

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento e validação de análise de duloxetina
em plasma humano, simultânea a outros antidepressivos,
por cromatografia líquida de alta eficiência**

William Kleber Silva

Ribeirão Preto

2014



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento e validação de análise de duloxetina
em plasma humano, simultânea a outros antidepressivos,
por cromatografia líquida de alta eficiência**

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

Área de concentração: Toxicologia

Orientado: William Kleber Silva

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

Ribeirão Preto
2014

FICHA CATALOGRÁFICA

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

SILVA, William Kleber da

Desenvolvimento e validação de análise de duloxetina em plasma humano, simultânea a outros antidepressivos, por cromatografia líquida de alta eficiência. Ribeirão Preto, 2014.

60p. : il.; 30cm.

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

Orientador: Costa Queiroz, Regina Helena

1. Monitorização terapêutica. 2. Antidepressivos tricíclicos. 3. Antidepressivos não tricíclicos. 4. HPLC. 5. Detecção por UV.

FOLHA DE APROVAÇÃO

William Kleber da Silva

Desenvolvimento e validação de análise de duloxetine em plasma humano, simultânea a outros antidepressivos, por cromatografia líquida de alta eficiência

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

Área de Concentração: Toxicologia

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.

Instituição:

Assinatura:

Prof. Dr.

Instituição:

Assinatura:

Prof. Dr.

Instituição:

Assinatura:

À
Minha Mãe
in memoriam
que pelos Teus Olhos
abriram-se os meus à Vida.

Agradecimentos

Às minhas irmãs, pelo eterno amor e carinho com os quais reconfortaram o meu entorno e me possibilitaram o aconchego de uma Família.

À minha sobrinha-única, para que, na minha esperança, estude e supere seu tio – desejo, aliás, nada, nada difícil para se concretizar.

À minha orientadora, que me aceitou, apesar de minhas limitações de horário, e me recebeu e norteou sempre, sempre, com um sorriso e um olhar de uma brandura que sempre me motivou.

Às amigas e técnicas, Sonia Dreossi, porque sem o seu enciclopédico conhecimento sobre a matéria este estudo teria se concluído de forma muito diferente, sem sua perfeição, seu apreço pelo trabalho, seus sorrisos entre pipetas e tubos de ensaio; Gilda Gatto e Maria Aparecido Buzeto, pelo carinho e paciência em me ensinarem do básico ao complicado em um laboratório de toxicologia.

A amiga Bruna (Maria), porque em dupla inseparável tudo fica mais fácil – faça chuva ou faça sol!

Ao amigo Grandini, que sempre dispôs, além de seus ouvidos a minhas lamúrias, seu vasto conhecimento sobre o difícil tema das normas para as referências bibliográficas.

Aos meus filhos, cachorros, mas filhos, Platão Horácio, Boris Maiorovitch e Magali, porque um abraço, um olhar, uma lambida deles foram incentivos mais do que carinhosos para ler mais um artigo ou escrever mais um parágrafo de relatório.

Vá o homem aonde for, encontrará apenas a porção de beleza que levou consigo.

Ralph Waldo Emerson

Sábio não é o homem que inventou primeira bomba atômica.
Sábio é o menino que inventou a primeira lagartixa.

Manoel de Barros

RESUMO

SILVA, W. K. **Desenvolvimento e validação de análise de duloxetina em plasma humano, simultânea a outros antidepressivos, por cromatografia líquida de alta eficiência.** 2014. 60f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Atualmente, a quantidade de pacientes que são diagnosticados com alguma forma de depressão, entre elas, o transtorno depressivo maior, aumenta consideravelmente, quer seja em razão de diagnósticos mais precisos ou pela própria epidemiologia da doença. Acresça-se o fato de que muitos pacientes, apesar da quantidade de tipos de antidepressivos atualmente disponíveis para a terapêutica, são refratários ao tratamento prescrito, em razão dos efeitos adversos apresentados, ou de seus efeitos tóxicos, ou ainda por simplesmente não se observar melhora com a prescrição seguida. Portanto, novos tratamentos farmacológicos são disponibilizados, e entre eles, a duloxetina, um duplo inibidor de recaptção de serotonina e norepinefrina. Para auxiliar na máxima eficácia em sua utilização, esse trabalho apresenta metodologia em HPLC para determinação simultânea de sete antidepressivos, tricíclicos e não tricíclicos, moclobemida, venlafaxina, citalopram, agomelatina, duloxetina, amitriptilina e sertralina, em plasma humano, para posteriormente ser aplicada na monitorização de pacientes depressivos. O simples e preciso método de preparo da amostra consiste na extração líquido-líquido, com recuperação entre 73% a 86% (exceto para moclobemida, de 55%), e para a duloxetina, de aproximadamente 73%. A separação foi obtida usando uma coluna em fase reversa Lichrospher® 60 RP-select B em LichroCART 250mm x 4mm, 5µm de diâmetro interno, Merck, sob condições isocráticas, com detecção em UV em 230nm, com fase móvel composta por 35% de uma mistura de acetonitrila:metanol 55/5 (v/v) e 65% de tampão acetato 0,25M, pH 4,4. As curvas padrões foram lineares em uma faixa de trabalho de 2,5-1000ng/mL para moclobemida, 5-2000ng/mL para venlafaxina, citalopram, agomelatina, duloxetina e amitriptilina, e 10-2000ng/mL para sertralina. As precisões intra e interensaios foram efetuadas em três concentrações (50, 200 e 500ng/mL). Os coeficientes de variação para a precisão intraensaio foram menores que 8,6% para todos os compostos e os coeficientes de variação para a precisão interensaio foram menores que 8,5%. Os limites de quantificação foram de 2,5ng/mL para a moclobemida, 5ng/mL para venlafaxina, citalopram, duloxetina, agomelatina, amitriptilina e 10ng/mL para sertralina. Não se observou qualquer interferência das drogas normalmente associadas aos antidepressivos.

Palavras-chave: monitorização terapêutica; antidepressivos tricíclicos; antidepressivos não tricíclicos; HPLC; detecção por UV.

ABSTRACT

SILVA, W. K. **Development and validation of analysis of duloxetine in human plasma, simultaneous with other antidepressants, by high performance liquid chromatography.** 2014. 60f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

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

Keywords: therapeutic monitoring; tricyclic antidepressants; not tricyclic antidepressants; HPLC; UV detection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Fórmula estrutural da duloxetina	14
Figura 2.	Procedimento de extração e análise cromatográfica dos padrões de antidepressivos em plasma por HPLC-UV	30
Figura 3.	Cromatograma obtido do branco (sem padrão interno)	31
Figura 4.	Cromatograma obtido do plasma adicionado de 200ng/mL dos padrões dos fármacos	32
Figura 5.	Estrutura química dos antidepressivos e do padrão interno	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Linearidades, equações da reta e coeficientes de correlação obtidos para os fármacos estudados pela metodologia empregada	34
Tabela 2.	Limites inferiores de quantificação obtidos para os fármacos estudados pela metodologia empregada	35
Tabela 3.	Precisão intra e interensaio e exatidão obtidos para os fármacos estudados pela metodologia empregada	36
Tabela 4.	Recuperações obtidas para os fármacos estudados pela metodologia empregada.....	37
Tabela 5.	Seletividade para a metodologia empregada	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	Serotonina
ACh	Acetilcolina
ADT	Antidepressivo tricíclico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CID	Classificação Internacional de Doenças
CQA	Controle de qualidade de alta concentração
CQB	Controle de qualidade de baixa concentração
CV	Coeficiente de variação
DA	Dopamina
DSM	Dicionário de Saúde Mental
ELL	Extração líquido-líquido
FDA	Food and Drug Administration
FM	Fase móvel
HPLC	High performance liquid chromatography
iMAO	Inibidores da monoaminooxidase
IRSN	Inibidor da recaptção de serotonina e noradrelina
ISRS	Inibidor seletivo da recaptção de serotonina
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LIQ	Limite inferior de quantificação
LSQ	Limite superior de quantificação
NE	Norepinefrina
PI	Padrão interno
QD	do latim <i>quaque dia</i> , uma vez ao dia
SWGTOX	Scientific Working Group for Forensic Toxicology
TDM	Transtorno depressivo maior
UV	Ultravioleta
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	iv
Lista de abreviatura e siglas	v
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Transtorno depressivo maior	3
1.2 Fármacos para tratamento da depressão	8
1.3 Duloxetina	11
1.4 Monitorização terapêutica, métodos de extração e cromatografia líquida de alta eficiência	14
1.5 Revisão bibliográfica	18
2. OBJETIVOS	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 Caracterização do local de estudo	20
3.2 Obtenção do <i>pool</i> de plasma	21
3.3 Análise crítica dos riscos e benefícios	21
3.4 Metodologia analítica	22
3.4.1 Padrões e reagentes	22
3.4.2 Sistema cromatográfico	22
3.4.3 Preparo das amostras	23
3.4.3.1 Soluções padrões	23
3.4.3.2 Solução de padrão interno	23
3.4.4 Extração das amostras	23
3.4.5 Curva de calibração	23
3.5 Validação da metodologia analítica	24
3.5.1 Curva de calibração	24
3.5.2 Precisão	25
3.5.3 Exatidão	26
3.5.4 Seletividade	26
3.5.5 Efeito residual	27
3.5.6 Efeito matriz	27
3.5.7 Estabilidade	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1 Padronização do método analítico de extração líquido-líquido	28
4.2 Análise dos antidepressivos em plasma humano por HPLC-UV	31
4.3 Validação da metodologia empregada	34
4.3.1 Curva de calibração da metodologia empregada	34
4.3.2 Limite inferior de quantificação (LIQ) da metodologia empregada ..	35
4.3.3 Precisão e exatidão da metodologia empregada	35
4.3.4 Recuperação da metodologia empregada	36
4.3.5 Seletividade da metodologia empregada	37
4.3.6 Efeito matriz da metodologia empregada	38
4.3.7 Efeito residual da metodologia empregada	39
4.3.8 Ensaios de estabilidade da metodologia empregada	39

5. CONCLUSÃO	40
6. REFERÊNCIAS	41
 APÊNDICE	45
 ANEXO	46

1. INTRODUÇÃO

Estima-se que a depressão afete 350 milhões de pessoas no mundo. A doença resulta de uma complexa interação de fatores sociais, psicológicos e biológicos. A depressão reduz a funcionalidade das pessoas e frequentemente é recorrente. Por essas razões, é a principal causa de incapacidade ao redor do mundo em termos de total de anos perdidos. A depressão é um contribuinte significativo para a carga global de doença no mundo (WHO, 2012).

Em psiquiatria, o termo depressão é utilizado para designar um transtorno de humor, uma síndrome em que a principal queixa de alterações exibidas pelo paciente é o humor depressivo e às vezes irritável durante a maior parte do dia. Há uma redução das funções psíquicas e da motricidade do indivíduo, além do prejuízo na capacidade de atenção e concentração. A depressão é muito mais profunda do que a tristeza. Estão presentes pensamentos constantes de cunho negativo, sentimento de culpa e sensação de inutilidade, diminuição do prazer e do ânimo para atividades cotidianas e de lazer, além de perda da capacidade de planejamento para o futuro, muitas vezes acompanhados por distúrbios do sono ou apetite (Canale, 2006).

