UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

**Análise toxicológica de antidepressivos em sangue total
por cromatografia em fase gasosa com detector de
nitrogênio e fósforo**

Daniela Mendes Louzada de Paula

Dissertação para a obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Regina Lúcia de Moraes Moreau

São Paulo
2007

Daniela Mendes Louzada de Paula

**Análise toxicológica de antidepressivos em sangue total por
cromatografia em fase gasosa com detector de nitrogênio e fósforo**

Dissertação para a obtenção do grau de
MESTRE.

Orientadora:

Profa. Dra. Regina Lúcia de Moraes Moreau

São Paulo

2007

Daniela Mendes Louzada de Paula

**Análise toxicológica de antidepressivos em sangue total por
cromatografia em fase gasosa com detector de nitrogênio e fósforo**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Regina Lúcia de Moraes Moreau
orientadora/presidente

Prof. Dr. Bruno Spinosa de Martinis
1º. examinador

Tânia Marcourakis
2º. examinador

São Paulo, 26 de março de 2007.

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Sebastião e Maria do Carmo,
por me ensinarem que com dedicação e honestidade
é possível alcançar o almejado.*

*À Profa. Regina Lúcia
pelo apoio e companheirismo
apresentado ao longo desses anos.*

Agradecimentos

Embora uma dissertação seja, pela sua finalidade acadêmica, um trabalho individual, há contribuições de natureza diversa que não podem, nem devem, deixar de ser realçados. Por essa razão, desejo expressar os agradecimentos:

Aos meus familiares, em especial aos meus irmãos, Daniel e Dayana, Tia Imaculada, Tio Samuel, Fernanda, Tio Raniel e Tia Du Carmo, pela compreensão, apoio, acolhida e amor oferecidos ao longo desse período.

Ao sempre presente, Josenilton, pelo carinho e força oferecidos nos bons e maus momentos.

A minha amiga, Mônica C. Sampaio, pela colaboração no andamento das tarefas do laboratório nos momentos que a minha atenção estava voltada para o desenvolvimento deste projeto.

À Profa. Éster N. Palácios, por permitir o meu encontro com a pesquisa.

À Profa. Regina Lúcia, professora e orientadora, pela oportunidade, disponibilidade, amizade e por proporcionar liberdade para aprender com os meus erros.

À equipe do CCI, em especial à Dra Darciléia Amaral, à Dra Maria Zilda N. Carrazza e à Edna Maria M. Hernandez, pela colaboração nas coletas de amostras, sem os quais este trabalho seria prejudicado, e pelas diversas sugestões proporcionadas.

À equipe do IML, pela colaboração na seleção das amostras, pela paciência e atenção dispensada, em especial a perita Débora G. de Carvalho.

Aos professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Profa. Elizabeth Nascimento, Profa. Silvia R. C. Santos, Profa. Sandra Farsky, Profa. Silvia Berlanga, Profa. Ana Paula Loureiro, Prof. Ernani Pinto, Prof. Maurício Yonamine, Profa. Tânia Marcourakis, e Profa. Alice Chasin, pelas sugestões, incentivos e por todo aprendizado conquistado por meio do convívio diário. Ao

Prof. Maurício Yonanime, um agradecimento em especial, pela confiança, investimento, apoio e por representar profissional exemplar a ser seguido.

Aos amigos da pós-graduação, Émerson, Alexandre, Sandra, Cristina, Karine, Daniellê, Igo, Julita, Silvia, Paula, Meron, Fabiana, Sydnei, Vânia, Virgínia, Fabriciano, Tiago, Renata, Willian, Carolina, Rafael, Leandro, Cecília, Melissa e Ana Verônica pelo companheirismo e auxílio e pelas diversas alegrias.

Aos colegas do laboratório, Mônica, Ângelo, Carmen, Raphael, Felipe e Suellen, pela colaboração e convívio diário. Aos estagiários do laboratório, Luciana, Kátia, Wagner, Amanda, Ana Paula, Marli e Mariana, que foram um incentivo para o enriquecimento do meu conhecimento. Às funcionárias da Toxicologia, Roseli, Karla, Helena, Luzia e Dalva, sem as quais as dificuldades seriam ainda maiores.

E por último, mas sempre o primeiro, a Deus, Aquele que sempre me guarda e me escuta.

Obrigada a todos!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1. Classe dos antidepressivos	4
2.2. Cinética	5
2.3. Uso terapêutico	16
2.4. Incidência de intoxicação	18
2.5. Incidência de suicídio	22
2.6. Toxicidade	25
2.6.1. Os antidepressivos tricíclicos	26
2.6.2. Os inibidores seletivos de recaptura de serotonina	31
2.7. O papel da análise toxicológica de antidepressivos	34
2.7.1. Matrizes biológicas	37
2.7.2. Extração	39
2.7.3. Detecção e identificação	42
3. OBJETIVO E PLANO DE TRABALHO	45
4. MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1. Material	46
4.1.1. Soluções – padrão	46
4.1.2. Equipamentos e acessórios	46
4.1.3. Reagentes	47
4.1.4. Amostras de sangue total	47
4.1.5. Ética	49
4.2. Métodos	49
4.2.1. Desenvolvimento de método para determinação de antidepressivos e produtos de biotransformação em sangue total	49
4.2.1.1. Preparação da amostra	49
4.2.1.2. Extração	49
4.2.1.3. Condições cromatográficas	51
4.2.2. Resolução entre os picos cromatográficos	51
4.2.3. Parâmetros de validação analítica	52
4.2.3.1. Especificidade	52
4.2.3.2. Limite de detecção	53
4.2.3.3. Limite inferior de quantificação	53
4.2.3.4. Linearidade	54
4.2.3.5. Precisão	56
4.2.3.6. Recuperação	57
4.2.3.7. Estabilidade	58
4.2.4. Carryover	58
4.2.5. Aplicação do método em amostras de sangue total	59
5. RESULTADOS	60
5.1. Resolução entre os picos cromatográficos	60
5.2. Especificidade	61
5.3. Limite de detecção e quantificação	61
5.4. Linearidade	62
5.5. Precisão intra e interensaio	63
5.6. Recuperação	64
5.7. Estabilidade	65

5.8. Carryover	65
5.9. Validação parcial	65
5.10. Aplicação do método em amostras de sangue total	67
6. DISCUSSÃO	75
7. CONCLUSÕES	92
REFERÊNCIAS*	93
APÊNDICE	102
ANEXOS	104

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais produtos de biotransformação da amitriptilina na urina e a porcentagem de eliminação	7
Figura 2 - Principais produtos de biotransformação da nortriptilina na urina e a porcentagem de eliminação	8
Figura 3 - Principais produtos de biotransformação da imipramina na urina e a porcentagem de eliminação	9
Figura 4 - Principais produtos de biotransformação da clomipramina.....	10
Figura 5 - Principais produtos de biotransformação da fluoxetina.....	11
Figura 6 - Principais produtos de biotransformação da sertralina	12
Figura 7 - Propagação do impulso/eletrocardiograma.....	28
Figura 8 - (A) Eletrocardiograma de uma paciente com 44 anos após a ingestão de elevada dose de desipramina e (B) Eletrocardiograma de um indivíduo normal	29
Figura 9- Critérios de Busca de Toxicidade Serotoninérgica	32
Figura 10 - Alteração na derivação aVR nas intoxicações por antidepressivos	36
Figura 12- Cromatograma de uma amostra de sangue total referência negativa adicionada do PI (etidocaína) e dos antidepressivos selecionados neste estudo na concentração do limite superior de quantificação	60
Figura 13 - Cromatograma obtido de uma amostra de sangue total heparinizada para estudo da especificidade, mostrando a presença de um interferente	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos antidepressivos.....	5
Tabela 2 - Parâmetros farmacocinéticos dos antidepressivos	12
Tabela 3- ITF e DL50	26
Tabela 4 - Fatores de risco que predisõem as convulsões	30
Tabela 5 - Concentrações em mg/L utilizadas na linearidade	56
Tabela 6 - Resolução entre os picos cromatográficos.....	60
Tabela 7 - Limite de detecção e quantificação dos antidepressivos em mg/L.....	62
Tabela 8 - Resultados da linearidade dos antidepressivos em sangue com o anticoagulante citrato/ fosfato/ dextrose-adenina	63
Tabela 9 - Dados do coeficiente de variação da precisão dos antidepressivos, em %	64
Tabela 10 - Dados da porcentagem de recuperação dos antidepressivos.....	64
Tabela 11 - Estabilidade das amostras de antidepressivos, em %, em relação a uma amostra recém – preparada	65
Tabela 12 - Resultados da linearidade dos antidepressivos em sangue com heparina	66
Tabela 13 - Resultados da linearidade dos antidepressivos em sangue <i>post mortem</i>	66
Tabela 14 - Resultados das amostras analisadas obtidas do CCI-SP	68
Tabela 15 - Resultados das amostras analisadas obtidas do IML - SP	71

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição da incidência de intoxicação por antidepressivos divididos por grupo e por ano	20
Gráfico 2 - Distribuição da incidência de intoxicação por inibidores seletivos de recaptção de serotonina divididos por fármaco e por ano	21
Gráfico 3 - Distribuição da incidência de intoxicação por antidepressivos tricíclicos divididos por fármaco e por ano	22
Gráfico 4 - Linhas de tendência das linearidades em sangue total dos antidepressivos.....	63

Resumo

PAULA, D.M.L. MOREAU, R.L.M. **Análise toxicológica de antidepressivos em sangue total por cromatografia em fase gasosa com detector de nitrogênio e fósforo.** 2007. 108f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Um método cromatográfico foi desenvolvido para determinação dos antidepressivos mais prescritos no Brasil e seus produtos de biotransformação (amitriptilina, imipramina, clomipramina, desmetilclomipramina, desipramina, nortriptilina, fluoxetina, norfluoxetina e sertralina) em sangue total por cromatografia em fase gasosa com detector de nitrogênio e fósforo. A extração em fase sólida (EFS) com o cartucho abselut™ NEXUS foi empregada de forma inovadora. O procedimento de extração consistiu na diluição de 0,5mL de sangue total em tampão (pH 9,5), aplicação da amostra no cartucho, remoção de interferentes usando tampão (pH 9,5) e eluição dos analitos com diclorometano/ isopropanol (17/3 v/v); a etidocaína foi adotada como padrão interno. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LIQ) encontrados foram de 0,1mg/L a 0,4mg/L e de 0,4mg/L a 1,6mg/L, respectivamente. O método foi preciso, específico e linear na faixa de concentração estudada (do LIQ até 12mg/L). A recuperação média de todos os analitos foi 65,5%. O método foi aplicado em amostras de âmbito forense e de emergência clínica.

Palavras-chave: antidepressivos, extração em fase sólida, cromatografia gasosa com detector de nitrogênio e fósforo, sangue total, intoxicação.

Abstract

PAULA, D.M.L. MOREAU, R.L.M. **Toxicology analysis of antidepressants in whole blood with gas chromatography and nitrogen-phosphorus detection.** 2007. 108f. (Master) – College of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2007.

A gas chromatographic method was developed to determine antidepressants most prescribed in Brazil and their metabolites (amitriptyline, imipramine, clomipramine, desmethylclomipramine, desipramine, nortriptyline, fluoxetine, norfluoxetine, and sertralina) in whole blood, using solid phase extraction and gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. The solid-phase extraction (SPE) with absolut™ NEXUS was applied in an innovative manner. The extraction procedure consists of the dilution of 0.5mL of whole blood in buffer (pH 9.5), application of the sample in the cartridge, washing with buffer (pH 9.5) and elution of the analytes with dichloromethane/isopropanol (17/3, v/v). The limit of detection (LOD) and quantification (LLOQ) were from 0.1mg/L to 0.4mg/L and from 0.4mg/L to 1.6mg/L, respectively. Etidocaine was used as internal standard. The method was precise, specific and linear in the studied concentration (range from LLOQ to 12mg/L). The average recovery of all analytes was 65,5%. Forensic and clinical emergency samples were submitted to the validated method.

Keywords: antidepressants, solid phase extraction, gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection, whole blood, intoxication.

1. INTRODUÇÃO

É crescente o número de pacientes intoxicados por medicamentos nos centros de emergências do mundo. No Brasil, os benzodiazepínicos, os antigripais, os antidepressivos e os antiinflamatórios são as classes de medicamentos com maior índice de intoxicação, segundo a base de dados do Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX), no período de 1993 a 1996 (BORTOLETTO; BOCHNER, 1999). No Centro de Controle de Intoxicação da Prefeitura de São Paulo (CCI-SP) durante o período de 1998 a 2002, dentre os agentes mais freqüentes envolvidos nas exposições, 43,4% foi devido aos medicamentos, sendo que o grupo dos antidepressivos e lítio foi responsável por 8,55% das notificações por intoxicações.

Os casos de intoxicações graves e fatais por antidepressivos possuem uma estreita relação com o suicídio. Na Inglaterra e no País de Gales, cerca de 80% das mortes por antidepressivos foram por intoxicação intencional entre os anos de 1998 e 2000 (CHEETA et al., 2004).

Esses números ganham relevância no contexto amplo da emergência clínica e da forense, quando se observa a restrita população que tem acesso aos antidepressivos. Esses fármacos são comercializados apenas com a apresentação e a retenção da prescrição médica, dessa forma a aquisição desses medicamentos se limita aos usuários com acompanhamento médico. Além disso, os antidepressivos são prescritos, principalmente, para os indivíduos com problemas psiquiátricos, e essa população apresenta uma incidência de suicídio maior do que a população geral (HEALY; LANGMAAK; SAVAGE, 1999; DHOSSCHE, 2003; BRADVIK; BERGLUND, 2005).

A classe de antidepressivos tricíclicos (ADTs) é composta por fármacos que estão envolvidos em situações da emergência clínica e do âmbito forense desde o início da sua comercialização na década de 60. São potencialmente fatais, como resultado da toxicidade cardiovascular manifestada por anormalidades do eletrocardiograma, arritmias e hipotensão (THANACOODY; THOMAS, 2005). E

assim, apresentam índices de toxicidade fatal (ITF) alto, muitas vezes classificados de risco inaceitável (MONTGOMERY; BALDWIN; GREEN, 1989; CHEETA et al., 2004).

Com o avançar da farmacologia e a introdução de antidepressivos mais seguros, como os inibidores seletivos de recaptura de serotonina (ISRSs), a gravidade das intoxicações diminuiu. Apesar dessa segurança, em dezembro de 2003, a *Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency* (MHRA) advertiu contra o uso de todos os ISRSs em crianças, exceto a fluoxetina. O *United State Food and Drug Administration* (FDA) emitiu, em março de 2004, uma advertência pública alertando os médicos para monitorarem os pacientes em tratamento com os ISRSs, tanto crianças quanto adultos, em relação à piora da depressão e/ou risco de suicídio (CULPEPPER et al., 2004).

Nesse contexto, os laboratórios de toxicologia de emergência têm a importância de oferecer aos clínicos, uma evidência objetiva da natureza e da magnitude da exposição a um agente em particular ou a um grupo de compostos (FLANAGAN, 2004). A concentração de ADTs no soro maior ou igual a 0,8mg/L é um dos fatores que predispõem uma maior toxicidade, caracterizada por convulsões, coma, intubação, arritmias, hipotensão e morte (CARAVATI; BOSSARTI, 1991). A importância da quantificação dos ADTs nas intoxicações, em conjunto com as características clínicas, é oferecer dados que podem ser usados para decidir se a monitorização intensa de possíveis arritmias, depressões cardíaca e do sistema nervoso central é necessária, e também pode influenciar na longa permanência do paciente no hospital (KERR; MCGUFFIE; WILKIE, 2001; POWER et al., 1995). Os ISRSs possuem baixa toxicidade nas intoxicações causadas somente por um fármaco desse grupo, contudo, ensaios qualitativos e/ou quantitativos são justificados na suspeita de co-ingestão para auxílio na confirmação do diagnóstico clínico e podem sugerir que um período de observação clínica mais prolongado e intenso seja apropriado (POWER et al., 1995).

Na investigação forense, a quantificação dos antidepressivos no sangue periférico pode colaborar na diferenciação entre uma superdosagem e um uso terapêutico (FLANAGAN; CONNALLY, 2005).

Diante desse contexto, este projeto visa o desenvolvimento de um método analítico para a determinação de antidepressivos capaz de ser aplicado na emergência clínica e na análise forense. Foram selecionados os fármacos com alto consumo no mercado brasileiro e maior predominância nas notificações de intoxicação, considerando os produtos de biotransformação: amitriptilina, desipramina, imipramina, clomipramina, desmetilclomipramina, nortriptilina, fluoxetina, norfluoxetina e sertralina.

A matriz escolhida foi o sangue total, por ser de obtenção relativamente fácil e por ter aplicação no *post mortem* e no *antemortem* (COOK; BRAITHWAITE; HALE, 2000). A extração em fase sólida (EFS) utilizando o cartucho abselut™ NEXUS foi aplicada de forma inovadora na análise toxicológica de antidepressivos. A composição do seu adsorvente é apolar e foi desenvolvida para suprimir uma fase do processo analítico: o condicionamento do cartucho. Utilizou-se a cromatografia em fase gasosa com detector de nitrogênio e fósforo (CG/DNP), por possibilitar a detecção de concentrações baixas de fármacos de caráter básicos, como os antidepressivos, apresentando, portanto, um alto poder de identificação e de quantificação (MARTÍNEZ; DE LA TORRE, ALMARZA, 2002; CHEN et al., 1994).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Classe dos antidepressivos

Até os anos 80, havia duas classes de antidepressivos: os antidepressivos tricíclicos (ADTs) e os inibidores de monoamino oxidase (IMAOs). Esses medicamentos apresentam diversos efeitos colaterais e interações medicamentosas, além de serem fatais na superdosagem. Nos últimos anos, o desenvolvimento de novos fármacos foi responsável por um aumento significativo no número de antidepressivos. São fármacos que atuam por mecanismos diversos e apresentam estrutura química diferenciada. Essa situação dificulta um consenso no meio científico para o agrupamento desses fármacos.

A classificação mais simples divide em quatro grupos: os ADTs, tais como a amitriptilina, a clomipramina, a imipramina, a desipramina e a nortriptilina; os ISRSs, como o citalopram, a fluoxetina, a paroxetina e a sertralina; os IMAOs, como a moclobemida; e os antidepressivos atípicos, como a bupropiona (HARDMAN; LIMBIRD, 2003).

A classificação mais complexa divide a classe dos antidepressivos em oito grupos. O primeiro, caracteriza-se por inibir não seletivamente a recaptura de monoaminas, seus componentes possuem estrutura heterocíclica, tricíclica ou tetracíclica. Os ADTs são divididos em aminas terciárias (imipramina, amitriptilina e clomipramina) e em aminas secundárias (desipramina, nortriptilina e protriptilina). Os demais grupos são caracterizados de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1 - Classificação dos antidepressivos

Grupo	Subgrupo	Fármacos
Inibidores não seletivos de recaptura de monoaminas	Antidepressivos tricíclicos (ADTs)	Amitriptilina, desipramina, nortriptilina, clomipramina, imipramina
	Antidepressivos tetracíclicos	Maprotilina, amoxapina
Inibidores da Monoamino Oxidase (IMAOs)	Não seletivo e irreversível	Tranilcipromina, fenelzina
	Seletivos e reversíveis	Moclobemida
Inibidores seletivos de recaptura de serotonina	-	Fluoxetina, paroxetina, sertralina, fluvoxamina, citalopram
Inibidores seletivos de recaptura de serotonina e noradrenalina	-	Venlafaxina e duloxetina
Inibidores de recaptura de serotonina e antagonista 5HT ₂	-	Nefazodona e trazodona
Estimulantes de recaptura de serotonina	-	Tianeptina
Inibidores seletivos de recaptura de noradrenalina	-	Reboxetina e viloxazina
Inibidores seletivos de recaptura de dopamina	-	Amineptina, bupropiona

Fonte: Adaptação de MORENO; MORENO; SOARES, 1999.

2.2. Cinética

Os antidepressivos são facilmente absorvidos pela via oral, os ADTs e os ISRSs possuem uma biodisponibilidade em torno de 55 a 80%. Entretanto, as vias intramuscular e intravenosa podem ser de escolha nos casos de depressão grave e em pacientes que sofrem de anorexia. O sistema de liberação transdérmico vem sendo desenvolvido no início do século XXI para diminuir o efeito de primeira passagem e para permitir a manutenção da concentração plasmática no estado de equilíbrio (PANCHAGNULA et al., 2005).

São fármacos biotransformados no fígado pelo sistema citocromo P450 (CYP), principalmente pelo CYP2D6, entretanto outras isoformas também são

responsáveis, como: CYP3A4, CYP2C19 e CYP1A2. Diversos antidepressivos são capazes de inibir as enzimas do citocromo (VAN HARTEN, 1993), a fluoxetina e a norfluoxetina são as mais potentes inibidoras do CYP2D6, enquanto que a sertralina e o citalopram inibem moderadamente essa isoforma (CREWE et al., 1992).

Os ADTs com aminas terciárias são desmetiladas através do CYP1A2, mas não perdem atividade farmacológica, enquanto que a inativação dos ADTs ocorre pela hidroxilação catalizada pelo CYP2D6 (MOFFAT; OSSELTON; WIDDOP, 2004).

Os principais produtos de biotransformação da amitriptilina, clomipramina, desipramina, fluoxetina, imipramina, nortriptilina e sertralina estão apresentados nas Figuras de 2 a 6.

A amitriptilina é extensivamente metabolizada em uma série de compostos mais polares, desses incluem a nortriptilina, que é parcialmente responsável pelos efeitos farmacológicos da sua precursora. A dinortriptilina ou didesmetilamitriptilina e os metabólitos hidroxilados têm sido detectados na urina. Os hidroxilados são excretados na maior parte conjugado com o ácido glucurônico, enquanto que cerca de 8% dos metabólitos são eliminados nas fezes de forma inalterada – Figura 1 (BASELT, 1978; MOFFAT; OSSELTON; WIDDOP, 2004).

A nortriptilina, como fármaco de origem, é extensamente hidroxilada e liberada conjugada, somente uma pequena porcentagem é desmetilada em dinortriptilina – Figura 2 (BASELT, 1978; MOFFAT; OSSELTON; WIDDOP, 2004).

A imipramina e o seu metabólito desmetilado, a desipramina, sofrem hidroxilação na posição 2 e 10, seguidos de conjugação e eliminação. Existe a suspeita da atividade dos metabólitos 2-hidroximipramina e 2-hidroxidesipramina (POLLOCK; PEREL, 1992). Cerca de 20% da dose é eliminada nas fezes. A desipramina, como fármaco de origem, tem como principal metabólito a 2-hidroxidesipramina, que é liberada, principalmente, conjugada com o ácido glucurônico na urina. Além dos principais fármacos de eliminação apresentada na Figura 3, ocorre em pequena extensão a formação de didesmetilimipramina, a partir da dupla N-desmetilação da imipramina ou da N-desmetilação da desipramina; e de

iminodibenzila, a partir da clivagem da cadeia alifática do nitrogênio do anel aromático (MOFFAT; OSSELTON; WIDDOP, 2004).

Figura 1 - Principais produtos de biotransformação da amitriptilina na urina e a porcentagem de eliminação - Fonte: PubChem Compound; MOFFAT; OSSELTON; WIDDOP, 2004.

Figura 2 - Principais produtos de biotransformação da nortriptilina na urina e a porcentagem de eliminação - Fonte: PubChem Compound; MOFFAT; OSSELTON; WIDDOP, 2004.

Figura 3 - Principais produtos de biotransformação da imipramina na urina e a porcentagem de eliminação - Fonte: PubChem Compound; MOFFAT; OSSELTON; WIDDOP, 2004.

A clomipramina apresenta um número de produtos de biotransformação menor comparado com a imipramina, como mostra a Figura 4. Contudo, o único produto de biotransformação ativo é a norclomipramina, mais conhecida como desmetilclomipramina, que possui atividade farmacológica comparável ao fármaco de origem.

Figura 4 - Principais produtos de biotransformação da clomipramina - Fonte: PubChem Compound; MOFFAT; OSSELTON; WIDDOP, 2004.

A fluoxetina é eliminada, principalmente, pela urina, sendo menos de 10% na forma inalterada ou conjugada com o ácido glucurônico. O produto de biotransformação de maior relevância é a norfluoxetina, que também apresenta atividade farmacológica. Outros produtos de biotransformação da fluoxetina correspondem a 73% da eliminação do fármaco na urina, com mostra a Figura 5 (HIEMKE; HARTTER, 2000).

Figura 5 - Principais produtos de biotransformação da fluoxetina - Fonte: PubChem Compound; HIEMKE; HARTTER, 2000.

A sertralina e o seu principal produto de biotransformação, a desmetilsertralina, são extensivamente metabolizados, 40 a 45% da dose é eliminada na urina, e somente 0,2% na forma inalterada, os outros 50% são eliminados pelas fezes. A desmetilsertralina possui atividade *in vivo* e *in vitro* modesta, que corresponde a uma atividade 25 a 60 vezes menor do que a da sertralina (HIEMKE; HARTTER, 2000; DEVANE; LISTON; MARKOWITZ, 2002). Os principais produtos de biotransformação da sertralina encontram-se na Figura 6.

Os antidepressivos apresentam uma alta taxa de ligação à proteína plasmática, variando de 73 a 98%. A máxima concentração no plasma, após a passagem pelo fígado, é atingida entre 2 e 8 horas e o tempo de meia-vida normalmente é superior a 24 horas, como mostra a Tabela 2, que considera apenas os parâmetros farmacocinéticos dos antidepressivos estudados neste trabalho.

Figura 6 – Principais produtos de biotransformação da sertralina - Fonte: PubChem Compound; DEVANE, LISTON, MARKOWITZ, 2002.

