



João Luís Jesus Gonçalves

Quantificação de Antipsicóticos em Urina, recorrendo à Microextração por Sorvente Empacotado combinada com a Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

Mestrado em Medicina Legal e Ciências Forense

FMUC

Junho de 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



FMUC FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

João Luís Jesus Gonçalves

Quantificação de Antipsicóticos em Urina, recorrendo à
Microextração por Sorvente Empacotado combinada com
a Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

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

Orientadora: Professora Doutora Helena Maria Sousa Ferreira Teixeira

Co-orientador: Professor Doutor José Sousa Câmara

Junho de 2015

AGRADECIMENTOS

Este espaço é dedicado a todos aqueles que deram a sua contribuição, direta ou indiretamente, para que esta dissertação fosse realizada. A todos eles deixo aqui o meu agradecimento sincero.

As minhas primeiras palavras de agradecimento vão para a Professora Doutora Helena Teixeira, pela orientação, incentivo e apoio constante, apesar da distância mostrou estar sempre disponível para responder às dúvidas que foram surgindo ao longo deste trabalho. Agradeço imenso a atenção, incentivo e compreensão ao longo da realização deste projeto.

Expresso da mesma forma o meu profundo agradecimento ao Professor Doutor José Sousa Câmara pela orientação, pela oportunidade, disponibilidade, pelo conhecimento transmitido e por todo o apoio prestado para concluir este trabalho.

Ao Professor Doutor Duarte Nuno Vieira, Coordenador do Mestrado em Medicina Legal e Ciências Forenses da Universidade de Coimbra, agradeço a oportunidade e o privilégio que tive em frequentar este Mestrado que muito contribuiu para o enriquecimento da minha formação académica e científica.

À Casa de Saúde S. João de Deus do Funchal, em especial ao Sr. Diretor Eduardo Lemos, ao Sr. Enf.º Manuel Freitas e a todos os enfermeiros e auxiliares, expresso a minha gratidão pela disponibilidade e colaboração para o desenvolvimento deste trabalho. Expresso de igual modo a minha gratidão e solidariedade a Todos os Pacientes que, embora no anonimato, prestaram uma contribuição fundamental para que este estudo fosse possível.

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

A todos os elementos do Laboratório de Química Analítica do Centro de Química da Madeira agradeço pelo apoio, carinho e boa disposição. Um especial agradecimento à Vera Alves e à Carlota Conceição pela amizade, pela ajuda e pelo sorriso nos dias mais cinzentos.

Por último, e tendo consciência que sozinho nada disto seria possível, dirijo um agradecimento especial à minha família e, em particular aos meus pais, por serem modelos de coragem, pelo seu apoio incondicional, incentivo, amizade, paciência e total ajuda na superação dos obstáculos que ao longo desta caminhada foram surgindo. A eles o meu profundo e sincero agradecimento!

TRABALHOS CIENTÍFICOS

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

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

O presente trabalho encontra-se publicado na revista *Microchemical Journal*:



Development of MEPS-UHPLC/PDA methodology for the quantification of clozapine, risperidone and their major active metabolites in human urine



João L. Gonçalves^{a,b}, Vera L. Alves^{a,b}, Carlota J.F. Conceição^a, Helena M. Teixeira^{b,c}, José S. Câmara^{a,*}

^a CQM-UMA, Centro de Química da Madeira, Centro de Ciências Exactas e da Engenharia da Universidade da Madeira, Campus Universitário da Penteada, 9000-290 Funchal, Portugal

^b Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Azinhaga de Santa Comba, Celis, 3000-548 Coimbra, Portugal

^c Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P., Delegação Centro, Largo da Sé Nova, 3000-213 Coimbra, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:
Received 15 April 2015
Received in revised form 13 May 2015
Accepted 18 May 2015
Available online 23 May 2015

Keywords:
Antipsychotics
Clozapine
Risperidone
Microextraction by packed sorbent
Ultra high pressure liquid chromatography

ABSTRACT

A new, fast and reliable methodology using a digitally controlled microextraction by packed sorbent (MEPS), followed by ultrahigh pressure liquid chromatography (UHPLC) separation combined with a photodiode array (PDA) detection, has been developed and validated for the simultaneous determination of clozapine and risperidone, and their active metabolites, in urine samples. Important parameters affecting MEPS performance, including type of sorbent material (C₂, C₈, C₁₈, SIL, M1, R-AX, R-CX, PGC, PEP, HLB-DVB and H-DVB), elution solvent system, number of extraction cycles, sample volume, elution volume, and sample pH, were evaluated. The optimal experimental conditions involved the loading of 500 µl of sample through a C₁₈ sorbent in a five extraction cycles and in a short time period (5 min for the entire sample preparation step). The obtained extract was analyzed by UHPLC, using a binary mobile phase, composed of aqueous 0.1% formic acid and methanol in the gradient elution mode (10 min total analysis). Good results were obtained under the optimized conditions, in terms of linearity with correlation coefficients (r^2) values higher than 0.9986. Low detection limits, ranging between 0.052 and 0.055 µg ml⁻¹ were achieved, whereas the lowest quantification limit was 0.1 µg ml⁻¹, corresponding to the lowest concentration of the standard curve. Satisfactory results were found with accuracy values ranging from 83% to 116%, and with precision results from 2.65% to 18%. Recoveries ranged between 76% and 96%, which was in agreement with results reported by other studies.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Since their introduction in the 1950s, psychotherapeutic drugs like antipsychotics have become widely prescribed in clinical psychiatry, as a first-line treatment for schizophrenia and schizophrenia-related disorders. With more than 35 antipsychotics currently available worldwide, this drug class has rapidly gained importance in both clinical and forensic settings [1]. Their potential abuse and involvement in accidental intoxications and suicides are of considerable interest in forensic toxicology [2–4]. On the other hand, therapeutic drug monitoring (TDM) in clinical practice is a powerful tool used to optimize antipsychotic pharmacotherapy improving efficiency and avoiding side effects [5].

Based on their mechanism of action, and depending on their propensity to cause extrapyramidal side effects, antipsychotic medication can be divided into typical and atypical agents [6]. Both types of antipsychotics tend to block the D₂ neuroreceptors in the dopaminergic pathways in the brain. In addition to the blockage of D₂ dopamine

receptors, atypical antipsychotic drugs also include serotonin 5-HT_{2A} receptor antagonists. Actually, it is well known that high 5-HT_{2A}/D₂ affinity ratio is the pharmacological feature that best distinguishes these two antipsychotic classes [7]. Furthermore, differences in the affinity of atypical antipsychotics for various central receptors may explain the reduced incidence of the extrapyramidal side effects [8]. Medications available in this class include, among others, clozapine (CLZ) and risperidone (RISP).

CLZ, a tricyclic dibenzodiazepine derivative is used especially in the treatment of patients with refractory schizophrenia [9]. After oral administration, only 27% to 47% of the CLZ dose reaches the systemic circulation unchanged and, consequently, is mainly biotransformed in *N*-desmethylclozapine, also known as norclozapine (NORCLZ), and clozapine *N*-oxide metabolites (Fig. 1) [10].

On the other hand, the newer atypical antipsychotic RISP, a benzisoxazole derivative, may constitute an alternative to CLZ, the current treatment of choice for refractory schizophrenia, due to adverse effects caused by this medication [11]. The absolute oral bioavailability of RISP is nearly 70%, and after oral administration, it is converted to 9-hydroxyrisperidone (9-OHRISP), the main active metabolite, differing only by a single hydroxyl group (Fig. 2) [12].

* Corresponding author. Tel.: +351 291705112; fax: +351 291705149.
E-mail address: jsc@uma.pt (J.S. Câmara).

RESUMO

Desde a sua introdução, na década de 50, que os antipsicóticos se tornaram amplamente prescritos na psiquiatria clínica, como tratamento de primeira linha para a esquizofrenia e outros distúrbios psicóticos. Com o atual crescimento do consumo de antipsicóticos em Portugal, e face aos efeitos colaterais causados por estes, tornou-se indispensável o desenvolvimento de metodologias analíticas que possibilitassem a identificação e quantificação destes fármacos em matrizes biológicas de forma rápida, simples e económica. Neste sentido, surge o nosso presente estudo, cujo principal objetivo foi a determinação de antipsicóticos, nomeadamente a clozapina, a risperidona e os seus metabolitos ativos norclozapina e 9-hidroxi-risperidona, em amostras de urina, recorrendo à microextração por sorvente empacotado (MEPS), seguido de análise por cromatografia líquida de ultra eficiência com detetor de fotodiodos (UHPLC-PDA).

Foram alvo de avaliação neste trabalho os fatores que influenciam o desempenho da MEPS, incluindo o tipo de sorvente, o número de ciclos de extração, o volume de amostra, o pH da amostra, o sistema de solventes e o volume de eluição. As melhores condições de extração envolveram a passagem de 500 μL de amostra através do sorvente C_{18} em 5 ciclos de extração. O extrato obtido foi analisado por UHPLC, usando um sistema de fase móvel binário, constituída por metanol e uma solução aquosa de ácido fórmico a 0,1%, num gradiente de concentração ao longo da separação cromatográfica, com um fluxo constante de 250 $\mu\text{L min}^{-1}$.

A validação do método analítico incluiu o estudo da seletividade, linearidade, limites de deteção e quantificação, precisão, exatidão e eficiência de extração. O método validado demonstrou ser seletivo para os compostos em estudo, além de apresentar um desempenho satisfatório em termos de linearidade, com fatores de correlação (r^2) acima de 0,998. Relativamente aos limites de deteção, estes mostraram-se igualmente satisfatórios com valores que variaram entre os 0,052 e 0,055 $\mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto que os limites inferiores de quantificação foram da ordem dos 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, correspondendo à mais baixa concentração da reta de calibração. No que diz respeito à exatidão, os valores obtidos variaram entre os -1,5 e os 20%, enquanto que na precisão os coeficientes de variação mantiveram-se abaixo dos 19%. Em termos de recuperação, os valores conseguidos variaram entre 76 e os 96%, encontrando-se de acordo com resultados de outros estudos.

A fim de testar a aplicabilidade do método proposto, foram analisados 23 casos reais. As concentrações determinadas variaram entre 0,10 e 2,08 $\mu\text{g mL}^{-1}$, permitindo evidenciar a capacidade do método para identificar e quantificar este tipo de substâncias. Podemos, assim, concluir que o método analítico desenvolvido demonstrou ser eficiente, designadamente ao nível do tempo de análise, e suficientemente sensível para a deteção, identificação e quantificação de clozapina, risperidona e os seus metabolitos ativos em amostras de urina. De salientar, também, que a simplicidade da metodologia proposta o torna compatível com a rotina analítica de um serviço de toxicologia.

Palavras-chave: Antipsicóticos, Clozapina, Risperidona, Microextração por sorvente empacotado, Cromatografia líquida de ultra eficiência.

ABSTRACT

Since their introduction, in 1950's, that antipsychotics have become widely prescribed in clinical psychiatry, as a first-line treatment for schizophrenia and others psychotic disorders. With current growth of antipsychotic use in Portugal, and considering the side effects caused by them, it is indispensable the development of fast, simple and economic analytical methodologies for the identification and quantification of this drugs in biological matrices. In this sense, the present study aims to determine antipsychotics, including clozapine, risperidone, and their active metabolites norclozapine and 9-hydroxyrisperidone, in urine sample using microextraction by packed sorbents (MEPS), followed by ultra high performance liquid chromatography with photodiode array detector (UHPLC-PDA) analysis.

In this work, were evaluated factors that influence the performance of MEPS, including the type of sorbent material, number of extraction cycles, sample volume, sample pH, the solvent system and elution volume. The best extraction conditions involved the loading of 500 μL of sample through a C_{18} sorbent in a five extraction cycles. The obtained extract was analysed by UHPLC, system using a binary mobile phase, composed by methanol and an aqueous solution of 0.1% formic acid, in a gradient of concentration along the chromatographic separation, with a constant flow of 250 $\mu\text{L min}^{-1}$.

Validation of the analytical method included the study of selectivity, linearity, detection and quantification limits, precision, accuracy and extraction efficiency. The validated method showed to be selective for the studied compounds, and have satisfactory performance in terms of linearity, with correlation coefficient (r^2) higher than 0.998. Regarding to the detection limits, this were equally satisfactory with values ranging between 0.052 and 0.055 $\mu\text{g mL}^{-1}$, whereas the lowest quantification limit was 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, corresponding to the lowest concentration of the standard curve. In relation to accuracy, the obtained values vary between -1.5 and 20%, while in precision, the coefficients of variation remained below to 19%. In terms of recovery, the obtained values ranged between 76 and 96%, which was in agreement with results reported by other studies.

In order to test the applicability of the proposed method, 23 real cases were analysed. The concentration founded varied between 0.10 and 2.08 $\mu\text{g mL}^{-1}$, which allowed demonstrate the ability of the method to identify and quantify this type of substances. We can conclude that the validated method proved to be efficient, rapid and sensitive in the detection, identification and quantification of clozapine, risperidone and their active metabolites in urine samples. The simplicity of this assay makes it suitable for the analytical routine in a toxicology laboratory.

Keywords: Antipsychotics, Clozapine, Risperidone, Microextraction by packed sorbent, Ultra High Performance Liquid Chromatography.

ÍNDICE

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
I. INTRODUÇÃO	17
I.1. Breve introdução às doenças mentais e o início da psicofarmacologia	18
I.2. Consumo de antipsicóticos em Portugal	19
I.3. Antipsicóticos: Aspectos gerais e farmacológicos.....	20
I.3.1. Antipsicóticos Típicos	21
I.3.2. Antipsicóticos Atípicos.....	23
I.3.3. Propriedades Farmacocinéticas dos Antipsicóticos	25
I.3.4. Efeitos Adversos	27
I.3.5. Fármacos em Estudo	28
I.3.5.1. Clozapina	28
I.3.5.2. Risperidona.....	32
I.4. Importância clínica e médico-legal do estudo dos antipsicóticos	35
2. DETERMINAÇÃO DE ANTIPSICÓTICOS EM MATRIZES BIOLÓGICAS	37
2.1. Amostras biológicas.....	38
2.2. Métodos de preparação de amostras biológicas para separação cromatográfica	39
2.2.1. Precipitação de Proteínas (PP).....	39
2.2.2. Extração Líquido-Líquido (LLE)	40
2.2.3. Extração em Fase Sólida (SPE).....	42
2.2.3.1. Etapas envolvidas na SPE	44
2.2.3.2. Extração de antipsicóticos por SPE	45
2.2.4. QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe).....	46
2.2.5. Microextração em fase sólida (SPME)	47
2.2.6. Microextração por sorvente empacotado (MEPS).....	50
2.2.6.1. Configurações da MEPS.....	51
2.2.6.2. Extração de antipsicóticos por MEPS.....	53
2.3. Métodos analíticos usados na determinação de fármacos.....	54
2.3.1. Cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC)	58
2.3.2. Análise de antipsicóticos recorrendo às técnicas de cromatografia líquida.....	58

3. JUSTIFICAÇÃO DO TEMA E OBJETIVOS	61
4. MATERIAIS E MÉTODOS	63
4.1. Padrões e Reagentes	64
4.2. Equipamentos.....	64
4.3. Materiais.....	64
4.4. Preparação de Soluções.....	65
4.5. Recolha e pré-tratamento da Amostra	65
4.6. Otimização do Processo de Extração.....	65
4.7. Condições Cromatográficas	66
4.8. Validação do Método Analítico	68
4.8.1. Seletividade	68
4.8.2. Linearidade.....	69
4.8.3. Limites de Detecção e Quantificação.....	70
4.8.4. Precisão.....	71
4.8.5. Exatidão.....	73
4.8.6. Eficiência de extração.....	75
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
5.1. Otimização do Processo de Extração.....	78
5.1.1. Natureza do sorvente.....	78
5.1.2. Influência do número de ciclos de extração e volume de amostra	80
5.1.3. Influência do pH da amostra.....	81
5.1.4. Influência da lavagem.....	82
5.1.5. Efeito do solvente e do volume de eluição	83
5.2. Validação do Método	86
5.2.1. Padronização interna.....	86
5.2.2. Seletividade	87
5.2.3. Linearidade.....	89
5.2.4. Limites de Detecção e Quantificação.....	91
5.2.5. Precisão e Exatidão	92
5.2.6. Eficiência de Extração	94
5.3. Aplicação da metodologia em casos reais.....	95
6. CONCLUSÃO	99
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
ANEXOS	119

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolução dos Medicamentos Psicofármacos (DDD - dose diária definida por 1000 habitantes ao dia), por grupo terapêutico entre 2000 e 2012 (adaptado de [1]).	19
Figura 2. Efeito dos antipsicóticos típicos nas quatro vias dopaminérgicas (adaptado de [22]). APG: antipsicóticos de primeira geração; ATV: área tegmental ventral; NAc: núcleo acúmbens.	21
Figura 3. Efeito dos antipsicóticos atípicos nas quatro vias dopaminérgicas (adaptado de [22]). ASG: antipsicóticos de segunda geração.	24
Figura 4. Estrutura química da clozapina.	29
Figura 5. Metabolismo e eliminação da clozapina (adaptado de Raaska (2003) [50]). FMO é o acrónimo de flavina monooxigenase, e CYP1A2, CYP3A4 e CYP2C19 são enzimas responsáveis pelo metabolismo da clozapina.	30
Figura 6. Estrutura química da risperidona.	32
Figura 7. Metabolismo e eliminação da Risperidona e da 9-hidroxi-risperidona (adaptado de Álamo e López-Muñoz (2013) [65]). CYP2D6 and CYP3A4 são enzimas responsáveis pelo metabolismo da RISP.	33
Figura 8. Representação esquemática das 4 etapas genéricas associadas à SPE.	44
Figura 9. Dispositivo de SPME.	48
Figura 10. Representação esquemática dos modos de SPME (a) por imersão direta (DI-SPME) (b) por headspace (HS-SPME) (c) por membrana (M-SPME).	49
Figura 11. Seringa de MEPS.	50
Figura 12. Representação esquemática das etapas envolvidas na MEPS.	51
Figura 13. Formatos da MEPS disponíveis comercialmente: manual (seringa analítica), semi-automática (seringa analítica automática eVol®) e automática (estão disponíveis diversas configurações e.g. MEPS online kit da SGE Analytical Sciences para a plataforma robótica CTC). Adaptado de [164].	52
Figura 14. Esquema representativo da separação cromatográfica baseada na migração diferencial das substâncias constituintes de uma mistura.	55
Figura 15. Esquema representativo de um equipamento para HPLC.	56
Figura 16. Fluxograma do procedimento MEPS inicialmente utilizado para a otimização do processo de extração.	66

Figura 17. Sistema UHPLC-PDA da Waters modelo Acquity UPLC H-Class.....	67
Figura 18. Representação de gráficos de análises de resíduos (adaptado de [204]).....	70
Figura 19. Comparação do desempenho dos diferentes sorvente da MEPS para (A) cada um dos compostos analisados e para (B) a soma das áreas de todos os compostos. Acrónimos: 9-OHRisp - 9-hidroxi-risperidona; RISP - risperidona; NORCLZ - norclozapina e CLZ - clozapina.	79
Figura 20. Influência do número de ciclos de extração e volume de amostra no processo MEPS.	80
Figura 21. Estudo da influência do pH na eficiência de extração dos antipsicóticos. Acrónimos: 9-OHRisp - 9-hidroxi-risperidona; RISP - risperidona; NORCLZ - norclozapina e CLZ - clozapina.	81
Figura 22. Representação esquemática das interações eletrostáticas das substâncias básicas ionizadas com os grupos silanol ionizados (adaptado de [225])......	82
Figura 23. Diagrama ternário do sistema de eluentes utilizado na otimização da MEPS.	84
Figura 24. Influência do volume de eluição performance da MEPS. (A) Análise do extrato obtido durante a eluição; (B) Análise do condicionamento do sorvente.....	85
Figura 25. Fluxograma do procedimento MEPS otimizado.	86
Figura 26. Estrutura química da clomipramina.	87
Figura 27. Comparação do perfil cromatográfico de um pool de urina com o perfil cromatográfico do mesmo pool de urina mas fortificado com os analitos de interesse (C = 2,5 µg mL ⁻¹) após extração por MEPS; (A) 237 nm e (B) 239 nm. (9-OHRisp - 9-hidroxi-risperidona; RISP - risperidona; NORCLZ - norclozapina; CLZ - clozapina e PI - parão interno).....	88
Figura 28. Retas de calibração obtidas para cada antipsicótico.....	89
Figura 29. Cromatogramas obtidos das amostras de urina dos pacientes (A) 1 e (B) 12.....	96
Figura 30. Cromatogramas obtidos da amostra de urina do paciente 18: (A) 237 nm e (B) 239 nm.	96

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Classificação de alguns antipsicóticos típicos de acordo com a sua potência (adaptado de [23]).....	22
Tabela 2. Parâmetros farmacocinéticos dos antipsicóticos (adaptado de [4, 35]).....	25
Tabela 3. Comparação dos efeitos adversos entre medicamentos antipsicóticos (adaptado de [39]).	28
Tabela 4. Propriedades físico-químicas da clozapina [44].	29
Tabela 5. Parâmetros farmacocinéticos da clozapina.....	30
Tabela 6. Propriedades físico-químicas da risperidona [44].	32
Tabela 7. Parâmetros farmacocinéticos da risperidona.....	33
Tabela 8. Principais características dos mecanismos de separação por cromatografia líquida.	55
Tabela 9. Comprimento de onda dos solventes mais utilizados [192].	57
Tabela 10. Exemplos representativos de estudos publicados nos últimos 10 anos, que envolveram a separação e detecção de antipsicóticos em matrizes biológicas, por cromatografia líquida.....	59
Tabela 11. Gradiente de fase móvel usado na separação dos antipsicóticos e dos respetivos metabolitos alvo de estudo.	67
Tabela 12. Tabela ANOVA (fator único) [212, 213].	72
Tabela 13. Cálculo das estimativas das variâncias para o modelo experimental utilizado no estudo da repetibilidade e precisão intermédia [212, 213].	73
Tabela 14. Soluções testadas na avaliação no processo de lavagem da MEPS.	83
Tabela 15. Tempos de retenção (T_r) e comprimentos de onda máximo ($\lambda_{m\acute{a}x}$) dos antipsicóticos em estudo.....	88
Tabela 16. Resumo dos resultados obtidos relativos ao modelo de regressão linear para os antipsicóticos em estudo.	90
Tabela 17. Valores dos LOD e LOQ calculados para cada antipsicótico em estudo.	91
Tabela 18. Resumo dos resultados obtidos para a determinação da repetibilidade.	92
Tabela 19. Resumo dos resultados obtidos para a precisão intermédia e exatidão.	93

Tabela 20. Resumo dos resultados obtidos no teste de t-student para o estudo dos erros sistemáticos associados à recuperação do método.....	93
Tabela 21. Resultados da eficiência de extração.	94
Tabela 22. Informação acerca do tratamento dos pacientes.....	95
Tabela 23. Concentrações obtidas nas amostras de urina provenientes de pacientes sob tratamento com os fármacos risperidona e clozapina.	97

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrilo
ANOVA	Análise de variâncias (do inglês <i>Analysis of variances</i>)
BIN	<i>Barrel Insert and Needle Assembly</i>
CL	<i>Clearance</i>
CLZ	Clozapina
CQM	Centro de Química da Madeira
CV	Coefficiente de variação
CYP	Citocromo P450
C ₂	Etilsilano
C ₈	Octilsilano
C ₁₈	Octadecilsilano
DDD	Dose diária definida
d-SPE	Extração em fase sólida dispersiva (do inglês <i>Dispersive Solid Phase Extraction</i>)
DI-SPME	Microextração em fase sólida por imersão direta (do inglês <i>Direct Immersion Solid Phase Microextraction</i>)
DVB	Divinilbenzeno
EE	Eficiência de extração
EMR	Erro médio relativo
FA	Ácido fórmico (do inglês <i>formic acid</i>)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GC	Cromatografia gasosa (do inglês <i>Gas Chromatography</i>)
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (do inglês <i>Gas Chromatography - Mass Spectrometry</i>)
H-DVB	<i>Highly cross-linked polystyrene divinylbenzene</i>
HLB-DVB	<i>Hydrophilic - Lipophilic Balance divinylbenzene</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HS-SPME	Microextração em fase sólida por <i>headspace</i> (do inglês <i>Headspace Solid Phase Microextraction</i>)
INMLCF, I.P.	Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, Instituto Público
INFARMED	Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, Instituto Público
IUPAC	<i>International Union Of Pure And Applied Chemistry</i>
LC	Cromatografia líquida (do inglês <i>Liquid Chromatography</i>)
LCD	<i>Liquid Crystal Display</i>
LLE	Extração líquido-líquido (do inglês <i>Liquid-Liquid Extraction</i>)
LOD	Limite de deteção (do inglês <i>Limit of Detection</i>)
LOQ	Limite de quantificação (do inglês <i>Limit of Quantification</i>)
LLOQ	Limite inferior de quantificação (do inglês <i>Lower Limit of Quantification</i>)
M-SPME	Microextração em fase sólida por membrana (do inglês <i>Membrane Solid Phase Microextraction</i>)

MeOH	Metanol
MEPS	Microextração por sorvente empacotado (do inglês <i>Microextraction by Packed Sorbent</i>)
MS	Espectrometria de massa (do inglês <i>Mass Spectrometry</i>)
MI	Fase sólida mista constituída por 80% de C ₈ e 20% de SCX
NORCLZ	Norclozapina
PDA	Detetor por arranjo de fotodiodos (do inglês <i>Photodiode Array Detection</i>)
PEP	<i>Polar Enhanced Polymer</i>
PGC	Carbono grafitizado poroso (do inglês <i>Porous Graphitic Carbon</i>)
PI	Padrão interno
PP	Precipitação de proteínas
PTFE	Politetrafluoretileno
QuEChERS	<i>Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe</i>
r	Coefficiente de correlação
R-AX	<i>Retain Anion Exchange</i>
R-CX	<i>Retain Cation Exchange</i>
RISP	Risperidona
RSD	Desvio padrão relativo (do inglês <i>Relative Standard Deviation</i>)
r^2	Coefficiente de determinação
SALLE	<i>Sailing out</i>
SCX	<i>Strong Cation Exchange</i>
SPE	Extração em fase sólida (do inglês <i>Solid Phase Extraction</i>)
SPME	Microextração em fase sólida (do inglês <i>Solid Phase Microextraction</i>)
SNC	Sistema Nervoso Central
$t_{1/2}$	Tempo de meia vida
UHPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência (do inglês <i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i>)
UHPLC-PDA	Cromatografia líquida de ultra eficiência com detetor de fotodiodos (do inglês <i>Ultra High Performance Liquid Chromatography with Photodiode Array Detector</i>)
UV/Vis	Detetor de ultravioleta visível
9-OHRisp	9-hidroxy-risperidona
$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de onda máximo

Capítulo I

Introdução

1.1. Breve introdução às doenças mentais e o início da psicofarmacologia

As doenças mentais são doenças de etiologia complexa, abrangendo alterações ao nível da cognição, das emoções e do controlo comportamental. Apesar das manifestações e da gravidade destas doenças serem extremamente variáveis e muitas vezes de origem pouco clara, em geral, as doenças mentais têm um impacto significativo na vida do paciente.

Genericamente, os transtornos mentais são classificados em dois grandes grupos: as neuroses e as psicoses. As neuroses são tidas como doenças mentais menos graves, onde os transtornos são caracterizados pelas grandes dificuldades sentidas pelo paciente em se adaptar ao meio que o rodeia, sem perder, contudo, a noção da realidade [5]. No caso da psicose, um problema mental de maior gravidade, o paciente perde o sentido da realidade e a sua personalidade encontra-se desorganizada, como acontece, por exemplo, em caso de esquizofrenia [5].

Existem vários subtipos de psicoses, no entanto, de uma forma geral, a pessoa que atravessa uma crise psicótica pode ter alucinações, delírios, mudanças comportamentais e pensamento confuso, estando o grau desta perda de contacto com a realidade dependente da intensidade da psicose. Além disso, os sintomas estão aliados a uma carência de visão crítica que leva o indivíduo a não reconhecer o carácter estranho do seu comportamento e, conseqüentemente, ter sérias dificuldades nos relacionamentos sociais e na execução de tarefas quotidianas [6].

A esquizofrenia, provavelmente o tipo mais conhecido de transtorno psicótico, representa uma das doenças mentais mais graves e incapacitantes do mundo, não só para o doente, como também para a sua rede de relações sociais e familiares. De uma forma muito sucinta, os transtornos esquizofrénicos são caracterizados por um conjunto diversificado de sintomas que podem ser agrupados em três tipos principais: os sintomas positivos, que ocorrem quando se perde a noção da realidade (e.g. alucinações, delírios, etc.), os sintomas negativos, caracterizados por indiferença emocional e isolamento social (e.g. apatia, diminuição da afetividade, perda de capacidade de socializar, etc.) e os sintomas cognitivos, que estão associados a problemas de memória e de raciocínio (e.g. raciocínio lento, desorganizado, dificuldade de concentração, etc.) [7, 8].

Em Portugal, existem cerca de 100 mil doentes esquizofrénicos, ou seja, cerca de 1% da população nacional, números que acompanham a prevalência a nível mundial [9]. Embora seja desconhecida a causa exata da esquizofrenia, a maioria dos especialistas concorda que os fatores genéticos e ambientais parecem estar associados a um aumento do risco do desenvolvimento desta doença [7, 8].

Atualmente, as doenças ou transtornos psicóticos podem ser tratados através de medicamentos (antipsicóticos), ou outras formas de psicoterapia (e.g. tratamentos psicossociais, terapia cognitivo comportamental). No entanto, antes dos anos 50, a eletroconvulsoterapia e a

psicocirurgia eram considerados tratamentos adequados para os pacientes que sofriam destas doenças. Devido a uma falta de conhecimento em torno da fisiologia das perturbações psicóticas, o único “tratamento” farmacológico nesse momento consistiu na sedação com barbitúricos e drogas que induziam crises epilépticas [10].

O primeiro desenvolvimento notável na terapia medicamentosa para as pessoas que sofrem de transtorno bipolar – um distúrbio caracterizado pela alternância de episódios maníacos e depressivos, foi a descoberta do lítio como agente antimaniaco no final da década de 40 [11]. Embora o mecanismo de ação do lítio, ainda permaneça pouco claro, a sua eficácia no tratamento de distúrbios bipolares tem sido aceite em todo o mundo e ainda é considerado o principal tratamento profilático para esta condição, mesmo 60 anos após a sua descoberta [10].

A descoberta dos efeitos antipsicóticos da clorpromazina, no início dos anos 50, marcou o início da psicofarmacologia contemporânea. Desde então, o uso de antipsicóticos no tratamento de doenças mentais como a esquizofrenia, mudou radicalmente a falta de perspectivas que até então prevaleciam no campo da psiquiatria e da saúde mental, e teve como consequência um abrir das portas dos hospitais psiquiátricos a muitos doentes que passaram a viver na comunidade [12-14].

1.2. Consumo de antipsicóticos em Portugal

No que diz respeito ao consumo de antipsicóticos em Portugal, a utilização destas substâncias tem aumentado de forma expressiva nos últimos anos. De acordo com a Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P. (INFARMED) [1], na última década, registou-se um aumento do consumo de psicofármacos, mas com maior evidência no grupo dos antidepressivos, com um incremento de 240%, e no grupo dos antipsicóticos com 171% de aumento (Figura 1). Segundo a mesma fonte [1], este aumento do consumo pode dever-se a uma maior acessibilidade aos medicamentos, a uma utilização mais prolongada destes fármacos ou à aprovação de novas indicações terapêuticas.

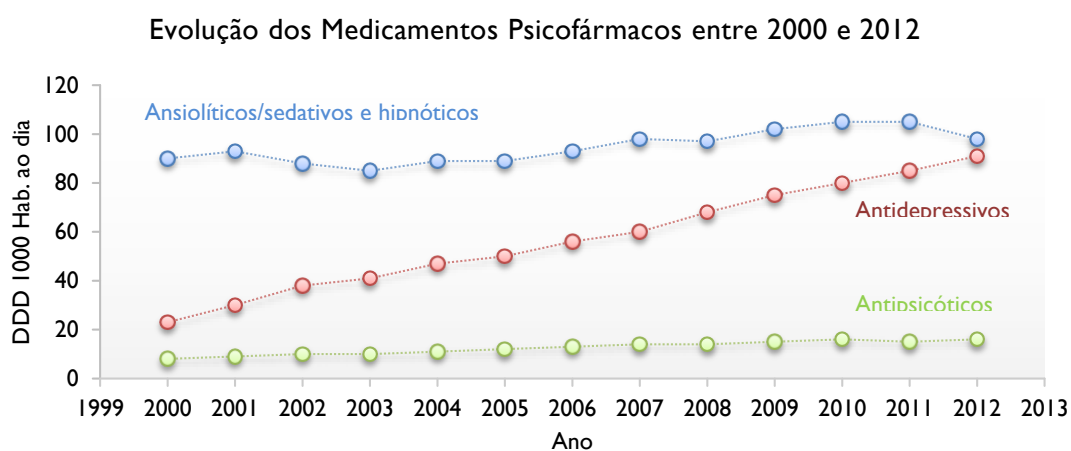


Figura 1. Evolução dos Medicamentos Psicofármacos (DDD - dose diária definida por 1000 habitantes ao dia), por grupo terapêutico entre 2000 e 2012 (adaptado de [1]).

No entanto, e apesar de serem escassos os trabalhos a nível nacional reportando o padrão de consumo de medicamentos de acordo com a classe social, recentemente foi publicado um estudo que ilustra o padrão de consumo de medicamentos por “pessoas sem-abrigo” na cidade do Porto [15]. Neste estudo participaram 146 “sem-abrigos”, recrutados a partir de quatro instituições de serviços sociais. Um total de 56,8 % dos participantes revelou ter tomado, pelo menos, um medicamento na semana anterior, sendo a maioria psicofármacos. De entre os medicamentos reportados, as benzodiazepinas e os antipsicóticos eram de longe os fármacos mais consumidos, com 21,9% e 15,1%, respetivamente.

Relativamente às intoxicações medicamentosas, alguns estudos [2, 3] revelam que os psicofármacos são os medicamentos que mais intoxicações têm causado a nível nacional. De acordo com estes estudos, as intoxicações mais frequentes ocorrem com o consumo de ansiolíticos, antidepressivos, antipsicóticos e analgésicos. Segundo Tarelho *et al* (2011) [16], as desvantagens sociais, períodos de crise económica e mudanças adversas no estatuto socioeconómico, são fatores que contribuem para o aumento de doenças psiquiátricas e consequente aumento do consumo de psicofármacos e em casos extremos do suicídio.

1.3. Antipsicóticos: Aspetos gerais e farmacológicos

Desde a sua introdução, na década de 50, que os antipsicóticos se tornaram amplamente prescritos na psiquiatria clínica, como tratamento de primeira linha para a esquizofrenia e outros distúrbios psicóticos. Os antipsicóticos são medicamentos inibidores das funções psicomotoras, as quais se podem encontrar aumentadas em estados, por exemplo de excitação e de agitação. Paralelamente, eles atenuam os sintomas neuro-psíquicos considerados psicóticos, tais como os delírios e as alucinações [17].

Inicialmente denominados de “neurolépticos” [18], devido à sua capacidade de induzir a neurolepsia, os antipsicóticos são atualmente agrupados em duas categorias, com base no seu mecanismo de ação, e em função da sua propensão para causar efeitos extrapiramidais [19]. Os antipsicóticos mais antigos são denominados de “típicos” e em geral apresentam mais efeitos extrapiramidais do que os mais recentes denominados de “atípicos”. Os efeitos extrapiramidais correspondem a sintomas motores, como a rigidez dos movimentos, tremores, dificuldade em estar parado, e em casos de sobredosagem podem levar a situações graves [17]. Ambos os tipos de antipsicóticos atuam bloqueando os recetores dopaminérgicos cerebrais D_2 . No entanto, os antipsicóticos atípicos atuam, adicionalmente, como antagonistas dos recetores serotoninérgicos $5-HT_{2A}$. Atualmente, a grande afinidade para o rácio $5-HT_{2A}/D_2$ é, na verdade, a característica farmacológica que melhor distingue os antipsicóticos atípicos dos antipsicóticos típicos [20].

1.3.1. Antipsicóticos Típicos

Os antipsicóticos típicos, também designados de convencionais ou de primeira geração, foram os primeiros medicamentos deste grupo, utilizados para tratar a esquizofrenia. Estes fármacos constituem um grupo muito heterogéneo no que respeita à sua natureza química, mas com um mecanismo de ação comum. Atuam, fundamentalmente, bloqueando os recetores dopaminérgicos cerebrais D_2 , apesar de muitos deles atuarem sobre os recetores de outros neurotransmissores, como a noradrenalina, a serotonina e a acetilcolina [21]. O bloqueio dos recetores D_2 na via dopaminérgica mesolímbica é responsável pelos efeitos terapêuticos dos antipsicóticos. Infelizmente, esta classe de antipsicóticos não é seletiva para os recetores D_2 apenas desta via, agindo noutras regiões do cérebro, causando os efeitos colaterais indesejáveis [4]. A Figura 2 ilustra os efeitos dos antipsicóticos típicos nas quatro vias dopaminérgicas.

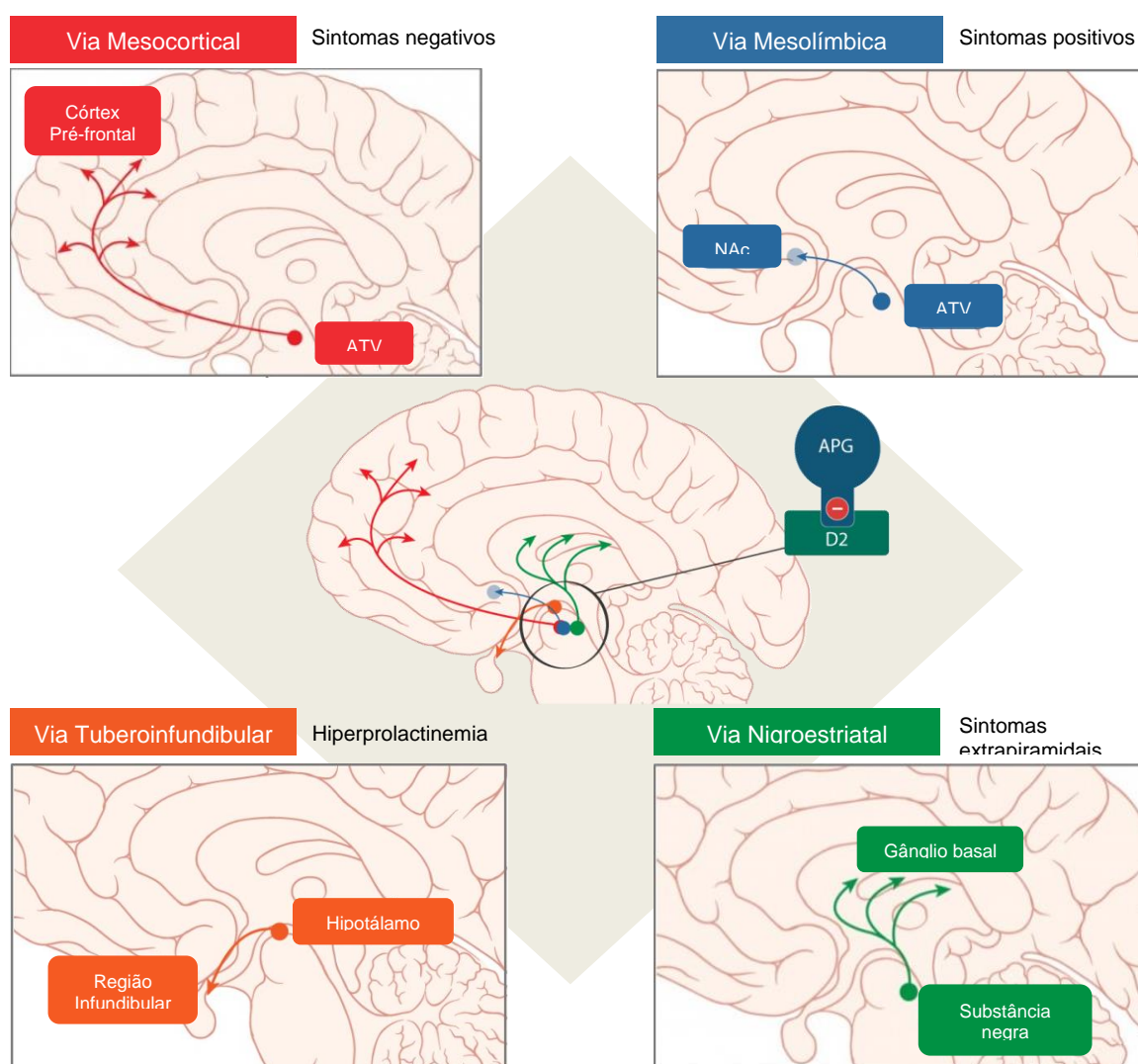


Figura 2. Efeito dos antipsicóticos típicos nas quatro vias dopaminérgicas (adaptado de [22]). APG: antipsicóticos de primeira geração; ATV: área tegmental ventral; NAc: núcleo acúmbens.