Além disso, a depressão geralmente é acompanhada por sintomas de ansiedade. Esses problemas podem se tornar crônicos ou recorrentes e levar a deficiências substanciais na habilidade de um indivíduo para cuidar de suas responsabilidades cotidianas. Na sua pior forma, a depressão pode levar ao suicídio. Cerca de 1 milhão de vidas são perdidas anualmente devido ao suicídio, que se traduz em 3.000 mortes por suicídio todo dia. Enquanto a depressão é a causa principal de incapacidade para ambos os sexos, a depressão é 50% maior para as mulheres do que para os homens (WHO, 2012).

Depressão é um transtorno do humor. Muitas vezes, os termos depressão e transtornos afetivos são utilizados como equivalentes. Em seu sentido exato não são. Os transtornos afetivos compõem uma categoria ampla de estados de ânimo (dificuldades no campo das emoções, na capacidade cognitiva, no comportamento e na regularidade das funções corporais). A depressão é a forma mais comum de transtornos afetivos (Silva et al, 2003).

No Brasil, a prevalência de depressão na população geral ao longo da vida é de aproximadamente 17%. Em um estudo internacional, realizado em 18

países, a prevalência encontrada foi de 11,1%, e entre os países de renda média, a maior prevalência encontrada foi no Brasil, com percentual de 18,4%. Quando se trata de cuidados primários no Brasil, essa prevalência pode chegar a 29,5%, diferentemente do encontrado em pacientes na atenção primária de outros países, como a Espanha (9,6%) (Molina et al, 2012).

A forma mais comum de classificação da depressão é aquela que diferencia a depressão bipolar e a depressão unipolar, a primeira caracterizada por longos períodos de depressão intercalados com episódios de mania (euforia), e a segunda por um estado contínuo ou periódico de depressão. As depressões também podem ser divididas em subtipos, tais como:

1) Distímia: quadro depressivo leve, intermitente, de início insidioso, em que o indivíduo sofre oscilações de humor depressivo súbitas ou contínuas, de intensidade variável ao longo do dia e de um dia a outro, durante anos.

2) Ciclotímia: caracteriza-se por instabilidade persistente do humor com alternância de inúmeros períodos distímicos.

3) Depressão endógena ou melancólica: possui gênese biológica, não importando se existe ou não fator psicogênico desencadeante.

4) Depressão atípica: humor reativo a estímulos e inversão dos sintomas vegetativos da depressão endógena (hipersonia, aumento do apetite e do peso).

5) Depressão sazonal: caracterizada por episódios depressivos recorrentes no outono e no inverno e ausência de depressão na primavera e no verão.

6) Depressão psicótica: trata-se de depressão grave, com presença de delírios e/ou alucinações, podendo ocorrer turvação da consciência em casos mais graves.

7) Depressão recorrente breve: depressivos que apresentam sintomas por menos de duas semanas, um a dois episódios ao mês, pelo período ao redor de um ano. (Canale, 2006)

A depressão é um distúrbio que pode ser diagnosticado com segurança e tratado em atendimentos primários de saúde, e as opções de tratamento preferíveis consistem de suporte psicossocial básico combinado com a prescrição de antidepressivo e/ou psicoterapia. A maioria da população que necessita de

tratamento para a depressão não a recebe. Em países nos quais os dados estejam disponíveis, menos de 50% das pessoas com depressão recebem algum tipo de tratamento, mas esse número pode ser menor, menos de 30% para a maioria das regiões do planeta e ainda menos que 10% em alguns países. Barreiras para o tratamento efetivo incluem falta de recursos, ausência de profissionais da área da saúde e o estigma social da depressão associado a transtornos mentais. Outra barreira para atendimento eficaz é a avaliação imprecisa. Mesmo em alguns países ricos, pessoas deprimidas nem sempre são corretamente diagnosticadas, e outras que não possuem a doença são ocasionalmente mal diagnosticadas e antidepressivos são prescritos (WHO, 2012). Sabe-se que o diagnóstico de depressão costuma ser prejudicado pela presença frequente de comorbidades, pela dificuldade da equipe de saúde em reconhecê-la e pela falta de atenção à saúde mental no sistema de saúde primário (Molina et al, 2012).

Embora não se disponha de parâmetros fisiológicos ou biológicos para avaliar as manifestações clínicas da depressão, as escalas de avaliação servem para medir e caracterizar o transtorno, isto é, traduzem o transtorno clínico em informações objetivas e quantitativas. Ajudam na avaliação dos sintomas e na elaboração do próprio diagnóstico, além de auxiliarem o acompanhamento do paciente e o resultado dos tratamentos. Assim, é de extrema importância e utilidade para aplicação clínica e científica buscar instrumentos que auxiliem a estabelecer um diagnóstico preciso e recomendar o melhor tratamento. Escalas autoaplicáveis são bastante utilizadas na pesquisa clínica. A Escala de Avaliação de Depressão de Hamilton (HAM-D), desenvolvida há mais de 40 anos, é a mais aceita e usada no âmbito mundial e se tornou o padrão-ouro para avaliação da intensidade da depressão, de modo que as escalas desenvolvidas posteriormente são comparadas a ela quanto a confiabilidade e a validade. A HAM-D enfatiza os sintomas somáticos, o que a torna particularmente sensível a mudanças vivenciadas por pacientes deprimidos, e contribui para a difusão de seu uso em ensaios clínicos com antidepressivos (Parcias, 2011).

1.1. Transtorno Depressivo Maior:

Distinguir as mudanças de humor entre graus clinicamente significativos de depressão (por exemplo, depressão maior) e aquelas que ocorrem

normal e cotidianamente continua a ser problemático. A identificação de depressão maior é baseado não apenas na sua severidade, mas também sobre a persistência, a presença de outros sintomas, e o grau de prejuízo funcional e social. Quanto maior a gravidade da depressão, maior a morbidade e consequências adversas (NICE, 2010).

O transtorno depressivo maior (TDM) é uma condição incapacitante, que é frequentemente subdiagnosticado e subtratado. Geralmente uma condição crônica, TDM está associado com redução de qualidade de vida, comprometimento funcional, más condições de saúde física, aumento da mortalidade e aumento do uso de recursos de saúde. O impacto prejudicial de TDM no mundo é desconcertante: em 2004 o transtorno era a terceira causa de carga de doença e uma importante causa de incapacidade em países desenvolvidos. Para 2020, TDM pode tornar-se até mesmo a maior causa de carga de doença, prevista para perder apenas para as doenças cardiovasculares. Cerca de 121 milhões de pessoas no mundo são afetadas por TDM. Nos Estados Unidos, a taxa de prevalência tem sido estimada em 6,7% da população adulta, e 30,4% desses pacientes possuem depressão grave. Na Europa, a prevalência de TDM varia entre os países e entre as áreas urbana e rural, mas, no geral, é estimado que 9% e 17% de homens e mulheres, respectivamente, são afetados por TDM (WHO, 2012).

De acordo com um estudo divulgado pela Organização Mundial de Saúde (WHO), o Brasil é o país com a maior prevalência da doença no ano de 2012, com 10,8% da população apresentando o distúrbio mental.

Manifestações somáticas de TDM frequentemente acompanham sintomas emocionais e é normalmente a queixa primária de pacientes aos médicos. Por exemplo, dor é uma das queixas principais de pacientes que procuram serviços em centros de atenção primária de saúde e que são eventualmente diagnosticados com TDM (WHO, 2012).

São frequentes as associações entre TDM com outras condições médicas e psiquiátricas, tais como insônia crônica, distúrbios alimentares, câncer, artrite, obesidade e doenças cardiovasculares (Ball et al, 2014).

O DSM-V define que a depressão maior requer a) pelo menos duas semanas de humor deprimido ou a perda de interesse ou prazer em quase todas as atividades, acompanhado de b) pelo menos quatro sintomas adicionais de

depressão a partir de uma lista que inclui alterações em apetite, peso, sono (insônia ou hipersonia) ou atividade psicomotora (retardo ou agitação observados); energia diminuída; sentimentos de inutilidade ou culpa inadequada; dificuldade de pensar, concentrar-se ou de tomar decisões; ou pensamentos recorrentes de morte ou ideação, planos ou tentativas suicidas. Tais sintomas devem c) ter surgido recentemente ou ter piorado claramente em comparação ao estado prévio ao episódio da pessoa. Os sintomas devem d) persistir durante a maior parte do dia, em quase todos os dias, por pelo menos duas semanas consecutivas, e causar e) sofrimento ou prejuízo clinicamente significativos nas áreas social, ocupacional ou outras áreas importantes de funcionamento. Além disso, os sintomas não devem ser f) causados pelo luto, abuso de substâncias ou por uma condição clínica.

Em essência, a depressão maior requer a presença de um episódio depressivo pelo menos por duas semanas, e que um número mínimo dos sintomas prescritos persistam durante o dia e causem prejuízo. Difere do luto (i.e., perda por morte ou abandono) e infere-se que é uma condição primária – ou seja, não é secundária ao abuso de substâncias ou a uma condição clínica, mas não há qualquer afirmação sobre o fato de ser primária ou secundária a condições psiquiátricas (por exemplo, ansiedade) ou a problemas psicossociais (por exemplo, transtorno de personalidade) (Parker et al., 2009).

As principais teorias relativas à base biológica da depressão situam-se nos estudos sobre neurotransmissores cerebrais e seus receptores, embora outras áreas também estejam sob investigação. As monoaminas constituem-se na principal hipótese envolvendo os neurotransmissores cerebrais (Bahls, 1999).

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

A hipótese das monoaminas baseia-se no conceito da deficiência das aminas biogênicas, particularmente NE, 5HT e DA, como a causa das depressões. A primeira hipótese aminérgica de Schildkraut (1965) e Bunney e Davis (1965) foi

denominada hipótese catecolaminérgica, pois propunha que a depressão se associava a um *déficit* das catecolaminas, principalmente a NE. Posteriormente surgiram a hipótese serotoninérgica, de Van Praag e Korf (1971), que teve grande impulso com o desenvolvimento da classe de antidepressivos chamados Inibidores Seletivos de Recaptação da Serotonina (ISRS) e a hipótese dopaminérgica de Wilner (1990), devido à implicação da DA nos fenômenos de recompensa cerebral, estando envolvida na fisiopatologia da anedonia, e de estudos demonstrando que o uso continuado de antidepressivos tricíclicos (ADT) aumenta a resposta comportamental à DA injetada no núcleo acumbens, que age como interface entre o sistema motor e o sistema límbico. Tal hipótese derivou inicialmente da compreensão advinda do conhecimento sobre o mecanismo de ação dos primeiros antidepressivos: tricíclicos e inibidores da monoaminoxidase (IMAO) que aumentam as concentrações das monoaminas nas fendas sinápticas cerebrais (Graeff e Brandão, 1993; Leonard, 1997; Stahl, 1998; Bahls, 1999).

