

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Dener Gomes Berlato

**DETERMINAÇÃO DE ANTIDEPRESSIVOS TRICÍCLICOS EM
SANGUE TOTAL EMPREGANDO A MICROEXTRAÇÃO
LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA E ANÁLISE POR
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA COM DETECTOR DE
ARRANJO DE DIODOS**

LINHA DE PESQUISA: ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS

Santa Maria, RS, Brasil
2021

Dener Gomes Berlato

**DETERMINAÇÃO DE ANTIDEPRESSIVOS TRICÍCLICOS EM SANGUE TOTAL
EMPREGANDO A MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA E
ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA COM DETECTOR DE ARRANJO DE
DIODOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

Orientador: Prof. Dr. André Valle de Bairros

Santa Maria, RS, Brasil
2021

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

BERLATO, DENER
DETERMINAÇÃO DE ANTIDEPRESSIVOS TRICÍCLICOS EM SANGUE
TOTAL EMPREGANDO A MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO
DISPERSIVA E ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA COM
DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS / DENER BERLATO.- 2021.
115 p.; 30 cm

Orientador: ANDRÉ VALLE DE BAIROS
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2021

1. Microextração líquido-líquido dispersiva 2.
Antidepressivo tricíclico 3. Cromatografia líquida 4.
DLLME 5. Sangue total I. VALLE DE BAIROS, ANDRÉ II.
Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, DENER BERLATO, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Dener Gomes Berlato

**DETERMINAÇÃO DE ANTIDEPRESSIVOS TRICÍCLICOS EM SANGUE TOTAL
EMPREGANDO A MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA E
ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA COM DETECTOR DE ARRANJO DE
DIODOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

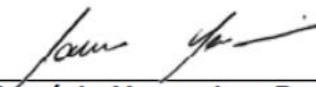
Aprovado em 21 de Julho de 2021:



André Valle de Bairros, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Marcelo Barcellos Da Rosa, Dr. (UFSM)



Maurício Yonamine, Dr. (USP)

Santa Maria, RS, Brasil
2021

Agradecimentos

Agradeço a Deus por iluminar todo o meu caminho traçado até o presente momento, por todas as oportunidades que obtive e pela força e amparo em todos os momentos difíceis que pude superar.

Agradeço imensamente a minha Família, especialmente mãe (Claudia Gomes), meu pai (Mauro Berlato) e meu irmão (Diego Berlato), que sempre me apoiaram em todas as decisões tomadas, pela ajuda, força e amparo nos momentos difíceis para superar e seguir em frente e me incentivaram durante todos esses anos desde a faculdade até a pós-graduação

A minha namorada, amiga e companheira (Natália Minuzzi) que me apoio e me incentivaram nos momentos mais difíceis.

Aos meus amigos que sempre, de alguma maneira, me ajudaram e incentivaram e não me deixaram desistir.

Em especial agradecer aos integrantes do Núcleo de Análises Toxicológicas (NAT), e a todos as pessoas dentro do UFSM que me ajudaram nessa caminhada.

Ao professor, amigo e orientador André Valle de Bairros, por ter aceitado meu pedido de ser seu orientado, por sempre me atender de bom ânimo, compartilhando seus conhecimentos e vivências, com preocupação e dedicação em instruir e aconselhar para o desenvolvimento de um pensamento mais crítico e responsável.

Aos amigos que fiz durante todo o tempo de Pós-Graduação, o qual pude amadurecer e me tornar uma pessoa melhor.

E por fim, grato a esta instituição, de ensino superior, me proporcionou muito aprendizado, muitas vivências e amizades desde a graduação até essa etapa de finalização da pós-graduação.

RESUMO

DETERMINAÇÃO DE ANTIDEPRESSIVOS TRICÍCLICOS EM SANGUE TOTAL POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA COM DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS EMPREGANDO MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA

AUTOR: DENER GOMES BERLATO
ORIENTADOR: PROF. DR. ANDRÉ VALLE DE BAIRROS

Os medicamentos psicoativos são os principais agentes envolvidos em casos de intoxicação segundo o Centro de Informações Toxicológicas do Rio Grande do Sul (CIT-RS) e o Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (Sinitox). Dentro das classes de medicamentos envolvidas destacam-se a classe dos antidepressivos tricíclicos (ADTs), gerando efeitos severos em casos de intoxicação, com efeitos cardiotoxicos, podendo ser fatal. A técnica extrativa foi baseada na microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) utilizando hexano como solvente extrator de baixa densidade e metanol como solvente dispersor. O sangue total foi a matriz biológica de escolha para determinação dos antidepressivos tricíclicos amitriptilina, imipramina e doxepina e seus respectivos produtos de biotransformação nortriptilina e desipramina. As amostras foram analisadas por cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos, afim de auxiliar em casos de intoxicação oriundos do Hospital Universitário de Santa Maria localizado na Universidade Federal de Santa Maria (HUSM-UFSM). O limite de quantificação foi de 10 ng/mL para amitriptilina e doxepina, 20 ng/mL para nortriptilina e 30 ng/mL para imipramina e desipramina. A fase móvel foi contituida por tampão KH_2PO_4 (pH 2,5) e metanol (60:40) com fluxo de 1,2 mL/min. O comprimento de onda para a análise foi doxepina, amitriptilina e nortiptilina em 239 nm, imipramina e desipramina em 249 nm e o padrão interno medazepam 255 nm. A DLLME desenvolvida em sangue total para determinação de ADTs desenvolvida mostrou ser uma método simples, confiável, robusta e reprodutível podendo ser empregado nos laboratórios de toxicologia.

Palavras-chave: Microextração líquido-líquido dispersiva; Antidepressivo tricíclico, Cromatografia líquida; DLLME; Sangue total

ABSTRACT

DETERMINATION OF TRICYCLIC ANTIDEPRESSANTS IN WHOLE BLOOD BY LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH DIODE DIARRAY DETECTOR EMPLOYING DISPERSIVE LIQUID-LIQUID MICROEXTRACTION

AUTHOR: DENER GOMES BERLATO
ADVISOR: PROF. DR. ANDRÉ VALLE DE BAIRROS

Psychoactive drugs are the main agents involved in cases of intoxication according to the Toxicological Information Center of Rio Grande do Sul (CIT-RS) and the National Toxic-Pharmacological Information System (Sinitox). Within the classes of drugs involved, the class of tricyclic antidepressants (ADTs) stands out, generating severe effects in cases of intoxication, with cardiotoxic effects, which can be fatal. The extractive technique was based on dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) using hexane as low density extracting solvent and methanol as dispersing solvent. Whole blood was the biological matrix of choice for the determination of the tricyclic antidepressants amitriptyline, imipramine and doxepin and their respective biotransformation products nortriptyline and desipramine. The samples were analyzed by liquid chromatography with a diode array detector, in order to assist in cases of poisoning from the University Hospital of Santa Maria located at the Federal University of Santa Maria (HUSM-UFSM). The limit of quantification was 10 ng/ml for amitriptyline and doxepin, 20 ng/ml for nortriptyline and 30 ng/ml for imipramine and desipramine. The mobile phase was constituted by KH_2PO_4 buffer (pH 2.5) and methanol (60:40) with a flow rate of 1.2 ml/min. The wavelength for the analysis was doxepin, amitriptyline and nortriptyline at 239 nm, imipramine and desipramine at 249 nm and the internal standard medazepam 255 nm. The DLLME developed in whole blood for the determination of ADTs developed proved to be a simple, reliable, robust and reproducible method that can be used in toxicology laboratories.

Palavras-chave: Dispersive liquid-liquid microextraction; Tricyclic antidepressant; Liquid chromatography; DLLME; Whole blood.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química e biotransformação dos ADTs.	21
Figura 2- Etapas da técnica de DLLME.....	25
Figura 3 – Esquema de método de DLLME para determinação de ADTs em sangue total.....	51
Figura 4 – Cromatograma para antidepressivos tricíclicos após DLLME em amostras de sangue total.	64
Figura 5 – Avaliação qualitativa da extração em sangue total.	65
Figura 6 – Gráfico Efeito santing-out.....	66
Figura 7 – Gráfico Solvente extrator.....	67
Figura 8 – Gráfico Solvente dispersor	67
Figura 9 – Gráfico Tempo vortéx.....	68
Figura 10 – Gráfico Tempo ultrassom	68
Figura 11 – Gráfico Molaridade NaOH	69
Figura 12 – Gráfico Tempo e velocidade de centrifugação	70
Figura 13 – Gráfico Volume de solventes.....	70
Figura 14 – Extração com óleos essenciais.	71
Figura 15 – Gráfico Estabilidade	72
Figura 16 – Gráfico Linearidade	73
Figura 17 – Cromatogramas para avaliação de amostra real de soro em LC-DAD.	75
Figura 18 – Cromatogramas para avaliação de amostra real de sangue total em LC-DAD.	77
Figura 19 – DLLME utilizando clorofórmio como solvente extrator em amostras de sangue total.	82
Figura 20 – Cromatogramas da DLLME utilizando óleo essencial com a etapa de <i>clean-up</i>	85
Figura 21 – Gráfico comparativo das áreas relativas de pré-tratamento.	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características físico, químicas e farmacocinéticas dos antidepressivos tricíclicos (ADTs).....	22
Tabela 2 – Solventes extratores mais utilizados para DLLME.....	27
Tabela 3 – Solventes dispersores mais utilizados para DLLME.....	27
Tabela 4 – Resumo da aplicação da DLLME de ADTs em matrizes biológicas.....	36
Tabela 5 – Fases móveis avaliadas.....	44
Tabela 6 – Volumes de solventes e matriz.....	48
Tabela 7 – Volumes de solventes e matriz.....	50
Tabela 8 – Resultado da etapa de otimização da fase móvel.....	56
Tabela 9 – Equação da reta dos antidepressivos tricíclicos e seus produtos de biotransformação do estudo da linearidade.....	73
Tabela 10 – Parâmetros de confiança do método validado para determinação de Antidepressivos tricíclicos em amostra de sangue total.....	74
Tabela 11 – Razão das concentrações de ADTs (hemácias/plasma).....	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AALLME	Microextração líquido-líquido dispersiva agitada por ar (do inglês <i>air-agitated liquid-liquid microextraction</i>)
AC	Anticonvulsivantes
ADIRS	Antidepressivos inibidores seletivos da recapitação da serotonina
ADTs	Antidepressivos tricíclicos
AMI	Amitriptilina
ATM	Articulação Temporomandibular
BDZ	Benzodiazepínicos
CIT-RS	Centro de Informações Toxicológicas do Rio Grande do Sul
CONEP	Conselho Nacional de Ética em Pesquisa
DAD	Detector de arranjo de diodos (do inglês <i>Diode Array Detector</i>)
DES	Desipramina
DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva (do inglês <i>Dispersive Liquid-Liquid Microextraction</i>)
DOX	Doxepina
DSPE	Extração líquido - líquido com partição (do inglês <i>Dispersive Solid Phase Extraction</i>)
ECG	Eletrocardiograma
FE	Fase estacionária
FM	Fase móvel
GC-FID	Cromatografia gasosa com detector de ionização por chama (<i>Gas chromatography with flame ionization detector</i> "GC-FID)
GC/MS	Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (do inglês, <i>Gas chromatography-mass spectrometry</i>)
LC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
LC-DAD	Cromatografia líquida de ultra eficiência com detector de arranjo de diodos
LC-UV/VIS	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta-visível
HUSM	Hospital Universitário de Santa Maria
ILDLLME	Microextração com líquidos iônicos
IMI	Imipramina
LAC	Laboratório de Análises Clínicas
LD	Limite de detecção
LDS-SD-DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva com solvente extrator de baixa densidade
LPME	Microextração em fase líquida (do inglês <i>Liquid Phase Microextraction</i>)
LQ	Limite de quantificação
NAT	Núcleo de Análises Toxicológicas
NMDA	N-metil-D-aspartato
NOR	Nortriptilina
SFOD	Microextração líquido-líquido dispersiva por gota orgânica flutuante solidificada (do inglês <i>solidification of floating organic droplet</i>)
SINITOX	Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas

SNC	Sistema nervoso central
SPE	Extração em fase sólida (do inglês <i>Solid Phase Extraction</i>)
SWGTOX	Scientific Working Group for Forensic Toxicology
TDLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva em tandem (do inglês <i>tandem dispersive liquid-liquid microextraction</i>)
UA-DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva assistida por ultrassom (do inglês, <i>Ultrasound-assisted microextraction</i>)
UA-IL-DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva com líquido iônico assistido por ultrassom ultrassom (do inglês <i>ultrasound-assisted ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction</i>)
UA-LDS-DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva com solvente de baixa densidade assistida por ultrassom ((do inglês <i>ultrasound-assisted low-density solvent dispersive liquid-liquid microextraction</i>)
UNODC	United Nation Office on Drugs and Crime
UV/Vis	Ultravioleta/visível
VALLME	Microextração líquido-líquido dispersiva assistida por vórtex

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
1.1	JUSTIFICATIVA	15
1.2	OBJETIVOS.....	15
1.2.1	Objetivo geral	15
1.2.2	Objetivos específicos	15
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	ANTIDEPRESSIVOS TRICÍCLICOS	16
2.2	CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	23
2.3	MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA (DLLME)	25
2.4	DETERMINAÇÃO DE ADTs EMPREGANDO MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA (DLLME)	30
2.5	MATRIZ BIOLÓGICA	41
2.5.1	SANGUE	41
3.	ENSAIO LABORATORIAL	43
3.1	FASE ESTACIONÁRIA	43
3.2	FASE MÓVEL	43
3.3.	MATERIAIS.....	44
3.3.1	Equipamentos	44
3.3.2	Reagentes e outros materiais	45
3.3.3	Padrões	45
3.3.4	Amostras	45
3.4	OTIMIZAÇÃO DLLME	45
3.4.1	Efeito salting-out	45
3.4.2	Tipos de solvente extrator	46
3.4.3	Tipos de solvente dispersor	46
3.4.4	Agitação por vórtex	47
3.4.5	Banho de ultrassom	47
3.4.6	Avaliação do pH	47
3.4.7	Tempo e velocidade de centrifugação	48
3.4.8	Volume do solventes	48
3.4.9	Mistura de solventes extratores	49
3.4.10	Óleo essenciais como solvente extrator	49
3.4.11	Estabilidade	50
3.5	DETERMINAÇÃO DE ANTIDEPRESSIVOS TRICÍCLICOS POR DLLME	50
3.6	CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	51
3.7	VALIDAÇÃO DO MÉTODO	51
3.7.1	Especificidade/seletividade	52
3.7.2	Limite de detecção (LD)	52
3.7.3	Limite de quantificação (LQ)	52
3.7.4	Recuperação	52
3.7.5	Linearidade	53
3.7.6	Precisão intra e inter-dia	53

3.7.7	Acurácia (inexatidão)	53
3.7.8	Integridade da diluição e efeito memória (<i>carryover</i>).....	53
3.7.9	Robustez	54
3.7.10	Aplicação do método	54
4.	RESULTADOS	54
4.1	FASE ESTACIONÁRIA.....	54
4.2	FASE MÓVEL.....	55
4.3	OTIMIZAÇÃO DA DLLME	64
4.3.1	Escolha da matriz biológica apropriada	64
4.3.2	Efeito <i>salting-out</i>	65
4.3.3	Tipos de solvente extrator	66
4.3.4	Tipos de solvente dispersor	67
4.3.5	Agitação por vórtex e banho de ultrassom.....	68
4.3.6	Avaliação do ph	69
4.3.7	Tempo e velocidade de centrifugação	69
4.3.8	Volume de solventes	70
4.3.9	Mistura de solventes	71
4.3.10	Óleos essenciais como solvente extrator.....	71
4.3.11	Estabilidade	72
4.4	VALIDAÇÃO DA DLLME PARA DETERMINAÇÃO DE ANTIDEPRESSIVOS TRICÍCLICOS EM SANGUE TOTAL	72
4.5	AMOSTRA REAL	74
4.5.1	Caso 1.....	74
4.5.2	Caso 2.....	76
5.	DISCUSSÃO	78
6.	CONCLUSÃO	92
	REFERÊNCIAS	93
	APÊNDICE A – CONDIÇÕES CROMATOGRAFICAS E RESULTADOS	
	(GC/MS)	105
	ANEXO A – Histórico escolar	107
	ANEXO B - Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)	108
	ANEXO C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	109

1. INTRODUÇÃO

Os medicamentos são os principais agentes responsáveis por intoxicações no Brasil, responsáveis por quase 14 mil casos registrados no país conforme o último dado divulgado pelo Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX) (SINITOX, 2017). No ano de 2019, somente no estado do Rio Grande do Sul, o número de pessoas intoxicadas por medicamentos alcançou mais de 9 mil ocorrências (CIT, 2019), do qual se destacam as substâncias psicotrópicas. As classes de medicamentos psicotrópicos com maior destaque são anticonvulsivantes (AC), benzodiazepínicos (BZD) e antidepressivos (CIT, 2019; AZEVEDO et al., 2016).

Dentre as classes de antidepressivos podemos destacar os Antidepressivos Tricíclicos (ADTs) que são os antidepressivos mais antigos e os mais intimamente relacionados com as fenotiazidas possuindo uma cadeia lateral de amina terciária. Os ADT atuam em diferentes receptores no sistema nervoso central (SNC) (colinérgico, histaminérgico, alfa-1-adrenérgico, serotoninérgico), aumentando a disponibilidade de norepinefrina e serotonina. Este mecanismo eleva a probabilidade de efeitos adversos como xerostomia e mioclonias de mesma forma que complicações toxicológicas como convulsões, depressão respiratória, depressão miocárdica e arritmias cardíacas, podendo levar a óbito (MORENO et al, 1999; LIEBELT & FRANCIS, 2002).

A análise toxicológica destes psicotrópicos é justificada devido a uma série de fatores como o elevado número de prescrições, alta comercialização, capacidade de causar uma série de efeitos adversos e complicações toxicológicas quando administradas isoladamente e agravadas em situações de politerapia medicamentosa. Além disso, há alta aptidão em provocar dependência e certa aceitação por parte da sociedade contemporânea quanto ao uso destes princípios ativos (LIEBELT & FRANCIS, 2002; DE LIMA, 2017).

Dentre as matrizes biológicas utilizadas nos laboratórios toxicológicos, destaca-se o sangue, uma matriz altamente complexa, de fácil obtenção e podendo ser utilizada tanto na emergência clínica como em casos *post-mortem*. Ainda é possível encontrar tanto o fármaco na forma íntegra como também seus produtos de biotransformação e no caso dos ADTs a utilização do sangue total nas análises reflete de forma mais fidedigna a concentração dos ADTs (TITIER, et al. 2007; MONTENARH, et al. 2014a; DE BOECK, et al. 2018).

O tratamento de amostra é uma etapa essencial nas análises toxicológicas. A microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) vem ganhando espaço nas análises em amostras biológicas por ser uma técnica rápida, simples, baixo custo e aplicável a qualquer laboratório.

1.1 JUSTIFICATIVA

Os antidepressivos tricíclicos (ADTs) possuem amplo espectro de ações farmacológicas atuando sobre o sistema nervoso central, elevando a probabilidade de efeitos adversos e complicações toxicológicas. Outros fatores como o elevado número de prescrições, alta comercialização e há alto potencial destes princípios ativos em provocar dependência e certa aceitação por parte da sociedade contemporânea quanto ao uso atenuam a necessidade de uma técnica para desenvolvimento de um método analítico que possa detectar e quantificar estes fármacos com especificidade e sensibilidade suficientes para auxiliar na conduta profissional de médicos e outros profissionais da saúde em casos de intoxicação acidental ou intencional.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

O objetivo geral é desenvolver de um método analítico por micro extração líquido-líquido dispersiva (DLLME) para determinar antidepressivos tricíclicos e seus respectivos produtos de biotransformação em sangue total empregando cromatografia líquida com detector de diárranjo de diodos (LC-DAD).

1.2.2 Objetivos específicos

- Determinar antidepressivos tricíclicos e seus principais produtos de biotransformação (amitriptilina, desipramina, doxepina, nortriptilina, imipramina) em sangue total por DLLME.
- Aplicar o método em voluntários usuários de ADTs.
- Incorporação da tecnologia desenvolvida para futuras análises toxicológicas que envolvam suspeitas de intoxicação por amitriptilina, imipramina, doxepina e seus produtos de biotransformação nortriptilina e desipramina.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ANTIDEPRESSIVOS TRICÍCLICOS

Os ADTs foram sintetizados em 1891 por Thiee e Hozenier sendo inicialmente testados como medicamentos anti-histamínicos nos anos de 1940 (ROSA et al, 2018). Devido ao seu mecanismo de ação, notou-se então que esta classe possui efeito antidepressivo e analgésico, sendo eficaz no tratamento de depressão, dor neuropática e transtorno obsessivo-compulsivo (DE PAULA, 2007; MEDAWAR & MATHEUS, 2012; ROSA et al, 2018). Atualmente os ADTs são aprovados para os seguintes tratamentos: Transtorno depressivo maior (tratamento agudo e manutenção); Depressão secundária; Transtorno bipolar; Enurese infantil; Insônia e Psiconeurose; Fibromialgia; Dor Crônica para Articulação Temporomandibular (ATM) (PROCYSHYN, et al. 2019).

Em geral, os ADTs compartilham de 5 ações farmacológicas: inibição da receptação de noradrenalina, serotonina e dopamina; bloqueio dos receptores histaminérgicos H₁; bloqueio dos receptores α_1 -adrenérgicos; bloqueio dos receptores colinérgicos muscarínicos; inibição da ATPase de sódio (Na⁺), e potássio (K⁺) (LIEBELT & FRANCIS, 2002; DE PAULA, 2007; GILLMAN, 2007; MEDAWAR & MATHEUS, 2012; ROSA, et al. 2018).

O principal mecanismo de ação dos ADTs, envolvem os níveis de monoaminas a nível pré-sináptico e pós-sináptico, inibindo a recaptação sináptica de serotonina e noradrenalina. Na fenda pré-sináptica, ocorre a inibição do transportador de membrana, assim, impedindo a recaptação de serotonina e noradrenalina, aumentando os níveis dos neurotransmissores, aumento seu tempo de ação na fenda sináptica (DE PAULA, 2007; GILLMAN, 2007; MEDAWAR & MATHEUS, 2012; STHAL, 2014; ROSA, et al. 2018) As aminas terciárias possuem maior afinidade pelo bloqueio da serotonina (imipramina, amitriptilina e doxepina), enquanto as aminas secundárias (nortriptilina e desipramina) possuem maior afinidade pelo bloqueio da noradrenalina (PROCYSHYN, et al. 2019).

A atividade pós-sináptica está relacionada com a interação com outros receptores. Os ADTs bloqueiam os receptores serotoninérgicos 5HT_{2A} e 5HT_{2C}, o qual, o receptor 5HT_{2c}, quando bloqueado, estimula a liberação de dopamina e de noradrenalina no córtex pré-frontal e exerce ações pró-cognitivas, porém esse efeito é pouco pronunciado (DE PAULA, 2007; GILLMAN, 2007; MEDAWAR & MATHEUS,

2012; STHAL, 2014; ROSA, et al. 2018; OCHI, et al; 2019). Além dos receptores serotoninérgicos, esta classe também bloqueia os receptores colinérgicos muscarínicos, receptores H₁-histamínicos, receptores α_1 -adrenérgicos e antagonizam os receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), que são acoplados aos canais de cálcio e sódio voltagem-dependente. Ao antagonizar os receptores NMDA, diminui os impulsos nervosos aumentando a hiperpolarização dos neurônios da dor (GILLMAN, 2007; MEDAWAR & MATHEUS, 2012; STHAL, 2014; CASTRO & CAMARELLA, 2019).

Os ADTs são facilmente absorvidos por via oral, a biodisponibilidade varia de 55 – 80% e possui forte ligação proteica, variando de 90-95%, em doses terapêuticas. Seus efeitos terapêuticos podem demorar cerca de 2 a 4 semanas para iniciar, demorando também para ocorrer os picos plasmáticos, tendo uma meia-vida que varia entre dez a oitenta horas, dependendo do ADTs (FERNANDES, 2006; DE PAULA, 2007; GILLMAN, 2007).

Os ADTs ão metabolizados pelo fígado, e grande parte sofre efeito de primeira passagem. A metabolização ocorre pelo sistema Citocromo P450, em que existem várias isoformas. As principais isoformas responsáveis pela metabolização dos ADTs são: CYP2C19, CYP3A4 e CYP1A2, elas removem o grupo metilo (CH₃), ou seja, metabolizam as aminas terciárias (imipramina, amitriptilina e doxepina) em aminas secundárias (nortriptilina e desipramina) farmacologicamente ativas (REGENTHAL et al., 1999; LIEBELT & FRANCIS, 2002; LIMA, et al. 2004; ROSA, et al. 2017). Enquanto, a isoforma CYP2D6, é responsável pela hidroxilação dos ADTs, formando produto de biotransformação inativos (LIMA et al, 2004, GILLMAN, 2007; STHAL, 2014). A excreção dos ADTs vai depender principalmente do fármaco utilizado (DE PAULA, 2007; GILLMAN, 2007).

A amitriptilina é caracterizada por ser uma amina terciária, possui alta ligação proteica, 91-97%. O tempo de meia-vida é de 9–36h, podendo aumentar em casos de intoxicação e a sua biodisponibilidade varia de 30-60% (MOFFAT, et al, 2011; CORDIOLI, et al., 2015). É metabolizada principalmente pelas isoformas CYP2C19 e CYP3A4, sofrendo desmetilação para formar o principal produto de biotransformação ativo nortriptilina. A isoforma CYP2D6 é responsável pela hidroxilação, fomando como metabolitos didesmetilamitriptilina e dinortriptilina, podendo ser encontrados na urina. Reações de N-oxidação e conjugação também ocorrem (DE PAULA, 2007, MOFFAT, et al, 2011, CASTRO & CAMARELLA, 2019; PROCYSHYN, el al. 2019).

É excretada principalmente na urina, sendo menos de 5% na forma inalterada ou nortriptilina. Os principais metabólitos excretados, são oriundos da hidroxilação hidroxinortriptilina, 10-hidroxiamitriptilina e suas formas conjugadas, enquanto, cerca de 8% pode ser eliminada nas fezes de forma inalterada (DE PAULA, 2007, MOFFAT, et al, 2011, KAYLEE, et al. 2016; CASTRO & CAMARELLA. 2019; PROCYSHYN, et al. 2019).

A amitriptilina promove a inibição da recaptção de noradrenalina e, mais fortemente, da serotonina por ser uma amina terciária (CORDIOLI, et al., 2015; PROCYSHYN, et al. 2019). Também possui a capacidade de bloquear os canais de sódio, semelhantemente aos analgésicos locais (CASTRO & CAMARELLA. 2019). A sua principal indicação clínica é para o tratamento da depressão, entretanto também é indicada para o tratamento de dor crônica e novos estudos indicam que seu uso é eficaz para o tratamento de dor neuropática (MOORE, et al 2015; KREMER, et al. 2018).

A doxepina, juntamente com a amitriptilina, é uma amina terciária, derivada dos dibenzozepínicos. É rapidamente absorvida por administração oral, mas sofre extensa desmetilação de primeira passagem. Possui alta ligação proteica, cerca de 80%, seu pico de concentração plasmática é atingido 2 e 8 horas após a ingestão e sua meia vida varia de 6 a 17 horas, podendo chegar a 36 horas em casos de intoxicação e sua biodisponibilidade varia de 15 a 45% (MOFFAT, et al, 2011; PROCYSHYN, et al. 2019).

É metabolizado principalmente pela isoforma CYP2D6, sofrendo hidroxilação, entretanto sofre também reação de desmetilação pelas isoformas CYP1A2, 3A4 e 2C19, formando o metabólito ativo nordoxepina, com tempo de meia-vida de 51 horas (MOFFAT, et al, 2011; CORDIOLI, et al., 2015; PROCYSHYN, et al. 2019). A doxepina ainda inibe a CYP2C19, desencadeando pequenos efeitos farmacológicos (CORDIOLI, et al., 2015). A doxepina é excretada menos de 1% na forma inalterada em um período de 24 horas (MOFFAT, et al, 2011).

A doxepina inibe a recaptção da noradrenalina e, em menor grau, da serotonina, diferentemente da amitriptilina. Atua também nos receptores muscarínicos M1 e nos receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} e 5-HT₂, estes efeitos estão relacionados com seu efeito antidepressivo (MOFFAT, et al, 2011; SHIMAMURA, et al. 2011 CORDIOLI, et al., 2015). Em doses abaixo da terapêutica, interage com os receptores histaminérgicos H₁, entretanto, esse mecanismo está relacionado com o tratamento

de insônia, e sua interação com os receptores H_2 estão relacionados com efeitos adversos. Ainda, possui a capacidade de se ligar em receptores colinérgicos e α_1 e α_2 -adrenérgicos e bloqueia os canais de sódio (SHIMAMURA, et al. 2011; CORDIOLI, et al., 2015; HOFMANN et al. 2016; EDMONDS & SWANOSKI, 2017).

A nortriptilina é um produto de biotransformação ativo da amitriptilina. Possui boa absorção via oral e alta taxa de ligação a proteínas plasmáticas 90-95%, seu pico plasmático ocorre entre 2-6 horas e seu tempo de meia vida varia de acordo com a idade, em jovens e adultos varia de 12-56 horas, já em idosos pode chegar a 90 horas e sua biodisponibilidade varia 50–60% (DE PAULA, 2007, MOFFAT, et al, 2011, CASTRO & CAMARELLA. 2019; PROCYSHYN, et al. 2019).

É metabolizada no fígado pela CYP2D6, sofre principalmente as reações de desmetilação e hidroxilação formando os metabólitos dinortriptilina, 10-hidroxi-dinortriptilina e 10-hidroxi-nortriptilina, seu principal produto de biotransformação. Também ocorre a conjugação glucuronida da nortriptilina e dos seus metabólitos. Menos de 5% de nortriptilina é eliminada de forma inalterada, e o produto de biotransformação 10-hidroxi-nortriptilina é o principal composto eliminado, 30-50% (DE PAULA, 2007, MOFFAT, et al, 2011, CASTRO & CAMARELLA. 2019; PROCYSHYN, et al. 2019; MIFSUD BUHAGIAR, et al. 2019)..

A eficácia da nortriptilina é comparada aos antidepressivos inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ADISRS), isso se deve pela sua capacidade de bloquear predominantemente a recaptação da noradrenalina nos neurônios pré-sinápticos, aumentando as concentrações desse neurotransmissor na fenda. Atua de maneira menos intensa nos receptores α_1 , H_1 , $5HT_2$ e colinérgicos muscarínicos. Como os demais ADTs, também bloqueia os canais de sódio voltagem-dependentes, apresentando menos efeitos colaterais (MARSH, 2007; JAGTAP & TAPADIA. 2018; CASTRO & CAMARELLA. 2019; PROCYSHYN, et al. 2019).

A imipramina é o primeiro antidepressivo desenvolvido da classe dos tricíclicos. O fármaco é prontamente absorvido por via oral e amplamente distribuído entre os tecidos, apresenta alta taxa de ligação as proteínas plasmáticas 85-95%. O pico plasmático é de 2-6 horas e seu tempo de meia-vida 4-35 horas, podendo aumentar em crianças, idosos e casos de overdose. Já sua biodisponibilidade é cerca de 50%, porém existe uma variação subjetiva (MOFFAT, et al, 2011; CASTRO & CAMARELLA. 2019; PROCYSHYN, et al. 2019).