Tabela 2 - Parâmetros farmacocinéticos dos antidepressivos

Fármaco	Meia – vida do fármaco (horas)	Produto de biotransformação principal	Meia vida do produto de biotransformação (horas)	Conc. terapêutica (mg/L)*	Conc. tóxica (mg/L)
Amitriptilina	8 - 51 (35)	Nortriptilina	19 - 93	0,05 - 0,30	>0,5
Clomipramina	12 - 36	desmetilclomipramina	70	0,09 - 0,25	> 0,4
Desipramina	12 - 54	-	-	0,03 – 0,30	> 0,5
Fluoxetina	24 - 72	norfluoxetina	168 - 240	0,20 – 1,10 [#]	> 1
Imipramina	6 - 20	desipramina	12 - 54	0,05 – 0,15	> 2 [#]
Nortriptilina	19 - 93	-	-	0,05 - 0,25	> 0,5
Sertralina	22 - 35	desmetilsertralina	60 - 104	0,02 - 0,05	> 1,5

Fonte: Adaptação de MUSSHOFF, 2004; HARDMAN; LIMBIRD, 2003; BALANT – GORCIA; GEX-FABRY; BALANT, 1991. * concentração terapêutica para o tratamento da depressão, [#] representa a soma do fármaco de origem e do produto de biotransformação principal.

A eliminação dos antidepressivos *in vivo* ocorre em poucos dias, entretanto, existem exceções. Geralmente, os ADTs amino-secundários e os ISRSs N-desmetilados apresentam uma meia-vida mais ampla do que a dos seus precursores. Os ADTs e os seus produtos de biotransformação são parcialmente excretados pela bile e podem ser reabsorvidos no intestino antes que sejam excretados (THANACOODY; THOMAS, 2005).

Por serem fármacos lipofílicos, se concentram em vários tecidos, no leite materno, e atravessam a barreira hematoencefálica e a placentária facilmente. A exposição fetal e do lactente deve ser avaliada na escolha do tratamento ideal. Poucos efeitos adversos foram relatados até o momento. Estudos apontam que os ISRSs não apresentam efeitos teratogênicos, entretanto se faz ressalvas à possível influência no desenvolvimento neurocognitivo infantil em longo prazo e a adaptação neonatal (GENTILE, 2005).

A lipossolubilidade também contribui para o amplo volume de distribuição dos antidepressivos tricíclicos, que varia de 6-10 L/kg para a amitriptilina chegando entre 22-59 L/kg para a desipramina. A fluoxetina é o ISRS com mais amplo volume de distribuição, entre 14 – 100L/kg. O acúmulo é alto em pulmões e em órgãos ricos com lisossomas. A sertralina apresenta um volume de distribuição que excede os 20L/kg, mas há uma inespecificidade na ligação com os tecidos (HIEMKE; HARTTER, 2000).

Muitos ADTs e ISRSs apresentam uma farmacocinética linear em doses terapêuticas, ou seja, o aumento na dose é proporcional ao nível plasmático. Entretanto, para a fluoxetina, a farmacocinética não apresenta linearidade, isso se deve à inibição enzimática dose-dependente do citocromo P-450, acarretando um aumento desproporcional da dose plasmática desses fármacos (HIEMKE; HARTTER, 2000).

Existem diferenças na farmacocinética de antidepressivos entre os gêneros, como demonstrou o estudo de Hildebrandt et al., 2003. As mulheres apresentaram concentrações plasmáticas de antidepressivos tricíclicos superiores à dos homens. Tem sido sugerida uma diferença na absorção; provavelmente as mulheres secretam menos ácido gástrico do que os homens. Isso ocasiona um aumento

relativo do pH gástrico que proporciona às bases fracas uma maior absorção. Outras diferenças entre os gêneros podem justificar a variação cinética, como porcentagem de massa corpórea, volume sanguíneo, alterações nas enzimas hepáticas, variação hormonal feminina, entre outras.

As diferenças não só entre o sexo, mas também entre a idade, influenciam na distribuição ou no metabolismo dos antidepressivos. Nos idosos, a diminuição da atividade do CYP3A4, possivelmente devido a uma diminuição na taxa de testosterona, pode afetar a depuração dos antidepressivos (LOTRICH; POLLOCK, 2005). Um exemplo é a taxa de eliminação constante de sertralina ser maior em jovens do sexo masculino do que do feminino ou indivíduos com mais de 65 anos. Em homens jovens, a meia vida de eliminação é em torno de 30% menor do que em mulheres e indivíduos com idade avançada (HIEMKE; HARTTER, 2000). Outros citocromos apresentam a atividade diminuída nos idosos, entretanto, para o CYP2D6 não se verifica alteração na intensidade da função. A redução total de proteínas plasmáticas em idosos proporciona uma maior concentração da fração livre de antidepressivos, conseqüentemente um maior efeito. Já a diminuição no fluxo sanguíneo hepático e esplênico também causa alterações significativas na velocidade de absorção. Outras alterações fisiológicas influenciam na farmacocinética dos antidepressivos em idosos: a diminuição do fluxo renal, a variabilidade interindividual, as doenças e a polifarmácia (LOTRICH; POLLOCK, 2005).

Por outro lado, um estudo realizado para avaliar a depuração da desipramina entre crianças e adolescentes não obteve diferenças significativas entre gênero e idade na população pediátrica (COHEN et al., 1999).

O polimorfismo genético das enzimas hepáticas responsáveis pela biotransformação dos antidepressivos tem sido descrito na literatura. Indivíduos com deficiência da enzima CYP2D6, denominados metabolizadores pobres, apresentam concentrações elevadas do fármaco devido ao baixo nível de hidroxilação do mesmo (HIEMKE; HARTTER, 2000; DUAG, 1999). Isoformas com reduzida capacidade de metabolização para fármacos na população asiática é mais prevalente que na

população caucasiana. Essa é a possível justificativa para o uso de dose/peso menores de sertralina em asiáticos do que em caucasianos (NG et al., 2006).

Em casos de superdosagem fatal por antidepressivos, a concentração dos fármacos no sangue pode sofrer influências do sítio de coleta, do tempo após a morte e da redistribuição. A concentração dos antidepressivos no sangue *post mortem* exibe uma relação sítio dependente: as concentrações no compartimento central são usualmente maiores do que no sangue periférico, como nas veias femurais. Além de que, a concentração no sangue *post mortem* freqüentemente aumenta quanto maior for o intervalo entre a morte e a coleta (PROUTY; ANDERSON, 1990).

Existem várias hipóteses, explicadas por Prouty e Anderson (1990) para os fenômenos citados acima, que não são registrados apenas para os antidepressivos, mas para diversos fármacos. Os tecidos, nos quais os fármacos estão armazenados, como coração, fígado, ou pulmão, podem liberá-los para o sangue adjacente. Como os ADTs apresentam uma alta afinidade por tecidos, essa redistribuição é especulada. Estudos de Hilberg et al. (1994), em um modelo experimental com ratos, identificaram a importância da redistribuição da amitriptilina e da nortriptilina presente nos pulmões. Já estudos realizados para a fluoxetina, também demonstraram a redistribuição a partir do fígado e do pulmão em 2 e 12 horas após a morte de cães previamente tratados com esse antidepressivo. Ademais, a concentração de fluoxetina no sangue *post mortem* foi dependente do grau de coagulação. As amostras *antemortem* apresentaram uma concentração de fluoxetina equivalente às amostras de sangue coagulado *post mortem* no interior do coração e menor que as amostras de sangue não coagulado do coração e da veia cava (POHLAND; BERNHARD, 1997). Há poucos estudos *post mortem* envolvendo a sertralina. Todavia análises de Logan et al. (1994), sugerem uma distribuição *post mortem* uniforme.

Também existem estudos que demonstram a ocorrência de uma circulação vascular interna significativa dos antidepressivos no *post mortem*, causada em grande parte pela formação de gases que acompanham a decomposição. Em estágios avançados de putrefação, ocorre a liberação de fármacos do tecido para o

sangue e a distribuição é favorecida pela circulação vascular. (PROUTY; ANDERSON, 1990).

2.3. Uso terapêutico

Os antidepressivos são conhecidos como os “curingas” da psiquiatria, usados isoladamente ou associados à outros fármacos, pois estão presentes no tratamento de diversos transtornos psiquiátricos. Mas o seu uso não se restringe a esse campo. Várias áreas da medicina utilizam os antidepressivos, não só nos transtornos depressivos, como na prevenção de enxaquecas, na incontinência urinária, em distúrbios caracterizados por dor crônica e nevralgias, entre outros.

A depressão é um transtorno afetivo comum, crônico e recorrente. A prevalência na população em geral é de 3 a 11% (FLECK et al., 2003). Os critérios para diagnosticar um episódio depressivo maior segundo o Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais, quarta edição (DSM-IV) incluem cinco ou mais dos seguintes sintomas presentes durante um período de duas semanas:

- Humor deprimido na maior parte do dia, ou quase todo o dia;
- Diminuição marcante do interesse e do prazer;
- Perda significativa de peso, quando não se faz dieta, ou ganho de peso;
- Insônia ou hipersonia quase todo o dia;
- Agitação ou retardo psicomotor;
- Fadiga ou perda da energia quase todo o dia;
- Sentimento de desvalia, culpa excessiva ou inapropriada;
- Diminuição da capacidade de raciocínio, concentração ou decisão;
- Pensamentos recorrentes de morte, ideação suicida, tentativa de suicídio ou um plano específico para cometer suicídio.

Os ISRSs têm sido os fármacos de primeira escolha no tratamento do transtorno depressivo moderado a grave. Quando não se obtém a resposta desejada ou na indisponibilidade de utilizá-los, dá-se preferência aos tricíclicos ao invés dos IMAOs devido ao menor risco de crises hipertensivas. O uso dos tricíclicos também é de escolha em casos de episódios depressivos graves em pacientes

hospitalizados. Os IMAOs são preconizados no tratamento de depressões atípicas (FLECK et al., 2003).

Os transtornos psiquiátricos, como pânico, obsessivo-compulsivo e déficit de atenção e hiperatividade, podem ser tratados com antidepressivos. No transtorno obsessivo-compulsivo, uma junção da farmacoterapia com a terapia comportamental, mostrou-se efetiva em 60 a 80% dos pacientes. Estudos de meta-análises resultaram na confirmação de uma maior eficácia da fluoxetina, fluvoxamina, clomipramina e sertralina sobre o placebo no tratamento do transtorno obsessivo-compulsivo (STOKES; HOLTZ, 1999).

Os ADTs e os ISRSs são utilizados no tratamento profilático da enxaqueca, embora os seus mecanismos de ação ainda sejam desconhecidos nessa cefaléia primária. Quando o antidepressivo é usado de forma correta e individualizada promove reduções significativas na frequência e na intensidade dos episódios (KRYMCHANTOWSKI; MOREIRA FILHO, 1999).

O transtorno disfórico pré-menstrual atinge mulheres na idade reprodutiva, principalmente acima dos 30 anos. Os sintomas incluem humor deprimido, acompanhado por hipersonia, aumento do apetite com predileção por carboidratos, fadiga, sensibilidade à rejeição, ansiedade e irritabilidade. Esses aparecem uma semana antes e permanecem alguns dias após a menstruação (PIRES; CALIL, 1999). O mecanismo ainda não se conhece, contudo diversos estudos demonstram a eficácia da fluoxetina no tratamento desse transtorno (STOKES; HOLTZ, 1999).

Os ADTs já são medicamentos consagrados no tratamento da dor crônica. Estudos com a aplicação da amitriptilina pela via subaracnóidea demonstraram uma boa eficácia clínica, apresentando inclusive o efeito sinérgico com a morfina. Entretanto, a falta de preparações farmacêuticas adequadas e a observação de efeitos adversos, como a fraqueza muscular, postergam a utilização dessa via de administração na prática clínica (ROCHA; LEMONICA; BARROS, 2002).

Outro uso bem estabelecido dos antidepressivos é nos transtornos alimentares. Os mecanismos pelos quais os antidepressivos diminuem o excesso no

consumo alimentar e a sua eliminação forçada do organismo ainda não foram elucidados. O benefício talvez venha do efeito antidepressivo ou ansiolítico, de uma melhora no controle do impulso, de um efeito direto no comportamento de ingestão, ou de uma combinação desses efeitos (STOKES; HOLTZ, 1997). Entretanto, na anorexia nervosa, a eficácia dos antidepressivos ainda é questionada (CLAUDINO et al., 2006). Na obesidade, dois ensaios realizados por 52 semanas com a fluoxetina, comparada com o placebo, demonstraram a ineficácia na diminuição do peso (IOANNIDES-DEMOS; PROIETTO; MCNEIL, 2005; HALFORD et al., 2005).

Além dos usos terapêuticos citados acima, os antidepressivos ainda contribuem no tratamento da fibromialgia, das distúrbios de personalidade, da fobia escolar, e da ejaculação precoce (HARDMAN; LIMBIRD, 2003).

2.4. Incidência de intoxicação

Estudos internacionais vêm apontando o aumento da incidência de intoxicação por antidepressivos. Uns dos primeiros dados foram colhidos por Teige e Fleischer, do Instituto de Medicina Forense, Oslo; constataram um aumento crescente de intoxicações letais de antidepressivos, entre os anos de 1977 a 1980, correspondendo a valores que variaram de 12% a 20%, respectivamente (RETTESOL, 1993). Outro estudo conduzido por Cheeta et al. (2004), na Inglaterra e no País de Gales, entre 1998 e 2000, demonstrou que os antidepressivos estavam envolvidos em 11,2% de todas as mortes relacionadas à fármacos. De um total de 468 óbitos por antidepressivos, 60% estavam implicados ao uso desses fármacos de forma isolada e 40% ao uso concomitante de outro fármaco. Nos Estados Unidos, de acordo com o relatório anual de 2004 da *American Association of Poison Control Centers Toxic Exposure Surveillance System* (TESS), os antidepressivos corresponderam a 4,2% das exposições a agentes tóxicos em seres humanos; entre os adultos, maiores de 19 anos, esse número atingiu 8,1% (WATSON et al., 2005).

Com base no banco de dados do TESS, no período de 1998 a 2000, Spiller e colaboradores, 2003, verificaram que ocorreram 1500 a 1700 casos anuais de ingestão não intencional de antidepressivos cíclicos por criança menor de seis anos. Por meio desse estudo, foi possível presumir que a ingestão de uma dose até

5mg/kg não apresenta reações graves em crianças e a monitoração pode ser feita na própria residência.

No Brasil, as bases de dados do SINITOX oferecem informações sobre o perfil da população brasileira mais acometida pelas intoxicações. No período de 1993 a 1996, as faixas etárias mais expostas foram as crianças menores de cinco anos (33%) e os adultos de 20 a 29 anos (19%); o sexo feminino foi mais vulnerável, constituindo 63% das intoxicações medicamentosas. Os benzodiazepínicos, os antigripais, os antidepressivos e os antiinflamatórios foram as classes de medicamentos com maior índice de intoxicação (BORTOLETTO; BOCHNER, 1999).

Segundo dados coletados pelo Centro de Controle de Intoxicação da Prefeitura do Município de São Paulo (CCI-SP) nos anos de 1998 a 2002, foram notificados 47.333 casos de exposição humana. Desse total, 61,3% dos atendimentos realizados correspondeu a casos de intoxicação, 80,4% a uma exposição aguda única (dentro de um período de 24 h) e 80,5 % envolvendo a via oral. A circunstância acidental foi a principal razão das exposições, com 50,8% das ocorrências, seguida pela tentativa de suicídio, com 24,2%. O medicamento foi a classe de agente tóxico de maior prevalência, sendo responsável por 43,4% dos casos, seguido pelos produtos químicos de uso domiciliar, com 16,5% e raticida, com 8,1%. No grupo dos medicamentos, os psicofármacos ocorreram com maior frequência, tanto no número de participantes do grupo como no número de ocorrências, seguido pelos analgésicos/antiinflamatórios/antipiréticos; os antidepressivos e o lítio corresponderam a 8,55% das notificações. (HERNANDEZ, 2004).

O Gráfico 1 ilustra a porcentagem das notificações por classe de antidepressivos e lítio, durante 1998 e 2002. Verifica-se que o grupo dos tricíclicos continua sendo o que apresenta os maiores índices de intoxicação; ao todo, representa 67,22% dos casos dentro dos 5 anos. É interessante observar que, mesmo após a introdução dos antidepressivos mais recentes, que possuem toxicidade relativa menor, os ADTs continuaram sendo largamente prescritos. As possíveis justificativas desse fato são o seu baixo custo e a crença de muitos clínicos de que essa classe possui maior eficácia que os outros grupos de

antidepressivos (KERR; MCGUFFIE; WILKIE, 2001). Seguem, em ordem decrescente de incidência de intoxicação, os inibidores seletivos de recaptura de serotonina, com 25,6%, o grupo do lítio (carbonato de lítio) com 6,64% e, por último, os inibidores de monoamina oxidase, com menos que 1,0%.

Gráfico 1 - Distribuição da incidência de intoxicação por antidepressivos divididos por grupo e por ano - Fonte: Centro de Controle de Intoxicação da Prefeitura de São Paulo, entre 1998 e 2002.

A disposição do Gráfico 1 também permite analisar o desenvolvimento das notificações com o decorrer dos anos. Infelizmente, houve um aumento de 33% das notificações de 2002 quando comparadas com 1998, mostrando a necessidade de uma política de prevenção específica para as intoxicações acidentais e tentativas de suicídios por antidepressivos. O crescimento de 2,62% observado no grupo dos ADTs é preocupante, devido às altas taxas de mortalidade após intoxicações por fármacos desse grupo. Os ISRSs exibiram um aumento de 3,44%, principalmente pela atual tendência de substituir os ADTs no tratamento da depressão. As notificações do lítio e dos IMAOs não sofreram grande variação durante esse período. A tranilcipromina é o único IMAO que apresentou notificação no CCI-SP.

Os gráficos abaixo apresentam dados do CCI-SP, nos quais os números de casos são divididos por classe de antidepressivos e por fármaco. Infelizmente, esses

dados podem ser ainda mais expressivos devido as subnotificações e pelo alto percentual de intoxicações sem a identificação do agente causal.

O principal componente do grupo dos ISRSs é a fluoxetina, que apresentou um aumento no número de casos notificados de 62% em 2002, quando comparado com o ano de 1998, conforme exhibe o Gráfico 2. Os próximos ISRSs de relevância são a sertralina e a paroxetina, enquanto a trazodona e o citalopram apresentam dados menos expressivos.

Gráfico 2 - Distribuição da incidência de intoxicação por inibidores seletivos de recaptação de serotonina divididos por fármaco e por ano - Fonte: Centro de Controle de Intoxicação da Prefeitura de São Paulo, entre 1998 e 2002.

Os ADTs, como a amitriptilina, amoxapina, desipramina e dotiepinina são considerados os mais tóxicos, conforme os levantamentos realizados no Reino Unido, nos Estados Unidos e na Noruega (CHEETA et al., 2004; WATSON et al., 2004; RETTERSTEL, 1993). A amitriptilina está dentre os dez princípios ativos de maior prevalência em intoxicações na região metropolitana de São Paulo (HERNANDEZ, 2004), enquanto os demais não são comercializados no Brasil. No Gráfico 3, a amitriptilina se sobressai dentre dos ADTs, seguida pela clomipramina ou pela imipramina conforme o ano em questão.

Gráfico 3 - Distribuição da incidência de intoxicação por antidepressivos tricíclicos divididos por fármaco e por ano - Fonte: Centro de Controle de Intoxicação da Prefeitura de São Paulo, entre 1998 e 2002

2.5. Incidência de suicídio

A relação entre as substâncias psicoativas, como os antidepressivos, e o suicídio, é complexa e multifatorial. Os pacientes com problemas psiquiátricos fazem parte de um grupo que apresenta uma alta incidência em superdosagem de medicamentos e em suicídio consumado. Em um levantamento sobre os suicídios ocorridos em Alabama, Estados Unidos, no período de 1990 a 1998, foi revelado que 47 a 89% dos casos corresponderam a pacientes depressivos; 19 a 51%, estavam envolvidos fármacos de abuso; 2 a 16%, à esquizofrenia e 0 a 19% a pacientes com ausência de distúrbios psiquiátricos (DHOSSCHE, 2003).

Existe uma controvérsia na literatura no sentido se os antidepressivos são eficazes na prevenção do suicídio, juntamente com o lítio e a clozapina (DHOSSCHE, 2003), ou se é o seu uso que induz ideação suicida em adultos com depressão.

Com relação ao primeiro aspecto, um levantamento realizado na Suécia, durante o período de 1992 a 1994, envolvendo 5281 ocorrências de suicídio, mostrou que os antidepressivos foram detectados em 17% dos casos, sendo 4% em nível tóxico. Durante os anos do estudo, o consumo desses fármacos aumentou 51%, a taxa de suicídio caiu 10%, acompanhado por um aumento na detecção *post mortem* de antidepressivos de 7% (ISACSSON et al., 1999). Outro estudo, nos Estados Unidos, entre 1985 e 1999, revelou que a taxa de suicídio nacional diminuiu 13,5% e aparentemente estava associada ao aumento de 69% no consumo de ISRSs (GRUNEBAUM et al., 2004).

Por outro lado, quando o estudo de Teicher e colaboradores, em 1990, apontou a fluoxetina como indutora de idéias suicidas em adultos com depressão (RETTESOL, 1993), esse resultado foi associado aos ISRSs, que foram comercializados na década de 80 e 90. Outras pesquisas tentaram procurar essa evidência, mas fracassaram, contrapondo essa suspeita. No entanto, em junho de 2003, *The Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency* (MHRA) do Reino Unido publicou um alerta sobre o uso de paroxetina em menores de 18 anos. Na mesma época, *Food and Drugs Administration* (FDA) dos Estados Unidos da América recomendou que a paroxetina não fosse usada em crianças e adolescentes devido ao aumento do risco de suicídio. Em dezembro de 2003, a MHRA advertiu contra o uso de grande parte dos ISRSs. O FDA emitiu, em março de 2004, uma advertência pública alertando os médicos para monitorarem os pacientes, tanto crianças quanto adultos, em relação à piora da depressão e/ou suicídio. Os antidepressivos citados nesta advertência foram: fluoxetina, sertralina, paroxetina, fluvoxamina, citalopram, escitalopram, bupropiona, venlafaxina, nefazodona e mirtazapina (CULPEPPER et al., 2004).

As advertências do FDA e do MHRA foram baseadas em estudos não publicados sobre o uso de antidepressivos na pediatria, mas relatados aos órgãos regulamentadores e por testemunhas. Atualmente, a relação dos antidepressivos com o risco de suicídio ainda encontra-se em discussão pela comunidade científica. Um levantamento de dados das fichas de pacientes com suicídio consumado em ensaios clínicos relatados ao FDA, envolvendo nove antidepressivos (fluoxetina, sertralina, paroxetina, venlafaxina, nefazodona, venlafaxina, mirtazapina, bupropiona

e citalopram) não indicou diferença na taxa de suicídio entre os diferentes antidepressivos e o placebo (KHAN et al., 2003).

A controvérsia aumenta, pois vários estudos não avaliaram as idéias e os comportamentos suicidas antes e durante o tratamento com antidepressivo, apenas o suicídio consumado. Os pacientes recrutados para os ensaios clínicos são de conveniência, pois não representam a população vulnerável, visto que pacientes que apresentam idéias e tentativas de suicídio são retirados dos estudos. Os pacientes com superdosagem nem sempre têm o distúrbio primário diagnosticado, podendo ser pacientes com transtornos de personalidade limítrofe, que sabidamente apresentam altas taxas de suicídios e são mais medicados com os ISRSs do que com os ADTs. Além desses fatores, a ética médica impede o desenvolvimento de estudos com dados mais claros (HEALY; LANGMAAK; SAVAGE, 1999; DHOSSCHE, 2003).

A incidência de intoxicação intencional por antidepressivos em suicídios tem sido avaliada por alguns estudos internacionais, como o de Crome (1993) que verificou que os antidepressivos sozinhos ou em combinação com o etanol foram responsáveis por 14% dos casos ocorridos em 1987, no Reino Unido. Na Inglaterra e no País de Gales, no período 1998 a 2000, foi verificado que 80% das mortes causadas por antidepressivos foram por suicídios (CHEETA et al., 2004). Dados do relatório anual da TESS, de 2003, são alarmantes por demonstrar que as intoxicações intencionais por uso de antidepressivos corresponderam a 15% dos casos desse ano (WATSON et al., 2004).

No Brasil, foi caracterizado o perfil epidemiológico das tentativas de suicídio por substâncias químicas em um estudo retrospectivo com 70 participantes, de 12 a 24 anos, atendidos pelo Centro de Controle de Intoxicação do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina, no Paraná, entre 1994 e 1999. As tentativas foram mais freqüentes em mulheres (80%), brancos (61,4%), solteiros (85,7%), de 16 a 19 anos (45,7%) e estudantes (38,6%). A maioria das tentativas de suicídio ocorreu nas residências (87,3%), com o uso de medicamentos (67,1%) e praguicidas (18,6%). O grupo de psicofármacos (anticonvulsivantes, antidepressivos, antipsicóticos e sedativos) foi o principal envolvido nas tentativas de suicídio,

correspondendo a 43,6% do total de medicamentos, enquanto o segundo grupo de maior ocorrência (antieméticos, antihistamínicos, broncodilatadores, diuréticos, hormônios, vasodilatadores, antihipertensivos, antiinfeciosos e suplementos alimentares) atingiu o valor de 40,8% (MARCONDES FILHO et al., 2002).

Dados do SINITOX, durante 1993 e 1996, apontam que 44% do total de intoxicações medicamentosas foram classificadas como tentativas de suicídio e 40% como acidentes; do total registrado como tentativas de suicídio, 62% foram atribuídas aos medicamentos (BORTOLETTO; BOCHNER, 1999). Segundo dados coletados pelo CCI-SP nos anos de 1998 a 2002, as tentativas de suicídio corresponderam a 24,2% das exposições humanas (HERNANDEZ, 2004).

2.6. Toxicidade

O Índice de Toxicidade Fatal (ITF) é usado para avaliar a toxicidade dos psicofármacos na população. O ITF compara o número de mortes causado por intoxicações pelo fármaco em uma cidade ou país, com o consumo da medicação, ou seja, número de mortes por milhão de prescrição (BUCKLEY; MCMANUS, 2005).

Montgomery, Baldwin e Green (1989) mostraram que a amitriptilina possui “risco inaceitável” (mais de 40 mortes por milhão de prescrição), a imipramina, “claramente perigosa” (mais de 20 mortes por milhão); a clomipramina, “potencialmente perigosa” (mais de 10 mortes por milhões); e a fluoxetina e a fluvoxamina, com “risco relativo”, sendo associados a menos de 10 mortes por milhão de prescrição no Reino Unido durante 1979 e 1985.