A reforçar a hipótese das monoaminas, houve outras evidências: a) drogas, como a reserpina, que depletam esses neurotransmissores são capazes de induzir depressão; b) precursores da 5HT: L-triptofano e 5-hidroxitriptofano apresentam efeito antidepressivo leve; c) vários estudos relataram anormalidades nos metabólitos das aminas biogênicas, como o ácido 5-hidroxiindol acético (5HIAA), o ácido homovanílico (HVA) e 3-metoxi-4-hidroxi-phenilglicol (MHPG) no sangue, urina e líquido de pacientes deprimidos; d) a redução da concentração de 5HT e seu principal metabólito 5HIAA ocorre no cérebro de vítimas de suicídio, alcançado de maneira violenta, e no líquido de pacientes deprimidos; e) a privação aguda de triptofano causa recidiva em 80% dos pacientes deprimidos tratados com sucesso com os antidepressivos da classe dos ISRS (Kaplan, Sadock e Grebb, 1994; Graeff e Brandão, 1993; Bahls, 1999).

Apesar da relevância da hipótese das monoaminas na investigação da depressão, existe certa resistência para sua plena aceitação, especialmente devido ao fato de que todos os medicamentos antidepressivos aumentam, de imediato, as monoaminas em nível das fendas sinápticas, porém seu efeito clínico só ocorre algumas semanas depois. Outras substâncias, como, por exemplo, a cocaína, também elevam os níveis das monoaminas, mas não apresentam efeito antidepressivo. Do mesmo modo, nenhuma alteração nos índices de DA ou NE no

líquor parece caracterizar pacientes deprimidos como um todo, e o nível reduzido de 5HIAA está mais relacionado a problemas de controle do impulso do que à depressão (Bahls, 1999).

Há evidências de que a doença também provoque alterações em outros neurotransmissores, como o ácido gama-aminobutírico (GABA, principal transmissor inibitório do sistema nervoso central - SNC) e o glutamato (principal transmissor excitatório do SNC). Por exemplo, há aumento dos níveis de glutamato e declínio dos níveis de GABA no córtex occipital. Porém, essa alteração varia, de acordo com a região cerebral, para todos os neurotransmissores (BRATS, 2012).

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

Outra hipótese importante na fisiopatologia da depressão é o envolvimento neuroendócrino. Os principais neurotransmissores monoaminérgicos (serotonina, dopamina e noradrenalina) estão envolvidos com o funcionamento neuroendócrino, relacionado com o estresse, e a depressão, em muitos casos, poderia ser uma resposta ao estresse crônico. O hormônio liberador da corticotrofina (CRH) é o principal regulador da secreção do ACTH (adrenocorticotrofina) e possui um papel importante na resposta fisiológica ao estresse (Aguiar et al, 2011).

Pacientes deprimidos apresentam hipercortisolemia e alteração do ciclo circadiano (com alteração do ciclo sono-vigília e de temperatura corporal, pressão sanguínea, liberação de hormônio tireotrófico ou estimulante da tireóide – TSH – e melatonina). A secreção excessiva e prolongada de glicocorticoide pode levar à supressão da neurogênese, alterando número, densidade e tamanho de neurônios e células da glia. Pode ocorrer inclusive atrofia cerebral, especialmente no hipocampo, devido ao estresse provocado. Dessa forma, o processo somático relacionado à depressão (com alteração de sono, apetite e libido) também se relaciona à disfunção serotoninérgica e à alteração no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Destaca-se, entretanto, que essa disfunção não é síndrome específica, uma vez que a 5-HT também está envolvida em vários transtornos psiquiátricos (BRATS, 2012).

Atualmente, crê-se também que processos inflamatórios e neurodegenerativos desempenham um papel importante na depressão, e que a doença provoque aumento do processo neurodegenerativo em consequência do processo inflamatório gerado. A hipótese considera que fatores extrínsecos, tais como estressores psicossociais, e intrínsecos, como doenças inflamatórias orgânicas ou outras condições, como o período pós-parto, podem provocar depressão por meio de processos inflamatórios. A depleção de triptofano, com consequente redução de 5-HT e hipersecreção de cortisol causam aumento de citocinas pró-inflamatórias como as interleucinas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12), o interferon γ , o fator de necrose tumoral (TNF α) e o óxido nítrico, gerando estresse oxidativo. Em consequência, há neuroinflamação, apoptose e necrose celular, levando ao aumento da neurodegeneração e redução da neurogênese, mecanismos principais relacionados à fisiopatologia da doença (BRATS, 2012).

Lesões vasculares também podem contribuir para a doença, uma vez que também podem alterar as redes neurais envolvidas na regulação emocional. Há hipótese de que a depressão esteja associada à diminuição da atividade metabólica em estruturas neocorticais e ao aumento da atividade metabólica em estruturas límbicas, como hipocampo e amígdala, responsáveis pelo “colorido” emocional (BRATS, 2012).

O genótipo pode estar relacionado à vulnerabilidade da depressão, entretanto não é determinante. A depressão requer fatores não genéticos para desenvolver-se. O estresse precoce, tal como trauma na infância, pode predispor indivíduos à depressão maior ao longo da vida, alterando o limiar ao estresse e à resposta a estímulos negativos (BRATS, 2012).

1.2. Fármacos para tratamento da depressão

Apesar da ampla variedade de opções terapêuticas disponíveis, tratamentos eficazes para o TDM continuam a ser um desafio para pacientes e médicos, sendo que os fármacos antidepressivos de primeira linha, quando administrados em monoterapia, não conjuntamente a outros tipos de terapia, alcançam uma remissão dos sintomas em 37% dos pacientes (Schacht, 2014).

Os antidepressivos podem ser uma forma eficaz de tratamento para a depressão moderada a grave, mas não são a primeira linha de tratamento para os

casos de depressão leve. Eles não devem ser utilizados para o tratamento da depressão em crianças e não são a primeira linha de tratamento, em adolescentes, entre os quais devem ser utilizados com cautela (WHO, 2012).

Muitos antidepressivos diferentes criaram registros de eficácia para o tratamento da depressão maior. No entanto, todos eles sofreram de algumas limitações em termos de eficácia, pois pelo menos 20% de todos os pacientes deprimidos são refratários aos vários e diferentes antidepressivos em doses adequadas. Os medicamentos mais comumente usados, muitas vezes chamados de antidepressivos de segunda geração, são os inibidores seletivos de recaptção de serotonina (ISRSs) e os inibidores de recaptção de serotonina e norepinefrina (IRSNs), quem possuem maior segurança em relação à maioria dos medicamentos mais antigos (ou seja, os antidepressivos de primeira geração). Inibidores relativamente seletivos da recaptção da norepinefrina também foram desenvolvidos como antidepressivos (Goodman & Gilman, 2012).

Geralmente a eficácia dos antidepressivos de primeira ou segunda geração é similar. No entanto, os antidepressivos de primeira geração frequentemente produzem vários efeitos adversos que muitos pacientes consideram-nos intoleráveis, e o risco para a saúde quando tomados em overdose ou em combinação com certos medicamentos é alto. Em razão de seus efeitos adversos relativamente mais brandos, os antidepressivos de segunda geração desempenham um papel proeminente no tratamento de pacientes com TDM (Gartlehner et al. 2011).

Os antidepressivos podem ser classificados segundo as categorias:

a) inibidores da captura de monoaminas:

a.1) inibidores não-seletivos (noradrenalina/serotonina) da recaptção: estes incluem os antidepressivos tricíclicos (ADTs) – por exemplo, imipramina e amitriptilina) e antidepressivos mais recentes, como a venlafaxina, que é mais seletiva para a serotonina, embora menos que os inibidores seletivos da recaptura da serotonina) e a duloxetina, que têm menos efeitos colaterais que os ADTs;

a.2) inibidor da recaptção relativamente seletiva de norepinefrina e dopamina – por exemplo, bupropiona.

a.3) inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRSs) – por exemplo, fluoxetina, fluvoxamina, paroxetina e sertralina;

a.4) inibidores seletivos da recaptação da noradrenalina – por exemplo, maprotilina, reboxetina;

b) inibidores da monoaminoxidase (MAO) (iMAOs):

b.1) inibidores irreversíveis não competitivos – por exemplo, fenelzina, tranilcipromina, que não são seletivos com respeito aos subtipos MAO-A e MAO-B;

b.2) inibidores seletivos para MAO-A – por exemplo, moclobemida.

c) compostos variados (atípicos) de bloqueio de receptores – por exemplo, mianserina, trazodona, mirtazapina (Rang e Dale, 2008; Aguiar et al, 2011).

Os efeitos a longo prazo dos fármacos antidepressivos evocam mecanismos adaptativos ou reguladores que aumentam a eficácia da terapia. Estas respostas incluem aumento da densidade ou sensibilidade do receptor adrenérgico ou serotoninérgico, aumento do acoplamento receptor-proteína G e sinalização de nucleotídeos cíclicos, indução de fatores neurotróficos e aumento da neurogênese no hipocampo. Os efeitos antidepressivos persistentes dependem da inibição contínua de transportadores de 5-HT ou NE, ou aumento da neurotransmissão serotoninérgica e da noradrenérgica alcançado por um mecanismo farmacológico alternativo. Por exemplo, o tratamento crônico com alguns antidepressivos que interagem diretamente com os transportadores de monoaminas (por exemplo, ISRSs, IRSNs ou inibidores da recaptação da NE) reduz a expressão e atividade dos transportadores de NE e 5-HT no cérebro, o que resulta em aumento da neurotransmissão serotoninérgica ou noradrenérgica. Uma evidência convincente sugere que a sinalização contínua através de NE ou 5-HT aumenta a expressão de determinados produtos gênicos, em particular o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), que parece estar relacionado com o mecanismo final da ação desses fármacos (Goodman e Gilman, 2012).

Uma crítica em relação a esta hipótese é decorrente da diferença entre o tempo de ação na fenda sináptica (horas) e o tempo de recuperação ou resposta clínica ao medicamento (semanas). Enquanto o antidepressivo modifica de imediato os níveis das monoaminas, a melhora em relação à sintomatologia só ocorre a partir de duas semanas de uso da droga. Pesquisas demonstraram que o uso crônico de medicação antidepressiva levava a uma redução na quantidade e função dos receptores monoaminérgicos, ocasionando um *feedback* que resultaria na liberação

de mais neurotransmissores. A hipótese inicial da alteração monoaminérgica clássica foi transformada na hipótese de modificação da sensibilidade dos receptores por ação da medicação antidepressiva. Ela propõe que alterações na sensibilidade de receptores monoaminérgicos, observadas após administração crônica de medicamentos, estão relacionadas ao mecanismo de ação antidepressiva (Aguiar et al, 2011).

1.3. Duloxetina

Duloxetina foi aprovada pela FDA para tratamento de TDM em 2004. Muitos estudos pré-clínicos que avaliaram o efeito de duloxetina em modelos animais de depressão e dor sugeriram um uso potencial de duloxetina para o tratamento de TDM, ansiedade, dor neuropática periférica diabética. Ensaios clínicos subsequentes permitiram aprovar duloxetina para fibromialgia e dores musculoesqueléticas crônicas. Além disso, duloxetina foi também aprovada para o tratamento de incontinência urinária por estresse na Europa (Ball et al, 2014).