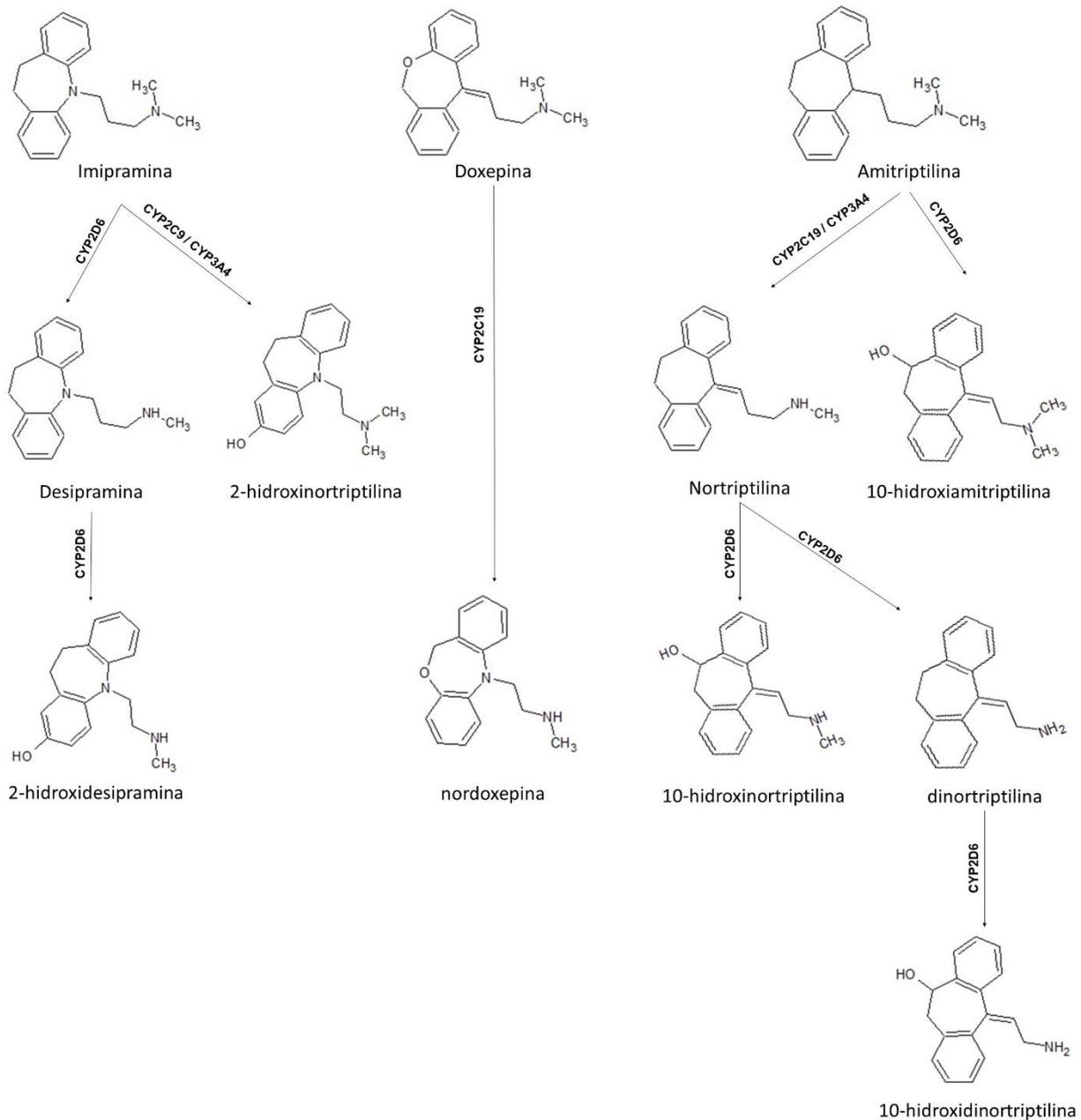
A imipramina sofre considerável metabolismo de primeira passagem, sendo metabolizada principalmente pela enzima CYP2D6, sofrendo desmetilação formando como metabólito ativo a desipramina, entretanto, pode sofrer metabolização das isoformas CYP3A4 e CYP2C9. Outras reações ocorrem como a hidroxilação nas posições 2 e 10 seguidas de conjugação. A excreção é principalmente pela urina, cerca de 80%, entretanto menos de 10% é eliminado a forma inalterada. Dentre os outros metabolitos destaca-se o 2-Hidroxi-imipramina e 2-hidroxi-desipramina que possam ter alguma atividade. Cerca de 20% é excretado nas fezes (MOFFAT, et al, 2011; DEAN, 2012; CASTRO & CAMARELLA. 2019; PROCYSHYN, et al. 2019).

Assim como a amitriptilina, a imipramina é uma amina terciária, ou seja, possui maior afinidade pela inibição da recaptção da serotonina, comparada a noradrenalina. Atua nos receptores α_1 , H_1 , $5HT_2$ e colinérgicos, com ação anticolinérgica intensa e quase não apresenta ação nos receptores $5-HT_2$ (DEAN, 2012; CORDIOLI, et al., 2015; CASTRO & CAMARELLA. 2019).

A desipramina não é comercializada no Brasil. Entretanto, é o produto de biotransformação ativo da imipramina. É uma amina secundária e é bem absorvida oralmente, possui alta ligação proteica 70-90%, seu pico plasmático ocorre de 2-6 horas e o tempo de meia vida é de 10-30 horas. Sofre metabolização hepática, pelas enzimas CYP2D6 e CYP2C19, e sofre hidroxilação formando 2-hidroxidesipramina, seu principal produto de biotransformação o qual possui atividade. Cerca de 70% da desipramina é excretado pelo rim (MOFFAT, et al, 2011; CORDIOLI, et al., 2015; CASTRO & CAMARELLA. 2019; PROCYSHYN, et al. 2019).

Por ser uma amina secundária, é um potente inibidor da recaptção da noradrenalina, entretanto quase não possui efeito sobre a inibição da recaptção de serotonina e nem sobre a dopamina. Também possui baixa afinidade nos receptores colinérgicos, α_1 -adrenérgicos e H_1 e possui poucos efeitos anticolinérgicos e anti-histamínicos (GILLMAN, 2007; CORDIOLI, et al., 2015). A Figura 1 ilustra a estrutura química e rota metabólica dos antidepressivos tricíclicos. A tabela 1 informa as propriedades físicas e químicas dos antidepressivos tricíclicos, bem como as concentrações sanguíneas tóxicas e terapêuticas.

Figura 1 – Estrutura química e biotransformação dos ADTs.



Fonte: REGENTHAL et al., 1999; LIEBELT & FRANCIS, 2002; LIMA et al, 2004; DE PAULA, 2007, MOFFAT, et al, 2011; DEAN, 2012; KAYLEE, et al. 2016; SANTANA ROSA, ET AL 2017; CASTRO & CAMARELLA. 2019; MIFSUD BUHAGIAR, el tal. 2019; PROCYSHYN, el al. 2019.

Tabela 1 – Características físico, químicas e farmacocinéticas dos antidepressivos tricíclicos (ADTs).

Antidepressivo	pKa	Log P	Absorção máxima (λ nm)	Ligação protéica (%)	T _{1/2} eliminação sérica (horas)	Nível terapêutico (ng/mL sangue)	Nível tóxico (ng/mL sangue)
Amitriptilina	9,4	4,92	239 ¹	91-97	17-40	50-200	500
Desipramina	10,02	3,9	250 ¹	70-90	10-35	8-15	400
Doxepina	9,76	3,84	292 ²	80	8,2-24,5	50-150	100
Nortriptilina	10,1	4,51	239 ¹	90-95	15-90	50-150	250
Imipramina	9,4	4,8	251 ¹ e 252 ³	85-95	8-20	10-100	500

1- Meio Ácido; 2 - Ácido sulfúrico 0.1N; 3 – Meio Alcalino; 4 - Ácido clorídrico 0,01M / metanol ou apenas metanol.

Fonte: MOFFAT et al, 2011

Os efeitos antimuscarínicos e antihistamínicos são bem característicos, com breve fase de excitação e inquietude, seguindo de sonolência, confusão, ataxia, nistagmo, disartria, midríase, alucinações, contraturas musculares, íleo paralítico e convulsões tônico-clônicas, e pode evoluir rapidamente para o coma. Esses efeitos sobre o SNC ainda podem evoluir para depressão respiratória (DE PAULA, 2007; CORDIOLI, et al., 2015). Já o bloqueio dos canais de sódio resulta no retardo da condução intraventricular e o impulso cardíaco se propaga mais lentamente dos átrios para os ventrículos, ocasionando o prolongamento do complexo QRS no eletrocardiograma (ECG). Outros achados incluem aumento do intervalo QT, depressão do segmento ST e ondas T anormais a devido atuação concomitante do bloqueio do efluxo de potássio sobre as fibras His-Purkinje. O sistema cardiovascular também é afetado pelo antagonismo alfa-adrenergico, que em conjunto com os demais mecanismos, levam a hipotensão enquanto a atividade anticolinérgica pode levar a taquicardia sinusal. As manifestações cardiotoxicas são as mais letais nos casos de intoxicação por ADTs (DE PAULA, 2007; CORDIOLI, et al., 2015; MARCOS, 2019).

2.2 CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (LC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) é um método analítico de separação que se desenvolveu muito nos últimos anos, possui ampla aceitação em várias áreas da ciência, sendo aplicada nas análises toxicológicas com sucesso. Esse método se baseia em um processo físico e químico de separação de misturas, no qual os componentes a serem separados distribuem-se em duas fases: fase estacionária (FE) e fase móvel (FM) (PERES 2002; LIMA, 2009; BORGES, 2012).

Um sistema de LC é constituído principalmente por um sistema de bombas, um sistema de injeção da amostra, a coluna cromatográfica, o detector e um sistema de registo e tratamento da resposta analítica do detector, ou seja, um computador e software (SILVA, 2016).

Diferentemente dos outros tipos de cromatografia, a cromatografia líquida é caracterizada por sua FM ser um solvente. Para a escolha do solvente, ele deve respeitar as características dos analitos a serem analisados, dentre elas, ter a capacidade de dissolver a amostra, com os analitos, sem qualquer interação química entre ambas. Também, o solvente deve possuir um alto grau de pureza e ser compatível com o detector empregado (PERES 2002; SOUZA, 2018).

A separação pode ocorrer por dois modos diferentes: fase normal ou fase reversa. O tipo de separação é definido pela polaridade da FE. A fase normal é caracterizada por uma FE polar, onde, geralmente é preenchida com sílica, podendo haver incorporação de componentes polares (cianopropil, nitropropil, diol, aminopropil, dimetilaminopropil) e a FM apolar (BORGES, 2012; SILVA, 2016; SOUSA, 2018).

A fase reversa utiliza uma FE apolar constituída, principalmente, por sílica com a incorporação de grupamentos de cadeia longa de hidrocarbonetos (denominados de C8 e C18) e a FM é polar. Sendo este modo o mais utilizado (BORGES, 2012; SILVA, 2016; SOUSA, 2018) e indicado para a análise de solutos básicos como os antidepressivos (BORGES, 2012). Já a interação dos analitos com a coluna cromatográfica pode ser classificada como: partição, adsorção, exclusão ou troca iónica. Isso ia depender do tipo de preenchimento da coluna e a escolha adequada ia depender do objetivo da análise e das características dos analitos em questão (SILVA, 2016).

Os detectores tem a função de analisar e identificar as bandas de separação dos analitos à medida que vão eluindo da coluna. Existem diversos tipos de detectores, contudo, eles devem apresentar as seguintes características: alta sensibilidade, seletividade, linearidade, pouca sensibilidade às variações de temperatura e fluxo, precisão e reprodutibilidade (SOUSA, 2018).

Dentro dos diversos detectores, o detector UV/Vis tem grande destaque por apresentar baixo custo e alta aplicabilidade, tornando um dos detectores mais utilizados em LC (SILVA, 2016). Os detectores UV/Vis são espectrofotométricos, que mede a absorção de luz pelos compostos (com grupamentos cromóforos), num dado comprimento de onda entre as regiões visível e ultravioleta, compreendido na faixa de 190 a 800nm, ou seja, a concentração do analito é proporcional à fração da luz transmitida pela célula do detector (SILVA, 2012; 2016).

Na mesma linha de detectores espectrofotométricos, o detector de arranjo de diodos (DAD), se baseia no mesmo princípio. Entretanto, o DAD permite a absorbância da amostra em vários comprimentos de onda de forma simultânea em um modo de varredura. Além disso, permite a análise pós corrida e seleção do respectivo comprimento de onda específico para cada analito, aumentando assim a detectabilidade (SILVA, 2012).

Ensaio imunológico também são utilizados para a análise de fármacos em sangue, como a classe dos antidepressivos (ASSELIN et al, 1991; CHATTERGOON et al, 1998; KRIEG et al, 2015). No entanto, essa metodologia é mais utilizada em triagem preliminar e seus resultados devem ser interpretados com cautela, pois, os imunoensaios podem ter problemas com seletividade e reação cruzada com outros fármacos, interferindo nos resultados necessitando de uma confirmação (DASGUPTA, et al, 2004; VAN HOEY, 2005; DASGUPTA et al, 2007; SAIDINEJAD et al, 2007).

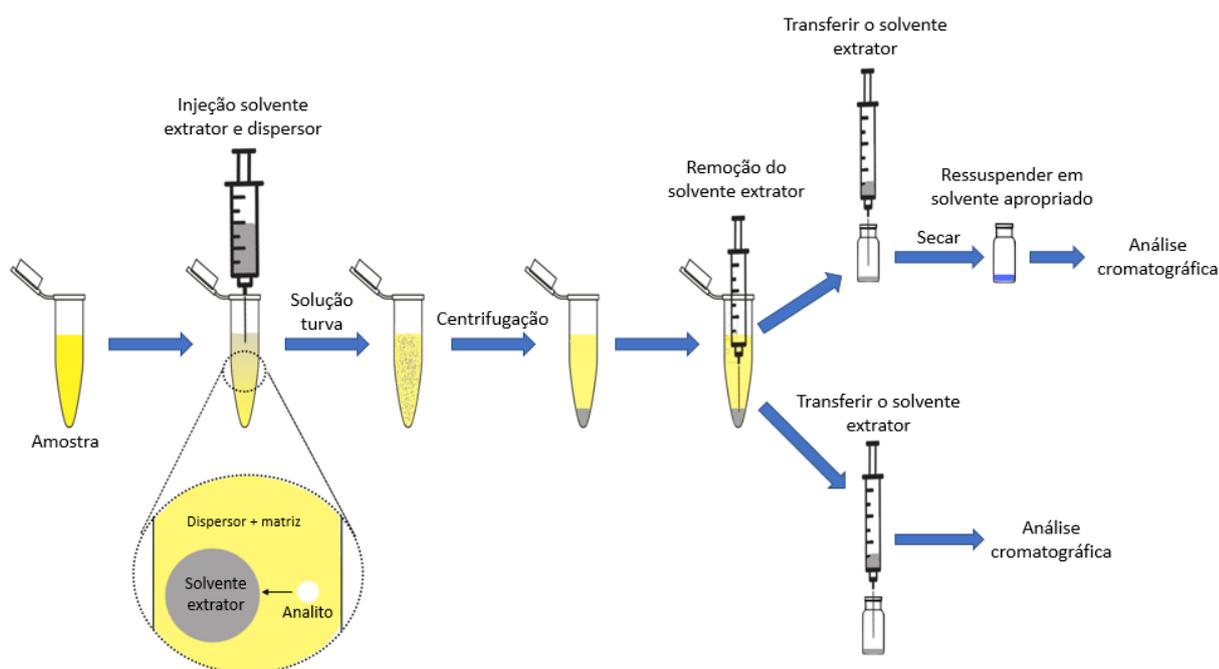
Devido às limitações apresentadas pelos imunoensaios, os métodos cromatográficos são considerados padrão “ouro” para determinação de medicamentos em sangue, principalmente com o enfoque toxicológico (CHATTERGOON et al, 1998; FLANAGAN et al., 2007a; UNODC, 2011; SAIMAN et al., 2014), onde análise de ADTs e ADIRS por LC-UV/Vis ou LC-DAD já estão bem estabelecidos no cenário científico e são as mais utilizadas, tanto para monitorização terapêutica, como para separação e determinação em casos de intoxicação. (DE PAULA, 2007; MANOUSI & SAMANIDOU, 2019).

2.3 MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA (DLLME)

Esta técnica de extração foi desenvolvida por Rezaee e colaboradores (2006), é caracterizada por ser uma técnica simples rápida e capaz de resultar na pré-concentração de compostos orgânicos, além de possuir baixo custo, por esta razão, permitem que este procedimento possa ser empregado em qualquer laboratório de análises toxicológicas, sendo uma técnica muito empregada e bem aceita em análises cromatográficas (REZAAE, et al. 2006; MARTINS, et al. 2012; MOREIRA, et al. 2014).

A DLLME se baseia em um sistema ternário, ou seja, um solvente extrator e um solvente dispersor são misturados a uma matriz aquosa, contendo o analito alvo. Essa mistura promove a dispersão do solvente extrator, na fase aquosa, na forma de microgotas com grande área superficial onde ocorre a extração do analito alvo, governada pela polaridade do sistema, de forma quase instantânea (MARTINS, et al. 2012, MANOUSHI & SAMANIDOU, 2019, TABANI, 2019). A figura 2 demonstra de forma simplificada a técnica de DLLME convencional.

Figura 2- Etapas da técnica de DLLME



A DLLME é utilizada para extração de analitos orgânicos, como produtos farmacêuticos, amins, fenóis e outros em amostras aquosas e alimentos, também pode ser utilizada para pré-concentração do analito desejado. Para a elaboração da DLLME alguns fatores devem ser considerados para atingir o máximo rendimento da técnica, como tipo do solvente extrator e dispersor, pH da amostra, força iônica,

volume dos solvente e tempo de extração (MARTINS et al, 2012; MOREIRA et al, 2014; RAMIN et al, 2019).

A seleção do solvente extrator é considerada o principal fator que influencia a eficiência da extração. Algumas características devem ser observadas para a determinação do solvente extrator como densidade, capacidade de extrair os analitos, capacidade para formar uma solução turva estável, baixa solubilidade em água, e bom comportamento cromatográfico ou eletroforético, ou seja, tem que ser adequado à técnica analítica escolhida. Dentre os solventes mais utilizados estão os hidrocarbonetos halogenados e não halogenados, entretanto o que deve ser levado em consideração é a compatibilidade do solvente com os instrumentos utilizados, por exemplo fases estacionárias e cromatógrafos líquidos, onde, dependendo do solvente, etapas devem ser adicionadas como a evaporação do solvente (MARTINS, 2012; MOREIRA 2014; SIMÃO, 2015).

Os solventes dispersores mais utilizados são acetonitrila, metanol e acetona. Entretanto, para a seleção do solvente dispersor, deve-se levar em consideração a sua miscibilidade, ou seja, a solubilidade tanto na fase aquosa quanto com o solvente extrator. Essa propriedade implicará diretamente na dispersão do solvente extrator na formação de microgotas na fase aquosa, conseqüentemente, a eficiência da extração (MARTINS, 2012; MOREIRA 2014; FLOSS, 2015).

O volume tanto do solvente extrator quanto do solvente dispersor também são fatores determinantes. Para os solventes extratores o volume está diretamente relacionado com o fator de concentração da amostra. O aumento no volume do solvente extrator resultará no aumento da fase sedimentada, diminuindo o enriquecimento e a concentração da amostra. Logo o volume ideal deve conter alto fator de pré-concentração e garantir um volume suficiente para as análises. Já, o volume do solvente extrator também influencia no volume da fase sedimentada, entretanto ele também influencia na formação das microgotas do solvente extrator, ou seja, o volume de ambos solventes influenciam na eficiência da extração (MARTINS, 2012; MOREIRA 2014; FLOSS, 2015; SIMÃO, 2015). As Tabelas 2 e 3 mostram os principais solvente extratores e dispersores empregados na DLLME com suas características físicas e químicas, respectivamente (MOREIRA 2014; ALMEIDA, 2020; PubChem, 2021).

Tabela 2 – Solventes extratores mais utilizados para DLLME

Solventes	Log P (O/W)	Densidade (g/mL)	Ponto de fusão (°C)	Ponto de ebulição (°C)
Acetato de etila	0,73	0,90	-84	77,1
Diclorometano	1,25	1,33	-95	39,75
Clorofórmio	1,97	1,48	-63,47	61,12
Benzeno	2,13	0,88	5,5	80
Tolueno	2,73	0,87	-95	110,6
Tetracloroeto de Carbono	2,83	1,59	-22,2	76,7
1-octanol	3,0	0,83	-14,7	194,7
Tetracloroetileno	3,4	1,63	-22,2	121,2
1-nonanol	3,77	0,83	-5	213,3
Hexano	3,90	0,66	-95,35	68,73
1-decanol	4,57	0,83	7,0	229
1-undecanol	4,72	0,83	19	243
Diexil éter	4,88	0,80	-34,5	223
1-dodecanol	5,13	0,83	24	259

Log P (O/W), coeficiente de partição (razão octanol/água)

Tabela 3 – Solventes dispersores mais utilizados para DLLME

Solventes	Log P (O/W)	Densidade (g/mL)	Ponto de fusão (°C)	Ponto de ebulição (°C)
Metanol	-0,77	0,79	97,8	64,7
Etanol	-0,31	0,79	-114,14	78,24
Acetona	-0,24	0,79	-96,55	55,75
Acetonitrila	-0,34	0,78	-46	81,6
Isopropanol	0,05	0,79	-87,9	82,3
Tetrahidrofurano	0,46	0,89	-108,3	66

Log P (O/W), coeficiente de partição (razão octanol/água)

A avaliação do pH da amostra é outro parâmetro a ser considerado, principalmente em extrações que envolvem analitos ionizáveis (Mansour et al, 2017).

O ajuste do pH do meio, em função do pK dos analitos, permite que os analitos permaneçam na sua forma não-ionizada (neutra), assim facilitando a partição dos analitos nas microgotas do solvente extrator e aumentando a eficiência da extração (CALDAS, et al. 2011; MOREIRA 2014).

A força iônica da amostra, ou seja, a adição de um sal promove o efeito denominado *salting-out*. O efeito *salting-out* reduz a quantidade de água disponível para solvatar as moléculas do analito, liberando assim, as moléculas orgânicas para a fase orgânica. Também auxilia na separação de fases por diminuir, entretanto diminui a solubilidade da fase aquosa e a fase orgânica aumento o sedimento (LORD & PAWLISZYN, 2000; MOREIRA 2014; CBQ, 2017). Contudo, o tipo de solvente utilizado e o analito a ser extraído deve ser levado em consideração para a escolha do sal a ser utilizado (ZHAO et al, 2012). Muitos estudos utilizam NaCl para esse parâmetro (MOREIRA 2014).

Por último o tempo de extração, o qual, é definido como o intervalo entre a injeção da mistura dos solventes extrator e dispersor na fase aquosa e o final da centrifugação. Entretanto, o equilíbrio da extração é alcançado rapidamente e deve ser um parâmetro a ser otimizado, apesar de muitos autores não acharem um fator importante (MARTINS, 2012; MOREIRA 2014).

A DLLME surgiu como uma alternativa para a microextração em fase líquida, do inglês *liquid phase microextraction* (LPME), devido as suas limitações apresentadas, principalmente, devido à demora para atingir o equilíbrio na extração. A DLLME convencional (Figura 2) utiliza solventes extratores mais densos que a água, principalmente agentes clorados. Esta técnica é muito eficiente em matrizes simples, já em matrizes complexas, como fluidos biológicos, esta técnica apresenta limitações, como a baixa eficiência da agitação manual, a alta toxicidade do solvente extrator e a difícil automação. Para contornar as limitações apresentadas, novas combinação de técnicas analíticas junto a DLLME foram desenvolvidas (SEID et al, 2013; LEONG et al 2014; Mansour & Khairy, 2017).

Os autores classificam as técnicas de DLLME em diferentes grupos, de acordo com a técnica de dispersão, a densidade do solvente em relação a água e de acordo com a combinação de técnicas extrativas com DLLME (LEONG et al 2014; Mansour & Khairy, 2017).

A microextração assistida por ultrassom, do inglês *Ultrasound-assisted microextraction* (UA-DLLME), este modo utiliza as ondas ultrassônicas para facilitar a

dispersão do solvente extrator na fase aquosa e para acelerar o equilíbrio de dissolução, pois a energia ultrassônica pode acelerar a transferência de massa, também ajuda a diminuir a emulsão formada, além de reduzir o uso de solventes. (LEONG et al 2014; XU et al, 2015; Mansour & Khairy, 2017; CHEN et al, 2017).

Assim como a UA-DLLME, a DLLME assistida por vórtex, do inglês *vortex-assisted liquid-liquid microextraction* (VALLME), utiliza as ondas geradas pelo vórtex para auxiliar na dispersão do solvente extrator, acelerar o equilíbrio de dissolução e reduzir o uso de solventes (LEONG et al 2014; Mansour & Khairy, 2017; ALTUNAY et al, 2018). Entretanto, quando comparado com a UA-DLLME, a utilização de ultrassom aumenta a área de contato entre o solvente extrator e a amostra (LEONG et al 2014). A vantagem da utilização do vórtex frente ao ultrassom, é que a utilização prolongada de ultrassom pode degradar os analitos na amostra (MOREIRA 2014; LEONG et al 2014; Mansour & Khairy, 2017).

A DLLME agitada por ar, do inglês *air-agitated liquid-liquid microextraction* (AALLME), a técnica desenvolvida por Farajzadeh e Mohammad (2012) não utiliza solvente dispersor, no lugar desse solvente é utilizada uma seringa para aspirar e injetar repetidamente o solvente extrator e a amostra até a formação de uma solução turva. Este modo é adequado para extração de diversos compostos em amostras aquosas (FARAJZADEH & MOHAMMAD, 2012; LEONG et al 2014; MANSOUR & KHAIRY, 2017).

A DLLME por gota orgânica flutuante solidificada, do inglês *solidification of floating organic droplet* (SFOD), baseia-se na utilização de solventes de densidade menor que a água, esses solventes apresentam temperatura de fusão de 10 a 25°C como 1-undecanol e 1-dodecanol. As etapas da SFOD são similares a DLLME convencional, exceto após a centrifugação, o solvente extrator é solidificado com a ajuda de um banho de gelo. Apesar de apresentar vantagens como a melhor separação de fases, a SFOD apresenta menor taxa de extração quando comparada a DLLME convencional (LEONG et al 2014; MANSOUR & KHAIRY, 2017; MOHEBBI et al. 2018).

A DLLME com solvente extrator de baixa densidade, do inglês *Low-density-solvent based solvent demulsification* DLLME (LDS-SD-DLLME), é outra técnica que, como o próprio nome diz, utiliza solventes extratores de densidade menor que a água. A utilização de um solvente demulsificador é outra característica dessa variação, o

que inutiliza a etapa de centrifugação, diminuindo o tempo de extração (GUO & LEE, 2011; MANSOUR & KHAIRY, 2017).

Seguindo a linha de *Green Chemistry*, foi desenvolvida a microextração com líquidos iônicos, do inglês *Ionic liquid microextraction* (ILDLLME). Os líquidos iônicos são sais orgânicos, devido as suas propriedades físicas e químicas, são líquidos em temperatura ambiente, apresentam alta estabilidade e poder de solubilidade, baixa volatilidade e toxicidade. Somando-se a essas características, os líquidos iônicos podem ser utilizados tanto como solvente extrator como dispersor (LEONG et al 2014; ARAIN et al 2016). Apesar de ser utilizado normalmente para extração de metais em matrizes não complexas, recentemente foi utilizado com fins forenses para análise post mortem de benzodiazepínicos (DE BOECK, et al. 2018).

A DLLME convencional e suas variações são eficientes em diversas matrizes tanto de origem não biológica como água, solo, chá, alimentos, bebidas alcoólicas tanto de origem biológicas como soro, leite, urina, plasma, sangue total, cabelo e saliva, Entretanto, alguns casos as amostras podem necessitar de um tratamento prévio, como diluição, desproteíntização e, em alguns casos, utilização extração em fase sólida, do inglês *Solid phase extraction* (SPE) (MARTINS, 2012; MOREIRA 2014; MANSOUR & KHAIRY, 2017).

Diversos analitos são extraídos por DLLME como praguicidas, hormônios, metais, fármacos, entre outros (MARTINS, 2012; MOREIRA 2014; LEONG et al 2014; MANSOUR & KHAIRY, 2017). Dentre os fármacos estão os ADTs (YAZDI et al 2008; XIONG et al 2009; ITO, et al. 2011; SHAMSIPU & MIRMOHAMMADI, 2014; FISICHELLA et al 2015; BAZREGAR et al. 2016; MOHEBBI et al. 2018)

2.4 DETERMINAÇÃO DE ADTs EMPREGANDO MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA (DLLME)

O primeiro estudo empregando DLLME para determinação de ADTs foi de Yazdi e colaboradores (2008), o objetivo foi a determinação de amitriptilina e nortriptilina em plasma utilizando cromatografia gasosa com detector de ionização por chama do inglês (*Gas chromatography with flame ionization detector* "GC-FID). Devido à alta ligação proteica dos analitos em estudo, foi realizada uma desproteíntização da matriz. Foi adicionado 1 mL de metanol em 500 uL de plasma, a mistura foi centrifugada por 15 minutos a 10.000 rpm, 50 uL do sobrenadante foi adicionada a 5 mL de água deionizada e o pH ajustado para 12 com NaOH 1M. Após essa etapa, foi

realizada a extração da fase aquosa utilizando 1 mL de metanol, como solvente dispersor, e 18 uL de tetracloreto de carbono, como solvente extrator. Essa mistura foi centrifugada por 10 minutos a 10.000 rpm, então 10 uL da fase aquosa foi injetada diretamente no GC-FID. Os limites de detecção foram de 0,005 e 0,01 ug/mL (YAZDI et al 2008).

Xiong e colaboradores (2009), empregou a técnica para determinar amitriptilina, clomipramina e tioridazina em amostras de urina analisadas em cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta-visível (LC-UV). As amostras de urina, contendo os analitos, foram centrifugadas por 15 minutos a 4.000 rpm e o sobrenadante foi filtrado e ajustado a pH 10 com NaOH 10M. Para a DLLME, 5 mL da fase aquosa (pH 10), foi misturada rapidamente com 500 uL de acetonitrila (solvente dispersor) e 20 uL de tetracloreto de carbono (solvente extrator), a separação total das fases foi alcançada em 3 min de centrifugação a 4.000 rpm. Essa mistura resultou em um droplet o qual, após o descarte da fase aquosa, foi adicionado 200 uL de acetonitrila e filtrado, o extraído foi injetado ao LC. Os limites de detecção para esse método foram de 3-8 ng/mL (XIONG et al 2009).

Em 2011, Ito e colaboradores (2011), desenvolveram um método de cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS) para determinação de ADTs em urina empregando DLLME como método extrativo. Para a extração, foi adicionado 600 uL de acetonitrila em 300 uL de urina. Após a centrifugação (9000 rpm por 8 min), foi retirado o sobrenadante (300 uL) e diluído com 600 uL de água deionizada e corrigido o pH com carbonato de sódio (pH 12,2). Uma mistura de 150 uL de metanol (solvente dispersor), 10 uL de tetracloreto de carbono (solvente extrator) e 5 uL de anidrido acético foi injetado rapidamente na solução da amostra. A mistura foi centrifugada por 3 min a 6.000 rpm e foi retirada 2 uL da fase orgânica e injetada no GC. Os limites de detecção foram de 0,5–2,0 ng/mL (ITO et al. 2011).

Imipramina e trimipramina foram analisadas por Shamsipu e colaborador (2014) em amostras de urina por LC-UV empregando DLLME. As amostras de urinas foram submetidas ao processo de hidrólise, com a adição de KOH 10M a 60 °C por 10 minutos, após esse processo, foi sonicado e filtrado e ajustado o para o pH 8,5 com ácido clorídrico. Então, foi adicionado NaCl a amostra de urina hidrolisada e diluída com água. Para a DLLME, 800 uL de acetonitrila (solvente dispersor) contendo 50 uL de clorofórmio (solvente extrator) foram adicionados rapidamente a amostra aquosa e

levadas a centrifugação a 2.000 rpm por 5 minutos. O solvente extrator então foi retirado e dissolvido com acetronitrila e injeto no LC. Os limites de detecção foram 0,6 ng/mL para ambos (SHAMSIPU et al 2014).

Em 2015, Fisichella e colaboradores desenvolveram um método de DLLME de alto rendimento para determinação de drogas de abuso, benzodiazepínicos e outros medicamentos psicotrópicos, incluindo clomipramina e imipramina, em amostras de sangue por LC-MS/MS. As amostras de sangue foram previamente preparadas. 500 uL de sangue foram desproteinizados com 500 uL de metanol e centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi adicionado a 1 mL de água deionizada contendo 0,2 g de NaCl e corrigido para pH 9. A DLLME foi realizada através da injeção rápida de um solvente binário constituído por 100 µL de clorofórmio como extrator e 250 µL de metanol como solvente dispersor, essa mistura foi misturada por 1 minuto em ultrassom e centrifugada a 4000 rpm por 5 minutos. A fase orgânica foi retirada, evaporada, reconstituída na FM e injetada. Os valores de limite de detecção foram 2 ng/mL (FISICHELLA et al, 2015)

Em 2016, foi realizado um estudo para analisar amitriptilina, imipramina e nortriptilina em plasma por LC-UV. Entretanto, Bazregar e colaboradores (2016) propôs uma nova versão de DLLME, na primeira etapa utiliza a microextração por emulsificação assistida por ultrassom (do inglês *ultrasound-assisted emulsification microextraction* "USAEME") e na segunda etapa utilizou a o método microextração líquido-líquido agitada por ar (do inglês *air-agitated liquid-liquid microextraction* "AALLME"), logo essa versão recebeu o nome de microextração líquido-líquido dispersiva em tandem (do inglês *tandem dispersive liquid-liquid microextraction* "TDLLME").

O preparo da amostra foi conduzido da seguinte forma: 0,8 mL do plasma foi misturado com os padrões, então foi adicionado 1,6 mL de acetonitrila e centrifugado por 7 minutos a 1398 x g. Após a centrifugação o sobrenadante é diluído com água com volume final de 8,0 mL e ajustado para o pH 11,25. Para a TDLLME, primeiramente a solução da amostra (pH 11,25) é colocada em ultrassom ligado e adicionado lentamente 95 uL de 1,2-dicloroetano, após 1 minutos em ultrassom ligado (25 ± 3 °C) a emulsão foi centrifugada por 4 minutos a 1132 x g.

