UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Monitorização terapêutica da agomelatina, sertralina e venlafaxina

Bruna Cordeiro Santos de Moura

Ribeirão Preto

2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Monitorização terapêutica da agomelatina, sertralina e venlafaxina

Dissertação de Mestrado apresentado ao
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para
obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientada: Bruna Cordeiro Santos de Moura

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Regina Helena Costa
Queiroz

Ribeirão Preto

2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO EPESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

De Moura, Bruna Cordeiro Santos

Monitorização terapêutica da agomelatina, sertralina e venlafaxina.

Ribeirão Preto, 2014

70 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentado à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto / USP – Área de concentração: Toxicologia

Orientadora: Queiroz, Regina Helena Costa

1. Monitorização terapêutica. 2. Venlafaxina. 3. Sertralina.
4. Agomelatina. 5. HPLC.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Bruna Cordeiro Santos de Moura

Monitorização terapêutica da agomelatina, sertralina e venlafaxina

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia
para obtenção do Título de Mestre em Ciências
Área de Concentração: Toxicologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Regina Helena Costa
Queiroz

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A minha mãe, **Oneyde**, pela vida, carinho, incentivo, ensinamentos e educação, que sempre servirão como modelos de dedicação e trabalho

“A você, que me deu a vida e me ensinou a vivê-la com dignidade, não bastaria um obrigado. A você, que iluminou os caminhos obscuros com afeto e dedicação para que eu trilhasse sem medo e cheia de esperança, não bastaria um muito obrigado. A você, que se doou por inteira e renunciou aos seus sonhos, para que, muitas vezes, pudesse realizar os meus. Pela longa espera e compreensão durante minhas longas viagens, não bastaria um muitíssimo obrigado. A você, mãe por natureza, por opção e amor, não bastaria dizer, que não tenho palavras para agradecer tudo isso. Mas é o que me acontece agora, quando procuro arduamente uma forma verbal de exprimir uma emoção ímpar. Uma emoção que jamais seria traduzida por palavras.”

Amo você!

(Autor desconhecido)

AGRADECIMENTO

Agradeço a **Deus** pela vida, pelos momentos difíceis que nos ensinam e os alegres que nos revigoram.

À Prof^a Dr^a **Regina Helena Costa Queiroz**, minha orientadora, a quem devo a oportunidade de conclusão do meu Mestrado, por ter confiado no meu trabalho e aceitado me orientar. Agradeço por ser um exemplo de pessoa e orientadora, sempre gentil e comprometida, por me transmitir tantos ensinamentos. Pela sua competência, sabedoria e humildade.

À minha mãe **Oneyde**, que mesmo nas dificuldades encontradas nunca deixou de me amparar, quem me ensinou a sempre batalhar e correr atrás dos meus sonhos, a ela devo minha vida e tudo o que sou hoje.

Às minhas tias **Ozires** e **Onilce**, pelo carinho, incentivo e orientação. Eu não teria conseguido estar onde estou sem o apoio de vocês.

Aos meus irmãos **Mauricio** e **Caroline**, pela paciência, amizade, cumplicidade e por sempre estarem presentes na minha vida, me orientando e apoiando.

À minha amada avó **Ermelinda** (in memoriam), pelo seu amor incondicional e todos os ensinamentos.

Ao amigo **William Kleber da Silva** por estar sempre presente, pelos conselhos, pela sua paciência, amizade, companheirismo e pelo incentivo e apoio constantes.

Às funcionárias e amigas do laboratório de Análises Toxicológicas **Sonia Aparecida Carvalho Dreossi**, **Gilda Alves Carvalho Gatto** e **Maria Aparecida Buzeto** pela ajuda constante, competência e paciência. Não tenho palavras para expressar a minha gratidão.

Aos meus queridos amigos **Clévia Braz Josué** e **Cesar Arruda Meschiari** pela amizade, companheirismo e apoio tão fundamentais.

Aos **funcionários** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, em especial a Rose e Rosana pelo auxílio e pela amizade.

A todos os **professores** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto que de uma forma ou de outra contribuíram para o meu crescimento e aprendizado. Pelo carinho, amizade e respeito, minha eterna gratidão.

Aos **amigos** do laboratório de Análises Toxicológicas: Flávia Isaura Ferreira, Mateus Machado Bergamaschi, Greyce Kelly S. Alcantara e Leandro F. Pippa pela amizade e apoio em todos os momentos e pelas discussões científicas.

À **minha família** por torcer e sempre acreditar em mim.

A todos os amigos e colegas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, que faz parte de um sonho a ser realizado.

À FAPESP e a CAPES pela bolsa de estudos e auxílio financeiro ao projeto.

*"De tudo ficaram três coisas:
A certeza de que estamos sempre começando,
A certeza de que é preciso continuar
E a certeza de que seremos interrompidos
antes de terminar...
Façamos da interrupção um caminho novo
Da queda, um passo de dança
Do medo, uma escada
Do sonho, uma ponte
e da procura, um encontro!"*

*"Não fiquemos tristes porque tantos momentos bons e inesquecíveis ficaram para
trás, estejamos felizes por tê-los vivido..."*

(Fernando Sabino)

RESUMO

Moura, B. C. S. **Monitorização terapêutica da agomelatina, sertralina e venlafaxina.** 2014. 70 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Atualmente, a quantidade de pacientes que são diagnosticados com alguma forma de depressão, entre elas, o transtorno depressivo maior, aumenta consideravelmente, quer seja em razão de diagnósticos mais precisos ou pela própria epidemiologia da doença. Acresça-se o fato de que muitos pacientes, apesar da quantidade de tipos de antidepressivos atualmente disponíveis para a terapêutica, são refratários ao tratamento prescrito, em razão dos efeitos adversos apresentados ou ainda em razão de simplesmente não se observar melhora com a prescrição. Em razão disso, novos tratamentos farmacológicos são disponibilizados. Para auxiliar na máxima eficácia em sua utilização, esse trabalho propôs o desenvolvimento de metodologia analítica para a determinação simultânea de antidepressivos tricíclicos e não tricíclicos, a saber: moclobemida, venlafaxina, citalopram, agomelatina, duloxetine, amitriptilina e sertralina em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), para posteriormente ser aplicada na monitorização de pacientes depressivos. O método consistiu na extração líquido-líquido com recuperação entre 73% a 86%, exceto para a moclobemida (55%). A separação foi obtida usando uma coluna em fase reversa LiChrospher® 60 RP-select B em LichroCART 250mm x 4mm, 5 µm de diâmetro interno, Merck sob condições isocráticas com detecção em UV em 230 nm, com fase móvel composta por 35% de uma mistura de acetonitrila/metanol 55/5 v/v e 65% de tampão acetato 0,25M pH 4,4. As curvas padrão foram lineares em uma faixa de trabalho de 2,5-1000 ng/mL para moclobemida, 5-2000 ng/mL para venlafaxina, citalopram, agomelatina, duloxetine e amitriptilina, 10-2000 ng/mL para sertralina. A precisão intra e interensaios foi efetuada em 3 concentrações (50, 200 e 500 ng/mL). Os coeficientes de variação para a precisão intraensaio foram menores que 8,8% para todos os compostos e os coeficientes de variação para a precisão interensaios foram menores que 8,6%. Os limites de quantificação foram de 2,5 ng/mL para a moclobemida, 5 ng/mL para venlafaxina, citalopram, duloxetine, agomelatina, amitriptilina e 10 ng/mL para sertralina com a etidocaína como padrão interno. Não se observou qualquer interferência das drogas normalmente associadas com antidepressivos. O método desenvolvido foi aplicado na monitorização de 79 pacientes em tratamento prolongado com amitriptilina, sertralina e venlafaxina. Paralelamente, foram avaliadas as concentrações plasmáticas de pacientes voluntários sadios submetidos a tratamento em dose única com agomelatina. A monitorização terapêutica se faz necessária para monitorar adesão ao tratamento já que a depressão está entre as principais causas mundiais de morbidade por incapacitação social e estimativa de prevalência crescente até 2030; caracterizando-se como um dos maiores e mais onerosos problemas de saúde pública.

Palavras-chave: Monitorização terapêutica; venlafaxina; sertralina; agomelatina; amitriptilina, duloxetine, HPLC; detecção por UV.

ABSTRACT

Moura, B. C. S. **Therapeutic monitoring of agomelatine, sertraline and venlafaxine**. 2014. 70 p. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Currently, the number of patients who are diagnosed with some form of depression, among them, major depressive disorder, increases considerably, either because of more accurate diagnosis or by the epidemiology of the disease. One should add the fact that many patients, despite the amount of types of antidepressants currently available for therapy are refractory to the treatment prescribed, because of the adverse effects appear, or their toxic effects, or by simply not observed improvement then the prescription. Therefore, new pharmacological treatments are available. To assist in maximum effectiveness in its use, this paper presents a methodology on HPLC for simultaneous determination of seven antidepressants, tricyclic and non-tricyclic, moclobemide, venlafaxine, citalopram, agomelatine, duloxetine, amitriptyline and sertraline in human plasma, later to be applied in monitoring depressed patients. The simple and accurate method of sample preparation consists of the liquid-liquid extraction with recovery between 73% to 86% (except for moclobemide, 55%). Separation was achieved using a reverse phase column Lichrospher® 60 RP-select B LiChroCART 4mm x 250mm, 5µm internal diameter, Merck, under isocratic conditions, with UV detection at 230nm, with a mobile phase consisting of a mixture of 35% acetonitrile:methanol 55/5 (v/v) and 65% 0.25M acetate buffer, pH 4.4. The standard curves were linear in the working range of 2,5-1000 ng/mL for moclobemide, 5-2000 ng/mL to venlafaxine, citalopram, agomelatine, duloxetine and amitriptyline and 10-2000ng/mL to sertraline. The intra and interassay precisions were performed at three concentrations (50, 200 and 500 ng/mL). The coefficients of variation for intra-assay precision were less than 8.6% for all compounds and the coefficients of variation for interassay precision were lower than 8.5%. The limits of quantification were 2.5 ng/mL for moclobemide, 5 ng/mL for venlafaxine, citalopram, duloxetine, agomelatine, amitriptyline and 10 ng/mL for sertraline. No interference of drugs normally associated with antidepressants was observed. The developed method was applied to the monitoring of 79 patients receiving prolonged treatment with amitriptyline, sertraline and venlafaxine. And, the plasma concentrations of healthy volunteer patients undergoing single dose agomelatine were evaluated. Therapeutic drug monitoring, is to ensure maximum clinical efficacy coupled with minimal adverse effects in patients undergoing long-term therapy is needed and to monitor adherence to treatment since depression is among the major causes of morbidity and social disability increasing prevalence estimate of 2030; characterized as one of the largest and most costly public health problems

Keywords: Therapeutic monitoring; venlafaxine; sertraline; agomelatine; amitriptyline, Duloxetine, HPLC; UV detection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química da agomelatina: N-[2-(7-metoxi-1-naftil)-etil] acetamida.....	13
Figura 2	Estrutura química da sertralina: cis-(1S,4S)-4-(3,4-diclorofenil)-1,2,3,4-tetraidro-N-metil-1-naftaleno-aminocloridrato	15
Figura 3	Estrutura química da venlafaxina: 1-2 dimetilamino -1-4-metoxifeniletilcicloexano	16
Figura 4	Procedimento de extração e análise cromatográfica dos antidepressivos em plasma por HPLC	34
Figura 5	Cromatograma obtido do plasma branco (sem padrão interno)	35
Figura 6	Cromatograma obtido do plasma adicionado de 200ng/mL moclobemida, venlafaxina, etidocaína (padrão interno), citalopram, agomelatina, duloxetine, amitriptilina e sertralina.....	36
Figura 7	Cromatograma obtido do plasma adicionado de 200ng/mL etidocaína (padrão interno) e agomelatina.....	36
Figura 8	Cromatograma obtido do plasma adicionado de 200ng/mL etidocaína (padrão interno) e sertralina	37
Figura 9	Cromatograma obtido do plasma adicionado de 200ng/mL etidocaína (padrão interno) e venlafaxina.....	37
Figura 10	Estrutura química dos antidepressivos e do padrão interno	38
Figura 11	Relação dose versus concentração plasmática da Amitriptilina e da Nortriptilina.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Resultados obtidos na avaliação da especificidade do método de análise simultânea dos antidepressivos em amostras de plasma humano	40
Tabela 2	Resultados obtidos na avaliação de faixa de linearidade dos antidepressivos em amostras de plasma humano	41
Tabela 3	Resultados obtidos na avaliação de limite de quantificação dos antidepressivos em amostras de plasma humano	42
Tabela 4	Resultados obtidos na avaliação de coeficientes de variação de interensaio, intraensaio e erros padrão relativos dos antidepressivos em amostras de plasma humano	43
Tabela 5	Resultados obtidos na avaliação de recuperação dos antidepressivos em amostras de plasma humano	44
Tabela 6	Concentrações plasmáticas de amitriptilina em pacientes submetidos ao tratamento com Amitryl [®]	48
Tabela 7	Concentrações plasmáticas de sertralina em pacientes submetidos ao tratamento com Cloridrato de Sertralina	49
Tabela 8	Concentrações plasmáticas de Venlafaxina em pacientes submetidos ao tratamento com Cloridrato de Venlafaxina [®]	50
Tabela 9	Concentrações plasmáticas de venlafaxina em uma paciente submetido ao tratamento com Cloridrato de Venlafaxina, na dose de 150 mg/dia	51
Tabela 10	Concentrações plasmáticas colhidas no pico (2h) de Agomelatina em voluntários sadios submetidos ao medicamento Valdoxan [®]	53
Tabela 11	Análise de variância (ANOVA) dos parâmetros bioquímicos realizados em pacientes submetidos a Amitriptilina, Venlafaxina e Sertralina	53
Tabela 12	Análise de Variância (ANOVA) dos parâmetros bioquímicos em pacientes sob terapia com Moclobemida	54
Tabela 13	Análise de Variância (ANOVA) dos parâmetros bioquímicos em pacientes sob terapia com Sertralina	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
OMS	Organização Mundial de Saúde
TDM	Transtorno depressivo Maior
ADT	Antidepressivo tricíclico
DMS-IV	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
CID-10	Classificação Internacional das doenças e problemas relacionados à saúde
NE	Norepinefrina
5-HT	Serotonina
DA	Dopamina
ACh	Acetilcolina
IMAO	Inibidores da monoaminoxidase

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	v
1 INTRODUÇÃO	2
1.1 Classificação da depressão	3
1.2 Base biológica da depressão	4
1.3 Fármacos para o tratamento da depressão	6
1.4 Monitorização Terapêutica, Métodos de Extração e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	10
1.5 Fármacos.....	13
1.6 Revisão bibliográfica.....	17
2 OBJETIVOS	21
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS	23
3.1 Caracterização do Local de Estudo	23
3.2 Obtenção do <i>pool</i> de plasma.....	23
3.3 Triagem dos Pacientes	23
3.4 Metodologia Analítica	24
3.4.1 Padrões e Reagentes	24
3.4.2 Sistema Cromatográfico	25
3.4.3 Preparo das Amostras	25
3.4.4 Extração das Amostras	25
3.4.5 Curva de Calibração	26
3.5 Validação da Metodologia Analítica	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 Análise de agomelatina, sertralina e venlafaxina em plasma humano por HPLC-UV.....	35
4.2 Padronização e validação do método para análise de agomelatina, sertralina e venlafaxina e demais antidepressivos em plasma humano por HPLC-UV	39

4.3 Monitorização terapêutica	45
4.3.1 Fatores que modificaram o efeito dos fármacos na monitorização terapêutica.....	45
4.3.2 Monitorização terapêutica dos antidepressivos em pacientes deprimidos	47
4.3.3 Alterações hepáticas e renais.....	52
 5 CONCLUSÃO.....	56
 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	58
 ANEXOS	67

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A depressão não deixa marcas aparentes, não pode ser diagnosticada por exames de imagem e, se for confundida com uma tristeza normal, os sintomas podem passar despercebidos. É a quarta principal causa de incapacitação em todo o mundo, e de acordo com projeções da Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2030 ela será o mal mais prevalente do planeta, à frente do câncer e de algumas doenças infecciosas. Segundo a Organização Mundial de Saúde a depressão está entre as 10 principais causas mundiais de anos de vida perdidos por incapacidade (Disability-Adjusted Life Years - DALY'S).

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) indicam que 13-20% da população mundial apresentam sintomas depressivos, sendo mais prevalente entre mulheres com idade entre 15 e 29 anos e menos prevalente nos indivíduos com idade de 50 ou mais anos, sendo 2-3% desse total atribuídos a indivíduos com transtornos afetivos graves, dos quais 15-30% cometem suicídio ou são potenciais suicidas. Mesmo sob tratamento médico, 30% dos pacientes com diagnóstico depressivo não respondem à terapia farmacológica, devido ao tempo de latência associado ao surgimento do efeito terapêutico e, ainda, aos seus efeitos adversos, os quais contribuem para o abandono da terapia (Rates, 2001).

É altamente incapacitante e interfere de modo decisivo e intenso na vida pessoal, profissional, social e econômica dos portadores. Estudos demonstram que essa doença pode contribuir para o agravamento do prognóstico clínico de várias outras enfermidades, devido desregulação imunológica, podendo diretamente aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias, que interferem em condições como: câncer, diabetes, cardiopatias, AIDS, artrite, doenças periodontais, podendo ainda diminuir a resposta imune celular prolongando processos infecciosos (OPAS/OMS; Hashemi SN, *et al*, 2012).

