **65**(9): p. 885-894.
46. Miller, J.N. and J.M. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry* 5th ed. 2005: Pearson.
47. Miller, D.J. and L. Yan, *Approximate maximum entropy joint feature inference consistent with arbitrary lower-order probability constraints: application to statistical classification*. Neural Comput, 2000. **12**(9): p. 2175-207.

48. Swartz M. E., K.I.S., *Analytical method development and validation*. Marcel Dekker ed. 1997, New York.
49. Ermer, J., *Validation in pharmaceutical analysis. Part I: an integrated approach*. J Pharm Biomed Anal, 2001. **24**(5-6): p. 755-67.
50. Ribani, M., et al., *Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos* Quim Nova, 2004. **27**(5): p. 771-780.
51. Araujo, P., *Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2009. **877**(23): p. 2224-34.
52. Halim, N.D., et al., *Effects of chronic haloperidol and clozapine treatment on neurogenesis in the adult rat hippocampus*. Neuropsychopharmacology, 2004. **29**(6): p. 1063-9.
53. Metzger, K.L., et al., *Pharmacokinetic and behavioral characterization of a long-term antipsychotic delivery system in rodents and rabbits*. Psychopharmacology (Berl), 2007. **190**(2): p. 201-11.
54. Barakauskas, V.E., et al., *Effects of sub-chronic clozapine and haloperidol administration on brain lipid levels*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2010. **34**(4): p. 669-73.
55. Jiang, T., et al., *Simultaneous determination of citalopram and its metabolite in human plasma by LC-MS/MS applied to pharmacokinetic study*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2010. **878**(5-6): p. 615-9.
56. Zhang, G., A.V. Terry, Jr., and M.G. Bartlett, *Sensitive liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of olanzapine, risperidone, 9-hydroxyrisperidone, clozapine, haloperidol and ziprasidone in rat brain tissue*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2007. **858**(1-2): p. 276-81.
57. Saar, E., et al., *Identification and quantification of 30 antipsychotics in blood using LC-MS/MS*. J Mass Spectrom, 2010. **45**(8): p. 915-25.
58. Suresh, P.S., et al., *A highly sensitive LC-MS/MS method for the determination of S-citalopram in rat plasma: application to a pharmacokinetic study in rats*. Biomed Chromatogr, 2010.
59. Rocha, A., et al., *Enantioselective analysis of citalopram and demethylcitalopram in human and rat plasma by chiral LC-MS/MS: application to pharmacokinetics*. Chirality, 2007. **19**(10): p. 793-801.
60. Niessen, W.M.A., *Fragmentation of Toxicologically Relevant Drugs in Positive-Ion Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*. Mass Spectrometry 2011. **30**: p. 626-663.
61. Smyth, W.F., et al., *The characterisation of selected antidepressant drugs using electrospray ionisation with ion trap mass spectrometry and with quadrupole time-of-flight mass spectrometry and their determination by*

- high-performance liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2006. **20**(11): p. 1637-42.
62. Yu, A.-M., *Difference in desipramine metabolic profile between wild-type and CYP2D6-humanized mice*. National Institute of Health, 2009. **3**(4): p. 234-241.
63. Bethem, R.K.B.C.B.R.A., *Trace Quantitative Analysis by Mass Spectrometry*. 2008: John Wiley & Sons, Ltd.

Anexos

Anexos

Tabela A.1: Valores críticos para o teste de Grubbs ($\alpha = 0.05$) [ISO. ASTM E-178]

$$G = \frac{|x_? - \bar{x}|}{s_x}$$

<i>n</i>	3	4	5	6	7	8	9
<i>G</i>	1.153	1.4663	1.672	1.822	1.938	2.032	2.110

<i>n</i>	10	15	20	25	50	100	
<i>G</i>	2.176	2.409	2.557	2.663	2.956	3.207	

Tabela A.2: Valores críticos para simetria (α_3) e curtose (α_4). Normalidade de distribuições ($\alpha = 0.05$)

<i>n</i>	$m_{c(z,3)}$	$m_{c(z,4)}$	<i>n</i>	$m_{c(z,3)}$	$m_{c(z,4)}$	<i>n</i>	$m_{c(z,3)}$	$m_{c(z,4)}$
6	1.210	0.973-3.313	45	0.670	1.655-4.084	85	0.503	1.976-3.884
10	1.136	0.975-3.934	50	0.640	1.711-4.054	90	0.490	2.003-3.866
15	1.020	1.095-4.155	55	0.613	1.761-4.025	95	0.478	2.027-3.848
20	0.927	1.223-4.206	60	0.590	1.806-3.997	100	0.466	2.049-3.832
25	0.853	1.336-4.202	65	0.569	1.847-3.972	105	0.455	2.071-3.816
30	0.794	1.434-4.179	70	0.550	1.883-3.948	110	0.446	2.090-3.801
35	0.746	1.518-4.149	75	0.533	1.917-3.925	115	0.436	2.109-3.787
40	0.705	1.591-4.116	80	0.517	1.948-3.904	120	0.428	2.127-3.774

Tabela A.3: Valores críticos da distribuição χ^2 unilateral ($\chi^2_{\alpha(v)}$).

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n z_i^2 = \frac{(n-1)s^2}{\sigma^2} = \sum_{i=1}^n \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

(1- α)	0.01	0.025	0.05	0.95	0.975	0.99
$v \setminus \alpha$	0.99	0.0975	0.95	0.05	0.025	0.01
1	0.0002	0.001	0.004	3.841	5.024	6.635
2	0.020	0.051	0.103	5.991	7.378	9.210
3	0.115	0.216	0.352	7.815	9.348	11.34
4	0.297	0.484	0.711	9.488	11.14	13.28
5	0.554	0.831	1.145	11.07	12.83	15.09
6	0.872	1.237	1.635	12.59	14.45	16.81
7	1.239	1.690	2.167	14.07	16.01	18.48
8	1.647	2.180	2.733	15.51	17.53	20.09
9	2.088	2.700	3.325	16.92	19.02	21.67
10	2.558	3.247	3.940	18.31	20.48	23.21
11	3.053	3.816	4.575	19.68	21.92	24.73
12	3.571	4.404	5.226	21.03	23.34	26.22
13	4.107	5.009	5.892	22.36	24.74	27.69
14	4.660	5.629	6.571	23.68	26.12	29.14
15	5.229	6.262	7.261	25.00	27.49	30.58
16	5.812	6.908	7.962	26.30	28.85	32.00
18	7.015	8.231	9.390	28.87	31.53	34.81
20	8.260	9.591	10.85	31.41	34.15	37.57
22	9.542	10.98	12.34	33.92	36.78	40.29
25	11.52	13.12	14.61	37.65	40.65	44.31
30	14.95	16.79	18.49	43.77	46.98	50.89
35	18.51	20.57	22.47	49.80	53.20	57.34
40	22.16	24.43	26.51	55.76	59.34	63.69
50	29.71	32.36	34.76	67.50	71.42	76.15
60	37.48	40.48	43.19	79.08	83.30	88.38
70	45.44	48.76	51.74	90.53	95.02	100.4
80	53.54	57.15	60.39	101.9	106.6	112.3
100	70.06	74.22	77.93	124.3	129.6	135.8
120	86.92	91.57	95.70	146.6	152.2	159.0
150	112.7	118.0	122.7	179.6	185.8	193.2
200	156.4	162.7	168.3	234.0	241.1	249.4
250	200.9	208.1	214.4	287.9	295.7	304.9
300	246.0	253.9	260.9	341.4	349.9	359.9