Na segunda etapa, o sedimento orgânico foi transferido para outro tubo e adicionado 50 uL da solução de extração aquosa (pH 1,75), então essa mistura foi repetidamente sugada e dispensada dentro do tubo, por 10 vezes, utilizando uma

seringa de vidro de 100 μL . Após essa etapa, a mistura foi centrifugada por 1 minuto a 1132 x g, então 25 μL do sobrenadante foi retirado e injetado no LC. Para esse método foi obtido os valores de limite de detecção foi 1,0 ng/mL para amitriptilina, 0,9 ng/mL para imipramina e 0,7 ng/mL para nortriptilina (BAZREGAR et al, 2016).

Fernández e colaboradores (2016) avaliaram venlafaxina, escitalopram, fluvoxamina, fluoxetina e sertralina em plasma, utilizando cromatografia líquida de ultra eficiência com detector matriz de fotodiodo (do inglês *Ultra Performance Liquid Chromatography with Photodiode Array Detector* “LC-PDA”). Neste estudo foi desenvolvido um método de DLLME com o auxílio de aparelho de ultrassom, denominado microextração líquido-líquido dispersiva assistida por ultrassom (UADLLME) (FERNÁNDEZ et al, 2016).

O procedimento foi conduzido da seguinte forma, em um tubo de ensaio contendo 500 μL de plasma e com o pool de padrão dos antidepressivos foram adicionados 2,5 mL de ACN e centrifugado por 5 minutos a 4.000 rpm. Após a centrifugação o sobrenadante foi retirado para outro tubo de ensaio e então adicionado 200 μL de clorofórmio, como solvente extrator, logo essa mistura foi rapidamente transferida para outro tubo contendo água Milli-Q (pH 9) e colocado imediatamente no banho de ultrassom por 3 minutos. O sobrenadante foi evaporado e resuspenso em 100 μL de FM, filtrado e injetado 5 μL no sistema cromatográfico. Os limites de detecção para escitalopram, fluvoxamina e fluoxetina foram de 5 ng/mL e para sertralina e venlafaxina foram de 4 ng/mL (FERNÁNDEZ et al, 2016).

Utilizando sangue total, Chen e colaboradores (2017) também desenvolveram um método de DLLME utilizando auxiliado por banho de ultrassom porém utilizaram um solvente extrator de baixa densidade, denominado microextração líquido-líquido dispersiva com solvente de baixa densidade assistida por ultrassom (do inglês *ultrasound-assisted low-density solvent dispersive liquid-liquid microextraction* “UALDS-DLLME”), para a quantificação de antidepressivos e antipsicóticos em GC-MS (CHEN et al, 2017).

Um volume de 500 μL de sangue total foi adicionado em um tubo de 1,5 mL e adiciona 100 μL para ajustar para pH 12. Então foi adiciona 100 μL de tolueno e a amostra com o solvente foi colocado em banho de ultrassom por 3 minutos, Após o banho de ultrassom foi adicionado 10 mg de NaCl para a quebra da emulsão e então centrifugado por 5 minutos a 14.000 rpm. Após a centrifugação o solvente extrator encontrado na parte superior foi retirado e injetado no GC-MS. Os limites de

quantificação foram para norfluoxetina, fluoxetina, fluvoxamina, melitraceno, maprotilina e citalopram foi 15 ng/mL e para agomelatina, mirtazapina, moclobeminda, N-desmetilmirtazapina, sertralina, paroxetina, clozapina e haloperidol foi 5 ng/mL (CHEN et al, 2017).

Ainda seguindo a DLLME com auxílio de banho de ultrassom, Vaghar-Lahijania e colaboradores (2018) aliaram essa metodologia com líquido iônico, denominado microextração líquido-líquido dispersiva com líquido iônico assistido por ultrassom (do inglês *ultrasound-assisted ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction* "UA-IL-DLLME"). Essa metodologia extrativa foi desenvolvida para determinar venlafaxina e amitriptilina em plasma por LC-DAD (VAGHAR-LAHIJANIA et al, 2018). A UA-IL-DLLME foi conduzida da seguinte forma, 5 mL, contendo 50 µg/L dos padrões, foram colocados em um tubo de vidro e ajustados para pH 11 com NaOH 0,4 M. 45 µL de [C8MIM][PF6] líquido iônico foram injetados na amostra e rapidamente colocados em banho de ultrassom por 6 minutos, após esta etapa a mistura foi centrifugada por 5 minutos a 4.500 rpm. Então o líquido iônico encontrado na parte inferior do tubo foi retirado, diluído com 1 mL de metanol e injetado 40 µL no sistema cromatográfico. Os limites de detecção foram 0,5 µg/L para venlafaxina e 0,8 µg/L for amitriptilina (VAGHAR-LAHIJANIA et al, 2018).

Mohebbi e colaboradores (2018) desenvolveram um método composto por 3 etapas de tratamento de amostra, incluindo DLLME, para a determinação de nortriptilina, amitriptilina, desipramina, clomipramina e imipramina em urina por LC-UV. As duas primeiras etapas, extração líquido - líquido com partição (SI-HLLE) induzida por sal e extração em fase sólida dispersiva (DSPE), realizaram o processo de clean-up da amostra e a DLLME com Solidificação da Gota Orgânica Flutuante (DLLME-SFO) como processo extrativo.

A primeira etapa, foi adicionado 2 mL de acetonitrila em 2 mL de urina contendo os analitos, após homogeneizado, foi adicionado 1,75 g de sulfato de sódio, misturado em vortex e centrifugado 5 min a 5.000 rpm; Em seguida, 1 mL da acetonitrila obtida na primeira etapa foi adicionada ao tubo contendo uma mistura de amina primária primária, negro de carbono grafitado e sorventes C18 para remover interferências. Então, foi homogeneizada por 2 min em vortex e centrifugada por 5 min a 5.000 rpm.

Por último, a acetonitrila obtida na DSPE misturada com 35 µL de mentol (solvente extrator) e rapidamente injetada em 5 mL de tampão de amônio (pH 10). A mistura foi centrifugada por 5 min a 5.000 rpm. Então, a solução foi colocada em um

banho de gelo e o mentol foi coletado no topo da solução como uma gota sólida e dissolvida em 10 μ L de acetonitrila para ser injetada no LC-UV. Os valores de limite de detecção foram de 0,22-0,31 μ g/L (MOHEBBI et al. 2018). Um resumo da DLLME para antidepressivos em matrizes biológicas estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4 – Resumo da aplicação da DLLME de ADTs em matrizes biológicas.

Matriz	Analitos	Equipamento	Detectabilidade (ng/mL)	Ensaio extrativo	Método validado	Referência
Urina	Imipramina Desipramina Amitriptilina Nortriptilina Clomipramina	LC-UV	0,31 ug/mL 0,26 ug/mL 0,22 ug/mL 0,24 ug/mL 0,29 ug/mL	Adicioanr 2 mL de acetonitrila em 2 mL de urina; adicionar 1.75 g de sulfato de sódio; misturar em vortex; centrifugar por 5 min a 5.000 rpm; Transferir 1 mL de acetonitrila em uma mistura de amina primária primária, negro de carbono grafitado e sorventes C18; 2 min em vortex; centrifugar por 5 min a 5.000 rpm; retirar acetonitrila e adicionar 35 µL de mentol e 5 mL de tampão de amônio (pH 10); centrifugar por 5 min a 5.000 rpm; colocada em um banho de gelo; retirar mentol solidificado; dissolver em 10 µL de acetonitrila; injetar no LC-UV	Seletividade Especificidade Linearidade LD LQ Inexatidão Precisão intra-dia Recuperação	MOHEBBI et al. 2018
Plasma	Amitriptilina Imipramina Nortriptilina	LC-UV	1,0 ng/mL 0,9 ng/mL 0,7 ng/mL	0,8 mL de plasma contendo os padrões; adicionar 1,6 mL de acetonitrila; centrifugar por 7 minutos a 1398 x g; diluir o sobrenadante com agua (volume final de 8,0 mL); ajustar para pH 11,25; colocar a solução da amostra (pH	Linearidade LD Precisão intra e inter-dia	BAZREGAR el al. 2016

				11,25) em ultrassom ligado (25 ± 3 °C); adicionar lentamente 95 µL de 1,2-dicloroetano (1 minuto); centrifugar por 4 minutos a 1132 x g; transferir o sedimento orgânico para outro tubo; adicionar 50 µL da solução de extração aquosa (pH 1,75); sugar e dispensar a mistura dentro do tubo por 10 vezes; centrifugar por 1 minuto a 1132 x g; retirar 25 µL do sobrenadante; injetado no LC.		
Plasma	Escitalopram, Fluvoxamina Fluoxetina Sertralina Venlafaxina	LC-PDA	5 ng/mL 5 ng/mL 5 ng/mL 4 ng/mL 4 ng/mL	500 µL de plasma e com o pool de padrão dos antidepressivos; adicionar 2,5 mL de ACN; centrifugar por 5 minutos a 4.000 rpm; Retirar o sobrenadante e transferir para outro tubo de ensaio; adicionar 200 µL de clorofórmio, como solvente extrator; transferir rapidamente a mistura para outro tubo contendo água Milli-Q (pH 9); colocar imediatamente no banho de ultrassom por 3 minutos; evaporar sobrenadante; resusper em 100 µL de fase móvel; filtrar; injetar 5 µL no sistema cromatográfico.	Seletividade Linearidade LD LQ Inexatidão Precisão intra-dia Precisão inter-dia	FERNÁNDEZ et al, 2016

Sangue total	Norfluoxetina Fluoxetina Fluvoxamina Melitracen Maprotilina Citalopram agomelatina, mirtazapina, moclobeminda, N- desmetilmirtazapina, sertralina, paroxetina, clozapina e haloperidol	GC-MS	*	Tubo contendo 500 µL de sangue total; adicionar 100 µL de solução de amônia para ajustar para pH 12; adicionar 100 µL de tolueno; banho de ultrassom por 3 minutos; após o banho de ultrassom; adicionar 10 mg de NaCl; centrifugar por 5 minutos a 14.000 rpm; retirar solvente extrator encontrado na parte superior; injetar no GC-MS.	Seletividade Estabilidade Linearidade LQ Inexatidão Precisão intra-dia Precisão inter-dia Recuperação	CHEN et al, 2017
Plasma	Venlafaxina Amitriptilina	LC-DAD	500 ng/L 800 ng/L	5 mL, contendo 50 µg/L dos padrões em um tubo de vidro; ajustar para pH 11 com NaOH 0,4 M; adicionar 45 µL de [C8MIM][PF6] líquido iônico na amostra; colocar rapidamente em banho de ultrassom por 6 minutos; centrifugar por 5 minutos a 4.500 rpm; retirar o líquido iônico encontrado na parte inferior do tubo; diluir com 1 mL de metanol; injetar 40 µL no sistema cromatográfico.	Linearidade LD Recuperação	VAGHAR-LAHIJANIA et al, 2018
Sangue total	Imipramina Clomipramina	LC-MS/MS	2,0 ng/mL	Adicionar 500 µL de metanol em 500 µL de sangue; centrifugar a 10.000 rpm por 10 min; retirar sobrenadante;	Sensibilidade Especificidade Linearidade LD	FISICHELLA et al 2015

				adicionar 1 mL de água deionizada contendo 0,2 g de NaCl; Corrigir para o pH 9; adicionar 100 µL de clorofórmio e 250 µL de metanol; 1 minuto em ultrassom; centrifugar a 4000 rpm por 5 minutos; evaporar fase orgânica; ressuspender na fase móvel e injetar no LC.	LQ Inexatidão Precisão intra-dia Recuperação	
Urina	Imipramina Trimipramina	LC-UV	0,6 ng/mL	Adicionar na urina, KOH 10M a 60 °C por 10 minutos; banho de ultrassom; filtrar; ajustar para pH 8.5 com ácido clorídrico; Adicionar 800 µL de acetonitrila e 50 µL de clorofórmio na fase aquosa; centrifugar a 2.000 rpm por 5 minutos; Retirar solvente extratos; dissolver em acetonitrila; Injetar no LC.	Linearidade LD Fator de enriquecimento Precisão intra-dia	SHAMSIPU et al, 2014
Urina	Imipramina Desipramina Amitriptilina Nortriptilina Clomipramina	GC/MS	0,5 ng/mL 2,0 ng/mL 0,5 ng/mL 0,5 ng/mL 0,5 ng/mL	Adicionar 600 µL de acetonitrila em 300 µL de urina; Centrifugar 9000 rpm por 8 min; Retirar 300 µL de sobrenadante; Dissolver em 600 µL de água deionizada; Corrigir para pH 12,2 com carbonato de sódio; misturar com 150 µL de metanol, 10 µL de tetracloreto de carbono e 5 µL de anidrido acético;	Linearidade Recuperação Inexatidão Precisão intra-dia LD LQ	ITO et al, 2011

				centrifugar por 3 min a 6.000 rpm; Injetar 2 μ L da fase orgânica no GC.		
Urina	Amitriptilina Clomipramina Tioridazina	LC-UV	3,0 ng/mL 7,0 ng/mL 8,0 ng/mL	Centrifugar a urina por 15 min a 4.000 rpm; filtrar sobrenadante e ajustar para pH 10 (NaOH 10M); Misturar 5 mL do sobrenadante com 500 μ L de Acetonitrila e 20 μ L de tetracloreto de carbono; Centrifugar por 3 min a 4.000 rpm; descartar a fase aquosa; adicionar 200 μ L de acetronitrila; filtrar; injetar ao LC.	Linearidade Recuperação Sensibilidade LD LQ Precisão intra-dia	XIONG et al, 2009
Plasma	Amitriptilina Nortriptilina	GC-FID	0.005 ug/mL 0.01 ug/mL	1 mL de metanol em 500 μ L de plasma; misturar; centrifugar por 15 min a 10.000 rpm; adicionar 50 μ L do sobrenadante em 5 mL de água deionizada (pH 12 com NaOH 1M); Retirar fase aquosa; adicionar 1 mL de metanol e 18 μ L de tetracloreto de carbono; centrifugar por 10 minutos a 10.000 rpm; injetar 10 μ L	Linearidade LD Recuperação Precisão intradia Fator de enriquecimento	YAZDI et al, 2008

LD: Limite de detecção; LQ: Limite de quantificação. *Estudo não validou o LD.

2.5 MATRIZ BIOLÓGICA

Dentro das análises toxicológicas, existem diversas matrizes para se analisar antidepressivos, como: sangue periférico, sangue cardíaco, plasma, soro, urina, bile, fluido gástrico, humor vitro fígado e o pulmão. Entretanto, para a escolha da matriz biológica deve ser ditada pelo objetivo da análise (DE PAULA, 2007; MADUREIRA, 2019).

Urina geralmente é a matriz biológica de escolha, devido a sua facilidade de coleta, por ser um método não invasivo, pelo grande volume de amostra e por conter tanto o fármaco na sua forma inalterada como seus produtos de biotransformação (LANGMAN & KAPUR, 2006). Entretanto, as concentrações dos ADTs na urina podem variar com o estado de hidratação, não possuindo grande aplicabilidade para o monitoramento terapêutico. Logo, para esses casos utiliza-se sangue, preferencialmente plasma ou soro como matriz biológica (LANGMAN & KAPUR, 2006; MONTENARH et al, 2014b).

2.5.1 SANGUE

O sangue é um tecido líquido de coloração vermelha, viscoso, levemente alcalino (pH, 7,4), heterogêneo formado por diferentes tipos de células suspensas em um fluido, denominado plasma. A principal função do sangue é o transporte de substâncias, como nutrientes e oxigênio, para os tecidos através das veias e artérias (JUNQUEIRA, 2013; PELIÇÃO, DE MARTINIS, PISSINATE, 2014).

O plasma é formado principalmente por proteínas plasmáticas, como o fibrinogênio, sais inorgânicos e compostos orgânicos diversos, tais como aminoácidos, vitaminas, hormônios e glicose. É obtido a partir da centrifugação do sangue tratado com anticoagulantes (JUNQUEIRA, 2013).

O soro é um líquido livre de células, o qual é obtido a partir da centrifugação do sangue sem o tratamento de anticoagulantes, ou seja, é necessário a coagulação do sangue. Logo, as principais diferenças entre soro, plasma e sangue total é que o soro não apresenta fibrinogênio, diferentemente do plasma e o sangue total onde contem fibrinogênio e fatores da coagulação. Porém o soro contém mais íons fosfato e sódio quando comparado ao plasma, já o sangue total possui mais biomoléculas endógenas comparado ao soro e plasma (JUNQUEIRA, 2013; MONTENARH, et al 2014a).

A nível analítico e estatístico, essas diferenças na composição pode levar a diferentes efeitos de matriz e a obtenção de concentrações falsas quando utilizado uma matriz diferente da matriz o qual uma metodologia foi validada, ou seja há uma dificuldade de aplicar métodos analíticos para a determinação de antidepressivos no soro e plasma em sangue total (SKOPP, 2004; JUNQUEIRA, 2013; MONTENARH, et al 2014a; MADUREIRA, 2019).

Tendo em vista a análise quantitativa de drogas, o sangue é a amostra biológica que consegue quantificar a droga precursora e seus produtos de biotransformação fornecendo uma relação direta entre a concentração e os efeitos. Além do mais, fornece importantes informações que auxiliam em casos de intoxicação, podendo diferenciar intoxicações agudas de intoxicações crônicas (PELIÇÃO, DE MARTINIS, PISSINATE, 2014).

Além do mais, a utilização de sangue total consegue evidenciar as concentrações das substâncias ligadas nos eritrócitos e nas proteínas plasmáticas fornecendo dados para uma interpretação mais precisa das concentrações obtidas, tanto do medicamento em si, como seus respectivos produtos de biotransformação. (WILLE et al, 2008; TRUTA et al, 2016; MADUREIRA, 2019).

Em situações *ante mortem*, o sangue é coletado principalmente por punção na região ante cubital com o auxílio de seringas e agulhas. O volume e o tratamento que a amostra de sangue vai receber dependera do objetivo da análise, podendo ser analisado como sangue total, soro ou plasma e as análises podem ser tanto qualitativas como quantitativas (PELIÇÃO, DE MARTINIS, PISSINATE, 2014).

Na análise forense, a interpretação dos dados obtidos em sangue de indivíduos mortos (*post mortem*), é uma das maiores dificuldades encontradas pelos toxicologistas, pois as concentrações obtidas não refletem com as concentrações *ante mortem*. Vários fatores influenciam na concentração sanguínea após a morte, como por exemplo a redistribuição *post mortem* (SKOPP, 2004; YAREMA & BECKER, 2005; PELIÇÃO, DE MARTINIS, PISSINATE, 2014; ØIESTAD, et al. 2018; SASTRE, 2017).

No caso dos antidepressivos eles são mais susceptíveis a redistribuição *post mortem* e também a existe uma relação concentração/sítio dependente (PELIÇÃO, DE MARTINIS, PISSINATE, 2014). Esse fenômeno é comum em substancias básicas e com grande volume de distribuição. Também essa classe possui uma afinidade pelo miocárdio, liberando de moléculas concentradas no miocárdio em direção às cavidades cardíacas, e uma afinidade pelos tecidos adiposos ocorrendo a

concentração no mesmo, por isso deve-se analisar o sangue periférico da veia femoral, pois possui uma estabilidade relativa com o tempo de morte e se aproxima mais com as concentrações *ante mortem* (PROUTY & ANDERSON, 1990; SKOPP, 2004; YAREMA & BECKER, 2005; PELIÇÃO, DE MARTINIS, PISSINATE, 2014; MCINTYRE & MALLETT, 2012; ØIESTAD, et al. 2018; SASTRE, 2017).

As moléculas básicas estão fortemente concentradas nas células *in vivo*. Esse acúmulo intracelular faz com que no *post mortem*, onde ocorre a autólise celular, aumente as concentrações sanguíneas (SASTRE, 2017). Tal fenômeno faz com que desenvolvimento de metodologias para determinação de ADTs em sangue total se torne mais importante.

3. ENSAIO LABORATORIAL

3.1 FASE ESTACIONÁRIA

As fases estacionárias disponíveis para o desenvolvimento experimental são do tipo octadecil (C18), utilizadas em cromatografia líquida de modo reverso. A FE são Waters® XBridge BEH C18 3,5 µm 4,6 x 50 mm e ZORBAX Eclipse XDB-C18 4.6 x 150 mm, 5 µm.

3.2 FASE MÓVEL

Para a elaboração da FM, foram testadas diversas condições cromatográficas, baseadas nas condições encontrada na literatura, conforme a Tabela 5, buscando a separação do maior número de padrões de ADTs e ADISRS em um tempo de corrida razoável. Foram testados os padrões de amitriptilina, desipramina, doxepina, nortriptilina, protriptilina, imipramina, flouxetina, paroxetina e setralina.

Tabela 5 – Fases móveis avaliadas.

Fase Móvel	Referências
NaH ₂ PO ₄ 250 mM (pH 5,5) + ACN (50:50)	QUEIROZ, et al.1995
KH ₂ PO ₄ 50 mM (pH 8,0) + ACN (50:50) + 2% dietilamina	THEURILLAT & THORMANN,1998
Tiretilamina 0,01 M (pH 2,7 ajustado Ácido fosfórico) + ACN (50:50)	KARPINSKA & STARCZEWSKA, 2002
CH ₃ COONH 50 mM (pH 5,5) + ACN (45:55) (1% trietilamina)	ALVES, et al. 2006
CH ₃ COONH 50 mM + ACN (45:55)	SAMANIDOU, et al, 2007
NaH ₂ PO ₄ 250 mM (pH 4,5) + MeOH:ACN (92:8, v/v) (65:35)	MALFARÁ, et al. 2007
CH ₃ COONH 50 mM + ACN + MeOH (55:15:30)	UDDIN, et al, 2008
NaH ₂ PO ₄ 50 mM (pH 3,5) + ACN (68:32)	MERCOLINI, et al. 2010

3.3. MATERIAIS

3.3.1 Equipamentos

- Nexera-XR (Shimadzu®, Kyoto, Japão) – Composto por: Cromatógrafo líquido 20ADXR bomba; Autosampler SIL-20AC; Forno de coluna CTO-10AS e Detector de arranjo de diodos SPD-M20A – Aquisição e análise de dados por software LabSolution (Shimadzu®, Kyoto, Japão).
- pHmetro digital Digimed® modelo DM-22, eletrodo combinado de pH, faixa de leitura de pH -2 a 20
- Balanças analíticas: Shimadzu® modelo AX200 e BEL modelo Mark 220 Classe II.
- Homogeneizador Biomixer® modelo QL-901 de 2800 rpm.
- Banhos de ultrassom Cristófoli® (42 KHz com aquecimento opcional).
- Ultracentrífuga Eppendorf® modelo 5427 R, faixa de temperatura de -11 a 40°C, velocidade máxima de 25000 x g (16220 rpm).
- Microseringa Hamilton® de 100 µL para LC.
- Colunas para cromatografia líquida de fase reversa:
 - Waters® XBridge BEH C18 3,5 µm 4,6 x 50 mm (Milford, EUA).

- Pré-coluna cromatográfica de fase reversa C18 - 12,5 mm x 4,6 mm x 3 µm

3.3.2 Reagentes e outros materiais

- Metanol grau LC, acetonitrila grau LC, hexano grau LC, ácido fosfórico, cloreto de sódio, fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) da marca Neon Comercial (Suzano, São Paulo, Brasil);
- Vials âmbar de 2mL nas dimensões 9mm x 12mm x 32mm e inserts cônicos de 300 µL com spring da marca Agilent Technologies (Santa Clara, Califórnia, EUA).

3.3.3 Padrões

- Padrão de referência analítica de amitriptilina (AMI); desipramina (DES); doxepina (DOX); imipramina (IMI); nortriptilina (NOR) e medazepam da marca Sigma-Aldrich do Brasil® (Saint Louis, Missouri, EUA).

3.3.4 Amostras

- O estudo empregou bolsa de sangue descartadas do Banco de Sangue do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) como matriz biológica para realização dos ensaios experimentais.
- Amostra de sangue oriundo de casos de intoxicação no HUSM e de voluntários interessados em participar da pesquisa. O voluntário deve preencher Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO C) para doação de sangue.
- Uma alíquota de 5 mL de sangue foi o suficiente para os procedimentos analíticos.
- Estas amostras foram acondicionadas em recipientes apropriados identificados apenas por números, para que seja preservada a identidade do paciente. O projeto encontra-se aprovado pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) (ANEXO B).

3.4 OTIMIZAÇÃO DLLME

3.4.1 Efeito salting-out

Neste experimento foi avaliado o efeito *salting-out* com a adição prévia de cloreto de sódio (NaCl) nas concentrações de 0%, 2% (0,010 g), 3% (0,015 g) e 40% (0,200 g). Primeiramente foi pesado as concentrações de NaCl em um tubo e adicionado 500 µL de sangue total contaminado com um pool de antidepressivos

tricíclicos na concentração de 167 ng/mL, adicionado 100 µL de NaOH 5M e homogeneizados em vórtex (2800 rpm) por 10 segundos. Após essa etapa, 400 µL do hexano (solvente extrator) com 700 µL de acetonitrila (solvente dispersor) foram injetados em conjunto dentro da amostra. A mistura foi sonicada em um banho de ultrassom por 60 segundos, após essa etapa, o conteúdo foi centrifugado por 10 minutos à 4000 rpm, a fase orgânica foi coletada, evaporada sob fluxo de ar e ressuspensa em 30 µL de FM.

3.4.2 Tipos de solvente extrator

Neste experimento foram avaliados os solventes extratores hexano, tolueno (apresentam densidade menor que o solvente dispersor) e clorofórmio. Primeiramente foi pesado 15mg de NaCl em um tubo e adicionado 500 µL de sangue total contaminado com um pool de antidepressivos tricíclicos na concentração de 167 ng/mL, adicionado 100 µL de NaOH 5M e homogeneizados em vórtex (2800 rpm) por 10 segundos. Após essa etapa, 400 µL do solvente extrator com 700 µL de acetonitrila (solvente dispersor) foram injetados em conjunto dentro da amostra. A mistura foi sonicada em um banho de ultrassom por 60 segundos, após essa etapa, o conteúdo foi centrifugado por 10 minutos à 4000 rpm, a fase orgânica foi coletada, evaporada sob fluxo de ar e ressuspensa em 30 µL de FM.

3.4.3 Tipos de solvente dispersor

Neste experimento foi avaliado os solventes dispersores metanol, acetonitrila, isopropanol, etanol e acetona assim como a ausência de solvente dispersor. Primeiramente foi pesado 15mg de NaCl em um tubo e adicionado 500 µL de sangue total contaminado com um pool de antidepressivos tricíclicos na concentração de 167 ng/mL, adicionado 100 µL de NaOH 5M e homogeneizados em vórtex (2800 rpm) por 10 segundos. Após essa etapa, 400 µL do hexano (solvente extrator) com 700 µL de solvente dispersor foram injetados em conjunto dentro da amostra. A mistura foi sonicada em um banho de ultrassom por 60 segundos, após essa etapa, o conteúdo foi centrifugado por 10 minutos à 4000 rpm, a fase orgânica foi coletada, evaporada sob fluxo de ar e ressuspensa em 30 µL de FM.

3.4.4 Agitação por vórtex

Foi avaliada a eficiência de extração com homogeneização por vórtex nos tempos de 0, 15, 30 e 60 segundos. Primeiramente foi pesado 15mg de NaCl em um tubo e adicionado 500 μ L de sangue total contaminado com um pool de antidepressivos tricíclicos na concentração de 167 ng/mL, adicionado 100 μ L de NaOH 5M e homogeneizados em vórtex (2800 rpm) por 10 segundos. Após essa etapa, 400 μ L do hexano (solvente extrator) com 700 μ L de metanol (solvente dispersor) foram injetados em conjunto dentro da amostra. A mistura foi homogeneizada no vórtex (nos tempos propostos), após essa etapa, o conteúdo foi centrifugado por 10 minutos à 4000 rpm, a fase orgânica foi coletada, evaporada sob fluxo de ar e ressuspensa em 30 μ L de FM.

3.4.5 Banho de ultrassom

Foi avaliado a eficiência de extração do banho de ultrassom nos tempos de 30, 60, 150 e 300 segundos sem aquecimento. Primeiramente foi pesado 15mg de NaCl em um tubo e adicionado 500 μ L de sangue total contaminado com um pool de antidepressivos tricíclicos na concentração de 167 ng/mL, adicionado 100 μ L de NaOH 5M e homogeneizados em vórtex (2800 rpm) por 10 segundos. Após essa etapa, 400 μ L do hexano (solvente extrator) com 700 μ L de metanol (solvente dispersor) foram injetados em conjunto dentro da amostra, A mistura foi homogeneizada por 30 segundos no vórtex e sonicada em um banho de ultrassom (nos tempos propostos), após essa etapa, o conteúdo foi centrifugado por 10 minutos à 4000 rpm, a fase orgânica foi coletada, evaporada sob fluxo de ar e ressuspensa em 30 μ L de FM.

3.4.6 Avaliação do pH

Neste experimento será avaliado a eficiência de extração sem a correção na de pH e com a correção do pH entre 11-14 com NaOH 1M, 2M e 5M. Primeiramente foi pesado 15mg de NaCl em um tubo e adicionado 500 μ L de sangue total contaminado com um pool de antidepressivos tricíclicos na concentração de 167 ng/mL, adicionado 100 μ L de NaOH (nas concentrações propostas) e homogeneizados em vórtex (2800 rpm) por 10 segundos. Após essa etapa, 400 μ L do hexano (solvente extrator) com 700 μ L de metanol (solvente dispersor) foram injetados

em conjunto dentro da amostra, A mistura foi homogeneizada por 30 segundos no vórtex e sonicada em um banho de ultrassom 300 segundos, após essa etapa, o conteúdo foi centrifugado por 10 minutos à 4000 rpm, a fase orgânica foi coletada, evaporada sob fluxo de ar e ressuspensa em 30 μL de FM.

3.4.7 Tempo e velocidade de centrifugação

Para este experimento será avaliado nas condições de 10 minutos à 4.000 rpm, 10 minutos à 10.000 rpm e 5 minutos à 14.000 rpm. Primeiramente foi pesado 15mg de NaCl em um tubo e adicionado 500 μL de sangue total contaminado com um pool de antidepressivos tricíclicos na concentração de 167 ng/mL, adicionado 100 μL de NaOH 2M e homogeneizados em vórtex (2800 rpm) por 10 segundos. Após essa etapa, 400 μL do hexano (solvente extrator) com 700 μL de metanol (solvente dispersor) foram injetados em conjunto dentro da amostra, A mistura foi homogeneizada por 30 segundos no vórtex e sonicada em um banho de ultrassom 300 segundos, após essa etapa, o conteúdo foi centrifugado (nas condições propostas), a fase orgânica foi coletada, evaporada sob fluxo de ar e ressuspensa em 30 μL de FM.

3.4.8 Volume do solventes

Para este experimento será avaliado a força de extração em diferentes volumes de solventes conforme descrito a Tabela 6.

Tabela 6 – Volumes de solventes e matriz.

Matriz	NaOH	Solvente extrator	Solvente dispersor
350 μL	70 μL	250 μL	250 μL
400 μL	100 μL	350 μL	550 μL
500 μL	100 μL	400 μL	700 μL

A DLLME foi conduzida da seguinte maneira: pesado 15mg de NaCl em um tubo e adicionado sangue total contaminado com um pool de antidepressivos tricíclicos na concentração de 167 ng/mL, adicionado NaOH 2M e homogeneizados em vórtex (2800 rpm) por 10 segundos. Após essa etapa, o hexano (solvente extrator) junto com metanol (solvente dispersor) serão injetados em conjunto dentro da amostra. A mistura será sonicada em um banho de ultrassom 300 segundos, após

essa etapa, o conteúdo foi centrifugado (nas condições propostas), a fase orgânica foi coletada, evaporada sob fluxo de ar e ressuspensa em 30 μL de FM.

3.4.9 Mistura de solventes extratores

Neste experimento foi avaliado a eficiência extrativa na mistura de solventes extratores hexano e octanol nas proporções de 5%, 10% e 15% (hexano:octanol). Primeiramente foi pesado 15mg de NaCl em um tubo e adicionado 400 μL de sangue total contaminado com um pool de antidepressivos tricíclicos na concentração de 167 ng/mL, adicionado 100 μL de NaOH 2M e homogeneizados em vórtex (2800 rpm) por 10 segundos. Após essa etapa, 350 μL da mistura de solvente extrator com 550 μL de metanol (solvente dispersor) foram injetados em conjunto dentro da amostra. A mistura foi sonicada em um banho de ultrassom 300 segundos, após essa etapa, o conteúdo foi centrifugado (nas condições propostas), a fase orgânica foi coletada, evaporada sob fluxo de ar e ressuspensa em 30 μL de FM.