No Reino Unido, durante os anos de 1993 e 1999, os ADTs atingiram um ITF de 34,8, os IMAOs de 20 e os ISRSs de 1,6 (BUCKLEY; MCMANUS, 2005). Na Inglaterra e nos País de Gales, durante os anos de 1998 a 2000, os ADTs atingiram um ITF de 12, os IMAOs de 14 e os ISRSs de 2 (CHEETA et al., 2004).

O uso da monitorização da toxicidade relativa dos antidepressivos, por meio do ITF, é apoiado pela correlação entre esses valores e a toxicidade do fármaco em estudos em animais. Molcho e Stanley, 1992, mostraram uma fraca, mais

significativa correlação ($r=0,55$) entre os valores do ITF para antidepressivos em humanos e sua dose letal média em ratos (DL50). Essa informação sugere que estudos laboratoriais pré-clínicos são úteis em prever a segurança de novos antidepressivos quando o ITF ainda não é disponível. A Tabela 3 demonstra os ITFs apresentados por diferentes estudos, regiões e anos, e a DL50 para os fármacos estudados nesse projeto.

Tabela 3- ITF e DL50

Antidepressivo	ITF - Estudo, período e país dos quais os dados originaram					DL50*
	Montgomery et al.	Casidy, Henry	Bucley, McManus	Cheeta et al	Kosk et al	
	1979 - 1985	1975 - 1984	1993 - 1999	1998 - 2000	1995-2002	
	Reino Unido	Reino Unido	Reino Unido	Inglaterra e Gales	Finlândia	
Amitriptilina	43,3	46,5	38	15	-	380
Clomipramina	12,3	11,1	12,5	11	-	914
Desipramina	-	80,2	200,9	-	-	385
Fluoxetina	-	-	0,9	3	0,38	452
Imipramina	31,9	28,4	32,8	11	-	355 - 682
Nortriptilina	-	39,2	5,5	9	-	405
Sertralina	-	-	1,2	1	0,33	1327

* dose letal oral em ratos – mg/kg

2.6.1. Os antidepressivos tricíclicos

Os antidepressivos tricíclicos estão associados a um número maior de acidentes e mortes intencionais no Brasil do que os antidepressivos lançados posteriormente no mercado. Do total de notificações de antidepressivos realizadas pelo CCI-SP durante 1998 a 2002, 67,22% pertencem aos ADTs. A incidência de tentativa de suicídio proposital que acompanha os ADTs é excessivamente alta. A maioria das mortes ocorre antes do paciente chegar ao hospital e uma melhora na ação médica ou na execução dos primeiros socorros tem apenas um limitado efeito na mortalidade. A sobrevivência do paciente aumenta quando o atendimento hospitalar é realizado nas primeiras seis horas após a ingestão. Cerca de 90% dos antidepressivos usados na superdosagem foram prescritos, de acordo com os dados coletados por Kragh-Serensen (1993).

Os ADTs possuem, em linhas gerais, cinco ações farmacológicas: a inibição da recaptura da norepinefrina e da serotonina e, em menor extensão, da dopamina; bloqueio dos receptores histamínicos H₁; bloqueio dos receptores adrenérgicos α_1 ; bloqueio dos canais de sódio cardíacos e ação anticolinérgica muscarínica (THANACOODY; THOMAS, 2005). O bloqueio da recaptura de serotonina e noradrenalina é variável entre os ADTs. As aminas terciárias tricíclicas apresentam uma maior capacidade de inibir a recaptura de serotonina (ex.: clomipramina), enquanto que as aminas secundárias são mais seletivas para a noradrenalina (ex.: desipramina, nortriptilina). A atividade anticolinérgica muscarínica dos ADTs está relacionada a constipação intestinal, sonolência, retenção urinária, boca seca, visão turva e confusão mental. O bloqueio da recaptura de noradrenalina contribui para os efeitos anticolinérgicos. Já a atividade antihistamínica pode ocasionar ganho de peso e sedação. A inibição dos receptores alfa-adrenérgicos leva a hipotensão ortostática e tonturas (KERR; MCGUFFIE; WILKIE, 2001).

Em doses elevadas ou em pacientes com predisposição, um dos principais mecanismos de toxicidade é o bloqueio dos canais de sódio, que está intimamente ligado a cardiotoxicidade. Normalmente, uma vez que o impulso parte do nodo sinoatrial, ele propaga rapidamente através do átrio, resultando na contração atrial e a formação da onda P, no eletrocardiograma. O sistema de condução está organizado de tal forma que o impulso cardíaco não se propaga tão rapidamente dos átrios para os ventrículos. Esse retardo, no nódulo atrioventricular ou nodo AV, fornece tempo para os átrios esvaziarem o excesso de sangue nos ventrículos, representado pelo intervalo P-R. Em seguida, ocorre a extensão do impulso do endocárdio para o epicárdio, estimulando a contração ventricular coordenada, manifestada na formação das ondas Q, R e S, ou no complexo QRS. A repolarização ventricular resulta na onda T do eletrocardiograma, como mostra a Figura 7 (HARDMAN; LIMBIRD, 2003; GUYTON; HALL, 1998).

Figura 7 - Propagação do impulso/eletrocardiograma - Fonte: HARDMAN; LIMBIRD, 2003

Os ADTs, ao bloquearem os canais de sódio, diminuem a concentração deste eletrólito na célula cardíaca, ocasionando o retardo da despolarização no nódulo atrioventricular, nas fibras de His-Purkinje e no miocárdio ventricular. Como resposta a este bloqueio ocorre o prolongando do intervalo P-R, que corresponde a um aumento do período de tempo entre o início da contração dos átrios e o início da contração dos ventrículos, que tem uma duração normal de 0,16 segundo. Outra característica da ação dos antidepressivos é o prolongamento do complexo QRS no eletrocardiograma, que corresponde ao tempo de condução no ventrículo. Estudos correlacionaram as alterações no complexo QRS com sinais do paciente intoxicado

por ADTs; intervalo QRS > 0,10 segundo predispõe às convulsões, enquanto que QRS > 0,16 segundo pode ocasionar uma arritmia ventricular (THANACODY; THOMAS, 2003). A Figura 8 representa um eletrocardiograma de uma paciente intoxicado por desipramina, no qual é possível verificar a descaracterização das ondas, com um prolongamento do complexo QRS de 0,132 segundo e do intervalo P-R de 0,228 segundo.

Figura 8 - (A) Eletrocardiograma de uma paciente com 44 anos após a ingestão de elevada dose de desipramina e (B) Eletrocardiograma de um indivíduo normal - Fonte: AKHTAR; GOLDSCHLAGER, 2006.

Além das anormalidades no eletrocardiograma, os ADTs causam arritmias; a principal é a *sinus* taquicardia devido à junção da atividade anticolinérgica com a inibição da recaptação de noradrenalina. A maioria das arritmias ocorre dentro de 24 horas, principalmente na primeira hora após a ingestão. A pressão arterial pode estar elevada nas horas iniciais, provavelmente devido à inibição da recaptação de

noradrenalina. Em seguida, ocorre uma hipotensão, devido ao bloqueio α - adrenérgico que diminui a resistência periférica, ao prejuízo da contratilidade do miocárdio e da potência cardíaca e à depleção de catecolaminas (THANACOODY; THOMAS, 2005).

Além dos efeitos cardíacos, a superdosagem por antidepressivos tricíclicos apresenta outros sintomas típicos: um breve período de excitação e inquietação, algumas vezes com mioclonia, convulsões tônico-clônicas ou distonia, seguidos pelo rápido desenvolvimento de coma, muitas vezes com depressão respiratória, hipóxia, reflexos deprimidos e hipertermia. As convulsões induzidas por ADTs aparentam estar associadas a altas concentrações plasmáticas, entretanto existem outros fatores de risco que predis põem convulsão, que estão dispostos na Tabela 4. A depressão respiratória resulta em acidose, o que reduz a ligação dos antidepressivos à proteína plasmática α_1 - glicoproteína, aumentando a fração livre responsável pelo agravamento do quadro de intoxicação (KERR; MCGUFFIE; WILKIE, 2001).

Tabela 4 - Fatores de risco que predis põem as convulsões

Fatores primários	Fatores secundários
Histórico de convulsões	Anormalidades no eletroencefalograma
Histórico familiar de convulsões	Neoplasia ou lesão no SNC e traumatismo craniano
Retardo mental	Substância de abuso ou síndrome de abstinência
Idade avançada	Terapia eletroconvulsiva
Demência primária	Demência secundária

Fonte: ELLENHORN, 1997

O paciente intoxicado por antidepressivos tricíclicos deve ser tratado precocemente numa unidade de tratamento intensivo. O coma desaparece gradualmente entre 1 e 3 dias, seguindo, tipicamente de excitação e delírio. As arritmias cardíacas com risco de vida continuam durante pelo menos vários dias, exigindo supervisão médica rigorosa. A cardiotoxicidade pode ser de difícil controle nessa intoxicação (ELLENHORN, 1997).

2.6.2. Os inibidores seletivos de recaptura de serotonina

Os ISRSs podem causar ou contribuir para a toxicidade fatal. Os principais mecanismos envolvidos são: excesso de serotonina devido a superdosagem; a co-ingestão com outra substância ativa que ocasione o aumento de serotonina extracelular e a inibição das isoenzimas do citocromo P450 responsáveis pela biotransformação dos ISRSs.

A superdosagem com ISRSs causa, principalmente, a toxicidade serotoninérgica, usualmente denominada síndrome serotoninérgica. Dados coletados pelo Serviço de Busca na Área Toxicológica, na Austrália, desde 1987, proveram a maioria das informações publicadas sobre essa síndrome (STERNBACH, 1991; GRAUDINS; DOWESETT; LIDDLE, 2002; ISBISTER; BUCKLEY, 2005; GILLMAN, 2006). A síndrome é caracterizada, segundo Sternbach (1991), por: 1- hiperatividade muscular: tremor, clonus, mioclonus hiperreflexia, arrepios; 2- hiperatividade autonômica: diaforese, febre, diarreia, taquicardia, taquipnéia e midríase e; 3- estado mental alterado: agitação, excitação, e confusão em um estágio mais avançado.

Sternbach (1991) considerou que todos os fatores para a definição desta síndrome apresentam o mesmo peso. Para Isbister e Buckley (2005), o método descrito acima considerou a sensibilidade dos achados clínicos, mas não a especificidade. Sintomas que são raramente vistos em outras condições, como o clônus generalizado ou o ocular ou até mesmo o induzido, não foram incluídos de forma adequada nos critérios de Sternbach. Desta forma, a comunidade científica estuda a inserção de novos critérios aos já estabelecidos.

A tentativa mais recente de desenvolver a definição da toxicidade serotoninérgica foi realizada através da validação dos novos critérios em mais de 2000 casos de superdosagem por agentes serotoninérgicos. Os chamados Critérios de Busca de Toxicidade Serotoninérgica (Figura 9) apresentaram uma eficácia, além de uma simplicidade, maior do que os critérios de Sternbach. Entretanto, estas novas diretrizes não estão validadas para pacientes com toxicidade de serotonina em doses terapêuticas de agentes serotoninérgicos (ISBISTER; BUCKLEY, 2005).

Figura 9- Critérios de Busca de Toxicidade Serotoninérgica - Fonte: Adaptação de ISBISTER; BUCKEY, 2005

A probabilidade da concentração de serotonina ficar suficientemente elevada para causar uma toxicidade moderada a grave é maior quando há a combinação de fármacos que ocasionam uma inibição na recaptação de serotonina, uma inibição na monoamino oxidase ou uma liberação de serotonina para o meio extracelular. Exemplos são a combinação de ISRSs com IMAOs, ADTs e com anfetaminas. Na prática clínica, a argumentação usada para a aprovação da utilização da combinação de dois antidepressivos, seja de uma mesma classe ou diferente, é justificada nos casos de pacientes com resistência ao tratamento (FAVA, 2001).

O uso isolado de um ISRSs raramente ocasiona uma toxicidade serotoninérgica grave. Existem apenas dois casos na literatura que relatam uma temperatura corporal acima de 38,5°C (GILLMAN, 2006). Entretanto, o elevado nível de serotonina sérica pode acarretar problemas cardiovasculares em pacientes com doença coronariana arterial. O mecanismo proposto baseia-se na vasoconstrição produzida pela serotonina, aumentando a pressão arterial, causando arritmias e

angina. Normalmente, quando a serotonina se liga ao receptor 5-HT₁ no endotélio vascular, ocorre a liberação de óxido nítrico, que relaxa a musculatura vascular. Ao mesmo tempo, a serotonina se liga a receptores 5-HT₂ nas células musculares que leva a vasoconstrição. Em pacientes com doença coronariana arterial, o dano no endotélio vascular não permite produzir óxido nítrico, assim a vasoconstrição se sobressai (DALFEN; STEWART, 2001).

A ingestão de doses elevadas de sertralina resulta em efeitos cardiovasculares e centrais de baixa intensidade. A maioria dos pacientes apresenta uma letargia e sonolência. Contudo, há descrição na literatura de casos com superdosagem com sertralina e alterações no eletrocardiograma (KLEIN-SCHWARTZ; ANDERSON, 1996, BOER et al., 2005). Nas superdosagens com fluoxetina, os sintomas mais relatados são: taquicardia, sonolência, tremor, vômito e náuseas (STOKES; HOLTZ, 1997). Entretanto, diversos casos de ingestão intencional de um ISRS com outra substância, como os benzodiazepínicos, os ADTs, os narcóticos, o etanol e a difenidramina ocasionam um potencial de toxicidade mais elevado (DALFEN; STEWART, 2001).

Todos os ISRSs possuem a capacidade de inibir o metabolismo de fármacos pelo sistema citocromo P450 (CYP). A principal isoforma envolvida é a CYP2D6 (VAN HARTEN, 1993). Recentemente, foi demonstrado que a fluoxetina, a norfluoxetina e a sertralina são inibidores *in vitro* do metabolismo do alprazolam, um substrato que é metabolizado no CYP3A4. Outros estudos vêm levantando outras isoformas possivelmente inibidas pelo ISRSs. A longa meia vida do metabólito da fluoxetina, norfluoxetina, comparado com a da fluoxetina, sertralina e fluvoxamina sugere que a superdosagem por fluoxetina é mais propícia a interações relacionadas com a inibição do CYP.

Isbister et al. (2004) realizaram um estudo para verificar a toxicidade relativa entre cinco ISRSs (paroxetina, sertralina, citalopram, fluoxetina, fluvoxamina). Dentre os 469 casos de intoxicação por ISRSs admitidos no hospital, 14% apresentaram a toxicidade serotoninérgica e 6,4% foram internados na unidade de tratamento intensivo. O citalopram foi o que apresentou maior cardiotoxicidade entre os ISRSs. Um estudo comparativo entre a toxicidade dos antidepressivos cíclicos e os novos

inibidores seletivos de recaptura de serotonina, foi realizado por Graudins et al. (2002), e mostraram que a intoxicação por antidepressivos tricíclicos resultou em uma maior morbidade e maior estadia do paciente no hospital, requerendo admissão em centro de tratamento intensivo com ventilação mecânica e monitoração cardíaca. Os pacientes intoxicados por ISRSs necessitaram de ventilação mecânica somente quando co-ingeriram outro fármaco ou droga de abuso. Por esses motivos, observou-se que o custo hospitalar diário de um paciente intoxicado por ADTs é quase duas vezes maior do que um por ISRSs (RAMCHANDANI, 2000).

2.7. O papel da análise toxicológica de antidepressivos

A análise de antidepressivos abrange três campos: a monitorização terapêutica, a emergência clínica e a forense. A monitorização terapêutica permite a manutenção de concentrações seguras e eficazes dentro da faixa ou janela terapêutica. No caso específico de certos ADTs e o lítio, tem sido indicado, particularmente, para os casos de populações especiais, como idosos, crianças, adolescentes e outros pacientes cujos parâmetros farmacocinéticos podem ser considerados diferentes da média populacional, podem ter sido alterado em consequência de uma doença ou por interação medicamentosa (LINDER; KECK, 1998).

Na emergência clínica, o desafio no manejo da superdosagem está na identificação dos fármacos que oferecem um alto risco; juntamente com o exame clínico, pode-se avaliar a necessidade de monitorização do paciente (POWER et al., 1995). Dessa forma, dados da análise toxicológica podem ser importantes para estabelecer um diagnóstico da intoxicação e um direcionamento no tratamento (FLANAGAN, 2004).

Com base nas intoxicações com alto grau de fatalidade, nas análises requisitadas com maior frequência pelos médicos e na importância dessas análises no tratamento, os ADTs são uma das 15 principais substâncias que devem ser rastreadas nos serviços de emergência clínica, de acordo com o Comitê de Métodos Analíticos de Investigação da Sociedade Japonesa de Toxicologistas Clínicos, estabelecido em 1999 (FUKUDA et al., 2005).

Todavia, o interesse clínico e a importância da quantificação dos ADTs nas intoxicações estão na possibilidade de prever quais pacientes possuem risco de toxicidade e, dessa forma, fornecer dados sobre o possível tempo de permanência do paciente no hospital, sobre a probabilidade de requerer ventilação mecânica e a necessidade de internação em unidades de tratamento intensivo (POWER et al., 1995, KERR; MCGUFFIE; WILKIE, 2001). Contudo, a triagem qualitativa de antidepressivos não oferece benefício superior ao atingido pela terapia de manutenção do paciente (POWER et al., 1995).

Sugere-se a análise quantitativa do ADT e do seu metabólito desmetilado, pois pode ser útil na avaliação de uma suspeita de intoxicação, visto que a razão entre o fármaco de origem e o produto de biotransformação pode ser um indicativo de intoxicação recente. Nas intoxicações por ADTs também se deve investigar: o ECG durante 12 horas; análise do sangue arterial (a acidose metabólica é uma anormalidade comum, hipóxia e outras características de depressão respiratória podem ser detectadas); e eletrólitos, principalmente hipocalemia (THANACOODY; THOMAS, 2003). Em conjunto com as características clínicas, o resultado quantitativo do ADT pode ser usado para decidir se a monitorização intensa de possíveis arritmias, depressões cardíacas e do sistema nervoso central é necessária. Também pode influenciar em determinar o período em que uma monitorização cardiovascular intensiva é adequada e, portanto (com algum grau) a duração da estadia do paciente no hospital (POWER et al., 1995).

De acordo com Thanacoody e Thomas (2005), valores plasmáticos de ADTs maiores que 1mg/L estão associados ao aumento na incidência de coma, convulsões e paradas cardíacas. Contudo, outro estudo demonstrou que a concentração de ADTs no soro maior ou igual a 0,8mg/L é um dos fatores que predispõem a uma maior toxicidade, caracterizada por convulsões, coma, intubação, arritmias, hipotensão e morte em uma análise retrospectiva de 106 pacientes hospitalizados por intoxicação por ADTs (CARAVATI; BOSSARTI, 1991). Esses estudos sugerem que, apesar de uma associação estatística entre a concentração plasmática de ADTs e toxicidade, essa associação não é robusta, pois a toxicidade também pode ser vista em concentrações inferiores a 1mg/L (POWER et al., 1995).

Foulke (1995) caracterizou o prolongamento da duração das ondas QRS ($>0,16$ segundo) como melhor indicador de convulsões e arritmias ventriculares do que a concentração desses fármacos no plasma. Todavia, uma meta-análise realizada recentemente em 18 estudos, comparando a precisão dos parâmetros dos eletrocardiogramas e da concentração plasmática de ADTs como indicador de prognóstico de risco de convulsões, arritmias ventriculares e morte em pacientes com superdosagem por ADTs, mostrou que ambos tiveram sensibilidade e seletividade comparáveis, mas foram baixos indicadores de complicações (BAILEY; BUCKLEY; AMRE, 2004).

No final da década de 90, foi sugerido que a onda terminal R maior que 3mm na derivação aVR pode ser um melhor indicador da possibilidade de ataques e arritmias do que o prolongamento do complexo QRS nos casos de intoxicações por antidepressivos (KERR; MCGUFFIE; WILKIE, 2001). A Figura 10 demonstra a alteração na onda R marcante da imagem da direita, representando uma intoxicação por um ADT.

Figura 10 - Alteração na derivação aVR nas intoxicações por antidepressivos - Fonte: HARRIGAN; BRADY, 1999.

Em relação aos ISRSs, os testes laboratoriais de rotina para a detecção desses fármacos isolados não são necessários devido a sua baixa toxicidade. Apesar dos antidepressivos atípicos e dos ISRSs serem mais seguros, os atendimentos emergenciais estão relacionados aos casos de superdosagem e de associação com outros fármacos, como os benzodiazepínicos, anfetamínicos e o etanol (DALFEN; STEWART, 2001). Contudo, ensaios qualitativos e/ou quantitativos

são justificados na suspeita de co-ingestão para auxílio na confirmação do diagnóstico clínico e podem sugerir que um período de observação clínica mais prolongado e intenso seja apropriado (POWER et al., 1995). Entretanto, a quantificação de fluoxetina e norfluoxetina, após uma intoxicação, pode ser de ajuda na compreensão e/ou na minimização de interações farmacológicas que podem resultar de uma prolongada presença da norfluoxetina no organismo (POWER et al., 1995).

A toxicologia forense é utilizada para estabelecer o papel de substâncias detectadas na morte ou nos eventos anteriores a esta. É essencial ter as informações relacionadas ao caso, como as circunstâncias, o histórico médico e o exame anatopatológico do médico legista para a interpretação adequada da análise toxicológica.

A investigação da suspeita de intoxicação por fármacos psicoativos, inclusive os antidepressivos, é complicada devido:

- a) Ao desenvolvimento de tolerância à toxicidade de fármacos ingeridos por um longo período;
- b) À falta de informação da concentração sanguínea de fármacos e dos produtos de biotransformação, alcançada no tratamento em longo prazo;
- c) Às alterações na composição dos fluidos corporais, especialmente o sangue, no *post mortem*;
- d) À toxicidade idiosincrática (FLANAGAN; CONNALLY, 2005).

A quantificação *post mortem* dos ADTs e dos ISRSs é primordial. Nesse caso, a análise do sangue periférico reflete melhor a concentração sanguínea *perimortem* e poder colaborar na diferenciação de uma superdosagem de um uso terapêutico em longo prazo (PROUTY; ANDERSON, 1990; FLANAGAN; CONNALLY, 2005).

2.7.1. Matrizes biológicas

Na análise toxicológica de antidepressivos, as matrizes com expressividade analítica são: o sangue periférico, o sangue cardíaco, o plasma, o soro, a urina, a

bile, o conteúdo gástrico, o fígado e o pulmão. O humor vítreo, na análise forense, está ganhando espaço devido à estabilidade dos componentes químicos no *post mortem* (GAGAJEWSKI et al., 2004). Contudo, a escolha da matriz biológica é constantemente ditada pelo caso que se quer investigar.

A urina é a matriz de escolha mais frequentemente usada nas emergências clínicas devido à facilidade de coleta, ao amplo volume, à alta concentração de vários agentes tóxicos, além da existência de diversos métodos analíticos já estabelecidos. Entretanto, a aquisição desse espécime pode ser dificultada na emergência clínica, devido à retenção urinária, característica típica na intoxicação por ADTs (KERR; MCGUFFIE; WILKIE, 2001) e no *post mortem*, pois nem sempre está disponível. Além do mais, a análise quantitativa nem sempre é útil (FLANAGAN; CONNALLY; EVANS, 2005).

O soro e o plasma são matrizes utilizadas na emergência clínica e no monitoramento terapêutico de fármacos; o sangue total e o hemolizado são evitados, pois em diversos casos, a concentração do fármaco nas hemácias é diferente da concentração no plasma (GUPTA, 1992). O sangue periférico, como o femoral, ao contrário do sangue dos compartimentos centrais, está menos sujeito a redistribuição influenciada pelos órgãos locais (como coração, pulmão e fígado) no *post mortem*. Por esta razão, a matriz de escolha para a análise toxicológica após a morte é o sangue da veia femoral (COOK; BRAITHWAITE; HALE, 2000). Na coleta de sangue para análise quantitativa de antidepressivos nesse local, é importante que a veia seja grampeada próximo da coleta, para evitar contaminação da veia ilíaca e da veia cava (YAREMA; BECKER, 2005; PROUTY; ANDERSON, 1990). Se amostra suficiente é obtida, ela deve ser dividida em tubos sem e com conservante (fluoreto de sódio, maior que 2%), caso contrário, toda a amostra deve ser coletada com conservante. A adição do fluoreto ajuda a minimizar a fermentação, a evitar a produção de etanol *in vitro* e a proteger fármacos lábeis da degradação (FLANAGAN; CONNALLY; EVANS, 2005).

O fígado é uma matriz importante no *post mortem*, pois pode ser usada para auxiliar na diferenciação de uma concentração terapêutica de uma letal, conforme demonstrado por Davis et al. (2001) e Apple e Bandt (1988): a concentração

hepática de amitriptilina, imipramina, desipramina e nortriptilina excedeu 30mg/kg nos casos onde houve intoxicação letal por antidepressivos tricíclicos, enquanto que valores ao redor de 10 mg/kg foram obtidos em casos de uso terapêutico. Todavia, a bile pode ser utilizada como matriz, pois alguns antidepressivos apresentam liberação entero-hepática, como o citalopram.

2.7.2. Extração

A extração de antidepressivos em sangue total é complexa e torna-se mais trabalhosa com o sangue *post mortem*, um dos motivos é a viscosidade elevada. Em compensação, o desenvolvimento de uma metodologia para esta matriz pode ser intercambiável para outras, como soro e plasma (DRUMMER, 1999).

Para análises cromatográficas, a amostra necessita de um pré-tratamento para reter todas as substâncias relevantes e remover todos os interferentes e outros compostos sem interesse. A extração de antidepressivos por líquido-líquido é a técnica mais tradicional. As propriedades físico-químicas das substâncias, como a natureza ácido-básica, pKa e polaridade, determinam o seu isolamento da matriz. Esse processo dificulta a extração de um amplo número de fármacos, pois é necessário que eles tenham características semelhantes. Os ADTs compartilham características físico-químicas similares, o que não acontece com os ISRSs, os IMAOs e as demais classes (DUVERNEUIL et al., 2003).