Trata-se de um inibidor da recaptação de serotonina (5-HT) e da noradrenalina (NA), com igual afinidade para ligação a transportadores de NE e de 5-HT, com pouca afinidade para outros receptores tais como receptores muscarínicos, histaminérgicos, alfa-adrenérgicos, dopaminérgicos, receptores serotoninérgicos e opioides, condição que permite ao fármaco ter um perfil menor de reações adversas em comparação com outras drogas antidepressivas (Härmark et al, 2012).

Duloxetina é geralmente segura e bem tolerada. Entretanto, náusea, dor de cabeça, boca seca, fadiga, insônia, constipação, diarreia, tontura, sudorese, disfunção sexual e redução do apetite são os mais comuns efeitos adversos relatados por pacientes. Recentemente, casos de lesão hepática induzida pela duloxetina também foi observada em pacientes com doença hepática preexistente ou com histórico de uso crônico de álcool (Dell'Osso et al, 2012). Menos frequentes são os efeitos cardiovasculares, como aumento da pressão sanguínea. Em relação a doses excessivas (500mg ou mais) o efeitos observados foram de atentado suicida, alteração do *status* mental, alterações cardiovasculares com hipotensão, bradicardia sinusal e prolongamento do intervalo QTc (Mercolini et al, 2007).

Estudos recentes também observaram que duloxetina pode representar uma estratégia eficaz para o tratamento do transtorno depressivo maior resistente. Diferentes testes clínicos investigaram a eficácia e segurança de duloxetina nos transtornos depressivo maior e de ansiedade generalizada. Sob esta perspectiva, um estudo recente mostrou que a troca de um ISRS/IRSN por duloxetina foi efetiva em pacientes afetados por TDM com sintomas de dores físicas. Em particular, as melhorias em medidas clínicas de humor, dor e ansiedade foram acompanhadas por melhorias funcionais clinicamente significativas (Dell’Osso et al, 2012).

Com respeito ao transtorno de ansiedade generalizada, uma recente meta-análise, envolvendo 27 estudos randomizados, avaliando a eficácia do tratamento com diferentes drogas, concluiu que duloxetina, escitalopram e pregabalina podem oferecer algumas vantagens em termos de resposta, remissão e tolerabilidade, respectivamente, sobre venlafaxina e paroxetina. Além do mais, um artigo que recentemente analisou resultados de três ensaios clínicos concluiu que duloxetina foi eficaz em curto e longo tratamento dos sintomas físicos de dor associados ao transtorno de ansiedade generalizada (Dell’Osso et al, 2012).

Ação analgésica de duloxetina foi observada na primeira semana de administração, provavelmente em razão da potenciação das vias descendentes inibitórias de dor no sistema nervoso central. Ensaios clínicos randomizados documentaram significativo efeito analgésico para a manutenção da dor crônica associada à fibromialgia e a dor neuropática periférica diabética. Estudos têm também sugerido que a dor associada com o distúrbio depressivo maior pode ser reduzida com sua utilização. Efeitos modestos para dor de cabeça, dor proveniente de osteoartrite e dor secundária à Doença de Parkinson também foram documentadas, mas os dados obtidos requerem outros para corroborá-los em grandes estudos randomizados (Bellingham e Peng, 2010).

A serotonina (5-HT) e a noradrenalina (NA) têm sido implicadas na mediação dos mecanismos de inibição endógena da dor através das vias inibitórias descendentes da dor no cérebro e na medula espinhal. Nos estados de dor crônica, o efeito inibitório destas monoaminas é postulado ser reduzido ou perdido e, conseqüentemente, mudando o sistema modulador da dor descendente de um estado de inibição para um estado de facilitação da dor. Estudos pré-clínicos têm demonstrado que a duloxetina reduz eficazmente o comportamento da dor através

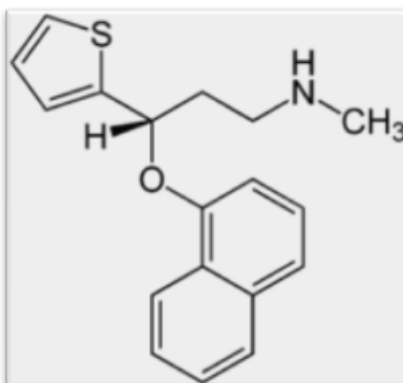
de uma variedade de estados de algesia inflamatórios, neuropáticos e persistentes, em um intervalo de dose que é consistente com a inibição da 5-HT e NE da recaptção. Assim, acredita-se que o efeito analgésico da duloxetina resulta do aumento da atividade da 5-HT e NE no SNC, presumivelmente, ou através do reforço das vias descendentes inibitórias da dor no cérebro e medula espinhal e/ou outras ações desconhecidas no SNC (Skljarevski et al, 2011).

Duloxetina exibe uma cinética linear em dosagens terapêuticas (60–120 mg/dia), com uma biodisponibilidade oral entre 32% a 80%, uma meia-vida média de eliminação de cerca de 12 horas e um tempo médio de absorção de 2 horas. O fármaco rapidamente liga-se a proteínas plasmáticas (96%) e é extensivamente distribuído aos tecidos e metabolizado no fígado por isoenzimas do citocromo P450, 1A2 e 2D6, as quais também são inibidas por esse fármaco, para metabólitos inativos. O fato de esta molécula ser extensivamente metabolizada pelo citocromo P450 implica que cuidados devem ser tomados quando for coadministrada com substratos dessas isoenzimas, tais como antidepressivos tricíclicos, fenotiazinas e alguns antiarrítmicos (Dell'Osso et al, 2012). Duloxetina é extensivamente metabolizada a compostos oxidados inativos e compostos conjugados. O conjugado glucoronídeo de 4-hidroxiduloxetina (4-OH-D-Gluc) é o maior metabólito no plasma humano. Três outros metabólitos, glucoronídeo e conjugados de sulfato, também são identificados no plasma em altos níveis (Kaza et al, 2014).

Ball et al (2014) conduziu ampla revisão sobre a eficácia e segurança de duloxetina. Nove estudos de curto prazo evidenciaram a eficácia de duloxetina 60mg QD para o tratamento de TDM. Dois outros estudos indicaram vantagem da duloxetina 60mg QD comparada ao placebo para tratamento de pacientes com sintomas de ansiedade associada ao TDM, embora um terceiro estudo não tenha trazido resultados estatisticamente diferentes para o grupo que recebeu duloxetina e o que recebeu placebo. Em outro estudo, no qual se verificou a eficácia de duloxetina em pacientes com TDM leve, o grupo que recebeu 60mg QD de duloxetina mostrou taxas de remissão dos sintomas de TDM maiores que as do placebo. Entre pacientes mulheres, outro estudo apontou também taxas de remissão dos sintomas de TDM maiores no grupo para o qual foi prescrito duloxetina 60mg QD. Outro estudo para avaliar a eficácia de duloxetina para o tratamento dos

sintomas de dor associados à TDM também trouxeram números que estatisticamente eram superiores aos do grupo para os quais foi prescrito somente placebo. Em decorrência, o mesmo estudo apoiou a teoria de um efeito analgésico direto da duloxetina, independente do efeito antidepressivo, porque reduziu os sintomas físicos de dores nos pacientes na ausência de melhoras significativas nos sintomas depressivos, mesma teoria que estudo outro indicou, sobre o efeito analgésico de duloxetina ocorrer de forma independente ao efeito antidepressivo. Porém os estudos não foram conclusivos sobre a prioridade de duloxetina. O tempo de resposta e de resposta sustentada para redução dos sintomas da depressão é de maior interesse dos médicos. Antidepressivos que oferecem um rápido início de ação fornecem melhora rápida nos sintomas da depressão, bem estar funcional e uma maior confiança do paciente no tratamento, além de poder reduzir o risco de suicídio. Enquanto existe consenso de que 60mg de duloxetina QD deve ser considerado como dose usual para tratamento de TDM, não há concordância sobre quando e se doses maiores (90mg-120mg QD) devem ser prescritas, embora estudo tenha indicado que doses maiores que 60mg de duloxetina QD não mostraram taxas de remissões maiores no tratamento de TDM.

Figura 1: fórmula estrutural da duloxetina



1.4. Monitorização terapêutica, métodos de extração e cromatografia líquida de alta eficiência

As áreas nas quais há interesse em análises de compostos encontrados em fluidos biológicos são muitas: ambiental, farmacêutica, análises clínicas, medicina legal, etc. A análise cromatográfica de substâncias presentes nestes tipos de matrizes (soro, plasma, urina, etc), em geral, requer um pré-tratamento da amostra. As razões para isso são inúmeras, destacando-se a

complexidade das matrizes biológicas, das quais os compostos são obtidos, a existência de proteínas que são incompatíveis com as colunas cromatográficas e a concentração das substâncias a serem analisadas, ao nível de traço. As técnicas de extração e/ou pré-concentração permitem que a análise dos componentes de interesse se torne possível. A meta final é a obtenção de uma subfração da amostra original enriquecida com as substâncias de interesse analítico, de forma que se obtenha uma separação cromatográfica livre de interferentes, com detecção adequada e um tempo razoável de análise. As técnicas mais comumente utilizadas para extração e/ou pré-concentração de compostos presentes em fluidos biológicos são: extração líquido-líquido (ELL), extração em fase sólida, extração com fluido supercrítico e extração com membranas sólidas (diálise e ultrafiltração) ou líquidas. Após a extração, a amostra é introduzida no sistema cromatográfico por meio de um injetor, como qualquer outra amostra. Hoje em dia, muitos equipamentos para extrações múltiplas são disponíveis comercialmente. Alguns deles fazem o processo de extração automaticamente, com a transferência da amostra para o injetor cromatográfico de modo manual (sistema semiautomático), enquanto outros, além de extração automatizada, são também capazes de transferir a amostra ao sistema cromatográfico (sistema completamente automático) (Queiroz et al, 2001).

Visto o presente trabalho utilizar-se de extração em fase líquida, apresenta-se a seguir uma breve abordagem sobre a técnica, de forma a facilitar a sua compreensão.

A ELL baseia-se na extração direta do material biológico com um solvente imiscível na água, possibilitando o isolamento do fármaco pela partição entre a fase orgânica e o meio aquoso. O coeficiente de partição é estabelecido entre as duas fases e é influenciado pela escolha do solvente extrator, pelo pH da fase aquosa e pela proporção do volume das fases, aquosa e orgânica. A condição inicial do processo de extração é que o fármaco seja preferencialmente distribuído na fase orgânica (Toxicologia Analítica, 2008). Para alguns sistemas, o valor da constante de distribuição, K_d , entre as fases pode ser aumentado pelo ajuste do pH, para prevenir a ionização de ácidos ou bases, pela formação de par iônico com solutos ionizáveis, pela formação de complexos lipofílicos com íons metálicos ou pela adição de sais neutros, para diminuir a solubilidade de compostos orgânicos na fase aquosa. (Queiroz et al, 2001).