3.4.10 Óleo essenciais como solvente extrator

Para a realização da DLLME utilizando óleo essencial como solvente extrator foi elaborado baseado no estudo de Oliveira Silveira e colaboradores (2021) (OLIVEIRA SILVEIRA, et al, 2021). Também será testado com uma etapa de *Clean-up* previamente ao método extrativo. Para a etapa de *Clean-up* será adicionado 200 μL do ácido ou da base forte em 200 μL sangue total contendo pool dos padrões na concentração de 250 ng/mL, centrifugado a 4.000 rpm por 20 minutos. Será retirado a 200 μL do sobrenadante adicionado 100 μL de NaOH 2M e homogeneizados em vórtex (2800 rpm) por 10 segundos. Após essa etapa, juntou-se o óleo essencial com o solvente dispersor e foram injetados em conjunto dentro da amostra. A mistura foi sonicada em um banho de ultrassom 300 segundos, após essa etapa, o conteúdo foi centrifugado por 10 minutos a 10.000 rpm, a fase orgânica foi coletada, evaporada sob fluxo de ar com aquecimento em chapa de aquecimento a ± 50 $^{\circ}\text{C}$ e ressuspensa em 30 μL de FM.

A Tabela 7 indica os volumes e solventes utilizadas. Os óleos essenciais utilizados foram: Laranja (*Citrus sinensis*), Eucalipto (*Eucalyptus globulus*) e Citronela (*Cymbopogon winterianus*). Os solventes dispersores utilizados: metanol, acetona e isopropanol. Para o *Clean-up* foi utilizado ácido tricloroacético 10% e hidróxido de sódio 50%.

Tabela 7 – Volumes de solventes e matriz.

Clean-up	Matriz	NaCl	NaOH	Óleo essencial	Solvente dispersor
-	250 µL	60 mg	100 µL	100 µL	-
-	250 µL	15 mg	100 µL	200 µL	200 µL
SIM	250 µL	15 mg	100 µL	200 µL	200 µL

3.4.11 Estabilidade

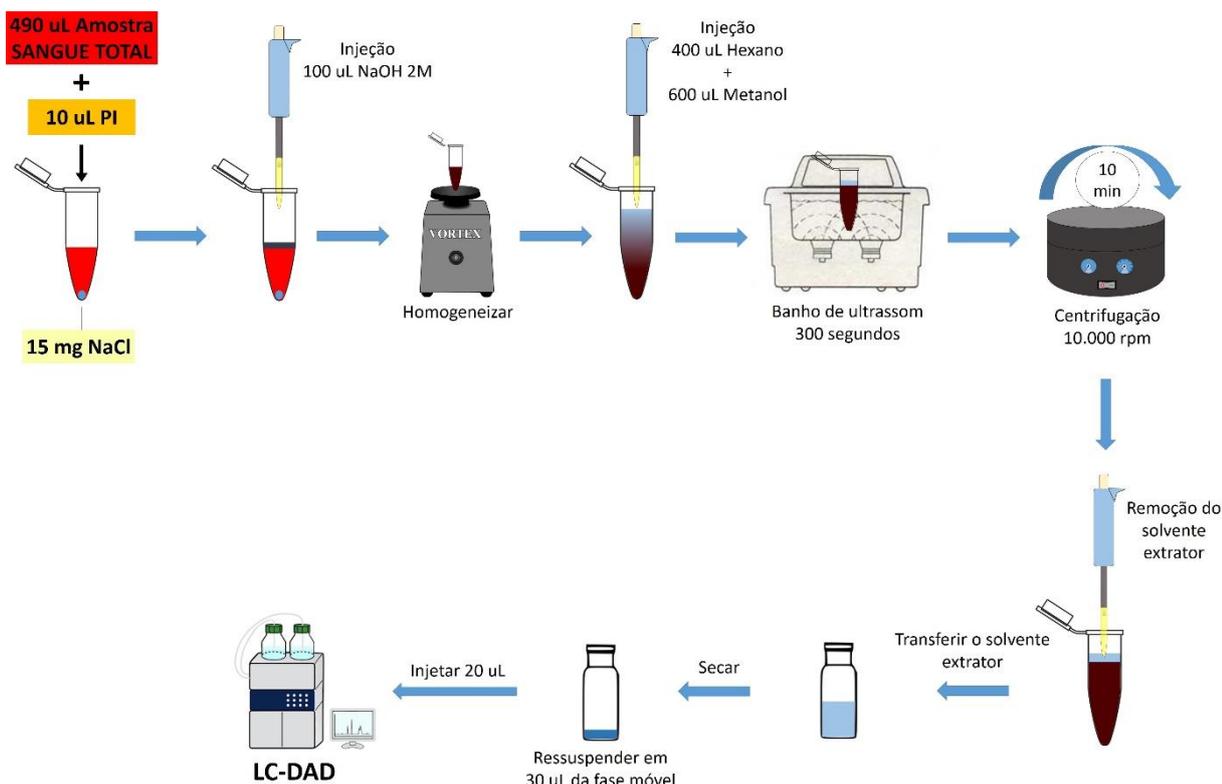
Foi realizada a estabilidade do extrato hexanóico oriunda das amostras de sangue total (solvente orgânico retirado após a centrifugação) da seguinte forma:

- Matriz biológica fortificada com pool de ADTs e padrão interno (200 ng/mL) em triplicata preparada e analisada no mesmo dia.
- Matriz biológica fortificada com pool de ADTs e padrão interno (200 ng/mL) em triplicata preparada em um dia e analisada 24h após DLLME.

3.5 DETERMINAÇÃO DE ANTIDEPRESSIVOS TRICÍCLICOS POR DLLME

Após serem conduzidos todos os testes de otimização do método extrativo, a DLLME ficou conduzida da seguinte forma: Pesar 15mg de NaCl em um tubo e adicionar 490 µL de sangue total, contendo pool de antidepressivos tricíclicos na concentração de 167 ng/mL e 10 uL de medazepam 10 µg/mL (padrão interno), adicionar 100 µL de NaOH 2M e homogeneizar em vórtex (2800 rpm) por 10 segundos. Após essa etapa, injetar em conjunto dentro da amostra 400 µL do hexano (solvente extrator) com 700 µL de metanol (solvente dispersor). Homogeneizar a mistura por 30 segundos no vórtex e levar ao banho de ultrassom por 300 segundos, após essa etapa, centrifugar o conteúdo por 10 minutos a 10.000 rpm. Coletar a fase orgânica, evapor sob fluxo de ar, ressuspender em 30 µL de FM e injetar 20 uL. Conforme a Figura 3.

Figura 3 – Esquema de método de DLLME para determinação de ADTs em sangue total



3.6 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

A corrida cromatográfica foi conduzida sob um fluxo de 1,2 ml/min. O padrão interno medazepam foi analisado no comprimento de onda de 255 nm; doxepina, amitriptilina e nortriptilina em 239 nm; imipramina e desipramina em 249 nm.

3.7 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Os parâmetros de validação ocorreram de acordo com o guia internacional de validação de métodos da United Nation Office on Drugs and Crime (UNODC, 2009). Deste modo, foi avaliado os parâmetros de especificidade/seletividade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), recuperação, linearidade, precisão intra e inter-dia, acurácia e robustez (UNODC, 2009). Já os parâmetros de integridade da diluição e *carryover* seguindo o guia SWGTOX (2013).

3.7.1 Especificidade/seletividade

A especificidade/seletividade foi avaliada incorporando 13 compostos que podem interferir a análise, ou seja, compostos normalmente combinados com os antidepressivos. As substâncias ativas avaliadas foram: Os analitos avaliados foram: cafeína, ácido acetilsalicílico, dipirona, paracetamol, varfarina, furosemida, atenolol, ibuprofeno, fenobarbital, clonazepam, efedrina, fenilpropanolamina e salbutamol na concentração de 1000 ng/mL. As amostras passaram pelo processo extrativo conforme descrito no Item 3.5. O critério de aceitação deste ensaio foi ausência de substâncias interferentes no tempo de retenção dos analitos de interesse e respectivo padrão interno.

3.7.2 Limite de detecção (LD)

Utilizou-se amostras de sangue total (branco) enriquecidas com concentrações decrescentes dos padrões dos analitos de interesse e também triplicatas de amostra do branco com o padrão interno medazepam na concentração de 200 ng/mL. A determinação dos valores de LD foi baseado no cálculo do limite do branco (ARMBRUSTER & PRY, 2008).

3.7.3 Limite de quantificação (LQ)

Este parâmetro foi avaliado primeiramente em triplicata as concentrações de 5, 10, 15, 20 e 30 ng/mL para amitriptilina, doxepina e nortriptilina; 5, 10, 15, 20, 30, 40 e 50 ng/mL para imipramina e desipramina. Após atingir o critério de aceitação foi realizado uma sextuplicata para confirmar o referido valor para cada analito. O critério de aceitação para o limite de quantificação foram de coeficiente de variação precisão < 20% para precisão e 80-100% de exatidão.

3.7.4 Recuperação

Para a avaliação desse parâmetro foi preparado dois conjuntos de amostras de sangue total. O conjunto A de amostras que consistia nas concentrações de 45, 250 e 400 ng/mL o processo de DLLME conforme descrito no item 3.5. O conjunto B, após o procedimento de DLLME, foi adicionado a mesma concentração do conjunto A. Todo procedimento foi realizado em sextuplicata.

A recuperação foi obtida pela comparação da resposta média obtida para o conjunto A e a resposta do conjunto B (100%). O Guia de Validação de Métodos

Analíticos da UNODC (UNODC, 2009) não considera este fator como indicativo para reprovação do teste, desde que os demais parâmetros da validação alcancem os propósitos desejados.

3.7.5 Linearidade

A curva de linearidade foi realizada em sextuplicata para cada ponto dos analitos de interesse, do qual iniciou-se pelo LQ (10 ng/mL para amitriptilina e doxepina; 20 ng/mL para nortriptilina e 30 ng/mL para imipramina e desipramina) seguido de 50, 100, 200, 300, 400 e 500 ng/mL. Os pontos da curva foram selecionados de acordo com as concentrações terapêuticas e tóxicas dos antidepressivos. Para a aceitabilidade a curva deve obter um coeficiente de correlação $R^2 > 0,99$.

3.7.6 Precisão intra e inter-dia

A precisão intra e inter-dia foi avaliada através da análise de amostras de sangue total contendo três concentrações conhecidas dos analitos-alvo em três dias consecutivos, em sextuplicata, utilizando o mesmo equipamento, materiais, reagentes e laboratório. As concentrações foram de 45 ng/mL, o ponto mais baixo; 250 ng/mL, o ponto médio; 400 ng/mL o ponto mais alto.

3.7.7 Acurácia (inexatidão)

Foi constituída uma curva nas concentrações de LQ (10 ng/mL para amitriptilina e doxepina; 20 ng/mL para nortriptilina e 30 ng/mL para imipramina e desipramina) seguido de 200 e 500 ng/mL para todos os analitos em triplicata. Depois foi avaliado em sextuplicata as amostras com os analitos nas concentrações de 45 ng/mL, o ponto mais baixo; 250 ng/mL, o ponto médio; 400 ng/mL. Após a coleta de dados foi realizado a ANOVA de 2 vias

3.7.8 Integridade da diluição e efeito memória (*carryover*)

Primeiramente foi constituída uma curva nas concentrações de 10 ng/mL para amitriptilina e doxepina, 20 ng/mL para nortriptilina e 30 ng/mL para imipramina e desipramina; 200 ng/mL e 500 ng/mL em triplicatas.

Uma alíquota de 500 µL de sangue total foi contaminada com um pool de antidepressivos tricíclicos, com a concentração final de 3,0769 µg/mL. Essa amostra

foi diluída 10 vezes com sangue total isento de analitos para a concentração de 307,69 ng/mL, foi adicionado o padrão interno na concentração final de 200 ng/mL e realizado a extração conforme o Item 3.5. As amostras diluídas foram analisadas em sextuplicatas. Após a extração e injeção dessa amostra, foram injetadas 3 amostras de branco para a avaliação do efeito memória (*carryover*).

3.7.9 Robustez

Robustez é a capacidade de resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos, indicando confiança na metodologia. Foi realizado os seguintes testes: variação de pH da fase móvel (0,2 unidades); Análise em diferentes equipamentos; Determinação por diferentes laboratoristas; Temperatura ambiental dos laboratórios.

3.7.10 Aplicação do método

Foram coletados amostras de sangue total de voluntários usuarios de ADTs e também foram obtidos amostras oriundas de casos de intoxicação do HUSM. As amostras dos voluntários foram coletadas em tubos contendo conservante fluoreto de sódio 2% (2 ml), EDTA (2mL) e tubo sem conservante com gel separador para amostra de soro. Para as amostras de pacientes com suspeita de intoxicação/exposição por ADTs oriundos do HUSM utilizava-se disponível (Sangue EDTA, Sangue Fluoreto, Sangue total/Soro) e submetidas ao método extrativo.

4. RESULTADOS

4.1 FASE ESTACIONÁRIA

Os testes realizados foram conduzidos na coluna Waters® XBridge C18 3,5 µm 4,6 x 50 mm e ZORBAX Eclipse XDB-C18 4.6 x 150 mm, 5 µm. Ambas fases estacionarias apresentaram o mesmo tempo de retenção em diferentes padrões, tanto ADTs como ADISRS. O problema ainda foi observado alterando a vazão, as diferentes fases móveis e o modo gradiente. Diante desses fatos, foi observado que a similaridade das características químicas dos padrões de interesse dificultaria a separação de todos sendo uma limitação para análise por LC-DAD, então optou-se pela análise de amitriptilina, desipramina, doxepina, nortriptilina e imipramina com a coluna Waters® XBridge C18 3,5 µm 4,6 x 50 mm o qual não ocorre a co-eluição entre si e menor tempo de corrida cromatográfica.

4.2 FASE MÓVEL

A escolha da FM foi baseada nos resultados dos testes realizados conforme o item 4.2 e os resultados das fases móveis testadas estão descritas na tabela 8

Tabela 8 – Resultado da etapa de otimização da fase móvel

FASE MÓVEL	pH*	VAZÃO	RESULTADO
Ácido fosfórico 0,09% (v/v) + MeOH (75:25)	2,0	1,0 mL/min	- Co-eluição: - AMI x NOR - IMI x FLU - DES x PRO x PAR x AMI
Ácido fosfórico 0,09% (v/v) + MeOH (25:75)	2,0	0,5 mL/min	- Co-eluição: - AMI x NOR - IMI x FLU - DES x PRO x PAR x AMI
Ácido fosfórico 0,09% (v/v) + MeOH (59:41)	2,0	0,3 mL/min	- Co-eluição: - AMI x NOR - IMI x FLU - DES x PRO x PAR x AMI
Ácido fosfórico 0,09% (v/v) + MeOH (49:51)	2,0	1,0 mL/min	- Co-eluição: - AMI x NOR - IMI x FLU

			- DES x PRO x PAR x AMI
TFA + MeOH (59:41)	2,0	1,0 mL/min	- Co-eluição: - AMI x NOR - IMI x FLU - DES x PRO x PAR x AMI
NaH ₂ PO ₄ 125 mM + ACN (50:50)	4,5	1,0 mL/min	- Co-eluição: - AMI x NOR - IMI x FLU - DES x PRO x PAR x AMI
H ₂ O + MeOH + ACN (63:19:18)	7,0	1,0 mL/min	- Co-eluição: - AMI x NOR - IMI x FLU - DES x PRO x PAR x AMI
NaH ₂ PO ₄ 83 mM + MeOH (60:40)	4,5	1,0 mL/min	- Co-eluição: TODOS PADRÕES

KH ₂ PO ₄ 5 mM + ACN (50:50)	4,5	1,0 mL/min	- Co-eluição: TODOS PADRÕES
KH ₂ PO ₄ 5 mM + ACN (50:50)	4,5	1,0 mL/min	- Co-eluição: TODOS PADRÕES
KH ₂ PO ₄ 5 mM + ACN (60:40)	4,5	1,0 mL/min	- Co-eluição: TODOS PADRÕES
KH ₂ PO ₄ 5 mM + ACN (70:30)	4,5	1,0 mL/min	- Co-eluição: TODOS PADRÕES
KH ₂ PO ₄ 25 mM + ACN (65:65)	4,5	1,0 mL/min	- Co-eluição: TODOS PADRÕES
KH ₂ PO ₄ 25 mM + ACN (70:30)	4,5	1,0 mL/min	- Co-eluição: TODOS PADRÕES
KH ₂ PO ₄ 25 mM + MeOH (60:40)	4,5	1,0 mL/min	- Co-eluição: AMI x NOR IMI x FLU DES x FLU x PAR x AMI
KH ₂ PO ₄ 25 mM + MeOH (55:45)	4,5	1,0 mL/min	- Co-eluição: - AMI x NOR - IMI x FLU - DES x PRO x PAR x AMI

NaH₂PO₄ 83 mM + MeOH + ACN
(55:43:2)

4,5

- Co-eluição:
- AMI x NOR
- IMI x FLU
- DES x PRO x PAR x AMI

KH₂PO₄ 25 mM + MeOH + ACN
(55:43:2)

4,5

- Co-eluição:
- AMI x NOR
- IMI x FLU
- DES x PRO x PAR x AMI

KH₂PO₄ 30 mM + MeOH (60:40)

4,5

- Co-eluição:
- AMI x NOR
- IMI x FLU
- DES x PRO x PAR x AMI

KH₂PO₄ 25 mM + MeOH + ACN
(55:40:5)

4,5

- Co-eluição:
- AMI x NOR
- IMI x FLU
- DES x PRO x PAR x AMI

KH₂PO₄ 30 mM + MeOH + ACN
(60:35:5)

4,5

- Co-eluição:
- AMI x NOR
- IMI x FLU
- DES x PRO x PAR x AMI

KH₂PO₄ 35 mM + MeOH + ACN
(60:35:5)

4,5

- Co-eluição:
- AMI x NOR
- IMI x FLU
- DES x PRO x PAR x AMI

KH₂PO₄ 40 mM + MeOH + ACN
(60:35:5)

4,5

- Co-eluição:
- AMI x NOR
- IMI x FLU
- DES x PRO x PAR x AMI

KH₂PO₄ 40 mM + MeOH + ACN
(70:10:20)

4,5

- Co-eluição:
- AMI x NOR
- IMI x FLU
- DES x PRO x PAR x AMI

KH ₂ PO ₄ 50 mM + MeOH + ACN (70:10:20)	7,0	- Co-eluição: - AMI x NOR - IMI x FLU - DES x PRO x PAR x AMI
KH ₂ PO ₄ 20 mM + MeOH 0 min(65:35) 30 min (35:65)	4,5	- Co-eluição: - AMI x NOR - IMI x FLU - DES x PRO x PAR x AMI
KH ₂ PO ₄ 20 mM + MeOH (57:47)	4,5	- Co-eluição: - AMI x NOR - IMI x FLU - DES x PRO x PAR x AMI
KH ₂ PO ₄ 20 mM + MeOH/ACN (98:2) (57:47)	4,5	- Co-eluição: - AMI x NOR

			- IMI x FLU - DES x PRO x PAR x AMI
KH ₂ PO ₄ 20 mM + MeOH (60:40)	4,5		- Co-eluição: - AMI x NOR - IMI x FLU - DES x PRO x PAR x AMI
KH ₂ PO ₄ 20 mM + MeOH (60:40)	5,0		- Co-eluição: - AMI x NOR - IMI x FLU - DES x PRO x PAR x AMI
KH ₂ PO ₄ 20 mM + MeOH (60:40)	2,5		- Co-eluição: - AMI x NOR - IMI x FLU - DES x PRO x PAR x AMI
KH ₂ PO ₄ 20 mM + MeOH (60:40)	2,5		- Co-eluição: - AMI x NOR - IMI x FLU

+ 400 μ L trietilamina

- DES x PRO x PAR x AMI

KH_2PO_4 100 mM + MeOH
(60:40)

2,5

- Co-eluição:

IMI x FLU

DES x PRO x PAR

KH_2PO_4 150 mM + MeOH
(60:40)

2,5

- Co-eluição:

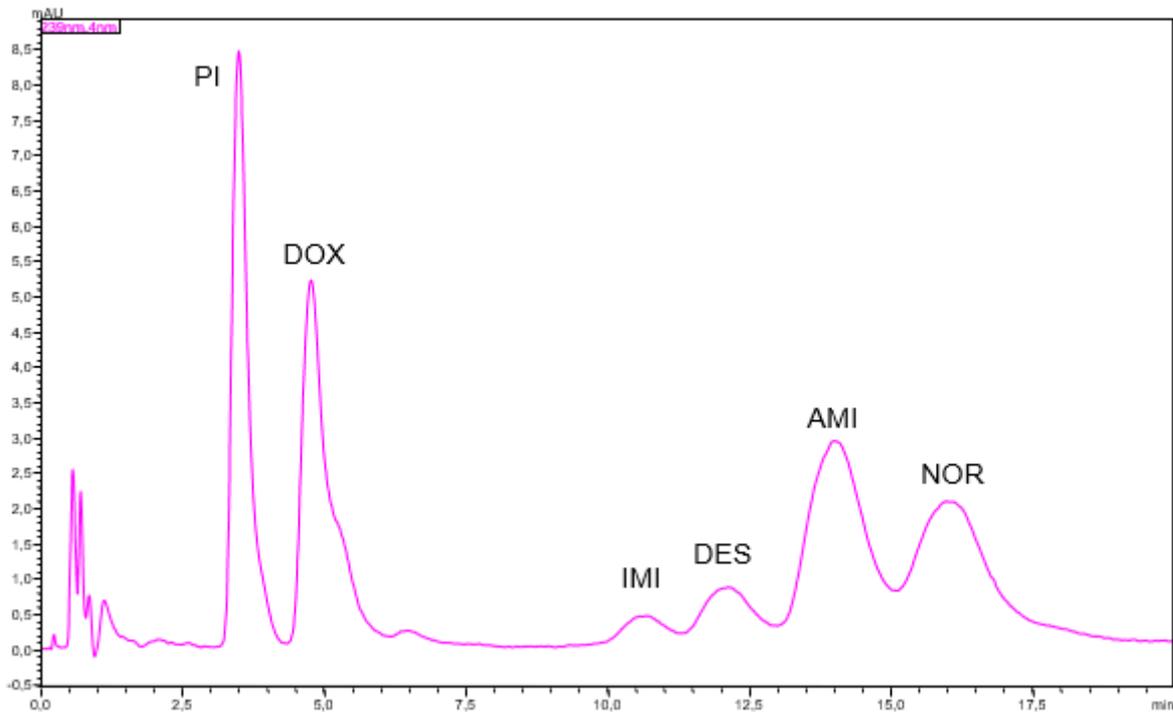
IMI x FLU

DES x PRO x PAR

*pH da fase aquosa medido antes da mistura com a fase móvel – ACN: Acetonitrila – MeOH: Metanol – H_2O : água MiliQ - NaH_2PO_4 : Fosfato de sódio monobásico - KH_2PO_4 : Fosfato potássio monobásico – TFA: Ácido trifluoroacético. AMI: Amitriptilina; DES: Desipramina; DOX: Doxepina; IMI: Imipramina; FLU: Fluoxetina; NOR: Nortriptilina; PAR: Paroxetina; PRO: Protriptilina; SER: Sertralina

A FM que apresentou os melhores resultados para o presente estudo é constituída por uma solução aquosa contendo 100 mM de fosfato de potássio monobásico, pH 2,5 corrigido com ácido o-fosfórico 85% e metanol na proporção de 60:40 para os analitos amitriptilina, desipramina, doxepina, nortriptilina e imipramina conforme o Figura 4.

Figura 4 – Cromatograma para antidepressivos tricíclicos após DLLME em amostras de sangue total.



Perfil cromatográfico dos padrões doxepina (DOX); imipramina (IMI); desipramina (DES); amitriptilina (AMI); nortriptilina (NOR), com padrão interno (PI) ambos na concentração de 200 ng/mL. O tempo de retenção dos analitos são respectivamente 3.48 min (PI), 4.75 min (DOX), 10.65 min (IMI), 12.12 min (DES), 13.99 min (AMI) e 15.97 min (NOR).

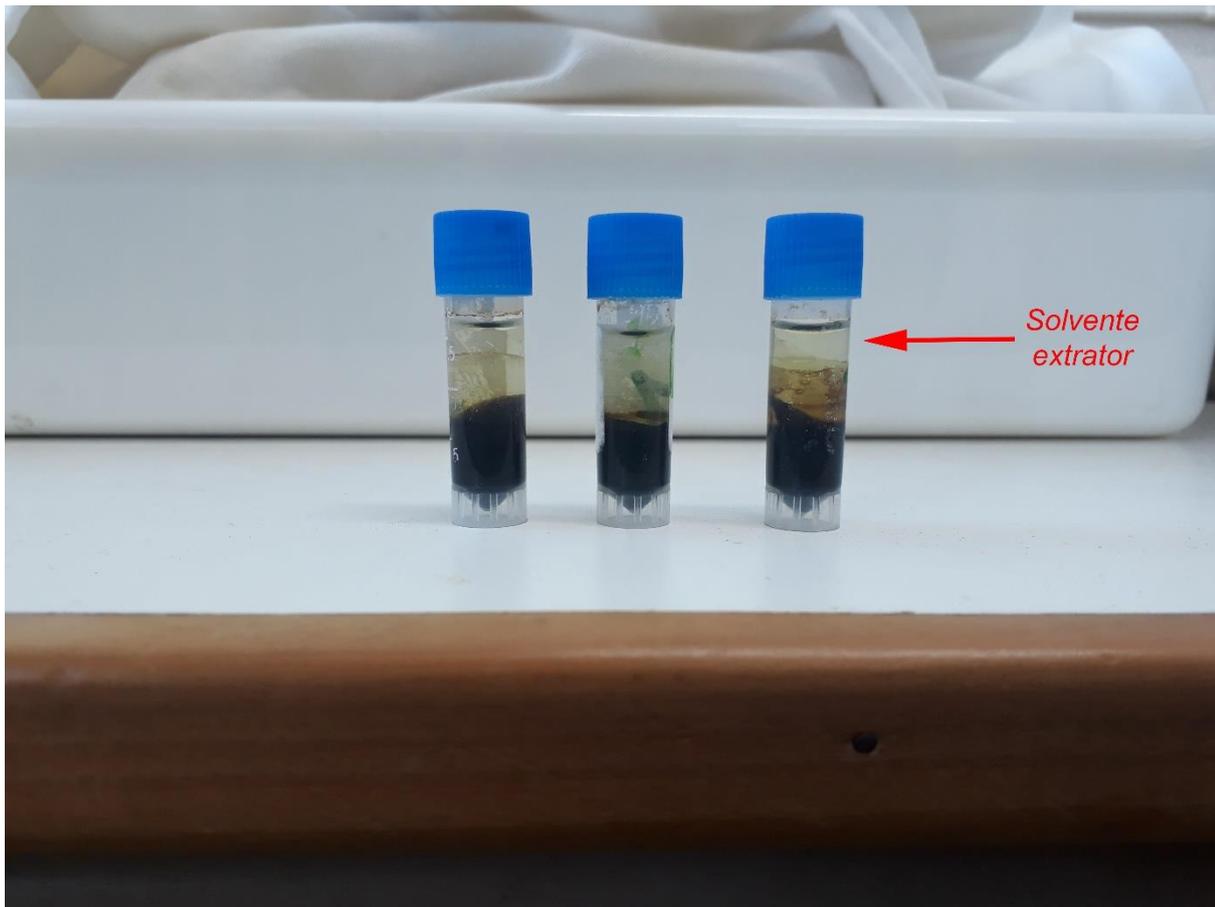
4.3 OTIMIZAÇÃO DA DLLME

A otimização da DLLME foi elaborada baseada nas técnicas descritas na Tabela 4. Serão avaliados respectivamente os seguintes parâmetros para otimização da DLLME:

4.3.1 Escolha da matriz biológica apropriada

Os testes preliminares foram realizados qualitativamente em soro, plasma e sangue total, a Figura 5 demonstra a triplicada realizada em sangue total. O solvente extratores nos testes qualitativos apresentaram um aspecto límpido com a possibilidade de injeção no LC, então a matriz biológica de escolha para a otimização foi sangue total. O cromatograma do método extrativo em sangue total (Branco) está no item 5.3.8.

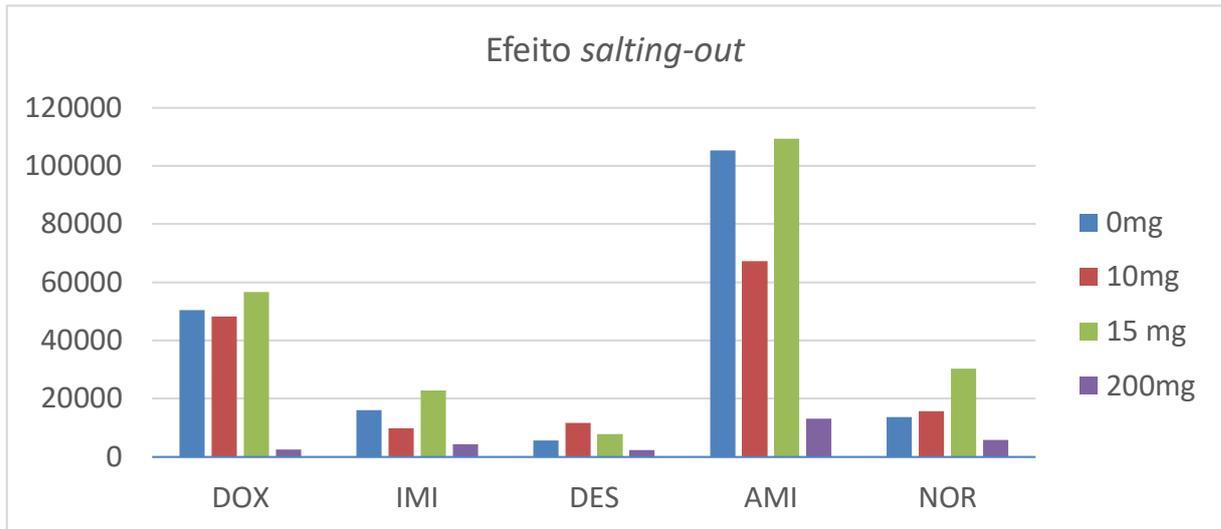
Figura 5 – Avaliação qualitativa da extração em sangue total.



4.3.2 Efeito *salting-out*

De acordo com a área integrada, conforme a Figura 6, o efeito *salting-out* foi melhor observado na concentração de 3% m/v (0,015 g) de cloreto de sódio. Apesar que, para a desipramina essa concentração não foi a que apresentou melhor resultado, de maneira geral, a concentração de 3% de cloreto de sódio foi a mais efetiva para a extração.

Figura 6 – Gráfico Efeito *salting-out*

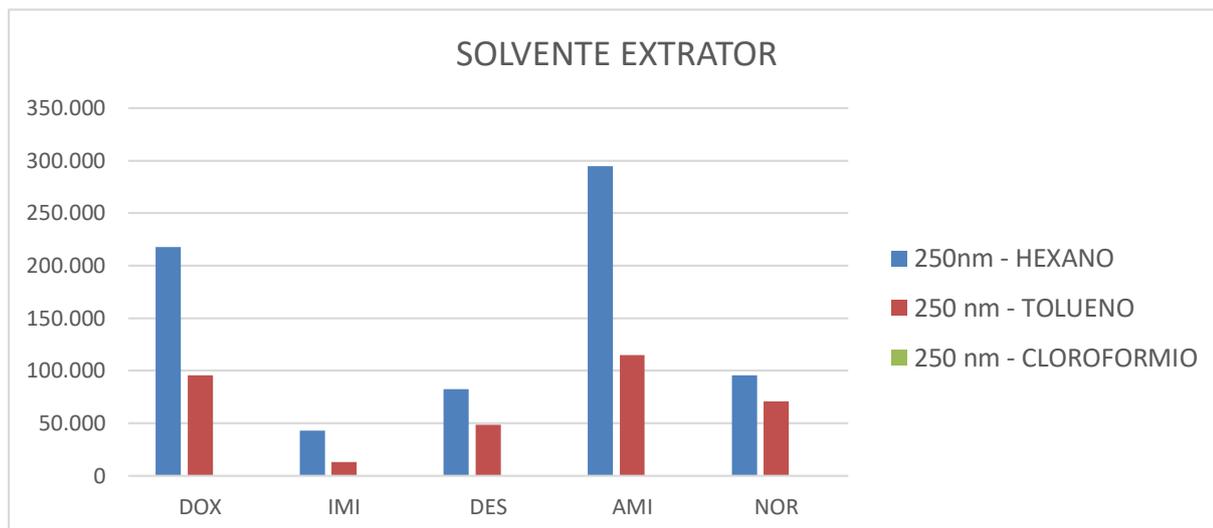


Eficiência de extração para doxepina, imipramina, desipramina, amitriptilina e nortiptilina nas concentrações de cloreto de sódio de 0, 2, 3 e 40% m/v

4.3.3 Tipos de solvente extrator

Segundo a comparação das áreas relativas, conforme a Figura 7, o hexano foi o solvente com maior eficiência na extração. A utilização de clorofórmio não houve a separação das fases orgânicas, então não foi injetado. Outro problema ocorreu com a utilização de diclorometano, na etapa de secagem no método da DLLME o diclorometano demorou mais para secar, comparado aos outros solventes, e ao ressuspender com a FM tinha um aspecto leitoso e sujo, então por segurança não foi injetado.