De acordo com a teoria dopaminérgica, que relaciona a esquizofrenia a um excesso de dopamina na via mesolímbica e a um déficit desta na via mesocortical, a ação antagonista D₂ dos antipsicóticos típicos no sistema mesolímbico melhora os sintomas positivos da doença, enquanto que a ação destes, na via mesocortical piora os sintomas negativos [18].

Por outro lado, o antagonismo dos recetores D₂ na via nigroestriatal, que tem origem na substância negra e se projeta para o corpo estriado, é responsável pelos efeitos colaterais extrapiramidais, que se caracterizam por alterações motoras, tais como bradicinesia e acatisia, muito semelhantes aos observados na doença de Parkinson. Além dos efeitos extrapiramidais, estes antipsicóticos podem provocar, entre outras alterações endócrinas, a hiperprolactinemia e a galactorrêa, decorrentes do antagonismo da via dopaminérgica tuberoinfundibular [18].

De acordo com a afinidade dos antipsicóticos convencionais para os recetores dopaminérgicos, esta classe de antipsicóticos pode ser subdividida em alta, média e baixa potência. A alta potência está associada com a elevada afinidade dos antipsicóticos para os recetores dopaminérgicos D₂ mesmo em doses baixas, enquanto que a média e baixa potência dos antipsicóticos se encontram relacionadas a uma menor afinidade para estes recetores, sendo necessárias doses mais altas para alcançar o efeito terapêutico (Tabela I). Esta divisão é importante para identificar mais facilmente os mecanismos de ação, efeitos colaterais e doses diárias, visto que dentro de um mesmo grupo os efeitos são muito semelhantes [23].

Tabela I. Classificação de alguns antipsicóticos típicos de acordo com a sua potência (adaptado de [23]).

Classe / nome do fármaco	Dose	Vias de administração ^a
Alta potência		
Flufenazina	2 a 20 mg/dia	VO
Haloperidol	1 a 20 mg/dia	VO, IM, EV
Penfluridol	20 a 60 mg/ semana	VO
Pimozida	2 a 10 mg/dia	VO
Média potência		
Trifluoperazina	5 a 30 mg/dia	VO
Pipotiazina	10 a 20 mg/dia	VO
Zucopentixol	10 a 60 mg/dia	VO
Baixa potência		
Clorpromazina	50 a 1200 mg/mês	VO, IM
Levomepromazina	200 a 800 mg/dia	VO, IM
Periciazina	20 a 70 mg/dia	VO
Tioridazina	150 a 800 mg/dia	VO

^a Vias de administração: VO - via oral; IM - via intramuscular; EV - via endovenosa

No que diz respeito às classes estruturais dos antipsicóticos convencionais, as mais proeminentes são as fenotiazinas e as butirofenonas. Os antipsicóticos fenotiazínicos constituem

o grupo químico com maior número de compostos (mais de 40). A clorpromazina, que tem sido considerada o protótipo dos antipsicóticos típicos, é caracterizada pela sua estrutura fenotiazina típica, a qual formou a base de outros antipsicóticos, tais como a flufenazina, perfenazina, promazina, prometazina, tioridazina, trifluoperazina e triflupromazina [4].

Relativamente aos antipsicóticos de primeira geração não fenotiazínicos, estes incluem as butirofenonas (e.g. haloperidol), os tioxantenos (e.g. flupentixol), as dihidroindolonas (e.g. molindona), as dibenzepinas (e.g. clotiapina) e as difenilbutilpiperidinas (e.g. pimozida) [4, 22].

Apesar dos efeitos adversos provocados pelos antipsicóticos típicos, esta classe continua a ser utilizada na psiquiatria clínica, principalmente na fase aguda da esquizofrenia, como coadjuvantes nos episódios maníacos do transtorno bipolar, por serem reconhecidamente eficazes e seguros, e principalmente pelo seu menor custo, quando este fator é decisivo [13, 23].

1.3.2. Antipsicóticos Atípicos

Até a introdução da clozapina, todos os antipsicóticos disponíveis apresentavam a mesma eficácia terapêutica, com um perfil característico de reações adversas, diferindo entre eles principalmente pela severidade destes efeitos adversos [21]. As propriedades atípicas da clozapina, como a atenuação dos sintomas positivos da esquizofrenia sem ocasionar efeitos extrapiramidais, bem como a eficácia contra os sintomas negativos, deram origem a uma nova classe de antipsicóticos, denominada de “atípicos” ou de “segunda geração” [18]. Tal como nos antipsicóticos convencionais, estes fármacos constituem um grupo muito heterogêneo no que respeita à sua natureza química. Fazem parte desta classe, as dibenzodiazepinas (e.g. clozapina), as oxazepinas (e.g. olanzapina), as benzamidas (e.g. amisulprida), entre outras.

Embora o exato mecanismo de ação desta classe ainda não esteja totalmente esclarecido, acredita-se que a elevada afinidade para os recetores serotoninérgicos 5-HT_{2A} face ao moderado antagonismo para os recetores dopaminérgicos D₂ [24], a rápida dissociação nos recetores D₂ [25, 26], e o agonismo parcial nos recetores 5-HT_{1A} [18], são as principais características que os distinguem dos homólogos típicos e que contribuem para as propriedades farmacológicas e para o baixo risco de provocar efeitos secundários extrapiramidais.

Tal como os antipsicóticos convencionais, o perfil neurofarmacológico desta classe de antipsicóticos está associado ao efeito inibidor seletivo dos neurónios mesolímbicos dopaminérgicos. No entanto, o antagonismo sobre os recetores serotoninérgicos 5-HT_{2A} parece ser a característica chave para a eficácia dos antipsicóticos atípicos, uma vez que este afeta a produção de dopamina em diferentes graus, de acordo com a via dopaminérgica [27]. A Figura 3 apresenta de forma resumida os efeitos dos antipsicóticos atípicos nas quatro vias dopaminérgicas.

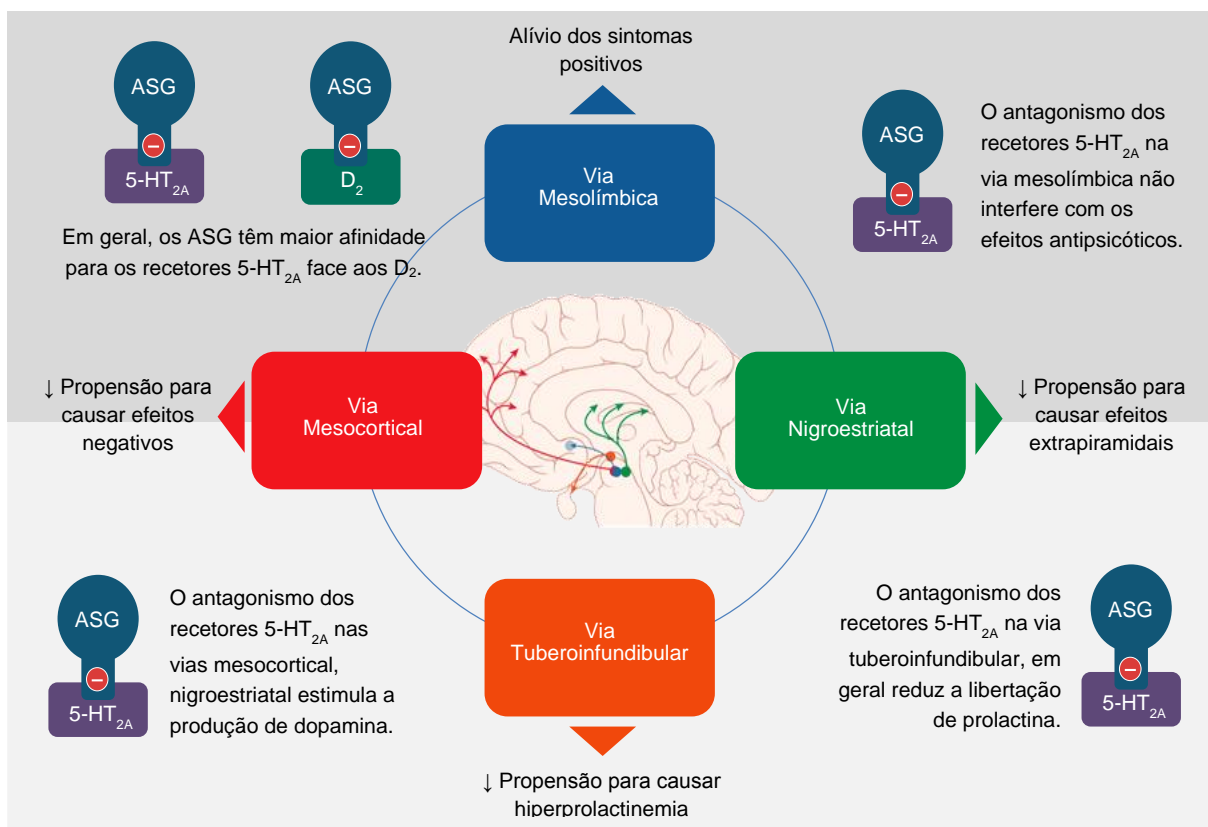


Figura 3. Efeito dos antipsicóticos atípicos nas quatro vias dopaminérgicas (adaptado de [22]). ASG: antipsicóticos de segunda geração.

O antagonismo dos receptores $5HT_{2A}$ na área tegmental ventral estimula a produção de dopamina que, por sua vez, estende a sua ação para o córtice pré-frontal (via mesocortical), aliviando os sintomas negativos da esquizofrenia. Apesar do antagonismo nos receptores D_2 , com o aumento da produção de dopamina haverá uma maior competição entre o fármaco e o neurotransmissor, aumentando a reversão do bloqueio dos receptores D_2 , levando a melhoria do funcionamento cognitivo [22, 26].

Tal como na via dopaminérgica mesocortical, os antipsicóticos atípicos na via nigroestriatal inibem os receptores $5-HT_{2A}$, aumentando a liberação de dopamina na fenda sináptica. O aumento de dopamina irá promover uma disputa entre a dopamina extra e o fármaco reduzindo o bloqueio dos receptores D_2 para 65% a 70%, face aos 80-90% obtidos pelos homólogos típicos, o que é suficiente para se ter uma eficácia antipsicótica reduzindo a manifestação dos sintomas extrapiramidais [28, 29].

No que diz respeito ao antagonismo $5HT_{2A}/D_2$ na via tuberoinfundibular, o antagonismo simultâneo destes receptores diminui a produção de prolactina, reduzindo o risco de hiperprolactinemia [30].

Relativamente à via mesolímbica, os efeitos antagónicos da serotonina sobre a dopamina nesta via não são suficientemente fortes para causar reversão dos recetores D_2 pelos antipsicóticos atípicos ou para diminuir as ações destes nos sintomas positivos da psicose [27].

Embora esta classe partilhe certas características gerais, cada antipsicótico atípico tem um perfil de ação diferenciado sobre uma grande variedade de recetores tanto dopaminérgicos (D_3 e D_4) como de outros neurotransmissores (5-HT_{1A}, 5-HT₂, muscarínicos, histaminérgicos H₁, α -adrenérgicos, entre outros). No entanto, a ação destes medicamentos nestes recetores pode estar na origem das reações adversas, tais como o aumento de peso (obesidade), risco de diabetes mellitus tipo II, hipertensão arterial sistémica e cardiopatia isquémica, que podem afetar a decisão do tratamento de escolha [23].

1.3.3. Propriedades Farmacocinéticas dos Antipsicóticos

Como exemplo de muitos psicofármacos, os antipsicóticos são muito semelhantes no que diz respeito às propriedades químicas, como a lipofilicidade, o peso molecular e a basicidade que os caracteriza. Em geral, estes fármacos são bem absorvidos por via oral, sofrendo intenso metabolismo hepático de primeira passagem [4], tendo o sistema de enzimas citocromo P450 (CYP) um papel fundamental no metabolismo destes fármacos [31]. Na verdade, as enzimas CYP representam cerca de 70-80% de metabolismo de primeira passagem e são responsáveis pela biotransformação dos fármacos lipofílicos em metabolitos polares [32, 33], que podem ser facilmente excretados pelos rins [34].

Em parte devido à sua lipofilicidade, estes fármacos distribuem-se amplamente pelo organismo e facilmente atravessam a barreira hematoencefálica acumulando-se no sistema nervoso central. Apresentam uma elevada afinidade para as proteínas plasmáticas, com as quais se ligam atingindo proporções até 99%. Os tempos de meia-vida são geralmente longos (Tabela 2) e, em geral, uma dose de fármaco por dia é suficiente para grande parte dos tratamentos clínicos [31].

Tabela 2. Parâmetros farmacocinéticos dos antipsicóticos (adaptado de [4, 35]).

Fármaco	Dose oral normalmente administrada (mg) ^a	Concentração de fármaco no sangue (ng mL ⁻¹) ^b	t _{1/2} (h) ^c	V _D (L Kg ⁻¹) ^d	Fração ligada ^e
9-hidroxi-risperidona*	3-12	10-100	23	–	–
Amissulprida	400-1200	50-400	11-27	13-16	0,17
Aripiprazol	10-30	50-350	60-90	4,9	0,99
Bromperidol	1-15	1-20	15-35	–	–
Buspirona	20-30	1-10	3-12	5-6	0,95
Clorpromazina	200-600	30-300	7-119	10-35	0,98
Clorprotixeno	40-80	20-200	8-12	11-23	–
Clozapina	300-450	200-800	6-17	2-7	0,95

Introdução

Droperidol	0,5-2,5	5-50	1,2-2,7	1,5-2,5	0,85-0,90
Flupentixol	3-6	1-15	19-39 (HCl) 5-113 dias (decanoato)	14,1	–
Flufenazina	1-5	2-20	13-58 (HCl) 3-4 dias (enantato) 5-12 dias (decanoato)	220	0,99
Fluspirileno**	2-5 (i.m.)	–	21 dias (decanoato)	–	–
Haloperidol	1-15	5-50	14-41 (lactato) 14-28 (decanoato)	18-30	0,90
Levomepromazina	25-50	15-60	15-30	30	–
Loxapina	20-100	10-100	3-4	–	0,91-0,99
Melperona	100-400	5-40	2-4	7-10	–
Mesoridazina	100-400	15-100	2-9	3-6	0,99
Molindona	50-100	~500	1,2-2,8	3-6	–
Olanzapina	5-20	10-100	21-54	10-20	0,93
Penfluridol	20-60 (uma vez por semana)	4-25	70	–	–
Perazina	50-600	100-230	8-15	–	0,96
Periciazina	15-60	5-60	–	–	–
Perfenazina	12-24	0,6-2,4	8-12	10-35	>0,90
Pimozida	7-10	15-20	28-214	11-62	0,99
Pimaperona	80-120	100-400	12-30	–	–
Proclorperazina	15-40	10-500	14-27	13-32	>0,90
Promazina	200-800	10-400	7-17	27-42	0,84
Promethazina		50-400	10-20	9-19	0,93
Quetiapina	300-450	70-170	6-7	8-12	0,83
Risperidona	2-6	10-100	3-20	0,7-2,1	0,90
Sertindola	12-20	50-500	–	20-40	0,99
Sulpirida	400-600	50-400	4-11	2,7	0,40
Tioridazina	150-300	200-2000	26-36	18	0,96
Tiotixeno	6-30	–	12-36	–	0,91-0,99
Trifluoperazina	15-20	1-50	7-18	–	>0,90
Trifluopromazina	165-375	30-100	–	–	–
Ziprasidona	40-160	50-120	2-8	1,5-2,3	0,99
Zotepina	75-300	5-300	12-30	50-168	0,97
Zuclopentixol	20-50	55-100	12-26 (HCl) 18-24 (acetato) 19 dias (decanoato)	15-20	0,98

^a Dose oral normalmente administrada em adultos para o tratamento da esquizofrenia, psicose ou transtorno bipolar

^b Concentração esperada de fármaco no sangue, seguindo as indicações terapêuticas

^c $t_{1/2}$: tempo de meia vida de eliminação – corresponde ao tempo necessário para as concentrações plasmáticas ou a quantidade de fármaco no corpo serem reduzidas em 50%.

^d V_D : volume de distribuição

^e Fração ligada: porção de fármaco que se encontra ligada às proteínas plasmáticas.

* Também referido como paliperidona; ** Disponível apenas na forma injetável intramuscular.

Em geral, os antipsicóticos estão disponíveis nas formas posológicas orais ou intramusculares. Estas últimas são normalmente sintetizadas pela esterificação do fármaco com

ácidos gordos [36] e podem ser divididas em medicamentos de ação curta e medicamentos de ação prolongada [4]. As formulações injetáveis têm maior biodisponibilidade, devido à ausência de metabolismo de primeira passagem e são especialmente utilizadas em pacientes que apresentam baixa adesão ao tratamento [4]. Além disso, o efeito de depósito (“depot”) das formulações de ação prolongada permite intervalos mais alargados entre injeções.

1.3.4. Efeitos Adversos

A escolha de um antipsicótico continua a não ser uma tarefa fácil e deve fazer-se considerando a intensidade da sua ação, as reações adversas que produzem e as características farmacocinéticas de cada composto [37]. O tratamento com medicamentos antipsicóticos implica um difícil equilíbrio entre o alívio dos sintomas psicóticos e a perturbação dos efeitos colaterais [38]. Atualmente, não existem antipsicóticos isentos de efeitos adversos indesejáveis, sendo estes os principais responsáveis pela descontinuidade, baixa adesão, redução de qualidade de vida, da interação e adaptação social [39, 40].

Os efeitos colaterais dos antipsicóticos podem ser agrupados em diferentes classes, incluindo (I) os efeitos neurológicos, como a neurotoxicidade, discinesia tardia, acatisia, sedação, convulsões, hipotermia, blefarospasmo e parkinsonismo; (II) os efeitos hematológicos, caracterizados pela eosinofilia, neutropenia e agranulocitose; (III) os efeitos endocrinológicos, baseados no aumento de peso, hiperglicemia, hiperprolactinemia, amenorreia e ginecomastia; (IV) os efeitos cardiovasculares, que consistem na hipotensão postural, alterações eletrocardiográficas e arritmias cardíacas; e (VI) os efeitos anticolinérgicos, caracterizados pela secura na boca, visão turva, dificuldades respiratórias, pupilas dilatadas, obstipação intestinal e aumento da temperatura corporal. A estes efeitos estão ainda associados sintomas psiquiátricos secundários, como mania e a catatonia [38, 40, 41].

Em traços gerais, os fármacos convencionais com ação antipsicótica mais intensa, como a flufenazina e o haloperidol, são os que causam efeitos extrapiramidais mais frequentes e com maior intensidade [37]. Os menos potentes do ponto de vista antipsicótico, como a clorpromazina e a tioridazina, são os que menor capacidade têm para produzir efeitos extrapiramidais, mas têm maior tendência para produzir hipotensão ortostática [37]. Por outro lado, os antipsicóticos mais recentes e, em particularmente a clozapina, apesar de ser o fármaco de eleição nas formas refratárias de esquizofrenia devido à sua eficácia, produz neutropenia em cerca de 2-3% dos pacientes levando, por vezes, a agranulocitose fatal, sendo fortemente recomendada uma monitorização cuidadosa da contagem de células brancas do sangue durante o tratamento farmacológico [42].

Apesar da comparação geral entre as classes de antipsicóticos ser muito importante, a comparação entre medicamentos específicos é de extrema relevância, uma vez que cada fármaco

apresenta os seus próprios desafios em termos de balanceamento entre eficácia, segurança e tolerabilidade [39]. A Tabela 3 estabelece uma comparação dos principais efeitos adversos entre medicamentos antipsicóticos.

Tabela 3. Comparação dos efeitos adversos entre medicamentos antipsicóticos (adaptado de [39]).

Efeitos adversos	Antipsicóticos típicos		Antipsicóticos atípicos					
	Baixa potência	Alta potência	ARI	CLZ	OLZ	QTP	RISP	ZPS
Efeitos anticolinérgicos	+++	+	0	+++	+	+	0	0
Dislipidemia	++	+	0	+++	+++	++	+	0
Efeitos extrapiramidais	+	+++	+	0	+	0	++	+
Hiperprolactinemia	++	+++	0	0	+	0	+++	+
Síndrome Neuroléptica Maligna	+	++	+	+	+	+	+	+
Hipotensão postural	+++	+	+	+++	+	++	++	+
Intervalo QT prolongado	++§	+	+	+	+	+	+	++
Sedação	+++	+	+	+++	++	++	+	+
Convulsões	+	+	+	+++	+	+	+	+
Disfunção sexual	+++	++	+	+	+	+	++	+
Diabetes mellitus tipo II	+	+	+	++	++	+	+	+
Aumento de peso	++	+	0	+++	+++	++	++	0

Notas: 0 - raro; + - baixo risco; ++ - médio risco; +++ - alto risco; § - a tioridazina apresenta um maior risco de causar prolongamento do intervalo QT. **Abreviaturas:** ARI - aripiprazole; CLZ - clozapina; OLZ - olanzapina; QTP - quetiapina; RISP - risperidona; ZPS - ziprasidona; QT - síndrome do QT (é um tipo de taquiarritmia ventricular).

O perfil de reações adversas associadas ao uso de antipsicóticos é relativamente extenso, pelo que a deteção precoce dos efeitos adversos, a diminuição da dose, a troca por outro fármaco e suspensão de associações desnecessárias são algumas das estratégias recomendadas para se obter um adequado efeito antipsicótico e menor desconforto e risco [39, 40].

1.3.5. Fármacos em Estudo

Neste trabalho, foram analisados dois fármacos antipsicóticos utilizados no tratamento da esquizofrenia: a clozapina, e a risperidona. Esta escolha deveu-se devido aos mecanismos de ação de cada um dos fármacos e ao facto de serem dois dos antipsicóticos mais prescritos na Casa de Saúde S. João de Deus do Funchal.

Dado que a dosagem e a resposta a um fármaco varia de indivíduo para indivíduo, é importante conhecer algumas das suas propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas e respetivos efeitos adversos [43].

1.3.5.1. Clozapina

A clozapina é um antipsicótico diferente dos neurolépticos clássicos, cuja ação farmacológica se pode dever ao antagonismo simultâneo dos recetores dopaminérgicos D₂ e

serotoninérgicos 5-HT_{2A}. O revolucionário perfil terapêutico demonstrado pela clozapina, como a atenuação dos sintomas positivos e negativos da esquizofrenia sem ocasionar efeitos extrapiramidais, tornou-a no primeiro antipsicótico de segunda geração. Não obstante dos efeitos adversos, a clozapina é excepcional, na medida em que funciona muitas vezes mesmo quando outros medicamentos falharam, principalmente no tratamento de pacientes com esquizofrenia refratária [42]. Infelizmente, a clozapina produz agranulocitose, caracterizada pela redução de leucócitos granulócitos no sangue, sendo recomendada uma rigorosa monitorização hematológica durante o tratamento com este fármaco.

A clozapina é uma dibenzodiazepina tricíclica, cuja estrutura é caracterizada por um anel diazepina central (ciclo-heptano com duas substituições por átomos de azoto nas posições 1,4) ligado a dois anéis benzênicos (Figura 4). No que diz respeito às suas propriedades físico-químicas, a Tabela 4 resume algumas referentes a este fármaco.

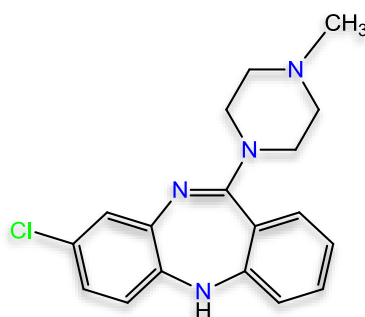


Figura 4. Estrutura química da clozapina.

Tabela 4. Propriedades físico-químicas da clozapina [44].

Propriedades Físico-Químicas	Clozapina
Nome IUPAC	2-cloro-11-(4-metil-1-piperazinil-5H-dibenzo [b,e] [1,4] diazepina
Massa molecular (g mol ⁻¹)	326,823
Fórmula molecular	C ₁₈ H ₁₉ ClN ₄
Ponto de fusão (°C)	183-184 °C
Ponto de ebulição (°C)	–
Solubilidade em água (mg mL ⁻¹)	0,186
Constante de dissociação (pKa)	7,5

1.3.5.1.1. Farmacocinética

Após a administração oral, a clozapina é rapidamente absorvida quase na sua totalidade (90 - 95%) pelo trato gastrointestinal. Devido ao intenso metabolismo de primeira passagem, a biodisponibilidade da clozapina é amplamente variável. Após a administração oral, cerca de 27 a 47% da dose ingerida atinge a circulação sistêmica de forma inalterada [45, 46]. O pico plasmático

(concentração máxima) é atingido entre 1 a 3 horas e o tempo de meia vida de eliminação médio ($t_{1/2}$) ocorre entre as 6 e as 17 horas [4, 35]. A clozapina distribui-se amplamente pelo organismo (V_D médio entre 2 e 7 L kg⁻¹), atravessando facilmente a barreira hematoencefálica [4, 35]. A depuração plasmática, ou *clearance* (CL), definida como o volume de plasma do qual o fármaco é completamente removido por unidade de tempo, varia entre 13 e 57 L h⁻¹ para a clozapina [47]. A Tabela 5 resume os principais parâmetros farmacocinéticos da clozapina. De salientar que a clozapina apresenta uma cinética linear ou de primeira ordem para concentrações terapêuticas, o que significa que as taxas de absorção e eliminação são proporcionais à concentração de fármaco.

Tabela 5. Parâmetros farmacocinéticos da clozapina.

Parâmetro	Valor
Biodisponibilidade oral (F)	27-47 %
Tempo para atingir o pico plasmático ($T_{máx}$)	1-3 h
Tempo de meia vida ($t_{1/2}$)	6-17 h
Volume de distribuição (V_D)	2-7 L kg ⁻¹
Depuração plasmática (CL)	13-57 L h ⁻¹
Fração não ligada	~5,5 %

A clozapina é principalmente biotransformada por N-desmetilação e N-oxidação do anel piperazina, originando a N-desmetilclozapina, também designada por norclozapina, e o metabolito N-óxido de clozapina (Figura 5). Adicionalmente, são formados os metabolitos hidroxilados e quimicamente reativos [48, 49].

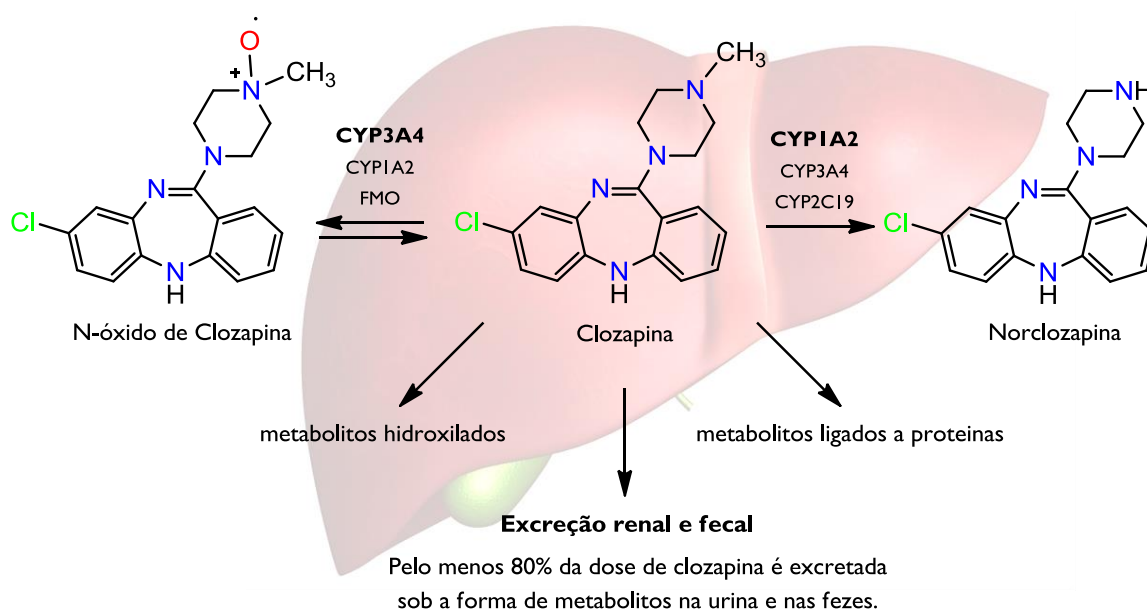


Figura 5. Metabolismo e eliminação da clozapina (adaptado de Raaska (2003) [50]). FMO é o acrónimo de flavina monooxigenase, e CYPIA2, CYP3A4 e CYP2C19 são enzimas responsáveis pelo metabolismo da clozapina.

O N-óxido de clozapina pode ser reduzido na presença de NADPH, originando novamente a clozapina. Esta interconversão é mais lenta no sentido da formação do metabolito N-óxido a partir da clozapina, do que a reação inversa [51]. Apesar da enzima responsável pela conversão do metabolito N-óxido em clozapina permanecer desconhecida, sabe-se atualmente que esta reação pode ser inibida, *in vitro*, na presença de ácido ascórbico [49].

As frações plasmáticas não ligada para a clozapina, norclozapina e N-óxido de clozapina são aproximadamente 5,5%, 9,7% e 24,6%, respetivamente [52]. O rácio clozapina:norclozapina:N-óxido de clozapina é muito variável; no entanto, no plasma ronda 3:2,5:1 e na urina cerca de 1:43:77 [52, 53]. Pelo menos 80% da dose ingerida de clozapina é eliminada sob a forma de metabolitos na urina e nas fezes [54].

Alguns estudos *in vitro* sugerem que no metabolismo da clozapina, a CYP1A2 é a principal enzima catalisadora da formação da norclozapina, enquanto que a CYP3A4 é a principal responsável pela formação do N-óxido de clozapina [49, 55, 56]. No entanto, em 1998 surgiu um estudo afirmando que a CYP3A4 parece ser a principal enzima na formação de ambos os metabolitos norclozapina e N-óxido de clozapina [57]. Adicionalmente, outras enzimas CYP e a flavina monooxigenase tipo 3 têm sido reportadas, devido ao seu contributo na metabolização da clozapina para a formação de norclozapina ou de N-óxido de clozapina [58].

A farmacocinética da clozapina é muito variável, tanto inter- como intraindividual [45, 46, 59]. Num estudo prospetivo de 26 semanas, a média do coeficiente de variação intraindividual foi 54,9%, apesar dos pacientes (n=41) não usarem outros medicamentos conhecidos que interagissem, significativamente, com a clozapina [59]. Noutro estudo, de menor duração, envolvendo 44 pacientes monitorizados semanalmente, as variações intra- e inter-paciente atingiram valores na ordem dos 27% e 50,9%, respetivamente [60].

1.3.5.1.2. Farmacodinâmica

A clozapina é um antagonista seletivo monoaminérgico, com ação em diversos recetores, incluindo os recetores dopaminérgicos, serotoninérgicos, adrenérgicos, colinérgicos e histaminérgicos [61]. Acredita-se que a elevada afinidade para os recetores serotoninérgicos 5-HT_{2A}, face ao moderado antagonismo para os recetores dopaminérgicos D₂, está fortemente relacionada com a ação terapêutica [24]. Por outro lado, o antagonismo noutros recetores com semelhante afinidade poderá explicar alguns dos efeitos adversos deste fármaco. O antagonismo nos recetores adrenérgicos α 1 poderá estar na origem da sedação, do relaxamento muscular, da taquicardia e da hipotensão, enquanto que o antagonismo no recetor muscarínico M₁₋₅ talvez possa explicar os seus efeitos anticolinérgicos [61]. Já o antagonismo nos recetores histamínicos H₁ parece estar fortemente associado à sonolência observada durante o tratamento com este fármaco [61].

Devido à capacidade da clozapina provocar agranulocitose, a utilização deste fármaco deve ser prescrito sob uma supervisão médica rigorosa. Por outro lado, a administração concomitante de fármacos que se sabe inibirem ou induzirem a atividade de algumas isoenzimas do citocromo P450 podem diminuir a eficácia do tratamento ou conduzir a efeitos indesejáveis [62].

1.3.5.2. Risperidona

A risperidona, tal como a clozapina, pertence à classe dos antipsicóticos atípicos e está indicada no tratamento da esquizofrenia, nos episódios maníacos do transtorno bipolar e nas perturbações comportamentais graves em doentes com demência cujos sintomas, podem variar desde a agressividade e perturbações da atividade motora (agitação, deambulação) até aos sintomas psicóticos proeminentes. A risperidona está igualmente indicada para o tratamento de alterações de conduta e de outras perturbações de comportamento em crianças, adolescentes e adultos subdesenvolvidos intelectualmente, indivíduos com certos comportamentos destrutivos proeminentes, como a agressividade, impulsividade e comportamentos auto-ofensivos [62, 63].

A risperidona é um derivado do benzisoxazol, cuja estrutura química compreende um anel benzeno fundido a um anel isoxazol (Figura 6). No que diz respeito às propriedades físico-químicas, a Tabela 6 resume algumas propriedades referentes a este fármaco.

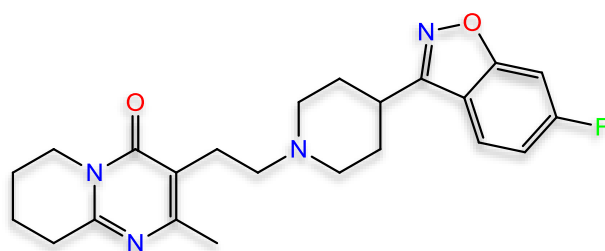


Figura 6. Estrutura química da risperidona.

Tabela 6. Propriedades físico-químicas da risperidona [44].

Propriedades Físico-Químicas	Risperidona
Nome IUPAC	4-[2-[4-(6-fluorobenzo[d]isoxazol-3-il)-1-piperidil]etil]-3-metil-2,6-diazabicyclo[4.4.0]deca-1,3-dien-5-ona
Massa molecular (g mol ⁻¹)	410,485
Fórmula molecular	C ₂₃ H ₂₇ FN ₄ O ₂
Ponto de fusão (°C)	170
Ponto de ebulição (°C)	–
Solubilidade em água (mg mL ⁻¹)	0,171
Constante de dissociação (pKa)	8,24

I.3.5.2.1. Farmacocinética

Após a administração oral, a risperidona é totalmente absorvida no trato gastrointestinal. A biodisponibilidade oral absoluta da risperidona é de, aproximadamente, 70%, e após a administração ela é rapidamente absorvida, atingindo o pico plasmático em cerca de 1 a 2 horas. O $t_{1/2}$, tanto na administração oral como na administração intravenosa, varia entre 3 e 24 horas, dependendo da atividade da CYP2D6 [47, 64]. A distribuição é menos extensa do que a da clozapina e em média apresenta valores na ordem dos 1,1 L kg⁻¹ [47]. A Tabela 7 resume os principais parâmetros farmacocinéticos da risperidona.

Tabela 7. Parâmetros farmacocinéticos da risperidona.

Parâmetro	Valor
Biodisponibilidade oral (F)	~70 %
Tempo para atingir o pico plasmático ($T_{máx}$)	1-2 h
Tempo de meia vida ($t_{1/2}$)	3-24 h
Volume de distribuição (V_D)	1,1 L kg ⁻¹
Depuração plasmática (CL)	13,7 L h ⁻¹
Fração não ligada	~10 %

A risperidona sofre um metabolismo hepático de primeira passagem, resultando na formação do metabolito ativo 9-hidroxi-risperidona e de uma série de metabolitos menos relevantes (Figura 7) [47, 64]. A risperidona e a 9-hidroxi-risperidona têm atividade semelhante e em conjunto formam a fração antipsicótica ativa [64].

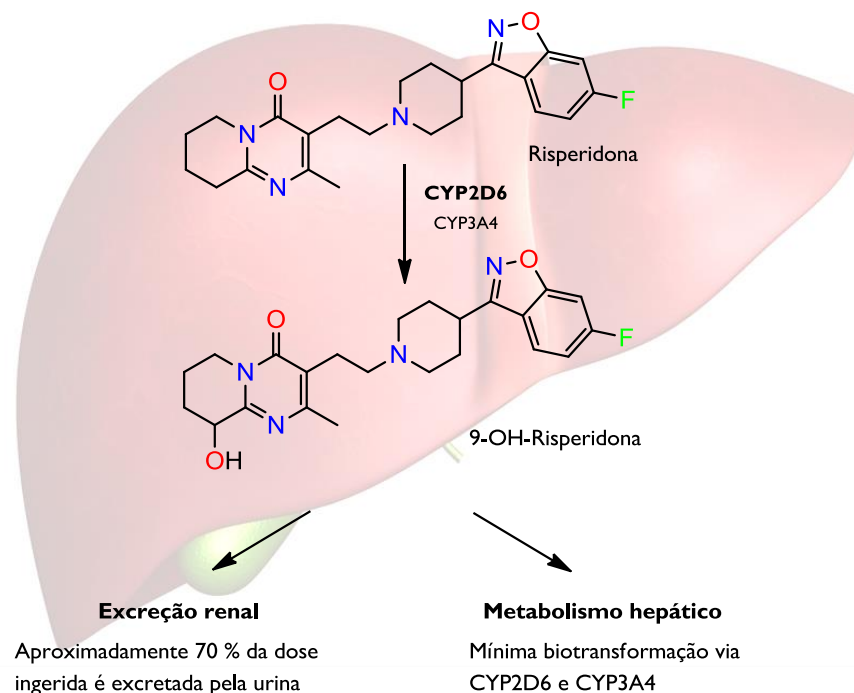


Figura 7. Metabolismo e eliminação da Risperidona e da 9-hidroxi-risperidona (adaptado de Álamo e López-Muñoz (2013) [65]). CYP2D6 and CYP3A4 são enzimas responsáveis pelo metabolismo da RISP.

A risperidona é essencialmente metabolizada pela enzima CYP2D6 e menos extensivamente pela CYP3A4. Esta biotransformação é estereosseletiva, sendo a enzima CYP2D6 a principal responsável pela (+)-9-hidroxilação, e a CYP3A4 pela (-)-9-hidroxilação [66]. A importância destas duas enzimas para o metabolismo da risperidona é apoiada pela concentração plasmática de risperidona e de 9-hidroxi-risperidona em pacientes genotipados para a CYP2D6. Por outras palavras, a enzima CYP2D6 está sujeita a polimorfismos genéticos, com grande impacto na metabolização da risperidona [67, 68].

Habitualmente referem-se 3 fenótipos de metabolização, consoante a velocidade de metabolização: os metabolizadores lentos, os metabolizadores extensivos (ou normais) e os metabolizadores ultrarrápidos [69]. Os metabolizadores extensivos da CYP2D6 convertem a risperidona rapidamente em 9-hidroxi-risperidona, enquanto que os metabolizadores lentos da CYP2D6 convertem-na muito mais lentamente. Apesar dos metabolizadores extensivos apresentarem concentrações de risperidona inferiores e concentrações de 9-hidroxi-risperidona superiores aos metabolizadores lentos, as farmacocinéticas da risperidona e da 9-hidroxi-risperidona combinadas, isto é, da fração antipsicótica ativa após dose única ou doses múltiplas, são semelhantes entre metabolizadores extensivos e lentos da CYP2D6 [62]. No caso dos metabolizadores ultrarrápidos, a concentração de risperidona é bastante baixa e, muitas vezes, a concentração de 9-hidroxi-risperidona é inferior ao esperado, o que em alguns pacientes pode explicar a ausência de resposta para o fármaco [70].