A maior vantagem da ELL é a seletividade, e, dependendo da escolha do solvente, do fármaco de interesse, do composto inalterado, pode ser mais bem extraído que os componentes endógenos e seus metabólitos. Se um fármaco é extensivamente metabolizado e seus metabólitos têm o mesmo cromóforo, esses apresentam um grande potencial de interferência em um ensaio espectrofotométrico; porém se o fármaco for seletivamente removido no processo de extração, por meio de um solvente lipofílico, seus metabólitos serão seletivamente excluídos, quando não se tem interesse da detecção dos metabólitos. Alternativamente, se, além do fármaco inalterado, necessitamos também da identificação e quantificação dos metabólitos, a escolha do solvente extrator será o de caráter menos apolar, em que a determinação do fármaco inalterado e de seu metabólito de interesse seria realizada com bom grau de eficiência (Toxicologia Analítica, 2008). A ELL apresenta ainda as vantagens de ser simples e utilizar um número grande de solventes, puros e disponíveis comercialmente, os quais fornecem uma ampla faixa de solubilidade e seletividade. Além disso, as proteínas presentes nas amostras são desnaturadas, eliminando a contaminação da coluna cromatográfica (Queiroz et al, 2001).

Por outro lado, esta técnica possui uma série de desvantagens, tais como: as amostras com alta afinidade pela água são parcialmente extraídas pelo solvente orgânico, resultando em perda do analito; impurezas do solvente são concentradas junto com a amostra, implicando no uso de solventes ultrapuros; pode ocorrer a formação de emulsões, o que resulta em grande consumo de tempo; volumes relativamente grandes de amostras e de solventes são requeridos, gerando problemas de descartes; alguns solventes orgânicos são tóxicos; pode ocorrer adsorção dos analitos na vidraria; decomposição de compostos instáveis termicamente, na etapa de pré-concentração; o processo é suscetível a erros e, relativamente, de difícil automação. Apesar destas desvantagens, a ELL é considerada uma técnica clássica de preparação de amostra e tem sido ainda muito utilizada em análises de diversos tipos de substâncias presentes em fluidos biológicos, pois extratos bastante limpos podem ser obtidos com alta seletividade para alguns analitos (Queiroz et al, 2001).

A aplicação da cromatografia líquida de alta performance (HPLC) para quantificação de antidepressivos foi relatada inicialmente em 1975. As vantagens da HPLC para a análise de antidepressivos são sua versatilidade e simplicidade de

preparação de amostras, assim como um amplo intervalo de linearidade nos detectores, fazendo da HPLC o método de escolha para a monitorização terapêutica de fármacos. A determinação de um ou mais fármacos dessa classe tem sido descrita usando HPLC com detector de fluorescência em UV. Em razão de as drogas antidepressivas tricíclicas diferirem largamente em sua estrutura química, métodos analíticos para sua determinação quantitativa em matrizes biológicas têm sido desenvolvidos para cada droga individualmente. Outros métodos foram relatados permitindo a determinação simultânea de drogas antidepressivas tricíclicas e não-tricíclicas. Mais recentemente métodos de triagem ou quantificação de antidepressivos têm sido descritos, mas muitos desses métodos usam métodos de extração de fase sólida ou detecção UV por arranjo de fotodiodos ou cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (LC/MS) com ionização por spray de elétrons ou LC-MS (MS). Esses métodos fornecem uma alta seletividade e sensibilidade em combinação com uma boa precisão e exatidão em amplos intervalos de detecção, permitindo o desenvolvimento de métodos de análise muito rápidos e eficientes. Por isso, esses ensaios podem ser caros e não largamente empregados. A tendência recente em monitorização terapêutica procura desenvolver métodos de análise rápidos, simples, precisos, exatos e de baixo custo para a determinação de vários fármacos simultaneamente. (Malfará et al, 2007).

A monitorização terapêutica no campo de drogas psicotrópicas começou com antidepressivos tricíclicos na década de 1960. Embora haja provas suficientes para os benefícios da monitorização na otimização da terapia antidepressiva, sua utilização durante as prescrições dos fármacos está longe de ser rotineira. Na prática clínica, o esforço para determinar a melhor dose individual da droga antidepressiva ainda é muitas vezes realizado por tentativas e erros entre acréscimos ou reduções de doses padrões (Neto, 2011).

O objetivo principal da monitorização terapêutica é minimizar as diferenças inter e intraindividuais nos níveis plasmáticos dos fármacos (Brosen, 1996). Se realizada apropriadamente, a monitorização terapêutica permite a manutenção de concentrações seguras e eficazes dentro da faixa ou janela terapêutica. Entretanto, os resultados laboratoriais devem ser sempre interpretados em relação ao estado clínico do paciente (Toxicologia Analítica, 2008).

São diversificadas as indicações para a aplicação da monitorização terapêutica, incluindo: início de tratamento, alterações de dose, ocorrência de efeitos adversos indesejáveis, ausência de efeito terapêutico, controle da *compliance*, interações farmacocinéticas, programas de farmacovigilância, tratamentos combinados (polimedicação), particularidades genéticas envolvidas no metabolismo dos fármacos, tratamentos profiláticos, populações especiais, como as crianças e idosos e psiquiatria forense. Entre as diversas classes de antidepressivos, o uso da monitorização terapêutica tem sido estabelecido de forma particularmente bem sucedida para os tricíclicos, uma vez que respondem aos requisitos necessários para que seja exequível a sua monitorização: índice terapêutico estreito e relações de concentração plasmática-resposta terapêutica previamente determinadas.. No entanto, na realidade, as concentrações plasmáticas ótimas podem diferir amplamente dos intervalos estabelecidos, dependendo das características clínicas de cada doente. É por isso necessário que haja a contextualização da situação para se optar de forma consciente por uma estratégia terapêutica adequada. Ao contrário dos TCA, inicialmente, os ISRSs não se encaixariam no perfil de fármacos que requerem monitorização para a sua utilização segura e eficaz. Isso se deve, principalmente, à sua ampla janela terapêutica e à sua apresentação gráfica dose-resposta antidepressiva que atinge, a partir de uma certa concentração, um *plateau*, querendo com isto dizer que o aumento das doses não é acompanhado com o aumento da resposta. No entanto, nos tratamentos em que não haja resposta, a monitorização terapêutica pode ajudar a determinar se o doente está desenvolvendo níveis plasmáticos do fármaco substancialmente menores do que o esperado, de forma a tentar um aumento da dose antes de concluir que o doente não responde ao ISRS em questão. Assim sendo, tem-se verificado que a utilidade da monitorização para avaliar a *compliance* do uso de ISRS pode ser uma aplicação favorável. Apesar do índice terapêutico alargado que caracteriza muitos dos antidepressivos recentemente introduzidos no mercado, as aplicações potenciais da monitorização à farmacoterapia antidepressiva são significativas (Neto, 2011).

1.5. Revisão Bibliográfica

Vários métodos encontram-se disponíveis para a determinação de duloxetine em amostras biológicas, dentre os quais, os por cromatografia líquida de

alta eficiência e detecção espectrofotométrica UV (HPLC-UV), cromatografia líquida com espectrômetro de massa acoplado (LC-MS), cromatografia líquida e espectrômetro de massa em tandem, (LC-MS-MS), cromatografia gasosa com detecção de nitrogênio e fósforo (GC-NPD) e os por cromatografia gasosa e espectrômetro de massa (GC-MS) (Selvan et al, 2007).

Com o intuito de desenvolver estudo aplicado a análise farmacocinética de formulação contendo duloxetina, Selvan et al (2007) propuseram metodologia empregando cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massa em tandem, triplo-quadrupolo, ionização a pressão atmosférica (LC-API-MS-MS), extração por metanol e separação por coluna C18, método que se mostrou rápido, sensível e preciso para detecção do fármaco em plasma humano.

Visando à monitorização terapêutica e utilizando-se de cromatografia líquida de alta eficiência e detecção UV, Malfará et al (2007) desenvolveram método de detecção simultânea de dez antidepressivos, frequentemente prescritos, tricíclicos e não-tricíclicos, entre os quais a duloxetina, com extração líquido-líquido, coluna de fase reversa e condições isocráticas de eluição.

Mercolini et al (2007) trabalhando somente com duloxetina, propuseram metodologia para análise do fármaco em plasma humano, por HPLC, em coluna C8 de fase reversa, detector espectrofotométrico UV e extração por fase sólida (SPE) com cartucho de troca iônica. A extração empregada mostrou-se superior aos procedimentos de extração líquido-líquido, por necessitar de menores volumes de solventes orgânicos e serem mais rápidos. O método também exibiu alta precisão e amplo intervalo de linearidade, condição que permitiu a determinação do analito não só em doses terapêuticas, mas também em casos de overdose e quando administrado em doses subterapêuticas.

Outros trabalhos buscaram desenvolvimento e validação de metodologias analíticas que incluíssem, além do fármaco, o seu principal metabólito ativo, como o método desenvolvido por Choong et al (2009), conduzido por HPLC-MS e extração de fase sólida.

Com a finalidade de desenvolver e validar metodologia para monitorização terapêutica em pacientes idosos, submetidos a tratamento com antidepressivos não-tricíclicos, entre os quais a duloxetina, por meio de cromatografia líquida e detecção espectrofotométrica UV, seguiram-se três trabalhos

que se destacaram em razão dos métodos de extração propostos: Melo et al (2009) utilizaram-se de extração por sorção *stir bar* (SBSE/LC-UV), na qual uma barra de agitação recoberta com o polímero polidimetilsiloxano (PDMS) funcionou como fase sólida; Silva et al (2008) utilizaram-se de uma coluna capilar aberta de sílica fundida para micro-extração de fase sólida (*in-tube* SPME/LC-UV); e Chaves et al (2009) também se utilizaram de micro-extração de fase sólida, no entanto, por meio de um revestimento do polímero polipirrol (SPME-PPY/LC), o qual se mostrou adequado para extração de compostos ionizáveis.

Mais recentemente Kaza et al (2014) desenvolveu e validou metodologia para determinar e quantificar duloxetina em plasma humano, por meio de extração líquido-líquido e HPLC-UV, com seletividade suficiente para minimizar a interferência com o maior metabólito da duloxetina, a 4-OH-D-Gluc, seguindo novas regras impostas pela Agência Europeia de Medicamentos – EMA.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é desenvolver e validar uma metodologia analítica utilizando-se de cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação em plasma de duloxetina e outros antidepressivos, simultaneamente, para posteriormente ser aplicada na monitorização de pacientes depressivos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Caracterização do Local de Estudo

O projeto foi realizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP) e nas dependências do Laboratório de Análises Toxicológicas.

O Laboratório de Análises Toxicológicas possuiu a infraestrutura necessária para o desenvolvimento de todas as etapas do projeto, bem como atendeu eventuais problemas decorrentes da execução do estudo.

3.2 Obtenção do *pool* de plasma

Para a otimização da metodologia analítica foi utilizado *pool* de plasma de voluntários sadios, que quiseram participar do estudo de forma espontânea, de ambos os sexos, livres de duloxetina ou dos outros antidepressivos utilizados no presente estudo, cujo critério de inclusão foi: a) ter idade compreendida entre 18 e 50 anos; b) ser sadio; c) não fazer uso dos fármacos e d) não faça parte de grupos vulneráveis.