A depressão, considerada um dos transtornos psiquiátricos mais comuns, é diferente de oscilações de humor habituais e respostas emocionais de curta duração para os desafios da vida cotidiana. Apresenta sintomatologia sutil e início relativamente precoce. Sua causa está atribuída a múltiplos fatores, tais como os sociais, psicológicos e hereditários, apresentando grande vulnerabilidade genética, sendo precipitada ou agravada por eventos negativos da vida. Pode variar de uma afecção muito leve, beirando a normalidade, à depressão grave (psicótica), acompanhada por alucinações e delírios. (Berton & Nestler, 2006; Rang & Dale, 2008).

O surgimento do primeiro episódio depressivo ocorre em média por volta dos 25 anos de idade, não obstante a incidência de diagnósticos de depressão pareça estar aumentando de

forma significativa entre crianças e adolescentes. As mulheres apresentam uma incidência duas vezes maior que a dos homens, sendo que o período pós-parto com relativa frequência está associado ao desencadeamento do primeiro episódio, e os quadros mais severos nessa fase podem levar a um maior prejuízo cognitivo. As diferenças entre os gêneros, no que diz respeito à incidência de depressão, começam a emergir entre os 10 e os 15 anos de idade, tornando-se mais evidentes entre os 15 e os 18 anos (Hashemi SN, *et al*, 2012; OMS, 2013).

1.1 Classificação da depressão

Na literatura, encontram-se descritos os seguintes tipos de depressão: transtorno depressivo maior, distímia, depressão integrante do transtorno bipolar I e II e depressão, como parte da ciclotímia. Os tipos mais comuns são o transtorno depressivo maior e o transtorno bipolar (Lafer B, *et al*, 2000; Meredith LS, 2004).

Com base no DSM-IV e CID-10, os sintomas clínicos da depressão são:

- humor depressivo;
- tristeza;
- perda de interesse ou prazer;
- perda ou ganho de peso significativo;
- insônia (no início, na metade ou no final do sono) ou hipersonia;
- agitação ou retardo psicomotor;
- fadiga ou perda de energia;
- sentimento de inutilidade ou culpa excessiva ou inadequada;
- indecisão ou capacidade diminuída de pensar ou concentrar-se;
- pensamentos de morte recorrentes.

O DSM-IV define ainda que a depressão maior requer:

a) pelo menos duas semanas de humor deprimido ou a perda de interesse ou prazer em quase todas as atividades;

b) acompanhado de pelo menos quatro sintomas adicionais de depressão a partir de uma lista que inclui alterações em apetite, peso, sono (insônia ou hipersonia) ou atividade psicomotora (retardo ou agitação observados); energia diminuída; sentimentos de inutilidade ou culpa inadequada; dificuldade de pensar, concentrar-se ou de tomar decisões; ou pensamentos recorrentes de morte, planos ou tentativas suicidas) tais sintomas ter surgido recentemente ou ter piorado claramente em comparação ao estado prévio ao episódio anterior;

d) os sintomas devem persistir durante a maior parte do dia, em quase todos os dias, por pelo menos duas semanas consecutivas;

e) causar sofrimento ou prejuízo clinicamente principalmente nas áreas social e ocupacional.

f) além disso, os sintomas não devem ser causados por perdas significativas, tais como morte ou separações conjugais, abuso de substâncias psicoativas ou por uma condição clínica.

Em essência, a depressão maior requer a presença de um novo episódio depressivo pelo menos por duas semanas, e que um número mínimo dos sintomas prescritos persistam durante o dia e causem prejuízo. Difere do luto (perda por morte ou abandono) e infere-se que é uma condição primária - ou seja, não é secundária ao abuso de substâncias ou a uma condição clínica, mas não há qualquer afirmação sobre o fato de ser primária ou secundária a condições psiquiátricas (e.g. ansiedade) ou a problemas psicossociais (e.g. transtorno de personalidade). A depressão maior é subdividida em múltiplos subgrupos – alguns ponderados do ponto de vista categorial (e.g. psicótica, melancólica, catatônica), alguns etiologicamente (e.g. pós-parto, sazonais, atípicas) e alguns de forma dimensional (envolvendo gravidade, cronicidade e persistência). Há somente outra condição principal depressiva segundo o DSM-IV - a distímia, colocada como menos grave, mas com maior duração do que a depressão maior, ao passo que há vários transtornos secundários (Parker & Brotchie, 2009).

O transtorno depressivo maior (TDM) é considerado uma das mais prevalentes e graves doenças entre todas as enfermidades médicas. Essa afirmativa se justifica porque o TDM se apresenta com episódios de longa duração e altas taxas de cronicidade e de recorrência, levando a perdas profissionais, prejuízo físico e psíquico, além de considerável morbidade e mortalidade por suicídio ou por associação com outras doenças. A prevalência descrita para toda a vida do TDM é de 16%. Em atendimento primário, estudos indicam a prevalência de 4,8 a 13% de pacientes com sintomas depressivos, sendo que somente a metade destes é identificada, e menos de 25% recebem tratamento minimamente adequado (Lima IVM, *et al*, 2004; Meredith LS, 2004; Mann JJ, 2005).

1.2 Base biológica da depressão

A causa específica da depressão ainda não é conhecida, entretanto, há achados sugerindo que a doença possui fisiopatologia multifatorial. As principais teorias relativas à base biológica da depressão situam-se nos estudos sobre neurotransmissores cerebrais e seus receptores, embora outras áreas também estejam sob investigação. As monoaminas constituem-se na principal hipótese envolvendo os neurotransmissores cerebrais (Saint-Clair B, 1999).

Os sistemas monoaminérgicos se originam em pequenos núcleos no tronco cerebral e mesencéfalo e projetam-se difusamente pelo córtex e sistema límbico. Esses sistemas são compostos por neurônios que contêm norepinefrina (NE), serotonina (5-HT) e dopamina (DA). Junto com a acetilcolina (ACh), eles exercem efeitos de modulação e integração sobre outras atividades corticais e sub-corticais e estão envolvidos na regulação da atividade psicomotora, apetite, sono e do humor (Lafer & Vallada-Filho, 1999).

A hipótese das monoaminas baseia-se no conceito da deficiência das aminas biogênicas, particularmente NE, 5HT e DA, como a causa das depressões. A primeira hipótese aminérgica de Schildraut (1965) e Bunney e Davis (1965) foi denominada hipótese catecolaminérgica, pois propunha que a depressão se associava a um *déficit* das catecolaminas, principalmente a NE. Posteriormente, surgiram a hipótese serotoninérgica, de Van Praag e Korf (1971), que teve grande impulso com o desenvolvimento da classe de antidepressivos chamados inibidores seletivos de recaptação da serotonina (ISRS) e a hipótese dopaminérgica de Wilner (1990), devido à implicação da DA nos fenômenos de recompensa cerebral, estando envolvida na fisiopatologia da anedonia, e de estudos demonstrando que o uso continuado de antidepressivos tricíclicos (ADT) aumenta a resposta comportamental à DA injetada no núcleo acumbens, que age como interface entre o sistema motor e o sistema límbico. Tal hipótese derivou inicialmente da compreensão advinda do conhecimento sobre o mecanismo de ação dos primeiros antidepressivos: tricíclicos e inibidores da monoaminoxidase (IMAO) que aumentam as concentrações das monoaminas nas fendas sinápticas cerebrais (Graeff & Brandão, 1993; Leonard BE, 1997; Stahl SM, 1998).

A reforçar a hipótese das monoaminas, houve outras evidências: a) drogas, como a reserpina, que depletam esses neurotransmissores são capazes de induzir depressão; b) precursores da 5HT: L-triptofano e 5-hidroxi-triptofano apresentam efeito antidepressivo leve; c) vários estudos relataram anormalidades nos metabólitos das aminas biogênicas, como o ácido 5-hidroxindol acético, o ácido homovanílico e 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol no sangue, urina e líquor de pacientes deprimidos; d) a redução da concentração de 5-HT e seu principal metabólito 5HIAA ocorre no cérebro de vítimas de suicídio, alcançado de maneira violenta, e no líquor de pacientes deprimidos; e) a privação aguda de triptofano causa recidiva em 80% dos pacientes deprimidos tratados com sucesso com os antidepressivos da classe dos ISRS (Graeff & Brandão, 1993; Kaplan & Sadock, 1997).

Apesar da relevância da hipótese das monoaminas na investigação da depressão, existe certa resistência para sua plena aceitação, devido ao fato de que todos os medicamentos antidepressivos aumentam, de imediato, as monoaminas em nível das fendas sinápticas,

porém seu efeito clínico só ocorre algumas semanas depois. E outras substâncias, como por exemplo a cocaína, também elevam os níveis das monoaminas, mas não apresentam efeito antidepressivo. Do mesmo modo, nenhuma alteração nos índices de DA ou NE no líquido parece caracterizar pacientes deprimidos como um todo, e o nível reduzido de 5HIAA está mais relacionado a problemas de controle do impulso do que à depressão (Rang & Dale, 2008).

O conhecimento atual da complexa inter-relação entre os sistemas neurotransmissores cerebrais restringiu as hipóteses de déficits de neurotransmissores nas fendas sinápticas a concepções simplistas e uma de suas consequências foi o deslocamento do foco das hipóteses biológicas da depressão para os receptores dos neurotransmissores (Saint-Clair B, 1999)

1.3 Fármacos para o tratamento da depressão

A monitorização terapêutica de antidepressivos é necessária para uma supervisão individualizada de pacientes em sua terapia medicamentosa evitando complicações médicas, intoxicação, comprometimento na eficácia do medicamento ou anuência do paciente a terapia. Farmacologicamente o tratamento para depressão avançou significativamente desde o desenvolvimento da primeira terapia em 1950, com a introdução dos inibidores da monoaminoxidase e antidepressivos tricíclicos (Baumann P, *et al*, 2005).

O tratamento da depressão deve ser compreendido de uma forma globalizada levando em consideração o ser humano como um todo, portanto, a terapia deve abranger psicoterapia, mudanças no estilo de vida e a terapia farmacológica (Aguilar CC, *et al*, 2011).

Outro fator importante no tratamento da depressão é a compreensão da farmacocinética das substâncias. O sistema citocromo P450 é o principal responsável pelos mecanismos envolvidos nessas interações. As interações medicamentosas potenciais resultantes dos efeitos inibitórios dos antidepressivos sobre enzimas do sistema citocromo P450 podem ter repercussões clínicas significativas. Por exemplo, a interação de IRSS com a warfarina através da enzima CYP2C9, pode resultar no aumento da concentração sérica de warfarina, associando-se a sangramento. Outra possibilidade é a diminuição do efeito terapêutico pela inibição da metabolização essencial para a ativação da substância (Goodman & Gilman, 2007).

A farmacoterapia, atualmente disponível para o tratamento médico dos distúrbios de depressão, inclui antidepressivos de primeira geração (antidepressivos tricíclicos e inibidores da monoaminoxidase) e os antidepressivos de segunda geração, que incluem os inibidores seletivos de recaptção de serotonina (SSRIs: citalopram, escitalopram, fluoxetina,

fluvoxamina, paroxetina e sertralina), os inibidores seletivos da recaptação de serotonina e norepinefrina (SSNRIs: duloxetina), os inibidores de recaptação de serotonina e norepinefrina (SNRIs: desvenlafaxina, mirtazapina, venlafaxina) e outros antidepressivos de segunda geração (bupropiona, nefazodona e trazodona) (Gartlehner G, *et al*, 2011).

Geralmente a eficácia dos antidepressivos de primeira ou segunda geração é similar. No entanto, os antidepressivos de primeira geração frequentemente produzem vários efeitos adversos que muitos pacientes consideram-nos intoleráveis, e o risco cardiovascular é altamente significativo na intoxicação aguda. Em razão de seus efeitos adversos relativamente brandos, os antidepressivos de segunda geração desempenham um papel proeminente no tratamento de pacientes com MDD (Gartlehner G, *et al*, 2011).

Com a descoberta das drogas antidepressivas, consistente evidência tem sido obtida acerca da efetividade do tratamento farmacológico nas depressões. Os medicamentos antidepressivos têm reduzido a morbidade e melhorado o desfecho clínico de milhares de casos de depressão em todo o mundo (Lima IVM, *et al*, 2004)

- ***Inibidores de Monoaminoxidase (IMAOs)***

A primeira classe antidepressiva descoberta foi a dos inibidores da monoaminoxidase (IMAOs), em 1956, sendo a Iproniazida, o primeiro IMAO, originalmente usada para tratar tuberculose. Mas foram superados pelos tricíclicos e outros tipos de antidepressivos, cujas eficácias clínicas foram consideradas melhores e cujos efeitos adversos, em geral, são menores do que os dos IMAOs. Os principais exemplos são fenelzina, tranilcipromina e iproniazida (Rang & Dale, 2008).

Seu mecanismo de ação constitui-se no bloqueio da enzima de monoaminoxidase (MAO), responsável pela destruição do neurotransmissor dentro do neurônio, como consequência disponibilizando mais na fenda sináptica (Goodman & Gilman, 2007; Aguiar CC, *et al*, 2011).

- ***Antidepressivos Tricíclicos (ADTs)***

Os antidepressivos tricíclicos (ADT) têm este nome resultado de sua estrutura que contém três anéis, sua síntese inicialmente foi relacionada a ação antipsicótica devido a clorpromazina (primeiro antipsicótico descoberto, 1952) ter também a estrutura química tricíclica. Contudo, a imipramina (primeira substância sintetizada desta classe) não

demonstrou ação antipsicótica, mas antidepressiva. A partir destes dados novas substâncias foram sendo descobertas (clomipramina, amitriptilina, nortriptilina etc) (Aguiar CC, *et al*, 2011). Os antidepressivos tricíclicos ainda são amplamente usados. Contudo, longe do ideal na prática, levou a introdução de inibidores de recaptura de 5-HT mais modernos e outros antidepressivos (Goodman & Gilman, 2007; Rang & Dale, 2008).

O principal efeito imediato dos ADTs é bloquear a recaptura das aminas pelas terminações nervosas por competição pelo sítio de ligação do transporte de aminas. A síntese de aminas, o armazenamento nas vesículas sinápticas e a liberação não são afetados diretamente, embora alguns ADTs pareçam aumentar indiretamente a liberação de transmissor por bloqueio dos receptores adrenérgicos α_2 pré-sinápticos. A maioria dos ADTs inibe a recaptura de noradrenalina e de 5-HT pelos sinaptossomos cerebrais em grau semelhante, mas tem muito menos efeito sobre a recaptura de dopamina. Além de seus efeitos sobre a recaptura de aminas, a maioria dos ADTs afeta um ou mais tipos de receptor de neurotransmissor, incluindo os receptores colinérgicos muscarínicos, os receptores de histamina e os receptores de 5-HT. Os efeitos antimuscarínicos dos ADTs não contribuem para seus efeitos antidepressivos, mas são responsáveis por vários efeitos adversos (Baldessarini RJ, 2006; Goodman & Gilman, 2007; Rang & Dale, 2008).

Os antidepressivos tricíclicos são preocupantes em superdosagem, comumente usados em tentativas de suicídio, o que foi um fator importante que levou à introdução de antidepressivos mais seguros. Os principais efeitos são sobre o sistema nervoso central e o coração. O efeito principal da superdosagem de ADTs é causar excitação e delírio, que podem ser acompanhados por convulsões. Isso é seguido por coma e depressão respiratória, durando alguns dias (Scalco MZ, 2002; Rang & Dale, 2008).

- ***Inibidores Seletivos de Recaptação de Serotonina (ISRS)***

Os fármacos desse tipo (muitas vezes denominados Inibidores Seletivos da Recaptação da Serotonina ou ISRSs) incluem a fluoxetina, fluvoxamina, paroxetina, citalopram e sertralina. Sendo a fluoxetina o primeiro ISRS a ser descoberto em 1988. É o grupo de antidepressivos mais comumente prescritos (Goodman & Gilman, 2007; Muneoka K, *et al*, 2009; Aguiar CC, *et al*, 2011).

Desenvolvidos a partir dos ADTs, os ISRS foram assim classificados por mostrar seletividade com respeito à recaptação da 5-HT em relação à noradrenalina (norepinefrina), têm menos probabilidade que os ADTs de causar efeitos adversos anticolinérgicos e mais

seguros em superdosagem. São tão eficazes quanto os ADTs e IMAOs para tratar depressão de grau moderado, mas provavelmente menos eficazes que os ADTs para tratar depressão intensa. Também são usados para tratar um tipo particular de transtorno de ansiedade conhecido como transtorno obsessivo-compulsivo (Rang & Dale, 2008; Aguiar CC, *et al*, 2011).

- ***Bloqueadores de Noradrenalina e Dopamina***

A bupropiona é um inibidor, relativamente seletivo, da recaptação de noradrenalina e dopamina, com mínimo efeito na recaptação de serotonina. Possui pouco efeito anticolinérgico ou anti-histamínico (Wilkes S, 2006). Diferentemente dos IRSS, não está associada a disfunção sexual. Nas formulações de liberação imediata foi associado com quadros convulsivos, principalmente em altas dosagens. Sendo contra indicado em doentes com epilepsia e recentemente vem sendo utilizado na compulsão alimentar apesar de dados contraditórios apresentados na literatura (Stahl SM, 2000; Aguiar CC, *et al*, 2011).