No que diz respeito à taxa de ligação às proteínas plasmáticas, estas atingem valores na ordem dos 90% para a risperidona e 77% para a 9-hidroxi-risperidona. Relativamente à depuração plasmática, nos metabolizadores extensivos da CYP2D6 os valores rondam os 5,0 L h⁻¹ para a fração antipsicótica ativa e os 13,7 L h⁻¹ para a risperidona, enquanto que, nos metabolizadores lentos da CYP2D6 os valores são aproximadamente 3,2 e 3,3 L h⁻¹, respetivamente [62].

No que se refere à eliminação, cerca de 70% da dose ingerida de risperidona é excretada pela urina, enquanto que aproximadamente 14% é eliminada nas fezes [62]. Na urina, a risperidona e a 9-hidroxi-risperidona representam 35-45% da dose, sendo a percentagem restante constituída por metabolitos inativos [62].

1.3.5.2.2. Farmacodinâmica

A risperidona é um antagonista seletivo monoaminérgico com ação em diversos recetores, incluindo os recetores dopaminérgicos, serotoninérgicos, adrenérgicos e histaminérgicos. Contrariamente à clozapina, a risperidona não possui nenhuma afinidade para os recetores colinérgicos [62]. Embora a risperidona seja um potente antagonista dos recetores D₂, ao que se atribui a melhoria dos sintomas positivos da esquizofrenia, ela causa menos depressão da atividade motora e indução de catalepsia do que os neurolépticos convencionais [62]. Adicionalmente, o

equilíbrio no antagonismo da serotonina e dopamina a nível central permite alargar a atividade terapêutica deste fármaco aos sintomas negativos e afetivos da esquizofrenia, bem como reduzir a possibilidade de aparecimento de efeitos extrapiramidais [62].

Em geral, a risperidona é bem tolerada e os efeitos secundários muitas vezes são difíceis de distinguir dos sintomas da doença. Na esquizofrenia, a risperidona mostra eficácia para ambos os sintomas positivos e negativos e é melhor que o haloperidol na prevenção de recaídas [71]. Apresenta poucos efeitos colaterais, quando comparada com o haloperidol, mas mais do que a clozapina [71, 72]. Com uma incidência de 5% ou mais, este fármaco apresenta alguns efeitos adversos que incluem a sonolência, agitação e hiperkinésia [71]. A risperidona está menos associada ao aumento de peso do que a clozapina ou a olanzapina, mas mais do que o haloperidol, quetiapina ou ziprasidona [71]. Por outro lado, a risperidona eleva a concentração de prolactina no plasma, mais que o haloperidol, clozapina ou olanzapina [73, 74]. A sua resposta à prolactina correlaciona-se com a concentração plasmática da fração ativa [75].

A dose oral diária recomendada no caso da doença esquizofrénica é habitualmente entre 2 e 6 mg. Doses superiores a 10 mg/dia não demonstraram eficácia adicional em relação a doses mais baixas e podem provocar mais sintomas extrapiramidais [62].

1.4. Importância clínica e médico-legal do estudo dos antipsicóticos

Um dos instrumentos mais valiosos de que se dispõe atualmente para assegurar a máxima eficácia terapêutica com a mínima incidência de efeitos adversos, em casos de tratamentos prolongados, é a monitorização terapêutica [76, 77]. Num ambiente clínico, a monitorização terapêutica de fármacos permite otimizar a eficácia do tratamento farmacológico, conseguindo-se, simultaneamente, uma melhor relação do custo-benefício associado à intervenção medicamentosa e uma melhoria da qualidade de vida do doente [77]. Justifica-se a sua aplicação a fármacos com margem terapêutica estreita, fármacos com elevada variabilidade farmacocinética e em grupos de doentes com características farmacocinéticas particulares (e.g. insuficientes renais) [77].

No caso específico dos antipsicóticos, a monitorização terapêutica é uma ferramenta particularmente útil, uma vez que pode ser usada para avaliar a adesão à terapêutica, identificar variações no metabolismo (relacionadas com polimorfismos genéticos) ou para investigar potenciais interações farmacológicas [77, 78]. Adicionalmente, a individualização posológica e a otimização do tratamento farmacológico mantém a concentração dos fármacos dentro do intervalo terapêutico recomendado, com a mínima incidência de efeitos adversos [4]. Por outro lado, a ausência de um antipsicótico prescrito, pode indicar um incumprimento resultando, em última análise, num estado mental alterado e num risco de morte súbita [4, 35].

No âmbito da medicina-legal, envolvendo a análise *post mortem*, a determinação de antipsicóticos é igualmente fundamental, de forma a descobrir se estes fármacos tiveram um papel

importante na morte do indivíduo. Neste sentido, a toxicologia forense assume um especial destaque, uma vez que esta possibilita a identificação e quantificação de determinada substância química, de forma a deliberar se a quantidade encontrada da mesma é compatível com a conclusão de morte por intoxicação, ou se se adequa mais a concentrações terapêuticas, subjacentes às características patológicas do caso em estudo [77]. Por outro lado, nos casos forenses, a ausência de um antipsicótico devido a um incumprimento, pode ser igualmente relevante sobretudo nos casos onde os distúrbios de comportamento levam a um homicídio [4, 35].

No entanto, quer em contexto clínico quer em contexto forense, a qualidade analítica e a fiabilidade dos resultados emitidos depende de vários fatores, destacando-se o tipo de amostra utilizada, a instrumentação analítica disponível, a validação das metodologias analíticas e o conhecimento prévio das características farmacocinéticas dos fármacos, bem como a definição das janelas terapêuticas. Por outro lado, devido à extensa metabolização dos fármacos, a concentração destas substâncias e dos respetivos metabolitos em amostras biológicas é muito baixa o que pode complicar a sua deteção, pelo que os serviços clínicos e toxicológicos necessitam constantemente desenvolver novas metodologias analíticas, muitas vezes baseados em combinações inovadoras de instrumentação moderna e matrizes biológicas alternativas.

Capítulo 2

Determinação de Antipsicóticos
em Matrizes Biológicas

2.1. Amostras biológicas

Atualmente, são diversas as matrizes biológicas que podem ser analisadas em toxicologia clínica e forense, de forma a detetar e quantificar substâncias exógenas, tais como tóxicos, medicamentos, entre outras. [79]. No entanto, nem todas as amostras são indicadas para análise, cabendo ao toxicologista selecionar dentre as amostras disponíveis a(s) mais adequada(s) para a análise, tendo em conta a especificidade do caso e o tipo de análise pretendida. Por outro lado, o conhecimento prévio da natureza da substância é uma mais-valia, dado que permite ao toxicologista selecionar a amostra que melhor represente a biodisponibilidade, a eliminação ou o efeito do agente tóxico ou farmacológico no organismo, bem como direcionar a análise para a determinação do agente precursor (substância inalterada) e/ou dos seus produtos de biotransformação (metabolitos).

No que diz respeito às matrizes biológicas propriamente ditas, os fluidos biológicos assumem um papel fundamental na determinação de fármacos. Quando se pretende relacionar a concentração do fármaco com os efeitos farmacológicos, o sangue é indiscutivelmente a matriz de eleição. Além disso, e visto que as células sanguíneas podem ser facilmente separadas dos componentes líquidos, o plasma e o soro são frequentemente utilizados na monitorização terapêutica, uma vez que o efeito de matriz é verdadeiramente inferior ao da matriz original. Por outro lado, nos casos *post mortem*, a lise celular e outros fenómenos de decomposição impedem, na maioria das vezes, a obtenção de plasma, sendo habitualmente utilizado o sangue total para análise [4]. A preferência por esta matriz deve-se à sua extensa distribuição pelo corpo, de tal forma que as substâncias presentes nesta matriz podem exercer a sua ação sobre uma vasta gama de órgãos. Apesar de ser fácil a sua obtenção, não deixa de ser invasiva, tornando-se desconfortável para os pacientes.

A urina é outra matriz biológica extensamente utilizada em análises toxicológicas sendo considerada a matriz de eleição para o *screening* toxicológico. A facilidade de colheita, o volume disponível e a presença de um elevado número de produtos provenientes das vias metabólicas são alguns dos fatores que tornam esta matriz tão atrativa. Além disso, as concentrações dos fármacos e/ou dos metabolitos na urina são relativamente mais elevadas e podem permanecer por muito mais tempo, quando comparada com outras matrizes biológicas. Por outro lado, e devido à filtração renal, a urina apresenta um baixo teor proteico e lipídico, tornando-se uma matriz menos complexa do que o plasma ou o soro, permitindo a realização de uma grande variedade de ensaios preliminares e a sua fácil aplicação em diversas técnicas extrativas [80, 81].

Relativamente às matrizes menos convencionais, como o cabelo, a saliva e o suor, estas têm-se destacado nos últimos anos, na análise toxicológica complementar de fármacos e outras substâncias [82]. No entanto, por se tratarem de matrizes um pouco complexas e apresentarem

menor concentração dos fármacos, a sua análise implica procedimentos de pré-tratamento muito laboriosos [83].

2.2. Métodos de preparação de amostras biológicas para separação cromatográfica

A análise de fármacos e outras substâncias químicas em amostras biológicas por técnicas cromatográficas requer, em geral, um prévio tratamento da amostra por diversas razões, salientando-se a complexidade das matrizes envolvidas, a sua incompatibilidade com os sistemas cromatográficos e o facto de muitos dos compostos a analisar se encontrarem em concentrações vestigiais [84, 85]. Apesar do pré-tratamento da amostra ser a parte mais laboriosa do procedimento analítico, podendo atingir até cerca de 80 % do tempo total de análise, este é considerado um ponto crucial nas análises clínicas e toxicológicas, pois é nesta fase que se procede ao isolamento e recuperação do analito, tornando-o numa forma mais adequada para análise instrumental [86, 87].

Atualmente, existe um grande número de técnicas de preparação da amostra disponíveis que, do ponto de vista histórico e da frequência de utilização, podem ser divididas em dois grupos principais: (1) as técnicas de preparação de amostra convencionais que, simultaneamente, são as técnicas mais utilizadas em análises de rotina e que podem incluir a precipitação de proteínas (PP), a extração líquido-líquido (LLE) e a extração em fase sólida (SPE); (2) e o segundo grupo, que corresponde às técnicas de preparação de amostra desenvolvidas mais recentemente que visam resolver algumas desvantagens das técnicas convencionais, tais como o elevado consumo de solventes, a quantidade de amostra necessária para análise e a baixa seletividade [88, 89].

No que diz respeito à extração de antipsicóticos em matrizes biológicas, as técnicas de preparação de amostra habitualmente utilizadas são a LLE, SPE, PP e a injeção direta sem tratamento prévio da amostra [35, 90]. No entanto, outras técnicas como a microextração em fase sólida (SPME) [91, 92] e, mais recentemente, o QuEChERS (*quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*) [93] e a microextração por sorvente empacotado (MEPS) [94, 95] têm sido aplicadas com sucesso na extração destes fármacos, em matrizes biológicas.

Neste capítulo, iremos abordar mais aprofundadamente as diferentes técnicas de preparação de amostra utilizadas na extração de antipsicóticos em amostras biológicas.

2.2.1. Precipitação de Proteínas (PP)

A remoção de proteínas por desnaturação ou precipitação é um procedimento muitas vezes necessário, principalmente em amostras de sangue ou plasma. O teor destes compostos em fluidos e tecidos biológicos é considerável, sendo a sua remoção essencial quando se trata de análises cromatográficas.

As proteínas são polímeros de aminoácidos unidos por ligações covalentes, cujo tipo e sequência em que se encontram conduzem ao enrolamento da cadeia polipeptídica, levando a uma conformação tridimensional específica, que é indispensável para a sua função biológica [96]. Qualquer condição que altere a sua conformação nativa, de forma temporária ou permanente, pode levar à perda da sua função, dizendo-se que a proteína sofreu desnaturação.

A perda de solubilidade em água é uma consequência física frequente da desnaturação proteica. Esta diminuição da solubilidade varia de proteína para proteína e depende de diversos fatores, entre os quais se destacam a temperatura, o pH, a força iônica e a constante dielétrica do solvente.

Quando se trata de analisar matrizes biológicas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), a solubilidade das proteínas é considerada um fator crítico. O uso de solventes orgânicos pode levar à desnaturação das proteínas e consequente precipitação, o que pode causar imensos problemas, como a obstrução e a rápida deterioração da coluna e, consequente, perda de eficiência cromatográfica. Para evitar estes inconvenientes, recorre-se, frequentemente, à remoção das proteínas por precipitação, antes da análise cromatográfica.

Em virtude da sua simplicidade, esta técnica de extração é amplamente utilizada na determinação de fármacos em fluidos biológicos por cromatografia líquida [97, 98]. Particularmente na análise de antipsicóticos, a PP é frequentemente induzida com solventes orgânicos, sendo o acetonitrilo o solvente mais utilizado [99-103]. Por vezes esta precipitação é efetuada com o auxílio de uma solução de sulfato de zinco em acetonitrilo ou metanol [104, 105], ou pela mistura de um solvente orgânico com um ácido [98]. Por outro lado, quando se trata de analisar matrizes de maior complexidade, a PP é usada em conjunto com outras técnicas de preparação de amostra. Neste sentido, Stevens *et al.* (2010) [106] usaram uma solução de 6% de ácido perclórico para induzir a PP no plasma, seguindo-se uma etapa de SPE, para a determinação da remoxiprida em amostras biológicas. Sampedro *et al.* (2012) [107] usaram uma abordagem semelhante na determinação de 17 antipsicóticos em tecido cerebral. Contudo, em vez de uma solução de ácido perclórico, os autores usaram uma solução de acetonitrilo com ácido fórmico como agente precipitante, seguindo uma etapa de SPE.

Apesar da PP ser uma técnica relativamente rápida e económica face a outras técnicas de preparação de amostra, a grande desvantagem desta técnica prende-se com a sua baixa seletividade [108].

2.2.2. Extração Líquido-Líquido (LLE)

A LLE, também conhecida como extração por solventes, é uma técnica separativa que envolve a distribuição de uma ou mais substâncias entre duas fases líquidas imiscíveis. Na maior parte dos casos, uma das fases líquidas é aquosa (solução/suspensão da substância a extrair) e

outra é um solvente orgânico imiscível (solvente extrator). A base do processo de extração é estabelecida pela lei de distribuição de Nernst, que considera que uma substância é distribuída entre duas fases líquidas imiscíveis, dependendo da sua solubilidade em cada uma delas [109]. Deste modo, o conceito “igual dissolve igual” adequa-se perfeitamente à LLE – os compostos hidrofílicos (maior polaridade) terão maior afinidade com a fase aquosa (polar), enquanto que os compostos hidrofóbicos (baixa polaridade) terão maior afinidade para a fase orgânica (apolar) [90, 110].

Quando se atinge o equilíbrio, a razão da concentração da substância nas duas fases é constante para uma determinada temperatura e sistema de solventes. A esta constante dá-se o nome de coeficiente de distribuição ou constante de distribuição (equação 1).

$$K_d = C_{org}/C_{aq} \quad (\text{equação 1})$$

onde K_d é o coeficiente de distribuição, C_{org} é a concentração do analito na fase orgânica e C_{aq} a concentração do mesmo composto na fase aquosa.

O valor do coeficiente de distribuição entre as duas fases é um indicador da afinidade do soluto pelo solvente de extração. Quando $K_d > 1$, então a substância é mais solúvel no solvente extrator do que no líquido em que está dissolvido ou suspenso, sendo, portanto, a extração eficaz e fácil de realizar [109]. Quando o valor de K_d é muito baixo, este poderá ser aumentado quer pela substituição do solvente extrator, quer pelo ajuste do pH, para impedir a ionização de compostos ácidos ou básicos, ou pela adição de sais neutros, de modo a diminuir a solubilidade dos compostos orgânicos na fase aquosa, proporcionando a ocorrência do fenómeno designado de “salting out” [110].

No que se refere à escolha do solvente de extração, este é provavelmente o passo crucial na LLE, visto que este deverá apresentar algumas “caraterísticas chave”, destacando-se, a imiscibilidade com a fase líquida onde o analito se encontra dissolvido, a boa capacidade de dissolução da substância de interesse ($K_d > 1$), a inércia química e o baixo ponto de ebulição para facilitar a recuperação do soluto [109, 110].

Posto isto, é de salientar que a eficiência de extração dependerá de diversos fatores, tais como, a afinidade do soluto pelo solvente de extração, a razão das fases (K_d) e o número de extrações [109].

Apesar da LLE ser uma técnica de extração relativamente simples e apresentar algumas vantagens como a disponibilidade de um grande número de solventes orgânicos, os quais fornecem uma ampla faixa de solubilidade e seletividade, esta técnica possui também certas limitações, que incluem volumes relativamente elevados de amostra e solventes, o uso de solventes orgânicos tóxicos, a possibilidade de formação de emulsões entre as fases resultando num aumento do

tempo de análise, possibilidade de contaminação e a perda dos analitos durante o processo de extração, bem como as dificuldades na automatização do processo extrativo [85].

Embora esta técnica apresente algumas desvantagens, a LLE é particularmente útil na extração de antipsicóticos em matrizes biológicas [90, 111]. Dado que os antipsicóticos são compostos lipofílicos, normalmente antes da extração com solvente orgânico, as amostras biológicas são ajustadas para um determinado valor de pH. Adicionalmente, são usadas soluções tampão, visto que o elevado teor de sais diminui a solubilidade destes fármacos na matriz biológica, forçando, em parte, a sua transferência para a fase orgânica. Saar *et al.* [112] avaliaram, sistematicamente, 9 combinações de solventes de extração e soluções tampão de modo a encontrar o método LLE mais adequado para a extração de 19 antipsicóticos em amostras de sangue. De acordo com estes autores, os melhores resultados em termos de eficiência de extração foram conseguidos usando a solução tampão de trizamina e o solvente de extração 1-clorobutano, sendo posteriormente comparado com um método padrão de SPE. Contudo, durante a comparação dos métodos, a obstrução dos cartuchos de SPE foram um problema frequente, especialmente quando se tratava de amostras de sangue *post mortem*. Nirogi *et al.* [113] aplicaram uma abordagem semelhante na determinação da olanzapina em amostras de plasma, comparando 6 solventes de extração e as suas combinações. Contudo, a mistura éter dietílico/diclorometano (7:3, v/v) proporcionou a melhor eficiência de extração.

Uma análise mais aprofundada da literatura revela que são inúmeros os trabalhos que recorrem à LLE para extrair os antipsicóticos de matrizes biológicas. Tais estudos mostram que os solventes orgânicos frequentemente utilizados na extração destes fármacos em matrizes biológicas incluem o acetato de etilo [114, 115], o éter dietílico [116, 117], o éter di-isopropílico [118, 119], o éter metil-terc-butílico [120-123], o acetonitrilo [124], o benzeno [125], e o 1-clorobutano [126]. No entanto, outros trabalhos utilizam uma mistura destes solventes (e.g. diclorometano/pentano [127, 128], hexano/álcool isoamílico [129, 130], etc.), de modo a obter a maior eficiência de extração.

Apesar da eficácia da LLE na extração destes fármacos em matrizes biológicas, vários métodos alternativos têm sido desenvolvidos, destacando-se entre eles a SPE, a SPME, a MEPS e o QuEChERS, como apresentado mais adiante.

2.2.3. Extração em Fase Sólida (SPE)

A SPE é uma técnica de separação sólido-líquido que tem por base o funcionamento da cromatografia líquida clássica [131]. Desde a sua introdução no mercado, no final dos anos 70, a SPE, tornou-se numa das ferramentas mais poderosas e mais utilizadas, cujo objetivo principal é a extração e/ou pré-concentração de analitos presentes em matrizes complexas [85]. A base do processo de extração assemelha-se à LLE, envolvendo a partição dos analitos entre duas fases.

Contudo, em vez de duas fases líquidas imiscíveis como na LLE, a SPE envolve a partição dos analitos entre uma fase líquida (matriz) e uma fase sólida (sorvente) [132].

Os mecanismos de retenção e eluição dos analitos pela fase sólida são análogos aos envolvidos na cromatografia líquida, onde as forças intermoleculares assumem especial relevância. Dependendo das características da fase sólida e da natureza da amostra, a SPE pode ser dividida em 4 categorias de acordo com o mecanismo de extração: fase reversa, fase normal, troca iônica e a exclusão molecular [133].

O modo de separação em fase reversa é, sem dúvida, o mais utilizado na SPE, onde os analitos são separados com base na sua polaridade. Este tipo de extração envolve uma matriz polar ou moderadamente polar (geralmente aquosa) e uma fase sólida apolar ou hidrofóbica, como por exemplo, a sílica funcionalizada com os grupos octil (C_8) ou octadecil (C_{18}) [109]. As interações hidrofóbicas que se estabelecem entre os analitos, com características apolares, e a fase estacionária ocorrem por intermédio de forças de dispersão ou de *van der Waals* [134]. Os solventes de eluição são, em regra, apolares, podendo também ser utilizados solventes polares como o metanol ou acetonitrilo [133].

Contrariamente à SPE de fase reversa, a fase normal aplica-se fundamentalmente à análise de compostos polares. Neste tipo de extração, os analitos que se encontram dissolvidos ou suspensos numa matriz não polar (ou pouco polar), são retidos após passarem por uma fase sólida polar, como a alumina, o florissil, alguns tipos de sílica gel, o cianopropilsilano, o aminopropilsilano, entre outras [132, 133]. A retenção do analito em condições de fase normal deve-se essencialmente às interações hidrofílicas, destacando-se as pontes de hidrogénio e as interações dipolo-dipolo [109]. A eluição, por sua vez, é efetuada com solventes polares que permitem a quebra das ligações entre o grupo funcional do analito e a superfície da fase estacionária.

Relativamente à SPE de troca iônica, as partículas sólidas do adsorvente contêm grupos funcionais de troca aniônica ou catiônica, responsáveis pelas interações eletrostáticas que ocorrem entre os compostos iônicos, ou suscetíveis de ionização, da amostra e a fase estacionária com grupos funcionais de carga oposta [134, 135]. Para que uma substância seja retida em condições de troca iônica, o pH da amostra deve ser ajustado de forma a que o analito e os grupos funcionais ligados ao sorvente estejam ionizados [109]. Por outro lado, uma solução de pH, capaz de neutralizar tanto os grupos funcionais do analito como os da superfície do sorvente é utilizada na eluição do analito. Quando uma destas funções é neutralizada, as forças eletrostáticas responsáveis pela interação analito-sorvente são quebradas e a substância é eluída.

No que diz respeito à SPE por exclusão molecular, apesar de ser o mecanismo menos utilizado em toxicologia, a separação ocorre em função das dimensões do analito, do tamanho dos poros da fase sólida e na capacidade das suas moléculas penetrarem nos poros [134]. Em geral, esta técnica é usada em conjunção com fases estacionárias de fase reversa e de troca iônica [133].

2.2.3.1. Etapas envolvidas na SPE

Embora a SPE exija por vezes um procedimento laborioso, o processo de extração pode ser dividido em 4 fases, destacando-se o condicionamento da fase sólida (ativação do sorvente), a adsorção do analito no sorvente, a lavagem da fase estacionária (eliminação de interferentes) e a recuperação dos analitos por eluição. Em certas situações, outras duas etapas adicionais, nomeadamente a concentração e a rediluição da amostra, são necessárias antes da análise instrumental propriamente dita. A Figura 8 ilustra as principais etapas envolvidas na SPE.

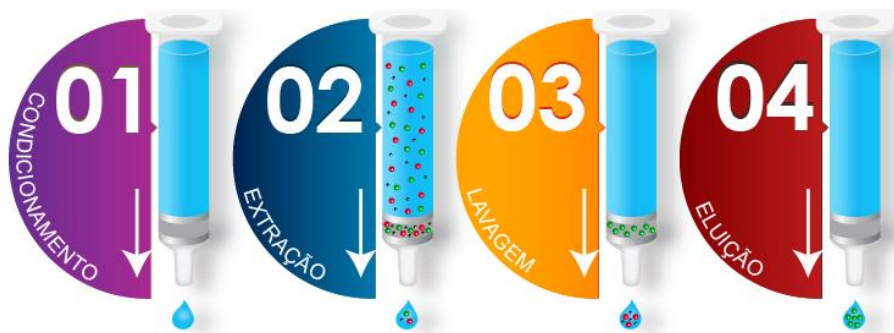


Figura 8. Representação esquemática das 4 etapas genéricas associadas à SPE.

Numa primeira etapa, a fase sólida é condicionada com um solvente adequado, o qual tem por objetivo solvatar os grupos funcionais da fase estacionária, assegurando, deste modo, que a matriz interage com o sorvente [134]. Esta etapa é crítica quando se realiza SPE de fase reversa. Para extrair substâncias hidrofóbicas de um meio aquoso é necessário haver contacto entre a fase sólida apolar e a amostra polar. Sem este tratamento prévio, a amostra polar passa por pequenos canais gerados no sorvente, sem efetuar o contacto necessário para ocorrer a extração [136]. Deste modo, o uso de um solvente intermediário, como por exemplo o metanol, permitirá uma melhor superfície de contacto entre as fases, levando a uma melhor eficiência extrativa.

Numa segunda etapa, a amostra líquida é transferida para a coluna de SPE. A passagem da amostra pelo sorvente resulta na retenção dos analitos, concentrando-os no suporte sólido, enquanto outros componentes da amostra são eluídos. Esta estratégia é usada, especialmente quando o analito está presente em baixas concentrações, ou quando a matriz contém múltiplos componentes de diferentes polaridades [109]. O processo inverso, isto é, a retenção de outros compostos da amostra enquanto que o analito de interesse é eluído, pode também ser utilizado como forma de limpar a amostra (*clean up*) antes da análise [137]. Esta estratégia é particularmente usada quando o analito está em altas concentrações [109]. Em ambos os casos, o controlo do pH ou da força iónica da amostra são uma mais-valia, para uma retenção mais efetiva do(s) analito(s)/interferentes no enchimento selecionado. Além disso, durante a passagem da amostra, a velocidade do fluxo deve ser controlada, visto que a mesma pode influenciar o fenómeno de retenção associado [87].

A lavagem da coluna é a etapa seguinte e tem como objetivo a remoção seletiva dos interferentes da matriz que ficaram retidos no sorvente no passo anterior, sem que haja a remoção dos compostos de interesse. Nesta etapa, faz-se passar um solvente adequado para as amostras analisadas, através dos espaços intersticiais do suporte sólido. Habitualmente é utilizado água, soluções tampão, bem como solventes orgânicos diluídos na solução de lavagem, de modo a eliminar os interferentes mais hidrofóbicos [134].

Para finalizar o processo de SPE, os analitos adsorvidos são removidos da fase sólida por intermédio de um solvente orgânico ou mistura de solventes adequados. O solvente de eluição deverá ser capaz de quebrar as interações analito-fase estacionária e recuperar os analitos no menor volume possível. Além disso, o solvente deverá ser compatível com os métodos analíticos a utilizar.

2.2.3.2. Extração de antipsicóticos por SPE

Atualmente, a SPE é a técnica mais utilizada para a análise de fármacos em fluidos biológicos, devido às amplas vantagens que esta técnica oferece, como a retenção seletiva dos analitos, redução do volume de solventes orgânicos face à LLE, obtenção de extratos mais limpos e a facilidade de automatização [4, 138]. Uma breve revisão bibliográfica acerca da extração de antipsicóticos em fluidos biológicos revela-nos que os mecanismos de retenção em fase reversa e de troca iônica são os modos de extração habitualmente utilizados. Niederländer *et al.* (2006) [139] usaram com sucesso, a SPE de fase reversa (Hysphere C18 HD SPE) para a monitorização terapêutica da clozapina e dos seus principais metabolitos em amostras de soro. Após alguns testes efetuados com uma fase sólida de cianopropil, como sugerido por outros autores [140, 141], Niederländer *et al.* [139] concluíram rapidamente que não seria possível obter a recuperação dos analitos desejada, independentemente do valor de pH da amostra e das soluções de lavagem. Por outro lado, o desempenho satisfatório da fase estacionária Hysphere C₁₈ HD SPE forneceu uma adequada seletividade para separar a clozapina e os seus metabolitos dos componentes mais polares da matriz. As percentagens de recuperação alcançadas com esta metodologia rondaram os 84 % para a N-óxido de clozapina, 90 % para a clozapina e 96 % para a norclozapina.

Da mesma forma que o estudo anterior, alguns trabalhos foram publicados posteriormente, usando a fase reversa como base do processo extrativo. Mercolini *et al.* (2007) [142] usaram a SPE de fase reversa (Varian BondElut C₁) na determinação simultânea da clozapina, da levopromazina, e dos seus principais metabolitos em plasma humano, enquanto que, Torres *et al.* (2011) [143] usaram um sorvente polimérico (Waters OASIS® HLB) no estudo da farmacocinética da risperidona. Ambos os autores obtiveram bons resultados, atingindo percentagens de recuperação acima dos 89 %.

Por outro lado, a presença de grupos funcionais suscetíveis de ionização na estrutura química dos antipsicóticos permitiu a extração destes compostos, não só através das interações hidrofóbicas, como também através das interações eletrostáticas. Neste sentido, De Meulder *et al.* (2008) [144] e Locatelli *et al.* (2009) [145] usaram sorventes poliméricos funcionalizados com grupos de troca catiónica (Varian Bond Elute Certify SPE e Strata-X-CW, respetivamente) para a extração da risperidona e dos enantiómeros da 9-hidroxi-risperidona em amostras de plasma e urina. A combinação de grupos apolares e de troca catiónica resultaram numa retenção mais efetiva destes analitos na fase estacionária, permitindo uma recuperação de 100,4 % no plasma e de 100,9 % na urina.

Contudo, e apesar das vantagens que esta técnica disponibiliza, a SPE ainda é uma técnica relativamente dispendiosa [146], além de apresentar alguns problemas técnicos, como a obstrução dos cartuchos, quando se trata de matrizes mais complexas como o sangue total *post mortem* [4, 112].

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

O QuEChERS é uma técnica de preparação de amostras relativamente recente, que se tornou muito popular na análise de resíduos de pesticidas em alimentos e produtos agrícolas, devido à sua simplicidade e rapidez, tornando o processo de extração pouco dispendioso, comparativamente aos métodos clássicos [147, 148].

Genericamente, o processo de extração é dividido em duas etapas: a extração líquido-líquido assistida por *salting out* (SALLE) e o *clean up* do extrato orgânico, utilizando a extração em fase sólida dispersiva (d-SPE). Numa primeira etapa, as amostras são extraídas com um solvente orgânico, geralmente miscível com água (e.g. acetonitrilo), na presença de grandes quantidades de sais (e.g. cloreto de sódio e o sulfato de magnésio), e/ou agentes tamponantes (e.g. citrato de sódio), para induzir a separação da fase líquida e estabilizar os analitos ácidos ou básicos [149]. A adição de sais, nesta etapa, promove o efeito de *salting out*, que se baseia na diminuição da solubilidade dos compostos na fase aquosa por adição de um sal, obrigando-os a migrarem para a fase orgânica, proporcionando melhores percentagens de recuperação dos analitos.

Após a agitação e centrifugação, uma alíquota de fase orgânica é submetida a um *clean up* adicional utilizando a dSPE. Contrariamente aos métodos tradicionais que utilizam cartuchos de SPE, a dSPE é efetuada num tubo *clean up* que permite, de forma rápida e simultânea, a remoção de interferências e a redução da água residual. A componente dispersiva permite a distribuição dos sais para que se difundam ao longo de toda a amostra para uma extração mais completa [150]. Após uma centrifugação o sobrenadante está pronto para análise.

Nos últimos anos, algumas modificações na metodologia original proposta por Anastassiades *et al.* (2003) [147] foram sendo efetuadas, permitindo a sua aplicação numa grande

variedade de analitos e matrizes. Atualmente, são diversos os estudos que reportam a análise de fármacos com recurso ao método QuEChERS em matrizes biológicas [150, 151]. Plöss *et al.* (2006) [151] desenvolveram uma metodologia para a extração simultânea de 41 fármacos e toxinas no sangue total. Mais recentemente, Westland e Dorman (2013) [150] descreveram uma metodologia alternativa baseada no QuEChERS, para a extração benzodiazepinas, a partir de amostras de sangue e urina.

No que diz respeito à extração de antipsicóticos a partir de matrizes biológicas por QuEChERS, são poucos os trabalhos encontrados na literatura. Usui *et al.* (2012) [93] aplicaram, com sucesso, o método QuEChERS modificado na extração de mais de 90 compostos com importância na área forense, incluindo diversas classes de fármacos, como por exemplo os antipsicóticos e os antidepressivos, e alguns tóxicos em amostras de sangue. Neste trabalho, a extração foi efetuada usando apenas 0,5 mL de amostra diluída com água destilada. Após a extração dos analitos com acetonitrilo, na presença de sulfato de magnésio e acetato de sódio, seguiu-se uma etapa de purificação por dSPE. Nesta etapa, a fase orgânica obtida no passo anterior foi transferida para um tubo de centrífuga contendo uma mistura de sorventes (amina primária-secundária e C_{18}) para a remoção das interferências, e um agente secante (sulfato de magnésio) para a redução da água residual. Após agitação e centrifugação, o sobrenadante foi injetado num sistema de cromatografia líquida. Para a maioria dos compostos foram obtidas boas percentagens de recuperação, com exceção dos compostos aconina, mesaconina e hipaconina. Relativamente ao efeito de matriz dos analitos estudados, os autores observaram variações entre 80% e 116%, indicando que a maioria dos analitos é ligeiramente influenciada pela matriz do extrato de sangue. Após a validação, o método foi aplicado, com sucesso, a um caso de fatal, onde foi confirmada a sua capacidade de extrair facilmente vários tipos de compostos e metabolitos em amostras de sangue.

Apesar da sua versatilidade, o QuEChERS tem como principais limitações os volumes de amostra e solventes requeridos, bem como a quantidade de resíduos originados.

2.2.5. Microextração em fase sólida (SPME)

A SPME é uma técnica de preparação de amostras singular, que tem por base a extração sortiva. Desde o seu desenvolvimento no início dos anos 90, por Janusz Pawliszyn [152], que esta técnica se tem revelado muito promissora e integra-se justamente no conceito de "química verde" [87]. Preservando todas as vantagens da SPE, tais como a simplicidade, fácil automatização, e, adicionalmente, a facilidade de amostragem em campo e redução do uso de solventes [109], a SPME tem sido extensamente investigada como uma alternativa simples, versátil e de baixo custo para a preparação de amostras para análises cromatográficas [153].

Na SPME, os analitos são retidos numa fibra de sílica fundida, recoberta com uma camada fina de sorvente (Figura 9). Dependendo da natureza do revestimento, os analitos presentes na amostra são absorvidos ou adsorvidos. Tal como na SPE, a escolha apropriada do revestimento da fibra (sorvente) é crucial para a eficácia do método analítico, pois o tipo de fibra utilizado afeta a seletividade da extração [154, 155].

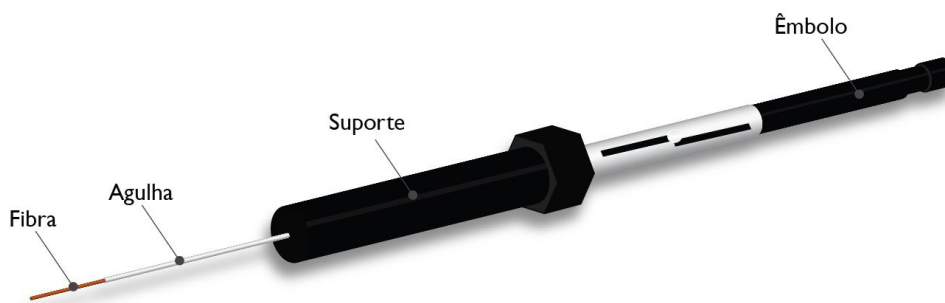


Figura 9. Dispositivo de SPME.

Em traços gerais, esta técnica de extração e pré-concentração compreende duas etapas: a partição dos analitos entre a fibra e a matriz, seguido de dessorção dos analitos num sistema cromatográfico. Na primeira etapa, a fibra é exposta diretamente na amostra ou no *headspace* (fase vapor em contacto com a amostra que se encontra num recipiente fechado), o que causa uma partição dos analitos da amostra para a fibra. A seleção do modo de extração deverá ser baseada na composição da amostra e na volatilidade do analito. Na SPME por imersão direta (DI-SPME), a fibra é posta diretamente em contacto com a amostra e os analitos distribuem-se entre a matriz e a fase extrativa. Este modo é idealmente usado para extrair analitos pouco voláteis, a partir de matrizes pouco “sujas” [156]. Relativamente à SPME por *headspace* (HS-SPME), os analitos necessitam de ser volatilizados antes de serem adsorvidos/absorvidos pelo revestimento da fibra, visto que a extração ocorre na fase de vapor. Este modo de extração é mais seletivo que a imersão direta, evitando interferências pouco voláteis e substâncias de elevado peso molecular (e.g. proteínas), eventualmente presentes na matriz [157]. Adicionalmente, o modo *headspace* permite a modificação da amostra, como por exemplo o ajustamento do pH, sem danificar a fibra, prolongando, assim, o seu tempo de vida médio [156, 157]. Similarmente à DI-SPME encontra-se a extração por membrana, diferindo apenas no facto da fibra se encontrar protegida por uma membrana semipermeável. Este tipo de extração está indicado para matrizes muito “sujas”, nos casos em que a extração por *headspace* não é possível (e.g. analitos pouco voláteis) [156, 157]. Por outro lado, uma membrana feita de material apropriado (e.g. polietilenoglicol e polidimetilsiloxano [158]) pode proporcionar um certo grau de seletividade ao processo extrativo [156]. O processo de extração nesta forma é substancialmente mais lento do que na imersão direta, uma vez que os analitos têm que se difundir na membrana antes de chegar ao revestimento

da fibra [159]. Na Figura 10 estão representados, esquematicamente, os modos de extração habitualmente usados por SPME.

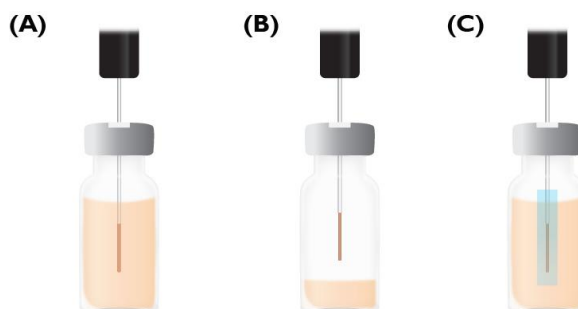


Figura 10. Representação esquemática dos modos de SPME (a) por imersão direta (DI-SPME) (b) por headspace (HS-SPME) (c) por membrana (M-SPME).

São diversos os fatores que influenciam a eficiência de extração, entre os quais se destacam o tipo de fibra, a temperatura e o tempo de extração, a agitação da amostra, a força iônica do meio e o pH da amostra.

Usualmente, o processo considera-se terminado quando a concentração dos analitos atinge o equilíbrio de distribuição entre a matriz e o revestimento da fibra. Uma vez terminada a extração, a fibra é retirada e transferida para o instrumento analítico onde decorre a dessorção dos analitos e análise.

Apesar de se tratar de uma técnica relativamente recente, são imensos os trabalhos publicados nos últimos anos. A maior parte destes trabalhos encontra-se no campo das análises ambientais, alimentares e no sector dos aromas e fragrâncias [156]. No entanto, esta técnica tem sido cada vez mais utilizada em análises clínicas e toxicológicas, como por exemplo na extração de fármacos e outros compostos lipofílicos de matrizes biológicas [160].