O número de voluntários participantes do projeto, necessário para a obtenção do volume certo de plasma para o estudo, foi de 30 (n = 30).

Com esse objetivo, fez-se o recrutamento de voluntários que preenchessem os critérios de inclusão, os quais somente doaram o plasma após leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) – conforme documento constante no Apêndice desta Dissertação, com os esclarecimentos de dúvidas que porventura tenham tido.

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

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

O presente projeto de pesquisa foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em pesquisa da FCFRP/USP apresentando como termo de consentimento livre e esclarecido de acordo com o protocolo CEP/FCFRP nº 287 – conforme documento constante no Anexo desta Dissertação.

3.3 Análise crítica dos riscos e benefícios

O estudo apresentou prejuízo mínimo aos voluntários em função da coleta do plasma, porquanto, ainda o procedimento seja invasivo, é considerado de baixo risco quando realizado em condições adequadas.

Quanto aos benefícios, futuramente a metodologia poderá ser empregada para indicar ajuste de dosagem em monitorização terapêutica, mudança

de tratamento ou ensaios farmacocinéticos; entretanto, o presente estudo não trouxe benefícios imediatos ao voluntário doador.

3.4 Metodologia analítica

Padronização e validação de método simultâneo para análise em plasma humano de duloxetine e outros antidepressivos por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta (HPLC-UV).

3.4.1 Padrões e reagentes

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

3.4.2 Sistema cromatográfico

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

3.4.3 Preparo das amostras

3.4.3.1 Solução padrão

As soluções estoques de cada antidepressivo foram preparadas dissolvendo quantidade rigorosamente pesada de cada composto de referência em metanol para se obter uma concentração de 1mg/mL de cada fármaco.

3.4.3.2 Solução de padrão interno

A solução estoque de 1mg/mL de etidocaína, padrão interno em metanol, foi diluída a 1/50 para se obter a concentração de 20µg/mL (solução de trabalho). A solução foi estocada a -20° C em tubos de vidro, protegidos da luz.

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

3.4.4 Extração das amostras

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

Foram também testadas extrações utilizando como solvente de extração o diclorometano e hexano:etanol (90:10, v/v), porém esses solventes não possibilitaram porcentagem de recuperação satisfatória.

3.4.5 Curva de calibração

As curvas de calibração foram preparadas diariamente pela adição de 25µL de cada solução padrão nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,4; 2,0; 4,0; 8,0; 20,0; 40,0µg/mL de metanol a 1mL de plasma branco (plasma de pacientes não tratados

com medicamentos por no mínimo 2 meses), correspondendo no plasma às concentrações de 2,5; 5,0; 10,0; 50,0; 100,0; 200,0; 500,0 e 1000,00ng/mL. As curvas de calibração foram processadas como descrito na preparação de amostras.

3.5 Validação da Metodologia Analítica

A validação é o processo por meio do qual se executa um conjunto de experimentos capazes de indicar a eficácia e confiabilidade de um método analítico. A finalidade da validação é estabelecer a evidência objetiva de que um método é capaz de realizar com sucesso seu uso pretendido e identificar as limitações do método sob condições normais de operação (SWGTOX, 2013).

A metodologia apresentada no presente estudo será validada de acordo com as especificações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, contidas na Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012.

3.5.1 Curva de Calibração

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

Isto é conseguido, determinando-se primeiro o intervalo de concentrações do analito com o qual vai se trabalhar no método, também chamado de faixa de trabalho. Dentro deste intervalo, haverá uma correlação entre o sinal resposta (por exemplo, a relação da área do pico do analito e a do padrão interno) e a concentração do analito na amostra. O modelo de calibração é o modelo matemático que descreve esta correlação. A escolha de um modelo apropriado (isto é, linear ou quadrático) é necessária para precisão e confiança dos resultados quantitativos obtidos (SWGTOX, 2013).

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

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação. A linearidade do método pode ser

determinada a partir da relação matemática entre o sinal medido e a concentração ou massa do analito, geralmente obtida por uma equação de reta $y = ax + b$, chamada de curva analítica. Os coeficientes a e b da curva analítica podem ser estimados a partir de um conjunto de medições experimentais usando o método matemático conhecido como regressão linear. Além destes, calcula-se o coeficiente de correlação r ou o coeficiente de determinação r^2 , que são parâmetros que permitem uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximos de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (Aragão et al, 2009).

3.5.2 Precisão

Precisão é a medida do grau de concordância entre uma série de medições obtidas a partir de várias alíquotas de uma mesma amostra homogênea (SWGTOX, 2013).

A precisão do método analítico avalia a proximidade dos resultados de análises independentes, quando o procedimento é aplicado diversas vezes numa mesma amostra homogênea, sob condições definidas (Esteban et al, 2007).

A precisão deve ser determinada em uma mesma corrida (precisão intracorrída) e em, no mínimo, 3 (três) corridas diferentes (precisão intercorridas), sendo que o ensaio de precisão intercorridas deve abranger corridas em dias distintos (ANVISA, 2012).

A precisão deve ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), 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 a seguir:

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

(ANVISA, 2012).

3.5.3 Exatidão

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

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

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

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

(ANVISA 2012)

3.5.4 Seletividade

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

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

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

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

3.5.5 Efeito residual

A análise de uma nova amostra pode ser comprometida para um resultado qualitativo ou quantitativo impreciso quando métodos instrumentais retenham analitos residuais (SWGTOX, 2013).

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

3.5.6 Efeito matriz

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

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

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

(ANVISA, 2012).

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

3.5.7 Estabilidade

Ocorrem geralmente circunstâncias em que as amostras que sofreram preparação de rotina não podem ser imediatamente analisadas. Nesses casos, é importante avaliar a extensão de tempo que uma amostra processada pode ser mantida antes de ser submetido a alterações inaceitáveis, impedindo a detecção confiável do analito, a identificação ou sua quantificação. (SWGTOX, 2013).

As condições de realização dos estudos de estabilidade devem reproduzir as condições de armazenamento, preparo e análise das amostras em estudo (ANVISA, 2012).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Padronização do método analítico de extração líquido-líquido

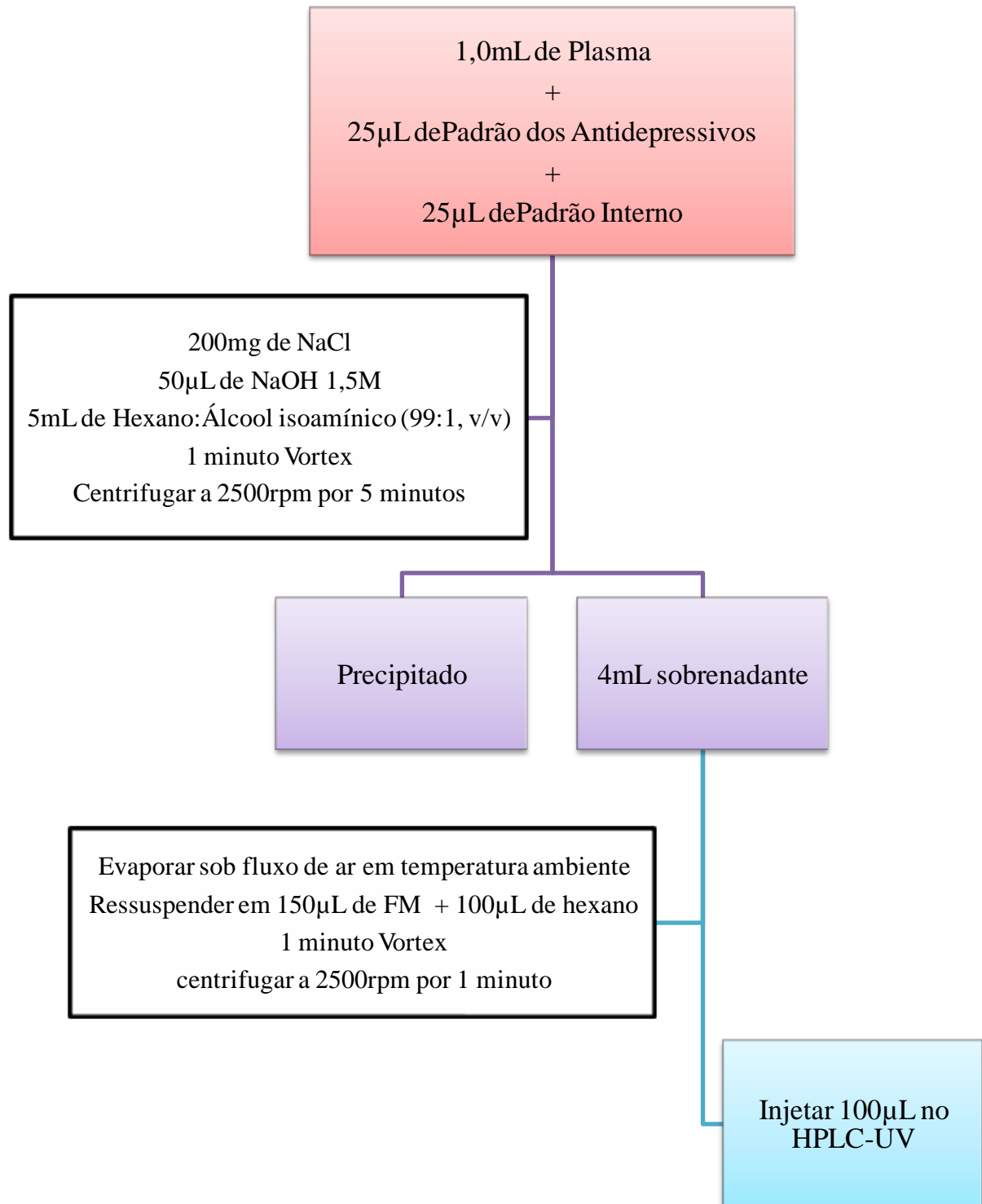
Na extração líquido-líquido, o pH da amostra é considerado um fator determinante na etapa de otimização, uma vez que, para se obter uma extração eficiente, o fármaco de interesse deve estar na forma não ionizada, permitindo assim sua partição para o solvente orgânico (HUTTUNEM et al, 2009), sendo necessário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

A extração líquido:líquido foi utilizada devido a sua alta eficiência, seletividade e simplicidade. Apesar das diferenças na estrutura química entre os compostos, as recuperações das extrações foram satisfatórias. A polaridade do solvente de extração, ou seja, a proporção de álcool isoamílico na mistura com hexano, mostrou ser a variável mais importante, que influenciou a extração. Preferimos a mistura hexano:álcool isoamílico (99:1 v/v), pois garantiu recuperações e limites de quantificação muito bons.