A extração alcalina de ADTs com n-hexano é a mais difundida, normalmente associado a 0,1 a 5% de álcool para o ajuste da polaridade. Contudo, outros solventes são usados como: n-heptano, éter dietílico, clorobutano, acetato de etila e pentano (GUPTA, 1992). Para adaptar à cromatografia líquida, após uma extração com solvente orgânico, este é coletado e re-extraído com uma fase aquosa ácida e injetado diretamente no cromatógrafo. Quando outros antidepressivos são incluídos, a mistura com dois ou mais solventes é quase determinante. No caso dos ISRSs e as demais classes de antidepressivos, a extração com n-hexano associado ao álcool isoamílico nas proporções de 99:1 ou 98:2 é usada com sucesso (DUVERNEUIL et al., 2003; TITIER et al., 2003). Tracqui et al. (1992) utilizaram a associação clorofórmio/isopropanol/n-heptano, 60/14/26, v/v para a extração de ADTs e alguns

ISRSs. Na análise por cromatografia gasosa, o extrato final deve ser altamente concentrado e livre de misturas; a evaporação dos solventes orgânicos na extração de antidepressivos é feita, na maioria dos casos, sob fluxo de nitrogênio em uma temperatura que varia da temperatura ambiente a 50°C (CHEN et al., 1992a; FRAHNERT; RAO; GRASMADER, 2003; MAURER; BICKEBOELLER-FRIEDRICH, 2000; FONTANILLE et al., 1997).

Atualmente, a extração em fase sólida (EFS) está difundida entre diversos laboratórios de toxicologia, e a sua utilização abrange diversos grupos de fármacos, inclusive os antidepressivos. O princípio da EFS baseia-se na adsorção do analito em 30 a 500mg de adsorvente fixado entre dois filtros em um tubo de polipropileno, denominado cartucho. As etapas envolvidas na EFS são:

- a) Condicionamento do cartucho: solvatação do adsorvente pela passagem de solvente apropriado, proporcionando uma maior facilidade na passagem da amostra;
- b) Remoção do solvente ativador por um líquido com composição similar a matriz. É de fundamental importância não permitir que todo este solvente seja eliminado antes da próxima etapa. A secagem do cartucho pode comprometer a reprodutibilidade, principalmente por criar caminhos preferenciais que afetam a precisão da técnica (LANÇAS, 2004; CHEN et al., 1992a).
- c) Aplicação da amostra, no qual idealmente os analitos são retidos;
- d) Remoção dos interferentes e parte da matriz por um solvente que não remova os analitos (etapa de lavagem);
- e) Eluição dos analitos do adsorvente com um solvente apropriado, de preferência que não remova os componentes da matriz que ainda estejam associados ao adsorvente, coletando o eluato para posterior análise (BERRUETA; GALLO; VICENTE, 1995).

No comércio, há a presença de um amplo número de adsorventes, sendo que aqueles de fase reversa, de fase normal e de troca iônica têm sido os mais utilizados. O termo fase reversa é empregado para descrever o modo cromatográfico no qual a fase móvel apresenta maior polaridade do que a fase sólida e reterá os analitos menos polares presentes em solventes polares. Isso envolve interações não

polares entre o analito e o adsorvente, por meio de forças de van der Waals. A afinidade do soluto com o solvente depende principalmente da hidrofobicidade (WALKER; MILLS, 2002). O adsorvente mais comum na fase reversa é a quimicamente ligada à sílica, como octadecil, octil, fenil, e cianopropil, que tem sido amplamente usada para a extração de fármacos. Em pH maior do que dois, os grupos silanóis que compõe a sílica, dissociam em Si-O^- , que fica disponível para interações iônicas secundárias com a amostra. A ligação de antidepressivos no adsorvente depende da quantidade não declarada de grupos silanóis e da porcentagem de carbonos ligados a sílica (GUPTA, 1992). Adsorventes alternativos utilizados na fase reversa incluem os copolímeros com alta ligação cruzada (N-divinilpirrolidina/divinilbenzeno e divinilbenzeno/estireno com metacrilato). Comparados aos adsorventes de sílica, são geralmente mais hidrofóbicos, com maior retenção, não possuem ligações iônicas secundárias e estáveis em uma faixa de pH ampla, 0 -14 (WALKER; MILLS, 2002). Esses adsorventes não necessitam de condicionamento e não tem problema do solvente secar antes da aplicação da amostra; entretanto, são descritos poucos trabalhos na literatura.

Nos adsorventes de fase normal, compostos polares dissolvidos em solventes não polares como o éter dietílico ou o n-hexano são extraídos por adsorção ao adsorvente polar. A sua aplicação abrange vitaminas, lipídios, carboidratos e fenóis (QUEIROZ; COLLINS; JARDINS, 2001). Para os antidepressivos, a principal fase normal utilizada é a cianopropilsilano (GUPTA, 1992).

Os adsorventes de troca iônica são, geralmente, empregados na extração em fase sólida para o isolamento de analitos de caráter ácido e básico presentes em soluções aquosas. Os compostos básicos são retidos por intermédio de uma fase sólida, constituindo de um trocador forte de cátions, do tipo $[\text{SO}_3]^-$, aprisionado à estrutura básica da sílica, enquanto os compostos ácidos são retidos por trocadores fortes de ânions, do tipo $[\text{N}(\text{CH}_3)_3]^+$ (LANÇAS, 2004). Como os antidepressivos são fármacos de caráter básico fraco, eles podem ser extraídos através da troca catiônica (WILLE et al., 2005).

A combinação de adsorventes de fase reversa com grupos de troca iônica, conhecidos como cartucho de fase mista, teve uma difusão muito rápida na área analítica toxicológica. Nesse caso, o analito é retido por dois mecanismos, sendo útil na extração de compostos com caráter lipofílico com grupo funcionais iônicos. Como os antidepressivos possuem nitrogênios que podem ser protonados, ocorre uma interação iônica com o grupo catiônico e uma adsorção da fase reversa com a parte lipofílica da molécula. Diversos estudos de extração em fase sólida com antidepressivos realizados por Martinez, de la Torre e Almarza (2002, 2003, 2004, 2005), demonstraram que o cartucho de extração de fase mista apresenta uma melhor recuperação e precisão intradia, cromatogramas com menos interferentes, e um menor limite de detecção e quantificação do que o cartucho de octadecilsilano.

2.7.3. Detecção e identificação

As técnicas analíticas usadas na detecção dos antidepressivos são os imunoensaios e as técnicas cromatográficas acopladas a vários sistemas de detectores (DUVERNEUIL, 2003).

Os imunoensaios para os antidepressivos baseiam – se no enzima imunoensaio e na fluorescência polarizada (SCHWARTZ; HURD; CARNAHAN, 1994); radioimunoensaios estão sendo pouco usados (GUPTA, 1992). A principal limitação dessas técnicas é a diferenciação entre o fármaco de origem e o produto de biotransformação. Estudos apontam que a fluorescência polarizada, *Biosite Diagnostics Triagem Panel for Drugs of Abuse and Tricyclic Antidepressants* (Abbott Diagnostics, TDX), realizada em soro e plasma, é mais sensível e específico do que o teste imunoenzimático Du Pont's EMIT (Syva, EMIT), em urina. Além disto, também apontam como principais interferentes do EMIT, os fenotiazínicos e os metabólitos da carbamazepina (TOMASZEWSKI et al., 2005; SCHWARTZ; HURD; CARNAHAN, 1994). Ensaio imunológicos para os outros antidepressivos ainda não são comercializados, principalmente devido à diversidade estrutural existente entre os fármacos desse grupo.

A cromatografia em camada delgada é uma das ferramentas mais utilizadas no Brasil no âmbito da toxicologia forense e da emergência clínica. O seu uso é

válido para identificar antidepressivos em concentrações tóxicas, não em concentrações terapêuticas. Os principais agentes reveladores utilizados são o ácido percloroacético e o reagente de Mandelin (GUPTA, 1992).

A cromatografia em fase gasosa (CG) é uma técnica adequada devido a sua sensibilidade e especificidade. O detector de ionização de chama é escolhido para analisar extratos por ser um detector universal, além de proporcionar um cromatograma limpo. Entretanto, a sua baixa sensibilidade limita a sua aplicação na detecção de fármacos presentes em baixa concentração na matriz, especialmente os de caráter básicos, como os antidepressivos (CHEN et al., 1994).

Uma forma de superar esse obstáculo é utilizar a cromatografia em fase gasosa acoplada ao detector de nitrogênio e fósforo (CG/DNP), pelo aumento da sensibilidade de substâncias contendo esses elementos em sua estrutura química, presentes em vários fármacos. Dessa forma, o DNP é capaz de expressar resultados em concentrações de até nanograma por microlitro. Na análise toxicológica, a CG/DNP tem sido utilizada por apresentar um menor limite de detecção para fármacos básicos, demonstrando ser um detector para triagem adequado para fármacos psicoativos que estão em baixa concentração no sangue (MARTÍNEZ et al., 2002; CHEN et al., 1994). Entretanto, o DNP tem algumas limitações, como a curta vida útil da pérola alcalina, que precisa ser trocada periodicamente. As colunas capilares contendo nitrogênio na fase estacionária não são compatíveis com o DNP para análises que necessitam de alta sensibilidade (GUPTA, 1992).

Os antidepressivos não respondem ao detector por captura de elétrons (DCE), e por isto precisam ser derivatizados. Além disto, existem dificuldades dos laboratórios de manusear partículas radioativas requeridas para o funcionamento do DCE (FONTANILLE et al., 1997). As aminas terciárias são derivatizadas e os produtos gerados correspondem às aminas secundárias respectivas. A fluoxetina e o seu metabólito, norfluoxetina, são analisados por DCE após a derivação com pentafluoropropiônico ou heptafluorobutirila (GUPTA, 1992).

Após a associação da cromatografia em fase gasosa com o espectrômetro de massas (CG/EM), na década de 70, a toxicologia forense adotou-a como a técnica

de referência para a identificação de fármacos em geral, inclusive dos antidepressivos. A derivatização dos antidepressivos antes de serem injetados no cromatógrafo é interessante para reduzir a interação das aminas primárias e secundárias com as colunas empacotadas, entretanto com o amplo uso das colunas capilares, a derivatização dos antidepressivos não é uma necessidade (GOERINGER et al., 2000). Quando é feita, derivados acetil, trimetilsilil e trifluoroacetil são os mais encontrados na literatura (POLETTINI et al., 1998; GUPTA, 1992).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com o detector de absorvância de ultravioleta/visível ou de fotodiodo (DAD – diode array detector) tem sido aplicada na análise toxicológica com sucesso. Vários comprimentos de ondas têm sido monitorados para aperfeiçoar o processo na análise de antidepressivos: 254, 210, 215, 220, 240, 242 e 245nm (GUPTA, 1992). Entretanto, estudos mais recentes utilizam 230nm (FRAHNERT; RAO; GRASMADER, 2003; BERZAS et al., 2002). A cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas tem surgido como uma nova ferramenta que associa o poder de separação da CLAE com a especificidade do espectrômetro, contribuindo para métodos com limites de detecção baixos e técnicas de extração mais simples. O uso da CLAE/EM está avançando (CHEN et al., 2006; SHINOKUSA, TERADA, TANAKA, 2006), contudo o alto custo do equipamento e o elevado nível técnico o seu manuseio ainda restringem o seu uso.

3. OBJETIVO E PLANO DE TRABALHO

O presente trabalho tem como objetivo desenvolver e validar um método para a quantificação de antidepressivos e produtos de biotransformação em amostra de sangue total, empregando extração em fase sólida e cromatografia em fase gasosa, capaz de ser aplicado na emergência clínica e na análise forense. Para alcançar o objetivo proposto, foi elaborado o seguinte plano de trabalho:

- Padronização de um método para quantificação de amitriptilina, clomipramina, desipramina, desmetilclomipramina, fluoxetina imipramina, nortriptilina, norfluoxetina e sertralina em amostra de sangue total, empregando o cartucho de extração em fase sólida, abselut™ NEXUS (Varian), com detecção por cromatografia em fase gasosa com detector de nitrogênio e fósforo;
- Validação analítica: especificidade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão intra e interensaio, recuperação, estabilidade e *carryover*.
- Aplicação do método validado em amostras de sangue total provenientes de pacientes com suspeita de intoxicação por antidepressivos ou de casos *post mortem* com histórico que sugira o envolvimento com essa classe de fármacos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Soluções – padrão

- Soluções estoque em metanol de amitriptilina, clomipramina, desipramina, desmetilclomipramina, imipramina, fluoxetina, norfluoxetina, nortriptilina e sertralina, na concentração de 1mg/mL cada, foram adquiridas da Cerilliant, Texas, USA;
- Soluções de trabalho de amitriptilina, clomipramina, desipramina, desmetilclomipramina, imipramina, fluoxetina, norfluoxetina, nortriptilina e sertralina foram preparadas a partir de diluições das soluções estoque em metanol, nas concentrações de 100 µg/mL e 10µg/mL;
- Solução de trabalho de etidocaína (PI – padrão interno) na concentração de 100 µg/mL em metanol. O padrão em pó, cloridrato de etidocaína, foi cedido pela Indústria Farmacêutica Astra Zenica.

Todas as soluções foram armazenadas entre 2 e 8°C, conforme especificações dos fabricantes.

4.1.2. Equipamentos e acessórios

- Equipamento de cromatografia em fase gasosa Agilent Technologies 6890N (Agilent Technologies, Little Falls, EUA) com injetor split/splitless e detector de nitrogênio e fósforo, acoplado ao computador com o programa HPCORE ChemStation para integração e processamento dos cromatogramas;

- Coluna capilar HP Ultra – 2 (Hewlett-Packard, Little Falls, EUA), composta com 5% (fenil) metilsiloxano, de 25m de comprimento x 0,20mm de diâmetro interno x 0,33µm de espessura de filme;
- Gases especiais para cromatografia em fase gasosa: ar sintético, hidrogênio e nitrogênio (Air Products);
- Ultra-som Thoenton Unique USC 700 (Unique-Thorton, São Paulo);
- Centrífuga clínica Excelsa II modelo 206BL (Fanem, São Paulo);
- Balança analítica Sartorius (Goettingen, Alemanha);
- Cartucho abselut™ NEXUS 60mg/3mL (Varian, USA);
- Suporte para extração em fase sólida a vácuo, Visipred DL (Supelco, Bellefonte, USA);
- Bloco de aquecimento com sistema de evaporação, modelo 18870 (Pierce, Rockford, USA).

4.1.3. Reagentes

- Metanol para análise Merck®;
- Diclorometano para análise Merck®;
- Isopropanol para análise Merck®;
- Tampão carbonato/ bicarbonato pH 9,5 com NaCl 1M:
 - Bicarbonato de potássio Merck®;
 - Carbonato de potássio Merck®;
 - Cloreto de sódio Merck®;
 - Água destilada.

4.1.4. Amostras de sangue total

- Referência negativa

Foram usadas bolsas de sangue cedidas pela Fundação Pró-Sangue do Hemocentro de São Paulo e do Hospital Municipal de Bertioga com o anticoagulante citrato/ fosfato/ dextrose-adenina e, também, um *pool* de seis amostras de sangue total *post mortem* negativa para antidepressivos;

- Referência positiva

Amostras de sangue total, como referência positiva, foram obtidas pela adição de soluções de trabalho de antidepressivos, para estudo de extração e validação.

- Amostras de casos *post mortem*

Provenientes da “coleção de amostras” do Núcleo de Toxicologia Forense do Instituto Médico Legal do Estado de São Paulo (NTF-IML), que apresentaram no histórico o possível uso de antidepressivos, um quadro de depressão, ou qualquer outro dado que sugira o envolvimento dessa classe de fármacos. Essas amostras foram coletadas durante o período de dezembro de 2005 e novembro de 2006.

- Amostras de pacientes com suspeita de intoxicação por antidepressivos

Os critérios de inclusão foram amostras provenientes do Centro de Controle de Intoxicação da Prefeitura Municipal de São Paulo (CCI-SP) de pacientes atendidos pela equipe médica (telefônico e hospitalar), de qualquer idade e de ambos os sexos, no período de junho até novembro de 2006, apresentando as seguintes características:

- Pacientes sintomáticos, com história de ingestão de qualquer antidepressivo, exposto ou não a outros agentes, com ou sem sintomas específicos, admitidos a qualquer tempo após a exposição.
- Pacientes sem história de ingestão de antidepressivos, mas que se enquadram nas seguintes situações: alteração do estado mental e/ou nível de consciência e síndrome colinérgica e/ou serotoninérgica.

Os critérios de exclusão são casos telefônicos para os quais não há indicação de coletar sangue para análises no CCI. Todos os casos incluídos foram acompanhados de uma ficha com informações do

paciente, uma adaptação da ficha do CCI-SP, preenchida pela equipe médica dessa instituição, conforme Apêndice I.

4.1.5. *Ética*

O projeto foi aprovado pelas Comissões de Éticas em Pesquisa da Faculdade de Ciência Farmacêutica da Universidade de São Paulo (Anexo I), da Secretaria Municipal da Saúde da Prefeitura de São Paulo (Anexo II), e do Instituto Médico Legal de São Paulo (Anexo III), e pela Comissão Nacional de Ética (Anexo IV).

4.2. Métodos

4.2.1. *Desenvolvimento de método para determinação de antidepressivos e produtos de biotransformação em sangue total*

O método foi desenvolvido para determinação de antidepressivos em amostras de sangue total, utilizando a técnica de extração em fase sólida com detecção por cromatografia em fase gasosa com detector de nitrogênio e fósforo.

4.2.1.1. *Preparação da amostra*

Uma alíquota de 25µL da solução de trabalho do padrão interno, etidocaína, correspondente a 100µg/mL, foi adicionada a uma alíquota de 500µL de sangue total. Após alcalinização do meio com 1mL do tampão, a amostra foi submetida a um banho de ultra-som por 10 minutos e, em seguida, centrifugada a 1899G por 10 minutos.

4.2.1.2. *Extração*

A amostra preparada conforme descrito em 4.2.1.1 foi extraída utilizando um cartucho abselut™ NEXUS de 60mg/3mL adaptada a um sistema a vácuo que mantém o fluxo constante em aproximadamente uma gota por segundo. Após a passagem completa da amostra, foi acrescentado 1mL da solução tampão, para lavagem, sob fluxo de 8-12 inHg. Logo após, o cartucho foi submetido à secagem com vácuo ajustado em 15 inHg ao longo de 5 minutos. A eluição foi feita com 2mL

de diclorometano/isopropanol (17/3, v/v); o eluato foi submetido à evaporação em temperatura ambiente sob fluxo de nitrogênio, após a secagem, ressuspendido com 100 μ L de metanol e, em seguida, 2 μ L foram injetados no CG-DNP. A Figura 11 apresenta um esquema do procedimento de extração.

Figura 11 – Fluxograma de extração de antidepressivos do sangue total

4.2.1.3. Condições cromatográficas

As análises foram efetuadas nas seguintes condições cromatográficas:

- Modo split 1:20;
- Gás de arraste: Nitrogênio a um fluxo inicial de 0,4 mL/min a pressão constante;
- Temperatura do injetor: 300°C;
- Temperatura do detector: 325°C;
- Programação de temperatura do forno: 180°C/1min, elevando 8°C/min até atingir 250°C, permanecendo nessa temperatura por 11,5 minutos;
- Tempo de corrida: 21,5 min.
- Velocidade média linear: 21 cm/s

4.2.2. Resolução entre os picos cromatográficos

A resolução é a medida da separação de dois picos consecutivos. Traduz a eficiência da coluna e da fase estacionária e serve para caracterizar a eficiência do sistema cromatográfico como um todo. É calculado conforme a fórmula a seguir:

$$Rs = \frac{2 \times (TR2 - TR1)}{Wb1 + Wb2}$$

Onde,

Rs: resolução

TR: tempo de retenção

Wb: largura do pico cromatográfico

Foi considerada uma resolução adequada, quando o valor é maior que 1,5, com uma resolução de 99,7% (AQUINO NETO; NUNES, 2003).

4.2.3. *Parâmetros de validação analítica*

Os parâmetros de validação analítica adotados no desenvolvimento desta metodologia seguiram o Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), anexo da resolução nº899, de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003) e o *International Conference Harmonization - ICH*, 1996. Desta forma, determinou-se a especificidade, o limite de detecção, o limite de quantificação, a linearidade, a precisão intra-ensaio e interensaio, a recuperação, a estabilidade e o *carryover*.

4.2.3.1. *Especificidade*

A especificidade é a habilidade do método de medir e diferenciar o analito de componentes que possam estar presentes na amostra, tais como produtos de biotransformação, impurezas, compostos de degradação ou componentes da matriz.

Esse parâmetro foi realizado a partir da análise de seis amostras de sangue total heparinizadas, sendo quatro normais, uma lipêmica e uma hemolisada, de indivíduos diferentes que não utilizaram os antidepressivos deste estudo. Foram analisadas, também, seis amostras de sangue total *post mortem* provenientes de indivíduos diferentes, os quais não apresentaram histórico que correlacionava com o uso de antidepressivos. Cada uma dessas amostras foi analisada segundo o procedimento desenvolvido neste projeto (4.2.1).

A aceitação da especificidade consiste na comparação dos tempos de retenção (TR) e dos tempos de retenção relativo (TRr) entre os possíveis picos que por ventura apareçam nas seis amostras heparinizadas e nas seis amostras *post mortem* com os dos antidepressivos obtidos de uma extração realizada em uma amostra de água adicionada dos antidepressivos estudados no projeto, na concentração do LIQ. Caso exista a presença de um pico que elua no mesmo TR ou TRr do analito, a área do pico interferente deve ser inferior a 20% da área do LIQ para garantir a especificidade dos analitos. No caso de existir um pico que elua em

um TR ou TRr igual ao do padrão interno, a área deve ser 5% inferior à área da concentração utilizada do padrão interno.

4.2.3.2. Limite de detecção

A determinação do limite de detecção foi baseada no desvio padrão da resposta e na inclinação da curva de calibração. Foram usadas seis diferentes concentrações próximas ao limite detectável, e por meio da relação resposta e concentração foi construída uma curva de calibração considerando no mínimo cinco pontos. Foi usado o teste de Grubbs para identificar valores anômalos, e esses foram retirados do cálculo. A resposta obtida é a relação entre a área do analito sobre a área do padrão interno. Esse procedimento foi realizado três vezes, obtendo três curvas de calibração. Por meio do cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, a equação da reta e o intercepto com o eixo Y são fornecidos.

Os dados da equação da reta foram aplicados na seguinte equação para o cálculo do limite de detecção (LD):

$$LD = \frac{Dpa \times 3,3}{IC}$$

Em que:

Dpa - é o desvio padrão do intercepto com o eixo Y das três curvas de calibração com o mínimo de quatro pontos e;

IC - é a média das inclinações das curvas de calibração. A IC é calculada pela diferença entre as áreas relativas do último e do primeiro ponto da curva dividida pela concentração final menos a inicial (ICH, 1996).

Após a determinação do limite de detecção de cada antidepressivo, as soluções – padrão de trabalho foram adicionadas a amostra de sangue de referência negativa, em cinco replicatas, para a avaliação da sua real detecção.

4.2.3.3. Limite inferior de quantificação

O limite inferior de quantificação (LIQ) foi encontrado por meio da mesma forma que foi obtido o limite de detecção, mas para tanto foi feito o uso da seguinte equação:

$$LIQ = \frac{Dpa \times 10}{IC}$$

Em que:

Dpa - é o desvio padrão do intercepto com o eixo Y das três curvas de calibração com o mínimo de quatro pontos e;

IC - é a média das inclinações das curvas de calibração. A IC é calculada pela diferença entre as áreas relativas do último e do primeiro ponto da curva dividida pela concentração final menos a inicial (ICH, 1996).

O limite de quantificação somente foi aceito quando obteve a precisão de no mínimo 20% através da análise de no mínimo cinco amostras adicionadas com padrões, segundo a ANVISA.

4.2.3.4. *Linearidade*

A linearidade foi realizada com sete amostras de sangue total adicionadas de analitos em concentrações crescentes a partir do limite de quantificação, amostra “branco” (matriz biológica isenta de padrões) e amostra “zero” (matriz biológica apenas com o padrão interno).

Inicialmente, verificou-se as curvas de calibração dos analitos são homoscedáticas ou heterocedásticas. Para tanto baseou-se no cálculo do F experimental e comparou-se com o limite unilateral de F ao nível de 1,0% de probabilidade, usando graus de liberdade de 4 (n-1). O F experimental foi encontrado a partir da divisão da variância obtida de 5 amostras do limite superior de quantificação (LSQ) pela variância obtida de 5 amostras do LIQ (ALMEIDA; CASTEL-BRANCO; FALCÃO, 2002).

Sendo caracterizado a presença de heterocedasticidade, foi realizada a escolha do fator de peso (*weighting factor-w*) para cada analito entre $1/x$, $1/x^2$, $1/x^{1/2}$, $1/y$ e $1/y^2$, $1/y^{1/2}$, sendo x , a concentração nominal e y , a área relativa. O coeficiente angular, a , e o intercepto da reta, b , da equação da reta ponderada foram estimados usando cada fator de peso, assim como o coeficiente de correlação, r , seguindo a fórmula abaixo:

$$b = \frac{\sum w \cdot \sum wxy - \sum wx \cdot \sum wy}{\sum w \cdot \sum wx^2 - (\sum wx)^2}$$

$$a = \frac{\sum wx^2 \cdot \sum wy - \sum wx \cdot \sum wxy}{\sum w \cdot \sum wx^2 - (\sum wx)^2}$$

$$r = \frac{\sum w \cdot \sum wxy - \sum wx \cdot \sum wy}{[\sum w \cdot \sum wx^2 - (\sum wx)^2]^{1/2} \cdot [\sum w \cdot \sum wy^2 - (\sum wy)^2]^{1/2}}$$

Onde:

w – fator de peso

x – concentração nominal do analito

y – área relativa do analito

A escolha do fator de peso foi baseada na soma das porcentagens de erro relativo (%ER), calculado para cada analito nos quatro fatores de peso estudado, segundo a fórmula abaixo (ALMEIDA; CASTEL-BRANCO; FALCÃO, 2002). A linearidade foi aceita quando o coeficiente de correlação linear foi igual ou superior a 0,98.

$$\%ER = \frac{C_{\text{encontrada}} - C_{\text{nominal}}}{C_{\text{nominal}}} \times 100$$

Onde:

$C_{\text{encontrada}}$ – concentração que corresponde à calculada a partir de cada equação de regressão linear obtida utilizando um determinado fator de peso.