No que diz respeito à extração de antipsicóticos a partir de amostras biológicas com recurso à SPME, são poucos os trabalhos publicados na literatura científica. Kumazawa *et al.* (2000) [91] utilizaram, com sucesso, a DI-SPME na determinação de 11 derivados da fenotiazina em fluidos biológicos. Neste trabalho, os melhores resultados em termos de eficiência de extração foram conseguidos com uma fibra de poliacrilato, durante 60 min de imersão, a uma temperatura de 40 °C com agitação constante (≈ 250 rpm). Kruggel e Ulrich (2000) [92] aplicaram uma metodologia semelhante, na determinação da levomepromazina, no plasma humano. Contudo, em vez de uma fibra de poliacrilato os autores usaram uma fibra de polidimetilsiloxano. Apesar das baixas eficiências de extração ($< 40\%$), em ambos os estudos os autores concluem que os métodos desenvolvidos são adequados para monitorização terapêutica e para análises toxicológicas.

No entanto, e apesar das vantagens que caracterizam a SPME, esta técnica apresenta diversas limitações, destacando-se a fragilidade e a restrita gama de fibras disponíveis comercialmente. Por outro lado, a qualidade das fibras depende do fabricante e, por vezes o desempenho delas varia de lote para lote, o que requer a otimização de cada fibra antes do seu

uso [161]. Particularmente na análise de fármacos em fluidos biológicos, as principais limitações prendem-se com a baixa estabilidade das fibras, na presença de solventes orgânicos, o que é uma enorme desvantagem quando se trata de analisar estes compostos por HPLC, e a adsorção irreversível de compostos de elevado peso molecular que mudam as propriedades da fibra deixando-a inutilizada [162].

2.2.6. Microextração por sorvente empacotado (MEPS)

A MEPS é uma das versões mais recentemente desenvolvidas na área de preparação de amostras, surgindo como resultado da cooperação entre a SGE Analytical Science, Mohamed Abdel-Rehim (AstraZeneca) e Lars G. Blomberg (Universidade de Karlstad) [163]. Essencialmente, a MEPS é uma miniaturização da SPE e, como tal, os volumes de solventes e de amostra usados são substancialmente menores, o que torna esta técnica atrativa do ponto de vista analítico, económico e ambiental [164].

A utilização de volumes reduzidos de solventes e amostra, combinada com a sua elevada seletividade e simplicidade, tornam esta técnica uma poderosa ferramenta para a análise de uma grande variedade de classes químicas. Além disso, esta técnica combina a extração, a concentração e o *clean up* da amostra num único dispositivo (Figura 11) que pode ser facilmente conectado com os sistemas de cromatografia líquida (LC) ou de cromatografia gasosa (GC), proporcionando um método completamente automatizado.

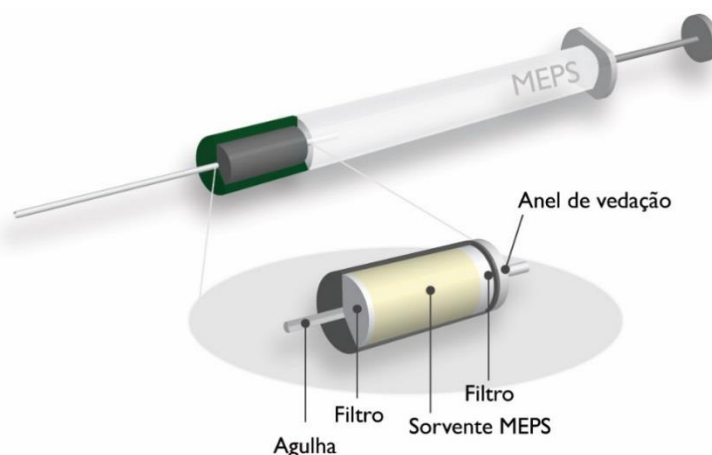


Figura 11. Seringa de MEPS.

Ao contrário das colunas de SPE convencionais, a fase sólida (sorvente) da MEPS encontra-se empacotada numa microcoluna (reservatório cilíndrico embutido numa agulha) designada de BIN (*Barrel Insert and Needle Assembly*). Este, por sua vez, é facilmente integrado numa seringa analítica que permite manusear líquidos com elevada precisão.

A atual gama de sorventes comercialmente disponíveis para a MEPS são as mesmas utilizadas na SPE, incluindo as fases de sílica funcionalizada com os grupos etil (C₂), octil (C₈) e

octadecil (C_{18}), a sílica não modificada (SIL), as resinas de troca iônica (R-AX e R-CX), o carbono grafítico poroso (PGC), as fases poliméricas de estireno divinil-benzeno (HLB-DVB, H-DVB), bem como a mistura de C_8 com resina de troca catiónica (SCX).

Tal como a SPE, um procedimento típico de MEPS envolve quatro etapas, como ilustra a Figura 12. Resumidamente, após o condicionamento do sorvente com o(s) solvente(s) apropriado(s) a amostra é aspirada e dispensada através da agulha uma ou várias vezes. Segue-se uma etapa de lavagem, para remover os interferentes e, finalmente, os analitos de interesse são eluídos diretamente no injetor do LC ou GC [165]. Para reutilizar o cartucho MEPS o sorvente é lavado com solvente(s) apropriado(s). O número de reutilizações possíveis para a MEPS depende do tipo de amostra. Por exemplo, para amostras de sangue ou plasma, o mesmo cartucho pode ser utilizado entre 50 e 100 extrações [166].



Figura 12. Representação esquemática das etapas envolvidas na MEPS.

Contrariamente à SPE convencional, onde a amostra e os solventes fluem num único sentido (de cima para baixo), a MEPS aspira e dispensa as soluções em dois sentidos (partindo do fundo). A passagem dupla da amostra e dos solventes reduz significativamente a fração fracamente ligada ao sorvente resultando em melhorias consideráveis na seletividade e no *clean up* da amostra [167]. Além disso, a ideia de incorporar uma microcoluna (BIN) numa seringa analítica, permitindo a “ciclização” de várias alíquotas de amostra através do sorvente, tem um grande impacto na recuperação dos analitos de interesse.

2.2.6.1. Configurações da MEPS

Desde o seu aparecimento, em 2004, que diversas formas da MEPS têm surgido. Atualmente, a MEPS está disponível comercialmente nas formas: manual, semi-automatizada e automatizada (Figura 13).



Figura 13. Formatos da MEPS disponíveis comercialmente: manual (seringa analítica), semi-automática (seringa analítica automática eVol®) e automática (estão disponíveis diversas configurações e.g. MEPS online kit da SGE Analytical Sciences para a plataforma robótica CTC). Adaptado de [164].

O formato mais simples e frequentemente reportado é a MEPS manual, onde o cartucho MEPS contendo o sorvente desejado é manuseado através de uma seringa analítica, disponível nas capacidades máximas de 100 e 250 μL [163]. Este foi o primeiro formato disponível, comercialmente, e o mais amplamente utilizado pela comunidade científica.

Por outro lado, a versão semiautomática (eVol®) foi recentemente introduzida no mercado pela SGE Analytical Science e pela Thermo Fisher Scientific e representa um grande avanço no desenvolvimento de métodos analíticos, uma vez que é mais fiável do que a forma manual [164]. Resumidamente, a eVol® é um dispositivo totalmente digital para aspiração e dispensa de líquidos, podendo ser programado para todas as tarefas e procedimentos na preparação de amostras, dentro de um laboratório analítico, que exijam pequenos volumes exatos e precisos [168]. A eVol® possui uma interface digital com monitor LCD colorido que apresenta a tecnologia "Touch Wheel" para interação com o utilizador. Adicionalmente, um menu inteligente permite o acesso a todas as funções de forma lógica e rápida. Por outro lado, a facilidade de substituição das seringas analíticas (XCHANGE®), prevenindo a contaminação cruzada entre solventes/amostras, bem como a facilidade de calibração pelo utilizador de modo a assegurar medições exatas e precisas, são alguns dos fatores que tornam esta ferramenta muito atrativa do ponto de vista analítico [91].

No que diz respeito à MEPS automatizada, existem diversas plataformas robóticas de manipulação de amostras com movimento nas direções XYZ, capazes de automatizar a preparação de amostras com elevada precisão. Com um volume típico de alguns microlitros, a eluição da MEPS é compatível com os sistemas cromatográficos LC e GC, tornando possível a preparação de amostras *on-line*. Além disso, estes amostradores automáticos (*autosamplers*) reúnem várias inovações tecnológicas, sendo uma mais-valia para análises de rotina, aumentando, desta forma, a produtividade laboratorial.

Ambas as versões, automática e semiautomática, permitem métodos analíticos mais fiáveis e precisos que o processo manual, visto que minimizam os erros inerentes ao operador humano.

2.2.6.2. Extração de antipsicóticos por MEPS

Apesar da MEPS ser uma metodologia relativamente recente, esta técnica tem vindo a ganhar terreno, face às tradicionais metodologias de preparação de amostras. Devido à sua versatilidade, a MEPS tem sido aplicada, com sucesso, em diversos tipos de análises, destacando-se as análises clínicas [169-171], farmacológicas [172-175], toxicológicas [176, 177], alimentares [178-181], ambientais [182-184], entre outras.

Uma breve revisão da literatura revela-nos, que até à data, são poucos os estudos que usaram a MEPS na determinação de antipsicóticos em matrizes biológicas. Em 2010, Saracino *et al.* [185] aplicaram a MEPS na determinação da risperidona e do seu principal metabolito, a 9-hidroxi-risperidona, em amostras de plasma e saliva de pacientes psiquiátricos submetidos a tratamento com este fármaco. Neste trabalho, ambas as matrizes biológicas foram diluídas em água ultrapura e após 15 ciclos de extração a um fluxo constante de $5 \mu\text{L s}^{-1}$, seguido de remoção dos interferentes, os analitos foram eluídos com 250 μL de metanol. Mandrioli *et al.* (2011) [94] usaram uma abordagem semelhante na extração das mesmas substâncias, não só em amostras de plasma e saliva como também em amostras de urina. A lavagem do sorvente foi a etapa crítica do processo de extração, revelaram os autores. Enquanto que para a saliva e para o plasma uma passagem de água ultrapura seguida de uma solução aquosa contendo 10 % de metanol foi suficiente para obter uma boa purificação, o mesmo não aconteceu com a urina. Para esta matriz, foi necessário aumentar a percentagem de fase orgânica (30% de metanol) para obter resultados equiparados. Contudo, em ambos os trabalhos, a fase sólida C_8 mostrou-se a mais adequada, permitindo recuperações acima de 90 %.

Desde a publicação destes trabalhos que outros estudos têm surgido, usando a MEPS como método de pré-tratamento de amostras biológicas para a determinação de antipsicóticos. Saracino *et al.* (2011) [186], desenvolveram uma metodologia alternativa para a determinação de clozapina e dos seus metabolitos a partir de manchas de sangue seco. Após a otimização da MEPS com a fase sólida C_8 , os autores concluíram que o método era adequado para a monitorização terapêutica de pacientes psiquiátricos submetidos a tratamento com clozapina.

Contrariamente aos estudos anteriores, da Fonseca *et al.* (2013) [187], usaram, com sucesso, um sorvente de fase mista (M1) na determinação simultânea de 7 antipsicóticos em plasma humano. A combinação dos grupos apolares da C_8 com os grupos de troca catiónica da SCX resultou numa satisfatória eficiência de extração (62-92 %). Atualmente, a metodologia desenvolvida por estes autores é aplicada rotineiramente na monitorização terapêutica de pacientes psiquiátricos do Centro Hospitalar Cova da Beira na Covilhã (Portugal) [187].

Recentemente, Mercolini *et al.* (2014) [188] compararam a *performance* da MEPS com a SPE na extração da ziprasidona, a partir do plasma humano. Após a validação dos métodos analíticos com a fase sólida C_2 e aplicação em amostras reais, a conclusão foi clara: a MEPS teve

um desempenho superior face à tradicional SPE. Durante a validação dos métodos analíticos, a MEPS obteve melhores resultados, sobretudo em termos de linearidade e de precisão ($r^2 > 0,9992$, RSD $< 4,2\%$). Além disso, e tal como nos estudos anteriores, a metodologia mostrou-se adequada para a monitorização terapêutica de pacientes submetidos a tratamento com a ziprasidona.

Apesar da sua simplicidade e fácil implementação, a MEPS tem algumas limitações, como por exemplo, a obstrução dos sorventes devido à passagem de amostras viscosas ou altamente concentradas, sendo necessário, muitas vezes, um tratamento prévio da amostra, como a diluição ou mesmo a precipitação proteica. Uma outra desvantagem desta técnica é a atual gama de sorventes disponíveis comercialmente. Embora seja relativamente inferior à gama de sorventes disponíveis para a SPE, esta limitação está a ser superada à medida que a MEPS se vai tornando mais popular [164]. Por outro lado, a possibilidade de personalização dos sorventes para aplicações mais específicas tem despertado a atenção da comunidade científica. A título de exemplo, de Souza *et al.* (2015) [189], sintetizaram os seus próprios sorventes, nomeadamente os monólitos de sílica híbrida funcionalizada com os grupos aminopropil e cianopropil, para extração simultânea de 16 fármacos, dos quais 5 eram antipsicóticos.

Em suma, apesar de algumas limitações, a MEPS é uma das técnicas mais simples de extração de amostra e apresenta mais vantagens quando comparada com outras técnicas de preparação de amostra. Além de reter as mesmas características que a tradicional SPE, ela é mais rápida, económica e favorável ao ambiente [190].

2.3. Métodos analíticos usados na determinação de fármacos

Os métodos de separação analítica constituem uma parte essencial das análises clínicas e toxicológicas, e neste sentido, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ocupa um lugar de destaque entre os métodos analíticos modernos para a análise e quantificação de fármacos e seus metabolitos em matrizes biológicas.

Em traços gerais, o HPLC é uma técnica de separação baseada na distribuição dos componentes de uma mistura entre duas fases: uma fase móvel líquida e uma fase estacionária, constituída por pequenas partículas de grande área superficial acondicionadas dentro de uma coluna. À medida que a fase móvel avança pela fase estacionária, os analitos da amostra são separados de acordo com a sua maior ou menor afinidade para cada uma das fases (Figura 14). A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias torna a cromatografia líquida numa técnica extremamente versátil e de grande utilidade em diversas áreas.

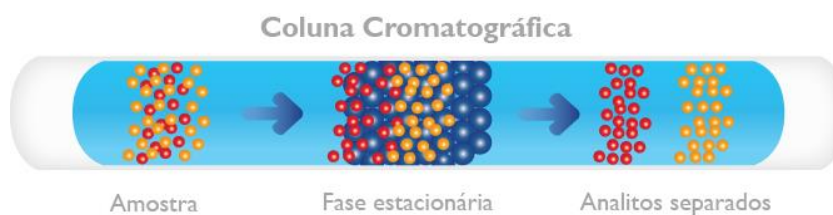


Figura 14. Esquema representativo da separação cromatográfica baseada na migração diferencial das substâncias constituintes de uma mistura.

Existem diversos mecanismos que influenciam a separação cromatográfica. No entanto, são quatro os principais mecanismos de separação, destacando-se a adsorção, a partição, a exclusão molecular e a troca iônica. A Tabela 8 apresenta de uma forma sucinta as principais características de cada um destes mecanismos de separação.

Tabela 8. Principais características dos mecanismos de separação por cromatografia líquida.

Mecanismo de Separação	Descrição
Adsorção (Fase Normal)	Este mecanismo de separação é caracterizado sobretudo pela elevada polaridade da fase estacionária (e.g. sílica, alumina, etc.) e a baixa-média polaridade da fase móvel (e.g. hexano, clorofórmio, isopropanol, etc.) [191]. A separação deve-se a uma série de eventos de adsorção/dessorção dos analitos na superfície da fase estacionária sólida [109].
Partição (Fase Reversa)	Contrariamente à fase normal, no modo reverso a fase móvel é mais polar que a fase estacionária [191]. Neste mecanismo de separação a fase estacionária é líquida e a separação baseia-se essencialmente na distribuição (solubilidade relativa) dos analitos entre os líquidos que constituem a fase estacionária e a fase móvel [109].
Permuta iônica	Neste mecanismo a fase estacionária é um sólido cuja superfície está ionizada e a separação baseia-se na atração de cargas opostas [109].
Exclusão molecular	A fase estacionária é constituída por um gel poroso e as substâncias são separadas de acordo com o tamanho molecular [109]. Neste sentido, as substâncias de maior volume molecular têm menor tempo de retenção (sofrem exclusão), enquanto que, as moléculas de menor dimensão demoram mais tempo a eluir (sofrem permeação) [191].

A HPLC é um tipo de cromatografia líquida que requer um equipamento apropriado para a sua execução (Figura 15). A instrumentação necessária é extremamente sofisticada, muito diferente da cromatografia líquida clássica.

O desenvolvimento de colunas com fases estacionárias preparadas com partículas de menores diâmetro, as quais, ofereciam maior resistência à passagem de fase móvel, tornou necessária a utilização de um sistema de bombas eficaz. Atualmente, as bombas analíticas trabalham a pressões de no máximo 500 bar (7000 psi), em fluxos que variam entre 0,01 e 10 mL min⁻¹ [192].

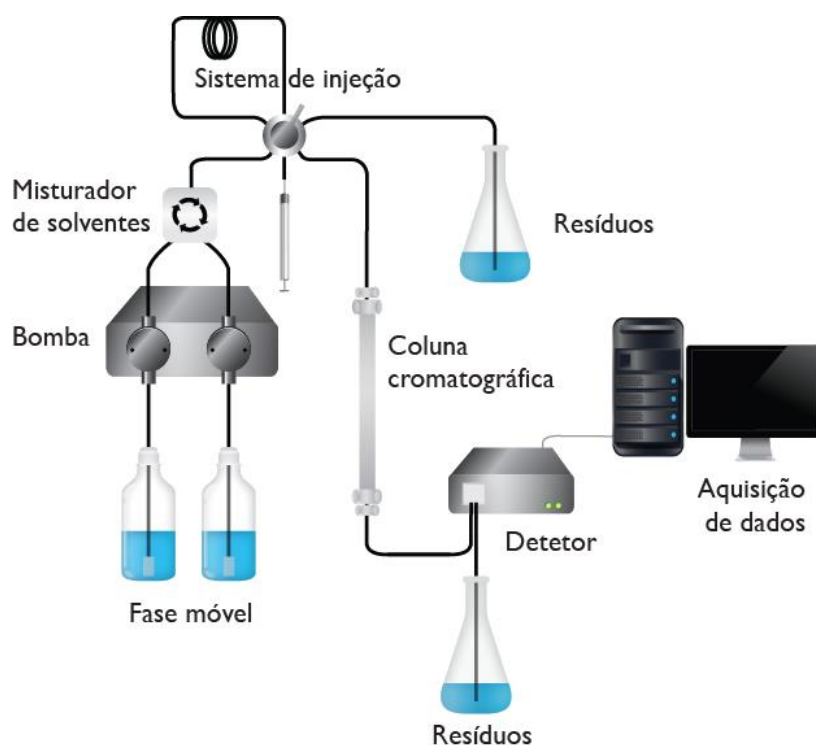


Figura 15. Esquema representativo de um equipamento para HPLC.

No que diz respeito ao sistema de injeção, inicialmente a introdução de amostra era efetuada com microsseringas, de maneira análoga à cromatografia gasosa. Atualmente, a maioria dos equipamentos utiliza injetores automatizados, denominados de auto-injetores, que são capazes de injetar um grande número de amostras sem a presença do analista, além de permitirem operações como diluição, derivatização ou adição de reagentes [192].

Relativamente ao sistema de detecção, a função destes equipamentos é a detecção dos compostos provenientes da coluna cromatográfica. As principais características desejadas ao escolher um detetor são a elevada sensibilidade e seletividade, baixo limite de detecção e estabilidade frente a mudanças na composição da fase móvel e na temperatura [192].

Atualmente, o detetor de espectrometria de massas (MS) é a melhor técnica de detecção de fármacos em amostras biológicas. A sua especificidade, seletividade e limite de detecção característicos são mais que suficientes para enfrentar a maioria dos problemas analíticos. No entanto, o MS é um equipamento extremamente sofisticado e dispendioso para muitos laboratórios.

Assim, um detetor de ultravioleta-visível (UV/Vis) constitui uma alternativa econômica ao detetor MS. Na verdade, o UV/Vis é o detetor mais utilizado em HPLC cujo princípio se baseia na absorção de luz ultravioleta ou visível por parte da amostra, quando nela passa radiação eletromagnética. É um detetor seletivo para moléculas que possuem cromóforos. Atualmente, estão disponíveis três tipos de equipamentos, que funcionam de acordo com este princípio: os

fotômetros de comprimento de onda fixo, os espectrofotômetros e os detetores por arranjo de fotodiodos [192].

Os fotômetros de comprimento de onda fixo têm a sua aplicação restrita a moléculas que absorvam no comprimento de onda em que eles funcionam. Por outro lado, os espectrofotômetros são mais versáteis, permitindo a escolha do comprimento de onda mais adequado a cada análise. Estes equipamentos podem emitir apenas luz ultravioleta, de 190-400 nm, através de lâmpadas de deutério, como também a região do visível, de 400-800 nm, utilizando-se lâmpadas de tungstênio [192].

Os detetores por arranjo de fotodiodos (PDA) fornecem espectros no UV-Vis do eluente da coluna em determinados intervalos de tempo. São especialmente úteis para o desenvolvimento de métodos, por possibilitarem um “varrimento” da região UV-Vis numa única corrida cromatográfica, para medidas de pureza de pico e para análise de amostras desconhecidas [192].

Recomenda-se a utilização do comprimento de onda máximo do analito, desde que este seja superior a 220 nm, pois abaixo deste valor geralmente observa-se interferência da fase móvel. Embora alguns eluentes possibilitem a análise em comprimentos de onda mais baixos (e.g. acetonitrilo/água - 200 nm), sugere-se a utilização do comprimento de onda de um cromóforo mais fraco, num comprimento de onda mais alto [192]. A Tabela 9 descreve os comprimentos de onda mínimos para que não se observe interferência da fase móvel.

Tabela 9. Comprimento de onda dos solventes mais utilizados [192].

Solvente	UV (nm) mínimo
Acetona	330
Acetonitrilo	200
Benzeno	280
Tetracloroeto de carbono	265
Clorofórmio	245
Ciclohexano	210
Dimetil sulfóxido	270
Etanol	210
Acetato de etilo	255
Hexano	200
Metanol	210
Tetraidrofurano	215
Tolueno	285
Água	190

2.3.1. Cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC)

Ao longo dos últimos anos, muitas alterações e melhorias nos instrumentos de cromatografia líquida têm sido introduzidas, permitindo análises mais rápidas e eficientes. Com a introdução do sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC), em 2004, pela Waters corporation, a ciência de separação foi levada a um outro nível. Este novo sistema de cromatografia líquida retém os mesmos princípios da HPLC, mas com algumas diferenças que proporcionaram uma melhoria significativa da performance cromatográfica. A utilização de fases estacionárias constituídas por partículas de diâmetro inferior a 2 μm , combinadas com o reduzido comprimento da coluna cromatográfica em conjunto com as elevadas pressões debitadas pelas poderosíssimas bombas analíticas, que podem atingir valores na ordem dos 15.000 psi, permitiu uma diminuição do tempo de análise e uma elevada resolução cromatográfica (grau de separação entre os picos), sem sacrificar o desempenho de parâmetros básicos, tais como a precisão, linearidade, estabilidade e robustez [193, 194]. Além disso, a diminuição do consumo de solventes face aos equipamentos de HPLC convencionais, tornaram esta técnica atrativa do ponto de vista analítico, económico e ambiental.

Apesar da UHPLC ser uma metodologia recente, esta técnica tem vindo a ganhar terreno em diversas áreas, incluindo a toxicologia forense [195] e as análises clínicas [196] devido à sua versatilidade.

2.3.2. Análise de antipsicóticos recorrendo às técnicas de cromatografia líquida

Até aproximadamente duas décadas atrás, a cromatografia gasosa acoplada à espetrometria de massa (GC-MS) era considerada o “*gold-standard*” para a análise e quantificação de fármacos e seus metabolitos em matrizes biológicas [4, 197]. No entanto, devido aos requisitos necessários para operar neste tipo de cromatografia (substâncias voláteis ou facilmente volatilizadas e termicamente estáveis), muitos fármacos como a risperidona não eram passíveis de análise direta, devido às suas propriedades físico-químicas. Era frequentemente necessário recorrer a procedimentos muito laboriosos, como a derivatização, de forma a converter estas substâncias numa forma mais apropriada para a deteção [4].

Com o desenvolvimento da HPLC e dos respetivos sistemas de deteção, a análise de fármacos passou a ser mais simples. Uma vez que a HPLC não necessita de volatilização ou derivatização, isto levou à utilização generalizada da cromatografia líquida para a determinação de antipsicóticos em matrizes biológicas [4]. A Tabela 10 proporciona uma visão geral dos trabalhos publicados nos últimos 10 anos que recorrem a técnicas cromatográficas para análise dos antipsicóticos em estudo em diferentes matrizes biológicas.

Tabela 10. Exemplos representativos de estudos publicados nos últimos 10 anos, que envolveram a separação e detecção de antipsicóticos em matrizes biológicas, por cromatografia líquida.

Analito	Matriz (volume)	Técnica de Extração	Coluna cromatográfica	Fases Móveis	Modo de separação/deteção	LOD	Ref.
RISP e 9-OHRisp	Plasma (500 µL)	LLE	Zorbax SB-C ₁₈ (150 × 2,1 mm, 5 µm)	Gradiente com (A) 10 mM de acetato de amónia (pH=4) e (B) ACN	HPLC-ESI-MS	0,1 ng mL ⁻¹	[123]
CLZ, NORCLZ e CLZ-OX	Plasma (50 µL)	SPE	Zorbax Eclipse XDB-C ₁₈ (150 × 4,6 mm, 3,5 µm)	Modo isocrático com 25 mM de acetato de amónia em MeOH	LC-MS	0,3 ng mL ⁻¹	[139]
RISP, 9-OHRisp, OLZ, CPZ, HAL e ZSD	Plasma (1000 µL)	LLE	Agilent Eclipse XDB C ₈ (150 × 4,6 mm, 5 µm)	Gradiente com (A) 30 mM de acetato de amónia e 0,05 % Et ₃ N e (B) ACN	HPLC-UV	–	[198]
CLZ, NORCLZ, CLZ-OX, LMP, NDLM, LMSO e ODLM	Plasma (250 µL)	SPE	Phenomenex C ₈ (150 × 4,6 mm, 5 µm)	Modo isocrático com uma mistura ACN e tampão fosfato (34 mM, pH=2) contendo 0,3% trietilamina (29:71, v/v)	HPLC-UV	3 - 7 ng mL ⁻¹	[142]
RISP, 9-OHRisp, OLZ, CLZ, HAL e ZSD	Plasma (250 µL)	LLE	Waters Atlantis™ dC-18 (30 × 2,1 mm, 3 µm)	Gradiente com (A) 5 mM de formato de amónio (pH=6,1) e (B) ACN	HPLC-ESI-MS/MS	–	[119]
RISP	Soro (300 µL)	LLE	Alltima-C ₁₈ (100 × 2,1 mm, 3 µm)	Modo isocrático com 0,1% de ácido fórmico e ACN	HPLC-ESI-MS/MS	–	[124]
RISP, BP, FPZ, FPT, PPZ, ZSD e ZPT	Sangue <i>post mortem</i> (1,0 g)	LLE	Zorbax Stable Bond Cyano (50 × 2,1 mm, 3,5 µm)	Gradiente com (A) 2% MeOH, 8% ACN e 90% de 20 mM de formato de amónia (pH=4) e (B) 24% MeOH, 36% ACN e 40% de 20 mM de formato de amónia (pH=4)	HPLC-ESI-MS/MS	–	[199]

Determinação de Antipsicóticos em Amostras Biológicas

RISP e 9-OHRisp	Plasma e saliva (100 µL)	MEPS	Gemini C ₁₈ (150 × 4,6 mm, 5 µm)	Modo isocrático com uma mistura ACN e tampão fosfato (7.07 mM, pH=6,5) (26:74, v/v)	LC-DC	0,17 ng mL ⁻¹	[185]
31 neuroléticos incluindo a RISP, 9-OHRisp, CLZ, NORCLZ e CLZ-OX.	Plasma (500 µL)	LLE	TF Hypersil GOLD Phenyl (100 × 2,1 mm, 1,9 µm)	Gradiente com (A) 10 mM de formato de amônia contendo 0,1 % de ácido fórmico (pH=3,4) e (B) ACN e 0,1 % de ácido fórmico	UPLC-APCI-MS/MS	0,3 - 112,5 ng mL ⁻¹	[200]
RISP e 9-OHRisp	Plasma urina e saliva (100 µL)	MEPS	Chromsep C ₈ (150 × 4,6 mm, 5 µm)	Modo isocrático com uma mistura ACN e tampão fosfato (30 mM, pH=3) contendo 0,23% trietilamina (27:73, v/v)	HPLC-UV	0,7 - 1,0 ng mL ⁻¹	[94]
CLZ, NORCLZ e CLZ-OX	Mancha de sangue seco (150 µL de extrato)	MEPS	Gemini C ₁₈ (150 × 4,6 mm, 5 µm)	Modo isocrático com uma mistura de MeOH, ACN e tampão fosfato (50mM, pH=2,1)	LC-DC	0,8 ng mL ⁻¹	[186]
>90 fármacos, incluindo a RISP	Sangue (500 µL)	QuEChERS	L-column ODS (150 × 1,5 mm, 5 µm)	Gradiente com (A) 95% formato de amônio (10mM) em 5% de MeOH e (B) 5% formato de amônio (10mM) em 95% de MeOH	HPLC-ESI-MS/MS	0,04 - 4,43 ng mL ⁻¹	[93]

Abreviaturas: ACN - acetonitrilo; CLZ - clozapina; CLZ-OX - N-óxido de clozapina; CPZ - clorpromazina; HPLC-ESI-MS/MS - cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (tandem) com ionização por eletrospray; HPLC-UV - cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de ultravioleta; LC-DC - cromatografia líquida com detetor colorimétrico; LC-MS - cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa; LMP - levomepromazina; LMSO - sulfóxido de levomepromazina; NDLM - N-desmetil-levomepromazina; NORCLZ - norclozapina; ODLM - O-desmetil-levomepromazina; OLZ - olanzapina; RISP - risperidona; UPLC-APCI-MS/MS - cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massa (tandem) com ionização química à pressão atmosférica; ZPT - zuclopentixol; ZSD - ziprasidona; 9-OHRisp - 9-hidroxi-risperidona.

Capítulo 3

Justificação do Tema e
Objetivos

3. Justificação do Tema e Objetivos

Face ao atrás exposto, e tendo em conta a importância da análise de antipsicóticos em amostras biológicas, particularmente nas áreas clínica e forenses, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento e validação de uma nova metodologia analítica, baseada na MEPS seguida de análise por cromatografia líquida de ultra eficiência com detetor de fotodiodos (UHPLC-PDA), para a deteção e quantificação de antipsicóticos em urina. A principal motivação deste trabalho deveu-se à forte tendência atual da miniaturização das técnicas analíticas, como MEPS, que têm como principal objetivo ultrapassar os inconvenientes das técnicas tradicionais. Por outro lado, a combinação de um tempo de análise curto com um baixo fluxo, obtido pelo sistema de UHPLC, poderá reduzir, drasticamente, o consumo de solventes, tornando esta técnica atrativa do ponto de vista analítico, económico e ambiental. Além disso, a deteção por fotodiodos constitui uma alternativa mais económica, quando comparada com os equipamentos mais sofisticados e dispendiosos, como por exemplo o detetor de espetrometria de massa, tornando esta metodologia mais acessível a muitos laboratórios.

Sob o ponto de vista prático, pretendeu-se otimizar os diferentes parâmetros que influenciam a MEPS, nomeadamente, a natureza do sorvente, o volume de amostra, o número de ciclos de extração, o solvente de extração, o volume de eluição e o pH da amostra, e em seguida proceder à validação do método analítico. Os parâmetros de validação definidos para esta metodologia englobaram a seletividade, linearidade, limites de deteção e quantificação, precisão, exatidão e a eficiência de extração, de forma a garantir a fiabilidade dos resultados analíticos. Posteriormente, esta metodologia analítica foi aplicada a amostras reais, provenientes de pacientes internados na Casa de Saúde S. João de Deus do Funchal.

Pretende-se que a metodologia que agora se apresenta se possa tornar numa ferramenta analítica muito útil, tanto em contexto clínico (e.g. monitorização terapêutica) como em contexto forense (e.g. intoxicações), e de fácil acessibilidade, sem necessidade de se recorrer a equipamentos muito sofisticados e dispendiosos.

Capítulo 4

Materiais e Métodos

4.1. Padrões e Reagentes

Os padrões de referência dos antipsicóticos, nomeadamente a clozapina (grau de pureza > 98 %) e a risperidona (grau de pureza > 95 %) foram obtidos à Cayman Chemicals (Michigan, EUA), enquanto que os respetivos metabolitos norclozapina (grau de pureza > 99 %) e 9-hidroxi-risperidona (grau de pureza > 98 %) foram adquiridos à Abcam plc (Cambridge, Reino Unido). Por sua vez, o padrão interno cloridrato de clomipramina (grau de pureza > 98 %) foi adquirido à Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Heidelberg, Alemanha).

O metanol e o acetonitrilo, ambos com grau de pureza adequado à cromatografia líquida, foram fornecidos pela Fisher Scientific (Loughborough, Reino Unido) enquanto que o ácido fórmico 98 % P.A. foi adquirido à Panreac (Barcelona, Espanha).

A água ultra pura, com resistividade mínima de 18,2 M Ω cm⁻¹ à temperatura ambiente, utilizada no decorrer deste trabalho foi produzida num sistema de purificação de água Milli-Q[®] da Millipore (Bedford, EUA).

4.2. Equipamentos

No desenvolvimento deste trabalho foram utilizados os seguintes equipamentos para a preparação de soluções e processamento das amostras: balança analítica PA114 (OHAUS[®] Pioneer[™]); centrifugadora Sigma I-6P (Sigma Laborzentrifugen); agitador vortex Maxi Mix Plus[™] (Thermolyne); medidor de pH 691 pH meter (Metrohm); placa de agitação MR 3001 (Heidolph) e uma seringa analítica automatizada eVol[®] XR (SGE Analytical Science).

Para análise das amostras foi utilizado um sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência da Waters Acquity UPLC H-Class (Mildford, MA, EUA) equipado com detetor de fotodiodos, modelo 2996 da Waters (Mildford, MA, EUA), e operado a partir do *software* Empower 2 (Waters Corporation).

4.3. Materiais

Tratando-se de um estudo de cariz analítico, todos os materiais de laboratório utilizados foram adequados à atividade experimental. Os materiais de vidro usados para medições volumétricas (balões volumétricos e pipetas) eram de classe A, provenientes da Labbox. Para a medição de volumes exatos foram utilizadas micropipetas da Orange Scientific, modelos Tipor V⁺ e Tipor VN, periodicamente calibradas por gravimetria, de capacidades máximas que variam entre 2 μ L e 10.000 μ L. Estas micropipetas utilizam pontas descartáveis (modelo Gilson[®] da Frilabo), que foram trocadas após cada utilização.

Relativamente à recolha das amostras de urina, utilizaram-se frascos de plástico esterilizados com dispositivo de transferência integrado de capacidade máxima 100 mL e tubos para urina (10,5 mL) da Vacuette[®]. A filtração das amostras foi efetuada com o auxílio de seringas

de plástico de capacidade máxima 20 mL e de filtros de seringa 0,22 µm de politetrafluoretileno (PTFE) hidrofílicos, da BGB®. A urina filtrada foi distribuída em alíquotas de 2 mL, em tubos de microcentrifuga estéreis (BIOplastics BV).

Os “cartuchos” MEPS, contendo as fases estacionárias, utilizados na seringa analítica eVol® XR foram adquiridos à SGE Analytical Science e à Fisher Scientific. Os extratos obtidos por MEPS, foram colocados em vials âmbar de 1,5 mL da Waters com os respectivos insertos de 250 µL cónicos em vidro.

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

4.4. Preparação de Soluções

As soluções padrão individuais das substâncias estudadas foram preparadas em metanol na concentração de 1000 µg mL⁻¹ e armazenadas a -20 °C, ao abrigo da luz.

As soluções de trabalho (100 µg mL⁻¹) foram obtidas por diluição das respetivas soluções padrão com metanol. Estas soluções foram adicionadas a uma amostra branca de urina, a fim de realizar os ensaios para a otimização das condições de extração e para o estudo da validação em diferentes concentrações. As soluções usadas na construção da reta de calibração (0,1 - 5,0 µg mL⁻¹) foram preparadas no dia da análise, por diluição das soluções de trabalho numa amostra de urina branca. As gamas de concentração foram selecionadas de acordo com a dose terapêutica e a sensibilidade do UHPLC-PDA.

4.5. Recolha e pré-tratamento da Amostra

As amostras de urina provenientes de pacientes internados na Casa de Saúde S. João de Deus do Funchal, utilizadas no decorrer deste trabalho, foram recolhidas em frascos de plástico esterilizados, com dispositivo de transferência integrado (Vacuette®), e transportadas para o laboratório de Química Analítica do Centro de Química da Madeira (CQM), numa caixa térmica apropriada para o transporte de amostras biológicas. Os tubos para urina de capacidade máxima 10,5 mL da Vacuette® (tubos de plástico com um vácuo pré-definido para aspiração exata de volume) foram usados na transferência da urina a partir dos recipientes de colheita. As amostras foram, posteriormente, centrifugadas a 5.000 rpm, durante 20 minutos e o sobrenadante recolhido foi filtrado com filtros de seringa 0,22 µm PTFE. A urina filtrada foi distribuída em alíquotas de 2 mL, em tubos de microcentrifuga estéreis, e armazenadas a -20 °C.

4.6. Otimização do Processo de Extração

A otimização das diversas variáveis que afetam o desempenho do processo de extração, nomeadamente, a natureza do sorvente, o volume de amostra, o número de ciclos de extração, o

solvente e o volume de eluição, bem como o pH da amostra foram avaliados neste trabalho. Partindo de um procedimento genérico (Figura 16) cada etapa do processo de extração foi otimizado usando um *design* experimental univariado.

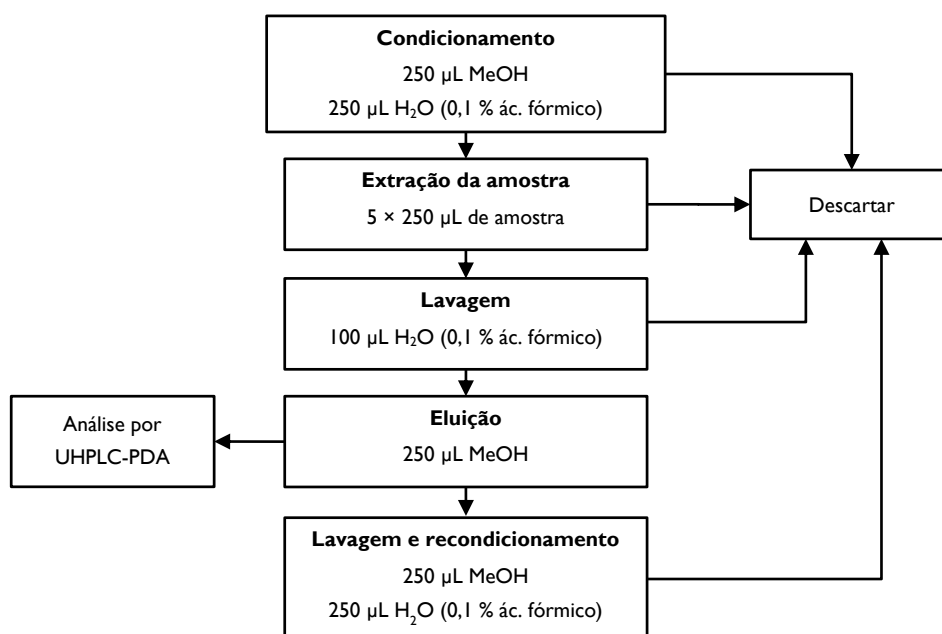


Figura 16. Fluxograma do procedimento MEPS inicialmente utilizado para a otimização do processo de extração.