A análise por HPLC necessariamente envolve um ou mais passos de preparação da amostra biológica. O processo de extração líquido-líquido dos padrões dos antidepressivos e do padrão interno etidocaína consistiu da adição de

25 μ L de padrão do antidepressivo, 25 μ L de etidocaína (padrão interno), 200mg de NaCl, 50 μ L de NaOH 1,5M e 5mL de hexano:álcool isoamílico (99:1, v/v) em 1mL de plasma, em tubo de extração com rolha esmerilhada. Em seguida, cada tubo foi agitado em vórtex por 1 minuto, centrifugado a 2500rpm por 5 minutos, e 4mL da fase orgânica (superior) foi transferida para tubo cônico e evaporada sob fluxo de ar. O resíduo foi reconstituído com 150 μ L da fase móvel e 100 μ L de hexano, agitado por 1 minuto em vórtex, centrifugada por 1 minuto a 2500rpm e 100 μ L da fase móvel foi injetada no sistema HPLC e cromatografada. A figura 2 descreve o procedimento de extração e análise cromatográfica utilizados. Este é um procedimento simples para a purificação de amostras biológicas, que é mais facilmente reproduzível por vários pesquisadores no laboratório.

Figura 2 – Procedimento de extração e análise cromatográfica dos padrões de antidepressivos em plasma por HPLC-UV.



4.2 Análise dos antidepressivos em plasma humano por HPLC-UV

O procedimento deu origem a uma excelente separação e a picos simétricos para cada antidepressivo. Cromatogramas representativos de plasma branco e de plasma enriquecida com 200ng/mL de cada fármaco antidepressivo são apresentados nas figuras 3 e 4, respectivamente. Sob as condições cromatográficas descritas, os tempos de retenção foram de 3,116 (moclobemida), 5,059 (venlafaxina), 6,379 (padrão interno etidocaína), 9,601 (citalopram), 14,042 (agomelatina), 17,305 (duloxetina), 19,210 (amitriptilina) e 25,045 (sertralina). A eluição completa foi obtida em menos de 30 min. A figura 5 mostra a estrutura química dos antidepressivos citados.

Figura 3. Cromatograma obtido do branco (sem padrão interno).

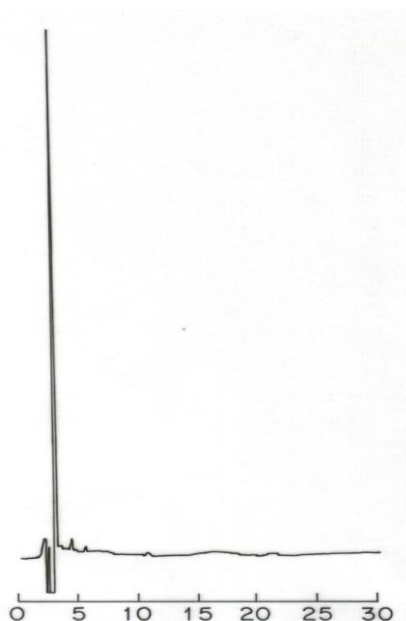


Figura 4. Cromatograma obtido do plasma adicionado de 200ng/mL (1) moclobemida, (2) venlafaxina, (3) etidocaína (padrão interno), (4) citalopram, (5) agomelatina, (6) duloxetina, (7) amitriptilina e (8) sertralina.

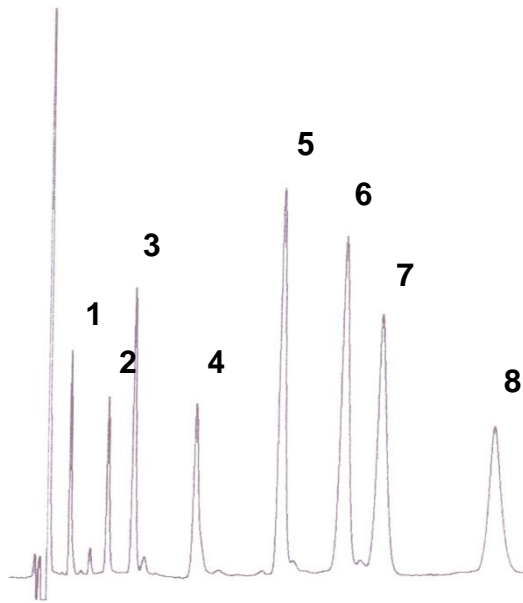
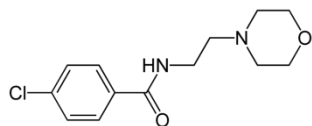
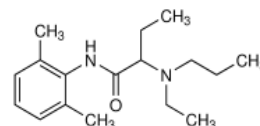


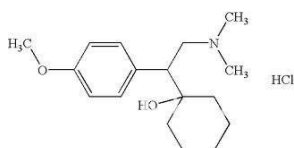
Figura 5. Estrutura química dos antidepressivos e do padrão interno.



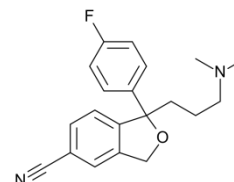
moclobemida



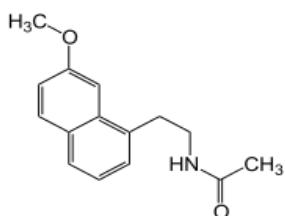
etidocaína (padrão interno)



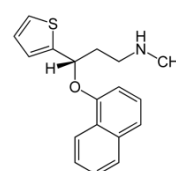
venlafaxina



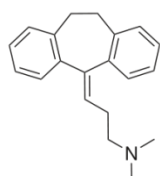
citalopram



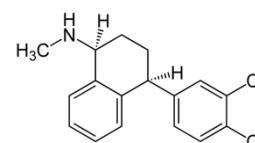
agomelatina



duloxetina



amitriptilina



sertralina

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

otimização das condições de separação, o método passou para as próximas etapas da validação.

4.3 Padronização e validação da metodologia empregada

Sendo a validação analítica de importância fundamental para as análises de plasma humano contendo antidepressivos, por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), realizamos a padronização e validação da presente metodologia.

4.3.1 Curva de calibração referente à metodologia empregada

A linearidade foi obtida através da análise de amostras de plasma em branco, contendo soluções padrões das drogas em concentrações de 2,5-1000ng/mL. O intervalo de concentração foi estimada com base na curva de regressão ($y = ax + b$) e no coeficiente de correlação (r^2).

As curvas de calibração foram lineares na faixa de 2,5-1000ng/ml para os fármacos, com coeficiente de correlação (r^2) > 0,998.

Tabela 1 - Linearidades, equações da reta e coeficientes de correlação obtidos para os fármacos estudados pela metodologia empregada.

Fármacos	Faixa de Concentração (ng/mL)	Equação da Curva Analítica	Coefficiente de Correlação (r^2)
Moclobemida	2,5-1000ng/mL	$y=0,06057x+0,00335$	0,999
Venlafaxina	5-2000ng/mL	$y=0,03942x+0,00092$	0,999
Citalopram	5-2000ng/mL	$y=0,00764x+0,00283$	0,999
Agomelatina	5-2000ng/mL	$y=0,03189x+0,00109$	0,999
Duloxetina	5-2000ng/mL	$y= 0,2774x+0,00233$	0,998
Amitriptilina	5-2000ng/mL	$y= 0,105x+0,00148$	0,999
Sertralina	10-2000ng/mL	$y= 0,0187x+0,00078$	0,999

4.3.2 Limite inferior de quantificação (LIQ) referente à metodologia empregada

O limite de quantificação foi determinado pela análise de amostras de plasma branco enriquecido com concentrações decrescentes de todas as solução padrões dos antidepressivos. O limite de quantificação foi considerado a menor concentração quantificada com um coeficiente de variação menor de 10%, obtido para 5 determinações.

Tabela 2 - Limites inferiores de quantificação obtidos para os fármacos estudados pela metodologia empregada.

Fármacos	Limite de Quantificação (ng/mL)
Moclobemida	2,5
Venlafaxina	5
Citalopram	5
Agomelatina	5
Duloxetina	5
Amitriptilina	5
Sertralina	10

4.3.3 Precisão e exatidão intra e interensaio à metodologia empregada

Para determinar a precisão intraensaio, alíquotas (n = 10) de plasma branco contendo a solução de padrões das drogas em três concentrações foram analisadas pelo método proposto. Para determinar a precisão interensaio, o plasma em branco contendo a solução de padrões com as mesmas concentrações foram analisados em três dias.

Os coeficientes de variação interensaio (CV) para os antidepressivos foram inferiores a 8,5%, e os CV intraensaios foram inferiores a 8,6%. Os erros padrão relativos (EPR) para os fármacos foram inferiores a 9,5%.

Tabela 3 - Precisão intra e interensaio e exatidão obtidos para os fármacos estudados pela metodologia empregada.

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

4.3.4 Recuperação referente à metodologia empregada

A avaliação de recuperação do antidepressivo foi determinada em três diferentes concentrações no plasma branco. As amostras de plasma com o padrão de duloxetina e dos demais fármacos foram extraídas em triplicata de acordo com o procedimento proposto. E as concentrações dessas amostras, depois de calculadas, foram comparadas com base em curva de calibração construída a partir dos dados para os fármacos não submetidos ao procedimento de extração.

Tabela 4 - Recuperações obtidas para os fármacos estudados pela metodologia empregada.

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

4.3.5 Seletividade referente à metodologia empregada

As amostras contaminadas com os fármacos abaixo tabelados não mostraram picos interferentes no tempo de retenção dos fármacos utilizados no presente estudo.

Tabela 5 - Seletividade para a metodologia empregada.

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

4.3.6 Efeito Matriz referente à metodologia empregada

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

4.3.7 Efeito Residual referente à metodologia empregada

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

4.3.8 Ensaio de estabilidade referentes à metodologia empregada

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

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

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

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

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

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

5. CONCLUSÃO

O método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência descrito permite a detecção e quantificação do antidepressivo duloxetina em plasma, simultânea a outros antidepressivos utilizados no presente estudo. O método mostrou-se seguro, robusto e eficiente, com bom limite de quantificação e boa seletividade, além de rápido, e com custo que possibilita sua viabilidade para o monitoramento de rotina terapêutica.

O método foi validado de acordo com os parâmetros normatizados pela ANVISA, em sua Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012, para a determinação de métodos bioanalíticos.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, C. C. et al. Drogas Antidepressivas. **Acta Médica Portuguesa**, v. 24, n. 1, 2011.
- ANVISA. **Resolução RDC nº 27**, Brasil, 2012. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027_17_05_2012.html. Acessado em: 28 out. 2012
- ARAGÃO, N. M.; VELOSO, M. C. C.; ANDRADE, J. B. Validação de métodos cromatográficos de análise - um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da "Química Verde" na determinação de metilxantinas em bebidas. **Química Nova**, v. 32, n. 9, 2009.
- BAHLS, S. Depressão: Uma Breve Revisão dos Fundamentos Biológicos e Cognitivos. **Interação**, Curitiba, v. 3, 1999.
- BALL, S. G. et al. Efficacy and safety of duloxetine 60 mg once daily in major depressive disorder: a review with expert commentary. **The Journal of Interventions in Clinical Practice**, internet.
- BELLINGHAM, G. A.; PENG, P. W. Duloxetine: a review of its pharmacology and use in chronic pain management. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**, v. 35, n. 3, 2010.
- BOLETIM BRASILEIRO DE AVALIAÇÃO DE TECNOLOGIAS EM SAÚDE – BRATS. Antidepressivos **no Transtorno Depressivo Maior em Adultos**, n. 18, 2012. Disponível em: < <http://200.214.130.94/rebrats/publicacoes/Brats18.pdf> >. Acessado em 4 jun. 2014.
- BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. 12. ed. São Paulo: McGraw Hill, 2012, p. 397-416.
- CANALE, A.; FURLAN, M. M. D. P. Depressão. Monografia apresentada a Universidade Estadual de Maringá para o curso de especialização em Biologia: Bases Morfológicas e Fisiológicas da Integração do Organismo com o Meio Ambiente. **Arq Mudi**, v. 10, n. 2, 2006.
- CERQUEIRA, M. B. R. et al. Validação de Método para Determinação de Ácidos Orgânicos Voláteis em Efluentes de Reatores Anaeróbios Empregando Cromatografia Líquida. **Química Nova**, v. 34, n. 1, 2011.
- CHAVES, A. R.; CHIERICATO, J. R. G.; QUEIROZ, M. A. C. Solid-phase microextraction using poly(pyrrole) film and liquid chromatography with UV detection for analysis of antidepressants in plasma samples. **Journal of Chromatography B**, v. 877, 2009.