Figura 7 – Gráfico Solvente extrator

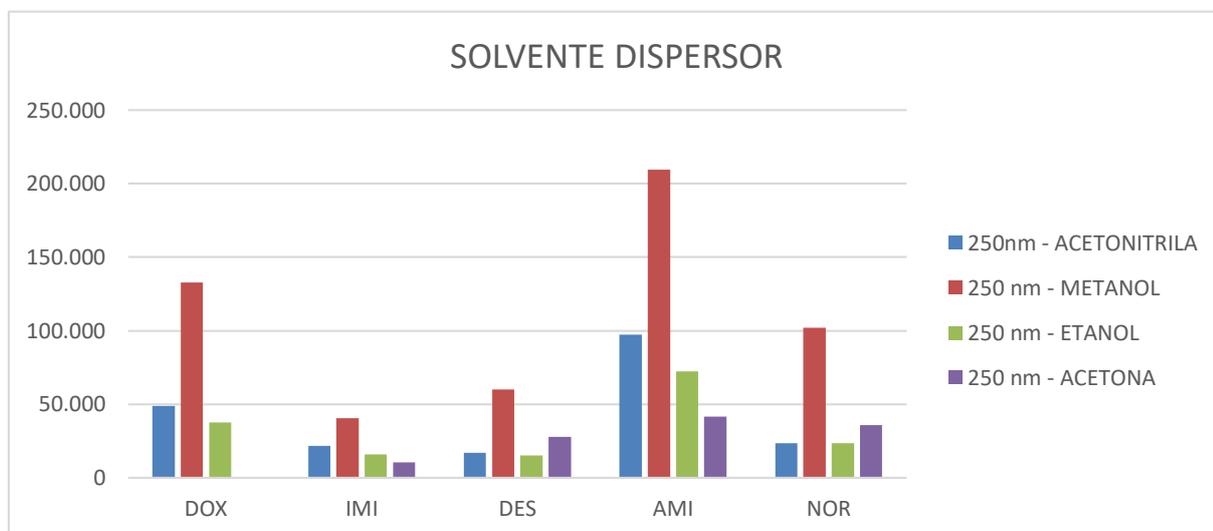


Eficiência de extração para doxepina, imipramina, desipramina, amitriptilina e nortiptilina nos diferentes solventes extratores.

4.3.4 Tipos de solvente dispersor

Em comparação a área relativa, conforme a Figura 8, o metanol foi o solvente que apresentou melhor dispersão do solvente extrator na amostra de sangue total. No caso da acetona, não foi possível integrar doxepina pois a utilização de acetona como solvente dispersor trouxe muitos interferentes da matriz.

Figura 8 – Gráfico Solvente dispersor

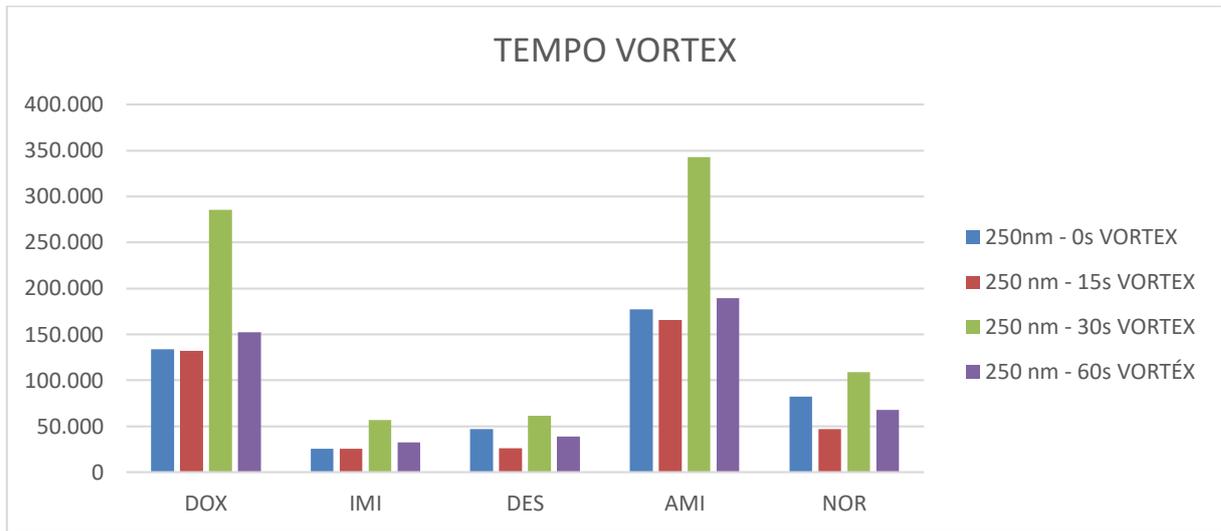


Eficiência de extração para doxepina, imipramina, desipramina, amitriptilina e nortiptilina nos diferentes solventes dispersores.

4.3.5 Agitação por vórtex e banho de ultrassom

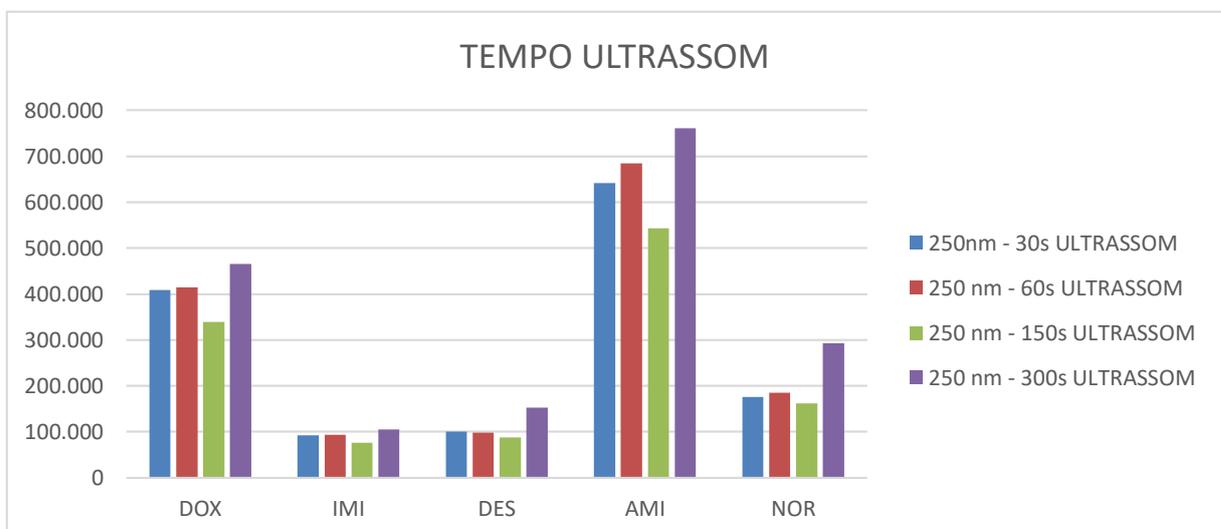
O uso de ultrassom por 300 segundos para homogeneização dos solventes extrator e dispersor na amostra foi mais efetivo que o uso de vórtex no tempo de 30 segundos, ambos tempos apresentaram maior efetividade em seus experimentos respectivamente. Conforme ilustrados nas Figuras 9 e 10.

Figura 9 – Gráfico Tempo vórtex



Eficiência de extração para doxepina, imipramina, desipramina, amitriptilina e nortiptilina utilizando vórtex.

Figura 10 – Gráfico Tempo ultrassom

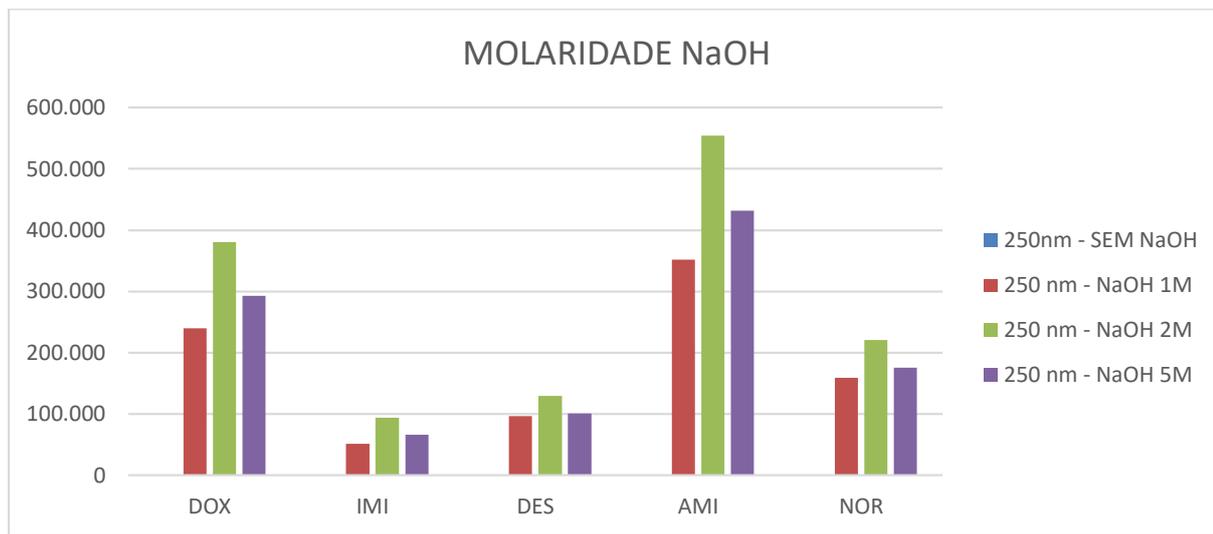


Eficiência de extração para doxepina, imipramina, desipramina, amitriptilina e nortiptilina utilizando banho de ultrassom.

4.3.6 Avaliação do pH

De acordo com as áreas, conforme a Figura 11, a adição de 100 uL de NaOH 2M, para correção de pH, apresentou maior efetividade de extração comparado as outras concentração de NaOH. A não adição do corretor de pH resultou na não extração dos ADTs do sangue pelo hexano.

Figura 11 – Gráfico Molaridade NaOH

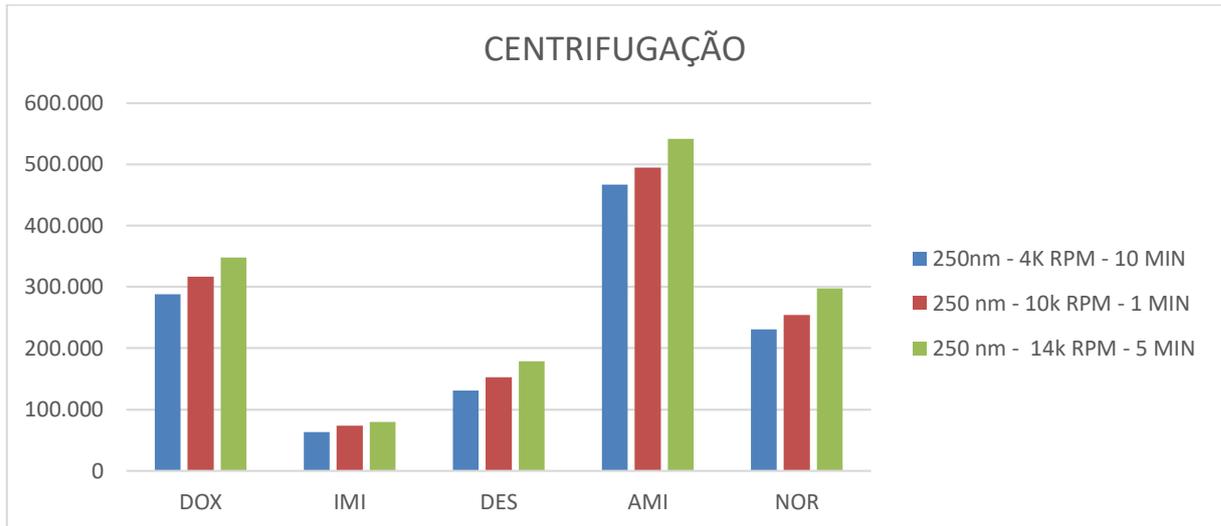


Eficiência de extração para doxepina, imipramina, desipramina, amitriptilina e nortriptilina nas difentes molaridades de pH.

4.3.7 Tempo e velocidade de centrifugação

Apesar de a centrifugação por 5 minutos a 14.000 rpm apresentar os melhores resultados, de acordo com a área relativa, a condição de escolha foi 10 minutos a 10.000 rpm. Essa condição de escolha apresentou menos interferentes quando centrifugado por 10 minutos a 4.000 rpm, e não teve diferença comparado a centrifugação por 5 minutos a 14.000 rpm, conforme ilustrado na Figura 12.

Figura 12 – Gráfico Tempo e velocidade de centrifugação

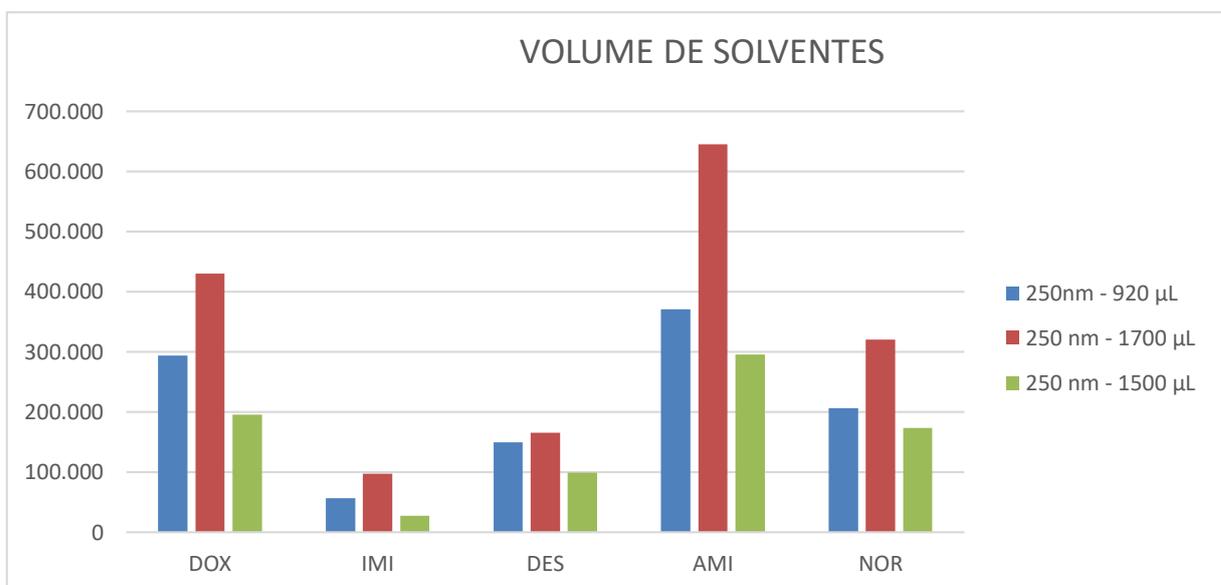


Eficiência de extração para doxepina, imipramina, desipramina, amitriptilina e nortiptilina nas difentes condições de centrifugação.

4.3.8 Volume de solventes

Segundo a integração da área dos cromatogramas, conforme a Figura 13, a diminuição dos volumes não apresentou a mesma eficiência de extração. Então foi mantido o volume final de 1.700 μ L.

Figura 13 – Gráfico Volume de solventes



Eficiência de extração para doxepina, imipramina, desipramina, amitriptilina e nortiptilina nos difentes volumes de solventes e matriz.

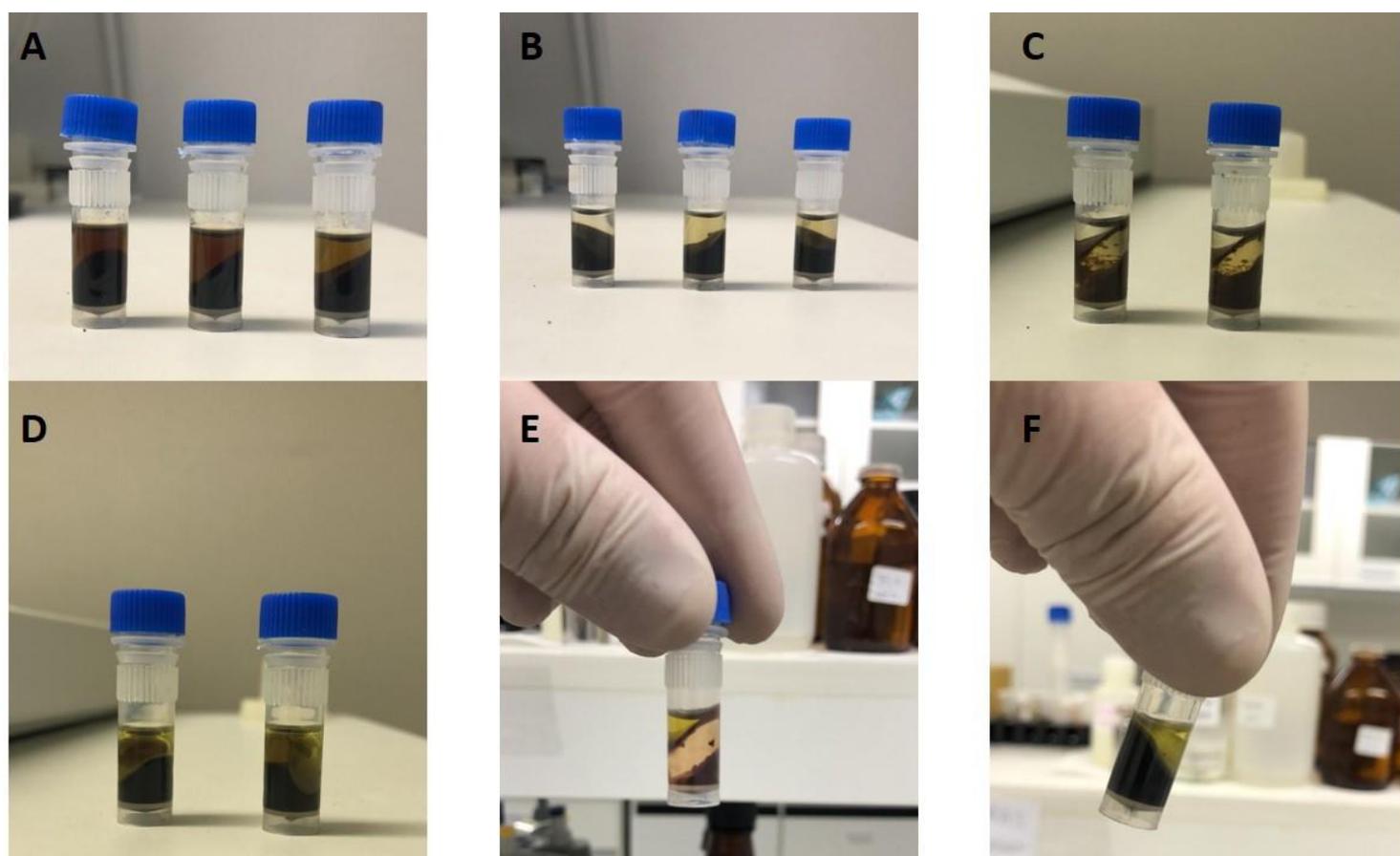
4.3.9 Mistura de solventes

A mistura de solventes extratores não foi capaz de extrair os ADTs, o qual não foi possível integrar as áreas dos cromatogramas. Então foi mantido apenas o hexano como solvente extrator.

4.3.10 Óleos essenciais como solvente extrator

A utilização de óleos essenciais como solvente extrator não foi possível extrair as substâncias ativas propostas, além de aparecer diversos interferentes no mesmo tempo de retenção do padrão interno e da doxepina. Outra dificuldade foi na separação de fases conforme a Figura 14.

Figura 14 – Extração com óleos essenciais.

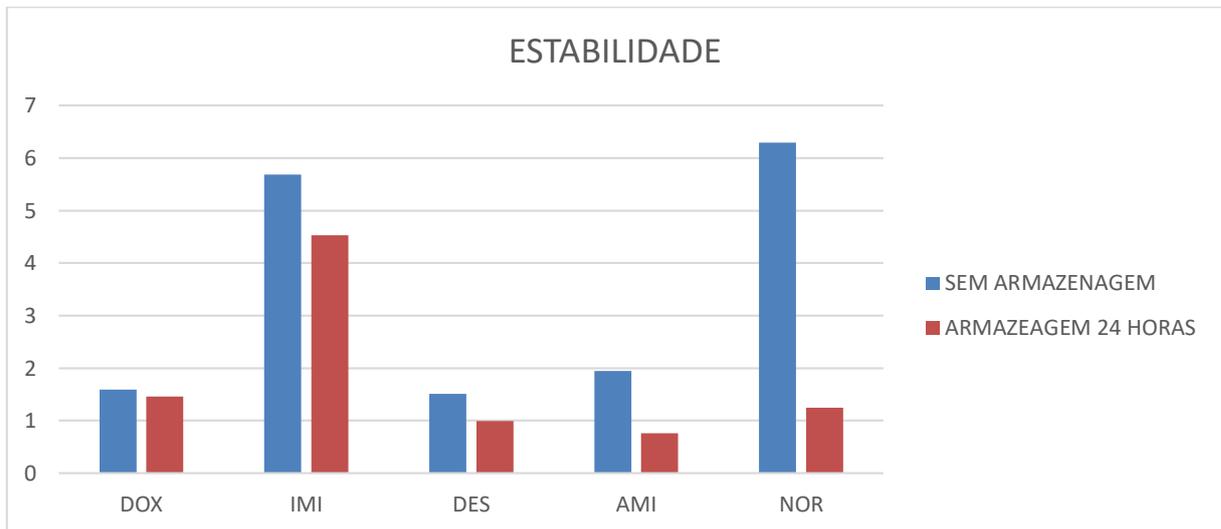


A. Isopropanol como solvente dispersor junto com Óleo essencial de eucalipto; B. Acetonitrila como solvente dispersor junto com Óleo essencial de eucalipto; C. NaOH 50% como solvente dispersor junto com Óleo essencial de eucalipto; D. Acetonitrila como solvente dispersor junto com Óleo essencial de Laranja; E. NaOH 50% como solvente dispersor junto com Óleo essencial de Laranja; F. Metanol como solvente dispersor junto com Óleo essencial de Laranja.

4.3.11 Estabilidade

O extrato hexanoico preparada em um dia e analisada 24h após DLLME apresentou menor área relativa dos analitos quando comparado com extrato hexanoico preparada e analisada no mesmo dia, principalmente os padrões AMI e NOR, conforme ilustra a Figura 15.

Figura 15 – Gráfico Estabilidade



Estabilidade dos padrões doxepina, imipramina, desipramina, amitriptilina e nortriptilina analisados após 24 horas, comparado com extrato hexanoico recém preparado, nas concentrações de 200 ng/mL.

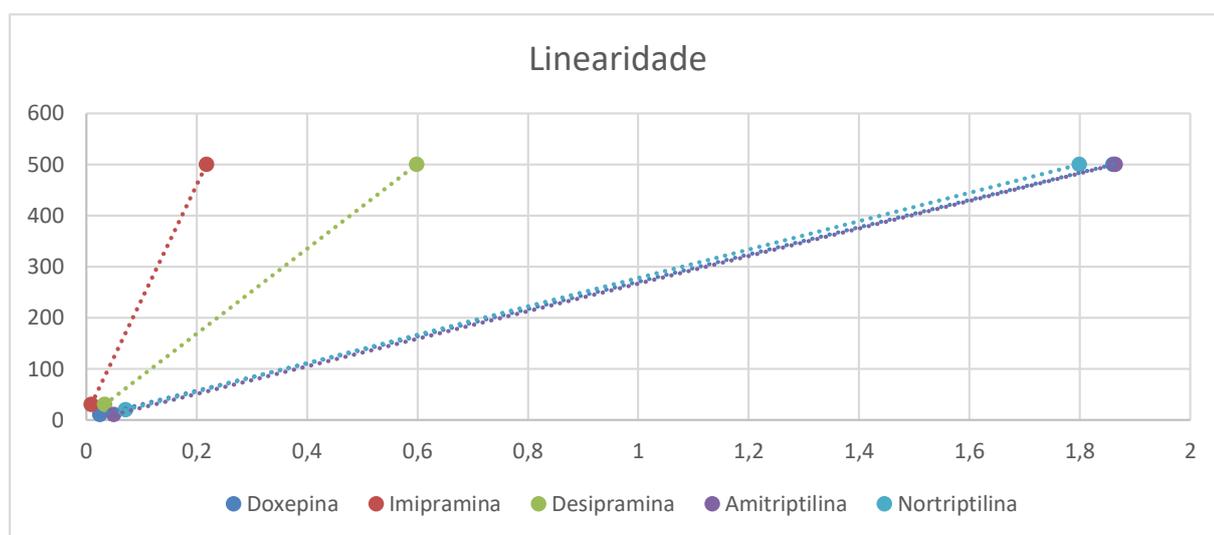
4.4 VALIDAÇÃO DA DLLME PARA DETERMINAÇÃO DE ANTIDEPRESSIVOS TRICÍCLICOS EM SANGUE TOTAL

A validação da metodologia foi realizada após as etapas de otimização e seguiu o guia UNODC 2009, conforme descrito no Item 3.7. Seguindo as concentrações terapêuticas e tóxicas de cada fármaco, a linearidade foi constituída inicialmente pelo LQ de cada fármaco até a concentração de 500 ng/mL. A equação da reta, coeficiente angular e linha de tendência de cada analito estão descritas na tabela 9 e Figura 16.

Tabela 9 – Equação da reta dos antidepressivos tricíclicos e seus produtos de biotransformação do estudo da linearidade.

Analito	Equação da reta	R ²
Doxepina	$y = 261,58x + 7,9474$	0,9987
Imipramina	$y = 2272,9x - 2,9523$	0,9953
Desipramina	$y = 841,4x - 10,85$	0,9956
Amitriptilina	$y = 259,71x - 3,4741$	0,9944
Nortriptilina	$y = 279,74x - 9,7701$	0,9974

Figura 16 – Gráfico Linearidade



Linha de tendência dos antidepressivos tricíclicos e seus produtos de biotransformação do estudo da linearidade

Os demais resultados dos parâmetros da validação como: Recuperação, LD, LQ, Precisão intra-dia e inter-dia, Exatidão e Integridade de diluição estão descritos na Tabela 10.

Tabela 10 – Parâmetros de confiança do método validado para determinação de Antidepressivos tricíclicos em amostra de sangue total.

Parâmetros	Doxepina	Imipramina	Desipramina	Amitriptilina	Nortriptilina
Recuperação (%)					
C1	15,66	14,15	14,42	14,45	18,38
C2	11,71	13,40	9,86	13,77	11,32
C3	21,60	23,30	17,22	23,99	31,60
LD (ng/mL)	2,5	10,0	10,0	2,5	7,5
LQ (ng/mL)	10,0	30,0	30,0	10,0	20,0
Precisão intra-dia (CV%)					
C1	10,90	12,80	12,03	12,35	9,83
C2	8,59	11,20	7,70	9,78	6,71
C3	9,53	8,31	9,98	4,46	8,91
Precisão inter-dia (CV%)					
C1	11,90	13,86	13,06	9,67	5,82
C2	9,20	7,56	14,59	10,89	11,87
C3	11,62	10,18	12,99	7,23	13,40
Exatidão (%)					
C1	92,89	85,64	113,78	96,87	113,67
C2	100,28	93,45	89,62	85,52	89,95
C3	111,16	95,92	97,54	90,19	99,18
Integridade da diluição					
Precisão (%)					
10 vezes (307,69 ng/mL)	100,67	82,36	114,05	88,99	105,40

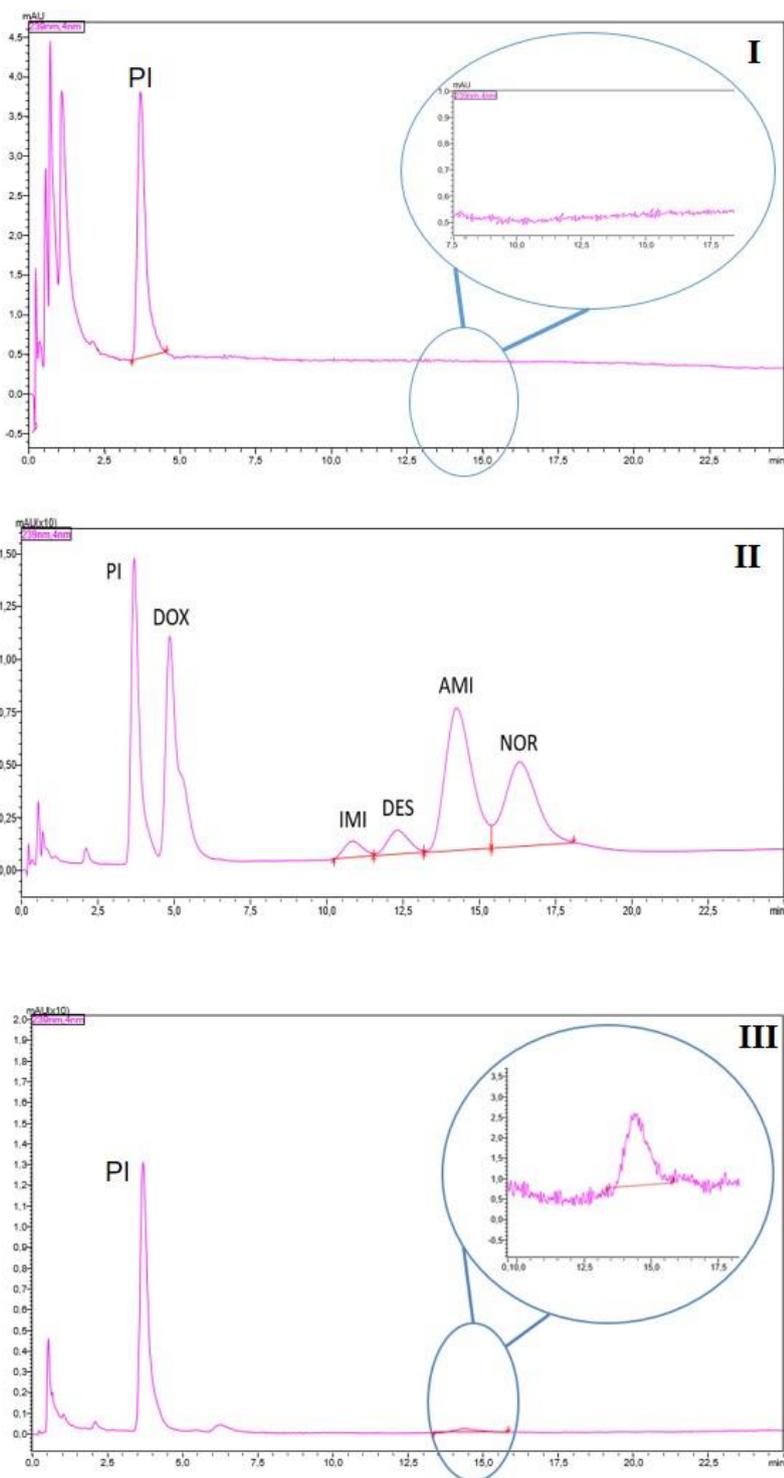
4.5 AMOSTRA REAL

Dois casos reais foram avaliados. Uma amostra de soro foi obtida através de um paciente com quadro de intoxicação polimedamentosa oriunda do HUSM e o segundo caso foi uma amostra de sangue total obtido através de voluntário.

4.5.1 Caso 1

Uma amostra de soro de uma paciente (SAME) com suspeita de intoxicações por medicamentos de várias classes, incluindo exposição ao ADTs foi encaminhado para o Núcleo de Análises Toxicológicas (NAT), conforme a Figura 17.

Figura 17 – Cromatogramas para avaliação de amostra real de soro em LC-DAD.