Antes de usar o sorvente pela primeira vez, o mesmo foi condicionado com 250 µL de metanol, seguido de 250 µL de água contendo 0,1 % de ácido fórmico. Posteriormente, a amostra de urina enriquecida com a solução padrão das substâncias em estudo (10 µg mL⁻¹) foi aspirada através do sorvente e dispensada no mesmo vial, uma ou mais vezes (pré-concentração dos analitos). A fase sólida foi lavada com 100 µL de água contendo 0,1 % de ácido fórmico, de forma a remover os compostos interferentes. Os analitos foram dessorvidos (eluídos), posteriormente, com 250 µL de metanol e injetados (2 µL) no sistema UHPLC-PDA.

Para aumentar o tempo de vida do sorvente, este foi lavado com 250 µL de metanol, seguido de 250 µL de solução aquosa de ácido fórmico (0,1 %). Esta etapa permitiu, além da minimização do efeito de memória (“*carry-over*”), o condicionamento do sorvente para a extração seguinte. De realçar que todo o processo de otimização foi realizado em triplicado e todos os ensaios foram efetuados com recurso a uma seringa analítica automática eVol® XR.

4.7. Condições Cromatográficas

As análises cromatográficas foram efetuadas num UHPLC da Waters, modelo Acquity UPLC H-Class (Figura 17), equipado com um sistema de bombas quaternário com módulo de desgaseificação integrado, um amostrador automático, um forno de colunas e um detetor de

fotodiodos (PDA, modelo 2996). Todo o sistema foi controlado a partir do *software* Empower 2 (Waters Corporation).

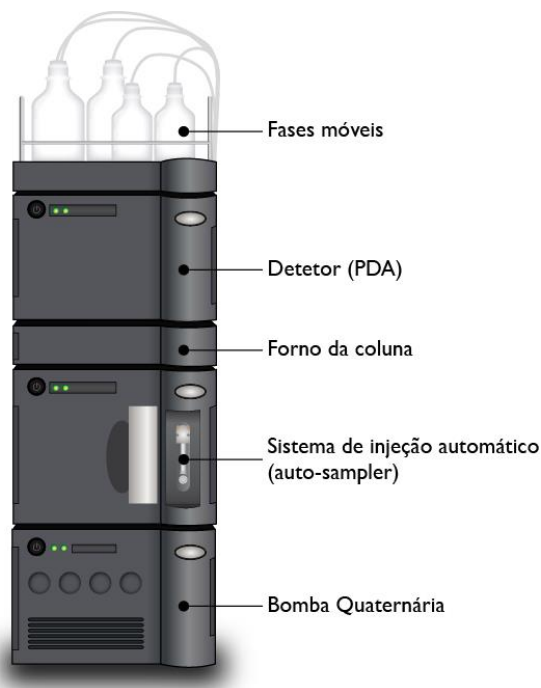


Figura 17. Sistema UHPLC-PDA da Waters modelo Acquity UPLC H-Class.

Após a otimização das condições cromatográficas a melhor separação foi conseguida numa coluna analítica de fase reversa CORTECS UPLC C18 (100 mm × 2,1 mm, 1,6 μm de diâmetro de partícula) precedida de uma pré-coluna CORTECS UPLC C18 VanGuard™ (5 mm × 2,1 mm, 1,6 μm de diâmetro de partícula). A temperatura da coluna foi programada para 30 °C e as amostras foram mantidas a 20 °C no amostrador automático. Foram injetadas alíquotas de 2 μL de amostra, usando-se uma fase móvel binária constituída por (A) água contendo 0,1% de ácido fórmico e (B) metanol com um fluxo constante de 250 μL min⁻¹. Durante cada corrida (10 minutos), foi utilizado o gradiente de fase móvel apresentado na Tabela II, o que permitiu uma adequada separação cromatográfica dos compostos.

Tabela II. Gradiente de fase móvel usado na separação dos antipsicóticos e dos respetivos metabolitos alvo de estudo.

Tempo (min)	% A	% B
0,0	80	20
3,0	60	40
5,0	50	50
7,0	30	70
9,0	80	20
10,0	80	20

De destacar que os solventes usados na cromatografia líquida foram previamente filtrados a vácuo, através de um sistema de filtração All-Glass da Millipore. O sistema usa uma membrana filtrante de 0,22 µm para eliminar partículas que poderiam diminuir a vida média das colunas, assim como facilitar a remoção de uma grande parte dos gases dissolvidos nas fases móveis, reduzindo o risco de formação de bolhas de ar que podem interferir na análise por cromatografia líquida.

Para a detecção dos antipsicóticos e dos respetivos metabolitos nas amostras, procedeu-se através de três canais distintos (237, 239 e 252 nm) correspondendo ao comprimento de onda máximo de cada composto, enquanto que a identificação foi baseada na comparação dos tempos de retenção e do espectro de absorção UV com as respetivas soluções padrão.

4.8. Validação do Método Analítico

A fiabilidade dos resultados analíticos é de extrema importância em química analítica, já que constitui um requisito essencial à correta interpretação dos resultados. Desta forma, o processo de validação deve incluir todos os parâmetros necessários para demonstrar que uma técnica analítica destinada à determinação quantitativa de um ou mais analitos numa determinada amostra é adequada [201]. Tendo em consideração estes pressupostos, os parâmetros analíticos avaliados na validação do método MEPS/UHPLC-PDA foram a seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e eficiência de extração. Importante referir que a análise quantitativa foi efetuada pelo método de padronização interna, que consiste na adição de uma substância conhecida (padrão interno) a uma concentração constante às amostras, brancos e padrões. Esta padronização tem como objetivo corrigir os erros associados às variações dos parâmetros instrumentais, experimentais e aos efeitos provocados pela matriz.

4.8.1. Seletividade

A seletividade corresponde à capacidade de um método distinguir um analito de forma inequívoca numa matriz complexa sem interferência, de outros elementos eventualmente presentes na amostra [134]. A seletividade e especificidade são muitas vezes termos que causam alguma confusão, visto possuírem uma definição e formas de avaliação semelhantes. Esta situação pode ser evitada com a utilização exclusiva do termo seletividade em detrimento da designação de especificidade, como sugerido pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) [202].

Com o objetivo de avaliar a seletividade do método analítico, selecionou-se um total de 20 amostras de urina, isentas dos analitos em estudo, as quais foram denominadas de amostras brancas. As amostras brancas, provenientes de indivíduos saudáveis, foram misturadas de forma aleatória em grupos de 4, constituindo-se assim 5 misturas (*pools*). Cada um dos *pools* foi dividido em duas alíquotas de 1 mL. A uma das alíquotas adicionou-se apenas o padrão interno (2,5 µg mL⁻¹).

l), enquanto que a segunda alíquota foi fortificada com uma mistura padrão dos antipsicóticos em estudo, incluindo o padrão interno, à concentração 2,5 µg mL⁻¹. Ambas as soluções foram analisadas pelo método otimizado MEPS/UHPLC-PDA. A ausência de sinais interferentes nos mesmos tempos de retenção e comprimentos de onda dos analitos provam que o método é seletivo.

4.8.2. Linearidade

A capacidade do método analítico fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito em estudo, dentro da gama de trabalho selecionada, é definida como linearidade. Para a maioria das técnicas analíticas, a linearidade é expressa através da correlação entre a resposta do equipamento (e.g. área ou altura do pico cromatográfico) e a concentração do analito. Essa correlação pode ser representada matematicamente pela reta de calibração e expressa pela equação de regressão linear:

$$y = ax + b \quad (\text{equação 2})$$

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

Os parâmetros da regressão obtidos pelo método dos mínimos quadrados (o declive, a ordenada na origem e o coeficiente de correlação – ver anexo 1) traduzem a relação linear dos dados experimentais, permitindo extrair informação sobre o método analítico. Os coeficientes de correlação linear (r) e de determinação (r^2) são frequentemente utilizados para avaliar o grau de linearidade entre os pontos experimentais e estes devem encontrar-se próximo de 1 de forma a garantir um melhor ajuste dos resultados (menor dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor incerteza dos coeficientes de regressão estimados). No entanto, a magnitude de tais coeficientes indicam apenas o grau de ajuste dos dados à reta de calibração, que só por si, não são suficientes para estabelecer a linearidade [203]. Neste sentido, o estudo da análise de resíduos e o teste de Mandel devem fazer parte da avaliação da reta de calibração.

O teste de Mandel ou teste de Fisher/Snedecor (ver anexo 2) permite avaliar qual dos modelos, linear ou não-linear (polinomial), proporciona um melhor ajustamento aos pontos da reta de calibração, enquanto que a determinação dos resíduos (ver anexo 3) avalia a distância entre os valores de y experimentais e os valores de y' ideais da reta de calibração. Este último teste é particularmente um bom indicador da linearidade, uma vez que a análise do gráfico de resíduos permitirá detetar problemas no ajuste da reta como, por exemplo, desvios da linearidade, presença de amostras atípicas, heterocedasticidade (ocorrência de variâncias não constantes nos resíduos), dependência, entre outros erros (Figura 18) [204]. Uma reta bem ajustada deverá apresentar erros com distribuição uniforme, média zero e variância constante (homocedasticidade) e ausência de amostras atípicas [204].

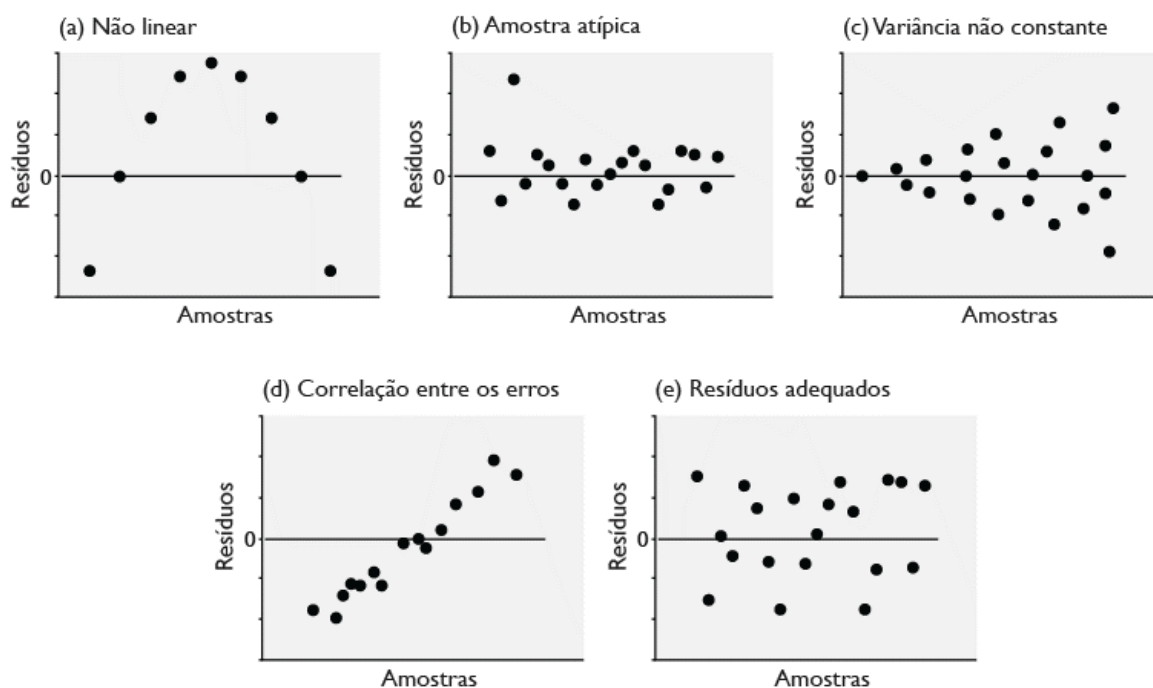


Figura 18. Representação de gráficos de análises de resíduos (adaptado de [204]).

Em termos experimentais, é recomendável que o estudo da linearidade seja feito com, pelo menos, 5 concentrações distintas. Assim sendo, para a determinação da linearidade preparou-se quatro retas de calibração, uma para cada substância em estudo, com 7 pontos de calibração, a partir da fortificação de alíquotas de uma amostra de urina, isenta dos analitos em estudo. O volume de urina utilizado por cada alíquota foi 500 μL e a gama de concentrações variou entre 0,1 e 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. De salientar que a gama de trabalho foi selecionada tendo em conta a gama terapêutica e a sensibilidade do UHPLC-PDA. A cada uma das amostras de calibração foi adicionado o padrão interno (2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e adotando a metodologia otimizada descrita mais adiante na secção 4.1, procedeu-se à extração e análise.

A obtenção da reta que melhor se ajusta ao conjunto dos resultados experimentais foi efetuada por recurso ao método dos mínimos quadrados das áreas relativas (área do analito/área do padrão interno) em função dos vários níveis de concentração e, calculado o coeficiente de determinação (r^2) para cada uma das retas. Efetuou-se, posteriormente, o teste de Mandel e a análise de resíduos para confirmar a linearidade da função.

4.8.3. Limites de Detecção e Quantificação

Os termos limite de deteção e quantificação são utilizados para demonstrar a capacidade do método em detetar/quantificar baixas concentrações de um analito. O limite de deteção (LOD) representa a menor concentração da substância em análise e que pode ser detetada com certo limite de confiança, mas não necessariamente quantificada [205]. Relativamente ao limite de quantificação (LOQ), este traduz a mais baixa concentração do analito que pode ser quantificada

com um nível aceitável de precisão e exatidão, sob as condições experimentais estabelecidas [203]. De acordo com a *Food and Drug Administration* (FDA) [206], o padrão mais baixo da reta de calibração pode ser aceite como limite de quantificação se a resposta produzida pelo analito for, no mínimo, 5 vezes a resposta da linha de base obtida pela amostra branca e se o pico do analito for identificável, discreto e reprodutível com uma precisão de até 20% e exatidão $\pm 20\%$ do valor de concentração nominal.

Ambos os limites são expressos em unidades de concentração e podem ser determinados de diversas formas [207]. No entanto, quando o método analítico envolve a utilização da calibração linear, os limites de detecção e quantificação podem ser calculados através do desvio padrão residual da reta de calibração, de acordo com as expressões matemáticas:

$$LOD = \frac{3,3 \times S_{y/x}}{a} \quad (\text{equação 2})$$

$$LOQ = \frac{10 \times S_{y/x}}{a} \quad (\text{equação 3})$$

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

4.8.4. Precisão

A precisão de um método analítico exprime o grau de concordância entre resultados analíticos, independentes, obtidos várias vezes nas mesmas condições [205]. No fundo, este parâmetro descreve a proximidade das medições individuais de um analito quando o procedimento é aplicado mais do que uma vez numa mesma amostra, em idênticas condições de análise [201]. Normalmente, a precisão é expressa em termos de desvio padrão, variância ou coeficiente de variação, do conjunto de ensaios realizados sob condições de repetibilidade, de precisão intermédia e reprodutibilidade [205, 208].

A repetibilidade, por vezes denominada de precisão intra-dia ou intra-ensaio, exprime a precisão de um método sob condições ótimas, isto é, nas mesmas condições experimentais, sobre a mesma amostra, pelo mesmo analista, no mesmo laboratório, e no decurso de uma mesma série de ensaios efetuados num curto intervalo de tempo [209]. Este estudo é realizado com várias preparações da mesma amostra e não deve ser confundido com a precisão instrumental, que é avaliada por uma sequência de injeções repetidas da mesma preparação [209].

No que diz respeito à precisão intermédia, também designada de variabilidade intra-laboratorial ou de precisão inter-dia, é um parâmetro que se refere à concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Habitualmente, a precisão intermédia é considerada como o parâmetro

mais representativo da variabilidade dos resultados obtidos através de um método analítico a nível interno de um laboratório [210].

A reprodutibilidade ou precisão inter-laboratorial, por sua vez, é um parâmetro obtido quando todos os fatores são diversificados durante a execução do método analítico, inclusive o laboratório [134]. No entanto, este parâmetro pode ser prescindível quando a validação se restringe a um único laboratório (*single-laboratory validation*) e a precisão é obtida, apenas, pela análise da repetibilidade e da precisão intermédia [203].

Posto isto, e tendo em conta o trabalho proposto, a precisão foi obtida através da análise de amostras brancas de urina fortificadas com todos os analitos alvo de estudo a três níveis de concentração, incluindo um nível baixo (0,1 µg mL⁻¹), um nível médio (2,5 µg mL⁻¹) e um nível alto (5 µg mL⁻¹) da reta de calibração. Para cada uma destas concentrações, foram efetuadas 6 réplicas para assim se proceder à avaliação da precisão das medidas efetuadas no mesmo dia – repetibilidade. Para a análise da precisão intermédia foram analisadas três réplicas de cada nível durante cinco dias não consecutivos (n = 15). Uma vez aplicado o procedimento de ensaio, os resultados foram expressos em termos de coeficiente de variação (CV) ou desvio padrão relativo (RSD), de acordo com as equações seguintes:

$$s = \frac{\sqrt{\sum x_i - (\bar{x})}}{(n - 1)} \quad \text{(equação 4)}$$

$$CV (\%) = \left(\frac{s}{\bar{x}}\right) \times 100 \quad \text{(equação 5)}$$

Onde, *s* corresponde ao desvio padrão, \bar{x} é a média aritmética dos resultados obtidos, x_i o valor individual de uma medição e *n* o número de medições.

Adicionalmente, a análise de variâncias (ANOVA), uma ferramenta estatística importante na avaliação da precisão, através da qual podem ser extraídas estimativas da repetibilidade e da precisão intermédia, de acordo com a norma ISO 5725 [211], foi aplicada aos resultados obtidos. As expressões matemáticas utilizadas encontram-se apresentadas na Tabela 12 e na Tabela 13.

Tabela 12. Tabela ANOVA (fator único) [212, 213].

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

Tabela 13. Cálculo das estimativas das variâncias para o modelo experimental utilizado no estudo da repetibilidade e precisão intermédia [212, 213].

Variância	Expressão
Variância da Repetibilidade (S_r^2)	$S_r^2 = MS_r$
Variância da precisão entre ensaios (S_{run}^2)	$S_{run}^2 = \frac{MS_{run} - MS_r}{n}$
Variância da Precisão intermédia (S_1^2)	$S_1^2 = (S_r^2) + (S_{run}^2)$

Onde p é o número de sequências de análises para cada nível de concentração (uma sequência por cada dia); n é o número de replicados efetuados em cada sequência; X_{ij} representa um replicado individual (replicado j) obtido na sequência i ; \bar{X}_i representa a média de n replicados obtidos na sequência i ; $\bar{\bar{X}}$ é a média das médias de p sequências [212].

4.8.5. Exatidão

A exatidão de um método analítico corresponde à proximidade ou concordância dos resultados obtidos em relação ao valor de referência estabelecido como verdadeiro [205]. A sua determinação é crucial no desenvolvimento de qualquer método analítico, uma vez que permitirá estimar o grau de erros sistemáticos que afetam o método em particular [214]. Os erros sistemáticos são erros que se manifestam sempre da mesma forma (e.g. erros instrumentais, erros operativos), para um dado conjunto de ensaios independentes, e colocam em causa a veracidade do resultado experimental, provocando o seu afastamento relativamente ao valor verdadeiro presente na amostra analisada [215].

Existem diversas formas de determinar a exatidão, destacando-se entre elas, o uso de materiais de referência certificados, a comparação dos resultados com métodos de referência ou através de ensaios inter-laboratoriais [205]. No entanto, face à indisponibilidade destes recursos, a exatidão pode ser avaliada através dos valores de recuperação absoluta obtidos a partir da análise de amostras fortificadas (adição de uma quantidade conhecida de analito à matriz branca) [216, 217]. Estes testes de recuperação constituem uma excelente vantagem económica para o laboratório, uma vez que permitem avaliar a exatidão sem recorrer a materiais certificados, usando somente soluções de padrão e amostras [215]. Além disso, estes testes permitem testar a resposta na presença da própria matriz da amostra em causa, o que é muito vantajoso pois não é comum haver materiais certificados com matrizes idênticas ou similares àquelas de interesse [215]. Por outro lado, alguns estudos revelam que este procedimento poderá ter as suas limitações, uma vez que a estimativa da recuperação obtida em amostras fortificadas pode ser relativamente diferente da que seria obtida numa amostra que contivesse o analito na sua forma nativa [134, 218]. Contudo, no caso de amostras líquidas, considera-se que a fortificação pode constituir uma representação razoável dos analitos em amostras reais [219].

Em termos experimentais, para a avaliação deste parâmetro, o procedimento utilizado neste estudo foi o mesmo descrito na secção 3.8.4, para a precisão intermédia. Após a determinação das áreas relativas para os diferentes compostos em relação ao padrão interno, a exatidão foi expressa através do erro médio relativo à concentração estimada (EMR ou *Bias*) (equação 6) para cada nível de concentração ou como recuperação percentual [220].

$$EMR (\%) = \frac{(Concentração\ calculada - Concentração\ teórica)}{Concentração\ teórica} \times 100 \quad (\text{equação 6})$$

Em geral, os procedimentos analíticos que revelam tendências devem ser modificados, de modo a eliminar a presença de erros sistemáticos [134]. No entanto, quando se utilizam amostras fortificadas e a estimativa da recuperação, os resultados analíticos devem ser corrigidos para esse erro, de modo a que o resultado final seja rastreável [212]. Neste sentido, foi avaliada a determinação da incerteza associada à recuperação da metodologia MEPS/UHPLC-PDA. Para tal, determinou-se a percentagem de recuperação do método (R_i), ou seja, a razão entre o valor observado (C_{obs}) e o valor esperado (C_{fort}) (equação 7), de forma a investigar a existência de erros sistemáticos, definir fatores de correção e estimar a incerteza associada à recuperação do método analítico [217]. De seguida, procedeu-se ao cálculo da recuperação média (\bar{R}), para cada nível de concentração, segundo a equação 8.

$$R_i = \frac{C_{obs}}{C_{fort}} \quad (\text{equação 7})$$

$$\bar{R} = \frac{\sum_{i=1}^p R_i}{p} \quad (\text{equação 8})$$

Onde, p representa o número de grupos (dias) e R_i é a recuperação média de n replicados obtidos em condições de repetibilidade.

Para cada nível de concentração, averiguou-se se a recuperação média era estatisticamente diferente da unidade (que corresponde a 100%), através da aplicação da ferramenta estatística denominada teste de *t-student* [217, 219]. Deste modo, o valor de teste (t_{exp}) e o valor da incerteza associada à recuperação média ($U_{\%R}$) foram determinados através das equações 9 e 10.

$$t_{exp} = \frac{|1 - \bar{R}|}{U_{\%R}} \quad (\text{equação 9})$$

$$U_{\%R} = \frac{S_{obs}}{\sqrt{p}} \quad (\text{equação 10})$$

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

Após a determinação do valor teste, este foi comparado com o valor t tabelado bilateral (t_{crit}), para $p - 1$ graus de liberdade e um intervalo de confiança de 95%. Se $t_{exp} \leq t_{crit}$, \bar{R} não é, então significativamente diferente de 100% o $U_{\bar{R}}$ é calculado de acordo com a equação 11. Caso contrário, quando $t_{exp} > t_{crit}$ existem diferenças estatisticamente significativas e $U_{\bar{R}}$ é calculado de acordo com a equação 12. Neste último caso, a incerteza é aumentada de forma a contemplar este fator adicional de incerteza [134].

$$U_{\bar{R}} = \frac{U_{\% \bar{R}}}{\bar{R}} \quad (\text{equação 11})$$

$$U_{\bar{R}} = \frac{\sqrt{(U_{\% \bar{R}})^2 + \left(\frac{1 - \bar{R}}{k}\right)^2}}{\bar{R}} \quad (\text{equação 12})$$

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

4.8.6. Eficiência de extração

A eficiência de extração, muitas vezes designada de recuperação ou rendimento de extração, corresponde à capacidade do método analítico para recuperar o analito adicionado à amostra. No fundo, este parâmetro traduz a resposta do detetor, obtida a partir de uma quantidade de analito adicionado e extraído da matriz biológica em relação à resposta desse detetor para a quantidade de analito teoricamente presente (sem extração) [201, 206]. Deste modo, a eficiência de extração do método analítico é calculada a partir da recuperação, sendo o processo tanto mais eficiente quanto mais próximo de 100 %. Contudo, e de acordo com a FDA [206], a recuperação do analito não necessita de ser exatamente 100%, desde que seja reprodutível e o método apresente precisão adequada.

Assim sendo, a avaliação da eficiência de extração foi efetuada mediante a comparação de dois conjuntos de amostras de urina branca, analisadas em triplicado. Num dos conjuntos, as amostras foram fortificadas com os analitos em estudo, nos três níveis de concentração usados no estudo da precisão, sendo posteriormente sujeitas a extração. No segundo conjunto, as amostras de urina foram sujeitas a extração, sendo os extratos posteriormente fortificados (imediatamente antes da evaporação sob corrente de azoto) com os mesmos analitos, nas três gamas de concentração referidas anteriormente. O padrão interno foi adicionado aos dois conjuntos de amostras, após a extração e imediatamente antes da evaporação. Os valores da recuperação de cada analito foram calculados utilizando a equação 13.

$$EE (\%) = \frac{\text{Área relativa}_{\text{ensaio}}}{\text{Área relativa}_{\text{sem extração}}} \times 100 \quad (\text{equação 13})$$

Onde, $\text{Área relativa}_{\text{ensaio}}$ corresponde à razão das áreas cromatográficas (analito/padrão interno) obtidas após a aplicação do processo de extração, e a $\text{Área relativa}_{\text{sem extração}}$ corresponde à razão das áreas cromatográficas (analito/padrão interno) obtidas sem a aplicação do processo de extração.

Capítulo 5

Resultados e Discussão

5. Resultados e Discussão

Ao longo deste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados referentes à análise dos antipsicóticos em estudo, nomeadamente a clozapina, risperidona, norclozapina e 9-hidroxi-risperidona. Numa primeira etapa, procedeu-se à otimização do processo de extração, seguindo-se a validação do método analítico. Por fim, o método otimizado e validado foi aplicado a casos reais.

5.1. Otimização do Processo de Extração

Para obtenção de um processo de extração eficiente, a otimização das diversas variáveis que afetam a performance da MEPS devem ser investigadas. Neste contexto, a natureza do sorvente, o volume da amostra, o número de ciclos de extração, o solvente e o volume de eluição, bem como o pH da amostra foram avaliados neste estudo. Partindo de um procedimento genérico (Ver capítulo 3 secção 3.6), cada etapa do processo de extração foi otimizado usando um *design* experimental univariado.

Para minimizar os erros inerentes ao controle manual, as extrações foram efetuadas através de uma seringa analítica automática eVol® XR, equipada com uma seringa de vidro de capacidade máxima 500 µL e com o respetivo reservatório contendo a fase estacionária (BIN). De salientar que todos os ensaios foram realizados em triplicado e os resultados apresentados correspondem a valores médios.

5.1.1. Natureza do sorvente

A escolha do sorvente adequado na MEPS é um fator importante, uma vez que está diretamente relacionado com a natureza química do analito de interesse e da matriz na qual ele se encontra. Neste contexto, o desempenho de onze fases sólidas disponíveis comercialmente para a MEPS, incluindo as fases de sílica funcionalizada com os grupos etil (C₂), octil (C₈) e octadecil (C₁₈), a sílica não modificada (SIL), as resinas de troca iónica (R-AX e R-CX), o carbono grafitizado poroso (PGC), as fases poliméricas de estireno divinil-benzeno (HLB-DVB, H-DVB e PEP), bem como a mistura de 80 % de C₈ com 20 % de resina de troca catiónica forte (SCX) designada de M₁, foram avaliadas quanto ao seu desempenho na pré-concentração e *clean up* dos analitos de interesse em urina. A Figura 19 ilustra os resultados obtidos na otimização dos diversos sorventes.

Genericamente, as fases C₂-C₁₈ são adequadas para a extração de analitos lipofílicos, enquanto que as fases poliméricas, tais como as DVB ou as fases de modo misto (modo de permuta aniónica-catiónica) são adequadas para analitos de carácter ácido ou básico [221]. Por outro lado, a PGC é adequada para a extração de compostos muito polares, moléculas hidrofílicas, os quais normalmente não são retidos em fase reversa [222].

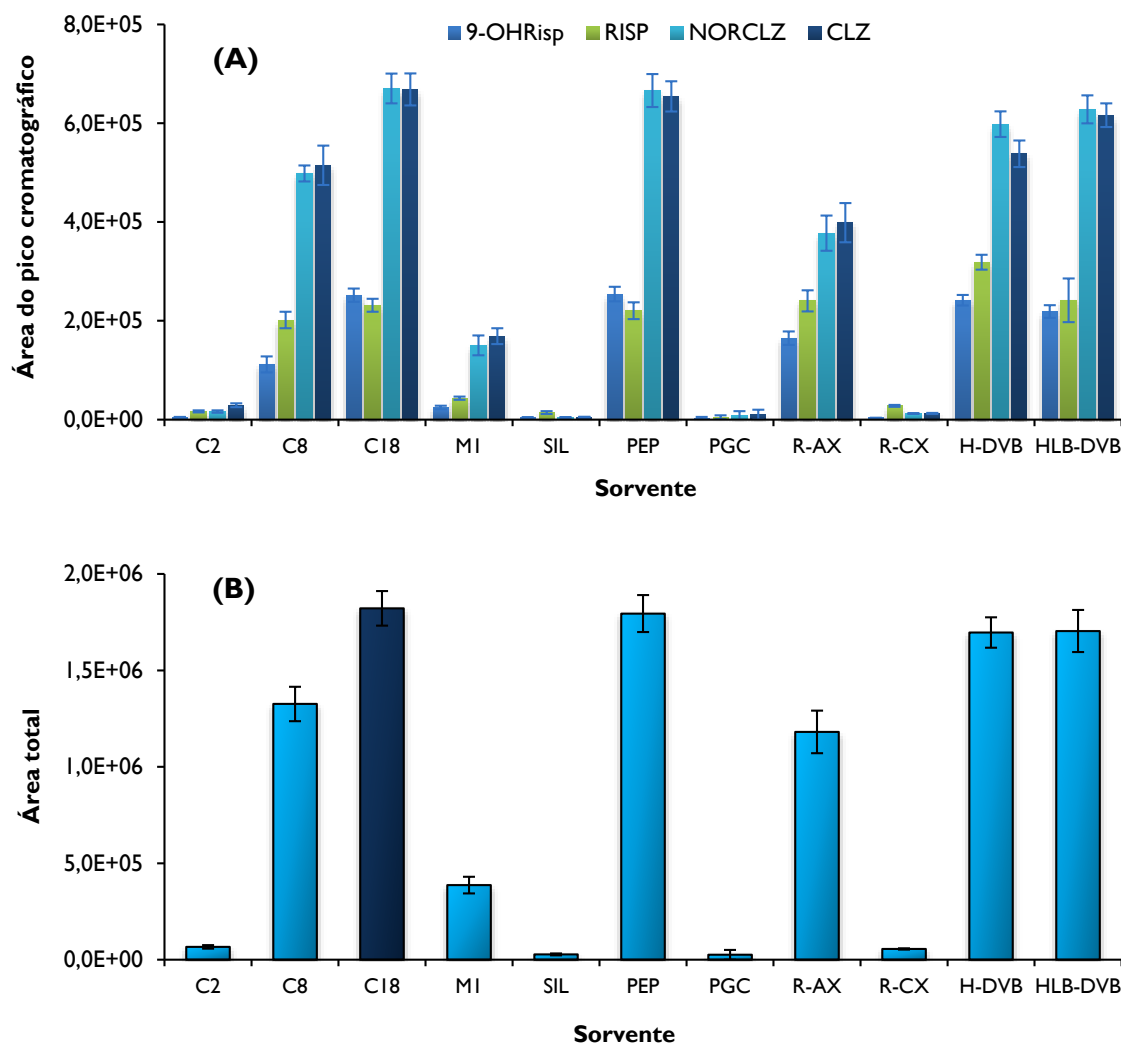


Figura 19. Comparação do desempenho dos diferentes sorvente da MEPS para (A) cada um dos compostos analisados e para (B) a soma das áreas de todos os compostos. Acrónimos: 9-OHRisp - 9-hidroxi-risperidona; RISP - risperidona; NORCLZ - norclozapina e CLZ - clozapina.

Entre os sorventes analisados, verificámos que a C_{18} proporcionou os melhores resultados, em termos de repetibilidade e resposta cromatográfica (área do pico cromatográfico). Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Mercolini *et al.* (2014) [188], onde o sorvente C_{18} apresentou a melhor eficiência de extração para a ziprasidona, um derivado benzisoxazol semelhante à risperidona, em plasma humano. No entanto, devido à baixa seletividade obtida com a C_{18} para esta matriz, os autores escolheram o sorvente C_2 para o procedimento de extração, de modo a contornar este problema. Alternativamente, Mandrioli *et al.* (2011) [94] usaram um sorvente C_8 para a quantificação de risperidona e 9-hidroxi-risperidona em plasma, urina e saliva.

Focando-se no presente estudo, ambos os sorventes C_2 e C_8 apresentaram uma resposta cromatográfica relativamente baixa, quando comparada com a C_{18} e as fases poliméricas PEP, HLB-DVB e H-DVB. No caso destas últimas fases (PEP, HLB-DVB e H-DVB) o *clean-up* da amostra mostrou-se insuficiente face à C_{18} .

Por outro lado, seria de esperar que conseguíssemos melhores resultados com o sorvente M_1 , uma vez que este combina a hidrofobicidade da C_8 com a atração eletrostática dos grupos funcionais carregados da SCX. Na verdade, este foi o sorvente selecionado no trabalho de Fonseca *et al.* (2013) [187] para a extração de 7 antipsicóticos, incluindo a clozapina, em plasma humano. No nosso caso, esperávamos que a combinação da fraca basicidade com as propriedades lipofílicas dos antipsicóticos proporcionasse bons resultados em termos de eficiência de extração. No entanto, os resultados mostraram que os grupos sulfonilo da fase SCX não desempenharam um papel relevante na retenção dos antipsicóticos estudados.

Assim, concluiu-se que o sorvente C_{18} apresentou os melhores resultados, tendo sido este selecionado para os ensaios seguintes.

5.1.2. Influência do número de ciclos de extração e volume de amostra

Genericamente, os procedimentos de MEPS usam um ou mais ciclos de extração, proporcionando uma oportunidade de otimização. Quando a amostra passa diversas vezes pelo sorvente, a interação dos analitos com a fase sólida é maior, possibilitando uma maior eficiência de extração. Neste sentido, o número de ciclos de extração e o volume de amostra foram otimizadas testando um, cinco e dez ciclos em alíquotas de 100, 250 e 500 μL de urina enriquecida com os antipsicóticos (Figura 20). Importante referir que, tal como na otimização dos sorventes, a velocidade do fluxo durante a aspiração foi limitada a 20 $\mu\text{L s}^{-1}$ de forma a prevenir a cavitação e aumentar o tempo de interação do analito com o sorvente, de modo a aumentar a eficiência de extração.

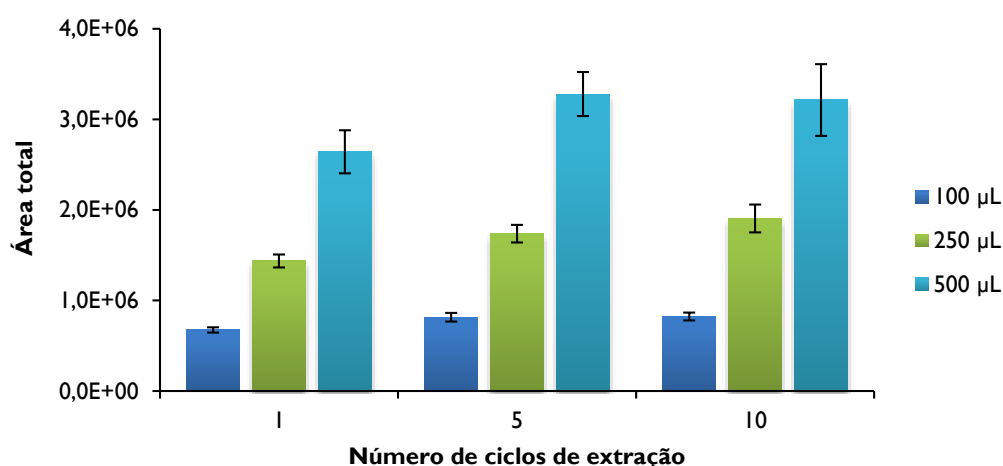


Figura 20. Influência do número de ciclos de extração e volume de amostra no processo MEPS.

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que com o aumento do número de ciclos de extração e do volume de amostra, houve uma maior competição para os sítios ativos do sorvente. No entanto, quando se atingiu os 5 ciclos de extração para um volume de 500 μL de

amostra, constatou-se que o sorvente atinge o ponto de saturação e não são esperadas variações significativas a partir deste ponto. Por esta razão, 5 ciclos de extração e 500 μL de amostra foram selecionados, uma vez que são suficientes para se obter uma boa eficiência de extração e prolongar o tempo de vida do sorvente.

5.1.3. Influência do pH da amostra

A influência do pH da matriz na eficiência de extração é um parâmetro muito importante, uma vez que os fármacos estudados apresentam grupos ionizáveis. Tendo em conta os valores de pKa dos compostos estudados (pKa 7,5-8,5) e a gama de pH suportada pelo sorvente (pH 2-8), o intervalo de pH selecionado para este estudo variou entre 3,4 e 7,4. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 21.

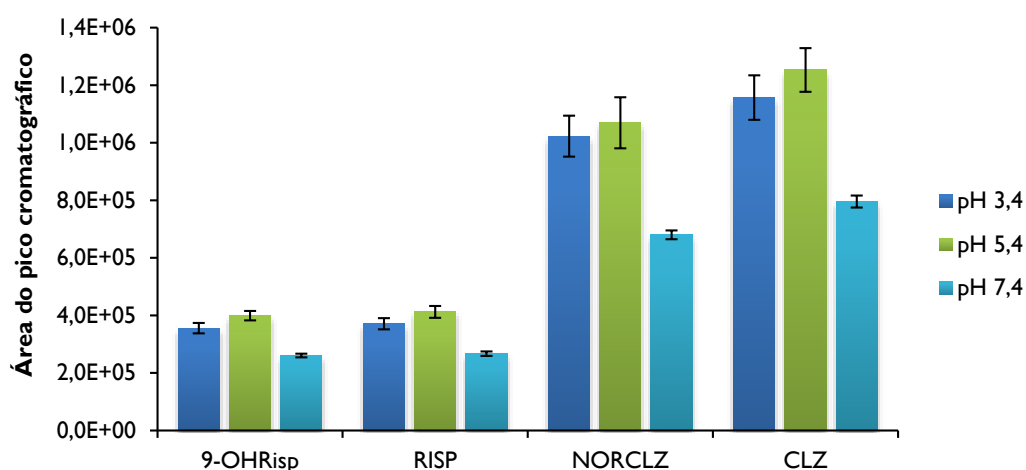


Figura 21. Estudo da influência do pH na eficiência de extração dos antipsicóticos. Acrónimos: 9-OHRisp - 9-hidroxi-risperidona; RISP - risperidona; NORCLZ - norclozapina e CLZ - clozapina.

De acordo com os resultados acima apresentados, constatou-se que a retenção dos analitos é favorecida para valores de pH entre 3,4 e 5,4, enquanto que para valores de pH mais elevados a retenção não é tão eficiente. Este facto surpreendeu-nos, uma vez que esperávamos uma melhor eficiência de extração para valores de pH mais elevados. Tendo em conta o tipo de interações que se estabelece entre os analitos e o sorvente C_{18} , seria de esperar que quanto menor fosse a ionização dos analitos (pH mais elevado), mais favorecidas seriam as interações hidrofóbicas. No entanto, a explicação para este facto pode residir no material de suporte da fase estacionária.