C_{nominal} – concentração que corresponde ao padrão do analito

As concentrações utilizadas para a determinação da curva de calibração de cada antidepressivo encontram-se na Tabela 5 a seguir, e foram aceitas no mínimo 6 pontos para cada linearidade, sendo sempre incluído o ponto 1 (LIQ) e o ponto 7 (LSQ).

Tabela 5 - Concentrações em mg/L utilizadas na linearidade

Antidepressivos	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6	Ponto 7
Amitriptilina	0,90	1,20	1,60	3,00	5,00	10,00	12,00
Clomipramina	0,40	0,80	1,60	3,00	5,00	10,00	12,00
Desipramina	1,60	2,00	3,00	5,00	6,00	10,00	12,00
Desmetilclomipramina	1,20	2,00	3,00	5,00	6,00	10,00	12,00
Fluoxetina	0,60	1,20	2,00	3,00	5,00	10,00	12,00
Imipramina	0,50	1,00	1,60	2,00	5,00	10,00	12,00
Nortriptilina	0,60	1,20	1,60	3,00	5,00	10,00	12,00
Norfluoxetina	0,90	1,20	2,00	3,00	5,00	10,00	12,00
Sertralina	0,40	0,80	1,60	2,00	5,00	10,00	12,00

4.2.3.5. Precisão

Para o desenvolvimento das precisões inter e intra-ensaio foram determinadas três concentrações dos analitos, denominadas: controle de qualidade baixo (CQB), controle de qualidade médio (CQM) e controle de qualidade alto (CQA). No ponto que se refere ao CQB, os analitos apresentam uma concentração idêntica ao LIQ, enquanto que o CQM a concentração é de 5mg/L e no CQA de 10mg/L, equivalente a 83% da concentração do LSQ, que é de 12mg/L.

O estudo da precisão intra-ensaio foi realizado utilizando cinco replicatas para cada concentração, CQB, CQM, CQA, todas analisadas em um mesmo dia. Já a precisão interensaio foi determinada com as mesmas concentrações, mas com extrações distintas desenvolvidas durante três dias consecutivos. Os dados das três séries foram estudados e analisados através do cálculo do coeficiente de variação, não se admitindo valores superiores a 15%, exceto para o LIQ, para o qual se admite valores menores ou iguais a 20%, segundo a fórmula:

$$CV = \frac{Dpa}{X} \times 100$$

Em que:

Dpa - é o desvio padrão

X - a média da área relativa

4.2.3.6. *Recuperação*

Este estudo foi realizado para avaliar a quantidade de analito recuperada pelo procedimento analítico, comparando a área relativa quando as soluções-padrão de antidepressivos são adicionadas nas amostras de sangue total de referência negativa, antes e após a extração. Cinco replicatas de cada ponto controle (CQB, CQM, CQA) foram realizados com o analito e o padrão interno. Os dados são analisados a partir da divisão da área relativa do analito obtido da extração com a área relativa do analito adicionado sem a extração, multiplicado por 100, resultando na porcentagem correspondente a eficiência do procedimento de extração do método, como demonstrado a seguir:

$$\text{Recuperação \%} = \frac{\text{valor obtido}}{\text{valor adicionado}} \times 100$$

Os valores de recuperação desejáveis são os mais próximos de 100%, entretanto valores menores são aceitáveis desde que apresentem uma precisão ideal.

4.2.3.7. *Estabilidade*

O ensaio de estabilidade dos fármacos foi realizado reproduzindo as reais condições de manuseio e análise das amostras. Foram avaliadas as estabilidades dos analitos após armazenagem de curta e de longa duração e após três ciclos de refrigeração e desrefrigeração.

Para verificação da estabilidade após armazenamento de curta duração utilizaram-se três amostras de concentrações equivalentes ao CQB/LIQ e ao CQA. Cada uma permaneceu à temperatura ambiente por doze horas e foram analisadas em seguida. A estabilidade de longa duração foi realizada com três amostras de concentrações equivalentes ao CQB/LIQ e ao CQA após serem armazenadas por 1 mês em temperatura entre 2 e 8°C. Para a estabilidade dos analitos após três ciclos de refrigeração foram utilizadas três amostras de concentrações equivalentes ao CQB/LIQ e ao CQA, nas seguintes condições: as amostras foram mantidas à temperatura entre 2 e 8°C por 12 horas, em seguida são retiradas da geladeira por uma hora, e retornam a temperatura entre 2 e 8°C, reiniciando um novo ciclo. A análise foi realizada após o terceiro ciclo.

As amostras foram consideradas estáveis quando não se observou desvio superior a 15% do valor obtido das amostras recém-preparadas, com exceção do LIQ, para o qual se aceita desvio de até 20%.

4.2.4. *Carryover*

Como a resolução 899 da ANVISA não relata sobre o estudo do *carryover*, este foi realizado por meio do programa estatístico EP Evaluator Release 7. Para tanto, foram preparadas 11 alíquotas de um pool de três extrações de amostras com as concentrações dos analitos no LIQ e 10 alíquotas de um pool de três extrações de amostras com as concentrações dos analitos no LSQ. Em seguida, foram injetadas no CG as alíquotas na seguinte sequência:

- 3 alíquotas do pool baixo;
- 2 alíquotas do pool alto;
- 1 alíquotas do pool baixo;
- 2 alíquotas do pool alto;
- 4 alíquotas do pool baixo;
- 2 alíquotas do pool alto;
- 1 alíquotas do pool baixo;
- 2 alíquotas do pool alto;
- 1 alíquotas do pool baixo;
- 2 alíquotas do pool alto;
- 1 alíquotas do pool baixo;

Os resultados foram analisados por meio do cálculo do desvio padrão (1) entre a área relativa do analito no LIQ após cada amostra do LSQ e do desvio padrão (2) entre a área relativa do analito no LIQ entre cada amostra do LIQ, exceto para a primeira injeção. O limite permitido para o *carryover* é 3 vezes o valor do desvio padrão (1), e o *carryover* é calculado diminuindo o desvio padrão (1) de (2).

4.2.5. Aplicação do método em amostras de sangue total

As amostras de sangue total provenientes do CCI-SP e do NTF-IML foram analisadas pelo método descrito em 4.2.1.

5. RESULTADOS

5.1. Resolução entre os picos cromatográficos

A Figura 12 apresenta um cromatograma obtido de uma amostra de sangue total referência negativa adicionada dos antidepressivos selecionados no presente estudo após os procedimentos 4.2.1.1., 4.2.1.2. e 4.2.1.3. A resolução entre os picos foi superior a 1,5, como demonstra a Tabela 6.

Figura 12- Cromatograma de uma amostra de sangue total referência negativa adicionada do PI (etidocaína) e dos antidepressivos selecionados neste estudo na concentração do limite superior de quantificação

Tabela 6 - Resolução entre os picos cromatográficos

Picos	Resolução
Norfluoxetina - Interferente	2,28
Interferente - Fluoxetina	2,50
Fluoxetina - Etidocaína	60,23
Etidocaína - Amitriptilina	52,44
Amitriptilina - Nortriptilina	5,94
Nortriptilina - Imipramina	3,41

Imipramina - Desipramina	7,52
Desipramina - Sertralina	42,84
Sertralina - Clomipramina	12,74
Clomipramina - Desmetilclomipramina	9,46

5.2. Especificidade

As amostras de sangue total heparinizados (normais, hemolizadas e lipêmicas) e de *post mortem* analisadas no teste de especificidade não apresentaram picos que eluíram no mesmo TR/TRr dos analitos do estudo. Contudo, foi possível verificar a presença constante de um interferente entre a fluoxetina e a norfluoxetina (Figura 13), mas que apresentou uma resolução adequada conforme resultados obtidos na Tabela 6.

Figura 13 - Cromatograma obtido de uma amostra de sangue total heparinizada para estudo da especificidade, mostrando a presença de um interferente

5.3. Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação estão apresentados na Tabela 7, e foram obtidos conforme o item 4.2.3.2 e 4.2.3.3.

Tabela 7 - Limite de detecção e quantificação dos antidepressivos em mg/L

FÁRMACO	LIMITES	
	LD	LIQ
Amitriptilina	0,3	0,9
Clomipramina	0,1	0,4
Desipramina	0,4	1,6
Desmetilclomipramina	0,4	1,2
Fluoxetina	0,2	0,6
Imipramina	0,2	0,5
Norfluoxetina	0,3	0,9
Nortriptilina	0,2	0,6
Sertralina	0,1	0,4

5.4. Linearidade

Todos os analitos apresentaram heterocedasticidade, ou seja, todos os valores de F experimental foram superiores aos valores do limite unilateral de F usando graus de liberdade de 4 (n-1), 15,98.

A Tabela 8 e o Gráfico 4 apresentam os resultados da linearidade: o coeficiente de correlação linear, o coeficiente angular, o intercepto da reta e o fator de peso escolhido para cada amostra baseado no menor valor da somatória dos ER encontrados.

Tabela 8 - Resultados da linearidade dos antidepressivos em sangue com o anticoagulante citrato/ fosfato/ dextrose-adenina

Analito	w	a	b	r
Amitriptilina	$1/x$	0,1863	-0,0223	0,9968
Clomipramina	$1/x$	0,2778	0,0005	0,9952
Desipramina	$1/x$	0,2206	-0,0344	0,9837
Desmetilclomipramina	$1/x$	0,1717	-0,1191	0,9864
Fluoxetina	$1/x^2$	0,1180	0,0580	0,9884
Imipramina	$1/x^2$	0,2939	0,0002	0,9810
Norfluoxetina	$1/y$	0,0623	-0,0004	0,9837
Nortriptilina	$1/x$	0,1354	-0,0302	0,9921
Sertralina	$1/x^2$	0,1401	0,0109	0,9866

w – fator de peso; a – coeficiente angular; b – intercepto da reta; r – coeficiente linear

Gráfico 4 - Linhas de tendência das linearidades em sangue total dos antidepressivos

5.5. Precisão intra e interensaio

Os estudos de precisão intra e interensaio proporcionaram os dados apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Dados do coeficiente de variação da precisão dos antidepressivos, em %

FÁRMACO	PRECISÃO %					
	CQB		CQM		CQA	
	INTRA	INTER	INTRA	INTER	INTRA	INTER
Amitriptilina	5,8	10,9	2,6	6,8	2,2	8,9
Clomipramina	8,9	13,2	6,8	14,3	3,2	9,9
Desipramina	5,9	10,9	6,5	11,8	10,1	13,2
Desmetilclomipramina	5,0	11,5	10,6	14,6	10,2	14,3
Fluoxetina	2,8	11,3	2,7	10,5	3,7	9,9
Imipramina	8,3	18,9	5,1	13,7	3,2	8,5
Norfluoxetina	7,9	12,9	13,7	13,6	3,3	14,6
Nortriptilina	6,0	13,3	5,0	15,0	7,3	11,0
Sertralina	9,8	18,7	3,9	10,2	5,1	10,7

5.6. Recuperação

Na Tabela 10, estão expostos os resultados da recuperação obtida conforme o item 4.2.3.6.

Tabela 10 - Dados da porcentagem de recuperação dos antidepressivos

FÁRMACO	RECUPERAÇÃO %		
	CQB	CQM	CQA
Amitriptilina	86	77	77
Clomipramina	66	69	75
Desipramina	67	47	49
Desmetilclomipramina	40	49	48
Fluoxetina	78	70	64
Imipramina	67	72	70
Norfluoxetina	72	41	52

Nortriptilina	75	95	56
Sertralina	70	74	64

5.7. Estabilidade

A Tabela 11 apresenta os dados do estudo de estabilidade feitos segundo o item 4.2.3.7.

Tabela 11 - Estabilidade das amostras de antidepressivos, em %, em relação a uma amostra recém – preparada

Analito	Curta duração 12 horas		Ciclo de refrigeração		Longa duração	
	CQB	CQA	CQB	CQA	CQB	CQA
Amitriptilina	1,6	9,3	-6,8	2,5	-17,22	4,31
Clomipramina	-13,1	8,2	-9,5	4,6	-36,7	-4,5
Desipramina	-18,6	8,8	4,7	12,0	-39,1	-14,9
Desmetilclomipramina	12,8	8,1	7,06	-2,4	-30,6	-19,6
Fluoxetina	3,2	5,8	-19,3	7,8	-26,0	7,7
Imipramina	5,7	10,6	7,6	0,8	-1,1	-7,6
Norfluoxetina	19,4	3,7	-17,28	-0,1	-20,4	-20
Nortriptilina	12,0	4,5	-11,5	-9,2	-38,67	3,3
Sertralina	19,8	12,4	-10,0	13,9	-12,4	-2,2

5.8. Carryover

Apenas a amitriptilina apresentou *carryover* de 4% na área relativa, enquanto que a análise dos demais não apresentou este fenômeno no teste realizado.

5.9. Validação parcial

De acordo com a Resolução nº 899 da ANVISA devem ser realizadas validações parciais quando ocorrerem modificações no método, como alteração de anticoagulante. Assim a linearidade em sangue total *post mortem* sem anticoagulante foi efetuada com um *pool* de seis amostras, previamente analisadas quanto a existência de antidepressivos. Os dados encontram-se nas Tabelas 12 e 13.

Tabela 12 - Resultados da linearidade dos antidepressivos em sangue com heparina

Analito	w	a	b	r
Amitriptilina	$1/x$	0,1886	-0,0319	0,9873
Clomipramina	$1/x$	0,2736	-0,0007	0,9898
Desipramina	$1/x$	0,2539	-0,1659	0,9846
Desmetilclomipramina	$1/x$	0,1791	-0,1291	0,9864
Fluoxetina	$1/x^2$	0,1174	0,0521	0,9882
Imipramina	$1/x^2$	0,2953	-0,0009	0,9953
Norfluoxetina	$1/y$	0,1549	-0,0919	0,9926
Nortriptilina	$1/x$	0,1222	-0,0227	0,9939
Sertralina	$1/x^2$	0,1434	-0,0024	0,9902

w – fator de peso; a – coeficiente angular; b – intercepto da reta; r – coeficiente linear

Tabela 13 - Resultados da linearidade dos antidepressivos em sangue *post mortem*

Analito	w	a	b	r
Amitriptilina	$1/x$	0,1810	0,0426	0,9818
Clomipramina	$1/x$	0,2866	-0,0048	0,9937
Desipramina	$1/x$	0,2883	-0,0316	0,9837
Desmetilclomipramina	$1/x$	0,2189	-0,0042	0,9838
Fluoxetina	$1/x^2$	0,1151	0,0750	0,9881
Imipramina	$1/x^2$	0,3402	0,0072	0,9937
Norfluoxetina	$1/y$	0,1196	0,09186	0,9900
Nortriptilina	$1/x$	0,1868	-0,0408	0,9942
Sertralina	$1/x^2$	0,1893	0,0197	0,9932

w – fator de peso; a – coeficiente angular; b – intercepto da reta; r – coeficiente linear

5.10. Aplicação do método em amostras de sangue total

A Tabela 14 apresenta uma sinopse dos dados coletados das amostras analisadas do CCI-SP, a partir da ficha com informações do paciente (Apêndice 1), e o resultado obtido a partir do presente estudo. Todas as amostras do CCI-SP analisadas ocorreram na zona urbana e em residência, exceto para os casos CCI-2, CCI-5 e CCI-15 que tiveram essas informações ignoradas. A exposição foi oral para os casos CCI-1, CCI-6, CCI-9, CCI-10, CCI-11, CCI-14 e, CCI-18, e os demais foram ignorados. O atendimento foi sempre telefônico de hospital/clínica, exceto para o caso CCI-6 e o CCI-13, que foi hospitalar, no pronto socorro do Hospital Arthur Ribeiro de Saboya, Jabaquara, São Paulo – SP.

A Tabela 15 apresenta os resultados obtidos pela análise de amostras do NTF-IML por meio do presente método, juntamente com as informações coletadas do banco de dados do IML.

Tabela 14 - Resultados das amostras analisadas obtidas do CCI-SP

Caso	Idade	Sexo	Δt entre a exposição e a coleta (h)	Tipo de ocorrência	Circunstância	Tipo de exposição	Possíveis agentes tóxicos envolvidos	Sintomas	AD (s) achado no presente trabalho	Conc. sang. (mg/L)	Informações geradas no CCI
CCI-1	20	F	+/- 19	Intoxicação	Tentativa de suicídio	Aguda sobre crônica	Fenobarbital, clonazepam, fluoxetina e vinho	Sonolência, midríase e distúrbios da fala	-	-	Fenobarbital 45mg/L
CCI-2	18	F	+/- 4	Diagnóstico diferencial	Ignorada	Ignorada	Fluoxetina	Torpor e agitação	-	-	Alcoolemia: 1,855g/L
CCI-3	34	F	NI	Diagnóstico diferencial	Ignorada	Ignorada	Benzodiazepínicos e barbitúricos	Agitação motora e alteração da fala	-	-	CCD – SNI
CCI-4	49	F	NI	Diagnóstico diferencial	Ignorada	Ignorada	-	Torpor, coma e taquicardia	-	-	Há um mês com ideação suicida. Faz uso regular de alprazolam e fenobarbital
CCI-5	16	M	NI	Diagnóstico diferencial	Ignorada	Ignorada	desconhecido	Torpor, agitação, taquicardia e midríase	-	-	CCD - negativo
CCI-6	37	M	+/- 10	Intoxicação	Abuso e tentativa de suicídio	Aguda repetida	Fluoxetina, bebida alcoólica	Sonolência, torpor, coma, e desidratação	-	-	Alcoolemia: 4,07g/L
CCI-7	29	F	+/- 4,5	Diagnóstico diferencial	Ignorada	Ignorada	Fluoxetina e bromazepam	Coma e midríase	-	-	Em tratamento para depressão há 7 dias. CCD - SNI
CCI-8	37	M	NI	Diagnóstico diferencial	Uso terapêutico	Crônico	Paroxetina, diazepam e carbamazepina	Agitação, confusão mental, depressão	-	-	Carbamazepina < 1,25mg/L CCD - SNI

Continua na próxima página.

Continuação da Tabela 14.

Caso	Idade	Sexo	Δt entre a exposição e a coleta (h)	Tipo de ocorrência	Circunstância	Tipo de exposição	Possíveis agentes tóxicos envolvidos	Sintomas	AD (s) achado no presente trabalho	Conc. sang. (mg/L)	Informações geradas no CCI
CCI-9	22	F	NI	Intoxicação	Tentativa de suicídio	Aguda única	Amitriptilina, clonazepam	Sonolência, torpor, coma e midríase	amitriptilina	NQ	-
CCI-10	17	M	+/- 7	Intoxicação	Tentativa de suicídio	Aguda única	Carbamazepina (19 comp.) e fluoxetina	Sonolência, torpor, coma insuficiência respiratória -IOT	fluoxetina	1,016	Carbamazepina > 20mg/L CCD - SNI
CCI-11	40	M	+/- 2	Intoxicação	Tentativa de suicídio	Aguda única	Amitriptilina (10 comp.)	Sonolência, agitação, taquicardia, desidratação	amitriptilina	NQ	-
CCI-12	36	F	NI	Diagnóstico diferencial	Ignorada	Ignorada	Amitriptilina	Torpor, agitação, taquicardia, hipertermia e hipertensão	amitriptilina	NQ	CCD urina - SNI CCD sangue - SNI + amitriptilina
CCI-13	54	M	NI	Diagnóstico diferencial	Ignorada	Ignorada	-	Deficiência motora e afaxia	-	-	CCD sangue – carbamazepina CCD urina – carbamazepina e nortriptilina
CCI-14	39	F	+/- 3	Intoxicação	Ignorada	Agudo sobre crônica	Carbamazepina, fluoxetina e amitriptilina	coma	fluoxetina norfluoxetina	0,78 NQ	Carbamazepina > 20mg/L CCD – SNI
CCI-15	32	F	+/- 12	Intoxicação	Tentativa de suicídio	Ignorada	Amitriptilina	Coma, agitação, confusão mental	amitriptilina nortriptilina	NQ NQ	CCD – urina - amitriptilina e nortriptilina

Continua na próxima página.

Continuação da Tabela 14.

Caso	Idade	Sexo	Δt entre a exposição e a coleta (h)	Tipo de ocorrência	Circunstância	Tipo de exposição	Possíveis agentes tóxicos envolvidos	Sintomas	AD (s) achado no presente trabalho	Conc. sang. (mg/L)	Informações geradas no CCI
CCI-16	8	F	+/- 5	Diagnóstico diferencial	Ignorada	Ignorada	Fenitoína e antihipertensivo	Sonolência, ataxia e bradicardia	-	-	CCD - SNI
CCI-17	14	F	+/- 11	Diagnóstico diferencial	Ignorada	Ignorada	Álcool e cocaína	Agitação, sudorese e miose	-	-	Alcoolemia: 0,07g/L Cocaína + CCD – SNI e indicativo de benzodiazepínico
CCI-18	31	F	+/- 3	Intoxicação	Tentativa de suicídio	Aguda sobre crônica	Fluoxetina, Diazepam, amitriptilina, álcool e cocaína	Miose, sonolência e vômito	-	-	Cocaína + CCD – SNI Conteúdo gástrico: indicativo de nortriptilina

Δt – diferença temporal; NI – não informado, CCD – cromatografia em camada delgada, SNI – substância não identificada, NQ – não quantificável, IOT – intubação orotraqueal

Tabela 15 - Resultados das amostras analisadas obtidas do IML - SP

Caso	Idade	Sexo	Δt entre a coleta e a exposição (h)	Informações do boletim de ocorrência	Informações da requisição médica	AD (s) achado no presente trabalho	Conc. sang. (mg/L)	Informações geradas no NTF
IML-1	30	M	< 48	Morte suspeita Enfermeiro. Sofria de depressão e fazia uso de medicamento controlado	Suspeita de overdose de cocaína. Com edema agudo de pulmão	sertralina	0,54	Confirmação para benzoilecgonina negativa
IML-2	51	F	< 12	Morte suspeita Médica. Após queda da escada, a vítima não aceitou tratamento e o óbito foi constatado mais tarde	Fazia uso de BZD, AD, e opióide	sertralina	1,17	Confirmação para anfetamina positiva
IML-3	18	M	-	Morte suspeita	Edema generalizado leve e congestão hepática. Ingestão de 60 comprimidos	fluoxetina	1,30	-
IML-4	45	M	-	Morte suspeita Comerciante. “Queda” da janela	Suicídio, queda, politraumatismo e depressão leve com uso de BZD	-	-	Confirmação para canabinóides positiva
IML-5	40	M	-	Morte suspeita	Coração aumentado. Histórico de epilepsia	-	-	Pontos pretos no estômago Suspeita de TEMIK
IML-6	46	F	-	-	Ingestão concomitante de vários fármacos	amitriptilina nortriptilina	5,51 5,52	Paciente chegou a ser hospitalizada
IML-7	48	F	-	Morte suspeita Delegada afastada do trabalho em razão de tratamento psiquiátrico	-	-	-	-

Continua na próxima página

Continuação da Tabela 15.

Caso	Idade	Sexo	Δt entre a coleta e a exposição (h)	Informações do boletim de ocorrência	Informações da requisição médica	AD (s) achado no presente trabalho	Conc. sang. (mg/L)	Informações geradas no NTF
IML-8	34	F	-	Suicídio Ingestão de chumbinho e enforcamento. Fazia uso de antidepressivo Carta de despedida, copo de vinho e frasco com chumbinho apreendidos no local	-	-	-	Chumbinho no estômago
IML-9	30	F	+/- 72	Encontrava em surto psicótico	Fazia uso de fluoxetina	fluoxetina norfluoxetina	6,19 NQ	-
IML-10	23	F	-	-	Uso há 7 dias de antidepressivo : nortriptilina	nortriptilina	1,82	-
IML-11	65	F	-	Morte suspeita Vítima deitada na cama com lesões pelo corpo	-	fluoxetina norfluoxetina	0,85 NQ	-
IML-12	40	F	-	-	Suicídio por ingestão de BZD e AD	-	-	CCD – negativo Dosagem alcoólica - negativo
IML-13	22	M	< 12	Suicídio consumado Usuário de drogas de abuso Vários comprimidos pelo chão	-	Imipramina desipramina	1,28 2,84	-
IML-14	41	F	-	Morte suspeita Caída no chão em local público	Suspeita de envenenamento Usava fluoxetina e clonazepam	fluoxetina	3,21	Dosagem alcoólica - negativa
IML-15	56	M	-	Morte suspeita Medicamentos ao lado do corpo	-	-	-	Análise por CCD identificaram o citalopram
IML-16	21	F	-	-	Hospitalizada por intoxicação por AD	amitriptilina nortriptilina	1,04 1,36	-

Continua na próxima página

Continuação da Tabela 15.

Caso	Idade	Sexo	Δt entre a coleta e a exposição (h)	Informações do boletim de ocorrência	Informações da requisição médica	AD (s) achado no presente trabalho	Conc. sang. (mg/L)	Informações geradas no NTF
IML-17	53	M	-	Morte suspeita “queda” da janela	Fazia uso de AD com mudança de medicação há pouco tempo	-	-	-
IML-18	16	F	-	Morte suspeita Uso de diversos medicamentos psicotrópicos Houve outras tentativas de suicídio anteriormente	Vítima com depressão	sertralina	1,14	-
IML-19	-	F	< 12	Morte a esclarecer Paciente internada em hospital psiquiátrico	Paciente psicopata	-	-	-
IML-20	51	M	-	Morte suspeita Ingestão concomitante de imipramina, diazepam biperideno, entre outros	Ingestão concomitante de vários fármacos	imipramina desipramina	4,25 2,24	-
IML-21	16	M	-	Morte suspeita Uso de várias medicações terapêuticas	Morte suspeita após surto psicótico	-	-	-
IML-22	42	F	-	-	Ingestão de medicamento Sofre de depressão	fluoxetina norfluoxetina	3,89 3,65	Paciente chegou a ser hospitalizada

Continua na próxima página

Continuação da Tabela 15.