CHOONG, E. et al. Therapeutic drug monitoring of seven psychotropic drugs and four metabolites in human plasma by HPLC-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, n. 50, 2009.

CID-10 Classificação internacional das doenças e problemas relacionados à saúde. São Paulo: EDUSP, 1997.

DELL'OSSO, B. et al. Duloxetine in Affective Disorders: a Naturalistic Study on Psychiatric and Medical Comorbidity, Use in Association and Tolerability Across Different Age Groups. **Clinical Practice & Epidemiology in Mental Health**, v. 8, 2012.

DSM-V Dicionário de Saúde Mental. 5. ed. American Psychiatric Publishing, 2013.

ESTEBAN, C.; RODRIGUES, C. A.; NASCIMENTO, E. S. Determinação de tetraciclina em líquido sinovial de vacas com doença podal. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, 2007.

GARTLEHNER, G. et al. Second-Generation Antidepressants in the Pharmacologic Treatment of Adult Depression: An Update of the 2007 Comparative Effectiveness Review, 2011, n. 46. Disponível em: < http://effectivehealthcare.ahrq.gov/ehc/products/210/862/CER46_Antidepressants-Update_execsumm.pdf>. Acessado em: 4 nov. 2013.

GRAEFF, F. G.; BRANDÃO, M. L. **Neurobiologia das doenças mentais.** São Paulo Lemos Editorial, 1993.

HÄRMARK, L. et al. Intensive monitoring of duloxetine: results of a web-intensive monitoring study. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 69, 2013.

HUTTUNEM, K. M. et al. Determination of metformin and its prodrugs in human and rat blood by hydrophilic interaction liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 50, 2009.

KAPLAN, H. I. et al. **Synopsis of Psychiatry.** 7 ed. Baltimore: Williams e Wilkins, 1994.

KAZA, M. et al. Determination of duloxetine in human plasma with proven lack of influence of the major metabolite 4-hydroxyduloxetine. **Clinical Biochemistry**, 2014, Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009912014002872>>. Acessado em: 6 jul. 2014.

LAFER, B.; VALLADA FILHO, H. P. Genética e fisiopatologia dos transtornos depressivos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, São Paulo, v. 21, s. 1, 1999.

LEONARD, B. E. The role of noradrenaline in depression: a review. **Journal of Psychophatology**, v. 11, n. 4, 1997.

MALFARÁ, R. W. et al. Reliable HPLC method for therapeutic drug monitoring of frequently prescribed tricyclic and nontricyclic antidepressants. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, 2007.

MELO, L. P. et al. Polydimethylsiloxane/polypyrrole stir bar sorptive extraction and liquid chromatography (SBSE/LC-UV) analysis of antidepressants in plasma samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 633, 2009.

MERCOLINI, L. et al. HPLC analysis of the novel antidepressant duloxetine in human plasma after an original solid-phase extraction procedure. **Journal of Chromatography B**, v. 856, 2007.

MOLINA, M. R. A. L. et al. Prevalência de depressão em usuários de unidades de atenção primária. **Revista de Psiquiatria Clínica**, São Paulo, v. 39, n. 6, 2012.

MOREAU, R. L. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B. **Toxicologia Analítica**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, p. 142-145.

NETO, A. I. A. **Determinação de antidepressivos em plasma humano por cromatografia líquida de rápida resolução acoplada a um detector de fotodiodos (UPLC-DAD)**. Dissertação de mestrado apresentado à Universidade da Beira Interior ao programa de pós-graduação em Ciências da Saúde. Covilhã, 2011. Disponível em: < https://ubithesis.ubi.pt/bitstream/10400.6/978/1/TESE%20FINAL_Ana%20Neto.pdf >. Acessado em: 5 mai. 2013.

PARCIAS, S. et al. Validação da versão em português do Inventário de Depressão Maior. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 60, n. 3, 2011.

PARKER, G.; BROTHIE, H. Major depression invites major concerns. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 31, s. I, 2009.

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

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007, p. 560-561.

RIBANI, M. B. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, 2004.

SANTANA, A. K. M. et al. Otimização e validação do método analítico volumétrico para a quantificação do carbonato de cálcio. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v. 28, n. 2, 2007.

SCHACHT, A. et al. Depression symptom clusters and their predictive value for treatment outcomes: Results from an individual patient data meta-analysis of duloxetine trials. **Journal of Psychiatric Research**, v. 53, 2014.

SCIENTIFIC WORKING GROUP FOR FORENSIC TOXICOLOGY (SWGTOX). **Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology**, 2013.

Disponível em: < <http://www.swgtox.org/documents/Validation3.pdf>>. Acesso em: 27 jul. 2013.

SELVAN, P. S. et al. Determination of duloxetine in human plasma by liquid chromatography with atmospheric pressure ionization-tandem mass spectrometry and its application to pharmacokinetic study. **Journal of Chromatography B**, v. 858, 2007.

SILVA, B. J. G.; LANÇAS, F. M.; COSTA QUEIROZ, M. E. In-tube solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography (in-tube SPME/LC) analysis of nontricyclic antidepressants in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 862, 2008.

SILVA, J. A. et al. Desenvolvimento e validação de método analítico para a quantificação de diclofenaco de dietilamônio em pele humana por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 1, 2010.

SILVA, M. C. F. et al. Depressão: Pontos de Vista e Conhecimento de Enfermeiros da Rede Básica de Saúde. **Revista Latinoamericana de Enfermagem**, v. 11, n. 1, 2003.

SKLJAREVSKI, V. et al. Efficacy of Duloxetine in Patients with Chronic Pain Conditions. **Current Drug Therapy**, v. 6, 2011.

STAHL, S. M. **Psicofarmacologia: bases neurocientíficas e aplicações clínicas**. Rio de Janeiro: MEDSI, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Depression, a global crisis**, 2012. Disponível em: < http://wfmh.com/wp-content/uploads/2013/11/2012_wmhd_day_english.pdf>. Acesso em: 23 set. 2013.

APÊNDICE

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

**Laboratório de Toxicologia
FCFRP-USP**

NOME DO DOADOR/ IDADE:/.....
REGISTRO E/OU DOCUMENTO DE IDENTIFICAÇÃO:
TÍTULO DA PESQUISA: Desenvolvimento e Validação da Análise de Duloxetine em plasma por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:

- Profª. Drª. Regina Helena Costa Queiroz, Docente da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.
- William Kleber da Silva, Farmacêutico-Bioquímico, mestrando da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, sita na Avenida do Café, s/nº, e-mail: lilowikz@fcfrp.usp.br, telefone: (16) 3602-4259 e (16) 9135-5331

Fui informado que o Laboratório de Toxicologia do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP estuda o desenvolvimento e validação de método para análise do medicamento duloxetine em plasma humano, para futuramente poder ser utilizado, sob indicação médica, na monitorização de pacientes usuários da medicação, a fim de se obter os benefícios máximos do medicamento e minimizar os seus efeitos adversos (efeitos tóxicos).

Tomei conhecimento, em razão do estudo acima descrito, que o mencionado Laboratório está convidando pessoas para serem doadores de plasma e, por essa forma, contribuir para o desenvolvimento do projeto.

Declaro que me foi oferecida a oportunidade de fazer todas as perguntas que julguei necessárias para esclarecer minhas dúvidas. Estou ciente a respeito do procedimento, bem como sobre as condições básicas para a doação, quais sejam: o sangue será colhido a partir de uma punção no meu braço, em seringa descartável de 10mL. Na região de braço próxima ao local da coleta inicialmente será feita a limpeza e assepsia. Quando a pele estiver seca, a veia será fixada e meu braço será garroteado 5cm acima do local da coleta. A agulha será introduzida no interior da veia, pedindo-se, em seguida, que eu abra a mão, e o volume de 10mL será colhido. O garrote será então solto, a agulha retirada da veia e na região se fará compressão com algodão.

Foi a mim esclarecida sobre a possibilidade de a qualquer momento poder solicitar a retirada do material que por mim foi doado, ou de seus derivados, em razão de minha única e exclusiva vontade, ou em razão de fatos supervenientes a minha vontade.

Declaro que me foi tornado claro a garantia de sigilo de meus dados confidenciais ou que, de algum modo, possam provocar constrangimentos ou prejuízos a minha pessoa, bem como de que se tornará anônimo o material por mim doado.

Declaro ainda que me foram informados todos os cuidados que devo observar após a coleta do sangue, e que fui informado e orientado sobre as possíveis reações adversas.

Caso eu queira novamente contribuir com o objeto do estudo, ao doar meu plasma novamente, fui cientificado de que o intervalo e frequência de doações são: para homens intervalo de 2 meses, com frequência máxima de 4 doações anuais; para mulheres intervalo de 3 meses, com frequência máxima de 3 doações anuais.

Fui informado também, caso eu queira entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, o telefone para contato é: (016) 3602-4213 e o e-mail: cep@fcfrp.usp.br

Estou de acordo em doar o meu plasma desta doação para utilização em pesquisa, sabendo da importância dos estudos para a evolução dos tratamentos de várias doenças.

Ribeirão Preto,dede

William Kleber Silva
CPF nº 156.251.548/99

Profª. Drª. Regina Helena Costa Queiroz
CPF nº 037.077.888/06

Assinatura do Doador

ANEXO

Aprovação do Projeto de Pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP



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

Of. CEP/FCFRP nº. 0001/2013
kms

Ribeirão Preto, 8 de fevereiro de 2013.

Ao Pós-graduando

William Kleber da Silva

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Regina Helena Costa Queiroz
FCFRP/USP

Prezado Pós-graduando,

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP aprovou, em sua 111^a reunião ordinária realizada em 07.02.2013, o projeto de pesquisa intitulado "DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE ANÁLISE DE DULOXETINA EM PLASMA POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA", apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo **CEP/FCFRP nº. 287**.

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

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

Atenciosamente,

PROF^a. DR^a. MARIA REGINA TORQUETI
Coordenadora do CEP/FCFRP