Apesar da grande diversidade de fases sólidas atualmente disponíveis, a maior parte dos sorventes de fase reversa utiliza a sílica como material de suporte. Durante a preparação destas fases, somente uma parte dos grupos silanol presentes na sílica gel reage com os compostos orgânicos de cadeia longa, sobrando uma grande quantidade desses grupos. Estes grupos silanol

residuais possuem, geralmente, propriedades diferentes do grupo imobilizado, alterando, desta forma, as propriedades da fase sintetizada [223, 224]. Apesar destes grupos poderem ser desativados pelo processo de *endcapping*, no qual os grupos silanol reagem com pequenos grupos como o cloro trimetilsilano, as fases reversas tradicionais não sofrem este processo, permitindo que os grupos silanol interajam com os analitos. Uma vez ionizados, os grupos silanol podem facilmente interagir com as bases ionizadas, através de interações eletrostáticas. A Figura 22 mostra, esquematicamente, as interações eletrostáticas entre os grupos silanol ionizados e as substâncias básicas ionizadas.

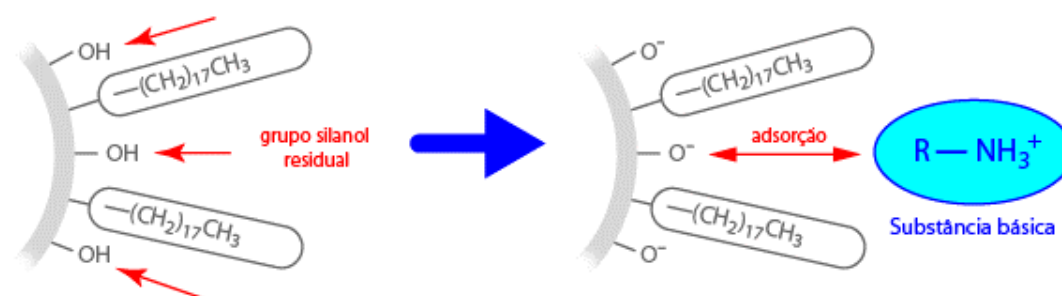


Figura 22. Representação esquemática das interações eletrostáticas das substâncias básicas ionizadas com os grupos silanol ionizados (adaptado de [225]).

Neste sentido, os sorventes baseados em organossilanos de cadeia carbonada longa, apresentam mecanismos de retenção mistos, nomeadamente a partição entre os analitos hidrofóbicos e a cadeia carbonatada e a forte adsorção dos analitos polares nos grupos silanol ativos da superfície da sílica que não foram modificados no processo de organossilanização, devido ao impedimento estérico causado pelo grande volume do modificador (e.g. C_{18}) [226].

Assim sendo, e com base nos resultados obtidos, verifica-se que os grupos silanol desempenharam um papel relevante na adsorção das substâncias em estudo. Adicionalmente, constatou-se que o pH 5,4 apresenta a melhor adsorção de todos os analitos, seguindo-se o pH 3,4. Provavelmente, para valores de pH abaixo de 5,4 o número de cargas positivas em solução é de tal ordem que a repulsão entre os analitos dificulta a sua retenção no sorvente.

Portanto, o pH 5,4 foi o valor selecionado para os próximos ensaios, visto ter sido o que alcançou melhores resultados.

5.1.4. Influência da lavagem

A seleção das melhores condições de lavagem do sorvente constitui um fator crítico no processo de extração, visto que os analitos não podem ser eluídos em conjunto com os interferentes, devendo permanecer retidos na fase sólida. Esta etapa é geralmente realizada com o mesmo solvente usado para equilibrar o sorvente no primeiro passo da extração (água contendo 0,1 % de ácido fórmico) [190]. Contudo, a otimização deste parâmetro é um requisito necessário

para eliminar o maior número de compostos provenientes da matriz que podem interferir no método analítico. Neste sentido, para avaliar esta etapa do processo de extração, testou-se várias soluções, de forma a obter as melhores condições de lavagem. A Tabela 14 apresenta as diferentes soluções testadas.

Tabela 14. Soluções testadas na avaliação no processo de lavagem da MEPS.

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

Abreviaturas: MeOH: metanol; ACN: acetonitrilo; FA: ácido fórmico.

Para além da análise cromatográfica do extrato obtido na eluição, os resíduos produzidos na lavagem do sorvente foram igualmente analisados, de modo a verificar se os analitos em estudo eram eluídos juntamente com os interferentes. Após a análise cromatográfica verificou-se que a solução 3 proporcionou os melhores resultados, removendo grande parte dos interferentes sem afetar a retenção dos analitos de interesse.

Quanto às soluções usadas nos testes 1 e 2, verificou-se que não foram muito eficientes na remoção dos compostos endógenos da matriz, devido à baixa percentagem de fase orgânica. Por outro lado, as soluções 4, 5 e 6 mostraram-se mais eficientes na eliminação de interferentes, contudo, constatou-se que os analitos eluíam juntamente com os interferentes.

Deste modo, a lavagem da MEPS passou a ser realizada através da passagem de 100 µL de água contendo 0,1% de ácido fórmico, seguida de 100 µL de uma solução de 10% de metanol com 90% de água acidificada.

5.1.5. Efeito do solvente e do volume de eluição

A escolha do solvente ou mistura de solventes de eluição é uma tarefa difícil, contudo imprescindível para um bom resultado. Um bom solvente de eluição deve ultrapassar as interações primárias e eventualmente secundárias no qual o analito possa estar sujeito. Adicionalmente, o solvente ideal deve ser capaz de eluir os analitos no mínimo volume possível.

Assim sendo, a avaliação de diferentes solventes, nomeadamente, água contendo 0,1 % de ácido fórmico, metanol, acetonitrilo e diversas combinações entre estes, foram investigadas neste trabalho. Os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 23 sob a forma de diagrama

ternário. A representação gráfica destes resultados foi obtida através do *software* estatístico OriginLab® 9.0. Os pontos negros apresentados no diagrama correspondem às diferentes composições dos três solventes testados. Cada vértice corresponde à concentração pura de solvente (100 %) e zero para os outros dois solventes. A percentagem de cada eluente vai diminuindo linearmente com o aumento da distância a partir do vértice. Os valores do lado direito superior indicam a área total obtida para todos os analitos estudados.

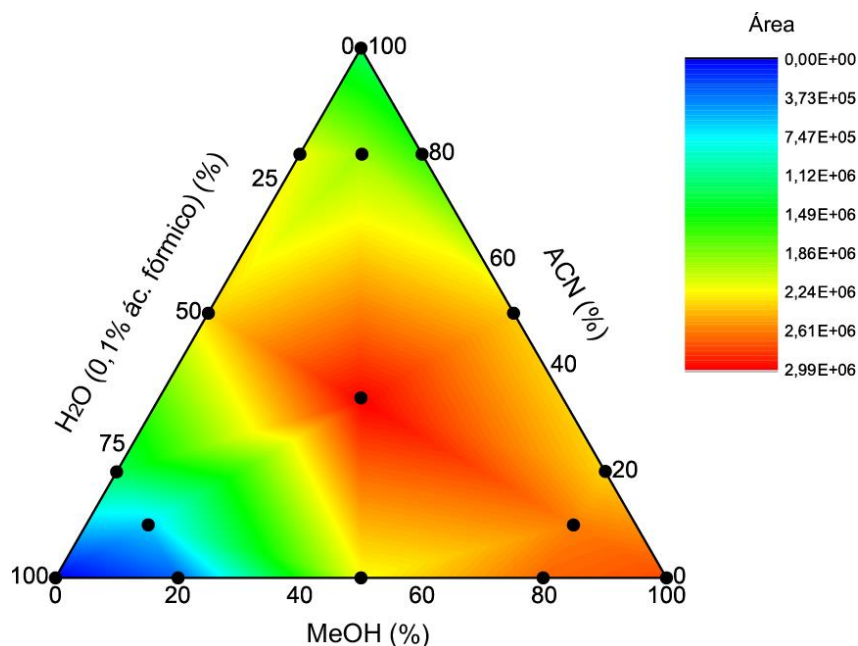


Figura 23. Diagrama ternário do sistema de eluentes utilizado na otimização da MEPS.

De acordo com os resultados, a melhor eficiência de extração foi obtida usando a mistura dos três solventes nas mesmas proporções (33,3:33,3:33,3, v/v/v). Esta combinação de solventes permitiu que as ligações que se estabeleciam entre os analitos e o solvente fossem interrompidas mais facilmente. Por outro lado, a baixa percentagem de fase orgânica em solução ($\leq 20\%$), mostrou ser pouco eficiente na extração dos analitos em estudo.

Uma vez conhecido o melhor sistema de eluentes, testaram-se diferentes volumes de eluição, de forma a eluir os analitos no menor volume possível. Neste sentido, os volumes de eluição avaliados neste estudo variaram entre 100 e 1000 μL e os resultados obtidos encontram-se perceptíveis na Figura 24A. De salientar que após a eluição o solvente foi evaporado até à *secura* sob corrente de azoto e o extrato foi redissolvido com 100 μL de fase móvel.

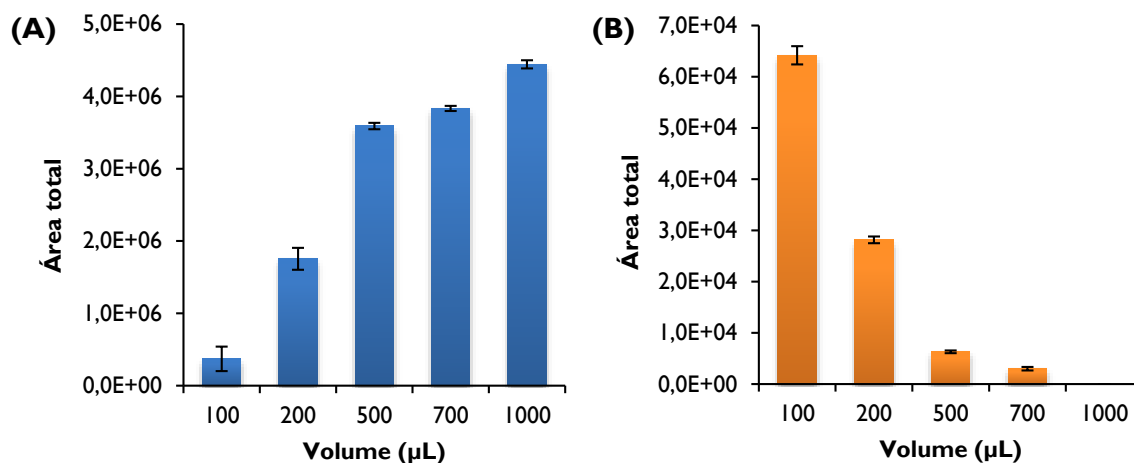


Figura 24. Influência do volume de eluição performance da MEPS. (A) Análise do extrato obtido durante a eluição; (B) Análise do recondicionamento do sorvente.

Paralelamente, os resíduos produzidos no recondicionamento do sorvente foram analisados (Figura 24B), de modo a verificar se os analitos em estudo teriam sido totalmente removidos do sorvente durante a eluição. Após a análise cromatográfica, verificou-se que a eficiência de extração aumentou com o aumento do volume de eluição, sendo o volume de 1000 µL o que apresentou maior área total. Além disso, constatou-se que para os volumes de eluição mais baixos (100-700 µL), os analitos ficavam retidos no sorvente e só eram eluídos na etapa do recondicionamento (Figura 24B).

Portanto, de acordo com os resultados obtidos, as melhores condições de eluição foram conseguidas com 1000 µL de H₂O(0,1% FA):MeOH:ACN (33,3:33,3:33,3, v/v/v) e a MEPS passou a ser efetuada de acordo com o procedimento descrito na Figura 25.

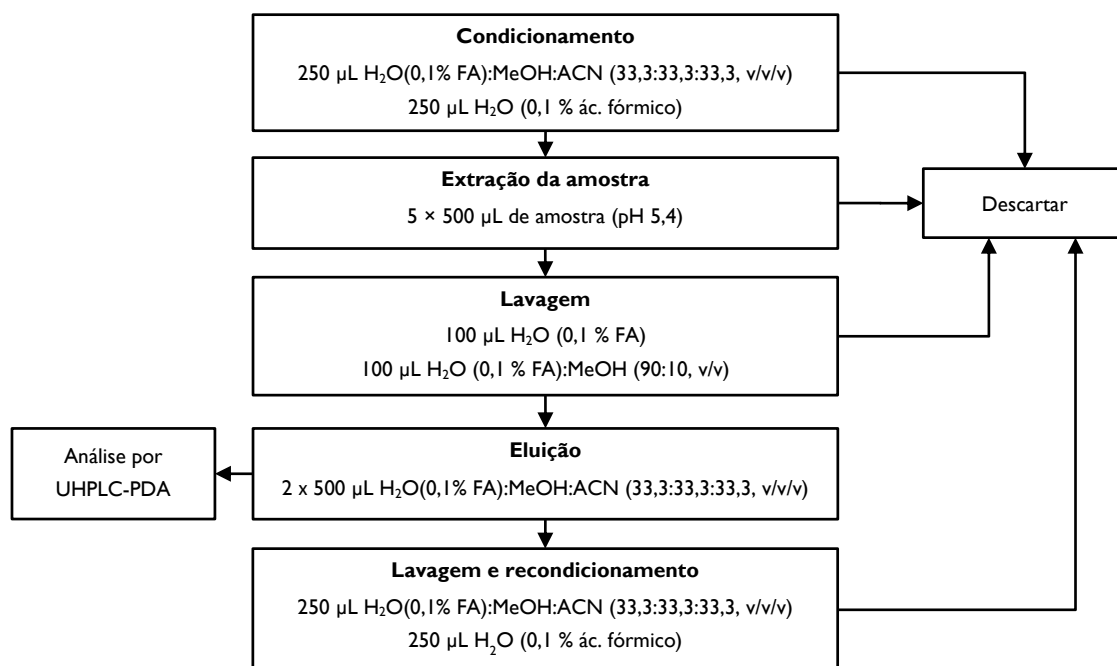


Figura 25. Fluxograma do procedimento MEPS otimizado.

5.2. Validação do Método

O bom desempenho de qualquer técnica analítica depende crucialmente de dois parâmetros: a qualidade das medidas instrumentais e a confiabilidade estatística dos cálculos envolvidos no seu processamento [204]. Uma forma de assegurar a aplicabilidade e o alcance de um método durante as operações de rotina de um laboratório é estabelecendo os limites destes parâmetros por meio da estimativa das figuras de mérito, numa etapa conhecida como validação [204].

5.2.1. Padronização interna

A escolha do padrão interno constitui um desafio analítico, mas vital para o sucesso da metodologia, sobretudo quando está em causa a quantificação de substâncias em amostras reais. Idealmente, o padrão interno deverá ser selecionado tendo em conta as propriedades físico-químicas dos analitos de interesse. Neste sentido, os padrões deuterados análogos às substâncias em estudo são preferíveis por apresentarem propriedades físico-químicas semelhantes, serem compostos que não existem na natureza e que não existirão na amostra. No entanto, a sua disponibilidade e o custo associado aos padrões deuterados impede, muitas vezes, de serem considerados para análises de rotina.

Para contornar este problema, é frequentemente selecionado um fármaco da mesma classe terapêutica como padrão interno, devido às suas propriedades e semelhanças estruturais [227]. No caso dos antipsicóticos, isto é um pouco complicado uma vez que estes fármacos

constituem um grupo muito heterogêneo no que respeita à sua natureza química. Além disso, e dependendo do caso clínico, muitas vezes são administrados concomitantemente dois ou mais antipsicóticos, pelo que a probabilidade de um deles ser o padrão interno selecionado é muito grande. Tendo em conta estes pressupostos, testou-se inicialmente a clonidina, um fármaco usado no tratamento da hipertensão, como padrão interno. Esta escolha teve em conta os trabalhos efetuados por Kirchherr *et al.* (2006) [228] e Vecchione *et al.* (2012) [229], onde a clonidina foi usada como padrão interno na determinação de diversos psicofármacos incluindo os antipsicóticos em estudo. Todavia, os resultados obtidos não foram os esperados, visto que não se obteve uma boa eficiência de extração, nem a resolução cromatográfica mais adequada.

Avaliando os padrões disponíveis no laboratório, optou-se por utilizar a clomipramina, um antidepressivo tricíclico utilizado no tratamento dos estados depressivos, fobias, crises de pânico, entre outros, uma vez que apresentou uma boa resolução cromatográfica, sem interferir com outros analitos. Além disso, a clomipramina pareceu-nos uma boa opção visto que alguns estudos clínicos sugerem que este fármaco tem interação medicamentosa com alguns antipsicóticos, incluindo a clozapina [230] e a risperidona [231, 232], e por essa razão a administração concomitante deve ser evitada. Adicionalmente, a clomipramina (Figura 26) tem uma estrutura tricíclica semelhante à clozapina, que lhe confere algumas propriedades químicas idênticas como a basicidade e a hidrofobicidade.

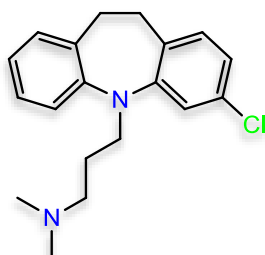


Figura 26. Estrutura química da clomipramina.

5.2.2. Seletividade

A capacidade de um método analítico diferenciar e quantificar um analito na presença de outros componentes na amostra é definida como seletividade, e esta deverá constituir a primeira etapa do método analítico [205]. Neste sentido, para a avaliação da seletividade, 5 *pools* de amostras brancas de urina foram extraídos pelo procedimento de extração descrito anteriormente e analisadas por UHPLC-PDA, onde foram pesquisados interferentes nos mesmos tempos de retenção dos analitos e comprimentos de onda máximo.

Através da análise visual dos cromatogramas (Figura 27), que compreendem o tempo de retenção dos analitos de interesse, verificou-se a ausência de resposta no cromatograma da amostra de urina, o que permitiu concluir que não foram observadas quaisquer interferências de

constituintes da matriz nos tempos de retenção e comprimentos de onda para cada uma das substâncias em estudo.

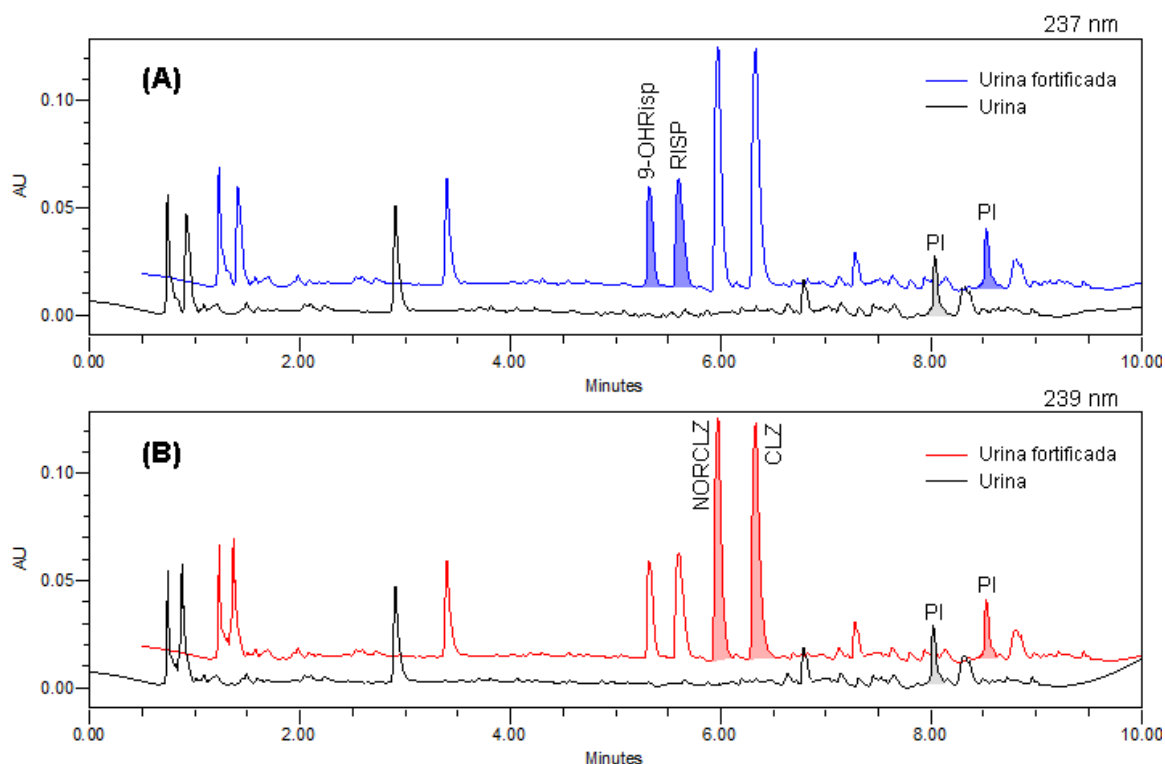


Figura 27. Comparação do perfil cromatográfico de um *pool* de urina com o perfil cromatográfico do mesmo *pool* de urina mas fortificado com os analitos de interesse ($C = 2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) após extração por MEPS; (A) 237 nm e (B) 239 nm. (9-OHRisp - 9-hidroxi-risperidona; RISP - risperidona; NORCLZ - norclozapina; CLZ - clozapina e PI - padrão interno).

A Tabela 15 resume os resultados obtidos da análise cromatográfica dos antipsicóticos clozapina, risperidona e dos respetivos metabolitos ativos, norclozapina e 9-hidroxi-risperidona, distinguindo os tempos de retenção e os respetivos comprimento de onda máximo específicos de cada um deles.

Tabela 15. Tempos de retenção (T_r) e comprimentos de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}}$) dos antipsicóticos em estudo.

Analito	Acrónimo	T_r (min)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
9-hidroxi-risperidona	9-OHRisp	4,796	237
Risperidona	RISP	5,041	237
Norclozapina	NORCLZ	5,378	239
Clozapina	CLZ	5,710	239
Padrão interno (clomipramina)	PI	8,254	252

5.2.3. Linearidade

A capacidade de um método fornecer resultados linearmente proporcionais à concentração de analito, dentro de um determinado intervalo de concentrações, é designada de linearidade e deve ser avaliada durante a validação do método [209]. Para a determinação da linearidade foram efetuadas quatro retas de calibração, uma para cada substância em estudo, com 7 pontos de calibração, numa gama de concentrações que variou entre 0,1 e 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Em cada uma das soluções de calibração foi adicionada a mesma quantidade de padrão interno (2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e os resultados obtidos foram expressos graficamente através da relação entre as áreas relativas (área do analito/área do PI) e a concentração de analito (Figura 28). Importante referir que todos os ensaios foram realizados em triplicado e os resultados apresentados correspondem a valores médios.

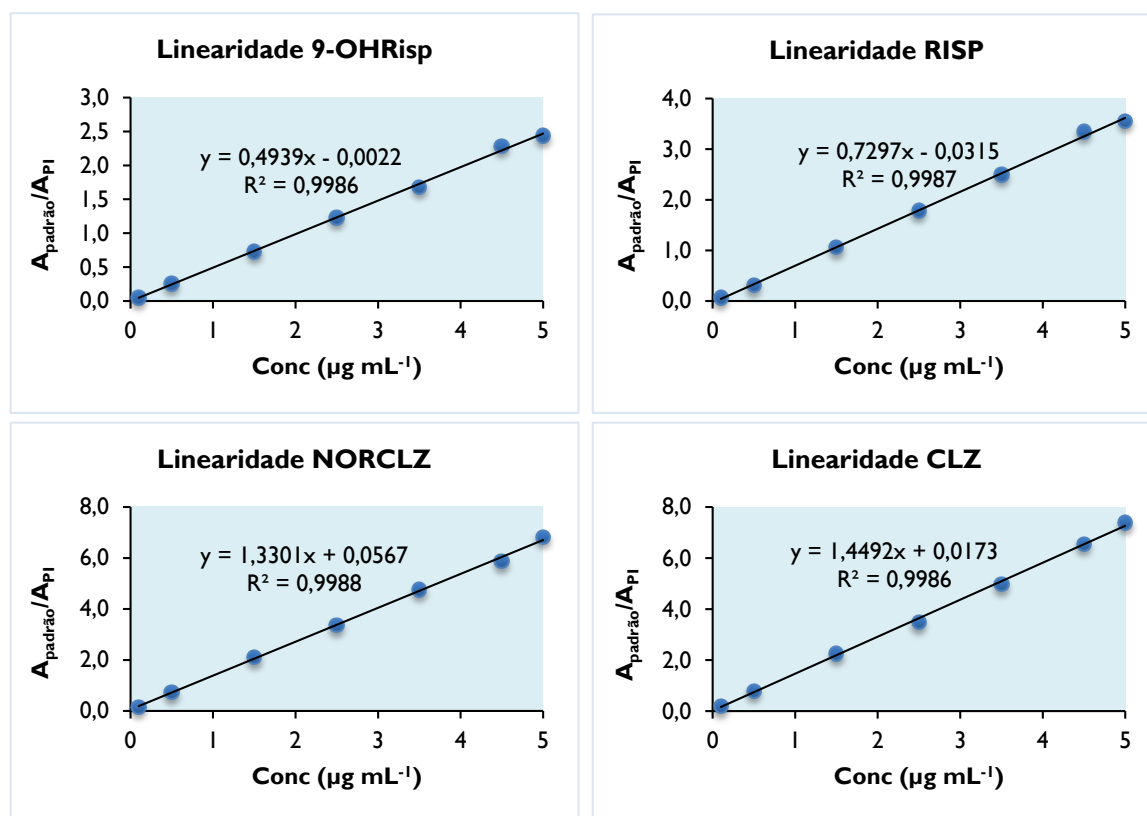


Figura 28. Retas de calibração obtidas para cada antipsicótico.

Uma vez determinada a equação da reta, a linearidade do método pode ser facilmente demonstrada através do estudo estatístico dos parâmetros da reta de calibração. Neste sentido, o declive da reta deve ter um valor estatisticamente diferente de zero, a ordenada na origem não deverá ser estatisticamente diferente de zero e o coeficiente da reta de calibração não deverá ser significativamente diferente de 1 [209]. A estes resultados devem ser aplicados outros testes estatísticos, como o teste de Mandel, a análise de resíduos e a análise de variâncias.

Resultados e Discussão

Neste trabalho os critérios de aceitação das retas de calibração, no que diz respeito à linearidade foram:

- Coeficiente de determinação $\geq 0,995$
- Coeficiente de variação do método $\leq 10\%$
- Valor do teste de análise de resíduos $\pm 10\%$
- Teste de Mandel $VT \leq F_{(0,95;1;N-3)}$

Na Tabela 16 são apresentados os principais resultados obtidos para o estudo da linearidade em amostras de urina. Em anexo, encontram-se tabelas e gráficos detalhados, com valores de áreas, retas de calibração e respectivos tratamentos estatísticos, para cada substância.

Tabela 16. Resumo dos resultados obtidos relativos ao modelo de regressão linear para os antipsicóticos em estudo.

Analitos	Equação da reta	r	r^2	$S_{y/x}^a$	Intervalo de 95% de confiança da ordenada na origem		Teste de Mandel	
					Limite inf.	Limite sup.	VT ^b	$F_{crit} (0,95;1;N-3)^c$
9-OHRisp	$y = 0,4939x - 0,0022$	0,9993	0,9986	0,038	-0,067	0,063	0,13	
RISP	$y = 0,7297x - 0,0315$	0,9994	0,9987	0,054	-0,123	0,060	0,0055	7,71
NORCLZ	$y = 1,3301x + 0,0567$	0,9993	0,9988	0,046	-0,178	0,330	0,49	$F(0,95;1;4)$
CLZ	$y = 1,4492x + 0,0173$	0,9993	0,9986	0,061	-0,300	0,287	1,30	

^a $S_{y/x}$ corresponde ao desvio padrão residual e exprime a dispersão dos valores do sinal instrumental em torno da reta de calibração.

^b VT - valor teste

^c $F_{crit} (0,95;1;N-3)$ - valores tabelados da distribuição F de Fisher/Snedecor, para um grau de confiança de 95%.

Através dos resultados obtidos verifica-se que o método é linear no intervalo de concentrações 0,1 - 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para cada uma das substâncias em estudo. A análise da regressão linear, obtida pelo método dos mínimos quadrados, demonstrou que os valores de r e r^2 foram superiores a 0,995 garantindo, deste modo, o ajuste adequado dos resultados à reta de calibração. Além disso, foi demonstrado que o intervalo de interceção da ordenada na origem não foi estatisticamente diferente do ponto zero.

Relativamente à avaliação da distribuição dos resíduos ao longo dos valores de concentração (ver anexo), não foram observadas tendências, ou seja, todos os resíduos apresentaram um desvio igual ou inferior a 10%, garantindo, desta forma, a homocedasticidade dos resultados. Por outro lado, através do teste de Mandel ou teste de Fisher/Snedecor foi possível demonstrar que o modelo linear proporcionou o melhor ajustamento aos pontos da reta de calibração, comprovando desta forma a linearidade do método analítico.

Paralelamente ao estudo da linearidade, foi possível demonstrar de forma indireta a sensibilidade do método, ou seja, a capacidade do método distinguir, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas [233]. Por outras palavras, a sensibilidade é um parâmetro que traduz a variação da resposta em função de uma variação na concentração da substância a analisar. Deste modo, o método será considerado sensível se pequenas variações na concentração (x) originarem grandes alterações na resposta medida (y) [209]. Sob o ponto de vista prático, a sensibilidade corresponde ao declive da reta e depende, essencialmente, da natureza da substância a analisar e da técnica de deteção utilizada. Deste modo, quanto maior for o declive maior será a sensibilidade do método. Neste sentido, e de acordo com os resultados obtidos podemos concluir que o método é mais sensível para a determinação da clozapina e norclozapina, do que para a risperidona e a 9-hidroxi-risperidona.

5.2.4. Limites de Deteção e Quantificação

Como referido na secção 3.8.3, existem vários métodos para a determinação do LOD e do LOQ. No entanto, para o desenvolvimento de métodos com base em funções lineares, ambos os limites são, normalmente, calculados a partir dos parâmetros da reta de calibração. Neste sentido, o cálculo dos limites de deteção e quantificação foram efetuados com base nas equações 2 e 3 e apresentados na Tabela 17.

Tabela 17. Valores dos LOD e LOQ calculados para cada antipsicótico em estudo.

Antipsicótico	LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
9-OHRisp	0,055	0,17
RISP	0,052	0,16
NORCLZ	0,052	0,16
CLZ	0,055	0,17

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que os valores de LOQ obtidos para todos os antipsicóticos foram superiores ao primeiro ponto da reta de calibração ($0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$). No entanto, como referido na secção 3.8.3, o padrão mais baixo da reta de calibração pode ser aceite como LOQ se a resposta produzida pelo analito for, no mínimo, 5 vezes a resposta da linha de base obtida pela amostra branca e se o pico do analito for identificável, discreto e reproduzível com uma precisão de até 20% e exatidão $\pm 20\%$ do valor de concentração nominal [206]. Deste modo, optou-se por utilizar o primeiro ponto da reta de calibração ($0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$) como o limite inferior de quantificação (LLOQ) para todos os analitos em estudo.

5.2.5. Precisão e Exatidão

Entre os parâmetros de validação do método, a precisão e a exatidão são considerados os mais relevantes, uma vez que, permitem estimar os erros e variações associados aos resultados analíticos [233, 234]. Enquanto que a precisão de um método descreve a proximidade dos valores analíticos em redor da sua média, a exatidão exprime o grau de concordância desses valores em relação ao valor de referência estabelecido como verdadeiro [205]. Sob o ponto de vista prático, a precisão pode ser avaliada em termos de repetibilidade e de precisão intermédia, enquanto que a exatidão pode ser determinada pelo cálculo do erro médio relativo (EMR).

Neste trabalho, a precisão e a exatidão foram avaliadas conjuntamente através da análise de amostras brancas de urina fortificadas com os antipsicóticos em estudo, a três níveis de concentração, incluindo um nível baixo ($0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$), um nível médio ($2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) e um nível alto ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) da reta de calibração. Para cada uma destas concentrações, foram efetuadas 6 réplicas, para avaliar a precisão intra-dia (repetibilidade), enquanto que para a precisão intermédia e a exatidão foram analisadas três réplicas, de cada nível, durante cinco dias não consecutivos ($n = 15$). Depois de aplicado o método, a precisão foi expressa pela medidas de dispersão (desvio padrão e coeficiente de variação), enquanto que a exatidão foi avaliada pelo EMR. Os resultados deste estudo encontram-se descritos nas tabelas 18 e 19.

Tabela 18. Resumo dos resultados obtidos para a determinação da repetibilidade.

Antipsicótico	Nível de Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Média das áreas relativas (área analito/área PI)	Desvio padrão (s)	Repetibilidade (CV %) (n=6)
9-OHRisp	0,1	0,051	0,0092	18
	2,5	1,22	0,044	3,6
	5,0	2,46	0,11	4,4
RISP	0,1	0,069	0,0050	7,2
	2,5	1,76	0,063	3,6
	5,0	3,55	0,16	4,4
NORCLZ	0,1	0,14	0,018	13
	2,5	3,37	0,12	3,7
	5,0	6,8	0,30	4,4
CLZ	0,1	0,18	0,020	12
	2,5	3,64	0,11	2,9
	5,0	6,4	0,12	2,8

Tabela 19. Resumo dos resultados obtidos para a precisão intermédia e exatidão.

Analito	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Repetibilidade (S_r)	Precisão entre ensaios (S_{run})	Precisão intermédia (S_I)	CV (%)	EMR (%)
	Teórica	Obtida					
9-OHRisp	0,1	0,11	0,015	0,008	0,15	11	12
	2,5	2,48	0,094	0,049	0,38	1,0	-0,93
	5,0	5,01	0,087	0,049	0,37	0,2	0,23
RISP	0,1	0,11	0,021	0,008	0,17	13	10
	2,5	2,48	0,046	0,007	0,23	1,1	-0,78
	5,0	5,01	0,056	0,029	0,29	0,3	0,19
NORCLZ	0,1	0,11	0,013	0,012	0,16	12	12
	2,5	2,48	0,053	0,014	0,26	1,1	-0,93
	5,0	5,01	0,088	0,049	0,37	0,3	0,23
CLZ	0,1	0,12	0,013	0,016	0,17	15	20
	2,5	2,46	0,048	0,022	0,26	1,4	-1,5
	5,0	5,02	0,092	0,050	0,38	0,3	0,39

Através da análise dos resultados, pode-se afirmar que a repetibilidade e a precisão intermédia se mantiveram dentro dos valores regulamentados, com um CV igual ou inferior a $\pm 20\%$ no LLOQ e de $\pm 15\%$ nos restantes calibradores [235]. Da mesma forma que os ensaios de precisão, os valores de EMR da exatidão se mantiveram dentro dos valores regulamentados de $\pm 15\%$ da concentração nominal para todos os calibradores e de $\pm 20\%$ da concentração nominal dos LLOQ [235]. Adicionalmente, a presença de erros sistemáticos (tendências) também foi investigada para este parâmetro. Para tal, aplicou-se o teste de *t-student*, de forma a verificar se a recuperação média era estatisticamente diferente da unidade. Os resultados obtidos encontram-se descritos na tabela seguinte.

Tabela 20. Resumo dos resultados obtidos no teste de *t-student* para o estudo dos erros sistemáticos associados à recuperação do método.

Antipsicótico	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	\bar{R}	t_{exp}	Critério de decisão $t_{exp} \leq t_{crit}(N-1; 0,95)$
9-OHRisp	0,1	111	2,16	2,78
	2,5	99		
	5,0	100		
RISP	0,1	110	1,58	2,78
	2,5	99		
	5,0	100		
NORCLZ	0,1	112	1,91	2,78
	2,5	99		
	5,0	100		
CLZ	0,1	120	2,54	2,78
	2,5	98		
	5,0	100		

Os resultados obtidos evidenciam que $t_{exp} < t_{crit}$ para um intervalo de confiança de 95% para todos os compostos estudados, comprovando-se, deste modo, a ausência de erros sistemáticos e a exatidão do método. Além disso, os valores das taxas de recuperação encontram-se no intervalo de valores, definido por uma margem de erro de 20% que varia entre 80 a 120% [210].

5.2.6. Eficiência de Extração

A maioria dos processos de extração levam à perda de analito por partição incompleta ou adsorção, tornando-se, por isso, imprescindível avaliar a capacidade de recuperação do processo analítico, ou seja, a sua eficiência de extração (EE) [209]. Assim sendo, o estudo da eficiência de extração foi realizado segundo o procedimento descrito na secção 3.8.6 e os resultados apresentados na Tabela 21. No que respeita aos critérios de aceitação definidos para este estudo, os valores obtidos devem ser reprodutíveis e preferencialmente com um valor mínimo de 75 %.

Tabela 21. Resultados da eficiência de extração.

Antipsicóticos	EE (%)		
	0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$	2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	5 $\mu\text{g mL}^{-1}$
9-OHRisp	80	94	95
RISP	87	94	94
NORCLZ	83	94	93
CLZ	76	88	96

Recorrendo à Tabela 21, verifica-se que os resultados obtidos para os quatro compostos apresentam recuperações médias na ordem dos 89,8% para a 9-hidroxi-risperidona, 91,5% para a risperidona, 89,8% para a norclozapina e 86,7% para a clozapina. Estes resultados estão de acordo com os reportados na literatura, usando a MEPS na extração de antipsicóticos a partir de amostras biológicas [94, 142, 187, 188].

Apesar dos critérios de aceitação definidos para este estudo, em geral é preferível obter resultados precisos, mesmo que a percentagem de recuperação seja baixa [209]. De acordo com Dadgar *et al.* (1995) [236], por vezes é preferível sacrificar a recuperação do método em prol de uma maior seletividade, desde que o método demonstre ter sensibilidade, precisão e exatidão adequadas.

No entanto, uma vez que os valores de recuperação deste estudo se revelaram satisfatórios, pode-se considerar que a técnica por MEPS é adequada para a extração dos antipsicóticos em amostras de urina.

5.3. Aplicação da metodologia em casos reais

Após a validação analítica, o método otimizado foi aplicado a 23 amostras de urina, provenientes de pacientes internados na Casa de Saúde S. João de Deus do Funchal, sob tratamento com clozapina e/ou risperidona.

Tendo em conta que o tempo de deteção de um fármaco depende essencialmente da dose, da sensibilidade do método utilizado e sua preparação, da via de administração e do tempo de tratamento (crónico ou agudo), neste estudo foram selecionados apenas os pacientes cujo tempo de tratamento era de, pelo menos, 1 ano. A Tabela 22 apresenta alguma informação adicional acerca do tratamento dos pacientes, como os fármacos administrados e respetiva posologia, o tempo de tratamento e o tempo decorrido desde a última administração até à recolha da amostra.

Tabela 22. Informação acerca do tratamento dos pacientes.

Paciente	Idade	Dosagem terapêutica	Via de administração	Tempo de tratamento (anos)	Tempo decorrido desde a última administração
1	30	CLZ 100 mg	Oral	10	Informação indisponível
2	28	RISP 2 mg	Oral	5	Informação indisponível
3	43	RISP 3mg	Oral	15	Informação indisponível
4	65	CLZ 100 mg	Oral	20	Informação indisponível
5	27	CLZ 100 mg	Oral	9	Informação indisponível
6	39	RISP 2 mg	Oral	15	Informação indisponível
7	58	RISP 3 mg	Oral	20	Informação indisponível
8	34	CLZ 100 mg	Oral	7	Informação indisponível
9	50	CLZ 100 mg	Oral	20	Informação indisponível
10	26	CLZ 100 mg	Oral	4	Informação indisponível
11	43	RISP 2 mg	Oral	12	Informação indisponível
12	25	RISP 2 mg	Oral	3	Informação indisponível
13	39	CLZ 100 mg	Oral	15	Informação indisponível
14	35	CLZ 100 mg	Oral	15	Informação indisponível
15	48	CLZ 100 mg	Oral	24	Informação indisponível
16	76	CLZ 100 mg	Oral	21	15 h
17*	40	CLZ 100 mg, RISP 3 mg	Oral	10	15 h
18*	56	CLZ 100 mg; RISP 3 mg	Oral	3	2 h
19*	53	CLZ 100 mg, RISP 3 mg	Oral	3	3 h
20*	45	CLZ 100 mg, RISP 3 mg	Oral	2	4 h
21*	47	RISP 2 mg	Oral	2	30 min
22*	51	CLZ 125 mg e 25 mg	Oral	3	30 min
23*	48	CLZ 100 mg e 25 mg, RISP 3 mg	Oral	3	30 min

* Pacientes cujo tratamento implica a administração concomitante de outros fármacos como por exemplos os antiparkinsonicos, estabilizadores de humor, benzodiazepinas, outros antipsicóticos, etc.