Caso	Idade	Sexo	Δt entre a coleta e a exposição (h)	Informações do boletim de ocorrência	Informações da requisição médica	AD (s) achado no presente trabalho	Conc. sang. (mg/L)	Informações geradas no NTF
IML-23	58	F	< 24	Morte suspeita Médica que sofria de etilismo e comportamento instável frente a medicamentos psicotrópicos como “Rivotril, Seroquel e Atenolol”	-	-	-	Dosagem alcoólica 1,4g/L
IML-24	20	M	< 86	Morte suspeita Policial militar depressivo e com ingestão freqüente de bebidas alcoólicas há pouco tempo. Foram encontradas duas caixas de diazepam vazias próximo à vítima	-	-	-	-

Δt – diferença temporal; AD – antidepressivo; BZD – benzodiazepínico; CCD – cromatografia em camada delgada; NQ – não quantificável; NTF – Núcleo de Toxicologia Forense

6. DISCUSSÃO

Para cumprir o objetivo proposto no presente trabalho, foi realizada, inicialmente, a seleção dos antidepressivos, tomando-se como base seu consumo, incidência de intoxicação no Brasil, toxicidade e farmacocinética.

Nesse contexto, foram selecionadas a amitriptilina, a clomipramina, a nortriptilina e a fluoxetina, pois fazem parte da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais, RENAME (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002), e assim colaboram com o alto consumo desses fármacos no Brasil. Além disso, esses antidepressivos foram os principais agentes relacionados às notificações de intoxicação no Centro de Controle de Intoxicação da Prefeitura de São Paulo durante os anos de 1998 e 2002, junto com a imipramina e a sertralina. De acordo com a farmacocinética, a nortriptilina, a desipramina, a desmetilclomipramina e a norfluoxetina são os produtos de biotransformação desmetilados da amitriptilina, imipramina, clomipramina e fluoxetina, respectivamente, que exibem atividade farmacológica e tempo de meia-vida superior ao fármaco de origem, fatos que contribuíram para a seleção dessas substâncias no desenvolvimento do método. A desipramina, por exemplo, possui um potencial tóxico superior a imipramina (LOTRICH; POLLOCK, 2005). Contudo, a norsertralina ou desmetilsertralina, produto de biotransformação da sertralina, apesar de apresentar tempo de meia-vida mais prolongado em relação ao fármaco de origem, não foi inserida neste estudo, por possuir uma atividade farmacológica limitada e um risco restrito de interações farmacológicas (HIEMKE; HARTTER, 2000).

O sangue total foi a matriz selecionada para atender as duas áreas de aplicação considerados no presente trabalho: a forense e a emergência clínica. Essa matriz oferece algumas vantagens na área forense, como a de ser abundante o suficiente para permitir estudos de *causa mortis* e fornecer o único material biológico sanguíneo disponível no *post mortem*, pela dificuldade de separação do plasma ou do soro (FLANAGAN; CONNALLY; EVANS, 2005; DRUMER, 2004). Além do mais, o sangue *post mortem* pode oferecer outro dado importante, pois permite avaliar a influência do fármaco no óbito; encontrada uma concentração elevada, a ingestão de

uma superdosagem fica evidente e vice – versa. Os fármacos que possuem volume de distribuição alto e, conseqüentemente, são influenciados pela redistribuição *post mortem*, como os antidepressivos, devem ser quantificados no sangue periférico, por representar de forma mais fidedigna a concentração *antemortem* (PROUTY; ANDRESON, 1990). No caso dos pacientes intoxicados por antidepressivos em situações de emergência, o plasma e o soro são as matrizes mais utilizadas. Contudo, o sangue total tem surgido como uma alternativa mais confiável, pois a concentração de ADTs no soro ou no plasma, como indicador de prognóstico de risco de convulsões, arritmias ventriculares e morte em pacientes com superdosagem de antidepressivos, é questionável (BAILEY; BUCLEY. AMRE, 2004). Esse achado é pouco explorado na literatura; apenas um trabalho foi encontrado, e este correlacionou a concentração de antidepressivos no plasma e no sangue total com o prolongamento do complexo QRS do eletrocardiograma, que é um outro indicador de prognóstico de toxicidade desses fármacos. O resultado demonstrou que o sangue total possui uma correlação superior à do plasma, provavelmente pela distribuição dos ADTs para os eritrócitos (THANACODY; THOMAS, 2005).

Na revisão de literatura realizada relativa à extração em fase sólida (EFS) com antidepressivos, há referência do uso de cartuchos de adsorventes de fase reversa (GUPTA, 1992), de troca iônica (WILLE, 2005) e de fase mista (MARTINEZ; DE LA TORRE; ALMARZA, 2002). No presente trabalho, o cartucho de EFS selecionado foi o abselut™ NEXUS, de fase reversa, como adsorvente alternativo composto do copolímero estireno-divinilbenzeno-metacrilato; o estireno-divinilbenzeno confere características apolares, enquanto o metacrilato é responsável pela polaridade da fase, o que proporciona um balanço hidrofílico-lipofílico (WALKER; MILLS, 2002). Todavia, a proporção existente de cada componente é uma informação preservada pelo fabricante, sendo que a porcentagem de adsorvente hidrofóbico é maior do que o hidrofílico. Essa característica possibilita um aumento no movimento da água da amostra pelo adsorvente e melhora a transferência de massa, aumentando a eficiência da coluna. Dessa forma, não há necessidade da etapa do condicionamento durante o processo de extração, o que constitui uma praticidade analítica. Não há referência na literatura do emprego desse cartucho para a extração de antidepressivos; seu emprego foi descrito em apenas dois artigos: Giacometti,

Milosevic e Cedomila (2002), que não recomendam para extração de lipídios polares e He et al. (2005), que obtiveram resultados aceitáveis com benzodiazepínicos.

Por outro lado, a EFS é uma técnica consolidada em matrizes biológicas, como o plasma, o soro e a urina. Entretanto, há poucas publicações empregando a EFS para sangue total, provavelmente porque as células sangüíneas tendem a obstruir o cartucho, principalmente quando a extração é automatizada (POLETTINI et al., 1998), ocasionando recuperações baixas e não reprodutíveis (CHEN et al., 1992b).

Diversos estudos foram realizados nesse trabalho, apresentados a seguir, que permitiram a padronização de um método utilizando o cartucho abselut™ NEXUS e o sangue total, superando as diversidades analíticas e ampliando a possibilidade de realização das análises de antidepressivos nas salas de emergências e em casos forenses.

Para a obtenção de um bom resultado, é fundamental um pré-tratamento do sangue total antes de colocá-lo no cartucho. Chen et al. (1992b) desenvolveram um estudo no qual compararam a recuperação de vários fármacos, inclusive de alguns antidepressivos tricíclicos, em diversos procedimentos de precipitação de proteínas: diluição da amostra com tampão seguida de banho de ultra-som, uso da acetonitrila, do metanol e do sulfato de zinco com metanol. O primeiro procedimento foi o que apresentou melhor recuperação, pois o banho de ultra-som fragmenta as células sanguíneas, enquanto que a diluição diminui a viscosidade do sangue. O emprego da acetonitrila, do metanol e do sulfato de zinco com metanol apresentou recuperação inferior, provavelmente devido à co-precipitação. Diante desses dados, o pré - tratamento escolhido foi a diluição da amostra com tampão seguida de banho de ultra-som e de centrifugação para precipitar as proteínas.

Outro desafio enfrentado na padronização do método foi identificar o melhor pH do tampão. Como os antidepressivos são substâncias básicas, buscou-se trabalhar com pH alcalino com o objetivo de aumentar a adsorção dos analitos no adsorvente apolar do cartucho de EFS. Os primeiros estudos foram realizados com o tampão de bicarbonato de sódio (pH 10) e a recuperação e a precisão foram

insatisfatórias. A possível justificativa é que as funções ésteres do metacrilato da NEXUS podem ser hidrolisadas em pH maior do que 10, sendo estáveis por um breve período (HENRY, 2000), apesar de o fabricante garantir estabilidade entre o pH 0 e 14. Entretanto, tentou-se trabalhar com um pH ligeiramente menor, 9,5, utilizando-se tampão carbonato/bicarbonato (DEUTSCHER, 1990). A essa solução adicionou-se cloreto de sódio 1M. Aparentemente, a presença da camada de solvatação em analitos polares prejudica a interação do adsorvente, do copolímero estireno-divinilbenzeno, com a estrutura apolar dos analitos. Desta forma, ao adicionar o sal, a camada de solvatação é retirada aumentando a recuperação e diminuindo o coeficiente de variação do método (BOSMAN et al., 2002). A lavagem do cartucho após a passagem da amostra, com tampão pH 9,5, possibilita a retirada de interferentes hidrofílicos. Em seguida, o cartucho permanece no vácuo por cinco minutos para evitar a interferência da solução de lavagem no eluato (ZEEUW; FRANKE, 2000).

O solvente de eluição foi escolhido com base nos descritos pela literatura e nos testes laboratoriais realizados neste trabalho. Os seguintes eluentes foram analisados: metanol, acetato de etila/acetona (4/1, v/v), diclorometano/isopropanol (17/3, v/v) e clorofórmio/isopropanol/n-heptano (10/14/26, v/v/v). Inicialmente, utilizou-se o metanol, de acordo com informações do fabricante do cartucho. Contudo, o metanol extraiu muitos interferentes; o eluato apresentou coloração avermelhada e necessitou de um longo período para evaporar. O acetato de etila/acetona (4/1, v/v) não foi eficiente, pois a nortriptilina e a desipramina ficaram retidas no cartucho após a sua passagem. Isso foi visualizado por meio de uma segunda eluição com éter no mesmo cartucho e analisado no CG-DNP. Apesar de o éter dietílico ter eluído de forma satisfatória, esse solvente não foi empregado como eluente devido a sua alta volatilidade, que pode prejudicar a precisão da extração. Por fim, o eluente selecionado foi o diclorometano/isopropanol (17/3, v/v), pois os antidepressivos são eluídos completamente com esse sistema-solvente, visto que a análise por CG-DNP não revelou qualquer resultado após uma segunda eluição, seja com éter, acetato de etila/acetona (4/1, v/v) ou mesmo com clorofórmio/isopropanol/n-heptano (10/14/26, v/v/v). Apesar de ter sido encontrado um comportamento similar com clorofórmio/isopropanol/n-heptano (10/14/26, v/v/v), esse sistema não foi selecionado por apresentar uma complexidade maior de preparação.

Com relação à seleção do padrão interno, inicialmente, selecionou - se a protriptilina, por ser um ADT com propriedades físico-químicas semelhantes aos fármacos de sua classe, não ser utilizado terapeuticamente no Brasil e ser mencionada em diversos trabalhos descritos na literatura sobre técnicas para detecção de antidepressivos (DUVERNEUIL et al., 2003; FONTANILLE, 1997). Todavia, a protriptilina não apresentou uma boa resolução, apesar das sucessivas tentativas de melhoras das condições cromatográficas. Outros padrões, como carbinoxamina e prilocaína foram testados, porém sem muito sucesso. A etidocaína foi selecionada para ser usada como padrão interno pelos seguintes motivos: apresentar uma constância na extração, não ser usada terapeuticamente no Brasil e, devido ao emprego de anestésicos locais como padrão interno ser comum para detecção de antidepressivos (GOERINGER et al., 2000; MARTÍNEZ, DE LA TORRE; ALMARZA, 2002).

Os parâmetros cromatográficos selecionados basearam - se na resolução dos picos do cromatograma, no tempo de análise e na teoria cinética segundo a equação de Van Deemter (AQUINO NETO; NUNES, 2003). Estabeleceu-se o tempo máximo de análise em torno de 22 minutos, pois o último analito é eluído em 19,6 minutos. Para encontrar a resolução ideal, foram feitas diversas tentativas, com o objetivo de não prejudicar a análise da fluoxetina, da norfluoxetina e dos antidepressivos tricíclicos: amitriptilina, imipramina, desipramina e nortriptilina. Para se obter uma melhor eficiência da coluna, tentou-se chegar a uma velocidade prática ótima do gás de arraste, que para o nitrogênio é em torno de 25 cm/s (GROB, 1995). A diferença entre a velocidade média linear, que para o nitrogênio o ideal é 10cm/s (CIOLA, 1985), e a velocidade prática ótima do gás de arraste, é que esta última garante a eficiência máxima por unidade de tempo e previne a perda da eficiência em sistemas de pressão constante na qual a temperatura aumenta. Em uma determinada pressão, a velocidade linear diminui com o aumento da temperatura. Isto ocorre pelo aumento da viscosidade do gás com o avançar da temperatura, o que gera uma diminuição no fluxo e uma perda da eficiência da coluna cromatográfica (GROB, 1995). Assim, buscando-se uma melhor eficiência, após diversas tentativas de combinação entre fluxo, rampa de temperatura e pressão, chegou - se à condição cromatográfica do método, com uma velocidade linear de 21 cm/s.

As resoluções entre os diversos analitos foram adequadas, pois apresentaram valores superiores a 1,5; considerados satisfatórios em cromatografia. Apesar da existência de um interferente entre a fluoxetina e a norfluoxetina, esse fato não impossibilitou a análise, visto que as resoluções obtidas entre eles ainda estavam dentro das condições mínimas aceitáveis (Tabela 6).

A validação analítica seguiu os preceitos da ANVISA, 2003 e da *International Conference Harmonization* - ICH, 1996. Os parâmetros realizados foram: especificidade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão intra e interensaio, recuperação, estabilidade e *carryover*.

A especificidade atingiu o desejável, logo no primeiro *pool* de amostras analisadas, tanto heparinizadas quanto *post mortem*.

O cálculo do limite de detecção e quantificação pode basear na avaliação visual, em métodos não instrumentais; na relação sinal – ruído; no método empírico; e nos métodos estatísticos (ARMBRUSTER; TILLMAN; HUBBS, 1994; ICH, 1996; BRASIL, 2003). O cálculo através do sinal – ruído é amplamente utilizado em cromatografia, entretanto ele não foi realizado, no presente trabalho. Isso é justificado pelas alterações da linha de base com o desgaste da pérola do detector de nitrogênio e fósforo, além de que a resposta no detector sofre variações, que podem ser significativas, com a injeção manual. O método empírico consiste na análise de uma série de amostras contendo uma concentração baixa, até que atinja uma concentração aceitável para critérios previamente determinados. Os métodos estatísticos baseiam - se, segundo o ICH, 1996, no desvio padrão da resposta de uma amostra de referência negativa e na inclinação da curva de calibração. O desvio padrão de resposta é criticado, pois avalia o nível médio do ruído do procedimento, medindo a capacidade de determinar ‘nada’ ao invés de uma concentração baixa do analito (ARMBRUSTER; TILLMAN; HUBBS, 1994). Analisado estes fatos, selecionou o método estatístico baseado na curva de calibração para determinar o limite de detecção e quantificação. Neste caso, o limite de detecção é basicamente definido como a diferença limitante entre um falso negativo e um falso positivo ser igual ou menor a 5% (KAY; WORTH, 2001). O método empírico demonstra ser uma

boa opção, entretanto ele foi descartado, pois o seu uso dispensa um número elevado de cartuchos de EFS quando se valida um método para nove analitos.

Os limites de detecção encontrados para os fármacos estão dentro da faixa terapêutica. Já o limite de quantificação, encontra-se entre a faixa terapêutica e a concentração tóxica para a clomipramina, a fluoxetina, a imipramina e a sertralina. Já a amitriptilina, a desipramina e a nortriptilina apresentam limites de quantificação superiores a concentração tóxica mínima apresentada pela literatura (MUSSHOFF, 2004). Provavelmente, o uso de um pequeno volume de amostra interferiu na obtenção de melhores resultados, entretanto, este volume visou à aplicação em crianças, que apresentam uma maior dificuldade na obtenção de amostras. Apesar do número de crianças intoxicadas por antidepressivos ser pequeno, o aumento do consumo em menores de seis anos correspondeu a 13% do consumo mundial destes medicamentos durante os últimos anos (ROSENBAUM; KOU, 2005), o que aumenta a possibilidade de intoxicação. Como o limite de detecção foi calculado, houve a necessidade de confirmar através da análise. Neste caso, foram feitas cinco replicatas e verificou a real existência dos picos, conforme o ICH. O limite de quantificação estabeleceu o critério de precisão estabelecido pela ANVISA.

A linearidade contemplou o requisito da ANVISA, com coeficiente de correlação linear maior do que 0,98. O ponto mais alto da curva baseou-se nas informações de intoxicações encontradas na literatura (MOFFAT; OSSELTON; WIDDOP, 2004). A precisão inter-ensaio e intraensaio atendeu as especificações da Resolução n° 899 da ANVISA, com precisão menor que 20% no limite de quantificação e precisão menor que 15% para os outros pontos.

A recuperação deve ser a mais próxima de 100%, mas aceita recuperações menores, desde que os valores sejam precisos. No presente estudo, a recuperação média apresentada foi de 65,5%. Contudo, vários fármacos apresentaram nas concentrações mais altas recuperações menores. No primeiro momento, verificou-se a possível saturação da coluna. Foram feitas análises individuais para aqueles com recuperação em torno de 40 – 50%, entretanto os valores se mantiveram baixos. Desta forma, a possível saturação da coluna não deve ser considerada, visto que fármacos com características semelhantes apresentaram melhores resultados. As

baixas recuperações da desipramina e da desmetilclomipramina devem estar correlacionadas aos seus valores de pKa, 10,2 e 10,37, respectivamente, pois o pH de 9,5 utilizado para a extração não possibilitou a não ionização de todas as moléculas.

Com a finalidade de verificar o momento da análise que poderia estar ocasionando uma possível perda dos antidepressivos, foi analisado o precipitado que forma após a centrifugação, a parte da amostra que não é retida após a passagem do sangue pré-tratado pelo cartucho e o tampão de lavagem após a passagem pelo mesmo cartucho. A técnica utilizada para avaliar essas três soluções foi um método de extração líquido – líquido de antidepressivos estabelecido por Moffat, Osselton e Widdop, 2004. A metodologia consiste em analisar 1mL de sangue, que após acrescentar 1,5 mL de tampão de cloreto de amônio (pH 9,5) e 5mL do solvente extrator – clorofórmio/isopropanol/n-heptano (10/14/26), foi colocado no vórtex por 1 min, centrifugado a 2000rpm por 5min, retirado a fase orgânica, secado a 60°C e ressuspendido em 50µL de metanol. O extrato foi injetado no CG-DNP seguindo as mesmas características do método usado no presente trabalho. A única alteração realizada foi a mudança do tampão de cloreto de amônio pelo carbonato/bicarbonato, ambos de pH 9,5. O material precipitado após a centrifugação foi ressuspendido com 1mL de água destilada e após a extração líquido – líquido foi verificado a presença de traços de diversos antidepressivos no cromatograma. Possivelmente, o precipitado carrou parte dos analitos. Já parte da amostra que não é retida após a passagem pelo cartucho apresentou um cromatograma com a presença de traços de fluoxetina e de imipramina, o que evidencia a dificuldade do cartucho em reter esses analitos. Na extração da solução de lavagem observou-se uma perda de imipramina. Para reduções das perdas, tentou diminuir o volume do solvente da lavagem e reduzir ao máximo o fluxo da passagem da amostra pelo cartucho.

Na literatura, há poucas informações sobre a estabilidade dos antidepressivos no sangue. Estudos de Holmgren et al. (1999) apontam que os antidepressivos não são degradados no sangue *post mortem*, desde que preservados em temperatura menor que 4°C no intervalo de uma semana ou a -20°C por um ano. No presente trabalho foi verificado que as amostras em baixas

concentrações, mantida entre 2 e 8°C, após um período de um mês apresentam resultados inferiores ao das amostras analisadas recentemente. Desta forma, deve – se preconizar que as amostras devem ser analisadas de forma imediata, visto que a variação na concentração pode chegar a quase 40% a menos.

Foi verificado, através do estudo de *carryover*, que existe a possibilidade de ocorrer este fenômeno para a amitriptilina. Sugere-se que entre as análises de amostras na emergência clínica e, principalmente, na forense, passa-se um branco, para diminuir a probabilidade de interferência na amostra.

A exatidão não foi realizada, pois não se tinha amostras certificadas ou amostras de estudos colaborativos que justifiquem a sua análise, visto que o estudo de exatidão através de amostras adicionadas com o padrão não considera a possível interação entre o analito e a matriz (CHASIN et al., 1998).

No presente trabalho, a validação foi realizada com anticoagulante citrato/ fosfato/ dextrose-adenina, por apresentar em maior abundância e segurança, visto que este material foi adquirido no banco de sangue. Como se trabalhou com amostra *post mortem* e com sangue heparinizado, foi utilizada uma validação parcial segundo a ANVISA, na qual determinou a curva de calibração. Neste caso, a linearidade dos analitos foi realizada e os seus valores estão dentro do aceitável.

Em um primeiro momento, o impacto da análise de antidepressivos no tratamento do paciente poderia ser questionado devido à morosidade na entrega do material para análise no laboratório do CCI-SP e na intervenção no manejo imediato do paciente, conforme o resultado analítico. Isso ocorre, pois, o laboratório do CCI-SP é um dos únicos a realizar análises de emergências toxicológicas na Grande São Paulo, demonstrando a necessidade de uma melhora na logística e na infraestrutura dos laboratórios nos diversos hospitais. No entanto, nossa intenção foi aplicar o método padronizado e validado nos casos provenientes do CCI-SP cujo uso dos antidepressivos estivesse envolvido nas intoxicações da emergência clínica. Adicionalmente, o histórico do caso pode dar subsídio a uma melhor discussão dos resultados obtidos.

A Tabela 14 mostra os resultados dos 18 casos do CCI-SP analisados pelo presente método juntamente com outras informações coletadas da ficha do paciente. Assim sendo, pode-se perceber que, desse total, a intoxicação e o diagnóstico diferencial foram os tipos de ocorrência registrados. Das oito ocorrências de intoxicação, sete tiveram como circunstância a tentativa de suicídio (CCI-1, CCI-6, CCI-9, CCI-10, CCI-11, CCI-15 e CCI-18), e uma, o caso CCI-14, é ignorada essa informação. Das 10 ocorrências de diagnóstico diferencial, apenas uma, o caso CCI-8 teve o uso terapêutico como circunstância; as outras 9 (CCI-2, CCI-3, CCI-4, CCI-5, CCI-7, CCI-12, CCI-13, CCI-16 e CCI-17) são ignoradas.

Outro parâmetro a ser ponderado é o tipo de exposição. Considerando as ocorrências de intoxicação, os casos CCI-9, CCI-10 e CCI-11 foram do tipo aguda única, ou seja, ocorridas dentro de um período de 24 horas (HERNANDEZ, 2004). Nesses três casos, os antidepressivos possíveis de estarem envolvidos na intoxicação foram detectados, ou seja, a amitriptilina para os casos 9 e 11 e a fluoxetina para o 10. Pelo fato de não ter sido encontrado seus respectivos produtos de biotransformação, pode-se inferir uma ingesta recente e mesmo uma possível inibição enzimática do CYP2D6 do fármaco de origem, dificultando a formação do produto desmetilado (HIEMKE; HARTTER, 2000). Nos casos CCI-9 e CCI-11, é possível que a amitriptilina tenha sido responsável pelo quadro de intoxicação, pois a concentração plasmática desse fármaco pode ser tóxica a partir de 0,5 mg/L e o LIQ do presente método é de 0,9 mg/L. Considerando-se que a amitriptilina tem uma relação de concentração no plasma e no sangue total de 1,2 (MOFFAT; OSSELTON; WIDDOP, 2004), pode-se inferir que a concentração no sangue total pode ser tóxica a partir de 0,4 mg/L, ou seja, um valor próximo do LD do presente método que é 0,3 mg/L. Fatos que corroboram o envolvimento da amitriptilina na intoxicação é que no caso CCI-11, os sintomas apresentados, agitação e taquicardia, são condizentes com os visualizados no início de uma intoxicação por tricíclicos (THANACOODY; THOMAS, 2005), visto que, o atendimento ao paciente foi imediato, pois a coleta do sangue ocorreu após 2 horas da exposição. Quanto ao caso CCI-9, o clonazepam pode ter colaborado com o quadro clínico apresentado de torpor, sonolência e coma. Também deve ser considerada a susceptibilidade individual, pois sintomas tóxicos podem surgir mesmo em concentrações terapêuticas. No caso CCI-10, a influência da fluoxetina é mais evidente, pois foi

possível determinar uma concentração elevada desse fármaco. No entanto, também deve ser considerada a participação da carbamazepina, que é um anticonvulsivante que foi analisado por quimioluminescência pelo laboratório do CCI-SP, cuja concentração encontrada estava acima de 20mg/L, considerada tóxica. Tomando-se esses dados em conjunto, pode-se inferir que a fluoxetina tenha inibido o metabolismo da carbamazepina, acarretando a elevação de até 50% de seu nível plasmático, aumentando o risco de toxicidade. O quadro clínico apresentado também confirma esta suspeita, pois apresenta sintomas característicos da intoxicação por carbamazepina: sonolência acentuada e respiração irregular, lenta ou superficial (CORDÁS; MORENO, 2001).

As intoxicações do tipo aguda sobre crônica expressam uma exposição/intoxicação aguda a um agente ao qual o paciente estava exposto cronicamente (HERNANDEZ, 2004), como nos casos CCI-1, CCI-14 e CCI-18. No entanto, não há informação específica sobre qual(is) agente(s) o paciente estava sob tratamento, apenas quais seriam os possíveis envolvidos. No caso CCI-1, a fluoxetina não foi o agente responsável pela intoxicação, pois não foi detectada na análise e mesmo considerando que pudesse estar abaixo do limite de quantificação do método, estaria em concentração terapêutica. Contudo, de acordo com o CCI, foi encontrada uma concentração plasmática de 45mg/L de fenobarbital, condizente com o quadro de intoxicação e com a circunstância descrita de tentativa de suicídio. Geralmente, a faixa terapêutica de 10 a 40 mg/L de fenobarbital é a recomendada para o controle da epilepsia (HARDMAN; LIMBIRD, 2003). No caso CCI-14, a concentração encontrada para a carbamazepina, pela análise do laboratório do CCI-SP, confirma a intoxicação por esse agente; a amitriptilina, não foi detectada e; a fluoxetina foi encontrada em concentração terapêutica, que pode ter colaborado com o quadro clínico de intoxicação. Nesse caso, é interessante salientar a importância do controle da concentração de norfluoxetina, produto de biotransformação da fluoxetina, pois pode ajudar na compreensão e/ou na minimização de interações farmacocinéticas, devida à associação de sua longa meia-vida com a influência nas enzimas hepáticas (POWER et al., 1995). No caso CCI-18 não foram encontrados antidepressivos no sangue total, mas foi detectada a nortriptilina no lavado gástrico, realizado pelos profissionais do CCI-SP. Possivelmente, ocorreu uma diminuição na absorção da nortriptilina, visto que um dos sintomas apresentados pelo paciente foi

o vômito e o atendimento médico nesse caso foi rápido, pois o tempo entre a exposição e a coleta de sangue foi de apenas 3 horas.