- ***Inibidores de Serotonina e Noradrenalina (IRSN)***

A Venlafaxina e a Duloxetina inibem o mecanismo da bomba de recaptação da noradrenalina, dopamina (fracamente) e serotonina. Sua afinidade pelo receptor noradrenérgico é dose dependente. Teoricamente não possui ação no sistema colinérgico, histamínico e no bloqueio dos receptores alfa-1- adrenérgicos, contudo apresenta efeitos adversos característicos de ação anticolinérgica, como constipação e boca seca. A Duloxetina, além da ação antidepressiva também estaria relacionada a melhora de sintomas dolorosos em pacientes portadores de neuropatia diabética (Muneoka K, *et al*, 2009; Goodman & Gilman, 2007; Aguiar CC, *et al*, 2011).

- ***Inibidores /Antagonistas da Serotonina-2 (IRAS)***

A trazodona possui uma fraca ação inibitória da recaptação de serotonina. O seu efeito antidepressivo seria decorrente do antagonismo sobre receptores 5-HT₂, como a nefazodona. A trazodona produz bloqueio alfa-1- adrenérgico e histaminérgico. Uma preocupação com o seu uso é o aparecimento de priapismo, possivelmente em decorrência do bloqueio alfa-1- adrenérgico central. (Kraus RL, *et al*, 2007; Goodman & Gilman, 2007).

A Mirtazapina produz antagonismo dos auto receptores e dos heteroreceptores alfa-2-adrenérgicos e nenhum efeito na recaptção de monoaminas. Devido a esse mecanismo (a noradrenalina interrompe a liberação de serotonina e noradrenalina pela sua interação com os heteroreceptores e auto receptores alfa-2-adrenérgicos, respectivamente) aumenta a transmissão noradrenérgica e serotoninérgica. Ela também bloqueia receptores serotoninérgicos e histamínicos. Sua eficácia é comparável à dos ADT em populações gerais (Lavergne F, *et al*, 2005; Aguiar CC, *et al*, 2011).

- ***Inibidor Seletivo da Noradrenalina (ISRN)***

A Reboxetina é um inibidor altamente seletivo e potente da recaptção da noradrenalina, portanto, pode ser classificado como ISRN. Sua eficácia antidepressiva foi comparada com outros antidepressivos: imipramina, desipramina e fluoxetina. Também pertence a essa classe a Maprotilina (Scates & Doraiswamy, 2000; Rang & Dale, 2008; Aguiar CC, *et al*, 2011).

1.4 Monitorização Terapêutica, Métodos de Extração e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

As áreas nas quais há interesse em análises de compostos encontrados em fluidos biológicos são muitas: ambiental, farmacêutica, análises clínicas, medicina legal etc.

A análise cromatográfica de substâncias presentes nestes tipos de matrizes (soro, plasma, urina etc), em geral, requer um pré-tratamento da amostra. A finalidade é a obtenção de um extrato concentrado, porém sem a interferência da matriz biológica, obtendo-se a separação cromatográfica livre de interferentes, com detecção adequada e um tempo razoável de análise. As técnicas mais comumente utilizadas para extração e/ou pré-concentração de compostos presentes em fluidos biológicos são: extração líquido-líquido, extração em fase sólida, extração com fluido supercrítico e extração com membranas sólidas (diálise e ultrafiltração) ou líquidas. Após a extração, a amostra é introduzida no sistema cromatográfico por meio de um injetor (Queiroz SCN, *et al*, 2001).

No presente trabalho utilizamos a técnica de extração em fase líquida, na qual ocorre a partição da amostra entre duas fases imiscíveis (orgânica e aquosa). A eficiência da extração depende da afinidade do soluto pelo solvente de extração, da razão das fases e do número de extrações.

Segundo Queiroz, SCN (2001), a extração líquido-líquido (ELL) apresenta as vantagens de ser simples e poder utilizar um número grande de solventes, puros e disponíveis comercialmente, os quais fornecem uma ampla faixa de solubilidade e seletividade. Além disso, as proteínas presentes nas amostras são desnaturadas, eliminando a contaminação da coluna cromatográfica. Por outro lado, esta técnica possui uma série de desvantagens, tais como: as amostras com alta afinidade pela água são parcialmente extraídas pelo solvente orgânico, resultando em perda do analito; pode ocorrer a formação de emulsões, o que resulta em grande consumo de tempo; volumes relativamente grandes de amostras e de solventes são requeridos, gerando problemas de descartes; alguns solventes orgânicos são tóxicos; pode ocorrer adsorção dos analitos na vidraria; decomposição de compostos instáveis termicamente, na etapa de pré-concentração; o processo é suscetível a erros e, relativamente, de difícil automação.

Apesar destas desvantagens, a ELL é considerada uma técnica clássica de preparação de amostra e tem sido ainda muito utilizada em análises de diversos tipos de substâncias presentes em fluidos biológicos, pois extratos bastante limpos podem ser obtidos com alta seletividade para alguns analitos.

A aplicação da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para quantificação de antidepressivos foi relatada inicialmente em 1975. As vantagens da HPLC para a análise de antidepressivos são sua versatilidade e simplicidade de preparação de amostras, assim como um amplo intervalo de linearidade nos detectores, fazendo da HPLC o método de escolha para a monitorização terapêutica de fármacos. A determinação de um ou mais fármacos dessa classe tem sido descrita usando HPLC com detector de fluorescência e ultravioleta (Malfará WR, *et al*, 2007).

Em razão de as drogas antidepressivas tricíclicas diferirem largamente em sua estrutura química, métodos analíticos para sua determinação quantitativa em matrizes biológicas tem sido desenvolvido para cada droga individualmente. Outros métodos foram relatados permitindo a determinação simultânea de drogas antidepressivas tricíclicas e não-tricíclicas. Mais recentemente métodos de triagem ou quantificação de antidepressivos têm sido descritos, mas muitos desses métodos usam métodos de extração de fase sólida ou detecção UV por arranjo de fotodiodos ou cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (LC/MS) com ionização por spray de elétrons ou LC-MS (MS). Esses métodos fornecem uma alta seletividade e sensibilidade em combinação com uma boa precisão e exatidão em amplos intervalos de detecção, permitindo o desenvolvimento de métodos de análise muito rápidos e eficientes. Por isso, esses ensaios podem ser caros e não largamente

empregados. A tendência recente em monitorização terapêutica procura desenvolver métodos de análise rápidos, simples, precisos, exatos e de baixo custo para a determinação de vários fármacos simultaneamente. (Malfará WR, *et al*, 2007).

A monitorização terapêutica dos fármacos consiste num instrumento válido para otimizar a farmacoterapia na área da psiquiatria. No entanto, apesar das vantagens que se associam a monitorização terapêutica, o seu uso na prática clínica está longe de ser considerado ótimo. São diversificadas as indicações para a aplicação de monitorização terapêutica, incluindo: início de tratamento, alterações de dose, ocorrência de efeitos adversos indesejáveis, ausência de efeito terapêutico, controle da compliance, interações farmacocinéticas, programas de farmacovigilância, tratamentos combinados (polimedicação), particularidades genéticas envolvidas no metabolismo dos fármacos, tratamentos profiláticos, populações especiais, como as crianças e idosos e psiquiatria forense (Neto AIA, 2011).

Até ao momento, entre as diversas classes de antidepressivos, o uso da monitorização terapêutica tem sido estabelecido de forma particularmente bem sucedida para os ADTs, uma vez que, respondem aos requisitos necessários para que seja exequível a sua monitorização: índice terapêutico estreito e relações de concentração plasmática; respostas terapêuticas previamente determinadas. No entanto, na realidade, as concentrações plasmáticas, ideais podem diferir amplamente dos intervalos estabelecidos, dependendo das características clínicas de cada paciente. É por isso, estritamente necessário, que haja a contextualização da situação para se optar de forma consciente por uma estratégia terapêutica adequada. Ao contrário dos TCA, os ISRSs não se encaixam no perfil de fármacos que requerem monitorização terapêutica para a sua utilização segura e eficaz. Isto se deve, principalmente, à sua ampla janela terapêutica e à sua apresentação gráfica dose-resposta antidepressiva que atinge, a partir de uma certa concentração, o “steady-state”, querendo com isto dizer que o aumento das doses não é acompanhado com o aumento da resposta. No entanto, nos tratamentos em que não haja resposta, a monitorização terapêutica pode ajudar na adequação do ajuste de dosagem, e corrigir possíveis variações farmacocinéticas, inerentes ao paciente, dando subsídios ao clínico a uma terapêutica mais segura e eficaz. A monitorização terapêutica também é uma ferramenta analítica muito importante na avaliação do “compliance” ou anuência do paciente a terapia. Apesar do índice terapêutico amplo, característica de muitos dos antidepressivos recentemente introduzidos no mercado, as aplicações potenciais da TDM à farmacoterapia antidepressiva são significativas (Neto AIA, 2011).

1.5 Fármacos

- **Agomelatina**

As duas características mais relevantes da agomelatina é que seu efeito antidepressivo se produz por atuar como um agonista dos receptores da melatonina MT1 e MT2, ao mesmo que se comporta como antagonista dos receptores serotoninérgicos 5-HT2C. Por outro, não tem afinidade por receptores adrenérgicos, dopaminérgicos, muscarínicos ou histaminérgicos, resultando em uma incidência muito baixa de efeitos adversos. Esses aspectos conferem a agomelatina um perfil diferente dos demais antidepressivos presentes em nosso arsenal terapêutico (Millan MJ, *et al*, 2005; Álamo C, *et al*, 2008; Bodinat C, *et al*, 2010; Patil SR, *et al*, 2011)

A agomelatina é um composto naftalênico denominado N-[2-(7-metoxi-1-naftil)-etil] acetamida (C₁₅H₁₇NO₂) (Figura 1), com um peso molecular de 243,30, praticamente insolúvel em água, selecionado entre mais de 2000 ligantes melatoninérgicos para conseguir um agonista com alta afinidade pelos receptores da melatonina (Gardiola-Lemaitre B, 2005).

Figura 1 - Estrutura química da agomelatina: N-[2-(7-metoxi-1-naftil)-etil] acetamida.

A estrutura química da agomelatina é muito parecida a da melatonina, sendo que a melatonina possui um grupo NH e a agomelatina possui um grupo HC = CH (Patil SR, *et al*, 2011).

Na verdade, a característica diferencial mais importante da agomelatina, em comparação aos outros antidepressivos, é sua capacidade de se fixar sobre os receptores melatoninérgicos (MT1 e MT2), com uma afinidade similar à que exibe a melatonina, comportando-se como sua agonista e, portanto, mimetizando as ações da melatonina sobre esses receptores. Além disso, a agomelatina tem afinidade pelos receptores 5HT2C que, desta forma, intervêm no controle dos ritmos circadianos no núcleo supra-quiasmático e atua nesses

mesmos receptores de forma específica no córtex frontal, e com ele produz a liberação da dopamina e noradrenalina sem variar as concentrações de serotonina na fenda sináptica (Millan MJ, *et al*, 2003; Millan MJ, *et al*, 2005).

A agomelatina, administrada por via oral, é absorvida no trato gastrintestinal, a máxima concentração plasmática (C_{máx}) é atingida rapidamente, entre uma e duas horas após a administração. A absorção é superior a 78% e sua distribuição é preferencialmente plasmática; 95% se encontram unida a proteínas plasmáticas (albumina, 35%; alfa -1-glicoproteína ácida, 36%) (Zupancic & Guilleminault, 2006; Patil SR, *et al*, 2011). Este fármaco é metabolizado no fígado e seus metabolitos são eliminados pela urina. No fígado, a agomelatina dispõe de vias metabólicas controladas pelas isoenzimas CYP1A1, CYP1A2 e CYP2C9 (Pandi-Perumal SR, *et al*, 2006; Zupancic & Guilleminault, 2006).

A agomelatina representa uma abordagem inovadora para o tratamento da depressão, uma vez que é o primeiro agente regulatório aprovado capaz de incorporar um mecanismo não-monoaminérgico. A sua atividade antidepressiva através de uma vasta gama de procedimentos experimentais em modelos animais e os respectivos perfis terapêuticos em humanos provavelmente refletem uma interação sinérgica de suas propriedades melatoninérgicas (agonista) e 5-HT_{2C} (antagonista). Extensos ensaios clínicos têm estabelecido tanto a eficácia a curto prazo e de longo prazo da agomelatina em pacientes com depressão maior, com uma melhoria da qualidade do sono, a preservação da função sexual, falta de ganho de peso e boa tolerabilidade. Por outro lado, a interrupção não está associado com os sintomas de abstinência. Este perfil geral compara favoravelmente em relação aos antidepressivos disponíveis atualmente e devem encorajar a adesão em todo o período extenso de tratamento, seis meses ou mais, recomendado para a melhoria duradoura de um episódio depressivo maior. Existe também um rico potencial, como destacado acima, para a exploração do uso mais amplo da agomelatina no tratamento de outros distúrbios do sistema nervoso (Bodinat C, *et al*, 2010).

Reações Adversas da Agomelatina - Hepatotoxicidade

Segundo o Comitê para Produtos Medicinais para Uso Humano (CHMP, 2008), os estudos de toxicidade de dose única para agomelatina indicaram uma toxicidade aguda relativamente baixa, com efeitos sedativos relacionados com a dose. Os estudos de toxicidade de dose repetida mostraram que o fígado foi o órgão visado. Nos roedores, observou-se uma indução marcada do CYP 2B e uma indução moderada do CYP 1A e do CYP 3A ao passo

que, nos macacos, a indução foi ligeira em termos do CYP 2B e 3A. Não se observou hepatotoxicidade nos estudos de toxicidade de dose repetida em roedores e macacos. Os estudos de reprodução no rato e no coelho mostraram a inexistência de efeito da agomelatina na fertilidade, desenvolvimento embriofetal e desenvolvimento pré- e pós-natal. Uma bateria de testes padrão da genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* constatou a inexistência de potencial mutagênico ou clastogênico da agomelatina. Num estudo de 4 semanas de pós-marcação com ^{32}P em ratos, observou-se a formação de adutos de DNA com níveis de exposição inferiores à exposição terapêutica humana com 50 mg/dia. Em estudos de carcinogenicidade, a agomelatina induziu um aumento da incidência de tumores hepáticos no rato e fibroadenomas mamários, numa dose pelo menos 110 e 400 vezes mais alta do que a dose terapêutica, respectivamente. O mais provável é que os tumores hepáticos estejam relacionados com a indução enzimática; contudo, permanece por esclarecer a relevância clínica final destes resultados.

- **Sertralina**

O cloridrato de sertralina (Figura 2) é um composto pertencente à classe dos denominados inibidores seletivos da recaptação da serotonina (SSRIs), que representam alternativa aos compostos tricíclicos no tratamento da depressão. O cloridrato de sertralina é o enantiômero *S-cis* de um tetraidronaftaleno dissustituído (Ferrarini A, *et al*, 2010).

Figura 2 - Estrutura química da sertralina: cis-(1S,4S)-4-(3,4-diclorofenil)-1,2,3,4-tetraidro-N-metil-1-naftaleno-aminocloridrato

A sertralina é o mais potente e seletivo entre os inibidores da recaptação da serotonina. Apresenta vantagens farmacocinéticas, tais como meia-vida de 26 horas, estabilização dos níveis plasmáticos em sete dias e ausência de inibição clinicamente significativa das enzimas hepáticas (P450 2D6), o que lhe confere maior segurança clínica na interação com outros

fármacos que usam essa via metabólica. É metabolizada no fígado em desmetilsertralina, que é inativa. Demonstra maior potência e especificidade pelos neurônios pré-sinápticos na inibição da recaptação da serotonina do que a noradrenalina (Hirano K, *et al*, 2005).

Em contraste com a maioria dos tricíclicos, sertralina e desmetilsertralina têm, relativamente, mínima ação na inibição da recaptação de noradrenalina e apresentam baixa afinidade por receptores muscarínicos, histaminérgicos e 5HT1A (Boscha ME, *et al*, 2008), produzindo dessa forma baixa incidência de efeitos adversos. A dose diária no tratamento da depressão é de 50 a 200 mg. No entanto, alguns pacientes apresentam aumento da irritabilidade quando submetidos a esta medicação.

- ***Venlafaxina***

A venlafaxina é um antidepressivo com uma estrutura química diferente da dos tricíclicos clássicos, tetracíclicos e outros agentes antidepressivos conhecidos, é uma feniletilamina bicíclica e quimicamente denomina-se 1-2 dimetilamino -1-4-metoxifeniletilcicloexano (Figura 3) (Wen L, *et al*, 2011).

Figura 3 - Estrutura química da venlafaxina: 1-2 dimetilamino -1-4-metoxifeniletilcicloexano.

A venlafaxina é um potente e ativo inibidor da recaptação de aminas no neurônio pré-sináptico e, além de inibir a recaptação da serotonina age sobre a noradrenalina e, em menor grau sobre a recaptação da dopamina (Lemke MR, 2007). Não gera efeitos significativos no nível autônomo, colinérgicos, hipnóticos ou cardiovasculares (Wen L, *et al*, 2011). Seu mecanismo de ação lembra o de outros antidepressivos conhecidos (tais como os tricíclicos), já que está diretamente associado à potencialização da atividade neurotransmissora no SNC. É absorvida oralmente, atingido o pico plasmático em duas horas após a ingestão e o equilíbrio plasmático em três dias, apresentando baixa ligação com proteínas.