Resultados e Discussão

Para cada amostra foi efetuada a sua preparação em triplicado e injetada no sistema cromatográfico UHPLC-PDA, onde foi efetuada a quantificação dos compostos em estudo. As Figuras 29 e 30 ilustram alguns exemplos representativos de cromatogramas obtidos para algumas amostras. As concentrações dos antipsicóticos são apresentadas na Tabela 23.

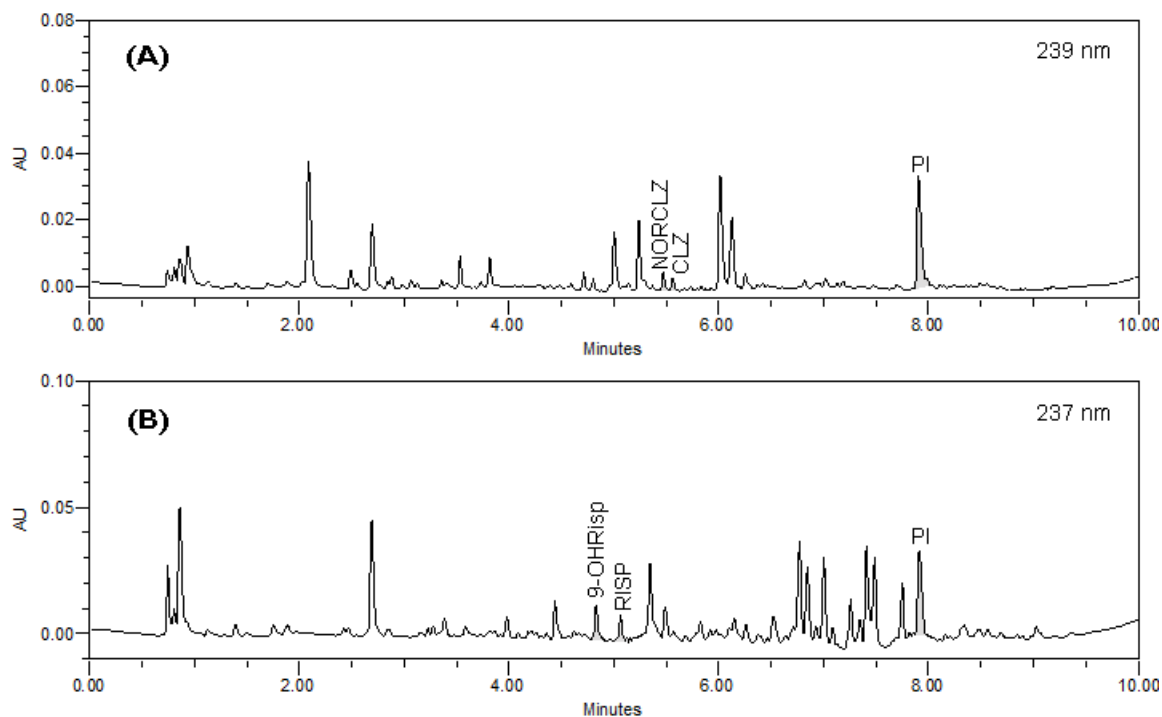


Figura 29. Cromatogramas obtidos das amostras de urina dos pacientes (A) I e (B) 12.

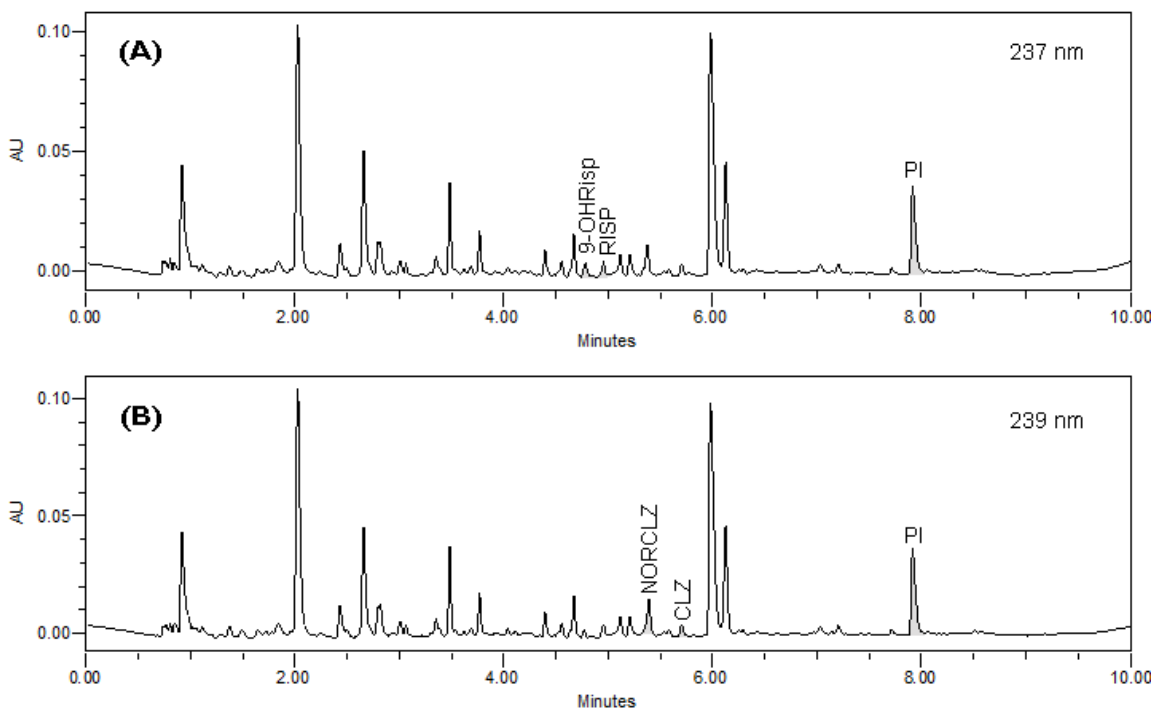


Figura 30. Cromatogramas obtidos da amostra de urina do paciente 18: (A) 237 nm e (B) 239 nm.

Tabela 23. Concentrações obtidas nas amostras de urina provenientes de pacientes sob tratamento com os fármacos risperidona e clozapina.

Paciente	Fármaco administrado	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			
		9-OHRisp	RISP	NORCLZ	CLZ
1	CLZ 100 mg	–	–	$0,49 \pm 0,01$	$0,32 \pm 0,01$
2	RISP 2 mg	$0,76 \pm 0,02$	$1,23 \pm 0,02$	–	–
3	RISP 3mg	<LLOQ	<LLOQ	–	–
4	CLZ 100 mg	–	–	<LLOQ	<LLOQ
5	CLZ 100 mg	–	–	$0,18 \pm 0,01$	<LLOQ
6	RISP 2 mg	$0,32 \pm 0,01$	$0,31 \pm 0,05$	–	–
7	RISP 3 mg	$0,38 \pm 0,01$	<LLOQ	–	–
8	CLZ 100 mg	–	–	$1,53 \pm 0,05$	$0,77 \pm 0,04$
9	CLZ 100 mg	–	–	$1,45 \pm 0,01$	$0,48 \pm 0,09$
10	CLZ 100 mg	–	–	$0,94 \pm 0,19$	$0,86 \pm 0,10$
11	RISP 2 mg	<LLOQ	$0,13 \pm 0,01$	–	–
12	RISP 2 mg	$1,04 \pm 0,05$	$0,80 \pm 0,04$	–	–
13	CLZ 100 mg	–	–	$1,70 \pm 0,02$	$0,92 \pm 0,04$
14	CLZ 100 mg	–	–	$1,94 \pm 0,11$	n.d. ^a
15	CLZ 100 mg	–	–	n.d.	n.d.
16	CLZ 100 mg	–	–	$0,12 \pm 0,01$	<LLOQ
17	CLZ 100 mg, RISP 3 mg	$1,11 \pm 0,04$	$1,38 \pm 0,01$	$1,54 \pm 0,13$	$0,92 \pm 0,02$
18	CLZ 100 mg; RISP 3 mg	$0,29 \pm 0,02$	$0,28 \pm 0,01$	$1,07 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,003$
19	CLZ 100 mg, RISP 3 mg	n.d.	$1,31 \pm 0,08$	$1,08 \pm 0,33$	n.d.
20	CLZ 100 mg, RISP 3 mg	$0,52 \pm 0,04$	$0,23 \pm 0,02$	$2,08 \pm 0,13$	$0,14 \pm 0,01$
21	RISP 2 mg	$0,78 \pm 0,03$	$0,38 \pm 0,02$	–	–
22	CLZ 125 mg e 25 mg	–	–	$0,21 \pm 0,01$	n.d.
23	CLZ 100 mg e 25 mg, RISP 3 mg	$0,27 \pm 0,02$	<LLOQ	$0,45 \pm 0,08$	$0,28 \pm 0,01$

^a n.d. - não detetado

Após a visualização cromatográfica, constatou-se que a forma e resolução dos picos de cada antipsicótico são muito semelhantes aos obtidos usando a amostra de urina branca fortificada. No entanto, verificaram-se algumas interferências próximas aos tempos de retenção dos analitos em estudo. Estas interferências poderão ser outros metabolitos dos antipsicóticos em estudo ou outros compostos provenientes da administração concomitante de outros fármacos.

Relativamente à metodologia por MEPS/UHPLC-PDA, a gama de concentrações encontrada para as amostras de urina provenientes de pacientes em tratamento com risperidona variou entre $0,13$ e $1,38 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o composto principal e entre $0,27$ e $1,11 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o metabolito ativo, 9-hidroxi-risperidona. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Mandrioli *et al.* (2011) [94], na determinação da risperidona e do seu metabolito ativo em amostras de plasma, urina e saliva.

Para as amostras de urina provenientes de pacientes em tratamento com clozapina, o intervalo de concentrações variou entre $0,10$ e $0,92 \mu\text{g mL}^{-1}$ para a clozapina e $0,12$ e $2,08 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o metabolito ativo, norclozapina. Souza *et al.* (2015) [189] obtiveram valores semelhantes

para a determinação da clozapina em amostras de plasma provenientes de pacientes em tratamento com este fármaco.

Deste modo, através da análise das 23 amostras reais, demonstrou-se a aplicabilidade da metodologia analítica descrita neste trabalho.

Capítulo 6

Conclusão

6. Conclusão

Este projeto teve como objetivo desenvolver e validar uma metodologia analítica, baseada na MEPS seguida de análise por UHPLC-PDA, para a detecção e quantificação de clozapina, risperidona e os seus metabolitos ativos, norclozapina e 9-hidroxi-risperidona, em amostras de urina. Depois de uma seleção cuidadosa das condições cromatográficas, foi demonstrado que a separação dos antipsicóticos e dos respetivos metabolitos poderia ser conseguida em menos de 10 min, com uma boa resolução cromatográfica. Além disso, a combinação do curto tempo de corrida com um fluxo na ordem dos 250 $\mu\text{L mL}^{-1}$, permitiu reduzir drasticamente o consumo de solventes, tornando esta técnica, não só mais económica, como também amiga do ambiente. Por outro lado, a detecção por fotodiodos revelou-se uma alternativa económica quando comparada com os equipamentos mais sofisticados e dispendiosos, como por exemplo o detetor de espetrometria de massa, tornando esta metodologia mais acessível a outros laboratórios.

No que diz respeito ao procedimento de extração propriamente dito, a MEPS foi a técnica selecionada para este estudo, dada a sua versatilidade, simplicidade, rapidez e baixo custo, que a torna atrativa do ponto de vista analítico, económico e ambiental. Após a otimização das diversas variáveis que afetam o desempenho da MEPS, a validação desta metodologia foi avaliada, em termos de seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e eficiência de extração. O método validado mostrou um desempenho satisfatório em termos de seletividade, linearidade, eficiência de extração, precisão e exatidão. Além disso, as concentrações de clozapina, risperidona e dos seus metabolitos determinadas em amostras reais, permitiu evidenciar a capacidade do método para identificar e quantificar este tipo de substâncias.

No entanto, o método analítico apresentado pode, em algumas vertentes, ser melhorado. A validação, a título de exemplo, poderia ter integrado a avaliação de outros parâmetros analíticos, não menos importantes, como a estabilidade das substâncias estudadas em ciclos de congelação/descongelação, o que é uma realidade num laboratório de toxicologia. Por outro lado, a preparação das amostras pode ser melhorada com a finalidade de diminuir as interferências que se verificaram durante a análise de algumas amostras reais. Como referido durante a discussão dos resultados, por vezes é preferível sacrificar a recuperação do método em prol de uma maior seletividade, desde que o método demonstre ter sensibilidade, precisão e exatidão adequadas.

De uma forma geral, estes resultados promissores sugerem que esta metodologia pode ser potencialmente útil para quantificar cada uma destas substâncias, assim como outros fármacos, não só em amostras de urina, como também noutras matrizes, constituindo uma alternativa às metodologias convencionais existentes. Adicionalmente, este método pode encontrar uma aplicabilidade relevante na prática clínica, especialmente na monitorização terapêutica bem como no estudo de casos de intoxicação mortais, no âmbito da Toxicologia Forense.

Capítulo 7

Referências Bibliográficas

7. Referências bibliográficas

1. Furtado, C., *Psicofármacos: Evolução do consumo em Portugal Continental (2000 – 2012)*. INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P. p. 20.
2. Pereira, C.S., *Morte por intoxicação medicamentosa - Análise retrospectiva dos casos analisados na Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal, I.P., entre 1996 e 2007*, in *Dissertação para a obtenção do grau de Mestre*. 2009, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra: Coimbra.
3. Ferreira, A.M.R., et al., *Avaliação das intoxicações medicamentosas em Portugal*. Revista da Faculdade de Ciências da Saúde, 2008, **5**: p. 94-110.
4. Saar, E., et al., *The Analysis of Antipsychotic Drugs in Human Biosamples by LC-MS*, in *LC-MS in Drug Bioanalysis*, Q.A. Xu and T.L. Madden, Editors. 2012, Springer Science. p. 177-196.
5. Medipédia, *Conteúdos de Serviços e Saúde*, <http://www.medipedia.pt/>, acessido a 15/04/2015.
6. Atlas da Saúde, *Transtornos Psíquicos*, <http://www.atlasdasaude.pt/>, acessido a 15/04/2015.
7. AstraZeneca, *Educação do doente: Curso de Esquizofrenia*, <http://www.astrazeneca.pt/>, acessido a 24/04/2015.
8. Silva, R.C.B.d., *Esquizofrenia: uma revisão*. Psicologia USP, 2006, **17**: p. 263-285.
9. Portal do cidadão com deficiência, *Associação dá curso para familiares de doentes com esquizofrenia*. <http://www.pcd.pt/index.php>, acessido a 24/04/2015.
10. Jones, A.W., *Perspectives in drug discovery 6. Antipsychotics*. TIAFT Bull, 2011, **41**: p. 16-19.
11. Delay, J., P. Deniker, and J.M. Harl, *Therapeutic method derived from hiberno-therapy in excitation and agitation states*. Ann Med Psychol (Paris), 1952, **110**: p. 267-73.
12. Gomes, A.N. *Saúde Mental e Psiquiatria*. 2014 [12/01/2015]; Available from: <http://www.saudementalepsiquiatria.com/>.
13. Cordioli, A.V. *Psicofármacos nos Transtornos Mentais*. 24/9/2013]; Available from: <https://www.nescon.medicina.ufmg.br/>.
14. Marques-Teixeira, J., *O Futuro da Psiquiatria*. Saúde Mental, 2009, **XI**: p. 7-10.
15. Gama, H., et al., *Use of medicines by homeless people in Porto, Portugal*. Cadernos de Saúde Pública, 2014, **30**: p. 207-212.
16. Tarelho, S., et al. *Is the Psychoactive Drugs Consumption Affected by The Economic Crisis?* in *19th IAFS WORLD MEETING 9th WPMO TRIENNIAL MEETING 5th MAFS MEETING Poster Section*. 2011. Portugal, Madeira, Funchal.
17. Correia, D. *Psiquiatria Lisboa: Antipsicóticos*, <http://www.psiquiatrialisboa.pt/>, acessido a 25/04/2015.
18. Moreira, F.A. and F.S. Guimarães, *Mecanismos de ação dos antipsicóticos: Hipóteses dopaminérgicas*. Medicina, Ribeirão Preto, 2007, **40**: p. 63-71.

19. Rasool, F., R. Ghafoor, and D. Lambert, *Antidepressants and antipsychotics: anaesthetic implications*. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 2011, **12**: p. 166-169.
20. Ginovart, N. and S. Kapur, *Role of Dopamine D2 Receptors for Antipsychotic Activity*, in *Current Antipsychotics*, G. Gross and M.A. Geyer, Editors. 2012, Springer Berlin Heidelberg, p. 27-52.
21. Infarmed, *Evolução do Consumo de Neurolépticos em Portugal Continental de 1995 a 2001: Impacto das Medidas Reguladoras*. 2002, Observatório do Medicamento e dos Produtos de Saúde. p. 20.
22. Instituto de Psicofarmacología, *Antipsicóticos*, <http://institutedepsicofarmacologia.com/>, acessado a 27/04/2015.
23. Gil, P.A.A., *Esquizofrenia*, in *Psiquiatria para estudantes de medicina*, A.C. Neto, Editor. 2003, Edipucrs: Porto Alegre. p. 369-380.
24. Meltzer, H.Y., S. Matsubara, and J.C. Lee, *Classification of typical and atypical antipsychotic drugs on the basis of dopamine D-1, D-2 and serotonin2 pKi values*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1989, **251**: p. 238-246.
25. Seeman, P. and T. Tallerico, *Rapid release of antipsychotic drugs from dopamine D2 receptors: an explanation for low receptor occupancy and early clinical relapse upon withdrawal of clozapine or quetiapine*. *Am J Psychiatry*, 1999, **156**: p. 876-84.
26. Seeman, P., *Atypical antipsychotics: mechanism of action*. *Can J Psychiatry*, 2002, **47**: p. 27-38.
27. Lind, C.P.T.C.K., et al., *Atypical Presentations of Atypical Antipsychotics*. *Psychiatry (Edgmont)*, 2005, **2**: p. 32-39.
28. Seeman, P., *Targeting the dopamine D2 receptor in schizophrenia*. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 2006, **10**: p. 515-531.
29. Nord, M. and L. Farde, *Antipsychotic Occupancy of Dopamine Receptors in Schizophrenia*. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 2011, **17**: p. 97-103.
30. Horacek, J., et al., *Mechanism of action of atypical antipsychotic drugs and the neurobiology of schizophrenia*. *CNS Drugs*, 2006, **20**: p. 389-409.
31. DeLucia, R., et al., *Antipsicóticos*, in *Farmacologia Integrada*, R. De Lucia, Editor. 2008, Clube de Autores. p. 127-132.
32. Bertz, R. and G.R. Granneman, *Use of In Vitro and In Vivo Data to Estimate the Likelihood of Metabolic Pharmacokinetic Interactions*. *Clinical Pharmacokinetics*, 1997, **32**: p. 210-258.
33. Evans, W.E. and M.V. Relling, *Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics*. *Science*, 1999, **286**: p. 487-91.
34. van der Weide, J. and J.W.J. Hinrichs, *The Influence of Cytochrome P450 Pharmacogenetics on Disposition of Common Antidepressant and Antipsychotic Medications*. *Clin Biochem Rev*, 2006, **27**: p. 17-25.

Referências Bibliográficas

35. Saar, E., et al., *The analysis of antipsychotic drugs in human matrices using LC-MS(/MS)*. Drug Testing and Analysis, 2012, **4**: p. 376-394.
36. Barnes, T.R. and D.A. Curson, *Long-term depot antipsychotics. A risk-benefit assessment*. Drug Saf, 1994, **10**: p. 464-79.
37. Infarmed, *Formulário Hospitalar Nacional de Medicamentos*, 9^a edição, <https://www.infarmed.pt>, acessado a 01/05/2015.
38. Ferreira, A., *Esquizofrenia e Análises Forenses. Desenvolvimento de um método analítico para a quantificação de fármacos psicotrópicos por LC-MS/MS*, in *Dissertação para a obtenção do grau de Mestre*. 2011, Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra.
39. Muench, J. and A.M. Hamer, *Adverse Effects of Antipsychotic Medications*. American Family Physician, 2010, **81**: p. 617-622.
40. Abreu, P.B., G. Bolognesi, and N. Rocha, *Prevenção e tratamento de efeitos adversos de antipsicóticos*. Revista Brasileira de Psiquiatria, 2000, **22**: p. 41-44.
41. WHO, *Pharmacological Treatment of Mental Disorders in Primary Health Care*. World Health Organization, in *Medicines used in psychotic disorders*. 2009: Geneva.
42. Herrick-Davis, K., E. Grinde, and M. Teitler, *Inverse Agonist Activity of Atypical Antipsychotic Drugs at Human 5-Hydroxytryptamine_{2C} Receptors*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2000, **295**: p. 226-232.
43. Jickells, S. and A. Negrusz, *Clarke's Analytical Forensic Toxicology*. 1st ed. 2008, London: Pharmaceutical Press. 672.
44. DrugBank, <http://www.drugbank.ca/>, acessado a 07/05/2015.
45. Cheng, Y.F., et al., *Clinical pharmacokinetics of clozapine in chronic schizophrenic patients*. Eur J Clin Pharmacol, 1988, **34**: p. 445-9.
46. Choc, M.G., et al., *Single- vs multiple-dose pharmacokinetics of clozapine in psychiatric patients*. Pharm Res, 1990, **7**: p. 347-51.
47. Byerly, M.J. and C.L. DeVane, *Pharmacokinetics of clozapine and risperidone: a review of recent literature*. J Clin Psychopharmacol, 1996, **16**: p. 177-87.
48. Jann, M., et al., *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Clozapine*. Clinical Pharmacokinetics, 1993, **24**: p. 161-176.
49. Pirmohamed, M., et al., *Metabolism and bioactivation of clozapine by human liver in vitro*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1995, **272**: p. 984-990.
50. Raaska, K., *Pharmacokinetic Interactions of Clozapine in Hospitalized Patients*. 2003, University of Helsinki: University of Helsinki, Department of Clinical Pharmacology. 111.

51. Chang, W.-H., et al., *Reversible metabolism of clozapine and clozapine N-oxide in schizophrenic patients*. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 1998, **22**: p. 723-739.
52. Schaber, G., et al., *Pharmacokinetics of clozapine and its metabolites in psychiatric patients: plasma protein binding and renal clearance*. British Journal of Clinical Pharmacology, 1998, **46**: p. 453-459.
53. Wagstaff, A. and H. Bryson, *Clozapine*. CNS Drugs, 1995, **4**: p. 370-400.
54. Baldessarini, R.J. and F.R. Frankenburg, *Clozapine. A novel antipsychotic agent*. N Engl J Med, 1991, **324**: p. 746-54.
55. Tugnait, M., et al., *Characterization of the human hepatic cytochromes P450 involved in the in vitro oxidation of clozapine*. Chemico-Biological Interactions, 1999, **118**: p. 171-189.
56. Olesen, O.V. and K. Linnet, *Fluvoxamine-Clozapine drug interaction: inhibition in vitro of five cytochrome P450 isoforms involved in clozapine metabolism*. J Clin Psychopharmacol, 2000, **20**: p. 35-42.
57. Fang, J., et al., *Elucidation of individual cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of clozapine*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1998, **358**: p. 592-9.
58. Tugnait, M., et al., *N-oxygenation of clozapine by flavin-containing monooxygenase*. Drug Metab Dispos, 1997, **25**: p. 524-7.
59. Kurz, M., et al., *Long-term pharmacokinetics of clozapine*. Br J Psychiatry, 1998, **173**: p. 341-4.
60. Centorrino, F., et al., *Clozapine and metabolites: concentrations in serum and clinical findings during treatment of chronically psychotic patients*. J Clin Psychopharmacol, 1994, **14**: p. 119-25.
61. Frota, L.H., *Cinqüenta anos de medicamentos antipsicóticos em psiquiatria*. 2003, Rio de Janeiro: Instituto de Psiquiatria - IPUB/UFRJ. 486.
62. Infomed - Base de dados de medicamentos, <https://www.infarmed.pt/infomed/inicio.php>, acessado a 08/05/2015.
63. Diagnosia: Risperidona, <http://www.diagnosia.com/pt/>, acessado a 08/05/2015.
64. Heykants, J., et al., *The pharmacokinetics of risperidone in humans: a summary*. J Clin Psychiatry, 1994, **55 Suppl**: p. 13-7.
65. Álamo, C. and F. López-Muñoz, *The Pharmacological Role and Clinical Applications of Antipsychotics' Active Metabolites: Paliperidone versus Risperidone*. Clinical and Experimental Pharmacology, 2013, **3**: p. 117.
66. Yasui-Furukori, N., et al., *Different enantioselective 9-hydroxylation of risperidone by the two human CYP2D6 and CYP3A4 enzymes*. Drug Metab Dispos, 2001, **29**: p. 1263-8.

Referências Bibliográficas

67. Bork, J.A., et al., *A pilot study on risperidone metabolism: the role of cytochromes P450 2D6 and 3A*. J Clin Psychiatry, 1999, **60**: p. 469-76.
68. DeVane, C.L. and C.B. Nemeroff, *An evaluation of risperidone drug interactions*. J Clin Psychopharmacol, 2001, **21**: p. 408-16.
69. Mertins, P.A.G., *Abordagem farmacogenômica na doença de Alzheimer: variação genética associada a CYP2D6*, in *Dissertação para a obtenção do grau de Mestre*. 2010, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. p. 66.
70. Guzey, C., T. Aamo, and O. Spigset, *Risperidone metabolism and the impact of being a cytochrome P450 2D6 ultrarapid metabolizer*. J Clin Psychiatry, 2000, **61**: p. 600-1.
71. Csernansky, J.G., R. Mahmoud, and R. Brenner, *A comparison of risperidone and haloperidol for the prevention of relapse in patients with schizophrenia*. N Engl J Med, 2002, **346**: p. 16-22.
72. Owens, D.G., *Extrapyramidal side effects and tolerability of risperidone: a review*. J Clin Psychiatry, 1994, **55 Suppl**: p. 29-35.
73. Kleinberg, D.L., et al., *Prolactin levels and adverse events in patients treated with risperidone*. J Clin Psychopharmacol, 1999, **19**: p. 57-61.
74. Turrone, P., et al., *Elevation of prolactin levels by atypical antipsychotics*. Am J Psychiatry, 2002, **159**: p. 133-5.
75. Huang, M.-L., et al., *Pharmacokinetics of the novel antipsychotic agent risperidone and the prolactin response in healthy subjects*. Clinical Pharmacology & Therapeutics, 1993, **54**: p. 257-268.
76. Portal da Educação: *Toxicologia de Medicamentos*, <http://www.portaleducacao.com.br/>, acessado a 09/05/2015.
77. Silva, D.F.M.D., *Monitorização Terapêutica de Fármacos: relevância clínica e forense*, in *Dissertação para a obtenção do grau de Mestre*. 2014, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.
78. Baumann, P., et al., *The AGNP-TDM expert group consensus guidelines: therapeutic drug monitoring in psychiatry*. Pharmacopsychiatry, 2004, **37**: p. 243-65.
79. Mali, N., M. Karpe, and V. Kadam, *A review on biological matrices and analytical methods used for determination of drug of abuse*. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 2011, **1**: p. 58-65.
80. Chamberlain, J., *The Analysis of Drugs in Biological Fluids*. 2nd ed. 1995: Taylor & Francis. 368.
81. Leite, M., *Desenvolvimento e Optimização de uma Metodologia Analítica para a Determinação de α - e β -Amanitina em urina humana por LC-MS/MS*, in *Dissertação para a obtenção do grau de Mestre*. 2011, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.
82. Kintz, P. and B. Ludes, *S4/L4 - Applications of alternative matrices (hair, saliva, sweat ...) in forensic toxicology*. Toxicology Letters, 1998, **95, Supplement 1**: p. 6.

83. Prior, J.A.V., D.S.M. Ribeiro, and J.L. Santos, *Controlo químico de bebidas adulteradas em crimes facilitados com drogas*. Acta Farmacêutica Portuguesa, 2013, **2**: p. 61-74.
84. Jones, G., *Postmortem toxicology*, in *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*, A.C. Moffat, M.D. Osselton, and B. Widdop, Editors. 2003, Pharmaceutical Press: London. p. 94-108.
85. Queiroz, S.C.N., C.H. Collins, and I.C.S.F. Jardim, *Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica*. Química Nova, 2001, **24**: p. 68-76.
86. Wietecha-Postuszny, R., et al., *Application of microextraction by packed sorbent to isolation of psychotropic drugs from human serum*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2012, **402**: p. 2249-2257.
87. Almeida, C., et al., *Novas perspectivas na preparação de amostras para análise cromatográfica*. Química : Boletim da Sociedade Portuguesa de Química, 2004, **95**: p. 69-77.
88. Nováková, L., *UHPLC in Modern Bioanalysis*, in *UHPLC in Life Sciences*, D. Guilleme and J.-L. Veuthey, Editors. 2012, The Royal Society of Chemistry: Cambridge. p. 237-282.
89. Kole, P.L., et al., *Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods*. Biomedical Chromatography, 2011, **25**: p. 199-217.
90. Zhang, G., A.V.T. Jr, and M.G. Bartlett, *Bioanalytical methods for the determination of antipsychotic drugs*. Biomedical Chromatography, 2008, **22**: p. 671-687.
91. Kumazawa, T., et al., *Determination of phenothiazines in human body fluids by solid-phase microextraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. Journal of Mass Spectrometry, 2000, **35**: p. 1091-1099.
92. Kruggel, S. and S. Ulrich, *Solid-Phase Microextraction for the Assay of Levomepromazine in Human Plasma*. Therapeutic Drug Monitoring, 2000, **22**: p. 723-728.
93. Usui, K., et al., *Rapid drug extraction from human whole blood using a modified QuEChERS extraction method*. Legal medicine (Tokyo, Japan), 2012, **14**: p. 286-296.
94. Mandrioli, R., et al., *Analysis of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in human plasma, urine and saliva by MEPS-LC-UV*. Journal of Chromatography B, 2011, **879**: p. 167-173.
95. Fonseca, B.M., et al., *Determination of seven selected antipsychotic drugs in human plasma using microextraction in packed sorbent and gas chromatography–tandem mass spectrometry*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2013, **405**: p. 3953-3963.
96. Santos, A., et al. *Bioquímica Prática - Protocolo para análise de biomoléculas e exercícios complementares*. 2013; Available from: <http://gurupi.ufma.br:8080/jspui/handle/1/445>.
97. Zhang, Y., et al., *[Determination of 61 central nervous system drugs in plasma by protein precipitation-high performance liquid chromatography]*. Se Pu, 2009, **27**: p. 787-93.

98. Nielsen, M.K.K. and S.S. Johansen, *Determination of Olanzapine in Whole Blood Using Simple Protein Precipitation and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*. Journal of Analytical Toxicology, 2009, **33**: p. 212-217.
99. Phapale, P.B., et al., *Liquid chromatography–tandem mass spectrometry quantification of levosulpiride in human plasma and its application to bioequivalence study*. Journal of Chromatography B, 2010, **878**: p. 2280-2285.
100. Caloro, M., et al., *An improved simple LC–MS/MS method for the measurement of serum aripiprazole and its major metabolite*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2012, **62**: p. 135-139.
101. Ansermot, N., et al., *Fast quantification of ten psychotropic drugs and metabolites in human plasma by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for therapeutic drug monitoring*. Journal of Chromatography A, 2013, **1292**: p. 160-172.
102. Juenke, J.M., et al., *Simultaneous UPLC–MS/MS assay for the detection of the traditional antipsychotics haloperidol, fluphenazine, perphenazine, and thiothixene in serum and plasma*. Clinica Chimica Acta, 2013, **423**: p. 32-34.
103. Gradinaru, J., et al., *Quantification of typical antipsychotics in human plasma by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for therapeutic drug monitoring*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2014, **88**: p. 36-44.
104. Hasselstrøm, J., *Quantification of antidepressants and antipsychotics in human serum by precipitation and ultra high pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography B, 2011, **879**: p. 123-128.
105. Uřinová, R., et al., *Liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determination of five antidepressants and four atypical antipsychotics and their main metabolites in human serum*. Journal of Chromatography B, 2012, **907**: p. 101-107.
106. Stevens, J., et al., *Online solid phase extraction with liquid chromatography–tandem mass spectrometry to analyze remoxipride in small plasma-, brain homogenate-, and brain microdialysate samples*. Journal of Chromatography B, 2010, **878**: p. 969-975.
107. Sampedro, M.C., et al., *Screening and quantification of antipsychotic drugs in human brain tissue by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: Application to postmortem diagnostics of forensic interest*. Forensic Science International, 2012, **219**: p. 172-178.
108. Taylor, P.J., *Method development and optimization of LC-MS*, in *Applications of LC-MS in Toxicology*, A. Poletti, Editor. 2006, Pharmaceutical Press: London. p. 23-42.
109. Pinto, M.M.M., et al., *Manual de Trabalhos Laboratoriais de Química Orgânica e Farmacêutica*. 2011, Lisboa: Lidel - Edições Técnicas Lda. . 462.

110. Prabu, S.L. and T.N.K. Suriyaprakash, *Extraction of Drug from the Biological Matrix: A Review*, in *Applied Biological Engineering - Principles and Practice*, G.R. Naik, Editor. 2012, InTech. p. 479-506.
111. Zhang, G., *Novel strategies for bioanalysis of hydrophobic antipsychotic drugs and hydrophilic oligonucleotide macromolecules*, in *Pharmaceutical and Biomedical Sciences*. 2007, University of Georgia. p. 245.
112. Saar, E., et al., *Comparison of extraction efficiencies and LC–MS–MS matrix effects using LLE and SPE methods for 19 antipsychotics in human blood*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009, **393**: p. 727-734.
113. Nirogi, R.V.S., et al., *Development and validation of a sensitive liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry assay for the quantification of olanzapine in human plasma*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, **41**: p. 935-942.
114. Kollroser, M., et al., *HPLC-ESI-MS/MS determination of zuclopenthixol in a fatal intoxication during psychiatric therapy*. *Forensic Science International*, 2001, **123**: p. 243-247.
115. Gervasini, G., et al., *Applicability of an Assay for Routine Monitoring of Highly Variable Concentrations of Olanzapine Based on HPLC with Mass Spectrometric Detection*. *Clinical Chemistry*, 2003, **49**: p. 2088-2091.
116. Kubo, M., et al., *Development and validation of an LC–MS/MS method for the quantitative determination of aripiprazole and its main metabolite, OPC-14857, in human plasma*. *Journal of Chromatography B*, 2005, **822**: p. 294-299.
117. Garay Garcia, L., et al., *Simultaneous determination of four antipsychotic drugs in plasma by high-performance liquid chromatography: Application to management of acute intoxications*. *Journal of Chromatography B*, 2003, **795**: p. 257-264.
118. Zhang, G., A.V. Terry Jr, and M.G. Bartlett, *Sensitive liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the determination of the lipophilic antipsychotic drug chlorpromazine in rat plasma and brain tissue*. *Journal of Chromatography B*, 2007, **854**: p. 68-76.
119. Zhang, G., A.V. Terry, and M.G. Bartlett, *Liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of olanzapine, risperidone, 9-hydroxyrisperidone, clozapine, haloperidol and ziprasidone in rat plasma*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2007, **21**: p. 920-928.
120. Josefsson, M., et al., *Liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for determination of olanzapine and N-desmethyloanzapine in human serum and cerebrospinal fluid*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2010, **53**: p. 576-582.

121. Al-Dirbashi, O.Y., et al., *Rapid liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for quantification of ziprasidone in human plasma*. Biomedical Chromatography, 2006, **20**: p. 365-368.
122. Suckow, R.F., et al., *Determination of plasma ziprasidone using liquid chromatography with fluorescence detection*. Journal of Chromatography B, 2004, **799**: p. 201-208.
123. Zhang, L., et al., *The Validation of an LC-MS Method for the Determination of Risperidone and its Active Metabolite 9-Hydroxyrisperidone in Human Plasma*. Chromatographia, 2005, **61**: p. 245-251.
124. Huang, M.-z., et al., *Determination of risperidone in human plasma by HPLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study in Chinese volunteers*. Journal of Zhejiang University Science B, 2008, **9**: p. 114-120.
125. Higashi, Y., S. Nakamura, and Y. Fujii, *Sensitive determination of 4-(4-chlorophenyl)-4-hydroxypiperidine, a metabolite of haloperidol, in a rat biological sample by HPLC with fluorescence detection after pre-column derivatization using 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole*. Biomedical Chromatography, 2006, **20**: p. 964-970.
126. Lin, S.-N., et al., *A Liquid Chromatographic-Electrospray-Tandem Mass Spectrometric Method for Quantitation of Quetiapine in Human Plasma and Liver Microsomes: Application to a Study of In Vitro Metabolism*. Journal of Analytical Toxicology, 2004, **28**: p. 443-448.
127. Aravagiri, M., S.R. Marder, and B. Pollock, *Determination of ziprasidone in human plasma by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry and its application to plasma level determination in schizophrenia patients*. Journal of Chromatography B, 2007, **847**: p. 237-244.
128. Titier, K., et al., *Simplified high-performance liquid chromatographic method for determination of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in plasma after overdose*. Journal of Chromatography B, 2002, **772**: p. 373-378.
129. Kishikawa, N., et al., *Determination of haloperidol and reduced haloperidol in human serum by liquid chromatography after fluorescence labeling based on the Suzuki coupling reaction*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2006, **386**: p. 719-724.
130. Titier, K., et al., *High-performance liquid chromatographic method with diode array detection to identify and quantify atypical antipsychotics and haloperidol in plasma after overdose*. Journal of Chromatography B, 2003, **788**: p. 179-185.
131. Fernandes, S.C.S., *Determinação de Sertralina, Venlafaxina e seus Metabólitos Activos, em Sangue e Urina, por UPLC-MS/MS*, in *Dissertação para a obtenção do grau de Mestre*. 2013, Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

132. Żwir-Ferenc, A. and M. Biziuk, *The Solid Phase Extraction Technique – Trends, Opportunities and Applications*. Polish Journal of Environmental Studies, 2006, **15**: p. 677-690.
133. Thurman, E.M. and M.S. Mills, *Solid-Phase Extraction: Principles and Practice*. 1998, New York: John Wiley & Sons, Inc.
134. Escada, M.S.d.S., *Métodos de análise de piperazinas em fluidos biológicos*, in *Dissertação para a obtenção do grau de Mestre*. 2007, Departamento de Química da Universidade de Aveiro.
135. Supelco. Bulletin 910: Guide to Solid Phase Extraction. 1998 29-03-2015]; Available from: <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>.
136. Araújo, R.M.d.S.C.G.d., *Validação de metodologia de análise de pesticidas agrícolas em águas por LC/MS*, in *Faculdade de Engenharia*. 2008, Universidade do Porto. p. 59.
137. Valente, I.M.A., *Desenvolvimento de metodologias analíticas para a determinação de off-flavours em bebidas*, in *Dissertação de tese para obtenção do grau de Doutor*. 2014, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. p. 199.
138. Aboul-Enein, H.Y., M.M. Hefnawy, and K. Nakashima, *Chromatographic methods for the analysis of drugs in biological fluids*, in *Drug Monitoring and Clinical Chemistry*, G. Hempel, Editor. 2004, Elsevier: The Netherlands. p. 15-69.
139. Niederländer, H.A.G., et al., *High throughput therapeutic drug monitoring of clozapine and metabolites in serum by on-line coupling of solid phase extraction with liquid chromatography–mass spectrometry*. Journal of Chromatography B, 2006, **834**: p. 98-107.
140. Olesen, O.V. and B. Poulsen, *On-line fully automated determination of clozapine and desmethylclozapine in human serum by solid-phase extraction on exchangeable cartridges and liquid chromatography using a methanol buffer mobile phase on unmodified silica*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 1993, **622**: p. 39-46.
141. Weigmann, H., et al., *Simultaneous determination of olanzapine, clozapine and demethylated metabolites in serum by on-line column-switching high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 2001, **759**: p. 63-71.
142. Mercolini, L., et al., *Simultaneous determination of the antipsychotic drugs levomepromazine and clozapine and their main metabolites in human plasma by a HPLC-UV method with solid-phase extraction*. Journal of Chromatography B, 2007, **846**: p. 273-280.
143. Torres V, P., M.J. Sepúlveda C, and C. Von Plessing R, *Pharmacokinetic study of risperidone: Application of a hplc method with solid phase extraction*. Journal of the Chilean Chemical Society, 2011, **56**: p. 606-609.
144. De Meulder, M., et al., *Validated LC–MS/MS methods for the determination of risperidone and the enantiomers of 9-hydroxyrisperidone in human plasma and urine*. Journal of Chromatography B, 2008, **870**: p. 8-16.