O caso CCI-6 apresentou intoxicação aguda repetida, ou seja, quando ocorrem repetidas exposições dentro de um período de 15 dias. Apesar do resultado apresentado no presente caso demonstrar o uso de etanol em uma dose inferior à necessária para causar os sintomas de sonolência, de torpor e de coma apresentados, deve-se avaliar o período entre a exposição e a coleta do material, que é em torno de 10 horas. Provavelmente o etanol foi o responsável pelos sintomas apresentados pelo indivíduo. O caso CCI-15, que apresenta uma intoxicação por tentativa de suicídio, mas com exposição ignorada, possui concentrações abaixo do LIQ, tanto da amitriptilina quanto da nortriptilina, no sangue total e a análise realizada pelo CCI, por CCD, identificou a presença dessas substâncias na urina. Como o período entre a exposição e a coleta foi em torno de 12 horas, é possível que parte dos fármacos tenha sido eliminada do organismo e o quadro clínico apresentado seja devido à amitriptilina e ao seu produto de biotransformação, visto que os sintomas são condizentes com uma intoxicação por ADT.

As ocorrências de diagnóstico diferencial, traduzido como a situação onde é necessário esclarecer o quadro clínico observado, confirmando ou afastando a possibilidade de intoxicação (HERNANDEZ, 2004), representaram a maioria dos casos analisados no presente trabalho, conforme pode ser observado na Tabela 14. Foram analisados 10 casos de diagnóstico diferencial e nem sempre os antidepressivos foram apontados como possíveis agentes tóxicos; a seleção desses para o estudo, baseou-se nos sintomas apresentados (CCI-3, CCI-4, CCI-5, CCI-13, CCI-16, CCI-17). Com exceção de um caso, em todos os outros não foi possível detectar os antidepressivos selecionados. As seguintes hipóteses podem ser levantadas: participação de outros antidepressivos não analisados no presente estudo, não veracidade da informação, casos não relacionados com o uso de antidepressivos e presença de substâncias abaixo do limite de detecção do método. O caso CCI-12 foi o único que apresentou um resultado que confirmou a presença de um antidepressivo, a amitriptilina. A presença apenas do fármaco de origem e dos sintomas relatados: agitação, taquicardia e hipertensão; nos permite indagar

sobre a possível ingestão aguda da substância, contudo são ignoradas as informações de circunstância e tipo de exposição. Esse quadro é semelhante ao encontrado nos casos CCI-9 e CCI-11.

Para a aplicação do método no âmbito forense, foram analisadas 24 amostras de sangue total *post mortem* do IML, com histórico relacionado com uso de antidepressivos ou morte suspeita, conforme descritos na Tabela 15. Nos casos IML-1, IML-2, IML-11 e IML-18, foram encontrados antidepressivos em concentrações inferiores à tóxica, podendo-se inferir que esses fármacos não foram responsáveis pelo óbito, podendo refletir apenas um uso terapêutico. O boletim de ocorrência e/ou requisição médica confirma esse padrão de uso para os casos IML-1 e IML-2; a descrição de lesões corporais no caso IML-11 diminui a participação do antidepressivo, sugerindo apenas o uso terapêutico e no caso IML-18, não pode ser descartada a influência da possibilidade de associação de diversos outros fármacos e o histórico de tentativa de suicídio.

Para a discussão dos casos em que o resultado analítico *post mortem* foi equivalente à concentração tóxica ou letal (IML-3, IML-6, IML-9; IML-10; IML-13, IML-14, IML-16, IML-20 e IML-22), devem ser feitas considerações prévias relativas à influência de diversos fatores como: o uso de conservantes na matriz; a armazenagem da amostra; o intervalo de tempo entre a morte e a coleta do material; o local anatômico da coleta do sangue; o uso terapêutico; a associação com outros fármacos; etc (FLANAGAN; CONNALLY, 2005).

Para que a coleta de sangue *post mortem* seja adequada, é recomendado que metade do material seja preservada com fluoreto de sódio e a outra sem conservantes. Também é importante a conservação do corpo a uma temperatura máxima de 4°C antes da coleta do material (FLANAGAN; CONNALLY; EVANS, 2005). O Núcleo de Toxicologia Forense do Instituto Médico Legal do Estado de São Paulo recebe amostras de todo o estado, a conservação do material no local de coleta e no trajeto para o laboratório, algumas vezes é questionável e o uso do fluoreto como conservante não faz parte da rotina. Contudo, foi possível demonstrar neste trabalho que os antidepressivos em sangue total são dificilmente degradados quando mantidos 12 horas em temperatura ambiente ou, conforme Holmgren et al.

(1999) durante 1 semana em temperatura de 4°C. Como o volume de amostras a serem analisadas para cada perito no NTF-IML é elevado, ocorre das amostras ficarem armazenadas na temperatura de 2 a 8°C por um período superior a uma semana ou até um mês, o que pode acarretar resultados subestimados ou indetectáveis conforme demonstrado no estudo de estabilidade do método.

O período decorrido entre a morte e a coleta é outro dado importante, pois a concentração de antidepressivos no sangue *post mortem* central aumenta com o avançar do tempo (PROUTY; ANDERSON, 1989). A obtenção desse dado ocorreu baseada em uma estimativa da provável data do óbito registrado no boletim de ocorrência e a data do pedido realizado pelo médico legista, que provavelmente corresponde à data da coleta da amostra. Na maioria dos casos analisados não foi possível estimar a diferença de tempo entre o momento da morte e a coleta da amostra por falta de informações. Infelizmente, não é relatado na literatura qual o tempo limite para realizar essa coleta no sentido que a análise expresse a concentração *antemortem*.

As amostras coletadas nos IMLs de São Paulo dificilmente chegam no laboratório indicando o local anatômico de coleta, contudo é de consenso que são coletadas na cavidade cardíaca. Devido ao fenômeno de redistribuição *post mortem* quanto maior a relação da concentração de antidepressivos entre o sangue coletado na cavidade cardíaca (central) e na veia femoral (periférica), razão C/P, maior a relação entre a concentração do sangue coletado no compartimento central *post mortem* (PM) com o plasma no *antemortem* (AM), razão PM/AM (YAREMA; BECKER, 2005). Em um relato de superdosagem por dotiepina, um ADT, a relação PM/AM atingiu valores superiores a 10 (COOK; BRAITHWAITE; HALE, 2000). No entanto, o uso da relação PM/AM ou C/P não é recomendado para estimar a concentração *antemortem*, devido a sua variabilidade, nem para diferenciar um uso terapêutico de uma superdosagem. Uma alternativa é avaliar a concentração do fármaco de origem com o produto de biotransformação, razão FO/BT, pois valores maiores que 1 são indicativos de ingestão recente, como vista na superdosagem (YAREMA; BECKER, 2005, COOK; BRAITHWAITE; HALE, 2000). De fato, foi encontrado no caso IML-20 uma relação FO/BT (imipramina/desipramina) maior que 1,8, confirmando essa indicação, o que também é corroborado pelas informações do

boletim de ocorrência: ingestão concomitante de diversos medicamentos psicotrópicos, incluindo a imipramina, em uma morte suspeita, provavelmente um suicídio. Nos casos IML-9 e IML-11, foi possível quantificar o fármaco de origem, a fluoxetina, e apenas identificar o produto de biotransformação, a norfluoxetina, o que impossibilita o cálculo da relação FO/BT. Entretanto, no caso IML-9, pode-se sugerir que a ingestão de fluoxetina ocorreu momentos antes do óbito, pois a concentração desse fármaco estava elevada e a do seu produto de biotransformação abaixo de LIQ; o longo período entre o óbito e a coleta da amostra (+/- 72 horas) justificaria uma redistribuição *post mortem*.

Nos casos IML-3 e IML-14, foi possível detectar apenas a fluoxetina, em concentrações elevadas, mas sem o produto de biotransformação; a falta de informações não permite definir a participação deles no caso. Como adicional a considerar, a síndrome serotoninérgica característica dos ISRSs e, portanto da fluoxetina, é difícil de ser diagnosticada no *post mortem*, o que torna improvável o aparecimento na maioria dos atestados de óbito, mesmo quando esses fármacos estão diretamente envolvidos. No caso IML-10, a concentração de nortriptilina encontrada é equivalente ao fármaco de origem, conforme dados da requisição médica, mas não temos informações para afirmar que este fármaco é responsável pelo óbito. Já nos casos em que a correlação entre o fármaco e o metabólito principal é pequena, como nos casos IML-6, IML-13, IML-16 e IML-22, é difícil especular sobre a participação do antidepressivo no óbito.

As análises das amostras IML-4, IML-5, IML-7, IML-8, IML-12, IML-15, IML-17, IML-19, IML-21, IML-23 e IML-24 apresentaram resultados negativos, justificáveis conforme discussão a seguir. Pela informação contida no boletim de ocorrência, a “queda da janela” confirma a causa da morte nos casos IML-4 e IML-17 e suicídio, ingestão de “chumbinho” e enforcamento para o caso IML-8. Os casos IML-7, IML-19 e IML-21 tratam-se de indivíduos com distúrbios psiquiátricos, sendo que nos casos IML-7 e IML-19 não há informação sobre utilização de fármacos e o caso IML-21 refere-se ao consumo de vários medicamentos, mas não especificamente dos antidepressivos. De maneira similar, os casos IML-23 e IML-24, com histórico de etilismo e consumo de medicamentos psicotrópicos e o caso IML-5, com histórico de epilepsia, não há informação específica de uso de antidepressivos.

No caso IML-15, a única informação no histórico é a indicação de medicamentos ao lado do corpo; análises realizadas pelos peritos do Núcleo de Toxicologia Forense identificaram o citalopram como possível agente tóxico, porém, esse antidepressivo não foi selecionado no presente projeto. O caso IML-12 apresenta poucas informações e as da requisição médica contradizem aos achados do presente projeto e as informações geradas no NTF-IML.

Não há um estudo estatístico brasileiro sobre a participação dos antidepressivos na causa das mortes. Dados internacionais apresentados, como o ITF, têm algumas limitações, pois não considera algumas variáveis, como a quantidade de fármaco ingerida, a possibilidade de co-ingestão e os erros nos atestados de óbito (POWER et al., 1995). Mas é inquestionável a possível discussão sobre a participação dos antidepressivos no suicídio, associado a superdosagens por impulso, ocasionadas pelas crises em poder não lidar com as dificuldades sociais e pessoais (KRAGH-SERENSEN, 1993). Podemos dizer que os antidepressivos têm participação nas tentativas de suicídio, conforme visto na análise dos casos do CCI-SP, mas quanto ao suicídio consumado, ainda temos poucos dados.

A técnica desenvolvida pode ser aplicada nos centros de controle de intoxicação para avaliação das intoxicações, superando a usual cromatografia em camada delgada, pois permite apresentar resultados quantitativos que podem auxiliar no manejo do paciente. Entretanto deve ser considerada a limitação da metodologia desenvolvida, que é o alto limite de quantificação da amitriptilina, desipramina e nortriptilina.

Nos diversos IMLs do Brasil, o método desenvolvido neste trabalho também pode colaborar em esclarecer ocorrências relacionadas aos antidepressivos, por meio da diferenciação de um uso terapêutico e uma superdosagem. Para atingir esse objetivo é necessário que algumas mudanças sejam realizadas como: a correta coleta das amostras e um preenchimento adequado e confiável dos boletins de ocorrência e das requisições médicas. Uma tentativa de superar a coleta inadequada e ter mais subsídios quanto à forma de uso dos antidepressivos, seria analisá-los no fígado, como uma segunda etapa da marcha analítica para os casos em que esses

fármacos fossem encontrados em concentrações elevadas no sangue total, de acordo com o presente método. No entanto, deve-se ponderar o custo da análise, a disponibilidade dessa amostra e a complexidade analítica.

Outra alternativa promissora, mais incipiente, seria o uso de biomarcadores de redistribuição *post mortem*, como o aminoácido metionina, que demonstrou uma correlação positiva com os fármacos que apresentam distribuição a partir dos pulmões, como a amitriptilina (YAREMA; BECKER, 2005).

7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que:

- O uso do cartucho de extração em fase sólida, abselut™ NEXUS (Varian), sem a necessidade da etapa de condicionamento, permitiu uma extração adequada de antidepressivos em sangue total;
- A cromatografia em fase gasosa com detector de nitrogênio e fósforo, nas condições padronizadas, permitiu a separação, a identificação e a quantificação da amitriptilina, clomipramina, desipramina, desmetilclomipramina, fluoxetina, imipramina, nortriptilina, norfluoxetina e sertralina;
- O método padronizado e validado mostrou-se específico, linear e preciso;
- A concentração dos antidepressivos foi estável quando as amostras foram mantidas por 12 horas em temperatura ambiente e no ciclo de refrigeração, mas foi instável no LIQ quando mantido por um mês em refrigeração;
- A baixa recuperação apresentada para alguns antidepressivos é aceitável visto que o método é preciso;
- O método pode ser aplicado em pacientes com suspeita de intoxicação para elucidar a participação do antidepressivo no quadro clínico, com ressalva dos altos LIQ para amitriptilina, desipramina e nortriptilina;
- O método pode ser aplicado em amostras de sangue total provenientes de casos *post mortem*;

REFERÊNCIAS*

- AKHTAR, M.; GOLDSCHLAGER, N.F. Brugada electrocardiographic pattern due to tricyclic antidepressant overdose. *J Eletrocardiology*, v. 39, p. 336-339, 2006.
- ALMEIDA, A.M.; CASTEL-BRANCO, M.M; FALÇÃO, A.C. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, v. 774 (2), p. 215 – 222, 2002.
- AQUINO NETO, F.R.; NUNES, D.S.S. **Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins**. Rio de Janeiro: Interciência, 2003. 187 p.
- ARMBUSTER, D.A.; TILLMAN, M.D.; HUBBS, L.M. Limit of detection (LOD)/limit of quantitation (LOQ): comparison of the empirical and the statistical methods exemplified with GC-MS assays of abused drugs. *Clin Chem*, v. 40, n. 7, p. 1233 – 1238, 1994.
- BASELT, R.C. **Disposition of toxic drugs and chemicals in man: centrally acting drugs**. Canton, USA: Biomedical publication, 1978.
- BAILEY, B.; BUCKLEY, N.A.; AMRE, D.K. A meta-analysis of prognostic indicators to predict seizures, arrhythmias or death after tricyclic antidepressant overdose. *J Toxicol Clin Toxicol*, v. 42, p. 877-88, 2004.
- BAKKALI, A.; CORTA, E.; CIRIA, J.I.; BERRUETA, L.A.; GALLO, B.; VICENTE, F. Solid-phase extraction with liquid chromatography and ultraviolet detection for the assay of antidepressant drugs in human plasma. *Talanta*, v. 49, p. 773 – 783, 1999.
- BALANT-GORGIA, A.E.; GEX – FABRY, M.; BALANT, L.P. Clinical pharmacokinetics of clomipramine. *Clin Pharmacokinet*, v. 20, n.6, p. 447 – 462, 1991.
- BERRUETA, L.A.; GALLO, B.; VICENTE, F.; A review of solid phase extraction: basic principles and new developments. *Chromatographia*, v. 40, n.7/8, p. 474 – 483, 1995.
- BERZAS, J.J.; GUIBERTEAU, C; CONTENTO, A.M.; RODRÍGUES, V0. Sensitive and rapid high-performance liquid method for simultaneous determination for antidepressants in pharmaceutical formulations. *Chromatography*, v. 56, p. 545-551, 2002.
- BORTOLETTO, M.E.; BOCHNER, R. Impacto dos medicamentos nas intoxicações humanas no Brasil. *Cad. Saúde Pública*, v. 15, n.4, p. 859 – 869, 1999.
- BOSMAN, J. WIJSBEEK, J.; FRANKE, J.P.; ZEEUW, R.A. Salting out improves solid-phase extraction recoveries on abselut-tox columns for broad spectrum drug screening. *J Anal Toxicol*, v. 26, p. 48-51, 2002.
- BOER, R.A.; DIJK, T.H.V.; HOLMAN, N.D.; MELLE, J.P.V. QT interval prolongation after sertralina overdose: a case report. *BMC Emergency Medicine*, v. 5, n. 5, p. 1 – 4, 2005.
- BRADVIK, L.; BERGLUND, M. Suicide in severe depression related to treatment: depressive characteristics and rate of antidepressant overdose. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, v. 255, p. 245-250, 2005.
- BRASIL. Resolução RE 899, de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre a publicação do Guia para validação de métodos analíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2 de junho de 2003.
- BUCKLEY, N.A.; McMANUS, P.R. Fatal toxicity os serotonergic and other antidepressant drugs of United Kingdom mortality data. *BMJ*, v. 325, p. 1332 – 1338, 2002.

De acordo com:

As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2002 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

CASSIDY, S.; HENRY, J. Fatal toxicity of antidepressant drugs in overdose. **BMJ**, v. 295, p. 1021-1024, 1987.

CASTILLO, M.A.; CASTELLS, R.C.; Initial evaluation of quantitative performance of chromatographic methods using replicates at multiple concentrations. **J Chromatogr A**, v. 921, p. 121 – 133, 2001.

CARAVATI, E.M.; BOSSARTI, P.J. Demographic and eletrocardiographic factors associated with severe tricyclic antidepressant toxicity. **Clin Toxicol**, v. 29, p. 31 – 43, 1991.

CHASIN, A.A.M., NASCIMENTO, E.S.; RIBEIRO-NETO, L.M; SIQUEIRA, M.E.P.B.; ANDRAUS, M.H.; SALVADORI, M.C.; FERNÍCOLA, N.A.G.; GORNI, R.; SALCEDO, S. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. **Rev Bras Toxicol**, v. 11, n. 1, p. 1 – 6, 1998.

CHEETA, S.; SCHIFANO, F.; OYEFESO, A.; WEBB, L.; GHODSE, A.H. Antidepressant-related deaths and antidepressant prescriptions in England and Wales, 1998-2000. **Brit J Psychiatry**, v. 184, p. 41-47, 2004.

CHEN, X.H. WIJSBEEK, J.; FRANKE, J.P.; ZEEUW, R.A. A single-column procedure on Bond Elut Certify for systematic toxicological analysis of drugs in plasma and urine. **J Forens Sci**, v. 37, n.1, p. 61-71, 1992a.

CHEN, X.H.; FRANKE, J.P.; WIJSBEEK, J.; ZEEUW, R.A. Determination of basic drugs extracted from biological matrices by means of solid-phase extraction and wide-bore capillary gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. **J Anal Toxicol**, v. 18, p. 150-153, 1994.

CHEN, X.H; FRANKE, J.P.; WIJSBEEK, J.; ZEEUW, R.A. Isolation of acid, neutral, and basic drugs from whole blood using a single mixed-mode solid-phase extraction column. **J Anal Toxicol**, v. 16, p. 351-355, 1992b.

CHEN, X.; DUAN, X.; DAI, X.; ZHONG, D. Development and validation of a liquid chromatographic/tandem mass spectrometric method for the determination of sertraline in human plasma. **Rapid Commun. Mass Spectrom**, v. 20, p. 2483–2489, 2006.

CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia a gás**. São Paulo: Editora Edgar Blucher, 1985. 266 p.

CLAUDINO, A.M.; HAY, P.; LIMA, M.S.; BACALTCHUK, J.; TREASURE, J. Antidepressants for anorexia nervosa. **Cochrane Database Syst Ver**, v. 25, n.1, p. CD004365, 2006.

COHEN, L.G; BIEDERMAN, J; WILENS, T.E.; SPENCER, T.J; MICK, E.B.A; FARAONE, S.V; PRINCE, J; FLOOD, J.G. Desipramine clearance in children and adolescents absence of effect of development and gender. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry**, v. 38, n.1, p 79-85, 1999.

CORDÁS, T.A.; MORENO, R.A. **Condutas em psiquiatria**. 4º ed. São Paulo: Lemos editorial, 2001. 421 p.

COOK, D.S.; BRAITHWAITE, R.A.; HALE, K.A. Estimating *antemortem* drug concentrations from *post mortem* blood samples: the influence of *post mortem* redistribution. **J Clin Pathol**, v. 53, p. 282-285, 2000.

CREWE, H.K.; LERNARD, M.S.; TUCKER, G.T.; WOODS, F.R.; HADDOCK, R.E. The effect of selective serotonin re-uptake inhibitors on cytochrome P4502D6 (CYP2D6) activity in human liver microsomes. **Br J Clin Pharmacol**, v. 34, p. 262-265, 1992.

CROME, P. The toxicity of drugs used for suicide. **Acta Psychiatr Scand**, v. 371,p. 33-37, 1993.

CULPEPPER, L.; DAVIDSON, J.R.T.; DIETRICH, A.J.; GOODMAN, W.K.; KROENKE, K.; SCHWENK, T.L. Suicidality as a possible side effect of antidepressant treatment. **J Clin Psychiatry**, v. 65, n. 6, p. 742 – 749, 2004.

DALFEN, A.K.; STEWART, D.E. Who develops severe or fatal adverse drug reactions to selective serotonin reuptake inhibitors? **Can J Psychiatry**, v. 46, p. 258-262, 2001.

DAVIS, G.; PARK, K.; KLOSS, J.; APPLE, F. Tricyclic antidepressant fatality: *post mortem* tissue concentrations. **J Toxicol Clin Toxicol**, v. 39, n. 6, p. 649-672, 2001.

DAVIS, J.M.; BARTLETT, E.; TERMINI, B.A. Overdosage of psychotropic drugs: a review, Part II: Antidepressants and other psychotropic agents. **Dis Nerv System**, v. 29, p. 246-256, 1968.

DE LA TORRE, C.S.; MARTÍNEZ, M.A.; ALMARZA, E.; Determination of several psychiatric drugs in whole blood using capillary gas-liquid chromatography with nitrogen phosphorus detection: comparison of two solid phase extraction procedures. **Forens Sci Intern.**, v.155, p. 193-204, 2005.

DEUTSCHER, M.P. **Guide to protein purification methods in enzymology**. California: Academic Press. v. 192, 1990.

DEVANE, C.L.; LISTON, H.L.; MARKOWITZ, J.S. Clinical pharmacokinetics of sertraline. **Clin Pharmacokinet**, v. 41, n.15, p. 1247 – 1266, 2002.

DHOSSCHE, D.M. Toxicology of suicide: touchstone for suicide prevention? **Med Sci Monit**, v. 9, n. 4, p. SR9 -19, 2003.

DRUMMER, O.H. Chromatographic screening techniques in systematic toxicological analysis. **J Chromatogr B**, v. 733, p. 27-45, 1999.

DRUMMER, O.H. Postmortem toxicology of drugs of abuse. **Forensic Sci Int**, v. 142 (2-3), p. 101-113, 2004.

DUAG – Danish University Antidepressant Group. Clomipramine dose – effect study in patient with depression: clinical end points and pharmacokinetics. **Clin Pharmacol Ther**, v. 66, p. 152 – 165, 1999.

DUVERNEUIL, C.; GRANDMAISON, G.L.; MAZANCOURT, P.; ALVAREZ, J.C. A High-Performance Liquid Chromatography Method with Photodiode-Array UV Detection for Therapeutic Drug Monitoring of the Nontricyclic Antidepressant Drugs. **Ther Drug Monit**, v. 25, p. 565 –573, 2003.

ELLENHORN, M.J. eds. **Ellenhorn's Medical Toxicology, Diagnosis and Treatment of Human Poisoning**. 2.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1997. 2047p.

FAVA, M. Augmentation and combination strategies in treatment-resistant depression. **J Clin Psychiatry**, v. 62, n.18, p. 4-11, 2001.

FLANAGAN, R.J. Developing an analytical toxicology service: principles and guidance. **Toxicol Rev**, v. 23, n. 4, p. 251 – 263, 2004.

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

FLANAGAN, R.J.; CONNALLY, G.; EVANS, J.M. Analytical toxicology: guidelines for sample collection post mortem. **Toxicol Rev**, v. 24, n. 1, p. 63 –71, 2005.

FLECK, M.P.A.; LAFER, B.; SOUGEY, E.B.; DEL PORTO, J.A.; BRASIL, M.A.; JURUENA, M.F. Diretrizes da Associação Médica Brasileira para o tratamento da depressão (versão integral). **Rev. Bras. Psiquiatr**, v. 25, n.2, p. 114-122, 2003.

FONTANILLE, P.; JOURDIL, N.; VILLIER, C.; BESSARD, G. Direct analysis of fluoxetine and norfluoxetine in plasma by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. **J Chromatogr B**, v. 692, p. 337-343, 1997.

FOULKE, G.E.; Identifying toxicity risk early after antidepressants overdose. **Am J Emerg Medicine**, v. 13, n. 2, p.123-126, 1995.

FRAHNERT, C.; RAO, M.L.; 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 B**, v. 794, p. 35-47, 2003.

FRANKE, J.P.; ZEEUW, R.A. Solid-phase extraction procedures in systematic toxicological analysis. **J Chromatogr B**, v. 713, p. 51-59, 1998.

FUKUDA, A.; ISHIDA, H.; KUBOTA, M.; KOJIMA, Y. Development of analysis of drugs and toxic substances that can play an immediate role in emergency medical services: what is to be analyzed? **Rinsho Byori**, v. 53, n. 1, p. 26 – 33, 2005.

GAGAJEWSKI, A., MURAKAMI M.M., KLOSS J., EDSTROM M., HILLYER M., PETERSON G.F., AMATUZIO J., APPLE F.S. Measurement of Chemical Analytes in Vitreous Humor: stability and precision studies. **J Forensic Sci**, v. 49, n. 2, p. 1-4, 2004.

GENTILE, S. The safety of newer antidepressants in pregnancy and breastfeeding. **Drug Saf**, v. 28, n. 2, p. 137-152, 2005.