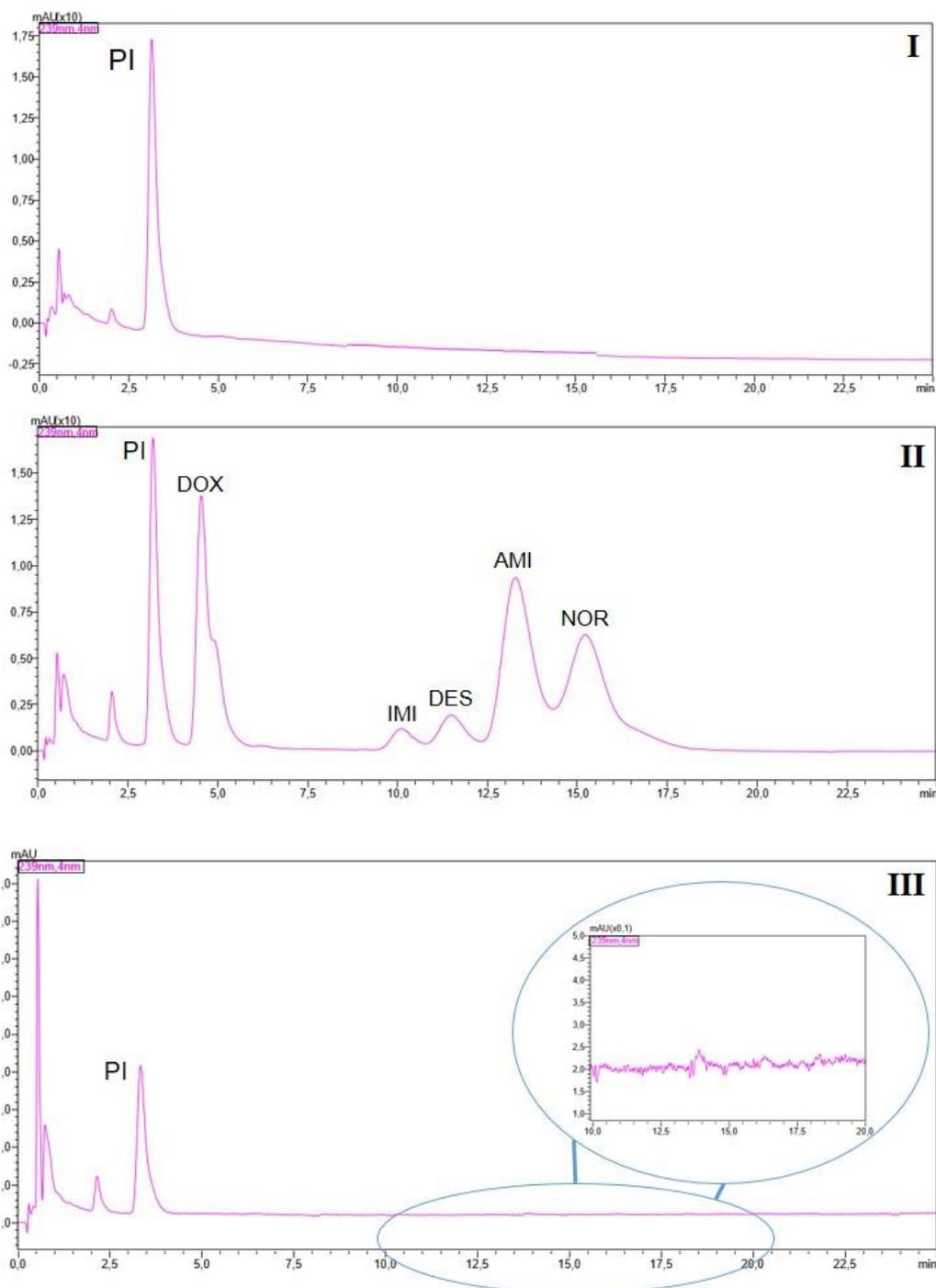
I – Perfil cromatográfico da extração branco com padrão interno; II – Perfil cromatográfico do método extrativo com sangue total incorporando (PI) padrão interno, padrões (DOX) doxepina, (IMI) imipramina, (DES) desipramina, (AMI) amitriptilina e (NOR) nortriptilina, nas concentrações de 200 ng/mL em 239nm; III – Cromatograma da extração em amostra real de soro. O tempo de retenção dos analitos são respectivamente 3.7 min (PI), 5.2 min (DOX), 11.2 min (IMI), 12.5 min (DES), 14.8 min (AMI) e 16.6 min (NOR).

Foi detectado amitriptilina na amostra em soro, entretanto abaixo do LQ (10,0 ng/mL). Uma alíquota da mesma amostra de soro foi analisada em GC/MS empregando a proposta de DLLME, as condições cromatográficas e cromatogramas estão descritas no Apêndice A.

4.5.2 Caso 2

Uma Mulher de 23 anos de idade se voluntariou para participação da pesquisa. A voluntaria informou que utiliza a posologia de 12,5 mg de Amitriptilina e 50 mg Alprazolam para tratamento de dor crônica de ATM. Os medicamentos são administrados todos os dias pela manhã, junto com o café da manhã. As amostras de sangue total foram coletadas em tubo contendo conservante fluoreto de sódio 2% e foi submetido ao método extrativo, os resultados estão ilustrados na Figura 18.

Figura 18 – Cromatogramas para avaliação de amostra real de sangue total em LC-DAD.



I – Perfil cromatográfico da extração branco com padrão interno (PI); II – Perfil cromatográfico do método extrativo com sangue total incorporando (PI) padrão interno, padrões (DOX) doxepina, (IMI) imipramina, (DES) desipramina, (AMI) amitriptilina e (NOR) nortriptilina, nas concentrações de 200 ng/mL em 239nm; III – Cromatograma da extração em amostra real de soro. O tempo de retenção dos analitos são respectivamente 3.7 min (PI), 4.9 min (DOX), 10.2 min (IMI), 11.5 min (DES), 14.5 min (AMI) e 16.2 min (NOR).

5. DISCUSSÃO

A proposta inicial do projeto visava desenvolver uma metodologia analítica para determinação de 9 antidepressivos das classes dos antidepressivos tricíclicos (ADTs), antidepressivos inibidores seletivos da serotonina (ADISRS) e seus respectivos produtos de biotransformação. Entretanto, devido a similaridades das propriedades físico e químicas, bem como as limitações técnicas do equipamento, foram selecionados aqueles com significância clínica, toxicológica e que atendiam a proposta da metodologia.

Seguindo nesta circunstância, foram selecionados amitriptilina, doxepina e imipramina, onde estão envolvidos em casos de exposição humana a medicamentos segundo o relatório do Centro de Informações Toxicológicas do estado do Rio Grande do Sul no ano de 2019. Já a amitriptilina também está descrita na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais 2020 (Rename). Também foram nortriptilina e desipramina, produtos de biotransformação da amitriptilina e imipramina, respectivamente (CIT, 2019; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

A matriz biológica elegida para o presente método foi o sangue total, pois essa matriz consegue atender tantos casos da emergência clínica como na área forense. Apesar de que, em casos de emergência clínica e o monitoramento terapêutico de drogas as matrizes de escolhas são, preferencialmente, o soro e o plasma (PROUTY & ANDERSON, 1990; GLAUSER, J., 2000; FLANAGAN et al 2005; DE PAULA, 2007; SANTOS, 2014).

No caso dos ADTs, o sangue total apresenta resultados mais confiáveis em casos de intoxicação, relacionando a concentração estes agentes e seus respectivos produtos de biotransformação com seus efeitos. Cabe ressaltar que a razão da substância ativa/produtos de biotransformação consegue informar o período de administração dos fármacos (DE PAULA, 2007; SANTOS, 2014; SASTRE, 2017; MADUREIRA, 2019).

Há diferenças nas concentrações de ADTs entre soro, plasma e sangue total, podendo ser explicado pela capacidade dos ADTs se ligarem nos eritrócitos (AMITAI, 1993; 2001; THANACOODY & THOMAS, 2005; TITIER et al. 2007; DE PAULA, 2007; MONTENARH et al, 2014b). Conforme o estudo de Amitai e colaboradores (1993), onde correlacionou a concentração em plasma e em hemácias de ADTs e seus respectivos produtos de biotransforção *in vitro* e em pacientes com intoxicação aguda

por ADTs. Foram avaliados no estudo: amitriptilina, imipramina, doxepina, nortriptilina, desipramina e nordoxepina. A Tabela 11 mostra a a razão da concentração (hemácia/plasma) de ADTs e seus respectivos produtos de biotransformação *in vivo* e a média razão da concentração (hemácia/plasma) dos ADTs precursores (amitriprilina, imipramina e doxepina) e de seus produtos de biontransformação (nortriptilina, desipramina e nordoxepina) em pacientes com casos de intoxicação aguda por ADTs no momento de admissão e após 6 a 10 horas da admissão.

Tabela 11 – Razão das concentrações de ADTs (hemácias/plasma).

ADTs	Razão [hemácias/plasma] <i>in vitro</i>	Razão [hemácias/plasma] Momento da admissão	Razão [hemácias/plasma] 6 a 10 horas após a admissão.
Amitriptilina	0,45		
Imipramina	0,73	0.53 ± 0.25	0,70 ± 0.36
Doxepina	0,98		
Nortriptilina	1,57		
Desipramina	1,60	1.56 ± 0.62	2.05 ± 0.57
Nordoxepina	1,62		

Fonte: AMITAI, 1993.

Outro estudo que reforça esse fenômeno é o estudo de Montenarh e colaboradores (2014). Os autores encontraram 242% para amitriptilina em sangue total comparado a soro/plasma. De acordo com este trabalho, esse fenômeno pode ser explicado pela maior presença de biomoléculas endógenas no sangue total (MONTENARH et al, 2014b).

Apesar de sua coleta ser um método invasivo, em casos de intoxicação, sua aquisição pode ser mais fácil comparada a urina devido à retenção urinaria (sintoma comum de casos de intoxicação por ADTs). Recomenda-se coleta de sangue (*ante mortem* e *post mortem*) em tubo contendo fluoreto de sódio 2%, pois minimiza a fermentação e degradação dos ADTs (FLANAGAN et al 2005; DE PAULA, 2007). Entretanto, não foi encontrado na literatura que a utilização de sangue total contendo outros conservantes ou a ausência deles possa afetar a análise dos ADTs em casos de emergencia clinica ou outras situação toxicológicas.

Logo, devido às diferenças das concentrações nas matrizes biológicas e por não existir muitas metodologias na literatura com a determinação de ADTs em sangue total, além da versatilidade dessa amostra, reforça ainda mais o desenvolvimento de um método válido para determinação de ADsT em sangue total.

Os ADTs são bases fracas, onde o pK varia de 9,4 a 10,02 e o logP varia de 3,84 a 4,92. Estes dados são de grande importância para a constituição da FM, da seleção da FE e também na etapa de extração. Inicialmente foram testados 9 padrões de fármacos e produtos de biotransformação de duas classes de antidepressivos, os ADTs (amitriptilina, desipramina, doxepina, protriptilina, nortriptilina e imipramina) e os AISRS (fluoxetina, paroxetina e sertralina).

Os testes iniciais foram realizados com a coluna Waters® XBridge C18 3,5 µm 4,6 x 50 mm, porém ocorria a co-eluição de diversos padrões, conforme os resultados descritos na Tabela 8. Na tentativa de contornar o problema de eluição entre os padrões, foram avaliados diferentes parâmetros como análises em modo gradiente, vazão, alterações na FM e tamanho de coluna. Mais testes foram conduzidos com a coluna ZORBAX Eclipse XDB-C18 4.6 x 150 mm, 5 µm, entretanto a troca de coluna aumentou o tempo da corrida cromatográfica e ainda assim, apresentou o mesmo tempo de retenção em diferentes padrões. O problema ainda foi observado alterando a vazão, as diferentes fases móveis e o modo gradiente.

Diante desses fatos, foi observado que a similaridade das características químicas dos padrões de interesse dificultaria a separação de todos os padrões sendo uma limitação para análise por LC-DAD, então optou-se pela análise de amitriptilina, desipramina, doxepina, nortriptilina e imipramina com a coluna Waters® XBridge C18 3,5 µm 4,6 x 50 mm com a pré-coluna C18 - 12,5 mm x 4,6 mm x 3 µm o qual não ocorre a co-eluição entre si.

Na constituição da FM, primeiramente tentamos reproduzir alguns estudos conforme Tabela 5, entretanto com a divergência de equipamento, FE e a falta de alguns material dos estudos propostos, foram feitas algumas adaptações. Conforme os testes realizado e analisando os achados na literatura, solutos base fraca sofrem grande interação secundária com os silanóis da FE em modo reverso, principalmente quando protonados. Uma das solução para o problema de assimetria do picos cromatográficos seria a utilização de uma FE com capeamento, geralmente com trietilamina para cromatografia de partição fase reversa, minimizando o número de silanóis residuais para impedir o acesso desses silanóis livres ao analito (BORGES,

2012; NETO, 2010; CASS & CASSIANO, 2015; ARAUJO, 2021). Entretanto obtivemos sucesso com as FM testadas. Então buscamos soluções modificando a FM.

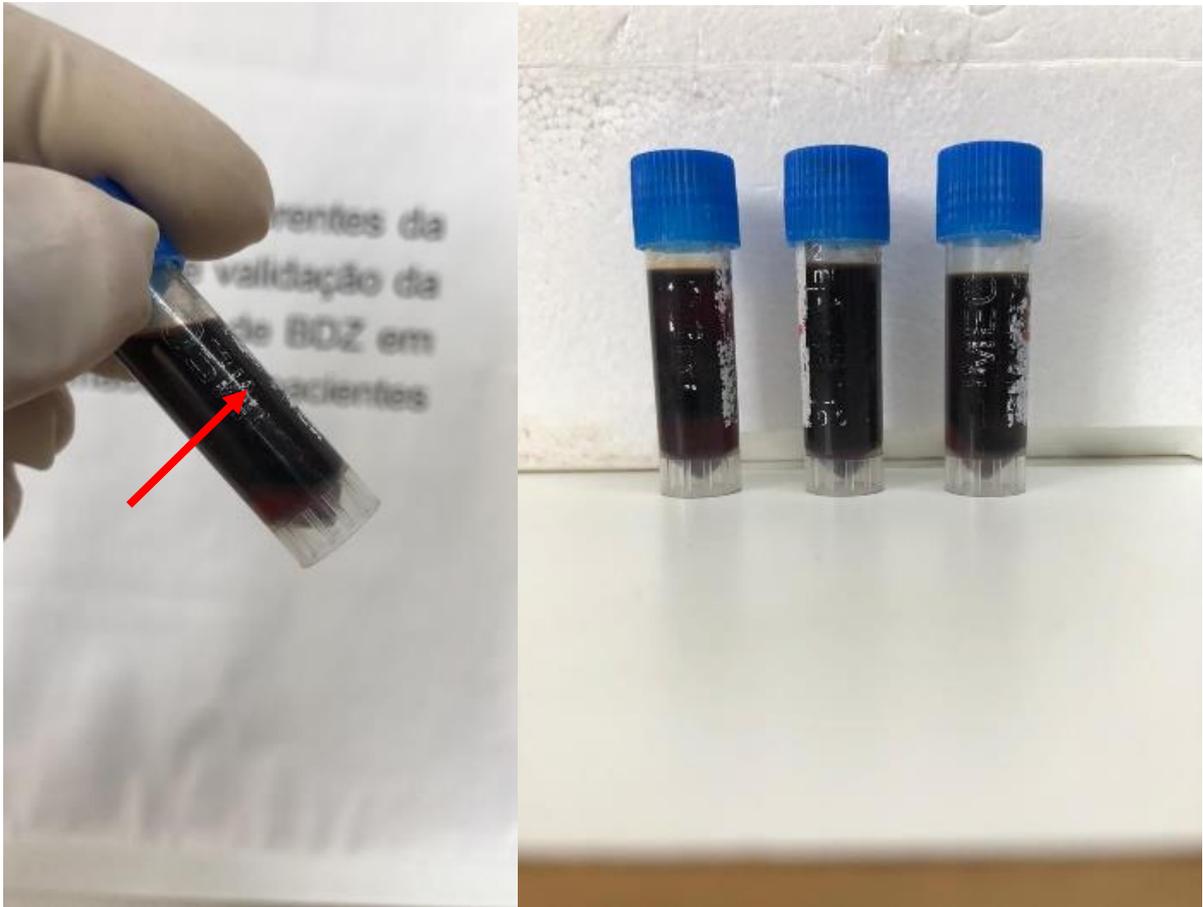
Pelo fato das colunas de fase reversa geralmente suportarem valores de pH entre 2 e 8, os analitos por serem bases fracas, com pK cerca de 9, vão estar na forma protonada na FM, então a necessidade de uso de um tampão para suprir a ionização e diminuir a interação dos analitos com os grupos silanóis. Também surgiu a necessidade da correção do pH, pois a acidificação da FM auxilia na estabilidade da FE resultando em picos mais simétricos (BORGES, 2012; ARAUJO, 2021)

Na prática, a FM ácida auxiliou na diminuição do tempo de retenção dos analitos. Logo, a FM ficou constituída por uma solução aquosa contendo 100 mM de fosfato de potássio monobásico em pH 2,5 corrigido com ácido o-fosfórico 85% e metanol na proporção de 60:40. A partir disso trabalhamos na otimização da DLLME.

A DLLME é amplamente utilizada em matrizes não complexas mas vem sendo empregada em matrizes complexas, como o sangue total. A presença de proteínas e diversos componentes endogênos faz-se necessário um pré-tratamento da amostra (desproteínização, hidrólise, entre outra). Contudo, conforme os resultados obtidos da otimização e validação não se fez necessário um procedimento anterior ao processo de DLLME, conforme ilustra as Figuras 4 e 5.

Para a DLLME foi avaliado o solvente extrator. Tendo em vista as características e os componentes encontrados no sangue, a utilização de solventes de densidade maior que água poderia ocasionar uma dificuldade no momento da retirada do solvente orgânico, além de poder ocorrer uma mistura dos interferentes da matriz com o solvente orgânico também no momento da retirada. Essa dificuldade foi detectada quando testado o solvente extrator clorofórmio. Apesar de ocorrer a separação de fases, além da dificuldade de coletar a fase orgânica a mesma não possuía um aspecto límpido, conforme a Figura 19.

Figura 19 – DLLME utilizando clorofórmio como solvente extrator em amostras de sangue total.



Cloroformio na parte inferior do tubo após a DLLME com sangue total.

Uma opção para solucionar os problemas detectados, é a utilização de solventes extratores de baixa densidade, pois após as etapas da DLLME o solvente orgânico vai encontra-se na parte superior. O estudo de Chen e colaboradores (2017) utilizou o tolueno como solvente extrator para produzir a DLLME afim de determinar antidepressivos e antipsicóticos em sangue total, além de não realizar um pré tratamento de amostra apresentou ótimos resultados para substancias ativas com características físico e químicas semelhantes aos ADTs (CHEN, et al. 2017).

Baseando no estudo de Chen e colaboradores (2017) foram testados os solventes tolueno e hexano. O tolueno como solvente extrator conseguiu extrair os ADTs em sangue total, entretanto carregou muitos interferentes endógenos e ao final do processo perdeu-se muito volume de solvente. Já o hexano apresentou uma

melhor eficiência na extração dos ADTs, além de carrear menos interferentes endógenos e ter pouca perda de volume ao final do processo, não ocorrendo problemas no momento de retirar a fase orgânica conforme a Figura 5.

Igualmente importante para o processo extrativo, o solvente dispersor deve ser solúvel tanto na fase aquosa como na fase orgânica, mas principalmente, deve garantir a dispersão do solvente na fase aquosa, afim de formar a “nuvem”, característica principal da DLLME. A dispersão formada (nuvem) está ligada diretamente na eficiência da extração, logo a escolha desse solvente deve ser avaliada atentamente. Foram avaliados acetonitrila, metanol, acetona, etanol e isopropanol.

Acetona e etanol apresentaram baixa taxa de enriquecimento e trouxeram muitos interferentes da matriz. No caso da acetona não foi possível integrar o pico cromatográfico da doxepina. Quando utilizado isopropanol, ocorreu dificuldade na secagem da fase orgânica e a amostra ressuspensa tinha um aspecto sujo e leitoso, então para prevenir a integridade da coluna cromatográfica não foi injetado. Acetonitrila e metanol apresentaram ser eficientes na extração, apresentando poucos interferentes da matriz, porém o metanol apresentou melhor eficiência extrativa e acabou sendo utilizado tanto como solvente dispersor como agente desproteinizante, eliminando a etapa de pré tratamento.

Outro ponto a ser cuidado é o pH da amostra, como deve ocorrer a passagem das moléculas da fase aquosa para a fase orgânicas, as mesmas devem estar na forma não ionizada, pois as moléculas ionizadas possuem maior afinidade pela fase aquosa, logo as moléculas nessa forma não ocorrerá a transferência da fase aquosa para a fase orgânica. O pH do sangue varia de 7,35 e 7,45, em casos de *post mortem* o sangue tende a acidificar devido aos vários processos que ocorre após a morte. Então, os ADTs presentes no sangue estarão na forma ionizada, levando em consideração o pK das moléculas (9,4 a 10,02), deve-se ajustar o pH para, no mínimo, 2 pontos acima do pK das moléculas ($\text{pH} > 12,02$). Logo, os ADTs estarão na forma não ionizada. Assim, a transferência de massa da referida substância partindo da matriz biológica para o solvente orgânico é viável.

Outro parâmetro que auxilia na efetividade da extração e que foi avaliado é o efeito *salting-out*. A concentração de sal para indução do efeito *salting-out* deve ser suficiente para produzir a separação da fase orgânica de forma clara e limpa, além de, em alguns casos, precipitar proteínas e outras macromoléculas presentes na

matriz biológica. Em altas concentrações, diminui a solubilidade das moléculas do solvente na fase aquosa, o que pode explicar a baixa eficiência extrativa com a concentração de 40% m/v (0,200 g) (GRECCO, et al. 2018). A concentração de 3% m/v (0,015 g) de cloreto de sódio foi a concentração ideal para a separação de fases possibilitando o efeito *salting-out*.

O banho de ultrassom e a utilização de vórtex vem sendo empregados em diversos estudos para redução de solventes e aumento na eficiência de extração. Os dois parâmetros foram avaliados e comparados separadamente após a injeção dos solventes extrator e dispensor. A aplicação de vórtex por 30 segundos apresentou as maiores áreas absolutas para os 5 ADTs, entretanto a utilização de 300 segundos de banho de ultrassom apresentou melhor eficiência de extração, uma vez que, o emprego da agitação ultrassônica pode levar novamente a formação de microgotas.

Por utilizar o hexano, solvente extrator de baixa densidade, após a injeção dos solventes, o mesmo se encontra na parte superior o qual poderia já ser retirado sem a utilização de centrifugação, entretanto após a injeção forma-se uma emulsão e o banho de ultrassom não é eficaz para quebrar toda a emulsão formada. Logo o tempo e velocidade de centrifugação foi avaliada. Com o aumento da velocidade de centrifugação houve sim uma melhora na extração e na nitidez da separação das fases. Entretanto, devido à alta força que de centrifugação (14.000 rpm x 10 minutos) ocorreram danos aos tubos que continham as amostras, inviabilizando a reprodutibilidade. Devido a esse motivo foi escolhido o tempo de 10 minutos e a velocidade de 10.000 rpm de centrifugação.

Em uma tentativa de aumentar a eficiência de extração, foi realizado uma mistura de solventes extratores. Tendo base nas propriedades físicas e químicas dos antidepressivos tricíclicos e dos solventes extratores, também sendo compatíveis com a metodologia proposta os solventes escolhidos foram hexano e octanol nas proporções de 5%, 10% e 15% (hexano:octanol). Entretanto essa mistura de solventes não obteve resultado satisfatório. Dentre os problemas encontrados, o elevado ponto de volatilização do octanol, mesmo em um volume baixo, demandou tempo superior a 20 minutos para a secagem total. Além disso, não foi eficiente na extração dos antidepressivos em sangue total e carregou muitos interferentes da matriz, e ainda houve interferência de compostos endógenos no tempo de retenção do padrão interno e doxepina. Tal comportamento impediu de realizar a avaliação cromatográfica dos analitos em questão (dados não demonstrados).

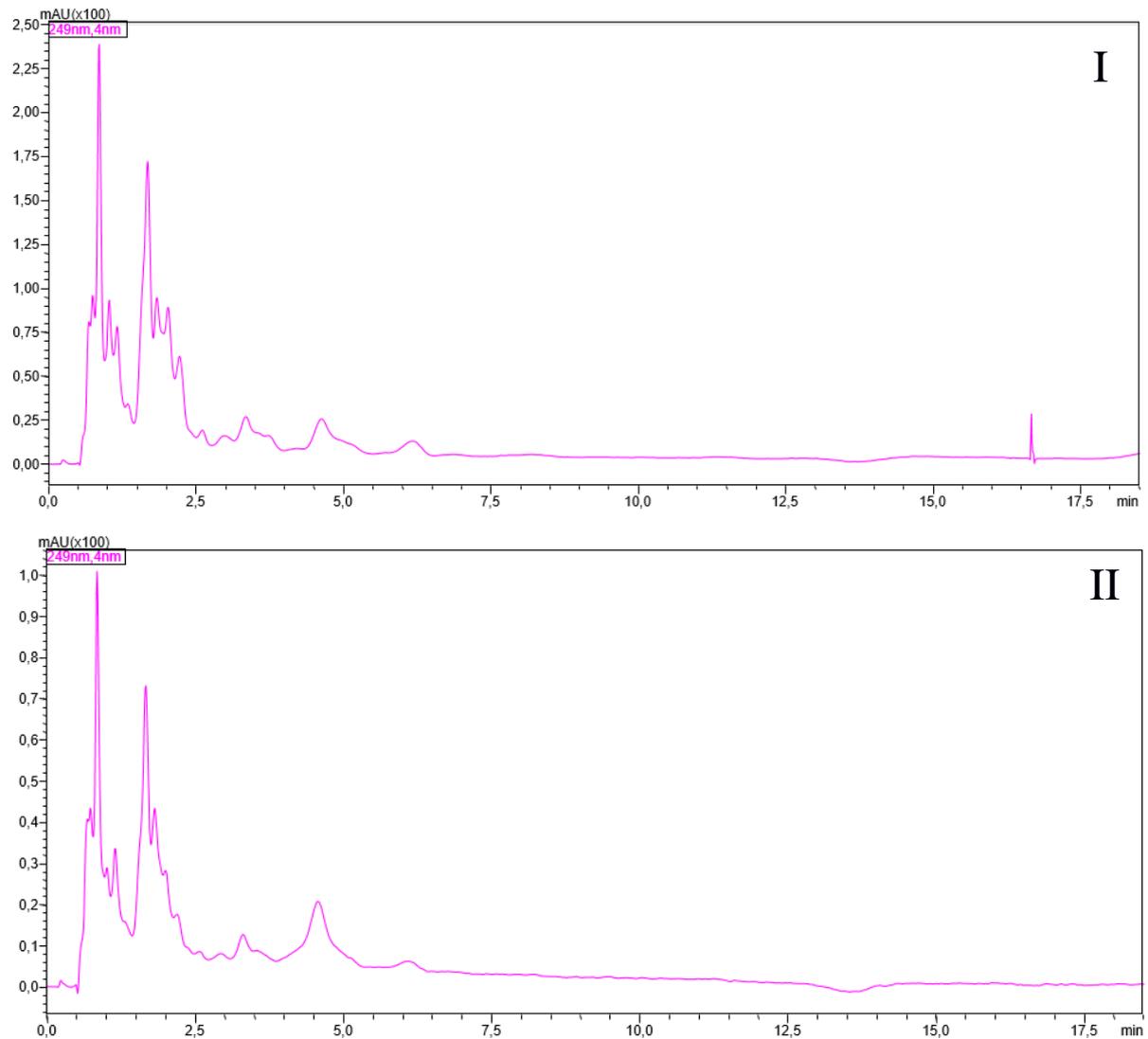
Baseado no estudo de Oliveira Silveira e colaboradores (2021) e também nos princípios da Química Verde, buscamos elaborar uma metodologia utilizando óleos essenciais como solvente extrator. Devido as diferenças significativas entre a matriz e o equipamento utilizado por Oliveira Silveira e colaboradores (2021) alguns ajustes foram feitos na técnica (OLIVEIRA SILVEIRA, et al, 2021). Primeiramente foi realizada a troca do solvente extrator hexano pelos óleos essenciais descritos no Item 3.4.10 e testado nos diferentes solventes dispersores.

Algumas combinações de solventes dispersores e óleos essenciais não foram satisfatórias. Dentre as dificuldades encontradas, ocorreu a solubilização do óleo essencial de Eucalipto (*Eucalyptus globulus*) tanto em acetonitrila como em metanol, o que não aconteceu com isopropanol. A solubilização do solvente extrator com o solvente dispersor não foi adequada para a técnica de DLLME. Na tentativa de contornar esse problema, utilizou-se NaOH 50% como agente desproteinizante, dispersor e também corretor de pH da amostra. Apesar de conseguir separar as fases e facilitar a coleta do óleo essencial, a utilização de NaOH 50% não foi efetiva para extrair os ADTs. Provavelmente a força da solução alcalina pode ter hidrolisado os ADTs.

Já a utilização do óleo essencial de Laranja (*Citrus sinensis*) não ocorreu a solubilização no metanol, acetonitrila e isopropanol. Entretanto após todo o processo da DLLME, o volume do óleo essencial disponível para coleta era baixo ($\pm 30\mu\text{L}$) e a coleta do extrato apresentava dificuldades manuais. Além disso, ambos óleos essenciais utilizados na técnica de DLLME proposta traziam diversos interferentes da matriz o que acabaram sendo retidos no mesmo tempo dos ADTs, o que não permitia a avaliação dos analitos em sangue total.

Na tentativa de diminuir os interferentes do sangue total na extração com os óleos essenciais, foi realizado uma etapa de *clean-up* do sangue total com ácido tricloroacético 10% e NaOH 50%. Entretanto estes também não foi suficiente para auxiliar na extração e diminuir os interferentes, conforme a Figura 20. Talvez a utilização tanto de ácido forte como base forte, pode acarretar na hidrólise das moléculas, inviabilizando a quantificação dos ADTs. E o aparecimento de interferentes podem ser devidos a complexidade dos componentes presentes nos óleos essenciais.

Figura 20 – Cromatogramas da DLLME utilizando óleo essencial com a etapa de *clean-up*



I - Cromatograma do Branco da extração NaOH 50% como solvente dispersor junto com óleo essencial de eucalipto; II - Cromatograma da extração NaOH 50% como solvente dispersor junto com óleo essencial de eucalipto.

Após as etapas de otimização, a fim de melhorar a logística de trabalho para a validação analítica foi testado a estabilidade do extrato hexanoico (solvente orgânico retirado após todo o processo de DLLME, antes da secagem). O extrato hexanoico recém preparado foi comparado com o extrato hexanoico preparado no dia anterior e guardado na geladeira em vial tampado. Houve perda dos analitos no processo de armazenagem por um dia, logo para a validação toda a etapa do método desenvolvido foi preparada e avaliada no mesmo dia.

A validação analítica foi conduzida seguindo os guias do UNODC e SWGTOX. Os cálculos dos limites de detecção e quantificação são avaliados baseados na relação sinal-ruído e em métodos analíticos. Os valores de LD foram definidos

seguindo o cálculo do limite do branco, 2,5 ng/mL para doxepina e amitriptilina; 10,0 ng/mL para imipramina e para desipramina; 7,5 ng/mL para nortriptilina.

O LQ é a menor concentração de calibração da faixa de trabalho, onde as concentrações devem possuir $CV \leq 20\%$. Os valores de LQ foram de 10 µg/mL para amitriptilina e doxepina; 20 µg/mL para nortriptilina e 30 µg/mL para imipramina e desipramina. Os testes foram obtidos experimentalmente com diferentes concentrações em triplicatas e confirmadas em sextuplicatas. Tendo em vista o detector utilizado e a complexidade da matriz de escolha, os valores de LQ, assim como o LD, foram satisfatórios estando dentro da faixa terapêutica.

A partir dos valores de LQ foi estabelecida a linearidade, que segundo a UNODC os analitos devem possuir o coeficiente de correlação angular maior que 0,99. A faixa linear foi estabelecida partindo das concentrações estabelecidas do LQ até a concentração de 500 µg/mL onde os 5 ADTs apresentaram linearidade nessa faixa, conforme a Tabela 9. Também não foi evidenciado o fenômeno de heteroscedasticidade para os ADTs do presente estudo.

A técnica mostrou ser específica/seletiva, não apresentando interferência de outros fármacos geralmente prescritos e utilizados concomitante os ADTs. Em relação ao parâmetro de precisão intra e inter-dia, a imipramina apresentou maior coeficiente de variação na precisão intra e inter-dia na concentração mais baixa (45 ng/mL), tal fato pode ser explicado pela baixa abundância apresentada do fármaco no detector DAD. Já o produto de biotransformação desipramina apresentou uma variação inter-dia maior que os outros ADTs. Essa variação pode ser explicada pela baixa eficiência apresentada pelo fato da integridade da FE utilizada. Com o aumento da concentração a nortriptilina apresentou uma maior variação na precisão inter-dia, também podendo ser explicada pela integridade da FE. Contudo, os 5 ADTs atenderam os critérios do guia UNODC no parâmetro de precisão intra e inter-dia.

Apesar de não ser um parâmetro obrigatório para aprovação, foi realizado o teste de recuperação e as taxas de recuperação apresentaram variações conforme a Tabela 10 (9,86% à 31,60%), tendo em vista a simplicidade da técnica extrativa utilizada, a complexidade da matriz biológica e os demais resultados dos parâmetros da validação, as taxas de recuperação para os ADTs estão de acordo com a literatura (DOS SANTOS, 2014).