Referências Bibliográficas

145. Locatelli, I., A. Mrhar, and I. Grabnar, *Simultaneous determination of risperidone and 9-hydroxyrisperidone enantiomers in human blood plasma by liquid chromatography with electrochemical detection*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2009, **50**: p. 905-910.
146. Patteet, L., et al., *Advances in detection of antipsychotics in biological matrices*. *Clinica Chimica Acta*, 2015, **441**: p. 11-22.
147. Anastassiades, M., et al., *Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce*. *J AOAC Int*, 2003, **86**: p. 412-31.
148. Cabrera, L.d.C., et al., *Extração em Fase Sólida Dispersiva na determinação de resíduos e contaminantes em alimentos*. *Scientia Chromatographica*, 2012, **4**: p. 227-240.
149. Stenerson, K., R. Wolford, and O. Shimelis *Extraction and Analyses of Agricultural Pesticides from Oranges Using the "QuEChERS" Method*. *The Reporter, Supelco*. **24.3**, 3-5.
150. Westland, J.L. and F.L. Dorman, *QuEChERS extraction of benzodiazepines in biological matrices*. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2013, **3**: p. 509-517.
151. Plössl, F., M. Giera, and F. Bracher, *Multiresidue analytical method using dispersive solid-phase extraction and gas chromatography/ion trap mass spectrometry to determine pharmaceuticals in whole blood*. *Journal of Chromatography A*, 2006, **1135**: p. 19-26.
152. Arthur, C.L. and J. Pawliszyn, *Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers*. *Analytical Chemistry*, 1990, **62**: p. 2145-2148.
153. Valente, A.L.P., et al., *Aplicação de SPME (Solid Phase Micro-Extraction) na análise de águas potáveis de três localidades do estado de São Paulo*. *Química Nova*, 1998, **21**: p. 804-806.
154. Mills, G.A. and V. Walker, *Headspace solid-phase microextraction procedures for gas chromatographic analysis of biological fluids and materials*. *Journal of Chromatography A*, 2000, **902**: p. 267-287.
155. Ouyang, G., et al., *Calibration of solid-phase microextraction for quantitative analysis by gas chromatography*. *Journal of Chromatography A*, 2005, **1097**: p. 9-16.
156. Gallardo, E., S. Costa, and M. Barroso, *A microextração em fase sólida como técnica de preparação de amostras em química analítica e toxicologia: Teoria e aplicações*. *Revista Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde*, 2009, **6**: p. 105-124.
157. Pawliszyn, J., *Theory of Solid-Phase Microextraction*. *Journal of Chromatographic Science*, 2000, **38**: p. 270-278.
158. Kloskowski, A., M. Pilarczyk, and J. Namieśnik, *Membrane Solid-Phase Microextraction—A New Concept of Sorbent Preparation*. *Analytical Chemistry*, 2009, **81**: p. 7363-7367.
159. Pawliszyn, J., *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*. 1997, New York: Wiley. 247.
160. Flanagan, R.J., et al., *Fundamentals of Analytical Toxicology*. 2008, England: Wiley. 544.

161. Falcó, I.P.R. and M.N. Moya, *Determination of Volatile Organic Compounds in Water*, in *Handbook of Water Analysis, Third Edition*, L.M.L. Nollet and L.S.P. De Gelder, Editors. 2013, CRC Press: Flórida. p. 549-610.
162. Queiroz, M.E.C., *Microextração em fase sólida para análise de fármacos em fluidos biológicos*. Scientia Chromatographica, 2009, **1**: p. 11-19.
163. SGE Analytical Science. *MEPS Application Note*. URL: <http://www.sge.com/home/>. Acedido a 08/04/2015.
164. Pereira, J., et al., *Microextraction using packed sorbent as an effective and high-throughput sample extraction technique: Recent applications and future trends*. Sample Preparation, 2013, **1**: p. 38.
165. Altun, Z., *New Techniques for Sample Preparation in Analytical Chemistry - Microextraction in Packed Syringe (MEPS) and Methacrylate Based Monolithic Pipette Tips*, in *Faculty of Technology and Science: Chemistry*. 2008, Karlstad University Studies. p. 66.
166. Abdel-Rehim, M., *Microextraction by packed sorbent (MEPS): A tutorial*. Analytica Chimica Acta, 2011, **701**: p. 119-128.
167. Dawes, P., *It's A Small World*. The Column, 2007, **3**: p. 26-29.
168. SGE Analytical Science. *eVol XR hand-held automated analytical syringe*. URL: <http://www.sge.com/products/evol>. Acedido a 12/03/2015.
169. Ferreira, A., et al., *Liquid chromatographic assay based on microextraction by packed sorbent for therapeutic drug monitoring of carbamazepine, lamotrigine, oxcarbazepine, phenobarbital, phenytoin and the active metabolites carbamazepine-10,11-epoxide and licarbazepine*. Journal of Chromatography B, 2014, **971**: p. 20-29.
170. Mendes, B., et al., *A new and fast methodology to assess oxidative damage in cardiovascular diseases risk development through eVol-MEPS-UHPLC analysis of four urinary biomarkers*. Talanta, 2013, **116**: p. 164-172.
171. Said, R., et al., *Determination of four immunosuppressive drugs in whole blood using MEPS and LC-MS/MS allowing automated sample work-up and analysis*. Journal of Chromatography B, 2012, **897**: p. 42-49.
172. Rodrigues, M., et al., *First liquid chromatographic method for the simultaneous determination of amiodarone and desethylamiodarone in human plasma using microextraction by packed sorbent (MEPS) as sample preparation procedure*. Journal of Chromatography B, 2013, **913-914**: p. 90-97.
173. Locatelli, M., et al., *Microextraction by packed sorbent and high performance liquid chromatography determination of seven non-steroidal anti-inflammatory drugs in human plasma and urine*. Journal of Chromatography A, 2014, **1367**: p. 1-8.

174. Vlčková, H., et al., *Microextraction by packed sorbent as sample preparation step for atorvastatin and its metabolites in biological samples—Critical evaluation*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2011, **55**: p. 301-308.
175. Magiera, S., *Fast, simultaneous quantification of three novel cardiac drugs in human urine by MEPS–UHPLC–MS/MS for therapeutic drug monitoring*. Journal of Chromatography B, 2013, **938**: p. 86-95.
176. Woźniakiewicz, M., et al., *Development of microextraction by packed sorbent for toxicological analysis of tricyclic antidepressant drugs in human oral fluid*. Journal of Chromatography A, 2014, **1337**: p. 9-16.
177. Sergi, M., et al., *Micro extraction by packed sorbent coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry for the rapid and sensitive determination of cannabinoids in oral fluids*. Journal of Chromatography A, 2013, **1301**: p. 139-146.
178. Adam, M., et al., *Microextraction by packed sorbent (MEPS) as a suitable selective method for l-ascorbic acid determination in beverages*. Food Chemistry, 2012, **135**: p. 1613-1618.
179. Leça, J.M., et al., *Rapid and sensitive methodology for determination of ethyl carbamate in fortified wines using microextraction by packed sorbent and gas chromatography with mass spectrometric detection*. Analytica Chimica Acta, 2014, **811**: p. 29-35.
180. Gonçalves, J.L., et al., *A semi-automatic microextraction in packed sorbent, using a digitally controlled syringe, combined with ultra-high pressure liquid chromatography as a new and ultra-fast approach for the determination of prenylflavonoids in beers*. Journal of Chromatography A, 2013, **1304**: p. 42-51.
181. Gonçalves, J., et al., *Development of a novel microextraction by packed sorbent-based approach followed by ultrahigh pressure liquid chromatography as a powerful technique for quantification phenolic constituents of biological interest in wines*. Journal of Chromatography A, 2012, **1229**: p. 13-23.
182. Noche, G.G., et al., *Microextraction by packed sorbent for the analysis of pharmaceutical residues in environmental water samples by in situ derivatization-programmed temperature vaporizer–gas chromatography–mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2011, **1218**: p. 9390-9396.
183. González Paredes, R.M., et al., *In situ derivatization combined to automated microextraction by packed sorbents for the determination of chlorophenols in soil samples by gas chromatography mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2014, **1359**: p. 52-59.
184. Fu, S., et al., *Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples using online microextraction by packed sorbent coupled with gas chromatography–mass spectrometry*. Talanta, 2012, **94**: p. 152-157.

185. Saracino, M.A., et al., *Analysis of risperidone and its metabolite in plasma and saliva by LC with coulometric detection and a novel MEPS procedure*. *Talanta*, 2010, **81**: p. 1547-1553.
186. Saracino, M.A., et al., *Rapid assays of clozapine and its metabolites in dried blood spots by liquid chromatography and microextraction by packed sorbent procedure*. *Journal of Chromatography A*, 2011, **1218**: p. 2153-2159.
187. da Fonseca, B.M., et al., *Determination of seven selected antipsychotic drugs in human plasma using microextraction in packed sorbent and gas chromatography–tandem mass spectrometry*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2013, **405**: p. 3953-3963.
188. Mercolini, L., et al., *A fast and feasible microextraction by packed sorbent (MEPS) procedure for HPLC analysis of the atypical antipsychotic ziprasidone in human plasma*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2014, **88**: p. 467-471.
189. de Souza, I.D., D.S. Domingues, and M.E.C. Queiroz, *Hybrid silica monolith for microextraction by packed sorbent to determine drugs from plasma samples by liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. *Talanta*, 2015, **140**: p. 166-175.
190. Moein, M.M., A. Abdel-Rehim, and M. Abdel-Rehim, *Microextraction by packed sorbent (MEPS)*. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2015, **67**: p. 34-44.
191. Chust, R.B., *Introdução Cromatografia de Líquidos (HPLC)*. *Boletim SPQ*, 1990, **39**: p. 43-53.
192. Cass, Q.B. and A.L.G. Degani, *Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação*. 2001: EdUFSCar.
193. Waters, *Beginners Guide to UPLC: Ultra-Performance Liquid Chromatography*. 1st ed. 2014: Waters Corporation. 52.
194. Nexera. *Sistema de cromatografia líquida de ultra performance*. URL: <http://www.shimadzu.com/>. Acedido a 19/05/2015.
195. Proença, P., et al., *An UPLC–MS/MS method for the determination of valproic acid in blood of a fatal intoxication case*. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 2011, **18**: p. 320-324.
196. Valente, A., et al., *Validation and clinical application of an UHPLC method for simultaneous analysis of total homocysteine and cysteine in human plasma*. *Journal of Separation Science*, 2012, **35**: p. 3427-3433.
197. Maurer, H.H., *Systematic toxicological analysis of drugs and their metabolites by gas chromatography-mass spectrometry*. *J Chromatogr*, 1992, **580**: p. 3-41.
198. Zhang, G., A.V.T. Jr., and M.G. Bartlett, *Simultaneous determination of five antipsychotic drugs in rat plasma by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection*. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2007, **856**: p. 20-28.
199. Roman, M., et al., *Quantitation of Seven Low-Dosage Antipsychotic Drugs in Human Postmortem Blood Using LC-MS-MS*. *Journal of Analytical Toxicology*, 2008, **32**: p. 147-155.

200. Remane, D., et al., *Ultra high performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometric multi-analyte procedure for target screening and quantification in human blood plasma: validation and application for 31 neuroleptics, 28 benzodiazepines, and Z-drugs*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2011, **401**: p. 1341-1352.
201. Neto, A.I.A., *Determinação de antidepressivos em plasma humano por cromatografia líquida de rápida resolução acoplada a um detector de fotodiodos (UPLC-DAD)*, in *Dissertação para a obtenção do grau de Mestre*. 2011, Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior.
202. Vessman, J., et al., *Selectivity in analytical chemistry (IUPAC Recommendations 2001)*. *Pure and Applied Chemistry*, 2001, **73**: p. 1381-1386.
203. Thompson, M., S. L. R. Ellison, and R. Wood, *Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report)*. *Pure and Applied Chemistry*, 2002, **74**: p. 835-855.
204. Ribeiro, F.A.d.L., et al., *Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados*. *Química Nova*, 2008, **31**: p. 164-171.
205. Relacre (Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal), *Validação de métodos internos de ensaio em análise química - Guia Relacre nº 13*, Lisboa, 2000.
206. Food and Drug Administration. *Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation*. URL: <http://www.fda.gov>. Acedido a 12/05/2014.
207. Paschoal, J.A.R., et al., *Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos*. *Química Nova*, 2008, **31**: p. 1190-1198.
208. Poletini, A., *Applications of LC-MS in Toxicology*. 2006, London: Pharmaceutical Press. 275.
209. Francisco, A.M., *Estudo da Lamotrigina em doentes epilépticos submetidos a monitorização video-electroencefalografia*, in *Dissertação para a obtenção do grau de Doutor*. 2008, Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.
210. Ribani, M., et al., *Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos*. *Química Nova*, 2004, **27**: p. 771-780.
211. ISO, I.O.f.S., *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 1: General principles and definitions. ISO 5725-1*. 1994: Genève.
212. Maroto, A., et al., *Estimation of measurement uncertainty by using regression techniques and spiked samples*. *Analytica Chimica Acta*, 2001, **446**: p. 131-143.
213. Maroto, A., et al., *Estimating uncertainties of analytical results using information from the validation process*. *Analytica Chimica Acta*, 1999, **391**: p. 173-185.
214. Araujo, P., *Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation*. *Journal of Chromatography B*, 2009, **877**: p. 2224-2234.

215. Ferreira, A.F., *Desenvolvimento farmacêutico e validação do método analítico de uma suspensão contendo paracetamol*, in *Dissertação para obtenção do grau de Mestre*. 2010, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.
216. Gonçalves, M.E.P., et al., *Validação do método de determinação simultânea dos íons brometo e bromato por cromatografia iônica em águas de consumo humano*. *Química Nova*, 2004, **27**: p. 503-507.
217. J. Barwick, V. and S. L. R. Ellison, *Measurement uncertainty: Approaches to the evaluation of uncertainties associated with recovery[dagger]*. *Analyst*, 1999, **124**: p. 981-990.
218. Camões, M.F., *Quantificação da incerteza nas medições analíticas. Versão em Português do Guia EURACHEM/CITAC*. 2nd ed. 2000: EURACHEM. 34.
219. Maroto, A., et al., *Measurement uncertainty in analytical methods in which trueness is assessed from recovery assays*. *Analytica Chimica Acta*, 2001, **440**: p. 171-184.
220. International Conference on Harmonization. *Validation of analytical methods – Methodology ICH Q2*. URL: <http://www.ich.org>. Acedido a 17/06/14.
221. Queiroz, M.E.C., *Microextração em sorvente empacotado (MEPS) para a determinação de fármacos em fluidos biológicos*. *Scientia Chromatographica*, 2011, **3**: p. 223-229.
222. Thermo Scientific. *Applications Notebook: Hipercarb Columns*. URL: <http://www.thermoscientific.com/en/home.html>. Acedido a 05/05/2015.
223. Zief, M. and R. Kiser, *Solid Phase Extraction for Sample Preparation*. 1994: Baker.
224. Foschiera, J.L., *Modificação da superfície de sílica gel com grupos aromáticos para aplicação na pré-concentração de compostos fenólicos em meio aquoso*, in *Dissertação para obtenção do grau de mestre*. 1999, Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
225. Shimadzu. *Separation Conditions: Fundamentals of a First-Choice*. URL: <http://www.shimadzu.com/>. Acedido a 25/05/2015.
226. Novais, A.S., et al., *Novo sorvente de hidrofobicidade reduzida para extração em fase sólida: Preparação e caracterização*. *Química Nova*, 2015, **38**: p. 274-279.
227. Tan, A., N. Boudreau, and A. Lévesque, *Internal Standards for Quantitative LC-MS Bioanalysis*, in *LC-MS in Drug Bioanalysis*, Q.A. Xu and T.L. Madden, Editors. 2012, Springer US. p. 1-32.
228. Kirchherr, H. and W.N. Kühn-Velten, *Quantitative determination of forty-eight antidepressants and antipsychotics in human serum by HPLC tandem mass spectrometry: A multi-level, single-sample approach*. *Journal of Chromatography B*, 2006, **843**: p. 100-113.
229. Vecchione, G., et al., *A reliable and rapid tool for plasma quantification of 18 psychotropic drugs by ESI tandem mass spectrometry*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2012, **67-68**: p. 104-113.

Referências Bibliográficas

230. Andrade C. *Clinical and Pratical Psychopharmacology: Serotonin Reuptake Inhibitor Treatment of Obsessive-Compulsive Symptoms in Clozapine-Medicated Schizophrenia*. URL: <http://www.psychiatrist.com/Pages/home.aspx>. Acedido a 04/05/2015.
231. *Chlorpromazine/clomipramine/risperidone interaction*. *Reactions Weekly*, 2013, **1474**: p. 12-12.
232. Iuppa, C.A. and L.A. Diefenderfer, *Risperidone-Induced Pisa Syndrome in MS: Resolution with Lurasidone and Recurrence with Chlorpromazine*. *Annals of Pharmacotherapy*, 2013, **47**: p. 1223-1228.
233. Brito, N.M., et al., *Validação de métodos analíticos: Estratégia e Discussão*. *Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente*, 2003, **13**: p. 129-146.
234. Brito, N.M., et al., *Avaliação da exatidão e da precisão de métodos de análise de resíduos de pesticidas mediante ensaios de recuperação*. *Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente*, 2002, **12**: p. 155-168.
235. Shah, V.P., et al., *Analytical methods validation: Bioavailability, bioequivalence, and pharmacokinetic studies*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1992, **81**: p. 309-312.
236. Dadgar, D. and P.E. Burnett, *Issues in evaluation of bioanalytical method selectivity and drug stability*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1995, **14**: p. 23-31.
237. International Organization for Standardization (ISO). *Water Quality - calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics. Part 1 : statistical evaluation of the linear calibration function*. ISO 8466-1. Geneva, 1990.
238. Barreira, M.J., *Ocorrência de patulina em alimentos destinados a lactentes e crianças: otimização e validação do método de análise por SPE-HPLC-UV*, in *Dissertação para a obtenção do grau de Mestre*. 2009, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

Anexos

Anexo I – Método dos Mínimos Quadrados [237, 238]

A forma algébrica da equação de uma reta é dada por:

$$y = ax + b \quad (\text{equação 2})$$

Onde:

a	Declive da reta
b	Ordenada na origem
x	Valores individuais da concentração conhecida na solução padrão

Esta reta é formada por um conjunto de pares ordenados e independentes, $(x_1, y_1); \dots; (x_n, y_n)$ onde n é o número de pontos da reta. A média dos valores de x (concentração dos padrões utilizados) representa-se por \bar{x} e a média dos valores de y (sinal instrumental) representa-se por \bar{y} , e a posição (\bar{x}, \bar{y}) é designada de centróide.

O cálculo do coeficiente de correlação, r , pode ser usado como um dos parâmetros para avaliar uma calibração analítica:

$$r = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sqrt{[\sum_i (x_i - \bar{x})^2] [\sum_i (y_i - \bar{y})^2]}} \quad (\text{equação 14})$$

As retas de calibração devem apresentar valores de r superiores a 0,995, no entanto quanto mais próximo do valor de 1 (correlação positiva) ou de -1 (correlação negativa) estiver este coeficiente melhor será a qualidade dos resultados. Para o cálculo de r é necessário ter em conta algumas precauções para que não se cometam erros de interpretação, pois um bom valor de r não é sinónimo da existência de uma relação linear. Assume-se ainda que todos os erros associados aos valores de x são desprezáveis face aos valores de y .

O coeficiente de determinação da reta, r^2 , é dado pelo quadrado do coeficiente de correlação.

Neste método os coeficientes a e b da reta são dados por:

$$a = \frac{\sum_{i=1}^N [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \quad (\text{equação 15})$$

e

$$b = \bar{y} - a\bar{x} \quad (\text{equação 16})$$

Onde:

x	Valores individuais de concentração conhecida na solução padrão
y	Valores individuais do sinal instrumental
\bar{x}	Média dos valores de x
\bar{y}	Média dos valores de y

Os coeficientes a e b dão uma estimativa verdadeira da função que é limitada pela dispersão inevitável do método. A precisão da estimativa é quantificada pelo desvio padrão residual ($S_{y/x}$) da reta:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [y_i - (b + ax_i)]^2}{N - 2}} \quad (\text{equação 17})$$

Este desvio padrão exprime a dispersão dos valores do sinal em torno da reta de calibração. Os desvios padrão do declive, S_a , e da ordenada na origem, S_b , são dados por:

$$S_a = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} \quad (\text{equação 18})$$

$$S_b = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N x_i^2}{N \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} \quad (\text{equação 19})$$

E podem ser usados para calcular os limites de confiança de a e b :

$$a \pm tS_a \quad (\text{equação 20})$$

$$b \pm tS_b \quad (\text{equação 21})$$

Sendo t o valor da variável de Student para o nível de confiança desejado de $(n-2)$ graus de liberdade.

Cálculo da concentração

Após ter determinado o declive e a ordenada na origem de uma reta de regressão, pode-se calcular o valor de x correspondente a um valor médio de y . A concentração de uma amostra por interpolação da reta de calibração é calculada pela seguinte equação:

$$x_i = \frac{y_i - b}{a} \quad (\text{equação 22})$$

Desvio padrão do método (S_m)

Este parâmetro permite ao analista verificar a qualidade do seu trabalho:

$$S_m = \frac{S_{y/x}}{a} \quad (\text{equação 23})$$

Coefficiente de variação do método (CV_m)

$$CV_m = \frac{S_m}{\bar{x}} \times 100 \quad (\text{equação 24})$$

Anexo 2 – Teste de Mandel ou de Fisher/ Snedecor [237, 238]

A linearidade pode ser avaliada estatisticamente, de acordo com a norma ISO 8466-1, pelo teste de Fisher/Snedecor ou teste de Mandel.

A partir do conjunto de resultados obtidos (sinal instrumental versus concentração), conjunto de pares ordenados, calcula-se a função de calibração (ISO 8466-1) e a função de calibração não-linear (ISO 8466-2), bem como os respetivos desvios padrão residuais, $S_{y/x}$ e S_{y^2} , do seguinte modo:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y}_i)^2}{N - 2}} \quad (\text{equação 25})$$

$$S_{y^2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y}_{i2})^2}{N - 3}} \quad (\text{equação 26})$$

Onde

N	Número de padrões de calibração
y_i	Sinal obtido para um padrão de determinada concentração
\bar{y}_i	Sinal estimado pela função de calibração linear para um padrão da mesma concentração
\bar{y}_{i2}	Sinal estimado pela função de calibração polinomial do segundo grau para um padrão da mesma concentração

Calcula-se a diferença de variâncias (DS^2) através da equação:

$$DS^2 = (N - 2) \times S_{y/x}^2 - (N - 3) \times S_{y^2}^2 \quad (\text{equação 27})$$

Obtém-se o valor teste, VT :

$$VT = \frac{DS^2}{S_{y^2}^2} \quad (\text{equação 28})$$

O valor teste (VT) é comparado com o valor tabelado da distribuição F de Fisher/Snedecor, para um grau de confiança de 95%.

Critérios de aceitação:

- a) Se $VT \leq F_{(0,95;1;N-3)}$: a função de calibração polinomial não conduz a um ajustamento significativamente melhor, e por isso, a função de calibração é linear.
- b) Se $VT \geq F_{(0,95;1;N-3)}$: a função de calibração é não linear e por isso a gama de trabalho deve ser reduzida tanto quanto possível de forma a cumprir a alternativa a). Caso não seja possível, deverá ser utilizada uma função de calibração não linear.

Anexo 3 – Análise de Resíduos [238]

Um bom indicador da linearidade é a determinação dos resíduos, a qual se baseia na avaliação da distância entre os valores de y experimentais e os valores de y' ideais da reta de calibração. Uma representação gráfica destes valores em função das concentrações deve dar origem a um conjunto de pontos que se dispõem aleatoriamente em torno do eixo dos x . Caso contrário poderá ser indicativo de que a função que melhor se ajusta ao conjunto de pontos experimentais poderá ser uma reta e não uma curva.

Para admitir a existência de linearidade numa determinada gama de concentração, foi definido que os valores deviam ter um desvio igual ou inferior a 10 %, ou seja, estar compreendidos entre 0 e 10 %. Sempre que existirem resíduos que apresentem um desvio superior a 10 % devem ser excluídos, reduzindo a gama de concentrações e aplicando-se novamente o teste até que estes requisitos sejam satisfeitos.

Calcula-se a concentração estimada (y') com base na equação da reta obtida para o composto em questão:

$$y' = ax + b \quad (\text{equação 29})$$

Onde:

- | | |
|-----|--|
| a | Declive da reta |
| b | Ordenada na origem (correspondente à equação da reta de calibração para o analito) |
| x | Valores individuais da concentração da solução padrão |

O resíduo representa o quociente entre os valores experimentais e os valores estimados da diferença de potencial da reta de calibração, em percentagem.

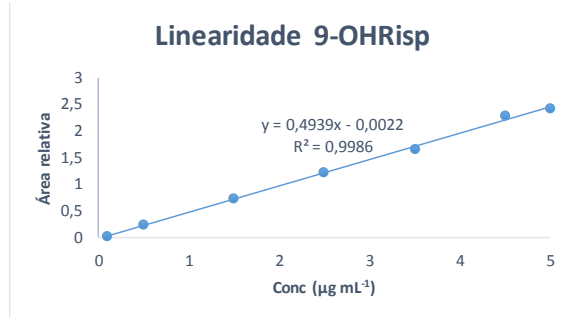
Após o cálculo destes valores, foi traçado um gráfico de resíduos (%) *versus* concentração.

Anexo 4 – Estudo estatístico da Linearidade

A.4.1. Resultados estatísticos da linearidade da 9-hidroxisperidona

RESUMO DOS RESULTADOS

<i>Estadística de regressão</i>	
R múltiplo	0,999308184
Quadrado de R	0,998616847
Quadrado de R ajustado	0,998340217
Erro-padrão	0,038565153
Observações	7



ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	5,368944365	5,368944365	3609,93	2,41696E-08
Residual	5	0,007436355	0,001487271		
Total	6	5,37638072			

	<i>Coeficientes</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>
Interceptar	-0,002198018	0,025291572	-0,086907149	0,934118	-0,067212075	0,062816038
Conc (µg/mL)	0,493910803	0,008220517	60,08269298	2,42E-08	0,472779291	0,515042315

RESULTADO RESIDUAL

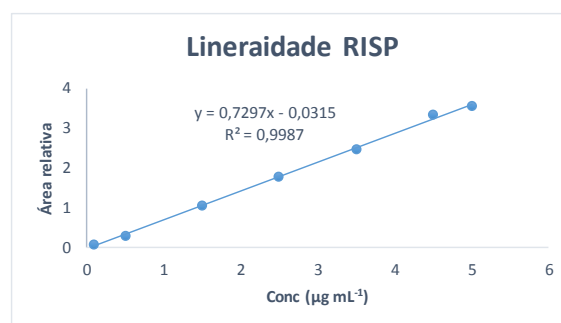
<i>Observação</i>	<i>Previsto Average (Astd/AIS)</i>	<i>Residuais</i>
1	0,047193062	0,000439318
2	0,244757383	0,012021782
3	0,738668186	-0,005814956
4	1,232578988	-0,000581171
5	1,726489791	-0,045206647
6	2,220400594	0,066729141
7	2,467355995	-0,027587466



A.4.2. Resultados estatísticos da linearidade da risperidona

RESUMO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,999368732
Quadrado de R	0,998737862
Quadrado de R ajustado	0,998485435
Erro-padrão	0,054421215
Observações	7



ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	11,71793882	11,71794	3956,533	1,92239E-08
Residual	5	0,014808343	0,002962		
Total	6	11,73274716			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>
Interceptar	-0,031526963	0,035690202	-0,88335	0,41749	-0,123271547	0,060217621
Conc (µg/mL)	0,729675369	0,011600382	62,90098	1,92E-08	0,699855636	0,759495101

RESULTADO RESIDUAL

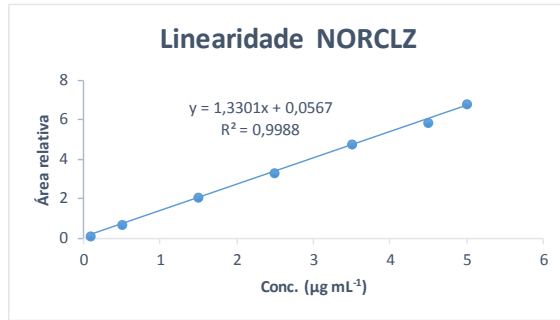
<i>Observação</i>	<i>Previsto Average Astd/AIS</i>	<i>Residuais</i>
1	0,041440574	0,024621058
2	0,333310721	-0,023980279
3	1,06298609	0,001149796
4	1,792661459	-0,007305029
5	2,522336827	-0,030831662
6	3,252012196	0,095507708
7	3,616849881	-0,059161591



A.4.3. Resultados estatísticos da linearidade da norclozapina

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,999135243
Quadrado de R	0,998271233
Quadrado de R ajustado	0,997839042
Erro-padrão	0,107510779
Observações	6



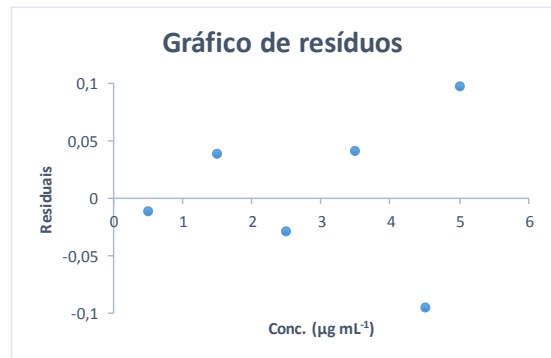
ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	26,69784476	26,69784476	2309,788358	1,12138E-06
Residual	4	0,04623427	0,011558568		
Total	5	26,74407903			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>
Interceptar	0,076251955	0,091606969	0,832381602	0,45200338	-0,178089764	0,330593675
0,1	1,324943291	0,027568377	48,06025757	1,12138E-06	1,248401206	1,401485376

RESULTADO RESIDUAL

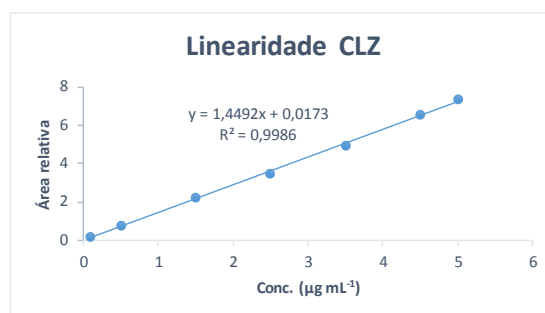
<i>Observação</i>	<i>Previsto Average Astd/AIS</i>	<i>Residuais</i>
1	0,738723601	-0,010600278
2	2,063666892	0,03944309
3	3,388610182	-0,027936252
4	4,713553473	0,041187314
5	6,038496764	-0,094579809
6	6,70096841	0,098248594



A.4.4. Resultados estatísticos da linearidade da clozapina

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,999044305
Quadrado de R	0,998089524
Quadrado de R ajustado	0,997611905
Erro-padrão	0,12417217
Observações	6



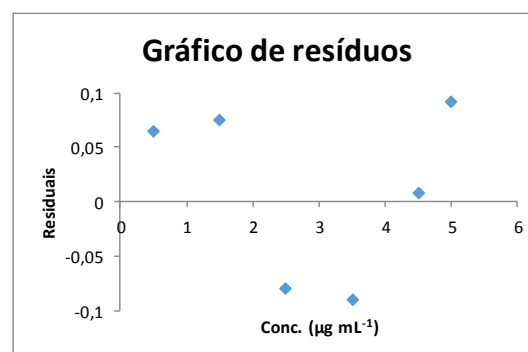
ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	32,22080637	32,22080637	2089,718864	1,36959E-06
Residual	4	0,061674911	0,015418728		
Total	5	32,28248128			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>
Interceptar	-0,006799343	0,105803681	-0,064263762	0,951843602	-0,300557454	0,286958769
0,1	1,45555088	0,031840763	45,71344292	1,36959E-06	1,367146751	1,543955009

RESULTADO RESIDUAL

<i>Observação</i>	<i>Previsto Average Astd/AIS</i>	<i>Residuais</i>
1	0,720976097	0,064152055
2	2,176526978	0,074868048
3	3,632077858	-0,080330715
4	5,087628738	-0,090578114
5	6,543179618	0,007382173
6	7,270955058	0,092298625
7	7,328459499	0,065481808



Anexo 5 – Estudo estatístico da precisão e exatidão

A.5.1. Resultados estatísticos da precisão intermédia e da exatidão para a 9-hidroxi-risperidona.

Data	1º Dia	2º Dia	3º Dia	4º Dia	5º Dia
Equação da reta	$y=0,4996x - 0,0067$	$y=0,4925x + 0,0024$	$y=0,4862x - 0,0048$	$y=0,4485x + 0,0206$	$y=0,5185x - 0,0223$
Gama Baixa 0,1 µg/mL					
Média	0,125	0,110	0,111	0,093	0,121
Recuperação (%)	124,9	110,2	110,6	93,1	120,8
Recuperação Média (%)	111,9				
Desvio padrão	12,32				
CV (%)	11,0				
N (nº dias)	5				
T _{exp}	2,16				
T _{crit}	2,78				
Incerteza de R%	5,5				
Incerteza padrão rel.	0,055				
Gama Baixa 2,5 µg/mL					
Média	2,451	2,480	2,479	2,514	2,459
Recuperação (%)	98,0	99,2	99,2	100,5	98,4
Recuperação Média (%)	99,1				
Desvio padrão	0,97				
CV (%)	1,0				
N (nº dias)	5				
T _{exp}	2,16				
T _{crit}	2,78				
Incerteza de R%	0,4				
Incerteza padrão rel.	0,004				
Gama Baixa 5,0 µg/mL					
Média	5,024	5,010	5,010	4,993	5,020
Recuperação (%)	100,5	100,2	100,2	99,9	100,4
Recuperação Média (%)	100,2				
Desvio padrão	0,24				
CV (%)	0,2				
N (nº dias)	5				
T _{exp}	2,16				
T _{crit}	2,78				
Incerteza de R%	0,1				
Incerteza padrão rel.	0,001				

A.5.2. Resultados estatísticos da precisão intermédia e da exatidão para a risperidona.

Data	1º Dia	2º Dia	3º Dia	4º Dia	5º Dia
Equação da reta	$y=0,7245x - 0,0171$	$y=0,7120x - 0,0043$	$y=0,7004x - 0,0067$	$y=0,6539x + 0,0118$	$y=0,7501x - 0,0312$
Gama Baixa 0,1 µg/mL					
Média	0,123	0,108	0,111	0,087	0,121
Recuperação (%)	122,8	108,0	110,7	87,5	121,1
Recuperação Média (%)	110,0				
Desvio padrão	14,13				
CV (%)	12,8				
N (nº dias)	5				
T _{exp}	1,58				
T _{crit}	2,78				
Incerteza de R%	6,3				
Incerteza padrão rel.	0,063				
Gama Baixa 2,5 µg/mL					
Média	2,455	2,484	2,479	2,525	2,459
Recuperação (%)	98,2	99,4	99,2	101,0	98,3
Recuperação Média (%)	99,2				
Desvio padrão	1,11				
CV (%)	1,1				
N (nº dias)	5				
T _{exp}	1,58				
T _{crit}	2,78				
Incerteza de R%	0,50				
Incerteza padrão rel.	0,005				
Gama Baixa 5,0 µg/mL					
Média	5,022	5,008	5,010	4,988	5,020
Recuperação (%)	100,4	100,2	100,2	99,8	100,4
Recuperação Média (%)	100,2				
Desvio padrão	0,27				
CV (%)	0,3				
N (nº dias)	5				
T _{exp}	1,58				
T _{crit}	2,78				
Incerteza de R%	0,12				
Incerteza padrão rel.	0,001				

A.5.3. Resultados estatísticos da precisão intermédia e da exatidão para a norclozapina.

Data	1º Dia	2º Dia	3º Dia	4º Dia	5º Dia
Equação da reta	$y=0,7245x - 0,0171$	$y=0,7120x - 0,0043$	$y=0,7004x - 0,0067$	$y=0,6539x + 0,0118$	$y=0,7501x - 0,0312$
Gama Baixa 0,1 µg/mL					
Média	0,125	0,109	0,113	0,090	0,122
Recuperação (%)	125,4	108,7	112,6	90,3	122,0
Recuperação Média (%)	111,8				
Desvio padrão	13,81				
CV (%)	12,4				
N (nº dias)	5				
T _{exp}	1,91				
T _{crit}	2,78				
Incerteza de R%	6,2				
Incerteza padrão rel.	0,062				
Gama Baixa 2,5 µg/mL					
Média	2,450	2,483	2,475	2,519	2,457
Recuperação (%)	98,0	99,3	99,0	100,8	98,3
Recuperação Média (%)	99,1				
Desvio padrão	1,08				
CV (%)	1,1				
N (nº dias)	5				
T _{exp}	1,91				
T _{crit}	2,78				
Incerteza de R%	0,48				
Incerteza padrão rel.	0,005				
Gama Baixa 5,0 µg/mL					
Média	5,024	5,008	5,012	4,991	5,021
Recuperação (%)	100,5	100,2	100,2	99,8	100,4
Recuperação Média (%)	100,2				
Desvio padrão	0,27				
CV (%)	0,3				
N (nº dias)	5				
T _{exp}	1,91				
T _{crit}	2,78				
Incerteza de R%	0,12				
Incerteza padrão rel.	0,001				

A.5.4. Resultados estatísticos da precisão intermédia e da exatidão para a clozapina.

Data	1º Dia	2º Dia	3º Dia	4º Dia	5º Dia
Equação da reta	$y=1,1103x + 0,7377$	$y=1,1674x + 0,6845$	$y=1,1482x + 0,8341$	$y=1,1283x + 0,8617$	$y=1,1643x + 0,6782$
Gama Baixa 0,1 µg/mL					
Média	0,124	0,097	0,112	0,122	0,146
Recuperação (%)	124,4	97,5	111,7	121,9	146,0
Recuperação Média (%)	120,3				
Desvio padrão	17,85				
CV (%)	14,8				
N (nº dias)	5				
T _{exp}	2,54				
T _{crit}	2,78				
Incerteza de R%	8,0				
Incerteza padrão rel.	0,080				
Gama Baixa 2,5 µg/mL					
Média	2,452	2,505	2,477	2,457	2,410
Recuperação (%)	98,1	100,2	99,1	98,3	96,4
Recuperação Média (%)	98,4				
Desvio padrão	1,40				
CV (%)	1,4				
N (nº dias)	5				
T _{exp}	2,54				
T _{crit}	2,78				
Incerteza de R%	0,6				
Incerteza padrão rel.	0,006				
Gama Baixa 5,0 µg/mL					
Média	5,023	4,998	5,011	5,021	5,044
Recuperação (%)	100,5	100,0	100,2	100,4	100,9
Recuperação Média (%)	100,4				
Desvio padrão	0,34				
CV (%)	0,3				
N (nº dias)	5				
T _{exp}	2,54				
T _{crit}	2,78				
Incerteza de R%	0,2				
Incerteza padrão rel.	0,002				