GIACOMETTI, J.; MILOSEVIC, A.; CEDOMILA, M. Gas chromatographic determination of fatty acids contained in different lipid classes after their separation by solid-phase extraction. **J Chromatogr A**, v. 976, p. 47 – 54, 2002.

GILLMAN P. K. A review of serotonin toxicity data: implications for the mechanisms of antidepressant drug action. **Biol Psychiatry**, v. 59, n. 11, p.1046 – 1051, 2006.

GOERINGER, K. E.; RAYMON, L.; CHRISTIAN, G.D.; LOGAN, B.K. Post mortem Forensic Toxicology of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors: A Review of Pharmacology and Report of 168 Cases. **J Forensic Sci**, v. 45, n 3, p. 633-648, 2000.

GRAUDINS, A.; DOWSETT, R.P.; LIDDLE, C. The toxicity of antidepressant poisoning: Is it changing? A comparative study of cyclic and newer serotonin-specific antidepressants. **Emergency Medicine**, v. 14, p. 440-446, 2002.

GRUNEBAUM, M.F.; ELLIS, S.P.; LI, S.; OQUENDO, M.A.; MANN, J.J. Antidepressants and suicide risk in the United States, 1985-1999. **J Clin Psychiatry**, v. 65, n.11, p.1456-1462, 2004.

GUPTA, R.N.; Drug level monitoring: antidepressants. **J Chromatogr: Biom Applic**, v. 576, p. 183 – 211, 1992.

HALFORD, J.C.; HARROLD, J.A.; LAWTON, C.L.; BLUNDELL, J.E. Serotonin (5-HT) drugs: effects on appetite expression and use for the treatment of obesity. **Curr Drug Targets**, v. 6, n. 2, p. 201-213, 2005.

HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. eds. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**, [tradução da 10^o ed. original, Carla de Mello Vorsatz, et al.; revisão técnica, Almir Lourenço da Fonseca]. Rio de Janeiro: Mc Graw-Hill, 2003, 1671 p.

HARRIGAN, R.A.; BRADY, W.J. ECG abnormalities in tricyclic antidepressant ingestion. **Am J Emerg Med**, v. 19, p. 387 – 393, 1999.

HE, H.; SUN, C.; WANG, X.R.; PHAM-HUY, C.; CHIKHI-CHORFI, N.; GALONS, H.; THEVENIN, M.; CLAUDE, J.R.; WARNET, J.M. Solid-phase extraction of methadone enantiomers and benzodiazepines in biological fluids by two polymeric cartridges for liquid chromatographic analysis. **J Chromatog B**, v. 814, p. 385 – 391, 2005.

HEALY, D.; LANGMAAK, C.; SAVAGE, M. Suicide in the course of treatment of depression. **J Psychopharmacology**, v. 13, n. 1, p. 94-99, 1999.

HENRY, M. SPE technology: principles and practical consequences. In: SIMPSON, N. J. K. **Solid – phase extraction: principles, techniques and applications**. New York: Hardcover, 2000. p. 125 – 182.

HERNANDEZ, E.M.M. **Estudo descritivo das intoxicações notificadas ao Centro de Controle de Intoxicações da Prefeitura do Município de São Paulo no período de 1998 a 2002 e propostas de ações preventivas**. 2004. Dissertação (Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004, 115 p.

HIEMKE, C.; HARTTER, S. Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitor. **Pharmacol & Therapeut**, v. 85, p. 11-28, 2000.

HILBERG, T. RIPEL, A.; SMITH, A.J.; SLORDAL, L.; MORLAND, J.; BJORNEBOE, A. Post mortem amitriptyline pharmacokinetics in pigs after oral and intravenous routes of administration. **J Forensic Sci**, v. 43, n. 2, p. 380-387, 1998.

HILBERG, T.; MORLAND, J.; BJORNEBOE, A. Post mortem release of amitriptyline from lungs; a mechanism of post mortem drug redistribution. **Forens Sci Inter**, v. 64, n. 1, p. 47-55, 1994.

HILDEBRANDT, M.G.; STEYERBERG, E.W.; STAGE, K.B.; PASSCHIER, J.; KARGH-SOERENSEN, P. Are gender differences important for the clinical effects of antidepressants? **Am J Psychiatry**, v. 160, p. 1643–1650, 2003.

HOLMGREN, P.; DRUID, H.; HOLMGREN, A.; AHLNER, J. Stability of drugs in stored postmortem femoral blood and vitreous humor. **J Forensic Sci**, v.49 (4), p. 820 – 825, 2004.

ISACSSON, G; HOLMGREN, P.; DRUID, H.; BERGMAN, U. Psychotropics and suicide prevention: implication from toxicological screening of 5281 suicides in Sweden 1992 – 1994. **Br J Psychiatry**, v. 174, n. 3, p. 259-265, 1999.

ICH. **Validation of Analytical procedures: methodology Q2B**, p. 1-8, 1996.

IOANNIDES-DEMOS, L.L.; PROIETTO J.; McNEIL, J.J. Pharmacotherapy for obesity. **Drugs**, v. 65, n. 10, p. 1391-1418, 2005.

ISBISTER, G.K.; BOWE, S.J.; DAWSON, A.; WHYTE, I.M. Relative toxicity of serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) in overdose. **J Toxicol Clin Toxicol**, v. 42, n. 3, p.277-285, 2004.

ISBISTER, G.K.; BUCKLEY, N.A. The pathophysiology of serotonin toxicity in animals and humans: implications for diagnosis and treatment. **Clin Neuropharmacol**, v. 28, n. 5, p. 205-214, 2005.

KAY, S; WORTH, A.P. Improving the application of quantitative methods in validation work. **Toxicol in vitro**, v. 15, p. 601 – 604, 2001.

KERR, G.W., MCGUFFIE, A.C., WILKIE, S. Tricyclic antidepressant overdose: a review. **Emerg Med J**, v. 18, p. 236-241, 2001.

KHAN, A; KHAN, S.; KOLTS, R.; BROWN, W.A. Suicide rates in clinical trials of SSRIs, other antidepressants, and placebo: analysis of FDA reports. **Am J Psychiatry**, v. 160 (4), p. 790 – 792, 2003.

KLEIN-SCHWARTZ, W.; ANDERSON, B. Analysis of sertraline-only overdoses. **Am J Emerg Med**, v. 14 (5), p. 456 – 458, 1996.

KRAGH-SERENSEN, P. Pharmacotherapy of the suicidal patient. **Acta Psychiatr Scand**, v. 371, p. 57-59, 1993.

KRYMCHANTOWSKI, A.V.; MOREIRA FILHO, P.F. Migraine prophylactic treatment: an update. **Arq. Neuro-Psiquiatr.**, v. 57, n. 2b, p. 513-519, 1999.

LANÇAS, F.M. **Extração em fase sólida (SPE)**. São Carlos: RiMA, 2004. 93 p.

LINDER, M.W.; KECK, P.E. Standards of laboratory practice: antidepressant drug monitoring. **Clin Chem**, v. 44, n 5, p. 1073 - 1084 , 1998

LOGAN, B.K.; FRIEL, P.N.; CASE, G.A. Analysis of sertralina (Zoloft) and its major metabolite in *post mortem* specimens by gas and liquid chromatography. **J Anal Toxicol**, v. 18, n. 3, p. 139-142, 1994.

LOTTRICH, F.E.; POLLOCK, B.G. Aging and clinical pharmacology: implications for antidepressants. **J Clin Pharmacol**, v. 45, p. 1106-1122, 2005.

MARCONDES FILHO, W. MEZZAROBIA, L.; TURINI, C.A.; KOIKE, A.; MOTOMATSU JUNIOR, A.; SHIBAYAMA, E.E.M.; FENNER, F.L.S. Tentativas de suicídio por substâncias químicas na adolescência e juventude. **Adolesc. Latinoam.**, Porto Alegre, v. 3, n.2, p. 1 – 11, 2002.

MARTÍNEZ, M.A.; DE LA TORRE, C.S.; ALMARZA, E.; Simultaneous determination of viloxazine, venlafaxina, imipramina, desipramina, sertralina, and amoxapine in whole blood: comparison of two extraction/cleanup procedures for capillary gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. **J Anal Toxicol**, v. 26, p. 296 – 301, 2002.

MARTÍNEZ, M.A.; DE LA TORRE, C.S.; ALMARZA, E.; A comparative solid-phase extraction study for the simultaneous determination of fluoxetine, amitriptyline, nortriptyline, trimipramine, maprotiline, clomipramine, and trazodone in whole blood by capillary gas-liquid chromatography with nitrogen-phosphorus detection. **J Anal Toxicol**, v. 27, p. 353 – 358, 2003.

MARTÍNEZ, M.A.; DE LA TORRE, C.S.; ALMARZA, E. A comparative solid-phase extraction study for the simultaneous determination of fluvoxamina, mianserin, doxepin, citalopram, paroxetina, and etoperidone in whole blood by capillary gas-liquid chromatography with nitrogen-phosphorus detection. **J Anal Toxicol**, v. 28, p. 174 – 180, 2004.

MAURER, H.H.; BICKEBOELLER-FRIEDRICH, J. Screening procedure for detection of antidepressants of the selective serotonin reuptake inhibitor type and their metabolites in urine as part of a modified systematic toxicological analysis procedure using gas chromatography-mass spectrometry. **J Anal Toxicol**, v. 24 (5), p. 340 – 347, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de política de saúde. Departamento de atenção básica. Gerência técnica de assistência farmacêutica. **Relação nacional de medicamentos essenciais**: RENAME. 3 ed. Brasília, 2002. p. 88.

MOFFAT, A.C.; OSSELTON, M.D. e WIDDOP. B.; **Clarke's analysis of drugs and poisons**, 3 ed., v. 2., London – Chicago: Pharmaceutical Press, 2004.

MOLCHO, A.; STANLEY, M. Antidepressants and suicide risk: issues of chemical and behavioral toxicity. **J Clin Psychopharmacol**, v. 12, p. 13S – 18S, 1992.

MONTGOMERY, S.A.; BALDWIN, D. GREEN, M. Why do amitriptyline and dothiepin appear to be so dangerous in overdose? **Acta Psychiatr Scand**, v. 354, p. 47-53, 1989.

MORENO, R.A.; MORENO, D.R.; SOARES, M.B.M. Psicofarmacologia de antidepressivos. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 21, p. 24-40, 1999.

MUSSHOFF, F.; PADOSCH, S.; STEINBORN, S.; MADEA, B. Fatal blood tissue concentrations of more than 200 drugs. **Forens Sci Intern**, v. 142, p. 161 –210, 2004.

NG, C.H.; NORMAN, T.R.; NAING. K.O.; SCHWEITZER, I; HO, B.K.W.; FAN, A.; KLIMIDIS, S. A comparative study of sertralina dosages, plasma concentrations, efficacy and adverse reactions in Chinese versus Caucasian patients. **Int Clin Psychopharmacol** , v. 21, p. 87 – 92, 2006.

PANCHAGNULA, R.; DRAVID, P.; JAIN, A; KHANDAVILLI, S. Single and multiple dose pharmacokinetic evaluation of a transdermal delivery system of imipramine hydrochloride. **Arzneimittelforschung**, v. 55, n. 4, p.198-204, 2005.

PIRES, M.L.N.; CALIL, H.M. Associação entre o transtorno disfórico pré-menstrual e o transtornos depressivos. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 21, n. 2, p. 118 – 127, 1999.

POHLAND, R.C.; BERNHARD, N.R. Post mortem serum and tissue redistribution of fluoxetine and norfluoxetine in dogs following oral administration of fluoxetine hydrochloride (Prozac®). **J Forensic Sci**, v. 42, n. 5, p. 812-816, 1997.

POLETTINI, A.; GROPPI, A.; VIGNALI, C.; MONTAGNA, M. Fully-automated systematic toxicological analysis of drugs, poisons, and metabolites in whole blood, urine, and plasma by gas chromatography-full scan mass spectrometry. **J Chromatogr B**, v.713, p.265-279, 1998.

POLLOCK, B.G.; PEREL, J.M. Imipramine and 2-hydroxyimipramine: comparative cardiotoxicity and pharmacokinetics in swine. **Psychopharmacology**, v.109, n 1-2, p. 57-62, 1992.

POWER, B.M.; HACKETT, L.P.; DUSCI, L.J.; ILETT, K.F.; Antidepressant Toxicity and the Need for Identification and Concentration Monitoring in Overdose. **Clin. Pharmacokinet.**, v. 29, n. 3, p. 154-171, 1995.

PROUTY, R.W.; ANDERSON, W.H. The forensic science implications of site and temporal influences on post mortem blood-drug concentrations. **J Forensic Sci**, v. 35, n. 2, p. 243-270, 1990.

PUOZZO, C.; HERMANN, P.; CHASSARD, D. Lack of pharmacokinetic interaction when switching from fluoxetine to milnacipran. **Int Clin Psychopharmacol**, v. 21, n. 3, p. 153 – 158, 2006.

QUEIROZ, S.C.N.; COLLINS, C.H. e JARDINS, I.C.S.F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Quim. Nova**, v. 24, n 1, p. 68-76, 2001.

RAMCHANDANI, P. Deliberative self poisoning with antidepressant drugs: a comparison of the relative hospital costs of cases of overdose of tricyclics with those of selective-serotonin reuptake inhibitors. **J Affec Disorders**, v. 60, p. 97-100, 2000.

RETTERSTOL, N.; Death due to overdose of antidepressants: experiences from Norway. **Acta Psychiatr Scand**; v. 371, p. 28 – 32, 1993.

ROCHA, A.P.C.; LEMONICA, L.; BARROS, G.A.M. Uso de medicações por via subaracnóidea no tratamento da dor crônica. **Rev. Bras. Anestes**, v. 52, n. 5, 2002.

ROSENBAUM, T.G.; KOU, M. Are one or two dangerous? Tricyclic antidepressant exposure in toddlers. **J Emerg Med**, v. 28 (2), p. 169 – 174, 2005.

SCHWARTZ, J.G.; HURD, I.L.; CARNAHAN, J.J. Determination of tricyclic antidepressants for ED analysis. **Am J Emerg Med**, v. 12 (5), p. 513 – 516, 1994.

SHINOKUSA, T.; TERADA, M.; TANAKA, E. Solid-phase extraction and analysis of 20 antidepressant drugs in human plasma by LC/MS with SSI method. **Forens Sci Intern** (article in press), 2006.

SORIANO, T. JURADO, C.; MENÉNDEZ, M.; REPETTO, M. Improved Solid-phase extraction method for systematic toxicological analysis in biological fluids. **J Anal Toxicol**, v. 25, p.137-143, 2001.

SPILLER, H.A.; BAKER, D.; KRENZELOK, E.P.; CUTINO, L. Use of dosage as a triage guideline for unintentional cyclic antidepressant ingestions in children. **Am J Emerg Medicine**, v. 21, n. 5, p. 422-424, 2003.

STERNBACH, H. The serotonin syndrome. **Am J Psychiatr**, v. 148, p. 705-713, 1991.

STOKES, P.E.; HOLTZ, A. Fluoxetine tenth anniversary update: the progress continues. **Clin Therapeut**, v. 19, n. 5, p. 1137 – 1225. 1997.

THANACODY, H.K.R.; THOMAS, S.H.L. Antidepressant poisoning. **Clin Medicine**, v. 3, n. 2, p. 114-118, 2003.

THANACODY, H.K.R.; THOMAS, S.H.L. Tricyclic antidepressant poisoning. **Toxicol Rev**, v. 24, n. 3, p. 205-214, 2005.

TILLER, J.W. Clinical overview on moclobemide. **Progr Neuropsychopharmacol Biol Psychiatr**, v. 17, p. 703-712, 1993.

TITIER, K.; CATAING, N.; SCOTTO-GOMEZ, E.; PEHOURCQ, F.; MOORE, N.; MOLIMARD, M. High-Performance Liquid Chromatographic Method with Diode Array Detection for Identification and Quantification of the Eight New Antidepressants and Five of Their Active Metabolites in Plasma after Overdose. **Ther Drug Monitor**, v. 25, p. 581-587, 2003.

TOMASZEWSKI, C.; RUNGE, J.; GIBBS, M.; COLUCCIello, S.; PRICE, M. Evaluation of a rapid bedside toxicology screen in patients suspected of drug toxicity. **J Emerg Med**, v. 28 (4), p. 389 – 394, 2005.

TRACQUI, A.; KINTZ, P.; KREISSIG, P.; MANGIN, P. A simple and rapid method for toxicological screening of 25 antidepressants in blood or urine using performance liquid chromatography with diode-array detection. **Ann Biol Clin**, v. 50, p. 639-647, 1992.

VAN HARTEN, J. Clinical pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. **Clin Pharmacokinet**, v. 24, p. 203-220, 1993.

WALKER, V.; MILLS, G.A. Solid-phase extraction in clinical biochemistry. **Ann Clin Biochem**, v. 38, p. 464-477, 2002.

WATSON, A.W.; LITOVITZ, T.L.; KLEIN-SCHWARTZ, W.; RODGERS, G.C.; YOUNISS, J.; REID, N.; ROUSE, W.G.; REMBERT, R.S.; BORYS, D. 2003 Annual Report of the American Association of Poison Control Centers Toxic Exposure Surveillance System. **Am. J. Emerg Medicine**, v. 22 (5), p. 335-404, 2004.

WATSON, A.W.; LITOVITZ, T.L.; RODGERS, G.C.; KLEIN-SCHWARTZ, W.; REID, N.; YOUNISS, J.; FLANAGAN, A.; KATHLEEN, M.W. 2004 Annual Report of the American Association of Poison Control Centers Toxic Exposure Surveillance System. **Am. J. Emerg Medicine**, v. 23 (5), p. 589-666, 2005.

WILLE, S.M.R.; MAUDENS, K.E.; VAN PETEGHEM, C.H.; e LAMBERT, W.E.E. Development of a solid phase extraction for 13 'new' generation antidepressants and their active metabolites for gas chromatographic-mass spectrometric analysis. **J Chromatog A**, v. 1098, p. 19-29, 2005.

WYNNE, H.; BATEMAN, D.N.; HASSANYEH, F.; RAWLINS, M.D.; WOODHOUSE, K.W. Age and self-poisoning: the epidemiology in Newcastle upon Tyne in 1980s. **Hum. Toxicol.**, v. 6, p. 511-515, 1987.

YAREMA, M.C.; BECKER, C.E. Key concepts in post mortem drug redistribution. **J Toxicol: Clin Toxicol**, v. 43, n. 4, p. 237-237, 2005.

ZEEUW, R.A.; FRANKE, J.P. 'General unknown' analysis. In: BOGUSZ, M. J. **Forensic Science: Handbook of Analytical Separation**. Elsevier science, v. 2, p. 567-597, 2000.

ZWEIPFENNING, P.G.M.; WILDERINK, A.H.C.M.; HORSTHUIS, P.; FRANKE, J.P.; ZEEUW, R.A. Toxicological analysis of whole blood samples by means of bond Elut Certify columns and gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. **J Chromatogr A**, v. 674, p. 87-95, 1994.

APÊNDICE

APÊNDICE I – Ficha com informações do paciente

Ficha do projeto intitulado “*Análise Toxicológica Sistemática de antidepressivos em sangue total por cromatografia gasosa com detector de nitrogênio e fósforo*”

Data do atendimento: _____ hora: _____

Identificação do paciente:

Número: _____ Idade: _____ Sexo: [1] masc [2] fem [3] ignorado Peso: _____

Getante: [1] 1. trim [2] 2. trim [3] 3. trim [4] ignorado Profissão: _____

Dados gerais:

Atendimento		Tipo de ocorrência	Circunstância	
Telefônico [1] hospital/clínica [2] CS/UBS [3] consul/ambul [4] local trabalho [5] outros cits [6] outros serv públ. [7] residência [8] outro [9] ignorado	Hospitalar [1] PS [2] enfermaria [3] ambulatório [4] UTI [5] outro	[1] intoxicação [2] exposição [3] reação adversa [4] diagnóstico diferencial [5] outro [6] ignorado	[1] acidente individual	[9] abuso
			[2] acidente coletivo	[10] tentativa de suicídio
			[3] ocupacional	[11] tentativa de aborto
			[4] uso terapêutico	[12] violência/homicídio
			[5] presc méd inadequada	[13] uso indevido
			[6] erro administração	[14] ignorada
			[7] auto medicação	[15] outra
			[8] abstinência	

Zona	Local		Exposição	Tipo
[1] urbana [2] rural	[1] residência [2] amb trabalho [3] amb externo [4] serv saúde	[5] trajeto trabalho [6] escola/creche [7] ignorado [8] outro	[1] oral [2] parenteral [3] ignorada [4] outra	[1] aguda única [2] aguda repetida [3] crônica [4] aguda sobre crônica [5] ignorada

Agente tóxico

dose/quantidade

Dados para análise toxicológica:

Data do atendimento emergencial: _____ hora do atendimento: _____

Data estimada do momento da exposição: _____ hora estimada: _____

Data da coleta da amostra: _____ hora da coleta de amostra: _____

Medicamentos ingeridos no atendimento emergencial:

Medicamentos de uso contínuo do paciente:

ANEXOS

ANEXO I - Comitê de Ética em Pesquisas da FCF-USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 157/2005

São Paulo, 01 de novembro de 2005.

Ilmo(a). Sr(a).
Daniela Mendes Louzada de Paula
Orientador: Prof. Regina Lúcia de Moraes Moreau
FBC

Prezado(a) Senhor(a),

Vimos informar que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 31 de outubro de 2005, **APROVOU** as alterações do projeto "Análise toxicológica sistemática de antidepressivos em sangue total por cromatografia gasosa acoplada ao detector de nitrogênio e fósforo" (Protocolo CEP nº 299) apresentado por Vossa Senhoria.

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Prof.ª Dr.ª Valentina Porta
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa da FCF/USP

ANEXO II - Comitê de Ética em Pesquisas da SMS-SP

Prefeitura do Município de São Paulo
Secretaria Municipal da Saúde
Coordenação de Desenvolvimento de Programas e Políticas de Saúde
CODEPPS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

São Paulo, 03 de março de 2006

PARECER N° 0039/2006 – CEP-SMS

Prezado (a) Senhor (a),

Pelo presente, informo que o Comitê de Ética em Pesquisa da Secretária Municipal de Saúde de São Paulo analisou, e **APROVOU**, de acordo com a Resolução CNS 196/96, o protocolo de pesquisa **CAAE – 0011/06 “Análise Toxicológica Sistemática de Antidepressivos em Sangue Total por Cromatografia Gasosa Acooplada ao Detector de Nitrogênio/Fósforo”**, de autoria do(a) pesquisador(a) **DANIELA MENDES LOUZADA DE PAULA**

Como procedimento adotado por este Comitê de Ética em Pesquisa, solicitamos a inclusão, no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do seguinte: qualquer questão, dúvida, esclarecimento ou reclamação sobre os aspectos éticos dessa pesquisa, favor entrar em contato com: Comitê de Ética em Pesquisas da Secretaria Municipal da Saúde de São Paulo – Rua General Jardim, 36 – 2º andar – Telefone: 3218-4043 – e-mail: smscep@prefeitura.sp.gov.br.

Lembramos que este parecer não basta para que seu estudo possa se realizar dentro da unidade, é necessária também a permissão administrativa da autoridade sanitária.

Salientamos os seguintes aspectos a serem considerados pelo pesquisador:

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma ou sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - item IV.1f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento livre e esclarecido, na íntegra, por ele assinado (item IV.2.d)
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. O relatório final deve ser apresentado ao CEP, logo que o estudo estiver concluído.

Atenciosamente,

IARA COELHO ZITO GUERRIERO

Coordenadora do
Comitê de Ética em Pesquisa da
Secretária Municipal da Saúde – CEP SMS

Ilustríssimo (a). Senhor (a).

DANIELA MENDES LOUZADA DE PAULA

NESTA

ANEXO III - Comitê de Ética em Pesquisas do IML-SP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Centro de Análises Clínicas e Toxicológicas
Laboratório de Análises Toxicológicas

São Paulo, 16 de novembro de 2005

Ao

Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Médico Legal de São Paulo,

Vimos por meio desta encaminhar o projeto de pesquisa, nível mestrado:

“Análise toxicológica sistemática de antidepressivos em sangue total por cromatografia gasosa acoplada ao detector de nitrogênio e fósforo”

para apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto médico Legal de São Paulo.

Este projeto será desenvolvido por Daniela Mendes Louzada de Paula, pós-graduanda do Programa de Toxicologia e Análises Toxicológicas – Mestrado - do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, sob orientação da Professora Doutora Regina Lúcia de Moraes Moreau.

*Após apreciação do projeto
por esta Comissão Científica
nada temos a apor quanto
à sua autorização.*

01/12/05

Dr. Paulo Argarate Vasques
Dr. Paulo Argarate Vasques
CRM 27798

Daniela Mendes Louzada de Paula
Pesquisadora Responsável

Profa. Dra. Regina Lúcia de Moraes Moreau
Orientadora

ANEXO IV - Comissão Nacional de Ética

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 1737/2005

Registro CONEP: 12004 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

CAAE – 0013.0.018.000-05

Processo nº 25000.085603/2005-17

Projeto de Pesquisa: "Análise toxicológica sistemática de antidepressivos em sangue total por cromatografia gasosa acoplada ao detector de nitrogênio e fósforo".

Pesquisador Responsável: Dr^a. Daniela Mendes Louzada de Paula.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Regina Lúcia de Moraes Moreau.

Instituição: Centro de Controle de Intoxicação da Prefeitura de São Paulo. Secretaria Municipal da Saúde de São Paulo – SMS/SP. CEP da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP.

Área Temática Especial: Novos procedimentos.

Ao se proceder à análise do projeto de pesquisa em questão, em resposta ao Parecer CONEP nº 1431/2005, cabem as seguintes considerações:

- a) A pesquisadora apresentou justificativa para a não obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido por se tratar de validação de técnica analítica a ser aplicada após as análises toxicológicas de rotina e esclareceu sobre a origem das amostras.
- b) As informações enviadas atendem aos aspectos fundamentais da Res. CNS 196/96 sobre diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.
- c) O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da instituição supracitada.

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

Situação: Protocolo aprovado.

Brasília, 27 de outubro de 2005.

WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/CNS/MS