A venlafaxina é um antidepressivo inibidor da recaptação de serotonina e norepinefrina, que apresenta baixo risco de desenvolvimento de efeitos adversos e um excelente perfil de tolerância. A venlafaxina apresenta meia-vida curta de cerca de 3 a 5 horas enquanto que seu metabólito ativo O-desmetilvenlafaxina é de 10 a 11 horas (Lemke MR, 2007).

1.6 Revisão bibliográfica

- *Agomelatina*

Xue-Jun (2010) relatou um método LC-UV para a agomelatina, em que a separação foi conseguida usando uma coluna il-C18 (4,6 x 150mm, 5 μ m). A fase móvel era composta por acetonitrila e água (30:70) com vazão de 1mL/min. O limite de quantificação foi de 5000 ng / ml.

Patil SR (2011) desenvolveu um método analítico baseado na extração líquido-líquido utilizando uma coluna Betasil C18 (4,0 x 100 mm, 5 mm) para a separação cromatográfica dos analitos seguido pela detecção com espectrometria de massa.

A metodologia analítica para a Agomelatina ainda é praticamente inexistente, justificando assim a necessidade de desenvolvimento de novos métodos para este fármaco.

- *Sertralina*

Vários métodos analíticos foram descritos na literatura para a determinação e quantificação da sertralina em amostras biológicas. Em 2008, BOSCHA, ME, et al, analisou as metodologias analíticas para a determinação deste composto farmacêutico ativo de 1987 até 2008. A maioria destes métodos é baseada em técnicas de separação, sendo o HPLC a mais frequentemente utilizada. Em comparação com outras técnicas, HPLC oferece várias vantagens, incluindo baixo custo, a preparação da amostra simplificada e facilidade de medição. Na literatura diferentes métodos de HPLC foram descritas para a análise de sertralina em amostras biológicas (He L, *et al*, 2005; Mandrioli R, *et al*, 2006; Rudberg I, *et al*, 2008; Patel BN, *et al*, 2009). Estes métodos empregam diferentes tipos de detecção, incluindo UV-vis, fluorescência e espectrometria de massa de detecção (MS) (Boscha ME, *et al*, 2008). Vários métodos analíticos foram também descritas para a identificação simultânea de diferentes drogas antidepressivas, incluindo sertralina, usando técnicas de HPLC (Malfará

WR, *et al*, 2007; Esrafil A, *et al*, 2007; Pathak A, *et al*, 2008; Reis M, *et al*, 2009). Alguns métodos descritos na literatura permitiram a separação e determinação de diastereoisômeros e enantiômeros da sertralina (Chen, D, *et al*, 2004; Rao RN, *et al*, 2009; Zhou MX, *et al*, 2004). O fato de a sertralina ser um composto quiral pode explicar por que estes métodos estão voltadas para a separação dos seus isômeros e estereoisômeros, enquanto que a análise aquiral deste composto biologicamente ativo e das suas impurezas potenciais não tem sido explorado (Patel BN, *et al*, 2009).

- **Venlafaxina**

Uma vez que venlafaxina tem menos efeitos secundários adversos do que quando compostos tricíclicos são administrados, é mais adequado para o tratamento da depressão (Feng Q, *et al*, 2010).

Em humanos venlafaxina é metabolizado em dois metabólitos menores e um metabólito maior que é ativo. Cerca de 1% da venlafaxina é desmetilado para N-desmetilvenlafaxina (NDV), 16% torna-se N, O-didesmethylvenlafaxine, e 56% é metabolizado a O-desmetilvenlafaxina (ODV), que tem um perfil de atividade sobre os transportadores da monoamina semelhante a venlafaxina (Feng Q, *et al*, 2010). Assim, tanto os níveis de venlafaxina e de ODV no plasma são importantes parâmetros farmacocinéticos para avaliar sua eficácia. É essencial desenvolver um método específico, sensível e rápido para a determinação simultânea de venlafaxina e ODV no plasma humano. Uma série de métodos analíticos para a determinação simultânea de venlafaxina e ODV em amostras biológicas têm sido relatados, incluindo HPLC com detecção UV (Frahnert C, *et al*, 2003), detecção coulométrica (Clement EM, *et al*, 1998), cromatografia eletrocínética micelar capilar (MEKC) (Labat L, *et al*, 2002), e métodos de eletroforese capilar (Fanali S, *et al*, 2001) capaz de separar simultaneamente os enantiômeros de venlafaxina e ODV. HPLC com detecção de fluorescência (Mandrioli R, *et al*, 2007) tem uma sensibilidade de cerca de 1 ng / mL para ambos analitos, mas estes métodos precisam de um tempo de corrida cromatográfica maior que 10 min.

Recentemente, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa, LC-MS (Liu W, *et al*, 2007) e LC-MS/MS (Theron HB, *et al*, 2007; Patel BN, *et al*, 2008), foram utilizados na determinação simultânea de venlafaxina e ODV. Alguns métodos atingiram sensibilidade de 2 ng/mL no plasma e/ou um tempo de execução de 3 minutos (Bhatt J, *et al*, 2005; Patel BN, *et al*, 2008). Feng Q (2010) descreveu um método rápido, sensível e seletivo

de UPLC-MS/MS método que permitiu a determinação simultânea de venlafaxina e ODV com boa precisão em concentrações no plasma humano tão baixo quanto 0,200 ng / mL, sendo que o tempo total de análise do método por amostra é de 2,0 min.

Objetivos

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi o de desenvolver e validar metodologia analítica utilizando-se da cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação em plasma de agomelatina, sertralina, venlafaxina e outros antidepressivos tricíclicos e não tricíclicos, simultaneamente, em pacientes depressivos.

A metodologia foi utilizada na monitorização terapêutica, a pedido médico, de pacientes que faziam uso de um dos medicamentos estudados.

Paralelamente marcadores bioquímicos renais e hepáticos foram avaliados nos pacientes em terapia a longo prazo com sertralina, venlafaxina e amitriptilina.

Casuística e Métodos

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Caracterização do Local de Estudo

O projeto foi realizado no Laboratório de Análises Toxicológicas do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

3.2 Obtenção do *pool* de plasma

Para a otimização da metodologia analítica foi utilizado *pool* de plasma de voluntários sadios, que quiseram participar do estudo de forma espontânea, que não faziam parte de grupos vulneráveis, de ambos os sexos, livres de agomelatina, sertralina e venlafaxina, obtido através de doações espontâneas, cujo critério de inclusão foi: a) ter idade compreendida entre 18 e 50 anos, b) ser sadio, c) não fazer uso dos fármacos e d) não fazer parte de grupos vulneráveis.

O número de voluntários participantes do projeto, necessário para a obtenção do volume certo de plasma para o estudo, foi de 90 ($n = 90$). Dessa forma, fez-se o recrutamento de voluntários que preencheram os critérios de inclusão, os quais somente doaram o plasma após leitura e assinatura Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) – Anexo II, com os esclarecimentos de dúvidas que porventura tenham tido.

Aos voluntários foi dado conhecimento sobre o sigilo das informações prestadas para o estudo e a confiabilidade da identificação do material doado, bem como o ressarcimento de gastos que porventura tivessem com a doação de plasma, tais como transporte e alimentação, além da possibilidade de deixar de participar ou retirar seu consentimento em qualquer fase do estudo, sem qualquer penalização.

Foi obtido apenas plasma em quantidade suficiente para o desenvolvimento do presente projeto, não restando, por essa forma, material armazenado.

O presente projeto de pesquisa foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em pesquisa da FCFRP/USP apresentando como termo de consentimento livre e esclarecido de acordo com o protocolo CEP/FCFRP nº 288 – Anexo 1.

3.3 Triagem dos Pacientes

No processo de triagem dos pacientes que fizeram uso dos antidepressivos em estudo, os critérios de inclusão foram:

- Usar o medicamento durante período necessário para atingir o estado de equilíbrio; paciente em terapia a longo prazo, no mínimo seis meses.
- Paciente Adulto com IMC (Índice de Massa Corpórea Normal)
- Não fumante e não alcoolista
- Sem patologias renais e hepáticas
- Sem doenças sexualmente transmissíveis

No processo de triagem, para excluir a possibilidade de uso nocivo do álcool foram incluídos sujeitos com escore menor que 3 na escala FAST (Hodgson R, *et al*, 2002) e foram utilizadas as escalas PHQ-9 (Kroenke K, *et al*, 2003) e SRQ-24 (WHO, 1993) como triagem prévia para excluir qualquer possibilidade de transtorno psiquiátrico e posteriormente aplicou-se a versão em português (Del-Bem CM, *et al*, 2001) da entrevista clínica estruturada para o DSM-IV (First MB, *et al*, 1997), por um médico psiquiatra devidamente treinado e qualificado, familiarizado com o instrumento.

Os pacientes selecionados foram convidados para participar do estudo. Foi dado conhecimento sobre o sigilo das informações prestadas para o estudo e da confiabilidade da identificação do material doado, bem como sobre o ressarcimento de gastos que porventura tiveram com a doação de plasma, tais como transporte e alimentação. Apenas os pacientes que estavam de acordo foram incluídos na pesquisa e tinham liberdade de deixar de participar ou retirar seu consentimento em qualquer fase do estudo, sem qualquer penalização.

Foi aplicado o “Questionário de Identificação” e “Questionário sobre a saúde do Paciente” aos pacientes incluídos na pesquisa (Anexo 3 e 4).

3.4 Metodologia Analítica

3.4.1 Padrões e Reagentes

O padrão de duloxetine foi comprado da Farmacopeia Cil (São Paulo, Brasil), sertralina (Ciba-Geigy, Brasil), amitriptilina, citalopram, agomelatina (Sigma, St. Louis, MO, USA), moclobemida (Roche, Brasil), venlafaxina (Pfizer) e o padrão interno etidocaína (Galena, Brasil). Metanol grau HPLC, foi comprado da J. T. Baker (Phillipsburg, USA), acetonitrila, hexano e álcool isoamílico grau HPLC, foram comprados da Merck (Darmstadt, Germany). Os reagentes usados no procedimento de extração foram grau analítico e comprados da Merck (Darmstadt, Germany). A água foi purificada no sistema de purificação por Osmose Reversa e em seguida, filtrada no sistema Milli Q.

3.4.2 Sistema Cromatográfico

A análise foi realizada em um sistema HPLC da Shimadzu modelo LC- 10 AT VP, um detector ultravioleta modelo SPD – 10 AVP operando em 230 nm, um integrador Chromatopac C- R8A e um injetor Rheodyne com *loop* de 100 μ L. A separação cromatográfica foi alcançada isocraticamente, a temperatura ambiente, em uma coluna em fase reversa LiChrospher[®] 60 RP-select B (5 μ m) em LichroCART (250mm x 4 mm), Merck. A fase móvel consistiu de 35% de uma mistura de acetonitrila:metanol (55:5, v/v) e 65% de tampão acetato 0,25 M pH 4,4, fluxo de 1,0 mL/min.

3.4.3 Preparo das Amostras

As soluções estoque de cada antidepressivo foram preparadas dissolvendo quantidade rigorosamente pesada de cada composto de referência em metanol para se obter uma concentração de 1 mg/mL de cada fármaco. A solução estoque de 1 mg/mL de etidocaína, padrão interno em metanol, foi diluída a 1/50 para obter a concentração de 20 μ g/mL (solução de trabalho). As soluções estoque foram estocadas a -20°C em tubos de vidro, protegidos da luz.

A etidocaína foi escolhida como padrão interno por apresentar recuperação em torno de 100%, quando comparada com a fenacetina e o N-desalquilflurazepam que também foram avaliadas, mas apresentaram porcentagem de recuperação inferior a 50% quando extraídos em hexano: álcool isoamílico (99:1, v/v).

3.4.4 Extração das Amostras

A extração consistiu da adição de 25 μ L de etidocaína (padrão interno), 200 mg de NaCl, 50 μ L de NaOH 1,5M e 5 mL de hexano: álcool isoamílico (99:1, v/v) a 1 mL de plasma, em tubo de extração com rolha esmerilhada. Em seguida, cada tubo foi agitado em vórtex por 1 minuto, centrifugado a 2500 rpm por 5 minutos, e 4 mL da fase orgânica (superior) foi transferida para tubo cônico e evaporada à secura em temperatura ambiente. A mistura foi reconstituída em 150 μ L de fase móvel, 100 μ L de n-hexano, agitada por 1 minuto em vórtex, centrifugada por 1 minuto a 2500 rpm e 100 μ L da fase móvel foi injetada no sistema HPLC.

Foram também testadas extrações utilizando como solvente de extração o diclorometano e Hexano:Etanol (90:10, v/v), porém eles não apresentaram porcentagem de recuperação satisfatória.

3.4.5 Curva de Calibração

As curvas de calibração foram preparadas diariamente pela adição de 25 μL de cada solução padrão nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,4; 2,0; 4,0; 8,0; 20,0; 40,0 $\mu\text{g/mL}$ de metanol a 1 mL de plasma branco (plasma de pacientes não tratados com medicamentos por no mínimo 2 meses), correspondendo no plasma às concentrações de 2,5; 5,0; 10,0; 50,0; 100,0; 200,0; 500,0 e 1000,0 ng/mL . As curvas de calibração foram processadas como descrito na preparação de amostras.

3.5 Validação da Metodologia Analítica

A validação, processo por meio do qual se executou um conjunto de experimentos, indicou eficácia e confiabilidade do método analítico. O objetivo da validação foi estabelecer a evidência objetiva de que o método foi capaz de realizar com sucesso o uso de estabelecer a confiabilidade total da análise (SWGTOX, 2013).

O método foi validado de acordo com as especificações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2012).

- *Curva de Calibração*

Relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito (ANVISA, 2012).

Foi conseguido, determinando-se primeiro o intervalo de concentrações do analito na faixa de trabalho. Dentro deste intervalo, houve correlação entre o sinal resposta (por exemplo, a relação da área do pico do analito e a do padrão interno) e a concentração do analito na amostra. O modelo de calibração foi o de modelo matemático que descreve esta correlação. A escolha de um modelo apropriado (isto é, linear ou quadrático) foi necessária para precisão e confiança dos resultados quantitativos obtidos (SWGTOX, 2013).

As amostras da curva de calibração, preparadas na mesma matriz proposta para o estudo, foram inicialmente adicionadas, no mínimo, em seis diferentes concentrações do padrão do analito e do padrão interno, e submetidas ao mesmo procedimento de preparação a que foram submetidas as amostras em estudo (ANVISA, 2012).

A linearidade foi a capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de

aplicação. A linearidade do método foi determinada a partir da relação matemática entre o sinal medido e a concentração ou massa do analito, obtida pela equação de reta

$$y = ax + b$$

chamada de curva analítica. Os coeficientes a e b da curva analítica foram estimados a partir de um conjunto de medições experimentais usando o método matemático conhecido como regressão linear. Além destes, calculou-se o coeficiente de correlação r ou o coeficiente de determinação r^2 , parâmetros que permitiram garantir a qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximos de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (Aragão et al, 2009).

- **Precisão**

Precisão foi a medida do grau de concordância entre uma série de medições obtidas a partir de várias alíquotas de uma mesma amostra homogênea, que foi expressa numericamente como imprecisão (SWGTOX, 2013).

A precisão do método analítico avaliou a proximidade dos resultados de análises independentes, quando o procedimento foi aplicado diversas vezes na mesma amostra homogênea, sob condições definidas (Esteban, Rodrigues e Nascimento, 2007).

A precisão foi determinada em uma mesma corrida (precisão intraensaio) e em, no mínimo, 3 (três) corridas diferentes (precisão interensaio ou dias), sendo que o ensaio de precisão interensaio foi realizado em dias distintos (ANVISA, 2012).

A precisão foi expressa como desvio padrão relativo das médias (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), não se admitiu valores superiores a 15% (quinze por cento), exceto para o Limite de quantificação, para o qual se admitiu valores menores ou iguais a 20% (vinte por cento), segundo a fórmula a seguir:

$$CV = \frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Concentração Média Experimental}} \times 100$$

(ANVISA, 2012)

- **Exatidão**

A exatidão foi a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação aos valores teóricos (Santana et al, 2007), sendo melhor expresso como % de erro sistemático.

A exatidão foi determinada em uma mesma corrida analítica (exatidão intracorrída) e em, no mínimo, 3 (três) corridas diferentes (exatidão intercorridas) (ANVISA, 2012).

A exatidão foi expressa pelo Erro Padrão Relativo (EPR), não se admitindo valores fora da faixa de $\pm 15\%$ (quinze por cento) do valor nominal, exceto para o Limite de quantificação, para o qual não se admitiu valores na faixa de $\pm 20\%$ (vinte por cento) do valor nominal, segundo a fórmula a seguir:

$$EPR = \frac{(\text{Concentração Média Experimental} - \text{Valor Nominal})}{\text{Valor Nominal}} \times 100$$

(ANVISA 2012)

- **Seletividade**

Um método instrumental de separação que produz resposta para uma única substância de interesse, normalmente um dado elemento, pode ser chamado de específico e um método que produz resposta para vários compostos químicos, com uma característica em comum, pode ser chamado de seletivo. Desde que há poucos métodos cromatográficos que respondem a apenas uma substância, o termo seletividade é mais apropriado, como sugerido pela IUPAC (Ribani *et al*, 2004).