A técnica mostrou ser precisa quando diluída em 10 vezes, tornando a técnica mais confiável em casos de intoxicação, onde pode haver altas concentrações,

extrapolando o limite da linearidade de 500ng/mL. Por fim, não ocorreu efeito memória na corrida cromatográfica.

Durante o processo de desenvolvimento da técnica, a robustez foi avaliada: A variação do pH da fase móvel (0.2 unidades) não foi relevante para alterar o método, assim como, a análise em diferentes equipamentos (N=), diferente laboratorista não foi relevantes (N=3). A diferença nas temperaturas entre os laboratórios de 30 ± 7 implicou apenas no tempo de corrida, mas não da separação dos analitos em questão. Além disso, a técnica foi reproduzida em GC/MS, com diferença de que para o este equipamento a extração foi ressuspensa em hexano, ao invés de ser ressuspensa na FM. A utilização em GC/MS teve como objetivo a confirmação da substância ativa em casos reais. Entretanto, não foi validado a técnica em GC/MS. Mesmo com as diferentes condições a técnica apresentou robustez, com resultados satisfatórios, podendo ser empregada em outros laboratórios.

A aplicação em caso real foi realizada em uma amostra de soro recebida do HUSM de uma paciente com quadro de intoxicação medicamentosa que deu entrada no hospital. O teste rápido multidroga foi positivo para antidepressivos tricíclicos entre outras substâncias, então a amostra foi submetida ao método extrativo desenvolvido. A corrida cromatográfica em LC-DAD detectou um pico cromatográfico no mesmo tempo de retenção da amitriptilina, conforme a Figura 17.

Foi detectado a presença de amitriptilina na amostra, entretanto não foi possível calcular a concentração por estar abaixo do LQ. Além disso, há uma falta de informações sobre o caso clínico. Afim de uma análise confirmatória, uma outra alíquota de soro da paciente foi submetida a DLLME proposta e análise em GC/MS e o cromatograma também apresentou o mesmo perfil cromatográfico da amitriptilina, conforme as Figuras 19.

No caso 2 não foi detectado nenhum dos ADTs do presente trabalho. Segundo o histórico informado, a posologia de amitriptilina utilizada é a posologia inicial para o tratamento de dor cônica, dose menor que a utilizada ao final do tratamento de 75-10mg por dia e menor que a dose utilizada para o tratamento da depressão, 70-300mg por dia. (CORDIOLI et al, 2015). A coleta foi realizada 1 hora após a ingestão dos medicamentos. Segundo o estudo de Garland (1977) a ingestão oral de 50 mg de amitriptilina, por voluntários, resultou em um pico plasmático na concentração de 20-40 ng/mL após 2-4 horas (GARLAND 1977). Já o estudo de Edelbroek e colaboradores (1984) o qual avaliou a administração oral de amitriptilina 150 mg, os

voluntários apresentaram concentrações séricas de amitriptilina entre 50-250 ng/mL (EDELBROEK et al, 1984). Tendo em vista a baixa posologia adotada e o período de tempo entre a ingestão de amitriptilina e a coleta, relacionando com a toxicocinética da amitriptilina, pode-se explicar a não detectabilidade de amitriptilina na amostra do Caso 2.

Porém, durante a extração da amostra de sangue total contendo fluoreto de sódio 2% (Caso 2), notou-se uma dificuldade na dispersão dos solventes na amostra, tal dificuldade não foi observada quando utilizada a matriz oriunda do banco de sangue no processo de validação. As amostras de sangue adquiridas no banco de sangue do HUSM contêm anticoagulante citrato/ fosfato/ dextrose-adenina (CPDA). Há diferenças na composição das amostras de sangue *ante-mortem*, *post-mortem* e nas amostras adquiridas pelo banco de sangue, e experimentalmente notou-se que existe uma diferença na viscosidade, o qual podem influenciar na eficiência do método extrativo, possivelmente não permitindo o efeito Nuvem característico de uma DLLME, podendo-se observar pela área integrada do padrão interno, Figura 18.

Na literatura Chen e colaboradores (2017) validou o método estocado as amostras de sangue total a -20 °C, o processo de congelamento e descongelamento afeta na estrutura das proteínas presentes no sangue. Entretanto, o caso real foi em amostra de sangue cardíaco *post mortem* (CHEN et al. 2017). Dos Santos e colaboradores (2014) avaliaram ADTs em sangue *post mortem* sem a necessidade de pré tratamento por LPME e avaliação por GC/MS (DOS SANTOS et al, 2014). Para o estudo de Fisichella e colaboradores (2015), não foi informado a origem das amostras para o processo de validação, nem a armazenagem, entretanto foram realizados 50 casos reais em amostras *post mortem* (FISICHELLA et al, 2015).

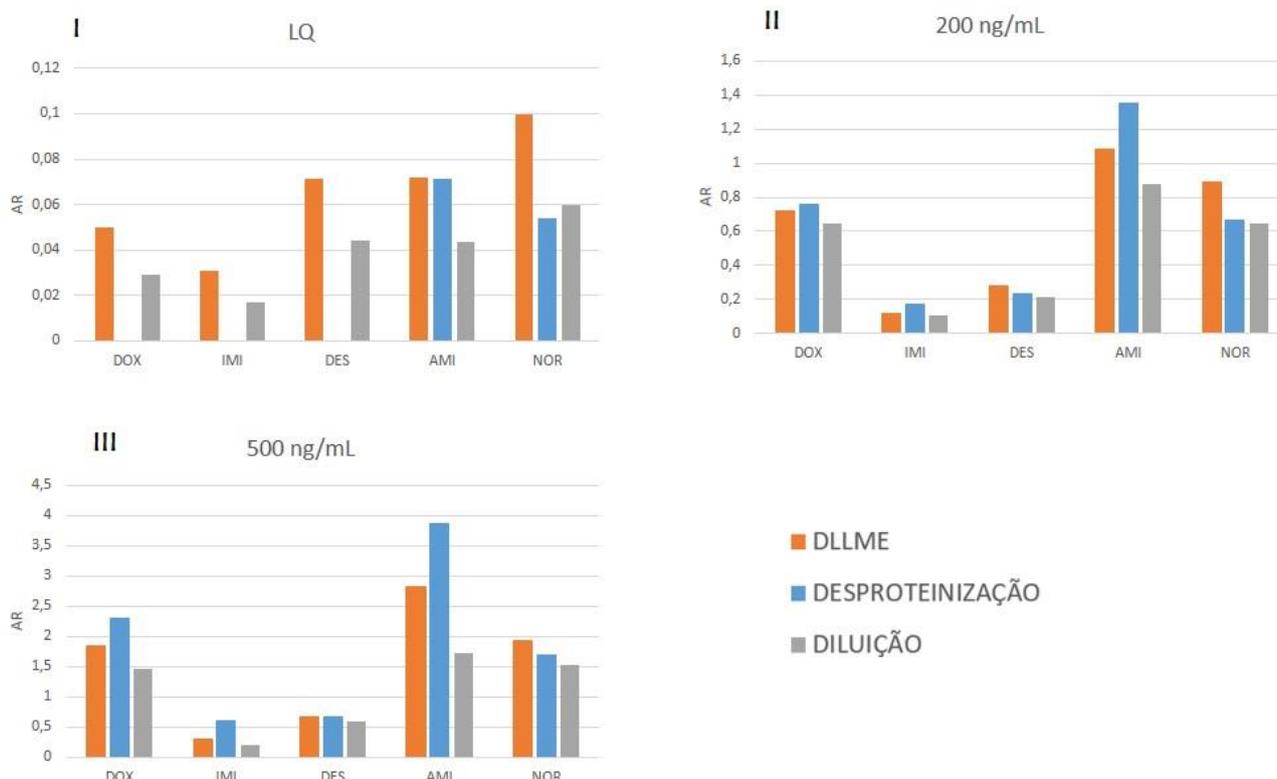
Diante dos estudos apresentados, tendo em vista alta capacidade dos ADTs se ligarem nas proteínas plasmáticas e aos eritrócitos, as análises utilizando sangue *post mortem*, podem ser facilitadas devido as alterações fisiológicas deste fenômeno que promovem a liberação dos ADTs ligados tanto em relação a proteínas plasmáticas como nas hemácias. Contudo mais estudos devem ser realizados para confirmar essa hipótese.

Para aumentar a eficiência extrativa para o Caso 2, buscou-se alternativas na literatura. O estudo de Fisichella e colaboradores (2015) utilizou sangue total para determinação de imipramina e clomina-pramina, e realizou um pré-tratamento de amostra adicionando 500 µL de metanol em 500 µL de sangue total. Após essa etapa

o sobrenadante foi retirado e realizada a DLLME (FISICHELLA et al, 2015). O mesmo procedimento de pré-tratamento de amostra foi realizado por Lin e colaboradores (2017) onde 200 μL de sangue total foi misturado em 1300 μL de metanol, afim de precipitar as proteínas, e o sobrenadante retirado seguiu com a técnica de DLLME para determinação de drogas recreativas em sangue total (LIN et al, 2017).

Baseados nesses estudos, foi testado um pré tratamento com a adição de 500 μL de metanol com 500 μL de sangue (oriundo do banco de sangue), nas concentrações de LQ, 200 e 500 ng/mL (triplicata), centrifugado por 10 minutos a 10.000 rpm e retirado 500 μL do sobrenadante. Então foi realizado a DLLME com sobrenadante. Também foi testado a adição de 500 μL de NaOH 2M com 500 μL de sangue (oriundo do banco de sangue) contendo os padrões de ADTs, nas concentrações de LQ, 200 e 500 ng/mL (triplicata), homogeneizado e então foi realizado a DLLME. Ambos testes apresentaram variações nas áreas relativas quando comparados com as áreas realivas da técnica de DLLME validada, conforme Figura 21.

Figura 21 – Gráfico comparativo das áreas relativas de pré-tratamento.



I – Gráfico comparativo das áreas relativas nas concentrações de LQ; **II** – Gráfico comparativo das áreas relativas nas concentrações de 200 ng/mL; **III** – Gráfico comparativo das áreas relativas nas concentrações de 500 ng/mL. **DLLME**: conforme item 3.5; **DESPROTEINIZAÇÃO**: Adicionou 500 μ L de metanol em 500 μ L de sangue total, foi retirar sobrenadante e realizada a DLLME; **DILUIÇÃO**: Adicionou 500 μ L de NaOH em 500 μ L de sangue total e realizada a DLLME

A desproteínização com 500 μ L de metanol apresentou maior área relativa nas concentrações de 200 ng/mL e 500 ng/mL, porém não foi possível determinar os respectivos LQ de cada analito. A diluição com 500 μ L de NaOH 2M apresentou área relativa menor em todas as concentrações quando comparado com a DLLME validada. Devido as diferenças nas áreas relativas, principalmente na concentração de LQ, optamos por não utilizar essas etapas adicionais nas análises.

Contudo, a metodologia foi validada com resultados satisfatórios dentro dos parâmetros estipulados pelo guia de validação de métodos da UNODC (2009), além de integridade da diluição e *carryover* conforme SWGTOX (2013). Além disso, foi possível aplicar a metodologia em amostras séricas, pois sangue total pode ser considerado uma matriz de maior complexidade do que plasma/soro, permitindo seu emprego em futuras análises com estes fluidos biológicos.

6. CONCLUSÃO

A metodologia de DLLME para ADTs em sangue total utilizando LC-DAD mostrou ser um método simples, confiável, robusto e reproduzível podendo ser empregado nos laboratórios de toxicologia para a determinação de ADTs com capacidade de quantificar em concentrações dentro da faixa terapêutica e concentrações tóxicas. A técnica desenvolvida e validada em sangue total pode ser aplicada em outras frações deste fluido biológico, como plasma e soro, também aplicadas em outros equipamentos cromatográficos. Contudo, estudos mais aprofundados devem ser realizados para a validação da técnica nas outras matrizes biológicas.

REFERÊNCIAS

ALVES, C. et al. Optimization of the SPME Parameters and Its Online Coupling with HPLC for the Analysis of Tricyclic Antidepressants in Plasma Samples. **Journal of Chromatographic Science**, v. 44, n. 6, p. 340–346, 2006 <https://doi.org/10.1093/chromsci/44.6.340>

ALTUNAY, N.; YILDIRIM, E.; GÜRKAN, R.; Extraction and preconcentration of trace Al and Cr from vegetable samples by vortex-assisted ionic liquid-based dispersive liquid–liquid microextraction prior to atomic absorption spectrometric determination. **Food Chemistry**, 2018, v. 245, p. 586–594. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.134>

AMITAI, Y. Establishing a cause of death dependent upon time of postmortem. **Journal of Toxicology - Clinical Toxicology**. 2001, v. 39(6), p. 651-652 <https://doi.org/10.1081/CLT-100108501>

AMITAI, Y.; Tricyclic Antidepressants in Red Cells and Plasma: Correlation with Impaired Intraventricular Conduction in Acute Overdose. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, 1993, v. 54(2), p. 219–227. <https://doi.org/10.1038/clpt.1993.133>

ARAIN, S. A. et al. A new dispersive liquid-liquid microextraction using ionic liquid based microemulsion coupled with cloud point extraction for determination of copper in serum and water samples. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 2016, v. 126, p. 186–192. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.12.035>

ARMBRUSTER, D. A. ; & PRY, T.; Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. **The Clinical biochemist. Reviews**, v. 29, n 1, p. 1-8. 2008

ASSELIN, W. M., & LESLIE, J. M. Direct Detection of Therapeutic Concentrations of Tricyclic Antidepressants in Whole Hemolyzed Blood Using the EMITtox Serum Tricyclic Antidepressant Assay. **Journal of Analytical Toxicology**, 1991, v. 15(4), 167–173. <https://doi.org/10.1093/jat/15.4.167>

AZEVEDO, A.J.P.; ARAÚJO, A.A.; FERREIRA, M.A.F. **Consumo de ansiolíticos benzodiazepínicos: uma correlação entre dados do SNGPC e indicadores sócio demográficos nas capitais brasileiras**. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 21, p. 83-90, 2016.

BAZREGAR, M., et al. Tandem dispersive liquid-liquid microextraction as an efficient method for determination of basic drugs in complicated matrices. **Journal of Chromatography A**, 2016, v. 1429, p. 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.11.087>

BORGES, E. M., GORAIEB, K., & COLLINS, C. H.; O Desafio de analisar solutos básicos por cromatografia líquida em modo reverso: Algumas alternativas para melhorar as separações. **Química Nova. SBQ**. 2012, v. 35. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422012000500024>

BORDIN, D.C.M.; MONEDEIRO, F.F.S.S.; CAMPOS, E.G.; ALVES, M.N.R.; BUENO, L.H.P.; MARTINIS, B.S. **Técnicas de preparo de amostras biológicas com interesse forense**. *Scientia Chromatographica*, v. 7, p. 125-143; 2015.

BULCÃO, R.P.; GARCIA, S.C.; LIMBERGER, R.P.; BAIERLE, M.; ARBO, M.D.; CHASIN, A.A.M.; THIESEN, F.V.; TAVARES, R. **Designer drugs: aspectos analíticos e biológicos**. Química Nova, v. 35, p. 149-158, 2012

CALDAS, S. S. et al. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, 2011, v. 34(9), p. 1604–1617. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000900021>

CASTRO, A. S.; CAMARELLA, L.; Farmacologia dos antidepressivos tricíclicos utilizados no tratamento das cefaleias primárias. **Revista Saúde e Desenvolvimento**. 2019, v.13, n.15, p. 15-33. 2019

CIT – Centro de Informações Toxicológicas do Rio Grande do Sul. Dados publicados em 2017. Disponível em <https://drive.google.com/file/d/1i7sEb5KaJQWGjNUpf5hcKTicgP7PIrUF/view>. Acesso em: 10 out. 2019

CHATTERGOON, D. S., et al. Carbamazepine interference with an immune assay for tricyclic antidepressants in plasma. **Journal of Toxicology - Clinical Toxicology**, 1998, v. 36(1–2), p. 109–113. <https://doi.org/10.3109/15563659809162597>

CHEN, X. et al. Ultrasound-assisted low-density solvent dispersive liquid–liquid microextraction for the simultaneous determination of 12 new antidepressants and 2 antipsychotics in whole blood by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2017, v. 142, p. 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.04.032>

COOK, D. S.; BRAITHWAITE, R. A.; & HALE, K. A.;. Estimating antemortem drug concentrations from postmortem blood samples: The influence of postmortem redistribution. **Journal of Clinical Pathology**, v. 53(4), p. 282–285. 2000. <https://doi.org/10.1136/jcp.53.4.282>

CORDIOLI, A. V.; GALLOIS, B. C.; ISOLAN, L.; PSICOFÁRMACOS CONSULTA RÁPIDA. **MEDICAMENTOS: INFORMAÇÕES BÁSICAS**. 5. ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2015

DASGUPTA, A., MCNEESE, C., & WELLS, A. (2004). Interference of Carbamazepine and Carbamazepine 10,11-Epoxyde in the Fluorescence Polarization Immunoassay for Tricyclic Antidepressants: Estimation of the True Tricyclic Antidepressant Concentration in the Presence of Carbamazepine Using a Mathematical Model. **American Journal of Clinical Pathology**, 2004 v. 121(3), p. 418–425. <https://doi.org/10.1309/wbq2-c5fl-yyhk-yct4>

DASGUPTA, A., WELLS, A., & DATTA, P. False-positive serum tricyclic antidepressant concentrations using fluorescence polarization immunoassay due to the presence of hydroxyzine and cetirizine. **Therapeutic Drug Monitoring**, 2007, v. 29(1), p. 134–139. <https://doi.org/10.1097/01.ftd.0000246767.12872.5b>

DE BOECK, M. et al. Ionic Liquid-Based Liquid–Liquid Microextraction for Benzodiazepine Analysis in Postmortem Blood Samples. **Journal of Forensic Sciences**. v. 63(6), p. 1875–1879. 2018 <https://doi.org/10.1111/1556-4029.13778>

DE LIMA, F. S. **O USO DA AMITRIPTILINA NO TRATAMENTO DEDOR AGUDA, CRÔNICA E NEUROPÁTICA**. 2014. Monografia (Graduação Farmácia)–FACULDADE DE EDUCAÇÃO E MEIO AMBIENTE, Ariquemes, RO, 2014

DE PAULA, D. M. L.; **Análise toxicológica de antidepressivos em sangue total por cromatografia em fase gasosa com detector de nitrogênio e fósforo**. 2007. Tese (Mestrado Ciências Farmacêuticas)–Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2007.

DEAN, L. Imipramine Therapy and CYP2D6 and CYP2C19 Genotype. Medical Genetics Summaries. **National Center for Biotechnology Information (US)**. 2012. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28520379>. Acessado em 25 jan. 2021

DOS SANTOS, M. F.; **Redistribuição *post mortem* de antidepressivos e seus produtos de biotransformação em tecidos biológicos humanos**. 2014. Tese (Doutorado Ciências Farmacêuticas) Universidade de São Paulo, São Paulo, RS. Disponível em < https://teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9141/tde-09022015-092617/publico/Marcelo_Filonzi_dos_Santos_DO_corrigida.pdf> Acessado em 20 fev. 2021.

EDMONDS, C.; & SWANOSKI, M.; A review of suvorexant, doxepin, ramelteon, and tasimelteon for the treatment of insomnia in geriatric patients. **Consultant Pharmacist**. 2017, v. 32(3), p. 156-160. <https://doi.org/10.4140/TCP.n.2017.156>

FARAJZADEH, M. A.; & MOGADDAM, M. R. A.; Air-assisted liquid-liquid microextraction method as a novel microextraction technique; Application in extraction and preconcentration of phthalate esters in aqueous sample followed by gas chromatography-flame ionization detection. **Analytica Chimica Acta**, 2012, v. 728, p. 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.03.031>

FERNÁNDEZ, P. et al. Optimization of ultrasound assisted dispersive liquid-liquid microextraction of six antidepressants in human plasma using experimental design. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 2016, v. 124, p. 189-197. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.02.041>

FERNANDES, G. et al. **Impacto das intoxicações por antidepressivos tricíclicos comparados aos depressores do “sistema nervoso central”**, 2006.

FISICHELLA, M.; ODOARDI, S.; STRANO-ROSSI, S.; High-throughput dispersive liquid/liquid microextraction (DLLME) method for the rapid determination of drugs of abuse, benzodiazepines and other psychotropic medications in blood samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and application to forensic cases. **Microchemical Journal**, 2015, v. 123, p. 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2015.05.009>

FLANAGAN, R.J.; TAYLOR, A.; WATSON, I.D.; WHELPTON, R. **Analytical Toxicology: Overview**. In: **Fundamentals of Analytical Toxicology**. Chichester: John Wiley & Sons, 2007. p.1-18.

FLANAGAN, R.J.; TAYLOR, A.; WATSON, I.D.; WHELPTON, R. **Immunoassay and Enzyme-Based Assay**. In: **Fundamentals of Analytical Toxicology**. Chichester: John Wiley & Sons, 2007a. p.309-337.

FLANAGAN, R.J.; TAYLOR, A.; WATSON, I.D.; WHELPTON, R. **Sample Preparation**. In: **Fundamentals of Analytical Toxicology**. Chichester: John Wiley & Sons, 2007b. p.49-93

FLOSS, V. M.; **DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM ÁGUA EMPREGANDO MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA (DLLME) E GC-MS/MS**. 2015. Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS. Disponível em <<https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/10609/FLOSS%2c%20VAGNER%20M%20EDEIROS.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acessado em 20 fev. 2021.

GILLMAN, P. K.; Tricyclic antidepressant pharmacology and therapeutic drug interactions updated. **British Journal of Pharmacol** 2007; v. 151, p.737–748, 2007.

GRECCO, C. F. et al. Extração líquido-líquido assistida pelo efeito salting out para análise de amostras biológicas. **Scientia Chromatographica**. v. 10, n. 2. 2018. <http://dx.doi.org/10.5935/sc.2018.006>

GUO, L.; & LEE, H. K.; Low-density solvent-based solvent demulsification dispersive liquid-liquid microextraction for the fast determination of trace levels of sixteen priority polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water samples. **Journal of Chromatography A**, 2011, v. 1218(31), p. 5040–5046. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.05.069>

HOFMANN, S. G.; GUTNER, C. A.; FANG, A. (2016). Social anxiety disorder. **Elsevier Science Ltd**. 2016, v. 96, p. 450–455. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809324-5.06570-6>

ITO, R., et al. Improvement and validation the method using dispersive liquid-liquid microextraction with in situ derivatization followed by gas chromatography-mass spectrometry for determination of tricyclic antidepressants in human urine samples. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, 2011, v. 879(31), p. 3714–3720. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.10.012>

JUNQUEIRA, L. C. U.; **Histologia básica**. 12 .ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

JAGTAP, P. K. & TAPADIA, K. Pharmacokinetic determination and analysis of nortriptyline based on GC-MS coupled with hollow-fiber drop-to-drop solvent microextraction technique. **Bioanalysis**, 2018, v. 10(3), p. 143–152. <https://doi.org/10.4155/bio-2017-0207>

KARPINSKA, J.; & STARCZEWSKA, B. Simultaneous LC determination of some antidepressants combined with neuroleptics. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 29(3), p. 519–525. 2002 [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(02\)00097-3](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(02)00097-3)

KAYLEE, R. M. et al. Variations in enzymatic hydrolysis efficiencies for amitriptyline and cyclobenzaprine in urine. **Journal of Analytical Toxicology**, 2016. v. 40(9), p. 732–737

KREMER, M.; et al. A dual noradrenergic mechanism for the relief of neuropathic allodynia by the antidepressant drugs duloxetine and amitriptyline. **Journal of Neuroscience**. 2018. v. 38(46), p. 9934–9954. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1004-18.2018>

KRIEG, A. K., & GAUGLITZ, G. (2015). Ultrasensitive Label-Free Immunoassay for Optical Determination of Amitriptyline and Related Tricyclic Antidepressants in Human Serum. **Analytical Chemistry**, 2015, v. 87(17), p. 8845–8850. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01895>

LANGMAN, L. J., & KAPUR, B. M. Toxicology: Then and now. **Clinical Biochemistry**, v. 39(5), p. 498–510. 2006 <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2006.03.004>

LEONG, M. I.; FUH, M. R.; HUANG, S. DA.; Beyond dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**. 2014, v. 1335, p. 2-14. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.02.021>

LIEBELT, E.L.; FRANCIS, P.D. Chapter 57 - Cyclic antidepressants. In: GOLDFRANK, L.R.; FLOMENBAUM, N.E.; LEWIN, N.A.; HOWLAND, M.A.; HOFFMAN, R.S.; NELSON, L.S.. Goldfrank's **Toxicological Emergencies**. United States of America: Editora McGraw-Hill, 2002. 7th, p.847-864

LIMA, A. P. S.; **DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ELETROFORÉTICOS E CROMATOGRÁFICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE BENZODIAZEPÍNICOS COMO ADULTERANTES EM FORMULAÇÕES FITOTERÁPICAS PARA EMAGRECIMENTO**. 2009. Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS. Disponível em <<https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/10448/LIMA%2c%20ANA%20PAULA%20SOARES%20DE.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acessado em 20 fev. 2021.

LIMA, A. P. S.; **DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ELETROFORÉTICOS E CROMATOGRÁFICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE BENZODIAZEPÍNICOS COMO ADULTERANTES EM FORMULAÇÕES FITOTERÁPICAS PARA EMAGRECIMENTO**. 2009. Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS. Disponível em <<https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/10448/LIMA%2c%20ANA%20PAULA%20SOARES%20DE.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acessado em 20 fev. 2021.

LIN, Z. et al. Ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of seven recreational drugs in human whole blood using gas

chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 1046, p. 177–184. 2017. doi:10.1016/j.jchromb.2017.01.024

LORD, H., & PAWLISZYN, J.; (2000). Microextraction of drugs. **Journal of Chromatography A**. 2000, v. 902, n. 1. p. 17-63. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00836-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00836-0)

.MADUREIRA, M. N. F.; **Presença de antidepressivos em amostras post-mortem: casuística interna, avaliação e interpretação dos valores obtidos de acordo com o diagnóstico diferencial médico-legal**. 2009. Dissertação (Mestrado em Medicina Legal) Universidade do Porto. Porto, PT. Disponível em <<https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/121574/2/344248.pdf>>. Acessado em 20 fev. 2021.

MALFARÁ, W. R. et al. Reliable HPLC method for therapeutic drug monitoring of frequently prescribed tricyclic and nontricyclic antidepressants. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44(4), p. 955–962. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.04.005>

MANOUI, N., & SAMANIDOU, V. F.; Recent Advances in the HPLC Analysis of Tricyclic Antidepressants in Bio-Samples. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, 2019, v. 20(1), p. 24–38. <https://doi.org/10.2174/1389557519666190617150518>

MANSOUR, F. R.; & KHAIRY, M. A.; Pharmaceutical and biomedical applications of dispersive liquid–liquid microextraction. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**. V. 1061-1062, p. 382-391. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.07.055>

MARSH, W. The Comprehensive Pharmacology Reference In: **Desipramine**. Elsevier Inc, 2007. <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.61564-8>

MCINTYRE, I. M.; & MALLETT, P. Sertraline concentrations and postmortem redistribution. **Forensic Science International**, v. 223(1–3), p. 349–352. 2012. DOI: 10.1016/j.forsciint.2012.10.020

MEDAWAR, C. V.; MATHEUS, M. E. Antidepressivos tricíclicos e gabapentinóides: uma análise do perfil farmacológico no tratamento da dor neuropática. **Revista Brasileira Farmacêutica**, v. 93, n. 3, p. 290-29. 2012

MEIRA LIMA, I. V.; BOTELHO SOUGEY, E.; VALLADA FILHO, H. P.; Farmacogenética do tratamento da depressão: Busca de marcadores moleculares de boa resposta aos antidepressivos. **Revista de Psiquiatria Clínica**. 2004, v. 31(1), p. 40-43. <https://doi.org/10.1590/s0101-60832004000100007>

MERCOLINI, L., et al. Simultaneous HPLC determination of 14 tricyclic antidepressants and metabolites in human plasma. **Journal of Separation Science**, v. 33(1), p. 23–30. 2010. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900493>

MIFSUD BUHAGIAR, L.; et al. Practical liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification of amitriptyline, nortriptyline and their hydroxy metabolites in human serum. **Biomedical Chromatography**, 2019, v. 33(12). <https://doi.org/10.1002/bmc.4679>

MOHEBBI, A., et al. Determination of tricyclic antidepressants in human urine samples by the three-step sample pretreatment followed by hplc-uv analysis: An efficient analytical method for further pharmacokinetic and forensic studies. **EXCLI Journal**, 2018, v. 17, p. 952–963. <https://doi.org/10.17179/excli2018-1613>

MONTENARH, D. et al. Quantification of 33 antidepressants by LC-MS/MS - Comparative validation in whole blood, plasma, and serum. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, p 5939-5953. 2014b <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8019-x>

MOORE, R. A.; et al. Amitriptyline for neuropathic pain in adults. **Cochrane Database of Systematic Reviews**. 2015. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD008242.pub3>

MARTINS, M; PRIMEL, E; CALDAS, S; PRESTES, O; ADAIME, M; ZANELLA, R. **Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): fundamentos e aplicações**. Scientia Chromatographica; 4(1), p 35-51, 2012

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de política de saúde. Departamento de atenção básica. Gêneria técnica de assistência farmacêutica. **Relação nacional de medicamentos essenciais: RENAME**. 1. ed. Brasília, DF, 2020.

MARCOS, C. S.; **O papel da emulsão lipídica nas intoxicações por antidepressivos tricíclicos – uma revisão narrativa**. 2019. TCC (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências da Saúde. Medicina. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/202358>>. Acessado em: 30 mai. 2021

MOFFAT, A. C.; OSSELTON, M. D.; WIDDOP, B.; Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. **PART TWO – Monographs**. 4. ed. Londres, GB: Pharmaceutical Press, 2011

MONTENARH, D.; HOPF, M.; MAURER, H.H.; SCHMIDT, P.; EWALD, A.H. **Detection and quantification of benzodiazepines and z-drugs in human whole blood, plasma, and serum samples as part of a comprehensive multi-analyte LC-MS/MS approach**. Analytical Bioanalytical Chemistry, v. 406, p. 803-818, 2014a.

MOREIRA, B; YOKOYA, J; GAITANI, C. **Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME): fundamentos, inovações e aplicações biológicas**. Scientia Chromatographica; 6(3): p 186-204, 2014

MORENO, R. A., MORENO, D. H., & SOARES, M. B. de M. **Psicofarmacologia de antidepressivos**. Revista Brasileira de Psiquiatria, v. 21(suppl 1), p. 24–40, 1999.

MORENO et al. **HPLC-DAD determination of CNS-acting drugs in human blood, plasma, and serum**. Critical Reviews in Analytical Chemistry, v. 44, p. 68-106, 2014.

OCHI, T. et al. Limited Associations Between 5-HT Receptor Gene Polymorphisms and Treatment Response in Antidepressant Treatment-Free Patients With Depression. **Frontiers in Pharmacology**. 2019; v. 10, p. 1462, 2019. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6951408/>>. Acessado em: 15 já. 2021.

ØIESTAD, A. M. L. et al. Comparative Study of Postmortem Concentrations of Antidepressants in Several Different Matrices. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 42, n. 7, p. 446–458, 2018. <https://doi.org/10.1093/jat/bky030>

OLIVEIRA SILVEIRA, G. et al. Essential oil-based dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of N,N-dimethyltryptamine and β -carbolines in human plasma: A novel solvent-free alternative. **Talanta**. v. 225, n. 1, 121976, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121976>

PELIÇÃO, F. S.; DE MARTINIS, B. S.; PISSINATE, J. F.; Amostras Biológicas em Análises Forenses: Matrizes Usuais (Urina e Sangue). In: **TOXICOLOGIA FORENSE**. 1. ed. São Paulo, SP: Blucher, 2018, cap 20, p. 381-392

PERES, B. T; NOÇÕES BÁSICAS DE CROMATOGRAFIA. **Biológico**, 2002, v.64, n.2, p.227-229.

POUNDER, D. J.; & JONES, G. R.. Post-mortem drug redistribution - A toxicological nightmare. **Forensic Science International**, v. 45(3), p. 253–263. 1990. [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(90\)90182-X](https://doi.org/10.1016/0379-0738(90)90182-X)

PROCYSHYN, R. M.; BEZCHLIBNYK-BUTLER, K. Z.; JEFFRIES, J. J.; **Clinical Handbook of Psychotropic Drugs**. 23. Ed. Boston, Massachusetts: Hogrefe Publishing, 2019

PROUTY. R. W; & ANDERSON, W. H.; The forensic science implications when influences on post mortem blood-drug concentrations. **Journal of Forensic Sciences**. V. 35, n. 2, p. 243-270. 1990.