A seletividade é o primeiro parâmetro a ser avaliado para o desenvolvimento e validação de um método analítico, devendo ser reavaliado continuamente durante o uso do método e validação, pois se a seletividade não estiver assegurada haverá comprometimento da linearidade, exatidão e precisão do método analítico (Silva *et al*, 2010).

Devem ser analisadas amostras da matriz biológica obtidas de, no mínimo, seis fontes distintas. Como plasma foi empregado na presente metodologia como matriz biológica serão empregadas quatro amostras normais, uma lipêmica e uma hemolisada aos testes de seletividade (ANVISA, 2012).

As respostas de picos interferentes próximo ao tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% da resposta do analito nas amostras do LIQ e próximos ao tempo de retenção do PI inferiores a 5% da resposta do PI. Caso uma ou mais amostras analisadas apresentem interferência acima dos limites estabelecidos, novas amostras de, no mínimo, outras seis fontes distintas devem ser testadas (ANVISA, 2012).

- ***Efeito residual***

A análise de uma amostra não pode comprometer o resultado qualitativo ou quantitativo das outras análises, assim a avaliação do efeito residual é tão importante. (SWGTOX, 2013).

Para se evitar interferências dessa natureza, foram realizadas três injeções da mesma amostra branco, sendo uma antes e duas logo após a injeção. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos de amostras processadas do LIQ. As respostas de picos interferentes no tempo de retenção do analito foram inferiores a 20% (vinte por cento) da resposta do analito nas amostras processadas do LIQ. As respostas de picos interferentes no tempo de retenção do PI foram inferiores a 5 % (cinco por cento) da resposta do PI (ANVISA, 2012).

- ***Efeito matriz***

O efeito matriz foi amplamente estudado por ser considerado como fonte de erro quantitativo devido à interferência de componentes da matriz (Cerqueira, *et al*, 2011).

Para se evitar o efeito, foram analisadas, no presente estudo, oito amostras de plasma de fontes distintas, sendo quatro normais, duas lipêmicas e duas hemolisadas, posteriormente adicionadas de analito e PI, e soluções, nas mesmas concentrações das amostras de CQB e CQA. Para cada amostra foi obtido o fator de matriz normalizado por PI (FMN), conforme a fórmula a seguir:

$$FMN = \frac{\text{Resposta do Analito em Matriz} / \text{Resposta do PI em Matriz}}{\text{Resposta do Analito em Solução} / \text{Resposta do PI em Solução}}$$

(ANVISA, 2012).

O coeficiente de variação (CV) dos FMNs relativos a todas as amostras foi inferior a 15% (ANVISA, 2012).

- ***Estabilidade***

Avaliamos a extensão de tempo que uma amostra foi mantida antes de ser submetida a alterações inaceitáveis, impedindo a detecção confiável do analito, a identificação ou sua quantificação (SWGTOX, 2013).

As condições de realização dos estudos de estabilidade foram reproduzidas às condições de armazenamento, preparo e análise das amostras em estudo (ANVISA, 2012).

Resultados e Discussão

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A relação dose-efeito ou a relação concentração plasmática-efeito são elementos básicos na farmacologia experimental. Contudo, na farmacologia clínica a demonstração destas relações é difícil. Para alguns fármacos, a relação dose-efeito varia consideravelmente entre os pacientes. E, esta alta variabilidade é principalmente o resultado de uma pobre aderência do paciente ao regime de dosagem ou diferenças na farmacocinética, particularmente na absorção e eliminação. Portanto, em algumas terapias é importante se ajustar a dose para se atingir o efeito terapêutico desejado sem correr o risco de toxicidade (Rasmussen & Brosen, 2000).

No presente trabalho, foram padronizadas e validadas metodologias em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para serem empregadas na monitorização terapêutica de fármacos antidepressivos.

De acordo com Rasmussen & Brosen (2000) para se aplicar a monitorização terapêutica é importante que a metodologia analítica alie alta sensibilidade e especificidade, porém sem o emprego de técnicas sofisticadas e onerosas, o que não é viável em um laboratório de rotina de Toxicologia Analítica.

Desta forma, foi desenvolvida uma metodologia simples, com detecção por ultravioleta e etapas de extração do fármaco da matriz (plasma) por partição líquido-líquido analisando antidepressivos tricíclicos e não tricíclicos.

Os antidepressivos tricíclicos sofrem adsorção na vidraria, conforme verificado por Queiroz, 1995. No entanto, este problema foi contornado lavando-se a vidraria com hexano:álcool isoamílico (99:1 v/v) antes do uso.

O solvente extrator selecionado foi o hexano:álcool isoamílico (99:1 v/v). Foram avaliados inúmeros solventes e misturas de solventes, todos com baixa eficiência na eliminação das interferências da matriz (plasma). O heptano apresentou resultados muito semelhantes ao hexano:álcool isoamílico (99:1), porém por razões econômicas optou-se pelo hexano. Mesmo o melhor sistema extrator resultava em picos interferentes de tamanhos consideráveis, com tempos de retenção bem maior que nosso analito. Estes picos embora não interferissem na separação, nas análises posteriores, interferiam com a sertralina. Para minimizar este problema, no momento de ressuspender com 150 μL de fase móvel foi acrescentado 100 μL de hexano, agitado por 1 minuto em mixer, centrifugado e injetado 100 μL da fase inferior (Bonato & Lanchote, 1993). Este procedimento eliminou a interferência da matriz dos compostos apolares. O pH da matriz, na faixa de 9 e 10 foi basificado com NaOH 1,5 mol L⁻¹. Para tornar o meio alcalino foram avaliados o tampão carbonato 0,35 mol L⁻¹ (pH=10) e tampão acetato 0,75 mol L⁻¹ (pH=7). Também foram

feitos testes para verificar a influência da luz e da temperatura. Para verificar a interferência da luz, foram feitos dois pontos em triplicatas protegidos através de papel alumínio e dois pontos não protegidos da luz. Para a temperatura, foram testados dois pontos em triplicata evaporados sob banho de gelo e dois pontos em triplicata, evaporados em temperatura ambiente. A luz e a temperatura não influenciaram no processo. A adição do NaCl melhorou consideravelmente a eficiência da extração, processo denominado “salting out”.

Na aplicação do método, foi empregada a coluna LiChrospher® 60 RP-Select B, 5µm em LichroCART (250mm x 4mm), produzida pela Merck, coluna de fase reversa indicada para compostos básicos. Nesta coluna não há necessidade de se formar pares iônicos para análise de aminas. Os pares iônicos são necessários nas colunas de sílica C-8 ou C-18 de fase normal ou reversa, para minimizar o problema de caudas nos picos.

O método foi validado seguindo-se recomendações de literatura específica, sendo obtidos resultados dentro dos limites aceitáveis. A figura 4 descreve o procedimento de extração e análise cromatográfica utilizado.

Sendo a validação analítica de importância fundamental para as análises de plasma humano contendo antidepressivos, por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), realizamos a padronização e validação do método para os fármacos moclobemida, citalopram, **agomelatina**, duloxetine, amitriptilina, **sertralina** e **venlafaxina**.

Na extração líquido-líquido, o pH da amostra foi considerado um fator determinante na etapa de otimização, uma vez que para se obter uma extração eficiente, o fármaco de interesse deve estar na forma não-ionizada, permitindo assim, sua partição para o solvente orgânico (Huttunen KM, *et al*, 2009). Sendo necessário alcalinizar o meio para que a extração obtivesse resultados satisfatórios.

A extração líquido-líquido foi utilizada devido à sua alta eficiência, seletividade e simplicidade. Apesar das diferenças na estrutura química entre os compostos, as recuperações de extração foram satisfatórias. A polaridade do solvente de extração, ou seja, a proporção de álcool isoamílico na mistura com hexano, mostrou ser a variável mais importante que influenciou a extração. A mistura hexano:álcool isoamílico (99:1 v/v), garantiu elevadas recuperações (90%) e assegurou limite de quantificação de 20 ng/mL.

Há descrito na literatura, várias tentativas para elucidar as causas e mecanismos da toxicidade hepática dos antidepressivos. Uma maior susceptibilidade para lesões hepáticas provocadas por agentes químicos parece ser consequência do metabolismo destas substâncias. O processo de biotransformação, em muitos casos, produz substâncias mais tóxicas ou mais reativas que as substâncias de origem, e como já foi dito anteriormente, este processo de

biotransformação está sujeito a variabilidades interindividuais (Zimmerman, 1999). Para os tricíclicos, a biotransformação envolve múltiplas etapas, formando metabólitos cada vez mais polares. A principal enzima envolvida na oxidação dos tricíclicos é o CYP2D6. O CYP2D6 é uma das isoformas do citocromo P450, sistema microssômico de enzimas responsáveis pela biotransformação de um grande número de fármacos. O CYP constitui uma superfamília de isoformas, e na psicofarmacologia clínica destas 4 isoformas são particularmente importantes: CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6 e CYP3A4 (Rudorfer & Potter, 1999; Brosen, 1996; Lin & Lu, 1998). Dentre estas isoformas, o CYP2D6 e o CYP2C19 são isoformas que apresentam polimorfismo genético e este polimorfismo tem grandes implicações na clínica. O polimorfismo genético do CYP divide a população em metabolizadores extensivos, lentos e ultrarrápidos. A incidência de metabolizadores lentos e ultrarrápidos é variável com a etnia das populações, sendo a maioria composta por metabolizadores extensivos (Lin & Lu, 1998).

Com base no conhecimento deste polimorfismo, pensou-se na possibilidade da existência de relação entre o fenótipo de oxidação do CYP e o desenvolvimento de hepatites. Desta maneira, Larrey, *et al*, realizaram experimentos para demonstrar se existe relação entre o fenótipo oxidativo da debrisoquina/dexmetorfano (CYP2D6) com a susceptibilidade para se desenvolver hepatite decorrente ao uso de amineptina, que também é um antidepressivo tricíclico. Contudo, neste experimento ficou demonstrado que não existe esta correlação, pois no estudo, todos os pacientes analisados foram fenotipados como metabolizadores extensivos de dexmetorfano, e todos eles apresentaram hepatite após o uso da amineptina.

Existem outros fatores relacionados com a susceptibilidade para lesões hepáticas, como por exemplo, a depleção de glutathione, que aumenta a toxicidade hepática de muitos fármacos. Deficiência genética na atividade da epóxido hidrolase, indivíduos com fenótipo de acetiladores lentos, deficiência na atividade da glicuronil transferase ou depleção de glicogênio, são fatores que contribuem para aumentar a toxicidade de fármacos sujeitos ao metabolismo hepático. Também deve ser mencionado que além dos fatores genéticos relacionados ao metabolismo, existem fatores como a idade, sexo, status nutricional, doenças, uso concomitante de álcool e outros fármacos que podem estar relacionado com o desenvolvimento de hepatotoxicidade (Zimmerman, 1999).

A relação da hepatotoxicidade com o uso de tricíclicos vem preocupando os pesquisadores há muitos anos, porém na terapia a longo prazo os dados ainda não são conclusivos.

Muitos fármacos estão disponíveis para o controle da depressão, porém a ação farmacológica dos antidepressivos está diretamente ligada a fatores fisiológicos e patológicos de cada paciente. Desta forma, a monitorização terapêutica, técnica de individualização do

regime de dosagem, vem reiterar a máxima eficácia clínica aliada ao mínimo de efeitos adversos na terapia a longo prazo com os antidepressivos.

Figura 4 - Procedimento de extração e análise cromatográfica dos antidepressivos em plasma por HPLC

4.1 Análise de agomelatina, sertralina e venlafaxina em plasma humano por HPLC-UV

O procedimento analítico desenvolvido deu origem a uma excelente separação e a picos simétricos para cada antidepressivo. Cromatogramas representativos de plasma branco e de plasma enriquecido com 200ng/mL de cada fármaco antidepressivo foram apresentados nas Figuras 5 a 9. Sob as condições cromatográficas descritas, os tempos de retenção foram de 3,116 (moclobemida), 5,059 (venlafaxina), 6,379 (padrão interno etidocaína), 9,601 (citalopram), 14,042 (agomelatina), 17,305 (duloxetina), 19,210 (amitriptilina) e 25,045 (sertralina). A eluição completa foi obtida em menos de 30 min. A figura 10 mostra a estrutura química dos antidepressivos citados.

Figura 5 - Cromatograma obtido do plasma branco (sem padrão interno).

Figura 6 - Cromatograma obtido do plasma adicionado de 200ng/mL (1) moclobemida, (2) venlafaxina, (3) etidocaína (padrão interno), (4) citalopram, (5) agomelatina, (6) duloxetina, (7) amitriptilina e (8) sertralina.

Figura 7 - Cromatograma obtido do plasma adicionado de 200ng/mL (1) etidocaína (padrão interno) e (2) agomelatina.

Figura 8 - Cromatograma obtido do plasma adicionado de 200ng/mL (1) etidocaína (padrão interno) e (2) sertralina.

Figura 9 - Cromatograma obtido do plasma adicionado de 200ng/mL (1) etidocaína (padrão interno) e (2) venlafaxina.

Moclobemida

etidocaína (padrão interno)

Venlafaxina

citalopram

Agomelatina

sertralina

Duloxetine

Amitriptylina

Figura 10 - Estrutura química dos antidepressivos e do padrão interno.

Para análise dos antidepressivos acima citados, tanto a coluna cromatográfica em fase reversa LiChrospher® 60 RP-select B (5µm) em LichroCART (250mm x 4mm) como a fase móvel composta pela mistura de 35% de acetonitrila:metanol (55:5, v/v) e 65% de tampão acetato 0,25 M pH 4,4, sob fluxo de 1,2mL/min, mostraram-se eficientes no processo de separação dos fármacos analisados. Os picos mostraram-se com excelentes desempenhos e

nenhuma sobreposição de sinal com fatores endógenos do plasma foi observada. Seguindo o processo de otimização das condições de separação, o método passou para as próximas etapas da validação.

4.2 Padronização e validação do método para análise de agomelatina, sertralina e venlafaxina e demais antidepressivos em plasma humano por HPLC-UV

- ***Estabilidade***

Os testes para verificação da estabilidade das amostras após ciclos de congelamento (a °C) e descongelamento evidenciaram a estabilidade das amostras durante o tempo de execução da validação da metodologia, de cerca de 3 semanas.

As amostras processadas no dia e injetadas eram congeladas e reprocessadas no dia seguinte e os números de quantificação eram confrontados.

Os testes para a verificação da estabilidade a curto prazo foram realizados em temperatura ambiente e indicaram segurança dos dados obtidos em tempo maior que o necessário para o processamento das amostras no estudo.

As amostras extraídas foram submetidas a análise em intervalo de tempo maior que o utilizado pela validação do presente estudo e ainda assim mantiveram-se estáveis.

Mesmo as amostras, processadas e extraídas, mantidas à temperatura ambiente, nas mesmas condições de análise das amostras em estudo, durante tempo superior àquele entre o preparo das amostras e a corrida analítica do dia, indicaram estabilidade dos fármacos e do padrão interno, com desvios inferiores ao preconizado, quando comparadas às amostras de CQB e CQA.

As médias obtidas das análises de soluções armazenadas dos fármacos utilizados na metodologia, bem como da solução de etidocaína, em tempo maior ao de sua utilização no presente estudo, não trouxeram desvios superiores ao preconizado quando cotejadas com os números provenientes das análises de soluções dos fármacos de interesse e do padrão interno recém preparadas.

- ***Seletividade***

Avaliação da Especificidade do método de análise simultânea dos antidepressivos: Moclobemida, Venlafaxina, Citalopram, Agomelatina, Duloxetine, Amitriptilina e Sertralina. Os fármacos testados como interferentes foram usados nas concentrações terapêuticas máximas.

Para a avaliação da Estabilidade do método de análise foram comparados os tempo de retenção para cada fármaco e o tempo de retenção dos mesmo após a extração, os quais se mantiveram constantes.

Na Tabela 1 estão os resultados obtidos pelas análises

Tabela 1 - Resultados obtidos na avaliação da especificidade do método de análise simultânea dos antidepressivos em amostras de plasma humano.

Fármaco	Tempo de Retenção (minutos)	Tempo de Retenção após Extração (minutos)	Concentração plasmática (ng/mL)
Cafeína	1,22	1,22	6.800,0
Metoprolol	2,13	2,13	200,0
Moclobemida	3,116	3,116	500,0
Venlafaxina	5,059	5,059	500,0
Etidocaína	6,379	6,379	
Carbamazepina	7,61	7,61	14.000,0
Propranolol	7,95	7,95	1.000,0
Lorazepam	8,35	8,35	240,0
Citalopram	9,601	9,601	500,0
Alprazolam	10,95	-	20,0
Agomelatina	14,042	14,042	500,0
Duloxetina	17,305	17,305	500,0
Amitriptilina	19,210	19,210	500,0
Diclofenaco	20,78	20,78	2.200,0
Diazepam	21,61	21,61	2.500,0
Sertralina	25,045	25,045	500,0
Clomipramina	26,52	26,52	500,0
Haloperidol	-	-	33,0
Metildopa	-	-	5.000,0
Amiodarona	-	-	1.000,0
Clonazepam	-	-	24,0
Fenobarbital	-	-	30.000,0
Primidona	-	-	12.000,0
Indometacina	-	-	3.000,0
Furosemida	-	-	5.000,0
Cimetidina	-	-	1.500,0
Ranitidina	-	-	820,0

- **Linearidade**

A linearidade foi obtida através da análise de amostras em plasma em branco, contendo soluções-padrão de cada antidepressivo, em concentrações de 2,5-1000 ng/ml para a moclobemida; 5-2000 ng/ml para a venlafaxina, citalopran, agomelatina, duloxetina e amitriptilina; 10-2000 ng/ml para a sertralina; e o coeficiente de correlação foi (r^2)>0,998 (Tabela 2). O intervalo de concentração foi estimado com base na curva de regressão ($y = ax + b$) e no coeficiente de correlação (r^2).

Tabela 2 - Resultados obtidos na avaliação de faixa de linearidade dos antidepressivos em amostras de plasma humano.

	Faixa concentração	Regressão linear, r^2
Moclobemida	(2,5-1000 ng/mL)	Y=0,06057x+0,00335 0,999
Venlafaxina	(5-2000 ng/mL)	Y=0,03942x+0,00092 0,999
Citalopram	(5-2000 ng/mL)	Y=0,00764x+0,00283 0,999
Agomelatina	(5-2000 ng/mL)	Y=0,03189x+0,00109 0,999
Duloxetina	(5-2000 ng/mL)	Y= 0,2774x+0,00233 0,998
Amitriptilina	(5-2000 ng/mL)	Y= 0,105x+0,00148 0,999
Sertralina	(10-2000 ng/mL)	Y= 0,0187x+0,00078 0,999

- **Limite Inferior de quantificação**

O limite de quantificação foi determinado pela análise de amostras de plasma branco enriquecido com concentrações decrescentes de todas as soluções padrões dos antidepressivos. O limite de quantificação foi considerado a menor concentração quantificada com um coeficiente de variação menor de 10%, obtido para cinco determinações.

O limite de quantificação foi determinado em 2,5 ng/ml para a moclobemida; 5 ng/ml para a venlafaxina, citalopran, agomelatina, duloxetina e amitriptilina; 10 ng/ml para a sertralina (Tabela 3)

Tabela 3 - Resultados obtidos na avaliação de limite de quantificação dos antidepressivos em amostras de plasma humano.

	Faixa concentração	Limite de quantificação (ng/mL)
Moclobemida	(2,5-1000 ng/mL)	2,5
Venlafaxina	(5-2000 ng/mL)	5
Citalopram	(5-2000 ng/mL)	5
Agomelatina	(5-2000 ng/mL)	5
Duloxetina	(5-2000 ng/mL)	5
Amitriptilina	(5-2000 ng/mL)	5
Sertralina	(10-2000 ng/mL)	10

- ***Precisão e exatidão***

Para determinar precisão intraensaio, alíquotas (n=5) de plasma branco contendo a solução de padrões das drogas em seis concentrações foram analisadas pelo método proposto. Para determinar a precisão interensaio, o plasma branco contendo a solução de padrões com as mesmas concentrações foram analisados em três dias.

Os coeficientes de variação de interensaio (CV) para os antidepressivos foram inferiores a 8,4%, e os CV intraensaio foram inferior a 8,5%. Os erros padrão relativos (EPR) para os fármacos foram inferiores a 9,4% (Tabela 4).

Tabela 4 - Resultados obtidos na avaliação de coeficientes de variação de interensaio, intraensaio e erros padrão relativos dos antidepressivos em amostras de plasma humano.

Fármacos (ng/mL)	Precisão Intraensaio CV (%), n=10	Precisão Interensaio CV (%), n=5	Precisão erro (%)
Moclobemida			
500	6,3	6,5	0,4
200	5,2	6,8	1,0
50	7,6	6,3	0,2
Venlafaxina			
500	4,7	7,1	6,6
200	8,3	3,7	9,4
50	5,9	5,0	6,5
Citalopram			
500	2,4	4,5	1,2
200	4,7	7,1	6,6
50	8,5	8,4	7,2
Agomelatina			
500	2,7	5,6	1,5
200	6,2	7,8	6,9
50	8,3	7,2	2,6
Duloxetina			
500	2,4	6,8	1,7
200	6,1	5,3	6,5
50	8,0	5,1	6,8
Amitriptilina			
500	2,4	5,3	1,6
200	5,7	7,5	8,0
50	6,9	6,1	4,2
Sertralina			
500	2,7	5,9	1,5
200	5,1	6,8	8,3
50	7,7	6,8	6,2

CV: coeficiente de variação

- **Recuperação**

A avaliação da recuperação dos antidepressivos foi determinada em seis diferentes concentrações no plasma branco. As amostras de plasma com o padrão de agomelatina, sertralina e venlafaxina foram extraídas em triplicata de acordo com o procedimento proposto. E as concentrações dessas amostras, depois de calculadas, foram comparadas com base em curva de calibração construída a partir dos dados para os medicamentos não submetidos ao procedimento de extração (Tabela 5).

Tabela 5 - Resultados obtidos na avaliação de recuperação dos antidepressivos em amostras de plasma humano.

Faixa concentração	Recuperação	
	Concentração(ng/mL)	Resultados (%) (n=5)
Moclobemida (2,5-1000 ng/mL)	400	58,2
	50	59,0
	2,5	55,0
Venlafaxina (5-2000 ng/mL)	500	85,0
	50	84,6
	5	81,1
Citalopram (5-2000 ng/mL)	500	76,3
	50	75,6
	10	74,9
Agomelatina (5-2000 ng/mL)	500	83,6
	50	82,9
	10	82,2
Duloxetina (5-2000 ng/mL)	500	75,2
	50	74,6
	5	73,3
Amitriptilina (5-2000 ng/mL)	500	86,3
	50	85,2
	5	84,8
Sertralina (10-2000 ng/mL)	500	80,1
	50	79,9
	10	79,2

- ***Efeito matriz***

As análises realizadas para verificação do efeito matriz, utilizando-se de amostras processadas provenientes de plasma normal, lipêmico e hemolisado, nas concentrações dos fármacos equivalentes ao CQB e CQA, não evidenciaram que a metodologia desenvolvida sofresse influência por esses fatores relacionados ao plasma, porque os coeficientes de variação obtidos mostraram-se abaixo do percentual máximo para este ensaio.

- ***Efeito residual***

As análises realizadas para demonstração do efeito residual das amostras branco não trouxeram picos interferentes no tempo de retenção dos fármacos, tampouco do padrão interno.

4.3 Monitorização terapêutica

4.3.1 Fatores que modificaram o efeito dos fármacos na monitorização terapêutica

- ***Idade***

A individualização da terapia para um paciente em particular exige a compreensão da farmacocinética e da farmacodinâmica. Muitos fatores influenciaram na resposta do paciente aos fármacos, incluindo idade, distúrbios patológicos como as alterações hepáticas ou renais, comprometendo a eliminação do fármaco. A interação medicamentosa e alimentar, além dos fatores genéticos e os ligados à formulação medicamentosa também influenciaram na terapêutica e na toxicidade dos fármacos. Ratificamos o encontrado pelos autores citados abaixo que reações adversas são extensões do efeito farmacológico da substância e, em geral, podem ser evitados se a terapia for monitorizada (Israili, 1993; Taylor, *et al*, 1993; Worden, 1994; Nies & Spielberg, 1996; Ambre, *et al*, 1997).

A escolha de trabalharmos apenas com uma faixa etária foi devido as diferenças significativas em cada extremo do espectro etário, os indivíduos apresentam farmacocinética e farmacodinâmica diferentes. Constatamos em um grupo piloto que, existe um risco muito grande em prescrever uma dose para criança ou lactente, por exemplo, a partir da simples redução com base no peso corporal ou na área de superfície. A falta de informações sobre o

uso de fármacos e a imaturidade dos sistemas hepáticas e renais colocam os neonatos e crianças, entre os principais grupos de risco. E devido a porcentagem de água e de gordura e também do desenvolvimento do sistema hormonal, culminam em uma resposta neuroendócrina totalmente diferente. Neste contexto, crianças e adolescentes não participaram do nosso estudo.

As vias de eliminação dos fármacos desenvolvem-se, consideravelmente, no primeiro ano de vida. O ponto crítico é que nos momentos de alteração fisiológica como nos neonatos e na puberdade, alterações na farmacocinética alteram o metabolismo dos fármacos. Desta forma, um contínuo monitoramento terapêutico é essencial para uma terapêutica eficaz (Queiroz, 1990; Israili, 1993; Taylor, *et al*, 1993; Nies & Spielberg, 1996).

Em relação aos antidepressivos, constamos em estudos anteriores realizados pela nossa equipe, que o grupo mais preocupante vem sendo os idosos. A expectativa de vida para pessoas de 75 a 84 anos de idade aumentou 60% e para os acima de 85 anos aumentou de 100%. O Brasil, seguindo os critérios da OMS, adota a idade de 60 anos para considerar idosos. Dados de 1997 do IBGE asseguram que o Brasil tem hoje 13,5 milhões de idosos (8,65% da população) e em 2050 terá 56 milhões, representando 24% da população prevista. Vários fatores tais como desenvolvimento de novos antibióticos, vacinas, melhoria da qualidade de vida pela tecnologia e medidas sanitárias eficazes vem contribuindo de forma expressiva na redução da mortalidade.

Devido ao aumento significativo nesta parcela da população, as internações hospitalares sofreram de forma gradativa, nos últimos anos, um acréscimo de 31% e a unidade de terapia intensiva 42%. Além de o ambiente hospitalar, muitas outras instituições ligadas ao bem estar social, vem sendo constantemente solicitadas através de programas ligados à saúde do idoso.

A depressão é comum na maioria dos pacientes idosos com prevalência estimada entre 5 a 43%. Sendo os antidepressivos, fármacos que normalmente requerem a monitorização terapêutica em um grupo especial de pacientes, como os idosos, o ajuste de dosagem se torna fundamental para a eficácia do tratamento (Gomez & Gomez, 1992; Flint, 1994; Baldwin, 1995; Golderberg, 1997; Tourigny-Rivard, 1997; Small, 1998). Este grupo por características tão especiais também foi excluído deste estudo. Priorizamos os adultos, excluindo os extremos da idade, pois cada paciente é um indivíduo e mesmo tendo a mesma idade e a mesma faixa do IMC, observamos respostas diferentes. Ressaltamos também a necessidade de estudos que abordem o aspecto hormonal relacionado aos antidepressivos, onde a relação neuroendócrina dos pacientes seja estudada e abordada de forma individual. O estágio hormonal

em que cada paciente está vivendo tem uma ligação direta com a resposta aos antidepressivos. Observamos que a resposta muda de paciente para paciente mesmo estando nas mesmas doses e também nas mesmas concentrações plasmáticas, principalmente no grupo feminino, onde a variação hormonal é maior.

- ***Aderência do paciente ao tratamento***

Na última década, diversos estudos vêm sendo realizados sobre o comportamento do paciente em relação ao tratamento, sobre a “aderência do paciente ao tratamento”. Aderência ou *compliance* significa a “concordância entre a prescrição e o comportamento do paciente” (Miller & Anderson, 1996); observamos que este fator vem comprometendo os tratamentos. Podemos citar as doenças crônicas, o uso de múltiplos medicamentos, os problemas psiquiátricos com impedimento cognitivo, os esquemas de dosagens complicados ou mesmo a comunicação ineficiente com profissionais da saúde.

4.3.2 Monitorização terapêutica dos antidepressivos em pacientes deprimidos

As Tabelas 6 a 9, mostram os resultados das dosagens individuais das concentrações plasmáticas da Amitriptilina, Sertralina e Venlafaxina, respectivamente.

Tabela 6 - Concentrações plasmáticas de amitriptilina em pacientes submetidos ao tratamento com Amitryl[®].

Paciente	Dose (mg/dia)	Concentrações plasmáticas (ng/mL)	
		AMITRIPTILINA	NORTRIPTILINA
M.D.P.	25	85,0	37,0
J.G.	25	46,0	39,0
J.J.	25	43,0	ND
M.B.F.	25	36,0	ND
A.M. ¹	25	26,0	25,0
L.C.	25	32,0	ND
J.F.	25	26,0	ND
N.O.	25	32,5	29,6
A.S.C.	25	ND	ND
I.M.A.V.	25	ND	ND
D.C.M.A.C.	25	28,0	10,0
O.J.S.	25	ND	15,0
M.A.S.	25	45,2	54,0
T.M.M.	37,5	ND	ND
A.A.S.	50	74,0	31,6
T.M.P.R.	50	ND	ND
O.M.A.	50	75,0	38,5
M.A.A.	50	53,0	27,0
N.M.D.	50	ND	ND
A.M.R.	50	20,0	15,0
M.J.R.	50	55,5	35,0
V.J.S.	50	15,0	42,5
G.C.S.	50	ND	ND
T.M.S.G.	50	47,0	35,0
N.C.B.	50	94,1	31,4
D.G.	50	48,0	22,0
A.B.	50	83,5	67,3
A.C.M.	50	25,0	15,0
A.P.	50	82,0	25,0
A.M. ²	75	62,0	31,0
L.P.N.	75	93,0	36,0
I.F.S.	75	52,6	11,4
H.N.B.	75	42,3	10,0
G.R.O.	75	66,0	15,0
A.C.J.	75	89,0	17,0
D.F.C.	75	63,0	36,4
A.F.B.	100	251,2	261,0

ND=não determinado

Tabela 7 - Concentrações plasmáticas de sertralina em pacientes submetidos ao tratamento com Cloridrato de Sertralina.

Pacientes	Dose (mg/dia)	Concentrações plasmáticas (ng/mL)
		SERTRALINA
M.A.C.	50	ND
P.M.	50	31,3
R.B.L.R.	50	34,3
E.P.	50	41,0
L.T.	50	50,8
H.C.	50	ND
M.M.	50	35,3
M.B.T.R.	50	44,3
J.P.	50	45,0
W.T.	50	50,8

ND=não determinado

Tabela 8 - Concentrações plasmáticas de Venlafaxina em pacientes submetidos ao tratamento com Cloridrato de Venlafaxina®.

Paciente	Dose (mg/dia)	Concentrações plasmáticas (ng/mL)
		Venlafaxina
A.M.N.	150	44,0
M.M.M.	150	35,0
V.F.F.	125	31,0
O.M.S.	125	34,5
M.L.S.A.	125	50,0
L.A.	150	52,0
L.M.S.	150	46,5
M.A.M.S.	150	65,0
I.O.G.	150	40,4
M.B.	150	39,0
A.L.M.	150	66,8
A.O.V.	185	40,0
M.D.S.S.	185	61,0
C.M.R.	185	54,0
J.S.S.	185	37,6
V.C.R.Z.	150	ND
J.S.	150	41,4
B.G.S.	75	21,0
J.C.N.	75	22,5
C.L.F.S.	75	22,0
J.S.F.	75	33,0

ND=não determinado

Tabela 9 - Concentrações plasmáticas de venlafaxina em uma paciente submetido ao tratamento com Cloridrato de Venlafaxina, na dose de 150mg/dia.

Paciente com 56 anos, sexo feminino, em steady-steady em terapia por 4 anos RHCQ		Estudo Cinético com Venlafaxina (ng/mL)
T zero		37,40
T1	após 1h	98,20
T2	após 2h	140,36
T3	após 4h	98,12
T4	após 6h	88,26
T5	após 8h	61,23
T6	após 10h	55,26
T7	após 12h	50,11
T8	após 24h	39,25

Outros medicamentos associados a esta paciente foram hormônios tireoidianos (88mg) e estrogênicos (natifa), atenolol 25 mg, além do clonazepam na dose de 2 mg/dia. As principais reações adversas relatadas foram a retenção urinária, perda da libido, aumento de colesterol, cansaço após 8 h da medicação; relatou ainda mudança de personalidade e uma irritação quando não descansa. Ressaltou que toma o remédio e sente aumento da temperatura.

A seguir, a Figura 11 mostra um gráfico relacionando as concentrações plasmáticas e as doses do antidepressivo no paciente.

Figura 11 - Relação dose *versus* concentração plasmática da Amitriptilina e da Nortriptilina. A faixa terapêutica da Amitriptilina (Ami+Nor) é de 60–220 ng/mL.

4.3.3 Alterações hepáticas e renais

As alterações farmacocinéticas são resultado de alterações na composição corporal e na função dos órgãos que eliminam os fármacos. A redução na albumina sérica e água total, e o aumento no percentual de gordura corporal resultam em mudanças na distribuição dos fármacos dependendo de sua lipossolubilidade e da ligação às proteínas plasmáticas. A depuração de muitos fármacos foi reduzida nos pacientes com problemas hepáticos e renais.

Com o aumento da idade, fator fundamental na etapa da biotransformação e eliminação dos fármacos, outro dado clinicamente significativo em fármacos de baixo índice terapêutico foi a idade. A atividade do citocromo P450 pode ser reduzida com o avanço da idade, devido à diminuição da capacidade do metabolismo do sistema enzimático e do fluxo sanguíneo hepático. Isto pode potencializar os efeitos farmacológicos e também aumentar os riscos das reações adversas.

A diminuição na taxa de filtração glomerular pode acontecer com a idade, o que justifica um aumento observado na concentração plasmática dos produtos de biotransformação hidroxilados (Queiroz, 1990; Gomez& Gomez, 1992; Miller& Anderson, 1996; Goldberg, 1997).