QUEIROZ, R. H. C., et al. (1995). Simultaneous HPLC analysis of tricyclic antidepressants and metabolites in plasma samples. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 70(2), p. 181–186. 1995. [https://doi.org/10.1016/0031-6865\(95\)00019-6](https://doi.org/10.1016/0031-6865(95)00019-6)

RAMIN, M; KHADEM, M; OMIDI, F; POURHOSEIN, M; GOLBABEI, F; SHAHTAHERI, S.J. **Optimization of dispersive liquid-liquid microextraction procedure for detecting chlorpyrifos in human urine samples**. Med J Islam Repub Iran, v. 71, p 20-33, 2019

REGENTHAL, R.; KRUEGER, M.; KOEPEL, C.; PREISS, R. Drug levels: **Therapeutic and toxic serum/plasma concentrations of common drugs**. Journal of Clinical Monitoring and Computing, v. 15, p. 529-544, 1999

REZAEI, M.; ASSADI, Y.; MILANI HOSSEINI, M.R.; et al. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, 2006 v. 1116, n. 1–2, p. 1–9.

ROSA, I. S. S.; CAVALCANTE, M. S.; TERRA, A. T. J.; BREVE RELATO DOS ANTIDEPRESSIVOS TRICÍCLICOS, INCLUINDO O EFEITO TERAPÊUTICO DO CLORIDRATO DE BUPROPIONA. **Revista Científica FAEMA**. v. 9, p. 551-558. DOI: <http://dx.doi.org/10.31072>

SAIDINEJAD, M., LAW, T., & EWALD, M. B.; Interference by carbamazepine and oxcarbazepine with serum- and urine-screening assays for tricyclic antidepressants. **Pediatrics**, 2007 v. 120(3), p. e504–e509. <https://doi.org/10.1542/peds.2006-2199>

SAITMAN, A.; PARK, H.D.; FITZGERALD, R.L. **False-positive interferences of common urine drug screen immunoassays: a review**. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 38, p. 387-396, 2014

SAMANIDOU, V. F.; NIKA, M. K.; & PAPADOYANNIS, I. N. (2007). Development of an HPLC method for the monitoring of tricyclic antidepressants in biofluids. **Journal of Separation Science**, v. 30(15), p. 2391–2400. 2007. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700142>

SANTOS, M.F.; FERRI, C.C.; Seulin, S.C.; Leyton, V.; Pasqualucci, C.A.; MUNOZ, D.R.; YONAMINE, M. **Determination of antidepressants in whole blood using hollow-fiber liquid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry**. *Forensic Toxicology*, v. 32, p. 214-224, 2014

SASTRE, C. Post Mortem Redistribution of Drugs: Current State of Knowledge. **Current Pharmaceutical Design**, v. 23(36). P. 5530-5541. 2017. DOI : 10.2174/1381612823666170622111739

SCIENTIFIC WORKING GROUP FOR FORENSIC TOXICOLOGY (SWGTOX). Scientific working group for forensic toxicology (SWGTOX) standard practices for method validation in forensic toxicology. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 37, n. 7, p. 452–474, 2013. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jat/article/37/7/452/765476>>

SEIDI, S.; YAMINI, Y.; & REZAZADEH, M.; Combination of electromembrane extraction with dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatographic analysis as a fast and sensitive technique for determination of tricyclic antidepressants. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, 2013 913–914, 138–146. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.12.008>

SHAMSIPUR, M.; & MIRMOHAMMADI, M.; High performance liquid chromatographic determination of ultra traces of two tricyclic antidepressant drugs imipramine and trimipramine in urine samples after their dispersive liquid-liquid microextraction coupled with response surface optimization. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 100, 271–278. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.08.008>

SHIMAMURA, T.; et al. Structure of the human histamine H₁ receptor complex with doxepin. **Nature**, 2011, v. 475(7354), p. 65–72. <https://doi.org/10.1038/nature10236>

SILVA, A. F. A.; **Validação de Métodos Analíticos para controlo de Qualidade de um Medicamento, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)**. 2016. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química e Bioquímica) Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, PT. Disponível em <https://run.unl.pt/bitstream/10362/19455/1/Silva_2016.pdf>. Acessado em 20 fev. 2021.

SILVA, D. P.; **Determinação de compostos fenólicos por HPLC**. 2012. Dissertação (Mestrado em Química Industrial). Universidade da Beira Interior, Covilhã, PT. Disponível em <<https://ubibliorum.ubi.pt/bitstream/10400.6/2766/1/Disserta%C3%A7...pdf>>. Acessado em 06 dez. 2021.

SIMÃO, V. **HF-DLLME: UMA NOVA COMBINAÇÃO DAS TÉCNICAS DE MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA E MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA COM MEMBRANA MICROPOROSA PARA DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINAS E AGROTÓXICOS EM SUCOS**. 2015. Tese (Doutorado Química)– Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2015.

SINITOX – SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES TÓXICO FARMACOLÓGICAS. Evolução dos casos registrados de intoxicação humana por agente tóxico. Rio de Janeiro, 2012. Disponível em <https://sinitox.icict.fiocruz.br/sites/sinitox.icict.fiocruz.br/files//Brasil4.pdf>. Acesso em: 10 out 2018.

SKOPP, G. Preanalytic aspects in postmortem toxicology. **Forensic Science International**, v. 142(2-3), p. 75–100. 2004. doi:10.1016/j.forsciint.2004.02.012

SOUSA, D. I. T.; **Validação de Método Analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) de um Medicamento de associação dupla (20mg + 40mg)**. 2018. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química e Bioquímica) Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, PT. Disponível em <https://run.unl.pt/bitstream/10362/58223/1/Sousa_2018.pdf>. Acessado em 20 fev. 2021.

STHAL, S. M.; **Psicofarmacologia - Bases Neurocientíficas e Aplicações práticas. Antidepressivos**. 4. ed. Rio de Janeiro, RJ: GUANABARA KOOGAN, 2014, cap 7.

TABANI, H.; et al. Evaluation of dispersive liquid–liquid microextraction by coupling with green-based agarose gel-electromembrane extraction: An efficient method to the tandem extraction of basic drugs from biological fluids. **Talanta**, 2019. v. 199, p. 329–335. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.02.078>

THANACOODY, H. K. R.; & THOMAS, S. H. L.; Tricyclic antidepressant poisoning: Cardiovascular toxicity. **Toxicological Reviews**. v. 24(3). p. 205-214. 2005. <https://doi.org/10.2165/00139709-200524030-00013>

THEURILLAT, R.; & THORMANN, W. Monitoring of tricyclic antidepressants in human serum and plasma by HPLC: Characterization of a simple, laboratory developed method via external quality assessment. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 18(4–5), p. 751–760. 1998. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(98\)00263-5](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(98)00263-5)

TITIER, K. et al. Quantification of Tricyclic Antidepressants and Monoamine Oxidase Inhibitors by High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry in Whole Blood. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 31, p. 200-207, 2007.

TRUTA, L. et al. Antidepressants detection and quantification in whole blood samples by GC–MS/MS, for forensic purposes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 128, p. 496–503. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.06.027>

UDDIN, M. N.; SAMANIDOU, V. F.; & PAPADOYANNIS, I. N. Development and validation of an HPLC method for the determination of benzodiazepines and tricyclic antidepressants in biological fluids after sequential SPE. **Journal of Separation Science**, v. 31(13), p. 2358–2370. 2008 <https://doi.org/10.1002/jssc.200800079>

UNODC - UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. Guidance for de validation of analytical methodology and calibration of equipment used for testing of illicit drugs in seized materials and biological specimens. Nova York, 2009. Disponível em https://www.unodc.org/documents/scientific/validation_E.pdf. Acesso em: 20 dez. 2020.

UNODC - UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. Guidance for the forensic analysis of drugs facilitating sexual assault and other criminal acts. Nova Iorque, 2011. Disponível em https://www.unodc.org/documents/scientific/forensic_analysis_of_drugs_facilitating_sexual_assault_and_other_criminal_acts.pdf. Acesso em: 11 out. 2020

VAGHAR-LAHIJANI, G. et al. Extraction and Determination of Two Antidepressant Drugs in Human Plasma by Dispersive Liquid–Liquid Microextraction–HPLC. **Journal of Analytical Chemistry**, 2018, v. 73, n. 2, p. 155–161

VAN HOEY, N. M.; Effect of cyclobenzaprine on tricyclic antidepressant assays. **Annals of Pharmacotherapy**. 2005 v. 39(7-8), p. 1314–1317. <https://doi.org/10.1345/aph.1E632>

WILLE, S. M. R. et al. Determination of antidepressants in human postmortem blood, brain tissue, and hair using gas chromatography-mass spectrometry. **International Journal of Legal Medicine**, v. 123(6), p. 451–458. 2009. <https://doi.org/10.1007/s00414-008-0287-6>

XIONG, C. et al. Extraction and determination of some psychotropic drugs in urine samples using dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2009, v. 49(2), p. 572–578. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.11.036>

XU, X. et al. A new liquid-liquid microextraction method by ultrasound assisted salting-out for determination of triazole pesticides in water samples coupled by gas chromatography-mass spectrometry. **Analytical Methods**, 2015, v. 7(3), p. 1194–1199. <https://doi.org/10.1039/c4ay02448f>

YAREMA, M.; & BECKER, C.; Key Concepts in Postmortem Drug Redistribution. **Clinical Toxicology**. v. 43, n. 4, p. 235-241. 2005. DOI: 10.1081/ct-58950

YAZDI, A. S.; RAZAVI, N.; YAZDINEJAD, S. R.; Separation and determination of amitriptyline and nortriptyline by dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography flame ionization detection. **Talanta**, 2008, v. 75(5), p. 1293–1299. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.01.039>

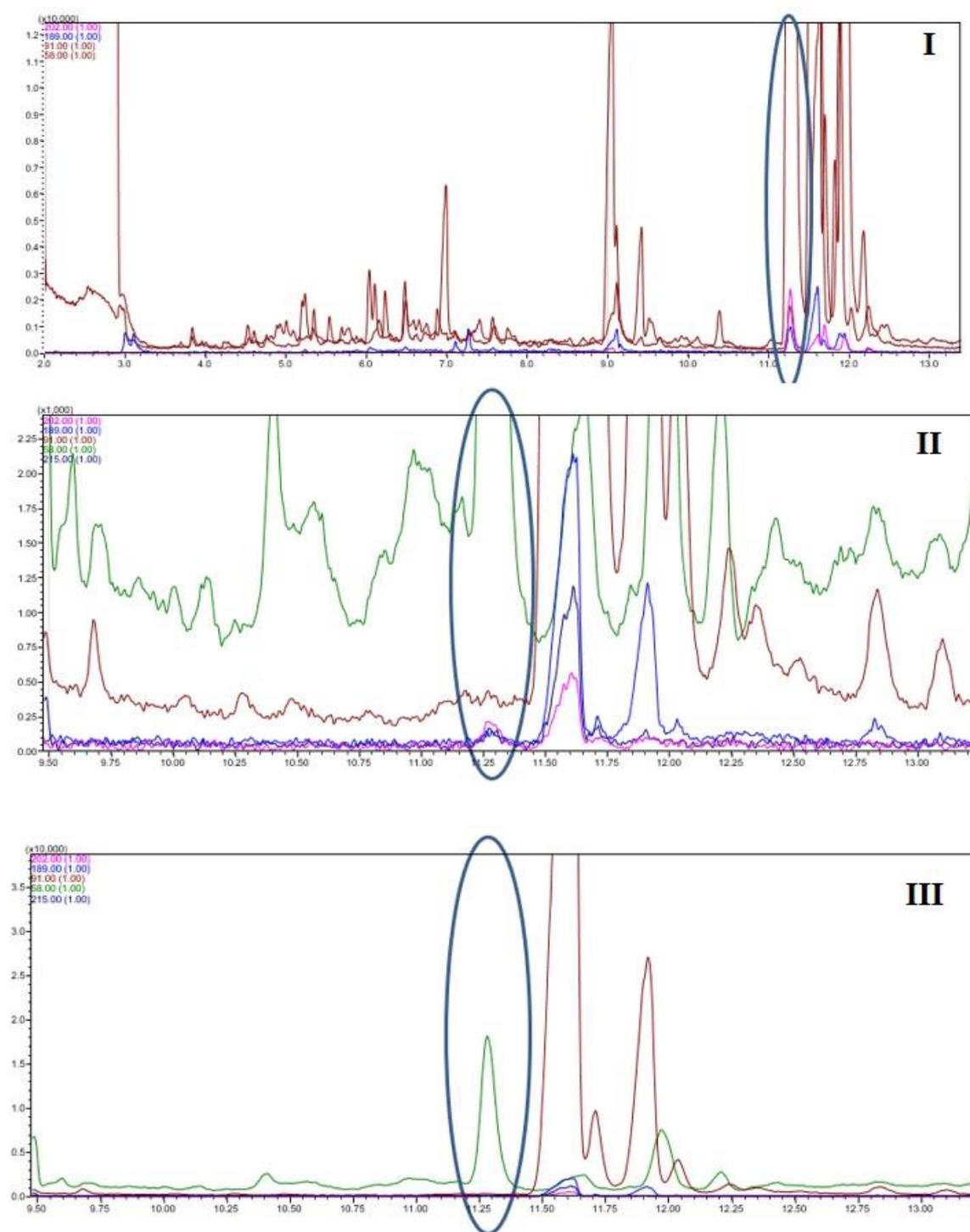
ZHAO, F. J., et al. Salting-out homogeneous liquid-liquid extraction approach applied in sample pre-processing for the quantitative determination of entecavir in human plasma by LC-MS. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, 2012, v. 881–882, p. 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.12.003>

57° CBQ - **Efeito de ânions na eficiência de extração de pesticidas em água por microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) – GC/FID**. 2017. Disponível em <http://www.abq.org.br/cbq/2017/trabalhos/4/11827-25070.html>. Acessado em 4 mai. 2020

APÊNDICE A – CONDIÇÕES CROMATOGRAFICAS E RESULTADOS (GC/MS)

As amostras foram tratadas conforme o item 3.5, no entanto foram resuspendidas com hexano e analisadas por GC/MS. O amostrador automático era um injetor da série AOC-20is (Shimadzu, Kyoto, Japão), o cromatógrafo gasoso era um GC-2010 Plus (Shimadzu, Kyoto, Japão) e o espectrômetro de massa era um GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu, Kyoto, Japão). A coluna era uma coluna de sílica fundida Rtx®-5ms GC (30 m × 0,25 mm d.i. × 0,25 µm de espessura de filme) com 5% de difenil e 95% de dimetil polisiloxano (Restek Corporation, Bellefonte, PA, EUA). O hélio foi o gás de transporte a uma taxa de fluxo de 0,80 mL/min. A temperatura do injetor foi mantida a 220 °C. Um volume de 1 µL de cada amostra foi injetado no modo splitless. A temperatura inicial do forno foi de 125 °C e foi mantida por 1 minuto. Em seguida, foi aumentada de 125 °C para 190 °C a uma taxa de 50 °C/min, depois de 190 °C para 225 °C a uma taxa de 5 °C / min onde foi mantida por 3 minutos. Em seguida, a uma taxa de 50 °C / min, foi aumentada até 230 °C, que foi mantida por 1 minuto, totalizando 13,40 minutos de corrida cromatográfica. A temperatura da interface foi mantida a 280 °C e a temperatura da fonte de íons a 280 °C. Os espectros de massa foram registrados em uma faixa de 40-700 amu a 0,30 varredura por segundo. Os voláteis foram identificados por espectrômetro de massa quadrupolo com modo de impacto de elétrons (EI) gerado a 70 eV no modo de aquisição por varredura. A identificação de componentes individuais foi feita usando seus índices de retenção relativos com o Wiley Registry of Mass Spectral Data (Palisade Corporation, Newfield, NY). A tabela abaixo esta descrito o tempo de retenção de cada analito e seus respectivos massa/carga (m/z) analisados.

ADTs	Tempo de Retenção (minutos)	m/z
PI	12,17	207 e 242
DOX	11,55	178, 115 e 42
IMI	11,75	280, 234 e 220
DES	12,21	234, 195 e 193
AMI	11,26	215, 202, 189, 91 e 58
NOR	13,4	263, 128 e 44



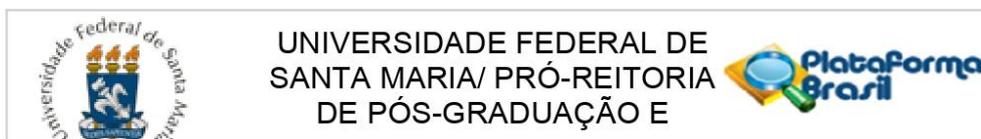
I-

I- Perfil cromatográfico do método extrativo com sangue total incorporando padrão interno, padrões doxepina, imipramina, desipramina, amitriptilina e nortriptilina, nas concentrações de 200 ng/mL; II – Cromatograma da extração em amostra real de soro com zoom no tempo de retenção da amitriptilina; III – Cromatograma da extração em amostra real de soro. O tempo de retenção dos analitos são respectivamente 12.17 min (PI), 11.55 min (DOX), 11.75 min (IMI), 12.21 min (DES), 11.26 min (AMI) e 13.4 min (NOR). Ions analisados (m/z) 215, 202, 189, 91 e 58.

ANEXO A – Histórico escolar

		UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA - UFSM			Data: 06/07/2021		
		Histórico Escolar Simplificado			Hora: 20:29		
					IP: 187.58.159.12		
Curso: 887 - PG em Ciências Farmacêuticas - Mestrado							
Matrícula: 201960544		Situação: Abandono		Versão: 2009			
Aluno: DENER GOMES BERLATO							
Código	Disciplina	C.H.	Cred	Situação	Média	Período	
Disciplinas de Outros Cursos							
MTD1033	BIOQUÍMICA DO EXERCÍCIO	60	4	Incompleto	****	2020 / 1. Semestre	
FSL854	DROGAS DE ABUSO: ASPÉCTOS TOXICOLÓGICOS E FORENSES-A	60	4	Aprovado com nota	B	2020 / 1. Semestre	
FSL849	TOXICOLOGIA DOS MEDICAMENTOS	30	2	Aprovado com nota	B	2020 / 1. Semestre	
FSL844	ASPECTOS BIOQUÍMICOS E FARMACOLÓGICOS DA AÇÃO DE FÁRMACOS NO SISTEMA NERVOSO	45	3	Aprovado com nota	A	2020 / 2. Semestre	
FSL827	TÓPICOS ESPECIAIS EM FARMACOLOGIA II	15	1	Aprovado com nota	A-	2020 / 2. Semestre	
OBRIGATORIAS							
FID824	SEMINÁRIOS I	30	2	Aprovado com nota	A	2019 / 1. Semestre	
FID843	CO-ORIENTAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA	30	2	Aprovado com nota	A	2019 / 2. Semestre	
APG303	DOCÊNCIA ORIENTADA I	15	1	Aprovado com nota	A	2019 / 2. Semestre	
FID825	SEMINÁRIOS II	30	2	Aprovado com nota	A-	2019 / 2. Semestre	
APG304	DOCÊNCIA ORIENTADA II	15	1	Aprovado com nota	A	2020 / 1. Semestre	
OPTATIVAS							
ACT800	BIOQUÍMICA CLÍNICA AVANÇADA	30	2	Aprovado com nota	A	2019 / 1. Semestre	
FID826	METODOLOGIA DA PESQUISA	30	2	Aprovado com nota	A-	2019 / 1. Semestre	
ACT813	ANÁLISES TOXICOLÓGICAS	30	2	Aprovado com nota	A-	2019 / 2. Semestre	
FID853	MÉTODOS CROMATOGRAFÍCOS "A"	60	4	Aprovado com nota	B	2019 / 2. Semestre	
FID833	MÉTODOS DE AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA	45	3	Matrícula	****	2020 / 1. Semestre	
Total Carga Horária/Créditos Vencidos:		270	18				
					Carga Horária: Vencidas		
OBRIGATORIAS					120		
OPTATIVAS					150		
Observações:							
- Foi APROVADO (A) no Teste de Suficiência em Leitura em Língua Estrangeira (INGLÊS), realizado no dia 04/12/2020, no Departamento de Letras Estrangeiras Modernas, da Universidade Federal de Santa Maria.							
<small>O regime de aprovação das disciplinas na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) conforme previsto no Regimento Geral da Pós-Graduação (Resolução n. 015/2014) prevê os seguintes conceitos: A (10,0 a 9,1); A- (9,0 a 8,1); B (8,0 a 7,1); B- (7,0 a 6,1); C (6,0 a 5,1); C- (5,0 a 4,1); D (4,0 a 3,1); D- (3,0 a 2,1); E (2,0 a 1,1); E- (1,0 a 0,0). Nas disciplinas que não forem computados os conceitos acima, serão atribuídas as seguintes situações: AP (Aprovado); NA (Não-Aprovado); R (Reprovado); e I (Situação Incompleta). O conceito mínimo de aprovação é B-, o discente que obtiver conceito igual ou inferior à "C", será reprovado. A frequência escolar mínima para aprovação: setenta e cinco por cento (75%).</small>							
Autenticação: 0088.F797.D4A7.EF8A.3048.0B01.477F.FFC9 consulte em < http://www.ufsm.br/autenticacao >						Página: 1	

ANEXO B - Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DETERMINAÇÃO RÁPIDA DE FÁRMACOS PSICOTRÓPICOS NO SANGUE EMPREGANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA COM DETECTOR ULTRAVIOLETA-VISÍVEL

Pesquisador: André Valle de Bairros

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 78043917.1.0000.5346

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Maria/ Pró-Reitoria de Pós-Graduação e

Patrocinador Principal: Universidade Federal de Santa Maria/ Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.353.688

Apresentação do Projeto:

Os medicamentos são os principais agentes responsáveis por intoxicações no Brasil, responsáveis por quase 27 mil casos registrados no Brasil e mais de 6 mil ocorrências no estado do Rio Grande do Sul (RS). Os principais toxicantes relacionados foram os benzodiazepínicos, anticonvulsivantes e antidepressivos. Assim, a proposta deste estudo é padronizar uma estratégia analítica capaz de determinar clonazepam, diazepam, nordiazepam, oxazepam, lorazepam, bromazepam, flunitrazepam, amitriptilina, desipramina, nortriptilina, fluoxetina, norfluoxetina, carbamazepina, 10,11-carbamazepina epóxido e fenobarbital em amostras de soro humano, tendo como foco principal o fármaco e seus respectivos produtos de biotransformação ativos de importância clínica analítica. Os analitos serão determinados por LC-UV/Vis e as metodologias serão validadas conforme protocolo internacional (UNODC, 2009).

Para tanto, será realizada exclusivamente uma coleta de sangue em tubos sem anticoagulante em pacientes usuários de BZD, AC, ADT e ADISRS e que estão internados no setor psiquiátrico do HUSM (n = 20). Esse número de pacientes é o suficiente para garantir a confiabilidade da

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar
Bairro: Camobi **CEP:** 97.105-970
UF: RS **Município:** SANTA MARIA
Telefone: (55)3220-9362 **E-mail:** cep.ufsm@gmail.com

ANEXO C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

1. Informações do Sujeito da Pesquisa

Nome:		
Documento de Identidade nº:	Sexo: () M () F	
Data de Nascimento: / /		
Endereço:		
Nº	Complemento:	
Bairro:	Cidade:	Estado:
CEP:	Telefones:	

2. Informações do Responsável Legal

Nome:		
Natureza (grau de parentesco, tutor, curador, etc.)		
Documento de Identidade nº:	Sexo: () M () F	
Data de Nascimento: / /		
Endereço:		
Nº	Complemento:	
Bairro:	Cidade:	Estado:
CEP:	Telefones:	

3. Informações sobre o projeto de pesquisa

Título do Projeto Guarda-Chuva: Rápida determinação de fármacos psicotrópicos em sangue empregando cromatografia líquida com detector ultravioleta/visível
Título do Projeto de Pesquisa: Determinação de antidepressivos em sangue empregando cromatografia líquida com detector ultravioleta-visível
Duração da Pesquisa: 4 anos
Nome do pesquisador responsável: André Valle de Bairros
Cargo/ Função: Farmacêutico
Instituição: UFSM/Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Prezado senhor(a)

Meu nome é André Valle de Bairros, professor do curso de Farmácia da Universidade Federal de Santa Maria e estamos convidando-o(a) a participar do projeto de pesquisa que estamos desenvolvendo em colaboração com o Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) através deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) conforme a Resolução do Conselho Nacional de Saúde N° 466, de 12 de dezembro de 2012, que garantirá o sigilo e segurança dos dados e da identidade do voluntário.

Esta pesquisa tem o objetivo de desenvolver uma metodologia analítica rápida, confiável e de baixo custo para fins de um diagnóstico preciso baseada em uma técnica chamada Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME) para ser avaliada por cromatografia líquida com detector de ultravioleta/visível (LC-UV/Vis) para determinação de antidepressivos tricíclicos em amostras de sangue. Trará benefícios no sentido de



Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

ajudar em casos de efeitos adversos ou complicações toxicológicas oriundas da terapia medicamentosa, no esclarecimento de casos onde é necessário comprovar especificadamente o uso dessas substâncias e auxílio no tratamento mais adequado ao indivíduo. Além disso, o novo método poderá ser implementado no HUSM para futuros casos de intoxicação e/ou servir como referência para outros laboratórios.

Se você aceitar participar da pesquisa, precisaremos do seu consentimento para coletar uma amostra de sangue no volume máximo de 5 mL. Em relação à coleta de material, não há necessidade de alguma preparação prévia para a coleta. O risco em relação ao projeto é mínimo, pois a coleta de sangue será através de seringas, agulhas e tubos novos descartáveis realizados por pessoal treinado. Como a coleta é realizada com sistema a vácuo através de uma agulha bipolar, não haverá necessidade da flebotomia em outra veia e/ou braço. Além disso, a coleta será realizada no mesmo dia de retirada de sangue para exames laboratoriais de rotina, o que acarretará menor incomodo ao voluntário. Como desvantagem, esse procedimento poderá formar uma mancha roxa (hematoma) no local da picada da agulha.

É de interesse deste estudo que possamos ter o máximo de informações possíveis em relação ao seu contato com outros fármacos e substâncias que por ventura possam vir a interferir na análise dentro de um período de 24hs para assegurar maior confiança no novo método que está sendo proposto, caso seja possível. Vale ressaltar que o material biológico coletado será utilizado exclusivamente para a proposta da pesquisa durante o tempo de atividade do estudo, não sendo empregado para outros fins. Com o término do projeto, datado para junho de 2021, qualquer amostra biológica utilizada para este estudo será descartada como lixo biológico.

É garantido ao voluntário, a qualquer tempo, receber informações sobre procedimentos, eventuais riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para eliminar alguma dúvida que possa surgir. O voluntário também possui a opção de recusar-se a participar ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência. Também está assegurada ao voluntário sua confidencialidade ao participar do estudo além de sigilo e privacidade.

Para crianças, adolescentes, pessoas com transtorno ou doença mental ou em situação de substancial diminuição em sua capacidade de decisão, um responsável legal deverá fornecer o assentimento através de assinatura frente à proposta deste projeto de pesquisa.

A identidade do sujeito da pesquisa será mantida em segredo e os dados obtidos neste período serão alocados na pasta do referido paciente no Serviço de Arquivo Médico (SAME), não exibindo o voluntário a qualquer tipo de exposição. Por se tratar de uma pesquisa científica, somente os resultados obtidos deste estudo poderão futuramente ser expostos em debates, relatórios, aulas para graduação e pós-graduação, congressos e revistas científicas.

Os gastos necessários para a sua participação na pesquisa serão assumidos pelos pesquisadores. Fica, também, garantida indenização em casos de danos comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa.



Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

4. Pesquisador responsável: Prof^o. Dr^o. André Valle de Bairros

Endereço: Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde (Prédio 26A)
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Sala 1401b
Av. Roraima, 1000 – Bairro Camobi; Santa Maria - RS
CEP: 97105-900
Fone: (055) 3220-8464

5. Observações complementares:

9. Consentimento Pós-Esclarecido:

Eu, _____, após a leitura ou a escuta da leitura deste documento e ter tido a oportunidade de conversar com o pesquisador responsável, para esclarecer todas as minhas dúvidas, estou suficientemente informado, ficando claro para que minha participação é voluntária e que posso retirar este consentimento a qualquer momento sem penalidades ou perda de qualquer benefício. Estou ciente também dos objetivos da pesquisa, dos procedimentos aos quais serei submetido, dos possíveis danos ou riscos deles provenientes e da garantia de confidencialidade, bem como de esclarecimentos sempre que desejar. Diante do exposto e de espontânea vontade, expresso minha concordância em participar deste estudo.

Santa Maria, _____ de _____ de 20____.

Assinatura do sujeito da pesquisa

Assinatura do responsável legal

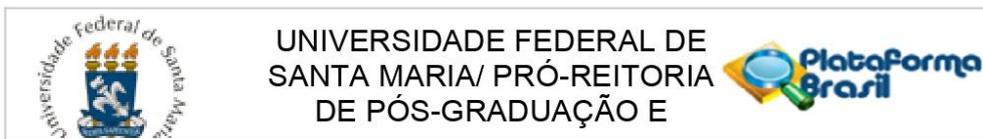


Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

Assinatura e carimbo do pesquisador responsável

*Para qualquer questão, dúvida, esclarecimento ou reclamação sobre aspectos éticos dessa pesquisa, favor entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFSM:
Av. Roraima, 1000 - 97105-900 - Santa Maria - RS - 2º andar do prédio da Reitoria.
Telefone: (55) 3220-9362 - E-mail: cep.ufsm@gmail.com.*



Continuação do Parecer: 2.353.688

metodologia analítica para fins toxicológicos (LEITE et al., 2009; MENCK et al., 2012; BAIRROS et al., 2014).

Esses pacientes serão previamente selecionados pelo setor psiquiátrico com aval do coordenador da referida pesquisa antes da coleta, a qual será realizada por pessoal treinado do Laboratório de Análises Clínicas (LAC), que estarão cientes do estudo que será realizado.

A amostra de sangue será obtida nos dias em que esses pacientes realizam punção venosa para outros exames laboratoriais de rotina, evitando o desconforto de nova picada de agulha. Uma alíquota de 5 mL de sangue será repassada ao coordenador do projeto, sendo este volume suficiente para realização dos procedimentos analíticos do estudo.

A identificação dos analitos será baseada no tempo de retenção, comparando-se com aqueles obtidos com padrões analíticos de referência, do qual deve-se obter o mesmo tempo de retenção (amostra e padrão).

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO GERAL: desenvolvimento e validação de um rápido método analítico para determinação de fármacos e seus respectivos produtos de biotransformação utilizando sangue como matriz biológica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS: desconforto no momento da colheita da amostra de sangue para a análise.

BENEFÍCIOS: indiretos através do conhecimento gerado.

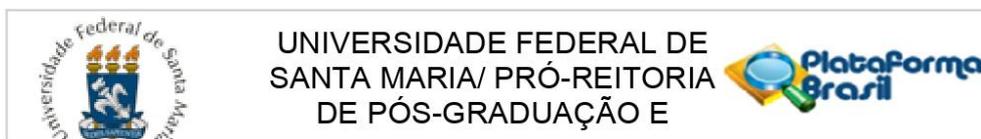
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta folha de rosto, registro do projeto, autorização institucional, termo de confidencialidade e termo de consentimento livre esclarecido, devidamente redigidos e assinados.

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar
Bairro: Camobi CEP: 97.105-970
UF: RS Município: SANTA MARIA
Telefone: (55)3220-9362 E-mail: cep.ufsm@gmail.com



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA
DE PÓS-GRADUAÇÃO E

Continuação do Parecer: 2.353.688

Recomendações:

.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_915078.pdf	25/10/2017 15:17:38		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEFinal3.docx	25/10/2017 15:16:53	André Valle de Bairros	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.pdf	25/10/2017 15:16:31	André Valle de Bairros	Aceito
Outros	Termodeconfidencialidadeassinado.jpg	02/10/2017 13:58:26	André Valle de Bairros	Aceito
Outros	MinutadoprojetoGAP.pdf	02/10/2017 13:51:58	André Valle de Bairros	Aceito
Folha de Rosto	PlataformaBrasilAndreValledeBairros.pdf	02/10/2017 13:51:30	André Valle de Bairros	Aceito
Outros	RegistroProjetoHUSM.jpg	22/06/2017 09:48:41	André Valle de Bairros	Aceito

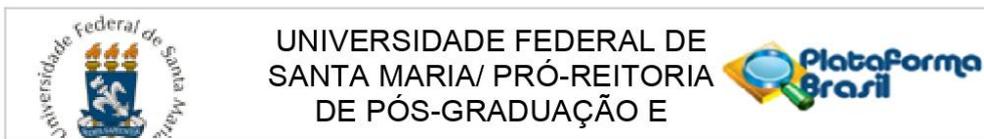
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar
Bairro: Camobi **CEP:** 97.105-970
UF: RS **Município:** SANTA MARIA
Telefone: (55)3220-9362 **E-mail:** cep.ufsm@gmail.com



Continuação do Parecer: 2.353.688

SANTA MARIA, 27 de Outubro de 2017

Assinado por:
CLAUDEMIR DE QUADROS
(Coordenador)

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar
Bairro: Camobi **CEP:** 97.105-970
UF: RS **Município:** SANTA MARIA
Telefone: (55)3220-9362 **E-mail:** cep.ufsm@gmail.com