A coadministração de fármacos é outro fator que modifica a concentração dos mesmos em suas formas livres. Um fármaco, quando deslocado por outro, do sítio de ligação às proteínas plasmáticas acarreta um aumento na fração livre e no volume de distribuição, consequentemente também nos outros fatores cinéticos (Queiroz, 1990); devido a todos estes fatores somente estudamos pacientes adultos, e dosamos os marcadores bioquímicos para enfatizar que neste grupo os marcadores bioquímicos hepáticos e renais não apresentaram valores estatisticamente significativos e também sem relevância clínica; isto mostra que nesta faixa etária os antidepressivos são seguros quanto a possíveis danos hepáticos e renais. Ressaltamos que os estudos referentes a Agomelatina foram realizados em voluntários sadios, pois o medicamento ainda é pouco utilizado no Brasil, assim apesar da literatura, como apresentamos na introdução deste trabalho, ser ainda controversa quanto aos efeitos hepáticos, nosso trabalho contribui de forma relativa, neste quesito pois a dose foi única e o estudo foi em voluntários sadios (Tabela 10).

As metodologias utilizadas para as dosagens bioquímicas foram as propostas pelos kits Labtest e estão apresentadas nas Tabelas 11 a 13.

Nas dosagens bioquímicas apresentadas na Tabela 11 podemos observar que não houve alterações bioquímicas clinicamente significativas, quando os dados foram comparados com o Grupo Controle.

Tabela 10 - Concentrações plasmáticas colhidas no pico (2h) de Agomelatina em voluntários sadios submetidos ao medicamento Valdoxan[®].

Voluntário sadio	Dose (mg/dia)	Concentrações plasmáticas (ng/mL)
		AGOMELATINA
R.M.N.	50	154,0
M.T.M.	50	135,0
O.F.F.	25	81,0
X.M.S.	25	84,5
L.L.S.A.	25	79,0
M.A.	50	182,0
I.M.S.	50	186,5
H.A.M.S.	50	165,0
J.O.G.	50	140,4
P.B.	50	139,0
D.L.M.	50	166,8

Tabela 11 -Análise de variância (ANOVA) dos parâmetros bioquímicos realizados em pacientes submetidos a Amitriptilina, Venlafaxina e Sertralina

Parâmetro Bioquímico (IC, 95%)	Controle média ± DP n = 14	Amitriptilina média ± DP n = 30	Venlafaxina média ± DP n = 20	Sertralina média ± DP n = 10	P
Bil. Direta (mg/dL)	0,16 ± 0,07 (0,13 – 0,20)	0,19 ± 0,12 (0,14 – 0,25)	0,17 ± 0,07 (0,13 – 0,21)	0,11 ± 0,04 (0,08 – 0,14)	> 0,05
Bil. Total (mg/dL)	0,56 ± 0,17 (0,46 – 0,45)	0,64 ± 0,19 (0,53 – 0,70)	0,53 ± 0,17 (0,44 – 0,62)	0,41 ± 0,09 (0,35 – 0,48)	> 0,05
Gama GT (U/L)	26,4 ± 5,1 (23,5 – 29,4)	27,5 ± 12,9 (22,7 – 32,3)	36,3 ± 24,9 (24,6 – 47,9)	35,5 ± 24,9 (17,7 – 53,3)	> 0,05
ALT (U/mL)	16,0 ± 3,23 (12,0 – 15,6)	13,8 ± 4,10 (10,9 – 16,5)	14,1 ± 6,35 (11,9 – 18,9)	14,2 ± 4,0 (11,4 – 18,0)	> 0,05
AST (U/mL)	13,8 ± 3,1 (14,1 – 17,9)	13,7 ± 7,4 (12,2 – 15,3)	15,4 ± 7,4 (11,2 – 17,1)	14,7 ± 4,6 (11,3 – 17,0)	> 0,05
Prot. totais (g/dL)	7,3 ± 0,54 (7,0 – 7,7)	7,3 ± 0,64 (7,0 – 7,5)	7,2 ± 0,46 (6,9 – 7,4)	7,2 ± 0,48 (6,8 – 7,5)	> 0,05
ALP (U/L)	33,9 ± 7,8 (29,5 – 38,5)	39,1 ± 9,9 (35,2 – 44,5)	40,4 ± 11,1 (34,9 – 46,5)	29,5 ± 6,7 (24,7 – 34,3)	> 0,05

Bil. =Bilirrubina; Gama GT= Gama glutamiltransferase; ALT= Alanina aminotransferase; AST= Aspartato Aminotransferase; Prot. Totais= Proteínas totais; ALP= Fosfatase Alcalina; IC, 95% = intervalo de confiança, 95%

Tabela 12 – Análise de Variância (ANOVA) dos parâmetros bioquímicos em pacientes sob terapia com Moclobemida

Parâmetro Bioquímico	Controle (n=15)	MOC (n=8)
	media $\pm$ SD	media $\pm$ SD
Aspartato Aminotransferase (U/L)	16.5 $\pm$ 3.23	17.12 $\pm$ 7.07
Alanina Aminotransferase (U/L)	13.8 $\pm$ 3.15	15.60 $\pm$ 7.17
Gamma- Glutamiltransferase (U/L)	26.4 $\pm$ 5.14	28.53 $\pm$ 6.27
Bilirrubina Total (mg/dL)	0.56 $\pm$ 0.12	0.69 $\pm$ 0.24
Bilirrubina Direta (mg/dL)	0.16 $\pm$ 0.07	0.19 $\pm$ 0.17
Proteínas Totais (g/dL)	7.3 $\pm$ 0.54	7.2 $\pm$ 0.46
Fosfatase Alcalina (U/L)	33.9 $\pm$ 7.8	38.1 $\pm$ 9.9

DP=desvio padrão

Moc = moclobemida

Tabela 13 - Análise de Variância (ANOVA) dos parâmetros bioquímicos em pacientes sob terapia com Sertralina

Parâmetro Bioquímico	Controle (n=15)	Sertralina (n=15)
	media $\pm$ SD	media $\pm$ SD
Aspartato Aminotransferase (U/L)	19.55 $\pm$ 5.19	23.12 $\pm$ 7.07
Alanina Aminotransferase (U/L)	17.70 $\pm$ 5.15	22.60 $\pm$ 7.17
Gamma-Glutamiltransferase (U/L)	26.00 $\pm$ 6.14	19.53 $\pm$ 6.27
Bilirrubina Total (mg/dL)	0.74 $\pm$ 0.12	0.90 $\pm$ 0.24*
Bilirrubina Direta (mg/dL)	0.18 $\pm$ 0.04	0.22 $\pm$ 0.07
Bilirrubina Indireta (mg/dL)	0.56 $\pm$ 0.09	0.68 $\pm$ 0.16*
Fosfatase Alcalina (U/L)	199.13 $\pm$ 32.20	209.46 $\pm$ 61.99

DP = desvio padrão

* nível de significância (p<0.05)

Conclusão

5 CONCLUSÃO

- ***Metodologia analítica***

O método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência por UV descrito permitiu a detecção simultânea e quantificação dos antidepressivos tricíclicos e não tricíclicos, ressaltando principalmente a agomelatina, sertralina e venlafaxina em plasma. Um método simples, utilizando extração líquido:líquido para fins de monitorização terapêutica, estudos farmacocinéticos ou para se verificar a aderência do paciente ao tratamento.

O limite de quantificação e a boa seletividade fizeram deste método rápido, viável e adequado para o monitoramento de rotina terapêutica.

Os parâmetros de validação estão de acordo com os normatizados pela ANVISA – RESOLUÇÃO RDC nº 27, de 17 de maio de 2012 para a determinação de métodos bioanalíticos.

- ***Monitorização terapêutica dos antidepressivos***

- A monitorização terapêutica dos antidepressivos tricíclicos em pacientes demonstrou baixa taxa de aderência ao tratamento e concentração plasmática abaixo dos valores de referência.

- 29,7% dos pacientes (11 pacientes) que usavam Amitriptilina apresentaram concentrações plasmáticas sub-terapêuticas e 16,2% (6 pacientes) não apresentaram concentrações plasmáticas detectáveis.

- 90% dos pacientes que usavam Venlafaxina apresentaram concentrações plasmáticas terapêuticas com correlação com a dosagem e 10 % (3 pacientes) não apresentaram concentrações detectáveis. Os principais efeitos adversos encontrados nesta classe foram de ordem sexual, boca seca, retenção urinária, irritação e ansiedade no pico da medicação e mudança de personalidade; porém todos comprovaram a eficácia terapêutica do medicamento: controle das crises de choro, do impulso ao suicídio, dos pensamentos punitivos, do medo e também controle da dor referente a fibromialgia, pois 100% dos pacientes só controlam a dor com a medicação.

- Dos 80 pacientes analisados, em relação a sertralina, todos apresentaram concentrações plasmáticas terapêuticas compatíveis com a literatura, relataram também controle da depressão porém quanto aos efeitos adversos relataram dores de cabeça e irritabilidade.

Quanto a Agomelatina, podemos apenas ratificar que as concentrações plasmáticas encontradas em nossos voluntários estão de acordo com a literatura.

Referências Bibliográficas

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, C.C; CASTRO, T.R.; CARVALHO, A.F.; VALE, O.C.; et al. Drogas Antidepressivas. Acta Med Port., 2011.

ÁLAMO C; LÓPEZ-MUÑOZ F; ARMANDA MJ. Agomelatina: un nuevo enfoque farmacológico en el tratamiento de la depresión con traducción clínica. Psiq Biol, 2008.

ANVISA. Resolução nº 27, Brasil, 2012.

ARAGÃO, N. M., VELOSO, M. C. C., BITTENCOURT DE ANDRADE, J. Validação de métodos cromatográficos de análise - um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da "Química Verde" na determinação de metilxantinas em bebidas. Química Nova, São Paulo, 2009.

BALDESSARINI RJ: Drug Therapy of Depression and Anxiety Disorders. In: Laurence L.Brunton, editor. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. Eleventh Ed 2006

BAUMANN P; ULRICH S, ECKERMANN G; GERLACH M; et al. The AGNP-TDM Expert Group Consensus Guidelines: focus on therapeutic monitoring of antidepressants. The AGNP-TDM Expert Group Consensus Guidelines: focus on therapeutic monitoring of antidepressants. Dialogues Clin Neurosci, 2005

BERTON O; NESTLER EJ. New approaches to antidepressant drug Discovery: beyond monoamines. Nat. Rev. Neurosci, 2006.

BHATT J; JANGID A; VENKATESH G; et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) method for simultaneous determination of venlafaxine and its active metabolite O-desmethyl venlafaxine in human plasma. J. Chromatogr, 2005.

BODINAT C; GUARDIOLA-LEMAITRE B; MOCAER E; RENARD P; MUÑOZ C; MILLAN MJ. Agomelatine, the first melatonergic antidepressant: Discovery, characterization and development. Nat. Rev. Drug Discovery, 2010.

BOSCHA ME; SANCHES AJR; ROJAS FS; OJEDA CB. Analytical methodologies for the determination of sertralina. J. Pharm. Biomed. Anal, 2008.

BRASIL, Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003, Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos, Diário Oficial União, ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

BRUNTON LL, LAZO JS, PARKER KL: Goodman & Gilman's Pharmacology 2006

CERQUEIRA, M. B. R., DIAS, A. N., CALDAS, S. S., SANTANA, F. B., MONTES D'OCA, M. G., PRIMEL, E. G. Validação de Método para Determinação de Ácidos Orgânicos Voláteis em Efluentes de Reatores Anaeróbios Empregando Cromatografia Líquida. Química Nova, Vol. 34, nº 1, 156-159, 2011.

CHEN D; CHEN Y; HU Y. Optimized separation of cis-trans isomers and enantiomers of sertraline using cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography. Chromatographia, 2004.

CID – 10 Classificação Internacional das doenças e problemas relacionados à saúde. São Paulo: EDUSP; 1997.

CLEMENT EM; ODONTIADIS J; FRANKLIN M. Simultaneous measurement of venlafaxine and its major metabolite, oxydesmethylvenlafaxine, in human plasma by high-performance liquid chromatography with coulometric detection and utilisation of solid-phase extraction. J. Chromatogr, 1998.

DSM - IV. Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais. Porto Alegre: Artes Médicas; 1994.

ESRAFILI A; YAMINI Y; SHARIARI S. Hollow fiber-based liquid phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography for extraction and determination of some antidepressant drugs in biological fluids. Anal. Chim. Acta, 2007.

ESTEBAN C; RODRIGUES CA; NASCIMENTO ES. Determinação de tetraciclina em líquido sinovial de vacas com doença podal. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 2007.

Evaluation of Medicines form Human Use (CHMP). CHMP Assessment Report for Valdoxan. European Medicines Agency, Doc.Ref.: EMEA/655251/2008. London, 2008.

FANALI S; RUDAZ S; VEUTHEY JL; et al. Use of vancomycin silica stationary phase in packed capillary electrochromatography. II. Enantiomer separation of venlafaxine and O-desmethylvenlafaxine in human plasma. J. Chromatogr, 2001

FENG Q; NING L; TING Q; et al. Simultaneous quantification of venlafaxina and O-desmethylvenlafaxine in human plasma by ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry and its application in a pharmacokinetic study. Journal of Chromatography B, 2010.

FERRARINI A; HUIDOBRO AL; PELLATI F; et al. Development and validation of a HPLC method for the determination of sertraline and three non-chiral related impurities. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2010.

FIRST, M. B. et al. Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders - Clinician Version (SCID-CV). Washington: American Psychiatric Press. 1997.

FRAHNERT C; RAO ML; GRASMADER K. Analysis of eighteen antidepressants, four atypical antipsychotics and active metabolites in serum by liquid chromatography: a simple tool for therapeutic drug monitoring, *J. Chromatogr*, 2003.

GARTLEHNER G; HANSEN RA; MORGAN LC; et al. Second-Generation Antidepressants in the Pharmacologic Treatment of Adult Depression: An Update of the 2007 Comparative Effectiveness Review, 2011.

GOODMAN & GILMAN. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. Editora Mc Graw Hill, 11 Edição, 2007.

GRAEFF FG; BRANDÃO ML. *Neurobiologia das doenças mentais*. São Paulo: Lemos Editorial, 1993.

GUARDIOLA-LEMAITRE B. Agonistes et antagonistes des récepteurs mélatoninergiques: effets pharmacologiques et perspectives thérapeutiques. *Ann Pharm Fr*, 2005.

HASHEMI SN; GHAFARIAN SHIRAZI HR; MOHAMMADI A; ET AL. Nortriptyline versus fluoxetine in the treatment of major depressive disorder: a six-month, double-blind clinical trial. *Clinical Pharmacology: Advances and Applications*, 2012

HE L; FENG F; WU J. Determination of sertraline in human plasma by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry and method validation. *J. Chromatogr. Sci*, 2005.

HIRANO K; KIMURA R; SUGIMOTO Y; et al. Relationship between brain serotonin transporter binding, plasma concentration and behavioural effect of selective serotonin reuptake inhibitors. *Br. J. Pharmacol*, 2005.

HODGSON, R. et al. The FAST Alcohol Screening Test. *Alcohol Alcohol*, v. 37, n. 1, p. 61-66, 2002.

HUTTUNEM KM; RAUTIO J; LEPPÄNEN J; et al. Determination of metformin and its prodrugs in human and rat blood by hydrophilic interaction liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2009.

KAPLAN HI; SADOCK BJ. Tratado de Psiquiatria. Porto Alegre: ARTMED;1997.

KATZUNG B: Basic & Clinical Pharmacology. Editora McGraw Hill. 10th 2006.

KEEGANMT, BROWN DR, RABINSTEIN AA: Serotonin syndrome from the interaction of cyclobenzaprine with other serotonergic drugs. *Anesth Analg* 2006.

KRAUS RL, LI Y, JOVANOVSKA A, RENGGER JJ: Trazodone inhibits T-type calcium channels. *Neuropharmacology* 2007; 53(2):308-317

KROENKE, K.; SPITZER, R. L.; WILLIAMS, J. B. The Patient Health Questionnaire-2: validity of a two-item depression screener. *Med Care*, v. 41, n. 11, p. 1284-1292, 2003.

LABAT L; DEVEAUX M; DALLET P; DUBOST JP. Separation of new antidepressants and their metabolites by micellar electrokinetic capillary chromatography. *J. Chromatogr*, 2002.

LAFER B; ALMEIDA OP; FRAGUAS G Jr; MIGUEL EC. Depressão no ciclo da vida. Porto Alegre: Artes Médicas; 2000.

LAFER B; VALLADA FILHO HP. Genética e fisiopatologia dos transtornos depressivos. *Ver Bras Psiquiatria*, 1999.

LAVERGNE F, BERLIN I, GAMMA A, STASSEN H, ANGST J: Onset of improvement and response to mirtazapine in depression: a multicenter naturalistic study of 4771 patients. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2005.

LEMKE MR. Antidepressant effects of dopamine agonists: experimental and clinical findings. *Nervenarzt*, 2007.

LEONARD BE. The role of noradrenaline in depression: a review. *J. Psychophatology*, 1997.

LIMA IVM; SOUGEY EB; VALLADA-FILHO HP. Farmacogenética do tratamento da depressão: busca de marcadores moleculares de boa resposta aos antidepressivos. *Rev. Psiqu. Clín*, 2004.

LIU W; CAI H; LI H. J. High performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-MS/ESI) method for simultaneous determination of venlafaxine and its three metabolites in human plasma. *Chromatogr*, 2007.

MALFARÁ WR; BERTUCCI C; COSTA QUEIROZ ME; et al. Reliable HPLC method for therapeutic drug monitoring of frequently prescribed tricyclic and nontricyclic antidepressants. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2007.

MANDRIOLI R; MERCOLINI L; CESTA R; et al. Analysis of the second generation antidepressant venlafaxine and its main active metabolite O-desmethylvenlafaxine in human plasma by HPLC with spectrofluorimetric detection. *J. Chromatogr*, 2007.

MANDRIOLI R; SARACINO MA; FERRARI S; et al. HPLC analysis of the second-generation antidepressant sertraline and its main metabolite N-desmethylsertraline in human plasma. *J. Chromatogr*, 2007.

MANN JJ. The medical management of depression. *N Engl J Méd*, 2005.

MATTOS P. Impacto social e econômico da depressão. In: MORENO DH; BERNIK M; MATTOS P; CORDÁS TA. *Recuperação em depressão*. São Paulo: Livre, 2003.

MEREDITH LS. Depression: 20 years of progress. *Med Care*, 2004.

MILLAN MJ; BROCCO M; GOBERT A; DEKEYNE A. Anxiolytic properties of agomelatine, an antidepressant with melatonergic and serotonergic properties: role of 5HT_{2C} receptor blockade. *Psychopharmacology*, 2005.

MILLAN MJ; GOBERT A; LEJEUNE F; et al. The novel melatonin agonist agomelatine (S20098) is an antagonist at 5-hydroxy-tryptamine 2C receptors, blockade of which enhances the activity of fronto cortical dopaminergic and adrenergic pathways. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003.

MUNEOKA K, SHIRAYAMA Y, TAKIGAWA M, SHIODA S. Brain region-specific effects of short-term treatment with duloxetine, venlafaxine, milnacipran and sertraline on monoamine metabolism in rats. *Neurochem Res*. 2009

NETO AIA. Determinação de antidepressivos em plasma humano por cromatografia líquida de rápida resolução acoplada a um detector de fotodiodos (UPLC-DAD). Dissertação de mestrado apresentado à Universidade da Beira Interior ao programa de pós-graduação em Ciências da Saúde. Covilhã, 2011.

NUNES LC. Métodos quimiométricos aplicados na determinação espectrofotométrica de misturas de aminoácidos. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa ao programa de pós-graduação em Agroquímica, Viçosa, Minas Gerais, 2007.

OPAS/OMS. Programa de Salud Mental, División de Promoción de Salud. Modelo para la capacitación de la enfermería general en al identificación y manejo de los transtornos afectivos. Generalista I, 1997.

PACHER P, KECSEMETI V. Trends in the development of new antidepressants. Is there light at the end of the tunnel? *Curr Med Chem*, 2004.

PANDI-PERUMAL SR; SRINIVASAN V; CARDINALI DP; MONTI JM. Could agomelatine be the ideal antidepressant. *Expert Rev Neurotherapeutics*, 2006.

PARKER G; BROTHIE H. Major depression invites major concerns. *Rev Brs Psiquiatria*, 2009

PATEL BN; SHARMA N; SANYAL M; SHRIVASTAV PS. Analysis of second-generation antidepressant drug, sertraline and its active metabolite, N-desmethyl sertraline in human plasma by a sensitive and selective liquid chromatography tandem mass spectrometry method. *J. Chromatogr*, 2009.

PATEL BN; SHARMA N; SANYAL M; SHRIVASTAV PS. Liquid chromatography tandem mass spectrometry assay for the simultaneous determination of venlafaxine and O-desmethylvenlafaxine in human plasma and its application to a bioequivalence study. *Pharm. Biomed. Anal*, 2008.

PATHAK A; RAJPUT SJ. Development of a stability-indicating high-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of alprazolam and sertraline in combined dosage forms. *J. AOAC Int*, 2008.

PATIL SR; NERURKAR KK; KALAMKAR AM; et al. Validated LC-MS/MS method for quantification of agomelatine in human plasma and its application in a pharmacokinetic study. *Journal of Mass Spectrometry*, 2011.

QUEIROZ SCN; COLLINS CH; JARDIM ICSF. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. *Quim. Nova*, 2001.

RANG HP & DALE MM. *Farmacologia*. Editora Elsevier, 6 Edição, 2008.

RAO RN; TALLURI MV; MAURYA PK. Separation of stereoisomers of sertraline and its related enantiomeric impurities on a dimethylated beta-cyclodextrin stationary phase by HPLC. *J. Pharm. Biomed. Anal*, 2009.

REIS M; AAMO T; SPIGSET O; AHLNER J. Serum concentrations of antidepressant drugs in a naturalistic setting: compilation based on a large therapeutic drug monitoring database. *Ther. Drug Monit*, 2009.

RIBANI, M. BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F., MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, 2004.

RUDBERG I; HERMANN M; REFSUM H; MOLDEN E. Serum concentrations of sertraline and N-desmethyl sertraline in relation to CYP2C19 genotype in psychiatric patients. *Eur. J. Clin. Pharmacol*, 2008.

SAINT-CLAIR, B. Depressão: Uma Breve Revisão dos Fundamentos Biológicos e Cognitivos, 1999.

SANTANA AKM; NUNES LCC; MEDEIROS FPM; et al. Otimização e validação do método analítico volumétrico para a quantificação do carbonato de cálcio. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada*, 2007.

SCALCO MZ: Tratamento de idosos com depressão utilizando tricíclicos, IMAO, ISRS e outros antidepressivos. *Rev Bras Psiquiat*, 2002.

SCATES AC, DORAISWAMY PM. REBOXETINE: a selective norepinephrine reuptake inhibitor for the treatment of depression. *Ann Pharmacother*, 2000.

SILVA JA; BEDRO DCG; SOUSA CEM; et al. Desenvolvimento e validação de método analítico para a quantificação de diclofenaco de dietilamônio em pele humana por cromatografia líquida de alta eficiência. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica*, 2010.

STAHL SM. Psicofarmacologia: bases neurocientíficas e aplicações clínicas. Rio de Janeiro: MEDSI – Editora Médica e Científica Ltda., 1998.

STAHL SM: *Essential Psychopharmacology of Depression and Bipolar Disorder*. Cambridge University Press, 2000.

SWGTOX. *Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology*, 2013.

THERON HB; MERWE MJ; SWART KJ, WESTHUIZEN JH. Employing atmospheric pressure photoionization in liquid chromatography/tandem mass spectrometry to minimize ion suppression and matrix effects for the quantification of venlafaxine and O-desmethylvenlafaxine. *Rapid Commun. Mass Spectrom*, 2007.

VISMARI L; ALVES GJ; PALERMO-NETO J. Depressão, antidepressivos e sistema imune: um novo olhar sobre um novo problema. *Rev Psiq Clín*, 2008.

WEN L; YING-CHUN D; NANG G; et al. Development and validation of a HPLC-MS/MS method for the determination of venlafaxina enantiomers and application to a pharmacokinetic study in healthy Chinese volunteers. *Biomed Chromatography*, 2011.

WILKES S: Bupropion. *Drugs Today (Barc)* 2006.

World Health Organization. www.who.int Saúde Mental – Depressão. (consultado em Abril de 2013).

World Health Organization(WHO). A user's guide to Self-Reporting Questionnaire. Geneva. 1993.

XUE JUN H; ZHEN R; JUAN W; et al. Determination of agomelatine by RP-HPLC. *West Chin. J. pharm. Sci*, 2010.

ZHOU MX; FOLEY JP. Analytical method for the quantitation of sertralina hydrochloride stereoisomers by electrokinetic chromatography. *J. Chromatogr*, 2004.

ZUPANCIC M; GUILLEMINAULT C. Agomelatine. A preliminary review of a new antidepressant. *CNS Drugs*, 2006.

Anexos

ANEXOS

- **Anexo 1:** Apreciação do Comitê de Ética em pesquisa da FCFRP/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Of. CEP/FCFRP nº. 010/2013
kms

Ribeirão Preto, 4 de abril de 2013.

À Pós-graduanda
Bruna Cordeiro Santos de Moura
Orientadora: Profª. Drª. Regina Helena Costa Queiroz
FCFRP/USP

Prezada Pós-graduanda,

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP aprovou, em sua 114ª reunião ordinária realizada em 04.04.2013, o projeto de pesquisa intitulado “**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA FINS DE MONITORIZAÇÃO TERAPÊUTICA DA AGOMELATINA, SERTRALINA E VENLAFAXINA**”, apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo **CEP/FCFRP nº. 288**.

Informamos que conforme Carta Circular 003/2011 da CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa), o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso e também o pesquisador responsável deverão rubricar todas as páginas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE, apondo sua assinatura na última página do referido Termo. Ainda, de acordo com a Resolução 196/96, item IV.2, letra d, “o TCLE deverá ser elaborado em duas vias, sendo uma retida pelo sujeito da pesquisa ou por seu representante legal e uma arquivada pelo pesquisador”.

Em atendimento à Resolução 196/96, lembramos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa em formulário próprio deste Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe.

Atenciosamente,

PROFª. DRª. MARIA REGINA TORQUETTI
Coordenadora do CEP/FCFRP

- **Anexo 2:** Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA
DOAÇÃO DE PLASMA PARA PESQUISA**

**Laboratório de Toxicologia
FCFRP-USP**

NOME DO DOADOR/ IDADE:/.....

REGISTRO E/OU DOCUMENTO DE IDENTIFICAÇÃO:

Este é um convite para você participar da pesquisa: **Desenvolvimento e validação de metodologia para fins de monitorização terapêutica da agomelatina, sertralina e venlafaxina**, sob a orientação da professora Dr^a. Regina Helena Costa Queiroz, Docente da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

Sua participação é voluntária, o que significa que você poderá desistir a qualquer momento, sem que isso lhe traga qualquer prejuízo.

Essa pesquisa busca estudar o desenvolvimento de um método para análise dos medicamentos agomelatina, sertralina e venlafaxina em plasma humano, para futuramente poder ser utilizado, sob indicação médica, no acompanhamento de pacientes usuários de uma das medicações em estudo, a fim de se obter os benefícios máximos dos medicamentos e minimizar os seus efeitos adversos (efeitos tóxicos). A agomelatina, sertralina e venlafaxina são medicamentos utilizados no tratamento da depressão.

Caso decida aceitar o convite, você será submetido(a) a coleta de 10mL de sangue, do qual utilizaremos apenas o plasma e o restante será descartado. Após a finalização da pesquisa, o material biológico coletado será descartado.

Os riscos envolvidos com sua participação são mínimos e caso ocorram, serão por causa da coleta de sangue, tais como pequeno desconforto no local da picada, necessidade de mais de uma picada, queda de pressão, possível mal-estar e inflamação da veia após a coleta. O presente estudo não trará benefícios ao voluntário doador.

Todas as informações obtidas serão sigilosas e seu nome não será identificado em nenhum momento. Os dados serão guardados em local seguro e a divulgação dos resultados será feita de forma a não identificar os voluntários. Se você tiver algum gasto que seja devido à sua participação na pesquisa, você será ressarcido, caso solicite. Em qualquer momento, se você sofrer algum dano comprovadamente decorrente desta pesquisa, você terá direito a indenização.

Você ficará com uma cópia deste Termo e toda a dúvida que você tiver a respeito desta pesquisa, poderá perguntar diretamente para a aluna de mestrado Bruna Cordeiro Santos de Moura pesquisadora responsável pela pesquisa, nos telefones: (16) 3602 4259 e (16) 9125 9571.

Dúvidas a respeito da ética dessa pesquisa poderão ser questionadas ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, no endereço Av. do Café, s/n °, Campus Universitário, Ribeirão Preto, telefone (016) 3602-4213 e e-mail: cep@fcfrp.usp.br.

Declaro que compreendi os objetivos desta pesquisa, como ela será realizada, os riscos e benefícios envolvidos e concordo em participar voluntariamente da pesquisa.

Bruna Cordeiro Santos de Moura
CPF nº 365.727.498/78

Prof^a. Dr^a. Regina Helena Costa Queiroz
CPF nº 037.077.888/06

Assinatura do Doador

• **Anexo 3:** Questionário de Identificação

QUESTIONÁRIO DE IDENTIFICAÇÃO		
Nome: _____		
Telefone Celular: () _____		
Telefone Residencial: () _____		
Telefone para recado: () _____		
Endereço de Contato: Logradouro (Rua, Av.): _____		
No. _____ Complemento: _____		
Bairro: _____ Cidade: _____ Estado: _____		
Melhor horário para que o pesquisador entre em contato : Manhã() Tarde() Noite()		
Idade: _____ anos Sexo: _____ (1-Masc.; 2-Fem.) Peso: _____ Altura: _____		
Situação laboral: _____ (1 Autônomo; 2 Empregado informalmente (<i>free lancer</i>); 3 Empregado formalmente; 4 Cuidando do lar; 5 Desempregado; 6 Inativo (Aposentado por invalidez - incapaz); 7 Inativo (Aposentado por tempo de serviço); 8 Afastado; 9 Outros)		
Estado Civil: _____ (1-casado; 2-solteiro; 3-relação estável; 4-divorciado; 5-viúvo)		
Cor ou raça (IBGE): _____ (1 – Branca; 2 – Preta; 3 – Parda; 4 – Amarela; 5 - Índio)		
Escolaridade: _____ (1 Analfabeto; 2 Ensino fundamental incompleto; 3 Ensino fundamental completo; 4 Ensino médio incompleto; 5 Ensino médio completo; 6 Ensino superior incompleto; 7 Ensino superior completo; 8 Mais de uma faculdade/ Pós-graduação)		
Curso: _____ Ano: _____ Período: _____		
Você tem ou teve alguma sintoma psiquiátrico? ☐ SIM ☐ NÃO Qual? _____		
Faz uso de alguma medicação? ☐ SIM ☐ NÃO		
Qual(is)? _____		
Faz psicoterapia? ☐ SIM ☐ NÃO Se sim, há quanto tempo? _____		
Já recebeu diagnóstico de Fobia Social ? ☐ SIM ☐ NÃO		
Se sim, há quanto tempo? _____		
Fez tratamento para Fobia Social? ☐ SIM ☐ NÃO		
Se sim, há quanto tempo? _____ Idade no início da Fobia Social: _____		
Faz uso de drogas ou substâncias ilícitas? ☐ SIM ☐ NÃO		
Se sim, qual e há quanto tempo? _____		
Você é ou já foi Fumante? ☐ SIM ☐ NÃO		
Caso <u>seja</u> ou <u>tenha</u> sido fumante, por favor, responda às perguntas abaixo:		
A) Idade que começou a fumar regularmente (ANOS): _____		
B) Por quantos anos fuma ou fumou: _____		
História familiar de transtorno(s) psiquiátrico(s)? ☐ SIM ☐ NÃO		
Se sim, qual o parentesco ? _____		
Se sim, qual transtorno? _____		

• **Anexo 4:** Questionário sobre a saúde do Paciente

PHQ9P

QUESTIONÁRIO SOBRE A SAÚDE DO/A PACIENTE-9 72883 (Portuguese for Brazil version of the PHQ-9)				
THIS SECTION FOR USE BY STUDY PERSONNEL ONLY. Were data collected? No ☐ (provide reason in comments) If Yes, data collected on visit date ☐ or specify date: _____ <small>DD-Mon-YYYY</small>				
Comments:				
Only the patient (subject) should enter information onto this questionnaire.				
Durante as últimas 2 semanas, com que frequência você foi incomodado/a por qualquer um dos problemas abaixo?	Nenhu- ma vez	Vários dias	Mais da metade dos dias	Quase todos os dias
1. Pouco interesse ou pouco prazer em fazer as coisas	0	1	2	3
2. Se sentir "para baixo", deprimido/a ou sem perspectiva	0	1	2	3
3. Dificuldade para pegar no sono ou permanecer dormindo, ou dormir mais do que de costume	0	1	2	3
4. Se sentir cansado/a ou com pouca energia	0	1	2	3
5. Falta de apetite ou comendo demais	0	1	2	3
6. Se sentir mal consigo mesmo/a — ou achar que você é um fracasso ou que decepcionou sua família ou você mesmo/a	0	1	2	3
7. Dificuldade para se concentrar nas coisas, como ler o jornal ou ver televisão	0	1	2	3
8. Lentidão para se movimentar ou falar, a ponto das outras pessoas perceberem? Ou o oposto — estar tão agitado/a ou irrequieto/a que você fica andando de um lado para o outro muito mais do que de costume	0	1	2	3
9. Pensar em se ferir de alguma maneira ou que seria melhor estar morto/a	0	1	2	3
SCORING FOR USE BY STUDY PERSONNEL ONLY _____ + _____ + _____ + _____ =Total Score: _____				
Se você assinalou <u>qualquer</u> um dos problemas, indique o grau de <u>dificuldade</u> que os mesmos lhe causaram para realizar seu trabalho, tomar conta das coisas em casa ou para se relacionar com as pessoas?				
Nenhuma dificuldade ☐	Alguma dificuldade ☐	Muita dificuldade ☐	Extrema dificuldade ☐	
Copyright © 2005 Pfizer Inc. Todos os direitos reservados. Reproduzido sob permissão. EPI0905.PHQ9P				
Declaro que as informações contidas neste questionário são verdadeiras.		Iniciais do/a paciente:		Data: