



**IPG** Politécnico  
|da|Guarda  
Polytechnic  
of Guarda

# RELATÓRIO DE ESTÁGIO PROFISSIONAL I

Licenciatura em Farmácia

Cristiana Mara Almeida Lourenço

junho | 2013





**Escola Superior de Saúde**  
Instituto Politécnico da Guarda

---

# RELATÓRIO DE ESTÁGIO PROFISSIONAL II

CRISTIANA MARA ALMEIDA LOURENÇO

CURSO DE FARMÁCIA – 1º CICLO

junho | 2013



**Escola Superior de Saúde**  
Instituto Politécnico da Guarda

---

CURSO DE FARMÁCIA – 1º CICLO  
4º ANO / 2º SEMESTRE

# RELATÓRIO DE ESTÁGIO PROFISSIONAL II

## ESTÁGIO EM INVESTIGAÇÃO

CRISTIANA MARA ALMEIDA LOURENÇO  
SUPERVISOR: Dr.<sup>a</sup> EUGÉNIA GALLARDO  
ORIENTADOR: Prof. ANDRÉ ARAÚJO

junho | 2013

## ABREVIATURAS/SIGLAS

---

AIM – Autorização de Introdução no Mercado  
APLF – Associação Portuguesa de Licenciados em Farmácia  
CICS – Centro de Investigação em Ciências da Saúde  
CLZ – Clozapina  
CPZ – Clorpromazina  
CYA – Ciamemazina  
DGV – Direção Geral de Veterinária  
DOE – Desenho Experimental  
ECD – Captura Eletrónica  
FCS – Faculdade de Ciências da Saúde  
FDA – Food and Drug Administration  
FDI – Detetor de Ionização de Chama  
FRET – Transferência de Energia de Ressonância por Fluorescência  
GC/MS/MS – Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa de Triplo  
Quadrupolo  
HAL – Haloperidol  
HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência  
LC/MS/MS – Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa de Triplo  
Quadrupolo  
LLE – Extração Líquido-Líquido  
LVMP – Levomepromazina  
MEPS – Microextração em Seringa Empacotada  
MNSRM – Medicamento Não Sujeito a Receita Médica  
MRM – Monitorização de Múltiplas Reações  
MSTFA – N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida  
NPD – Detetor de Azoto-Fósforo  
OLZ – Olanzapina  
PCR – Reação de Polimerização em Cadeia  
PRZ – Promazina  
PTFE – Politetrafluoroetileno  
PTP – Protriptilina  
PTV – Vaporização com Temperatura Programada

QTP – Quetiapina

SIM – Monitorização Seletiva de Iões

SPE – Extração em Fase Sólida

SPME – Microextração em Fase Sólida

TCD – Condutividade Térmica

TF – Técnico de Farmácia

TMCS – Trimetilclorosilano

TMS – Trimetilsilil

UBI – Universidade da Beira Interior

## AGRADECIMENTOS

---

Ultrapassei mais uma etapa no meu percurso de aprendizagem, sendo que tal não teria sido possível sem a ajuda da equipa de profissionais que me acolheu no Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS) da Universidade da Beira Interior (UBI). Esta página é única e simplesmente para dedicar com agradecimentos a todos os profissionais com os quais me cruzei no meu percurso de aprendizagem e os quais se revelaram importantes para o meu desenvolvimento de forma autónoma. Agradeço, desde já, ao meu professor e orientador, Dr. André Araújo por me ter concedido a oportunidade de realizar estágio neste conceituado centro de investigação em saúde, pois foi uma enorme alegria trabalhar num laboratório dedicado à investigação, que tinha por base todo o tipo de cromatografia. Agradeço aos meus co-supervisores, Ivo Moreno e Beatriz Fonseca, pela forma como me orientaram no meu estágio e os conhecimentos que me foram transmitindo, assim como a transmissão de valores éticos e profissionalismo. Não podia deixar de agradecer também à minha supervisora, Dr<sup>a</sup> Eugenia Gallardo, por todo o apoio que me foi dando ao longo deste estágio e também pelo conforto e carinho com o qual me acolheu no seu grupo de investigadores. Agradeço a todos vós com um sentido obrigado por tudo, pois jamais esquecerei a forma como fui recebida e a acolhida por vós.

*«A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério. É essa emoção fundamental que está na raiz de toda a ciência e toda a arte.»*

Albert Einstein

## ÍNDICE DE EQUAÇÕES

---

Equação 1 – Fórmula para calcular o coeficiente de variação .....	23
Equação 2 – Fórmula para calcular a quantificação.....	24
Equação 3 – Fórmula para calcular o bias.....	24
Equação 4 – Fórmula para calcular uma concentração desconhecida através da equação da reta de calibração ( $y=mx+b$ ) .....	24
Equação 5 – Fórmula para calcular a recuperação .....	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

Figura 1 - Vista aérea do CICS da FCS [Fonte: Google Earth] .....	14
Figura 2 – Diagrama de um processo de cromatografia gasosa (Adaptado da referência [13])..	27
Figura 3 – Esquema representativo do funcionamento de um equipamento GC/MS/MS (Adaptado da referência [20]) .....	30
Figura 4 – Descrição básica do espectrómetro de massa (Adaptado da referência [23]).....	31
Figura 5 – Princípio de MS/MS (Adaptado da referência [24]).....	32
Figura 6 – Seringa de MEPS e representação esquemática da coluna de extração (Adaptado da referência [33]).....	35
Figura 7 – Etapas do processo de extração em MEPS (Adaptado da referência [29]).....	37

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

---

Gráfico 1 – Reta de calibração da cafeína.....	23
--	----

## ÍNDICE DE TABELAS

---

Tabela 1 – Preparação das soluções de trabalho .....	22
Tabela 2 – Registo das absorvâncias.....	22
Tabela 3 – Resultados das absorvâncias e cálculos úteis .....	23
Tabela 4 – Resultados da concentração para a solução incógnita .....	24
Tabela 5 – Detetores mais utilizados em GC <sup>[12]</sup> .....	29
Tabela 6 – Comparação entre as principais técnicas de extração <sup>[28]</sup> .....	33
Tabela 7 – Características das reações de derivatização <sup>[41]</sup> .....	40
Tabela 8 – Caracterização das propriedades químicas dos fármacos em estudo <sup>[43]</sup> .....	42
Tabela 9 – Parâmetros farmacocinéticos dos fármacos antipsicóticos em estudo <sup>[44]</sup> .....	43
Tabela 10 – Antipsicóticos em estudo e respetivos tempos de retenção e transições (transições quantitativas a sublinhado).....	47
Tabela 11 – Matriz do DOE .....	49
Tabela 12 – Áreas dos picos obtidos para cada composto .....	50
Tabela 13 – Resultados referentes às razões entre o padrão interno e os compostos.....	50
Tabela 14 – Resumo dos resultados obtidos nos gráficos dos efeitos principais .....	51
Tabela 15 – Resumo dos limites de deteção para os analitos em estudo .....	52
Tabela 16 – Resultados da recuperação da fase de extração .....	53



## ÍNDICE

---

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>2. PERFIL DO TÉCNICO DE FARMÁCIA .....</b>	<b>12</b>
<b>3. CENTRO DE INVESTIGAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE (CICS).....</b>	<b>14</b>
3.1 LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DO CICS .....	14
3.2 APRESENTAÇÃO DO CICS .....	14
3.3 INSTALAÇÕES.....	16
<b>3.3.1 Instalações destinadas aos animais .....</b>	<b>16</b>
<b>3.3.2 Laboratório de Cultura de Células .....</b>	<b>17</b>
<b>3.3.3 Laboratório de Microscopia de Fluorescência.....</b>	<b>17</b>
3.4 ÁREAS DE INVESTIGAÇÃO E MISSÃO DO CICS.....	20
3.5 HORÁRIO DE FUNCIONAMENTO.....	20
<b>4. TRABALHOS DESENVOLVIDOS NO CICS.....</b>	<b>21</b>
4.1 RETA DE CALIBRAÇÃO DA CAFEÍNA .....	21
4.2 PROGRAMAS UTILIZADOS NO PROCESSO DE GC.....	25
<b>5. CONCEITO DE CROMATOGRAFIA.....</b>	<b>26</b>
5.1 CROMATOGRAFIA GASOSA .....	26
5.2 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA NO MODO TANDEM (GC/MS/MS) .....	29
<b>6. TÉCNICAS DE PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS.....</b>	<b>33</b>
6.1 MICROEXTRAÇÃO EM SERINGA EMPACOTADA (MEPS) .....	34
<b>6.1.1 Mecanismo de extração .....</b>	<b>36</b>
<b>6.1.2 Etapas do processo de extração.....</b>	<b>36</b>
<b>7. PROCESSO DE DERIVATIZAÇÃO.....</b>	<b>39</b>
7.1 PRINCIPAIS REAÇÕES DE DERIVATIZAÇÃO .....	39
<b>8. DETERMINAÇÃO DE ANTIPSICÓTICOS EM MATRIZES AQUOSAS COM USO DE MEPS E GC/MS/MS .....</b>	<b>42</b>
8.1 FÁRMACOS SELECIONADOS PARA O ESTUDO.....	42
<b>8.1.1 Propriedades físico-químicas.....</b>	<b>42</b>
<b>8.1.2 Farmacocinética.....</b>	<b>43</b>
8.2. DETERMINAÇÃO DE ANTIPSICÓTICOS EM MATRIZES AQUOSAS .....	43
8.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	44
<b>8.3.1 Equipamentos .....</b>	<b>44</b>

<b>8.3.2 Reagentes</b> .....	<b>45</b>
<b>8.3.3 Preparação das Soluções</b> .....	<b>45</b>
<b>8.3.4 Sistema cromatográfico e condições cromatográficas</b> .....	<b>46</b>
<b>8.3.5 Procedimento de extração otimizado</b> .....	<b>46</b>
<b>8.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>47</b>
<b>8.4.1 Identificação dos compostos</b> .....	<b>47</b>
<b>8.4.2 Otimização do processo extrativo</b> .....	<b>48</b>
<b>8.4.3 Desenho experimental</b> .....	<b>48</b>
<b>8.4.4 Limites de detecção</b> .....	<b>51</b>
<b>8.4.5 Recuperação da fase de extração (Eficiência da extração)</b> .....	<b>52</b>
<b>9. CONCLUSÃO</b> .....	<b>54</b>
<b>10. BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>56</b>
<b>Anexo I</b> .....	<b>61</b>
<b>Anexo II</b> .....	<b>62</b>
<b>Anexo III</b> .....	<b>63</b>
<b>Anexo IV</b> .....	<b>68</b>
<b>Anexo V</b> .....	<b>73</b>

## 1. INTRODUÇÃO

---

O relatório que se segue foi elaborado no âmbito da unidade curricular de Estágio Profissional II, inserida no 2º semestre do 4º ano do plano de estudos do Curso de Farmácia – 1º Ciclo, realizado no Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS), da Faculdade de Ciências da Saúde (FCS) da Universidade da Beira Interior (UBI), o qual pretende descrever de forma clara e sucinta todas as atividades e experiências adquiridas durante o período de estágio que decorreu entre 4 de março de 2013 e 21 de junho de 2013.

O Estágio Profissional II é um estágio de integração à vida profissional, objeto de avaliação e que visa sobretudo a integração e completa autonomia no desempenho das diferentes funções do Técnico de Farmácia (TF).

O estágio é um período fundamental para o enriquecimento do estudante, como futuro profissional, uma vez que lhe permite aprender inserido numa equipa multidisciplinar e permanecer em contacto direto com a realidade das diferentes áreas específicas de atuação do técnico de farmácia. De uma forma mais específica e concisa, podemos assim dizer que, o estudante deve tirar proveitos deste estágio, seguindo os objetivos inicialmente propostos <sup>[1]</sup>:

- Desenvolver competências científicas e técnicas que lhe permitam a realização de atividades subjacentes à profissão do Técnico de Farmácia, no enquadramento das várias áreas de intervenção profissional;
- Aplicar os princípios éticos e deontológicos subjacentes à profissão;
- Identificar, desenvolver e avaliar planos de intervenção adequadamente integrados numa equipa multidisciplinar;
- Responder aos desafios profissionais com inovação, criatividade e flexibilidade.

Para que fosse possível responder e tirar partido dos objetivos acima referidos e a fim de ser possível perceber a complexidade das experiências realizadas num laboratório direccionado para a vertente da investigação, várias foram as atividades planeadas para o estágio:

- Aquisição de conhecimentos básicos sobre cromatografia gasosa;
- Desenvolvimento de metodologias recorrendo a espectrometria de massas;
- Aquisição de conhecimentos básicos e avançados de Microextração em Seringa Empacotada (MEPS);

- Desenvolvimento e validação de uma metodologia bioanalítica para determinação de antipsicóticos em matrizes aquosas.

Com este relatório pretende-se descrever as atividades executadas durante o Estágio Profissional II, a fim de reportar todas as experiências vividas pelo estudante, de modo a poder ser igualmente considerado como uma ferramenta fidedigna para a avaliação do mesmo.

Ao longo do relatório será possível a retificação dos objetivos que foram inicialmente planeados e propostos para a realização de um bom estágio, onde será perceptível a forma como os mesmos foram estudados. Deste modo, no desenrolar do relatório irei realçar o perfil do Técnico de Farmácia enquanto profissional de saúde que abrange várias áreas; descrever e focar, de forma muito sucinta, os pontos mais importantes e relevantes sobre o CICS, a fim de ser possível visualizar o ambiente em que o estágio foi enquadrado; descrever alguns conhecimentos básicos e avançados sobre cromatografia gasosa e alguns conceitos acoplados; explicar o conceito de MEPS e de que forma esta se revela uma técnica importante neste ramo e irei descrever como se desenvolve e valida uma metodologia bioanalítica.

A metodologia aplicada para a elaboração deste relatório baseou-se na consulta de artigos, de teses de mestrado e ainda outras fontes de carácter fidedigno, todas elas referentes ao ramo da investigação.

## 2. PERFIL DO TÉCNICO DE FARMÁCIA

---

O TF tem que ser um profissional dotado de conhecimentos técnico-científicos, inserido numa equipa de saúde onde desenvolve um conjunto de atividades relacionadas com a prevenção, aconselhamento, terapia e reabilitação.

A carreira de TF é regulamentada e regida segundo o Estatuto Legal da Carreira de Técnicos de Diagnóstico e Terapêutica, onde se encontram abrangidos todos os profissionais das áreas de Tecnologias da Saúde. É no Decreto-Lei nº564/99, de 21 de Dezembro que está estabelecido o Estatuto Legal da Carreira dos Técnicos de Diagnóstico e Terapêutica, sendo que este faz referência às competências dos TF enquanto membros de uma equipa profissional, sendo de salientar as seguintes competências <sup>[2]</sup>:

- Desenvolvimento de atividades no circuito do medicamento, tais como análises e ensaios farmacológicos;
- Interpretação da prescrição terapêutica e de fórmulas terapêuticas, bem como a sua preparação, identificação e distribuição;
- Controlo dos prazos de validade;
- Distribuição;
- Gestão de *stocks* de medicamentos e outros produtos farmacêuticos;
- Informação e aconselhamento sobre o uso do medicamento.

Deste modo, podemos afirmar que o TF é, como todos os outros profissionais de saúde, um profissional competente, pois é detentor de uma formação especializada de nível superior, sendo ele um profissional ativo em todas as fases que estão diretamente ligados ao circuito do medicamento e responsável nas funções que exerce com autonomia para tal. Os TF são habilitados para um vasto leque de atividades ao nível da saúde, podendo exercer funções em <sup>[3]</sup>:

- Farmácia Hospitalar;
- Farmácia Comunitária;
- Responsáveis Técnicos dos locais de venda de Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica (MNSRM);
- Indústria farmacêutica, em diversas vertentes, nomeadamente produção e controlo de qualidade dos medicamentos;
- Centros de ensino e de investigação;

- Indústria Alimentar;
- Indústria Química.

A utilização de medicamentos nas sociedades modernas é um bem indiscutível que permite dar resposta às necessidades e exigências das populações, contribuindo para uma melhoria significativa da sua qualidade de vida. Deste modo, a participação dos TF nas equipas de saúde contribui de forma decisiva para um sistema de saúde mais eficaz e de qualidade, de forma a promover uma utilização racional e segura do medicamento. Como profissionais que são devem sempre fazer jus do sigilo profissional a que estão sujeitos e nunca perder a ética e os princípios morais que lhes foram inculcados durante toda a sua formação profissional.

A Associação Portuguesa de Licenciados em Farmácia (APLF) realça o Perfil Profissional do TF onde denota que o TF tem a capacidade de conceber, planear, organizar, aplicar e avaliar todas as fases do circuito do medicamento e produtos de saúde, tendo sempre em conta a sua qualidade, através de um espaço de intervenção próprio e autónomo <sup>[4]</sup>. A APLF realça as capacidades e aptidões para as quais os TF estão capacitados, baseando-se no Estatuto Legal da Carreira dos Técnicos de Diagnóstico e Terapêutica.

A nossa sociedade está a atravessar um período pouco favorável em termos socioeconómicos, o que vai levar a que o TF tenha de se preparar melhor para enfrentar todas as barreiras que apareçam no seu encalce e deve sobretudo alargar os seus horizontes e apostar em outras áreas para o qual está apto a exercer as suas funções, como por exemplo na área da investigação em saúde, embora este seja um ramo que pode requerer algumas verbas extra.

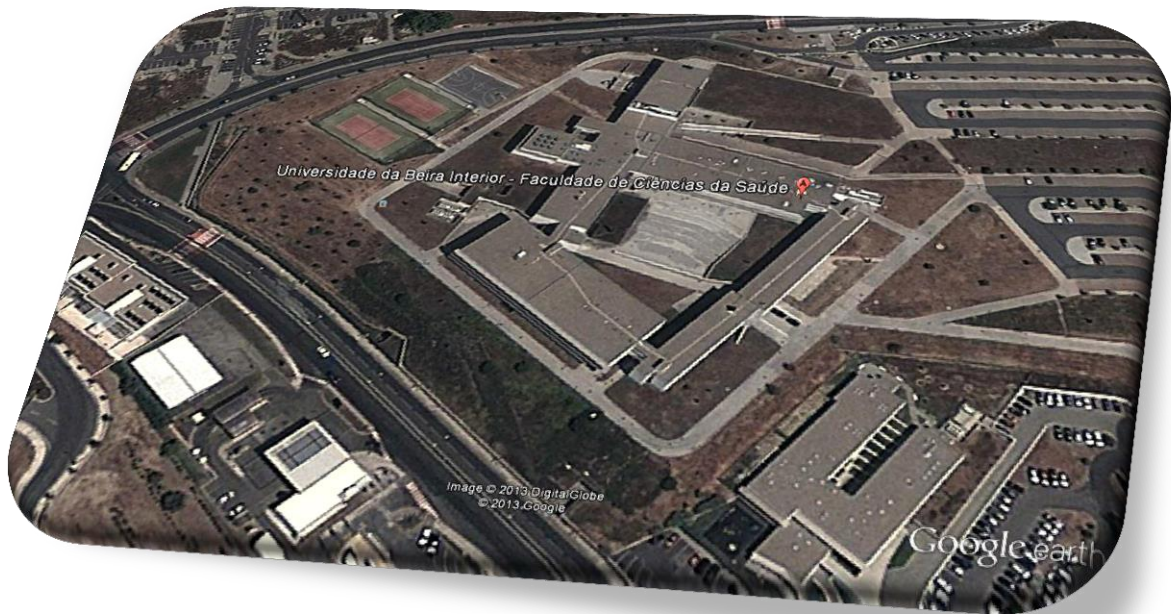
Qualquer TF que exerça a sua atividade profissional ao nível da investigação em saúde, pode considerar-se como um privilegiado, visto que tem a oportunidade de ser uma peça fundamental para o desenvolvimento de novos medicamentos, ou ainda na descoberta de moléculas, até à data desconhecidas, que podem ser fundamentais no diagnóstico ou tratamento de certas doenças, sendo que tal vai enaltecê-la a sua carreira profissional e a sua autoestima, pois acaba por se sentir útil na sociedade, revelando ser um profissional competente para o sucesso ao nível da saúde. No entanto, ao nível da investigação em saúde várias são as áreas de investigação como a toxicologia/ecotoxicologia e a área de saúde pública.

### 3. CENTRO DE INVESTIGAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE (CICS)

---

#### 3.1 LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DO CICS

O CICS da UBI encontra-se sediado na Avenida Infante D. Henrique, 6201-506 Covilhã, concelho da Covilhã e distrito de Castelo Branco. Na figura 1 apresento uma vista aérea da FCS onde se encontra inserido o CICS.



**Figura 1 - Vista aérea do CICS da FCS [Fonte: Google Earth]**

O CICS encontra-se situado na FCS da UBI. Embora todos os alunos tenham acesso à faculdade, nem todos conseguem ter acesso ao CICS, visto que para tal é necessário o uso de cartões para a abertura das portas e só os profissionais autorizados é que têm acesso a estes. Desta forma, o CICS é um local que está seguro e é vigiado, a fim de evitar o acesso de pessoas estranhas.

#### 3.2 APRESENTAÇÃO DO CICS

O CICS é uma estrutura de investigação que se encontra integrada na FCS – UBI. A missão do CICS é promover a pesquisa científica de alta qualidade ao nível de diversas áreas, a fim de contribuir para a educação para a saúde da população local. As áreas que têm impacto ao nível da investigação em saúde, são <sup>[5]</sup>:

- Biotecnologia;
- Biomédica;
- Clínica;
- Epidemiológica.

No CICS existem dois grupos distintos de investigadores, que direccionam os seus interesses de pesquisa nas áreas de «Hormonas e Inflamação» e «Biotecnologia e Ciências Biomoleculares».

O CICS não é apenas um centro de investigação, nele também são realizados trabalhos de mestrado e de doutoramento, visto que ele se encontra em estreita colaboração com as faculdades e os departamentos da UBI, de modo que são realizados os seguintes programas de Mestrado e Doutoramento <sup>[5]</sup>:

- Programas de Mestrado:
  - Medicina;
  - Ciências Farmacêuticas;
  - Ciências Biomédicas;
  - Bioquímica.
- Programas de Doutoramento:
  - Medicina;
  - Biomedicina;
  - Bioquímica;
  - Ciências Farmacêuticas.

A Beira Interior, atualmente, é bastante conhecida graças ao CICS, devido ao renome que este centro de investigação já enverga. Na verdade, o CICS tem demonstrado que é um centro de investigação com capacidade para dar resposta aos mistérios que a ciência vai despoletando.

No dia 30 de abril de 2013, foi inaugurada a maior estrutura científica da Beira Interior, a UBIMEDICAL. A UBIMEDICAL é um centro de competência e excelência que se encontra vocacionado para a qualidade de vida e saúde. Este projeto assenta em duas vertentes, investigação científica e desenvolvimento tecnológico e incubação de projetos empresariais com transferência de tecnologia. No que diz respeito à área de investigação, podemos encontrar laboratórios equipados com os mais avançados equipamentos científicos que existem nas áreas da saúde <sup>[6]</sup>.



### 3.3 INSTALAÇÕES

As instalações do CICS cobrem uma área de 1830 m<sup>2</sup>, onde se incluem os laboratórios comuns e as instalações específicas que possuem uma organização funcional <sup>[7]</sup>. De entre as instalações específicas, podemos salientar algumas que são usadas para a execução de tarefas gerais, tais como:

- Sala fria e os congeladores → sala destinada ao armazenamento de amostras e reagentes;
- Sala de Soluções → destina-se à preparação de soluções e ao armazenamento de reagentes;
- Sala de lavagem e esterilização → equipada com autoclaves, sistema de purificação de água e máquina de lavar;
- Sala de centrifugação → equipada com várias centrífugas e um sistema de liofilização;
- Sala destinada ao processamento de amostras de tecido, bem como amostras de culturas de células.

Estas instalações, são aquelas que todos os investigadores utilizam, ou seja, são instalações comuns a todos os profissionais que exercem funções no CICS. Deste modo, seguidamente, vou fazer uma breve descrição de cada uma das instalações que são específicas para determinada área <sup>[7]</sup>.

#### 3.3.1 Instalações destinadas aos animais

As instalações que estão destinadas apenas aos animais, também designadas de Biotério, local onde se criam ou recolhem animais vivos usados em experiências científicas <sup>[8]</sup>, foram licenciadas pela Direção Geral de Veterinária (DGV) em julho de 2009.

As instalações possuem de área 340 m<sup>2</sup> onde se podem encontrar as seguintes salas: sala de reprodução, sala de experiências e sala de cirurgia. Os animais que lá se encontram são ratos e hamsters, visto serem estes os animais mais usados para as experiências científicas. Todos os animais possuem gaiolas bem ventiladas e as instalações encontram-se ainda equipadas com uma unidade de peróxido de hidrogénio a fim de se executar a esterilização das salas e de todos os equipamentos aí presentes <sup>[7]</sup>.

### **3.3.2 Laboratório de Cultura de Células**

O laboratório destinado à cultura de células possui uma área de 35 m<sup>2</sup> e é dotado de três salas distintas: cultura de células primárias, cultura de linhas celulares de origem humana e cultura de linhas celulares de origem não humana. Estas salas encontram-se devidamente equipadas com todo o equipamento que é necessário para a cultura de células, possuem armários de fluxo laminar, incubadoras, frigoríficos e centrífugas.

### **3.3.3 Laboratório de Microscopia de Fluorescência**

O laboratório de microscopia de fluorescência, atualmente, encontra-se equipado com um microscópio invertido Zeiss AxioObserver que está preparado para a realização de imagens ao vivo e possui também um microscópio confocal AxioObserver LSM 710. Estes equipamentos encontram-se aptos para realizar análises de Transferência de Energia de Ressonância por Fluorescência (FRET) e imagens de cálcio.

### **3.3.4 Laboratório de Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)**

O laboratório de PCR possui dimensões pequenas e está unicamente reservado para a execução do método PCR. Este laboratório está equipado com termocicladores normais e um equipamento de PCR em tempo real, a fim de possibilitar a amplificação de segmentos de DNA através do processo de PCR.

### **3.3.5 Laboratório destinado à Eletroforese de Ácidos Nucleicos**

Este laboratório é usado para se efetuar a análise da expressão genética e para a avaliação de amostras de ácidos nucleicos. Este encontra-se equipado com dispositivos de imagiologia quantitativa, sistemas para a realização da eletroforese em gel, bem como outros pequenos equipamentos.

### **3.3.6 Laboratório de Eletroforese Proteica e Western Blotting**

Este laboratório, como o próprio nome o indica, é unicamente utilizado para a análise da expressão das proteínas. Encontra-se equipado com todos os equipamentos que são necessários para a realização do processo de análise.

### **3.3.7 Laboratório de Radioatividade**

A área deste laboratório é de 33 m<sup>2</sup> e encontra-se equipado com um contador beta e alguns equipamentos de dimensões menores para analisar a proliferação das células humanas e analisar ainda as transcrições por Northern blot.

### **3.3.8 Laboratório de Citometria de Fluxo**

O laboratório destinado à citometria de fluxo, encontra-se equipado com um citómetro de fluxo, que é capaz de detetar até quatro sinais fluorescentes e que pode medir até nove cores. Este equipamento permite contar, examinar e classificar partículas microscópicas que se encontram suspensas num meio líquido em fluxo. A citometria de fluxo permite a quantificação de um conjunto de parâmetros.

### **3.3.9 Laboratório de Fisiologia**

Este laboratório, como o nome indica, é destinado à investigação em fisiologia, possui uma área de 37 m<sup>2</sup> e encontra-se equipado com equipamentos de última geração, usados para a análise da atividade dos canais vasculares e das células do coração, análise da contractilidade do miocárdio e ainda equipamentos utilizados para medir a contração, migração e proliferação celular.

### **3.3.10 Laboratório de Microbiologia**

O laboratório de microbiologia possui uma área de 57 m<sup>2</sup>, este por sua vez encontra-se equipado com 3 incubadores orbitais e um biorreator Bioflo3000. Estes equipamentos são usados para otimizar as condições funcionais para o crescimento de células bacterianas e para maximizar os rendimentos das proteínas terapêuticas e dos ácidos nucleicos, quer ao nível da fermentação quer ao nível da cultura de células, através do método desenvolvido. O laboratório encontra-se ainda equipado de outros pequenos dispositivos essenciais num laboratório de microbiologia, sendo de salientar que este possui um sistema automatizado para gerar atmosferas de anaerobiose e de microaerofilia.

### **3.3.11 Laboratório de Proteómica**

Este laboratório encontra-se equipado com equipamentos de elevada sensibilidade e precisão. Possui um 4800 Plus MALDI TOF/TOF<sup>TM</sup>, sendo este um

equipamento de análise que oferece um elevado nível de sensibilidade para identificação e quantificação de proteínas de baixa abundância em misturas complexas. Incorporado neste laboratório, está ainda um sistema de Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa de Triplo Quadrupolo – LC/MS/MS 4000Q TRAP™, permitindo o desenvolvimento de novas aplicações de trabalho em proteómica, como sendo a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos.

### 3.3.12 Laboratório de Microcalorimetria

O laboratório de Microcalorimetria está equipado com um microcalorímetro de fluxo, que pode funcionar por fluxo contínuo ou em condições estáticas. Em condições de fluxo contínuo o microcalorímetro fornece uma visão valiosa em processos de adsorção de biomoléculas. Por outro lado, em condições estáticas é possível o estudo de diferentes tipos de ligações, as interações DNA-fármaco, a cinética enzimática e ainda a atividade do anticorpo.

### 3.3.13 Laboratórios de Cromatografia

Existem dois laboratórios de cromatografia, estes possuem 57 e 60 m<sup>2</sup>, respetivamente. Os laboratórios de cromatografia permitem um amplo desenvolvimento ao nível do isolamento e purificação molecular, bem como o desenvolvimento e validação de diferentes métodos para deteção de fármacos, drogas de abuso ou outros analitos, tendo por base amostras biológicas.

As experiências analíticas cromatográficas são realizadas em sistemas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e num sistema de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa de Triplo Quadrupolo (GC/MS/MS), também designado por modo *tandem*. Outros equipamentos de deteção estão disponíveis no laboratório, tais como: detetores de matriz, índice de refração, fluorescência e detetores eletroquímicos.

O meu estágio decorreu no laboratório de cromatografia onde se encontrava o GC/MS/MS, visto que, o meu projeto de investigação foi desenvolvido com aplicação do sistema de cromatografia gasosa. No decorrer do relatório, irei fazer referência a este tipo de sistema de deteção e quantificação.

### 3.4 ÁREAS DE INVESTIGAÇÃO E MISSÃO DO CICS

A investigação em Ciências da Saúde na UBI é promovida pelo CICS, que não é mais que uma unidade de pesquisa onde se reúnem diversos departamentos da universidade.

A missão do CICS é o desenvolvimento de pesquisa integrada e multidisciplinar voltada para o estudo dos mecanismos fisiológicos e patológicos ao nível molecular para o organismo vivo.

No que diz respeito aos recursos humanos do CICS, estes abrangem um amplo leque de profissionais multidisciplinares. No CICS existem atualmente, cerca de 160 investigadores, nos quais se incluem alunos de mestrado e de doutoramento, bem como alunos de pós-doutoramento. A formação multidisciplinar dos investigadores acarreta mais-valias no desenvolvimento de projetos integrados no campo da biomedicina, visto que existem investigadores com formação em medicina, farmacêuticos, bioquímicos e biomédicos<sup>[9]</sup>.

Como forma de garantir o desenvolvimento de projetos que tragam benefícios para a saúde pública e para a vida, foram estabelecidas duas grandes áreas de investigação que estão em colaboração constante: ‘Hormonas e Inflamação em Saúde e na Doença’ e ‘Biotecnologia e Ciências Biomoleculares’<sup>[9]</sup>, mencionadas anteriormente.

### 3.5 HORÁRIO DE FUNCIONAMENTO

O período normal de funcionamento do CICS é basicamente igual ao período de funcionamento da FCS, isto é, das 08.00h às 20.00h durante os cinco dias úteis da semana. No entanto, os profissionais qualificados para tal, podem fazer horário extra, ou seja, podem ir trabalhar durante a noite ou pela madrugada, desde que para isso possuam chaves de acesso e estejam devidamente habilitados para tal. Além das horas extra, podem também optar por trabalhar no fim de semana, sendo que desta forma pode dizer-se que o CICS está em funcionamento 24 horas sob 24 horas.

## 4. TRABALHOS DESENVOLVIDOS NO CICS

---

Todos os trabalhos que são desenvolvidos no CICS encontram-se, de uma forma ou de outra, ligados à investigação, isto é, o mote do CICS é a investigação em ciências da saúde. Logo, o meu trabalho no CICS também andou em volta da investigação, mais concretamente, no desenvolvimento de um método cromatográfico para deteção de antipsicóticos em água.

No entanto, não comecei logo a fazer investigação, pura e dura, primeiro realizei alguns trabalhos propostos pelos meus co-supervisores, pesquisa bibliográfica para sustentar o meu projeto, bem como a aprendizagem de alguns conceitos que não me eram de todo familiares. No que diz respeito aos trabalhos iniciais, esses serviram para me familiarizar com o tipo de cálculos necessários para a análise posterior e para obter a destreza desejada na utilização dos mesmos. Por outro lado, os meus co-supervisores deram-me alguns conceitos chave que tinha de saber, minimamente, para perceber qual a importância deles e de que modo, estes poderiam ser fundamentais em todo o meu projeto. Como tal, tive necessidade de pesquisar mais sobre estes conceitos, a fim de tentar perceber a sua aplicação no mundo da investigação, sendo que no seguimento deste relatório irei fazer referência aos conceitos que se revelaram fulcrais para o desenvolver de todo o meu projeto de investigação.

### 4.1 RETA DE CALIBRAÇÃO DA CAFEÍNA

Um dos primeiros trabalhos que realizei foi o da cafeína, sendo que os objetivos deste trabalho eram: preparação de soluções, familiarização com os cálculos a efetuar e traçar uma reta de calibração para a cafeína.

Para efetuar este trabalho parti de uma solução mãe de cafeína, cuja concentração era de  $50\mu\text{g/mL} = 50\text{ppm}$ , isto é, tinha  $5000\mu\text{g}$  de cafeína para um volume final de  $100\text{mL}$  de metanol. As minhas soluções de trabalho foram preparadas para um volume final de  $2\text{mL}$  de água, pelo que foi necessário realizar alguns cálculos, os quais se prenderam com a utilização da equação:  $C_i \times V_i = C_f \times V_f$ . De forma a não tornar a descrição do trabalho extensa, apresento seguidamente uma tabela (tabela 1) que resume a preparação das soluções de trabalho.

**Tabela 1 – Preparação das soluções de trabalho**

Soluções de trabalho	Volume de água ( $\mu\text{L}$ )	Volume de solução mãe ( $\mu\text{L}$ )
<b>0 ppm</b>	2000	0
<b>5 ppm</b>	1800	200
<b>10 ppm</b>	1600	400
<b>15 ppm</b>	1400	600
<b>20 ppm</b>	1200	800
<b>25 ppm</b>	1000	1000

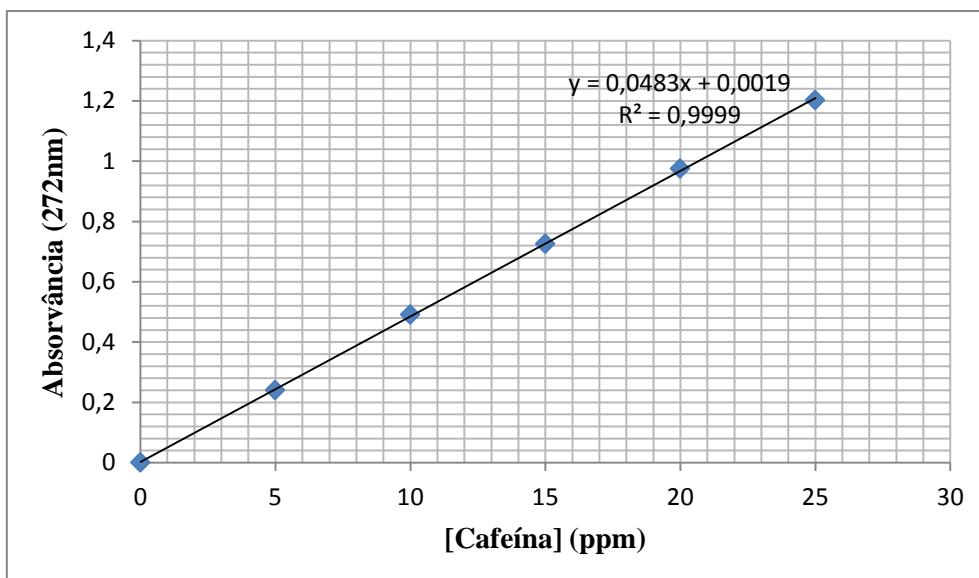
Seguidamente, após ter efetuado a correta preparação das soluções de trabalho, com recurso a um espectrofotómetro de absorção no visível/ultravioleta, medi a absorvância para cada uma das soluções de trabalho por três vezes a um comprimento de onda de 272 nm. Além disso, medi também a absorvância de uma solução incógnita que me foi dada com concentração desconhecida, com o objetivo de calcular a sua concentração com base na absorvância obtida e na reta de calibração que iria traçar com as soluções de trabalho. A tabela 2 refere os resultados obtidos de absorvância para cada uma das soluções de trabalho, bem como a absorvância da solução incógnita.

**Tabela 2 – Registo das absorvâncias**

Absorvância Concentração	Absorvância 1	Absorvância 2	Absorvância 3
<b>0 ppm</b>	0,000	0,000	0,000
<b>5 ppm</b>	0,232	0,241	0,248
<b>10 ppm</b>	0,495	0,490	0,488
<b>15 ppm</b>	0,713	0,727	0,737
<b>20 ppm</b>	0,971	0,979	0,975
<b>25 ppm</b>	1,179	1,222	1,209
<b>Solução incógnita</b>	0,408	0,398	0,410

Depois de efetuar a leitura das absorvâncias, o próximo passo foi o de traçar uma reta de calibração, como se pode visualizar no gráfico 1.

Gráfico 1 – Reta de calibração da cafeína



Por sua vez, a tabela 3 contém os dados referentes às concentrações e respectivas absorvâncias, mas ainda, apresenta os cálculos da média, desvio-padrão, coeficiente de variação, quantificação e bias.

Tabela 3 – Resultados das absorvâncias e cálculos úteis

		Concentração (ppm)					
		0	5	10	15	20	25
Ensaio	1	0,000	0,232	0,495	0,713	0,971	1,179
	2	0,000	0,241	0,490	0,727	0,979	1,222
	2	0,000	0,248	0,488	0,737	0,975	1,209
Média (Abs)		0,000	0,240	0,491	0,726	0,975	1,203
Desvio padrão		0	0,00802	0,00361	0,01206	0,004	0,02205
Coeficiente de variação		0	3,33737	0,73433	1,66129	0,41026	1,83266
Quantificação		-0,0393	4,93651	10,1263	14,9848	20,147	24,8744
Bias		0	-1,2698	1,26294	-0,1012	0,73499	-0,5024

A média e o desvio-padrão devem ser os primeiros cálculos a efetuar, uma vez que estes vão ser o ponto de partida para a realização de todos os cálculos seguintes. O cálculo do coeficiente de variação (Equação 1) é útil, na medida em que este permite estimar a precisão com a qual a experiência foi efetuada.

$$\text{Coeficiente de variação} = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Média}} \times 100$$

Equação 1 – Fórmula para calcular o coeficiente de variação



A quantificação (Equação 2) é calculada como forma de verificar se a concentração teórica é efectivamente a concentração presente na solução, daí que para se efetuar o seu cálculo se tenha de usar a equação da reta.

$$\text{Quantificação} = \frac{\text{média da absorvância} - b}{m}$$

#### Equação 2 – Fórmula para calcular a quantificação

Por último, calcula-se o bias (Equação 3). O bias diz respeito ao erro relativo médio que pode ocorrer na experiência, mediante a reta de calibração, sendo que este não deve ultrapassar os 15%, como definido pela *Food and Drug Administration* (FDA).

$$\text{Bias} = \frac{\text{valor da quantificação} - \text{valor da concentração nominal}}{\text{valor da concentração nominal}} \times 100$$

#### Equação 3 – Fórmula para calcular o bias

Depois de ter efetuado todos estes cálculos, procedi à determinação da concentração da solução incógnita, sendo para tal recorri à equação da reta traçada anteriormente e à fórmula que se segue (Equação 4).

$$\text{Concentração} = \frac{\text{Absorvância} - b}{m}$$

#### Equação 4 – Fórmula para calcular uma concentração desconhecida através da equação da reta de calibração (y=mx+b)

Posto isto, os resultados obtidos foram os que se encontram na tabela abaixo representada (tabela 4). Concluiu-se assim que a solução incógnita teria uma concentração aproximada de 8,35ppm.

**Tabela 4 – Resultados da concentração para a solução incógnita**

Absorvância da solução incógnita	Concentração (ppm)	Média (ppm)
<b>0,408</b>	8,40787	8,35266
<b>0,398</b>	8,20083	
<b>0,41</b>	8,44928	

## 4.2 PROGRAMAS UTILIZADOS NO PROCESSO DE CROMATOGRAFIA GASOSA (GC)

O funcionamento do GC é todo ele comandado através de programas informáticos, programas esses que fornecem a informação necessária ao GC para que ele desempenhe as suas funções. Para tal, trabalha-se basicamente com três principais programas, o QQQ1 – MassHunter, o Gerstel Maestro e o Agilent MassHunter Qualitative Analysis.

O QQQ1 – MassHunter é responsável pelo controlo de toda a parte ligada ao cromatógrafo e ao detetor. Neste programa, os comandos de uso mais relevante são: a sequência, os métodos e os instrumentos. No comando “Sequência” utilizam-se as funções que permitem editar a sequência (criar a sequência que se pretende) e correr a sequência. O comando “Métodos” permite criar novos métodos ou então editar métodos já existentes. Por sua vez, o comando “Instrumentos” permite o ajuste de algumas condições ao nível da espectrometria de massa, das rampas de temperatura e do injetor.

O programa Gerstel Maestro comanda toda a parte da injeção, ou seja, ele vai controlar todos os passos que devem ser dados pelo injetor. Deste modo, é responsável por seleccionar o vial a ser utilizado, o volume a injetar e como injetar esse mesmo volume, tudo isto com base nos tempos de corrida descritos no método que foi criado no programa anterior.

Por último, temos o programa Agilent MassHunter Qualitative Analysis que serve para analisar os resultados obtidos pelo detetor de espectrometria de massa. Este programa é muito fácil de manusear, sendo que para se analisar os resultados, basta seleccionar os cromatogramas pretendidos, mediante o nome que lhe foi atribuído no programa QQQ1 – MassHunter.

Para um correto funcionamento do GC primeiro deve fazer-se correr a sequência do programa QQQ1 – MassHunter e esperar que no GC fique *ready*, posto isso, faz-se correr a sequência do programa Gerstel Maestro, dando-se assim início à fase de injeção.

## 5. CONCEITO DE CROMATOGRAFIA

---

O termo cromatografia foi usado pela primeira vez por um botânico russo, que em 1906 descreveu as suas experiências na separação dos componentes de extratos de plantas, experiência onde se verificou que os componentes eram separados por meio de faixas coloridas. Em suma, este deve ser o motivo pelo qual a técnica é conhecida como cromatografia (*chrom* – cor e *graphie* – escrita) <sup>[10]</sup>.

A cromatografia é um método físico-químico de separação, que se fundamenta na migração diferencial dos componentes de uma mistura, sendo que esta ocorre devido a diferentes interações que se dão entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. Esta técnica é extremamente versátil e de grande aplicação, devido à grande variedade de combinações que se podem criar entre a fase móvel e a fase estacionária. Deste modo, a cromatografia pode ser utilizada para <sup>[10]</sup>:

- Identificação de compostos → Comparação com padrões previamente existentes;
- Purificação de compostos → Separação das substâncias indesejáveis;
- Separação dos componentes de uma mistura.

Existem diferentes formas de se efetuar a técnica de cromatografia, sendo que para a sua correta classificação é necessário ter em consideração alguns critérios. Existem quatro formas de classificar a cromatografia: classificação pela forma física do sistema cromatográfico; classificação pela fase móvel utilizada; classificação pela fase estacionária utilizada e classificação pelo modo de separação <sup>[10]</sup>.

Dos vários tipos de cromatografia que são conhecidos, é bem notável que os mais utilizados ao nível da indústria e mesmo ao nível da investigação são: a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e a Cromatografia Gasosa (GC). No entanto, verifica-se que a GC é das técnicas analíticas mais utilizadas, devido às vantagens que vai ostentando, alto poder de resolução e possibilidade de deteção à escala de nano e picogramas.

### 5.1 CROMATOGRAFIA GASOSA

A GC é uma técnica que foi desenvolvida a partir dos trabalhos de Prior, Martin e Synge, onde a amostra é introduzida num injetor que se encontra ligado à coluna cromatográfica. Após se dar a injeção da amostra, os compostos gasosos são

transportados ao longo da fase estacionária, por meio de uma fase móvel gasosa (gás de arraste), sendo estes separados com base nos seus pontos de ebulição e polaridade <sup>[11, 12]</sup>.

A figura 2 ilustra os componentes básicos de um equipamento para cromatografia gasosa.

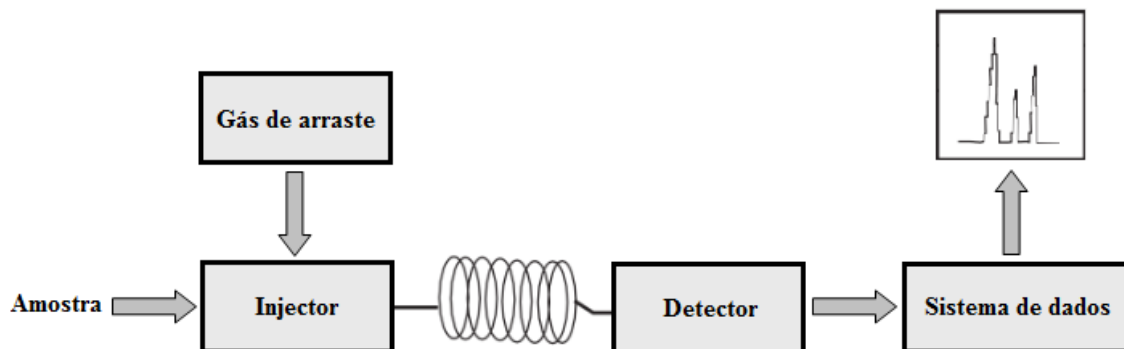


Figura 2 – Diagrama de um processo de cromatografia gasosa (Adaptado da referência [13])

Os gases mais usados como fase móvel são: o hidrogénio, o hélio e o azoto. Estes devem possuir algumas características fundamentais, devem ser puros e quimicamente inertes. A sua escolha está diretamente relacionada com as vantagens e inconvenientes associados a cada um deles, nomeadamente, custos, rapidez de análise e segurança, sendo que o hélio é o gás mais habitualmente utilizado <sup>[14]</sup>.

O processo de injeção é algo célere e efetua-se com recurso a micro-seringas que injectam as misturas numa câmara de vaporização. A mistura, já vaporizada, passa por um *liner* inerte de vidro sinalizado e, em seguida, dá-se a entrada dos compostos na coluna cromatográfica, onde vai ocorrer a sua separação <sup>[14, 15]</sup>. Há diversos tipos de sistemas de injeção, sendo que a sua escolha deve ser feita mediante as vantagens e os inconvenientes apresentados por eles. Os sistemas de injeção que usam colunas capilares, frequentemente, trabalham com repartição de fluxo (em *split*), sem repartição do fluxo (em *splitless*) ou ainda sob Vaporização com Temperatura Programada (PTV). Os modos de operação mais usados são: *split* e *splitless*, pois permitem controlar a quantidade de amostra que é introduzida na coluna, a qual depende da concentração dos compostos na mistura. No modo *splitless* toda a amostra que é injetada segue para a coluna, ao passo que no modo *split* apenas uma fração da amostra que foi injetada entra na coluna, sendo que a restante amostra vai ser eliminada através de uma válvula, a fim de se evitar a saturação da coluna devido às elevadas concentrações apresentadas pelos compostos <sup>[14, 16]</sup>.

A fase estacionária pode ser sólida ou líquida, encontrando-se no interior da coluna cromatográfica, podendo ser empacotada ou capilar. As colunas capilares são por hábito as mais utilizadas, visto que apresentam diversas vantagens em relação às colunas empacotadas, como sendo, maior eficiência e promoção de separações com maior resolução. A escolha de uma fase estacionária para GC deve seguir critérios que se demonstram cruciais para a escolha da fase estacionária ideal. A fase estacionária deve ser pouco volátil, apresentar estabilidade térmica e ser quimicamente inerte <sup>[12]</sup>.

Embora a interação com a fase estacionária possa influenciar a ordem de eluição dos compostos, em GC, esta é habitualmente determinada pelos seus pontos de ebulição. Regra geral, os compostos que têm carácter apolar são mais facilmente separados por uma fase apolar, ao passo que para os polares uma fase polar vai dar origem a uma separação mais eficiente. Por outro lado, a espessura da fase estacionária também pode ter influência ao nível da eficiência da coluna, deste modo, quando se pretende efetuar a separação de compostos com baixa volatilidade recorre-se ao uso de colunas com espessuras menores, sendo as colunas de espessuras maiores usadas na separação de compostos muito voláteis <sup>[14, 16]</sup>.

Outro parâmetro, que é importante na separação dos compostos, é a temperatura a que se encontra a coluna, sendo que esta deve ser controlada. Desta forma, perante uma separação isotérmica a coluna é mantida a uma temperatura constante, por sua vez um gradiente de temperaturas permite aumentar a temperatura de forma gradual ou por patamares, consoante for mais eficiente para o método cromatográfico <sup>[12]</sup>.

Acoplado à parte cromatográfica existe um detetor, que como o nome indica, vai detetar os compostos a fim de estes serem visíveis. Como forma de proporcionar uma sensibilidade ao nível do GC, deve ser selecionado um detetor ideal que origine limites de deteção baixos, que seja estável e reprodutível e origine uma resposta linear numa vasta gama de concentrações. Nomeadamente, deve ser de fácil utilização e o seu tempo de resposta deve ser reduzido e independente do fluxo. Existem detetores universais, onde a resposta pode ser equivalente para todos os compostos e os detetores seletivos, onde a resposta é seletiva para determinados grupos de compostos. Os detetores devem ser escolhidos em função da aplicação pretendida, sendo que os mais comumente utilizados são os que se apresentam na tabela 5 <sup>[12, 17]</sup>.

Tabela 5 – Detetores mais utilizados em GC <sup>[12]</sup>

Detetor	Tipo de detetor	Aplicação
Ionização de chama (FDI)	Universal	Análise de compostos com cadeias carbonadas
Condutividade térmica (TCD)	Universal	Análise de compostos gasosos
Captura eletrónica (ECD)	Seletivo	Compostos com elevada afinidade electrónica
Azoto-fósforo (NPD)	Seletivo	Compostos contendo azoto e/ou fósforo

No entanto, os componentes separados e quantificados no GC podem ser detetados por um segundo equipamento que irá produzir dados qualitativos, como é o caso de espectrómetro de massa, que dá informações sobre o tempo de retenção do composto e sobre o seu espectro de massa. É desta conjugação que surge o GC/MS/MS.

## 5.2 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA NO MODO *TANDEM* (GC/MS/MS)

A GC pode ser combinada com diferentes sistemas de deteção, sendo por isso considerada uma das técnicas analíticas mais utilizadas e conseqüentemente de melhor desempenho. Ao se acoplar um cromatógrafo com um espectrómetro de massa, está-se a combinar as vantagens da cromatografia, a alta seletividade e a eficiência de separação, com as vantagens da espectrometria de massa, a informação estrutural e o aumento ao nível da seletividade <sup>[18]</sup>.

A GC/MS/MS é uma metodologia normalmente utilizada como forma de confirmar a identificação dos compostos, sendo que atualmente tem vindo a ser utilizada também para a quantificação dos mesmos em amostras de origem clínica ou forense. O principal fator limitante do seu uso é o elevado custo e complexidade de operação. O emprego do sistema detetor de triplo quadrupolo (MS/MS) aumenta a seletividade para as análises <sup>[19]</sup>. A figura 3 mostra esquematicamente o modo de funcionamento deste detetor.

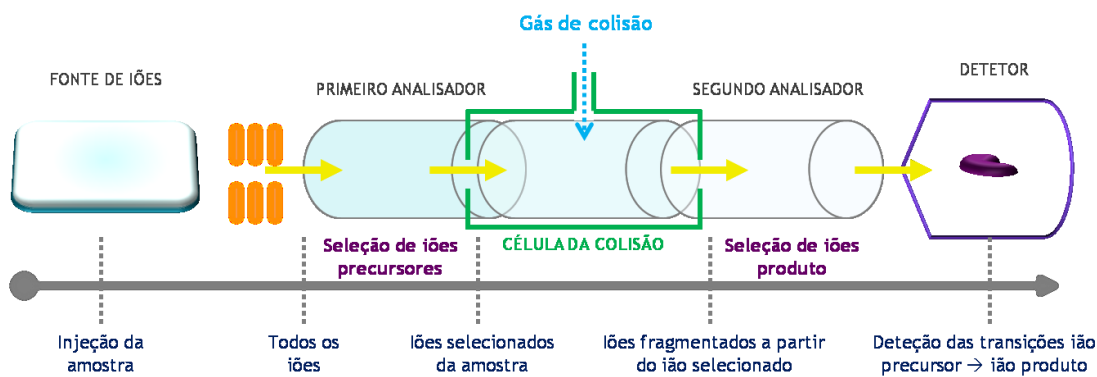
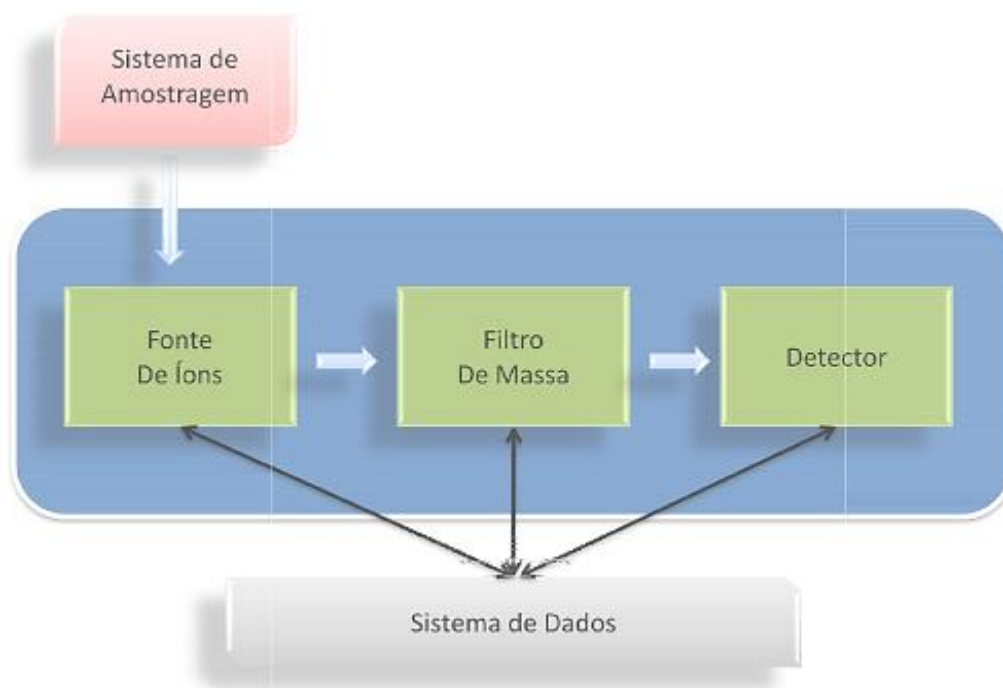


Figura 3 – Esquema representativo do funcionamento de um equipamento GC/MS/MS (Adaptado da referência [20])

A espectrometria de massa em *tandem* ou MS/MS é uma técnica que ao invés de utilizar apenas um analisador de massa para separar os íons da mesma razão por carga ( $m/z$ ) gerados pela fonte de ionização, recorre ao uso de dois ou mais estágios de análise de massa, os designados quadrupolos (Q1 e Q2). O primeiro analisador (Q1) funciona como um filtro de massa, usado para isolar o íon precursor, também denominado por íon pai. O segundo analisador (Q2) é usado para estabelecer uma relação entre o íon precursor isolado (obtido na fase anterior) e os íons produtos, vulgarmente designados por íons filhos, que foram gerados a partir de fragmentação induzida, com a colaboração de um gás inerte<sup>[21]</sup>. O espectrómetro de massa (figura 4) é composto por<sup>[22]</sup>:

- Fonte de íons → Ocorre a ionização dos analitos;
- Analisador → Separação dos íons;
- Detetor → Gera os sinais eléctricos que são mensuráveis.



**Figura 4 – Descrição básica do espectrômetro de massa (Adaptado da referência [23])**

A grande vantagem de um sistema MS em *tandem* prende-se com a possibilidade que este dispõe para monitorizar mais que um fragmento originado pelo ião precursor. Revela-se de extrema importância para se obter uma maior confirmação analítica, pois perante uma mistura complexa, os iões produtos (iões filhos) fornecem informações inequívocas sobre a presença de um certo composto.

O espectrômetro de massa mede a abundância de eletrões que é gerada pelos iões, para cada relação  $m/z$ . O espectro de massa obtido é resultado do registo de todas as cargas que são detectadas durante o varrimento, sendo que este pode ser programado para a aquisição de dados conforme os modos de operação: Varrimento Contínuo (Full Scan), Monitorização Seletiva de Iões (SIM) e Monitorização de Múltiplas Reações (MRM). No modo Scan, o espectrômetro de massa é programado de forma a analisar todas as massas do seu espectro de operação dentro de uma faixa determinada  $m/z$ . Em modo SIM, após a ionização ocorre a separação de apenas um ião específico, aumentando assim a sensibilidade. No modo de operação MRM, o espectrômetro é programado de modo a que dois ou mais iões sejam separados e fragmentados novamente. Através de MRM é possível efetuar-se a análise de multianalitos dentro de uma mesma análise, visto que permite a identificação e separação de cada transição monitorizada, destacando como grande vantagem uma maior seletividade <sup>[21]</sup>. Na figura 5 encontra-se representado o princípio de MS/MS.



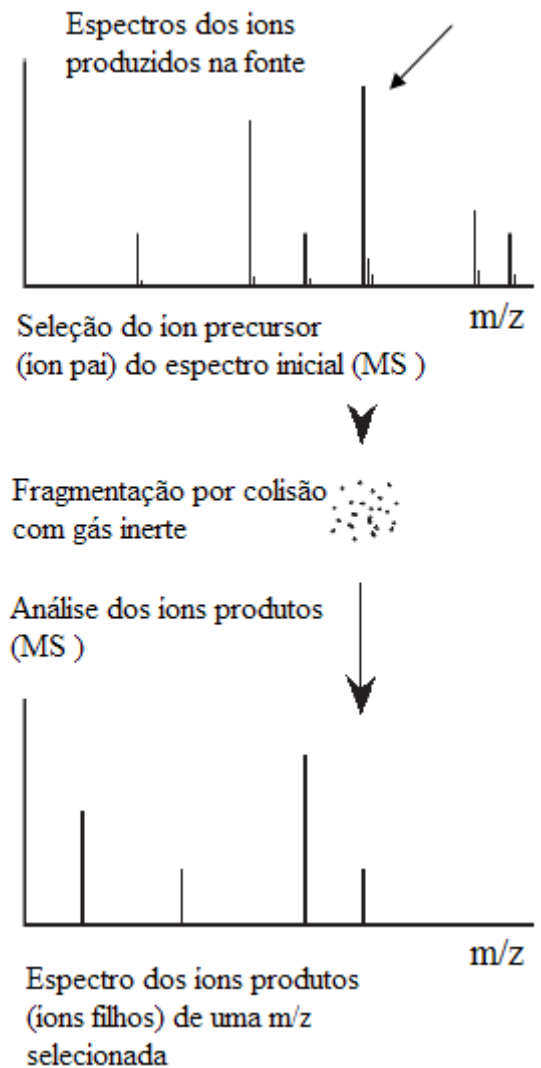


Figura 5 – Princípio de MS/MS (Adaptado da referência [24])

## 6. TÉCNICAS DE PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

Regra geral, as amostras biológicas analisadas por técnicas cromatográficas sofrem um pré-tratamento. Tal facto deve-se à incompatibilidade com os sistemas cromatográficos, devido a muitas das substâncias em análise se encontrarem em concentrações vestigiais e ainda à complexidade das matrizes envolvidas, podendo estas conter vários tipos de interferentes com propriedades semelhantes aos analitos de interesse <sup>[25]</sup>.

O tratamento prévio das amostras a analisar tem como objetivo o isolamento do composto de interesse, a fim de ser introduzido e separado num sistema cromatográfico com a sensibilidade e seletividade adequadas <sup>[26]</sup>.

As técnicas de preparação de amostras mais descritas para o isolamento e concentração dos analitos em amostras biológicas são: Extração Líquido-Líquido (LLE), Extração em Fase Sólida (SPE), e Microextração em Fase Sólida (SPME) e a Microextração em Seringa Empacotada (MEPS) <sup>[27]</sup>. Na tabela 6 apresento algumas vantagens e desvantagens das técnicas acima referidas, com exceção da MEPS que irei aprofundar posteriormente.

**Tabela 6 – Comparação entre as principais técnicas de extração <sup>[28]</sup>**

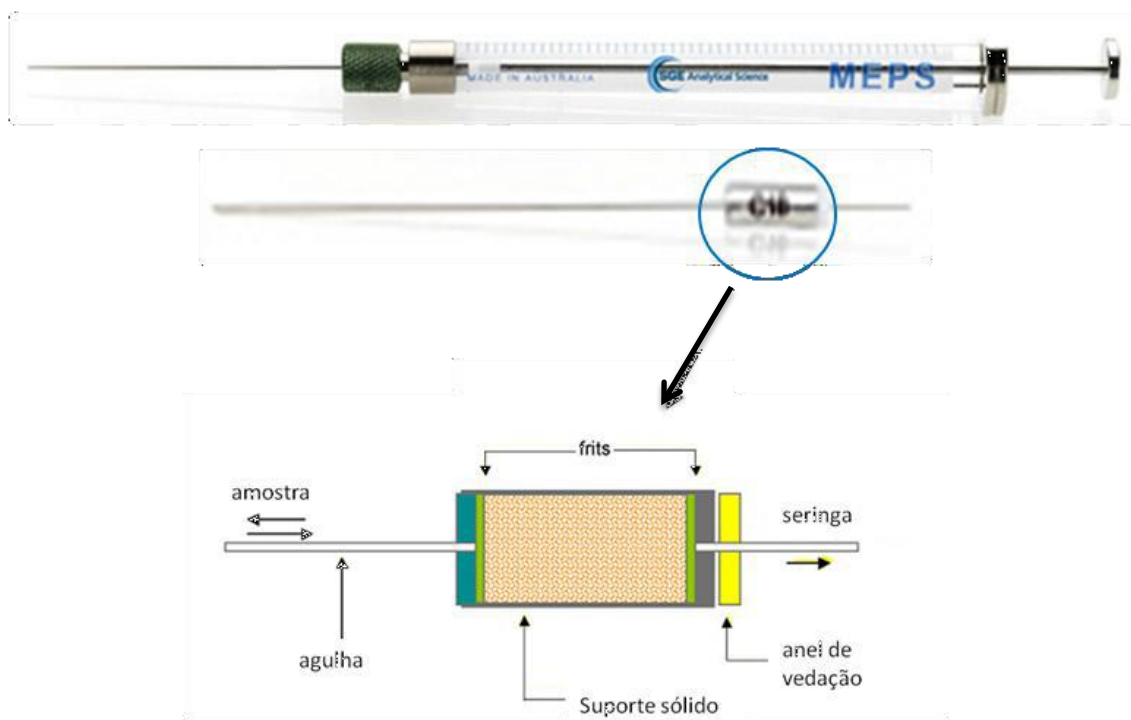
<b>Técnica</b>	<b>Princípios da técnica</b>	<b>Características da técnica</b>
Extração Líquido-Líquido (LLE)	Distribuição do analito entre dois líquidos imiscíveis em função de um coeficiente de partição.	Boa reprodutibilidade, fácil de manusear, utilizada para compostos pouco voláteis. Exige solventes puros e produz grandes quantidades de resíduos.
Extração em Fase Sólida (SPE)	Adsorção seletiva do analito em materiais sólidos e posterior dessorção com solventes. Segue os mecanismos da cromatografia em coluna clássica	Grande disponibilidade de materiais adsorventes, altas recuperações, baixo consumo de solventes. Cartuchos e os discos extractores tornam a técnica mais cara e mais complicada quando realizada manualmente.

<p>Microextração em Fase Sólida (SPME)</p>	<p>Distribuição do analito entre duas fases imiscíveis, onde a fase extratora é um polímero que reveste uma fibra de sílica.</p>	<p>Técnica versátil, com baixo consumo de solvente e utilização de pequena quantidade de amostra. As fibras de extração são reaproveitáveis. Os limites de quantificação são elevados e existem poucos materiais de extração disponíveis.</p>
--	--	---

### 6.1 MICROEXTRAÇÃO EM SERINGA EMPACOTADA (MEPS)

Em 2004, nos laboratórios Astra Zeneca, foi desenvolvida a técnica de extração MEPS, sendo esta um método muito promissor para a extração de drogas e metabolitos a partir de amostras biológicas <sup>[29]</sup>. A MEPS usa princípios básicos da SPE para obtenção de um processo simples e rápido, com o mínimo consumo de solventes e adsorventes, sendo assim considerada como a miniaturização da técnica convencional de SPE <sup>[30]</sup>.

O equipamento de extração MEPS que está disponível comercialmente consiste em duas partes, uma seringa de 100-250µL e um dispositivo cilíndrico (BIN – *Barrel Insert and Needle Assembly*). No dispositivo cilíndrico encontra-se a fase estacionária, onde está empacotado cerca de 1mg de um material sólido, protegido por dois discos (*frits*) quimicamente inertes de politetrafluoroetileno (PTFE), polietileno ou estruturas de aço inoxidável <sup>[31]</sup> (figura 6). Devido à extração por MEPS ocorrer num dispositivo cilíndrico, esta pode ser designada como uma «pequena coluna de cromatografia líquida inserida numa seringa». Esta extração baseia-se num sistema de passagem dupla, no qual a amostra é aspirada várias vezes pela fase estacionária, favorecendo desta forma a retenção dos analitos no suporte sólido. No fim da extração, o material sólido é lavado com um solvente antes de se efetuar a eluição dos compostos pretendidos <sup>[32]</sup>.



**Figura 6 – Seringa de MEPS e representação esquemática da coluna de extração (Adaptado da referência [33])**

Um dos aspetos favoráveis do uso desta técnica é o reduzido volume de solvente que é utilizado na eluição dos analitos, proporcionando assim a sua injeção diretamente em sistemas cromatográficos, o que vai facilitar o acoplamento *on-line* a estes sistemas [33].

A MEPS, quando comparada com técnicas de extração como a LLE e a SPE, apresenta diversas vantagens. Revela-se uma técnica totalmente automatizada, visto que permite que os passos de processamento de amostras, extração e injeção possam ser realizados *on-line* usando a mesma seringa. Demonstra também ser uma técnica de extração rápida, permitindo a preparação de uma amostra em apenas dois ou três minutos [31].

Com respeito ao suporte sólido de MEPS, verifica-se que este traz vantagens à técnica pois pode ser reutilizado várias vezes após a etapa de lavagem. Pode utilizar-se uma coluna de MEPS mais de 100 vezes com amostras de plasma ou urina e mais de 400 vezes no caso das amostras de água, sendo que tal não se verifica com as colunas de SPE, uma vez que são de uma só utilização [29]. Por outro lado, o consumo de solventes orgânicos, quer na solução de lavagem quer na solução de eluição, é mínimo, tendo por isso um baixo custo por análise.

### 6.1.1 Mecanismo de extração

A MEPS consiste em remover compostos interferentes que estejam presentes numa matriz, permitindo em simultâneo o isolamento e a concentração seletiva dos analitos. No processo de MEPS, há passagem da amostra líquida, por meio de aspirações, por uma coluna que contém no seu interior o sólido adsorvente; deste modo o analito fica retido na fase sólida, isolado da matriz, sendo que os interferentes são eliminados por limpeza da coluna. Seguidamente, o composto de interesse é eluído da coluna por intermédio de um solvente orgânico, levando desta forma à obtenção de um extrato onde os analitos estão concentrados <sup>[34, 35]</sup>.

Os mecanismos de extração básicos que existem são: fase reversa, fase normal, troca iónica e exclusão molecular, citando-se a fase reversa como o modo de separação mais usado em MEPS. Num mecanismo de extração de fase reversa a fase estacionária que se utiliza é apolar, isto é, as partículas adsorventes são hidrofóbicas. São exemplos desta fase estacionária, a sílica ligada a grupos octadecilsilano (C<sub>18</sub>), a grupos etilsilano (C<sub>2</sub>) ou a grupos octilsilano (C<sub>8</sub>). É comum o uso de solventes de eluição apolares, no entanto podem ser usados solventes polares, metanol ou acetonitrilo <sup>[25]</sup>.

Os materiais adsorventes usados em MEPS são em grande parte dos casos constituídos por sílica, sendo estes semelhantes aos encontrados nas colunas cromatográficas. A sílica é um material sólido, amorfo e poroso, que apresenta a superfície química ocupada por grupos hidroxilo, designados de silanol. Estes encontram-se no final da cadeia do polímero, sendo responsáveis pelas propriedades químicas da sílica e pela ligação dos vários compostos <sup>[36]</sup>.

Os grupos silanol isolados são os principais responsáveis pela maior parte dos processos de adsorção, em MEPS. Estes conseguem reter fortemente os compostos com grupos funcionais polares e fazer com que dificilmente ocorra a sua eluição <sup>[27]</sup>.

### 6.1.2 Etapas do processo de extração

A extração por MEPS compreende as seguintes etapas (como ilustra a figura 7) <sup>[29]</sup>.

- 1ª Etapa → Acondicionamento da fase estacionária;
- 2ª Etapa → Aspiração da amostra (adsorção do analito ao adsorvente);
- 3ª Etapa → Lavagem da fase estacionária (eliminação de possíveis interferentes);

- 4ª Etapa → Eluição dos analitos;
- 5ª Etapa → Injeção no sistema cromatográfico.

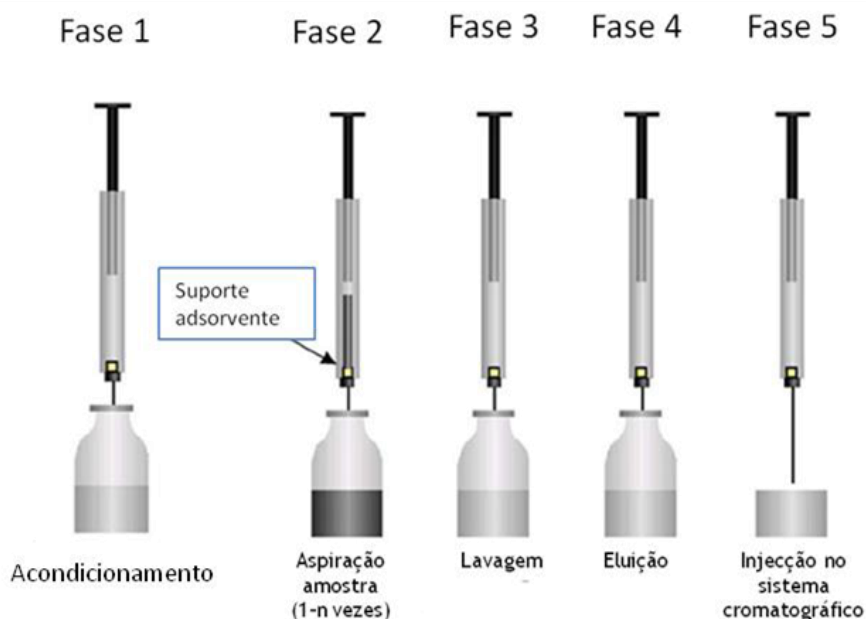


Figura 7 – Etapas do processo de extração em MEPS (Adaptado da referência [29])

No acondicionamento da fase estacionária (1ª etapa), o suporte sólido é ativado com um solvente adequado, normalmente usa-se o metanol, que vai solvatar os grupos funcionais da fase estacionária permitindo assim a retenção dos analitos. O ar que se encontra presente na coluna é removido e os espaços vazios são preenchidos pelo solvente. Terminada a passagem do solvente, é aplicada na coluna água ou tampões aquosos de modo a manter o equilíbrio químico [37].

Seguidamente, a amostra, que se encontra diluída num solvente fraco (nomeadamente em água), entra em contacto com a seringa sendo aspirada por esta (2ª etapa), a fim de os analitos ficarem retidos na fase estacionária, retenção esta que é devida às interações específicas com o adsorvente. Normalmente, este processo é realizado com sucessivas repetições, de forma a garantir a concentração dos analitos no interior da seringa [31].

A 3ª etapa diz respeito à lavagem da coluna, sendo esta efetuada com a finalidade de remover proteínas e outros interferentes que possam estar presentes na amostra. Nesta fase os solventes a utilizar devem ser miscíveis com a fase estacionária, devendo ainda ter pouca afinidade para os analitos, de forma a evitar que estes sejam removidos da fase estacionária [38]. Habitualmente, utiliza-se água e tampões, além de solventes orgânicos diluídos na solução de lavagem, de modo a eliminar os interferentes

mais hidrofóbicos de forma mais eficiente. Esta etapa da extração revela ser crítica, visto que o analito não pode ser eluído em conjunto com os interferentes, devendo sim permanecer retido na fase estacionária.

Por fim os analitos são eluídos com um solvente orgânico (4ª etapa), solvente esse pelo qual os analitos têm afinidade, como é o caso do metanol e são injectados diretamente no sistema cromatográfico (5ª etapa). Neste caso, os solventes ou a mistura de solventes adequados devem ser capazes de quebrar a interação adsorvente-analito, provocando deste modo a eluição dos analitos <sup>[37, 38]</sup>.

## 7. PROCESSO DE DERIVATIZAÇÃO

---

Como forma de auxiliar na determinação de compostos polares por GC/MS/MS é necessário a utilização do processo de derivatização, pois este permite a modificação da funcionalidade da molécula, conferindo-lhe algumas propriedades, como o aumento da sua volatilidade, diminuição da polaridade e melhoria da sua estabilidade. A derivatização permite ainda a redução da adsorção do analito no GC, trazendo benefícios ao nível da resposta no detetor e possibilitando uma separação mais eficiente dos picos cromatográficos.

Para se efetuar a escolha do reagente derivatizante a ser utilizado, é preciso ter em conta o grupo funcional que se quer derivatizar, seja ele uma amina, um ácido carboxílico, uma cetona, um aldeído ou um álcool, a estrutura química e as propriedades da molécula. O aumento do número de grupos derivatizados na molécula, pode trazer uma desvantagem, a massa molecular da substância derivatizada pode vir a encontrar-se fora da gama do espectrómetro de massa <sup>[39]</sup>.

Na seleção do reagente derivatizante, devem ser utilizados alguns critérios de seleção, que funcionam como diretrizes, são eles <sup>[40]</sup>:

- Reação de derivatização completa → 95-100%;
- Durante a formação do derivado → Não deve causar rearranjo ou alteração estrutural na amostra;
- Obtenção de um derivado que seja estável em relação ao tempo da reação.

A eficiência de um processo de derivatização depende de vários fatores, incluindo as condições em que a reação ocorre como o tempo e a temperatura, a natureza dos reagentes e dos solventes e as características do meio de secagem do extrato (por evaporação em atmosfera de azoto). Contudo, a concentração é sempre uma operação extremamente delicada, devendo ser realizada de forma lenta e cuidadosa, de modo a evitar perdas de analito por projeção ou acumulação nas paredes dos *vials* de reação <sup>[41]</sup>.

### 7.1 PRINCIPAIS REAÇÕES DE DERIVATIZAÇÃO

Os métodos mais usualmente empregados para a derivatização são: a alquilação, a acilação e a sililação, ocorrendo uma substituição do hidrogénio dos grupos polares, como, NH,OH e SH por grupos alquilo, acilo e sililo, respetivamente. A volatilização das amostras tem um aumento significativo, graças a estes processos de substituição. Na



tabela 7 encontra-se, de forma sucinta, as características das reações de derivatização atrás referidas.

Tabela 7 – Características das reações de derivatização <sup>[41]</sup>

Reação de derivatização	Descrição
Sililação	<ul style="list-style-type: none"><li>• Volatilização rápida da amostra</li><li>• Reação mais utilizada</li></ul>
Alquilação	<ul style="list-style-type: none"><li>• Utilizada como primeiro passo para futuras derivatizações ou como método de proteção de determinados átomos de hidrogénio ativos</li></ul>
Acilação	<ul style="list-style-type: none"><li>• Geralmente utilizada para adicionar grupos fluorados ao analito ou analitos.</li></ul>

A reação de sililação é a mais utilizada ao nível das amostras de GC, de tal forma que no trabalho que estive a desenvolver no CICS também foi esta a reação de derivatização que utilizei para derivatizar os analitos. Posto isto, é importante conhecer as suas propriedades, bem como o seu mecanismo de ação.

A sililação produz derivados de silil- que são mais voláteis e termicamente estáveis. Durante esta reação, os hidrogénios ativos são substituídos por grupos trimetilsilil (TMS), por meio de ataque nucleofílico  $SN_2$ . É de realçar que quanto melhor for o grupo abandonante, melhor é o processo. Ou melhor, o sucesso da reação de sililação depende do grupo abandonante, isto é, um grupo com baixa basicidade, capacidade de estabilizar uma carga negativa no estado transicional e pouca ou mesmo nenhuma ligação entre o grupo abandonante e o átomo de silício. Os reagentes de sililação reagem primeiramente com água e álcoois, daí que seja necessário garantir que tanto o extrato como os solventes estão completamente secos. Estes tipos de reagentes devem ser o mais puros possível, de modo a eliminar um excesso de picos cromatográficos. Quanto ao volume de reagente derivatizante, este deve ser o menor possível de forma a evitar a saída de grandes picos de solvente, o que pode ir dificultar a própria deteção dos analitos. É de evidenciar o cuidado a ter na injeção de reagentes de sililação, pois estes não devem ser injetados em colunas que tenham hidrogénios ativos na fase estacionária, uma vez que vão ser derivatizados <sup>[41]</sup>.

A reação de sililação apresenta algumas vantagens como a capacidade de siliar uma grande variedade de compostos, existência de um grande número de reagentes

disponíveis e é ainda de fácil preparação. Ainda assim, apresenta como desvantagem o facto de os reagentes serem uma mistura sensível, o que leva a que tenham de ser usados solventes orgânicos apróticos, ou seja, que não tenham protões disponíveis <sup>[41]</sup>.

O reagente mais versátil e comum é o N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) com 5% de trimetilclorosilano (TMCS), vulgarmente conhecido por MSTFA-TMCS. Os produtos resultantes desta reação são mais voláteis e apresentam-se termicamente mais estáveis. Este reagente foi o eleito para ser utilizado no projeto desenvolvido para os antipsicóticos, de acordo com a bibliografia de suporte existente consultada.

## 8. DETERMINAÇÃO DE ANTIPSICÓTICOS EM MATRIZES AQUOSAS COM USO DE MEPS E GC/MS/MS

### 8.1 FÁRMACOS SELECIONADOS PARA O ESTUDO

Para a realização deste estudo foram selecionados os seguintes fármacos antipsicóticos: Haloperidol (HAL), Quetiapina (QTP), Olanzapina (OLZ), Clozapina (CLZ), Levomepromazina (LVMP), Clorpromazina (CPZ) e a Ciamemazina (CYA). É importante referir que a CPZ, o HAL, a LVMP e a CYA são fármacos de primeira geração, ao passo que os restantes são de segunda geração. Nesta etapa, é necessário ter em conta aspetos de natureza físico-química, uma vez que o seu conhecimento é fundamental, para uma escolha assertiva quanto ao método de preparação e quantificação dos analitos. Deste modo, pode dizer-se que grande parte dos antipsicóticos é semelhante no que alude às propriedades químicas, onde se salienta a elevada lipofilia, o elevado peso molecular e a basicidade.

#### 8.1.1 Propriedades físico-químicas

Os fármacos antipsicóticos escolhidos para o estudo, englobam os de primeira e os de segunda geração. Nos de primeira geração destacam-se a CPZ, o HAL, a LVMP e a CYA. Ao passo que nos de segunda geração salientam-se a CLZ, a OLZ e a QTP [42]. A tabela que se segue (tabela 8) resume algumas características dos fármacos que foram selecionados para o estudo.

Tabela 8 – Caracterização das propriedades químicas dos fármacos em estudo [43]

Denominação Comum Internacional (DCI)	Classificação estrutural química	Peso molecular (g/mol)	pK <sub>a</sub> (25°C)
<b>Antipsicóticos de 1<sup>a</sup> geração</b>			
<b>CPZ</b>	Fenotiazina alifática	318,9	9,3
<b>CYA</b>	Fenotiazina	323,5	8,7
<b>HAL</b>	Butirofenona	375,9	8,3
<b>LVMP</b>	Fenotiazina alifática	328,5	9,2
<b>Antipsicóticos de 2<sup>a</sup> geração</b>			
<b>QTP</b>	Dibenzotiazepina	383,5	6,8
<b>OLZ</b>	Tienobenzodiazepina	312,4	7,4
<b>CLZ</b>	Dibenzodiazepina	326,8	9,8

### 8.1.2 Farmacocinética

Os fármacos antipsicóticos, regra geral, são altamente lipofílicos, ligando-se às membranas e proteínas plasmáticas em grande extensão. A sua distribuição é efetuada rapidamente na maioria dos tecidos bem irrigados e podem sofrer acumulação, caso apresentem elevados volumes de distribuição. Na sua maioria, os antipsicóticos são amplamente metabolizados, numa primeira fase pelo sistema de enzimas hepáticas do citocromo P450 (CYP450). Outro aspeto importante é o facto de a maioria dos antipsicóticos apresentarem tempos de semivida de eliminação, entre as 20 e as 40 horas, com exceção da QTP, que apresenta um tempo de semivida de eliminação mais curto <sup>[44]</sup>. A tabela 9 ostenta a informação pertinente acerca dos parâmetros farmacocinéticos dos antipsicóticos em estudo.

Tabela 9 – Parâmetros farmacocinéticos dos fármacos antipsicóticos em estudo <sup>[44]</sup>

Fármaco	Biodisponibilidade (%)	Tempo de semivida (t <sub>1/2</sub> ) (h)	Intervalo terapêutico (ng/mL)	Principais vias metabólicas
<b>Antipsicóticos de 1ª geração</b>				
<b>CPZ</b>	10 - 30	8 - 35	30 - 300	CYP3A4
<b>CYA</b>	-	10	n.d.	Hepáticas
<b>HAL</b>	40 - 70	12 - 36	5 - 15	CYP1A2, CYP2D6, CYP3A4
<b>LVMP</b>	50 - 60	20	20 - 150	Hepáticas
<b>Antipsicóticos de 2ª geração</b>				
<b>QTP</b>	9 ± 4	6 - 88	25 - 500	CYP3A4
<b>OLZ</b>	80	20 - 70	20 - 80	CYP1A2, CYP3A4
<b>CLZ</b>	12 - 81	11 - 105	200 - 600	CYP1A2, CYP3A4, CYP2C19

### 8.2. DETERMINAÇÃO DE ANTIPSICÓTICOS EM MATRIZES AQUOSAS

No processo de determinação de antipsicóticos podemos encontrar descritos em vários artigos, vários métodos utilizando amostras biológicas como sangue total, plasma, soro, tecido cerebral e a urina. Consideram-se matrizes biológicas

convencionais o sangue e seus derivados, bem como a urina. Por outro lado, temos amostras alternativas que são utilizadas na análise clínica, toxicológica e forense, de onde se destacam o cabelo, o fluido oral, o suor e o mecônio <sup>[45]</sup>.

No presente trabalho o objetivo é utilizar uma matriz aquosa para determinação dos antipsicóticos selecionados, tendo em conta que a maioria dos artigos prende-se com a determinação destes em matrizes biológicas, concretamente o plasma humano.

Um dos principais problemas na monitorização de fármacos em águas residuais e superficiais, é a falta de métodos eficazes para análise simples, de baixo custo e com sensibilidade para quantificar os fármacos com concentrações na ordem de ng/L e µg/L. Atualmente, têm sido feitos avanços notórios ao nível do desenvolvimento de novos métodos de análise, que permitem a quantificação de fármacos em concentração vestigiais. Além disso, a maior dificuldade que se encontra na análise de fármacos em matrizes aquosas, prende-se com a complexidade das amostras, vindo deste modo reforçar a necessidade de técnicas analíticas com limites de quantificação mais baixos e resolução mais elevada. Entende-se que a etapa fulcral para este tipo de análise, reside na preparação da amostra <sup>[46]</sup>.

Como forma de sustentar o trabalho a ser realizado, várias foram as pesquisas bibliográficas das quais resultou a tabela que se encontra no anexo I, onde resume os vários métodos que têm sido publicados para a determinação de antipsicóticos, no entanto, referentes a matrizes biológicas. Por outro lado, como a técnica de MEPS era uma opção inovadora para matrizes aquosas, houve também necessidade de realizar uma pesquisa nesse sentido (anexo II), a fim de se perceber qual o volume de amostra a utilizar, bem como o número de aspirações a serem efetuadas.

### 8.3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 8.3.1 Equipamentos

- Balança analítica da Sartorius – modelo CP225;
- Vortex Mixer da Labnet International – modelo 230V;
- Bloco de aquecimento »Tembloc» da J.P. Selecta, S.A.;
- Bomba de vácuo da GAST – modelo DOA-P505-BN (EUA);
- Sistema de purificação de água Milli-Q Advantage A10<sup>®</sup> System da Millipore;
- Câmara frigorífica da Dagard – refrigeração a 4°C;

- Micropipetas automáticas da Gilson de 10, 100, 1000 e 5000 $\mu$ L;
- Coluna de MEPS SGE – Analytical Science, adquirida à ILC;
- Fases estacionárias – M<sub>1</sub> (suporte de troca catiónica – 80% C<sub>8</sub> e 20% SCX)

### 8.3.2 Reagentes

- Água purificada – água Milli-Q;
- Hidróxido de amónio 24,5% *pro analysi*, J.T. Baker;
- Metanol 99,8% HPLC grade, Merck Co;
- Ácido acético glacial HPLC grade, Merck Co;
- Trimetilclorosilano (TMCS) Macherey-Nagel, Panreac;
- N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida (MSTFA) Macherey-Nagel, Panreac;
- Soluções stock dos compostos (antipsicóticos em estudo).

### 8.3.3 Preparação das Soluções

As soluções de trabalho, obtidas por diluição com metanol a partir das soluções stock, contendo uma mistura de todos os compostos em estudo, já se encontravam preparadas, uma vez que já haviam sido utilizadas em trabalhos anteriores. Desta forma, não houve necessidade de preparar mais soluções de trabalho, sendo que utilizei as soluções de concentrações de 0,1 $\mu$ g/mL, 1,0 $\mu$ g/mL e 10 $\mu$ g/mL. É importante referir que para os compostos HAL e OLZ as concentrações destes eram, 0,02 $\mu$ g/mL, 0,2 $\mu$ g/mL e 2 $\mu$ g/mL, respetivamente. Todas estas soluções se encontravam armazenadas a 4°C.

Preparação da solução de ácido acético a 5% em H<sub>2</sub>O: Para um balão volumétrico de 10mL de capacidade, pipetaram-se 9,5mL de água e adicionaram-se 0,5mL de ácido acético glacial. Homogeneizou-se a solução por inversão.

Preparação da solução de metanol a 10% em H<sub>2</sub>O: Para um balão volumétrico de 10mL de capacidade, pipetaram-se 9mL de água e adicionaram-se 1mL de metanol. Homogeneizou-se a solução por inversão.

Preparação da solução metanólica de amónia a 5%: Para um balão volumétrico de 10mL de capacidade, pipetaram-se 9,5mL de metanol e adicionaram-se 0,5mL de hidróxido de amónio. Homogeneizou-se a solução por inversão.

Preparação do reagente de derivatização, MSTFA-TMCS: Para um frasco com capacidade de 100mL, pipetaram-se 20mL de MSTFA e adicionaram-se 1mL de

TMCS. Homogeneizou-se a solução por inversão. A solução foi protegida da luz e armazenada a 4°C.

### 8.3.4 Sistema cromatográfico e condições cromatográficas

Para se efetuar a análise cromatográfica utilizou-se um sistema de GC, HP 7890 A (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), equipado com um espectrómetro de massa de triplo quadrupolo, modelo 7000B, um *autosampler* MPS2 e um injetor PTV da Gerstel (Mülheim na der Ruhr, Germany). Utilizou-se uma coluna capilar (30m x 0,25mm I.D., 0,25µm de espessura do filme) com 5% de fenilmetilsiloxano (HP-5 MS), fornecida por J&W Scientific (Folsom, CA) [47].

Com o intuito de se obter uma eficiência de separação adequada desenvolveu-se um programa de temperaturas da coluna: a temperatura inicial do forno foi de 120°C durante 2 minutos, seguindo-se um aumento de 20°C/min até atingir a temperatura final de 300°C. O tempo total de corrida cromatográfica foi de 14,25 minutos. A temperatura do injetor e do detetor foram de 250°C e 280°C, respetivamente. Utilizou-se o hélio como gás de arraste, a um fluxo constante de 0,8mL/min. O espectrómetro de massa foi utilizado com uma corrente de filamento de 35µA e uma energia de 70eV. O azoto foi usado como gás de colisão com um caudal de 2,5mL/min.

### 8.3.5 Procedimento de extração otimizado

O procedimento de extração foi previamente otimizado, de forma que seguidamente serão descritas as condições finais. Fortificou-se a amostra de água purificada com 25µL de padrão interno e 50µL de compostos (antipsicóticos), para um volume total de 5mL. Agitou-se durante 30 segundos e procedeu-se à extração por MEPS. A extração por MEPS otimizada consistia nos seguintes passos:

1. Acondicionamento da coluna de extração com 3x250µL de metanol e 250µL de água purificada;
2. Aspirar os compostos (amostra) 24x250µL;
3. Lavagem da coluna com 100µL de solução de ácido acético a 5% e 100µL de solução de metanol a 10%;
4. Eluição dos compostos com 1000µL de solução metanólica de amónia a 5%;

Após cada extração procedeu-se à lavagem da fase estacionária com 5x250µl de metanol e 5x250µL de água purificada, evitando assim efeitos de arrastamento (*carry over*) e acondicionando a coluna para a próxima extração.

Os extratos obtidos eram evaporados à secura sob uma corrente de azoto, seguidamente adicionava-se 65µL de reagente de derivatização (MSTFA-TMCS). Este procedimento era realizado a 85°C durante 20 minutos e depois procedia-se à injeção no sistema cromatográfico.

## 8.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 8.4.1 Identificação dos compostos

Como a determinação de antipsicóticos já havia sido feita, no CICS, em matrizes biológicas <sup>[47]</sup>, o meu trabalho mostrou-se simplificado ao nível da construção do método cromatográfico. Deste modo, apenas necessitei de injetar os compostos para visualizar os seus tempos de retenção e se saíam nas transições já definidas anteriormente. Na tabela 10 são apresentados os tempos de retenção e as transições para cada um dos antipsicóticos estudados.

**Tabela 10 – Antipsicóticos em estudo e respetivos tempos de retenção e transições (transições quantitativas a sublinhado)**

Analito	Tempo de retenção (minutos)	Transições
<b>Promazina (PRZ)</b>	6,55	<u>198,5</u> →167,1
<b>Protriptilina (PTP)</b>	6,64	<u>116,2</u> →116,1
<b>Clorpromazina (CPZ)</b>	7,04	318,5→233,2 / <u>318,5</u> →272,0
<b>Levomepromazina (LVMP)</b>	7,10	<u>242,0</u> →210,2 / 242,0→227,1
<b>Olanzapina (OLZ)</b>	7,30	<u>301,8</u> →285,1 / 301,8→286,1
<b>Ciamemazina (CYA)</b>	7,38	323,7→100,2 / <u>323,7</u> →277,3
<b>Clozapina (CLZ)</b>	8,69	<u>255,7</u> →227,1 / 255,7→239,1
<b>Haloperidol (HAL)</b>	9,05	296,4→103,2 / <u>296,4</u> →296,3
<b>Quetiapina (QTP)</b>	11,85	321,8→253,1 / <u>321,8</u> →279,1

A PTP e a PRZ são usadas como padrão interno. Estas são adicionadas à nossa amostra a uma concentração constante, como forma de minimizar as perdas de composto durante o processo extrativo. De forma a garantir que o seu comportamento durante todo o processo seja semelhante, o padrão interno deverá ter características físico-químicas o mais semelhantes possíveis aos dos compostos em estudo.



#### 8.4.2 Otimização do processo extrativo

Ao efetuar a pesquisa bibliográfica, verificou-se que ainda não existia qualquer informação acerca da extração de antipsicóticos em água por MEPS, sendo que, uma vez que a técnica de extração por MEPS apresenta várias vantagens em relação às outras técnicas preparativas, optou-se pelo seu uso no estudo em causa.

A eficiência da extração por MEPS pode ser afetada por um vasto leque de variáveis experimentais como:

- Tipo de coluna;
- Diluição da amostra;
- Aspiração da amostra pelo dispositivo;
- Percentagens de solventes na ativação e lavagem da coluna;
- Volume de eluição.

De forma a obter-se um melhor rendimento na extração dos antipsicóticos em amostras de água, optou-se por se efetuar um desenho experimental ou *Design of Experiments* (DOE).

#### 8.4.3 Desenho experimental

Quando se efetua o desenvolvimento de um método analítico tem de se ter noção que é a tarefa que mais tempo consome num laboratório, sendo que, para que seja possível o seu desenvolvimento, é necessário o gasto de muitos materiais e reagentes, o que acaba por tornar este procedimento algo moroso e dispendioso. No entanto, quando se desenvolve um método pode ser considerado o desenvolvimento do método usando uma abordagem de tentativa-erro ou por análise de um fator de cada vez (análise univariada). Na análise univariada, a otimização do método envolve a mudança de um dos fatores a ser analisado, ao passo que todos os outros se mantêm constantes. Este tipo de procedimento é bastante moroso e trabalhoso, especialmente se houver necessidade de avaliar vários fatores, o que pode levar a conclusões erróneas uma vez que as interações entre os vários fatores não são tidas em conta<sup>[48]</sup>.

O DOE é uma ferramenta estatística que permite o planeamento de todo o processo, permite avaliar de forma multivariada os diversos fatores intervenientes, minimizando os efeitos dos fatores não controlados e o número de experiências. A análise multivariada propicia a obtenção de melhores resultados, assim como o uso racional dos recursos a utilizar, o que permite aos laboratórios poupar no tempo e no

dinheiro. Para a realização deste estudo, recorreu-se à utilização do programa estatístico Minitab<sup>®</sup>, versão 16.

Os fatores susceptíveis de influenciar a MEPS são vários, como já referi anteriormente, no entanto para este trabalho concluímos que apenas o número de aspirações da amostra e o volume de eluição poderiam ser fatores de influência na eficiência do processo extrativo. Neste sentido, gerou-se uma matriz no programa estatístico Minitab<sup>®</sup>, onde os fatores em estudo eram o volume de eluição e o número de aspirações, sendo que para cada um deles se definiu um máximo e um mínimo, de forma a ser gerado pelo programa um ponto intermédio a ser repetido três vezes. Na tabela 11 encontra-se a matriz gerada pelo Minitab<sup>®</sup>, mediante os dados inseridos.

**Tabela 11 – Matriz do DOE**

Ordem de execução	Número de aspirações	Volume de eluição (µL)
1	6	1000
2	15	600
3	15	600
4	15	600
5	24	200
6	24	1000
7	6	200

Mediante a ordem proposta pela matriz de DOE, efetuaram-se as várias extrações e analisaram-se os resultados obtidos. Nas tabelas 12 e 13 encontram-se as áreas dos picos dos compostos e as razões das áreas dos padrões internos com os compostos, respetivamente. Na tabela 13 também constam os cálculos da média, desvio padrão e coeficiente de variação, efetuados para as três experiências com o ponto intermédio.

**Tabela 12 – Áreas dos picos obtidos para cada composto**

Ordem	Área de PTP	Área de PRZ	Área de LVMP	Área de CLZ	Área de HAL	Área de OLZ	Área de CPZ	Área de QTP	Área de CYA
1	693731	103569	660137	64202	424566	1337	243576	42480	69680
2	694250	107102	643005	53075	708431	581	231124	74841	99194
3	1026472	149585	1910574	389314	1556939	1605	646459	280109	210172
4	916853	117429	1465419	219903	1250128	1391	496046	177968	171832
5	1307226	151415	1937035	728033	1846799	2934	582939	263840	233656
6	1777740	150928	2771881	1208847	2313360	3755	921036	494937	322656
7	1135765	128532	793176	73729	679530	693	313571	84991	97459

**Tabela 13 – Resultados referentes às razões entre o padrão interno e os compostos**

Ordem \ Razão	CPZ/PTP	CPZ/PRZ	LVMP/PRZ	OLZ/PTP	CYA/PTP	CLZ/PTP	CLZ/PRZ	HAL/PTP	QTP/PRZ
1	0,35111	2,35182	6,37388	0,00192	0,10044	0,09254	0,61989	0,61200	0,41016
2	0,33291	2,15798	6,00366	0,00083	0,14288	0,07644	0,49555	1,02042	0,69878
3	0,62978	4,39570	12,99126	0,00156	0,20475	0,37739	2,60262	1,51678	1,87257
4	0,54103	4,07038	12,02474	0,00151	0,18741	0,25631	1,87264	1,36349	1,51553
5	0,44593	3,84994	12,79288	0,00224	0,17874	0,55692	4,80819	1,41276	1,74249
6	0,51809	6,10248	18,36558	0,00211	0,18149	0,67999	8,00942	1,30129	3,27929
7	0,27608	2,43963	6,17103	0,00061	0,08581	0,06491	0,57362	0,59830	0,66124
Média	0,58541	4,23304	12,50800	0,00154	0,19608	0,31685	2,23763	1,44014	1,69405
Desvio padrão	0,06276	0,23003	0,68343	3,29E-05	0,01225	0,08561	0,51617	0,10839	0,25246
Coefficiente de variação	10,7207	5,43426	5,46401	2,13282	6,25192	27,0194	23,0678	7,52639	14,9029

Por análise dos resultados obtidos na tabela 13, concluiu-se que se a experiência 2 fosse eliminada, o coeficiente de variação era aceitável para todos os compostos, à exceção da CLZ, pois para essa os resultados obtidos não foram os mais favoráveis. Os resultados obtidos foram considerados satisfatórios, uma vez que com exceção da CLZ a precisão obtida foi aceitável, como revela o coeficiente de variação.

Com base nas razões efetuou-se a análise estatística dos dados, onde se realizou os diagramas dos efeitos de Pareto, os gráficos dos efeitos principais e os gráficos de interações entre os vários fatores para cada um dos compostos estudados.

No anexo 3, apresentam-se os diagramas dos efeitos de Pareto obtidos. Nestes diagramas os efeitos de cada um dos fatores dispõem-se por ordem decrescente de magnitude, sendo eles representados por barras horizontais. Se um dos efeitos exceder a linha vermelha representada no diagrama (nível de significância de 5%) é considerado estatisticamente significativo, ou seja, vai causar influência na resposta. Depois de

analisar todos os diagramas, concluiu-se que apenas na razão CLZ/PRZ há influência por parte do número de aspirações, ou seja, a variação do número de aspirações influencia a resposta.

Analisando os gráficos dos efeitos principais (anexo IV), observamos que, de um modo geral, as condições que originam melhores respostas para todos os compostos são aquelas em que se efetuam 24 aspirações da amostra e cujo volume de eluição é de 1000µL. A tabela 14 resume os resultados obtidos nestes gráficos.

**Tabela 14 – Resumo dos resultados obtidos nos gráficos dos efeitos principais**

Razões	Nº de aspirações	Volume de eluição (µL)
<b>CPZ/PRZ</b>	24	1000
<b>CPZ/PTP</b>	15	600
<b>LVMP/PRZ</b>	24	1000
<b>OLZ/PTP</b>	24	1000
<b>CYA/PTP</b>	24	600
<b>CLZ/PRZ</b>	24	1000
<b>CLZ/PTP</b>	24	1000
<b>HAL/PTP</b>	24	600
<b>QTP/PRZ</b>	24	1000

Por fim, procedeu-se à análise dos gráficos de interações (anexo V) e verificou-se, que para todos os compostos, não existem interações entre o volume de eluição e o número de aspirações.

Estes foram os resultados obtidos no DOE, no entanto, o DOE foi repetido duas vezes devido aos resultados desfavoráveis obtidos no primeiro DOE que se efetuou. Ainda assim, no segundo DOE os resultados foram favoráveis e possibilitou o avanço do estudo.

#### **8.4.4 Limites de deteção**

O limite de deteção (LD) é definido como sendo a menor quantidade do analito presente numa amostra que pode ser detetada, porém não tem de ser necessariamente quantificada, sob condições experimentais estabelecidas. Os critérios para os limites de deteção dos métodos foram estabelecidos pela relação sinal/ruído (S/N) igual a 3, mediante a análise de concentrações decrescentes dos analitos. <sup>[23]</sup>

Deste modo, o LD de um método analítico é definido como a mais baixa concentração de analito presente numa amostra, claramente distinguível do branco, podendo esta ser detetada visualmente, sem ter de ser necessariamente quantificada.

Neste sentido, para a determinação do LD foram analisadas quatro réplicas para a concentração de 1ng/mL para todos os compostos, com exceção do HAL e da OLZ com concentração de 0,2ng/mL e ainda outras quatro réplicas com concentração de 2ng/mL para todos os compostos, com exceção do HAL e da OLZ com concentração de 0,4ng/mL. Na tabela 15 encontram-se os valores obtidos para o LD referente a cada analito.

**Tabela 15 – Resumo dos limites de deteção para os analitos em estudo**

<b>Analito</b>	<b>LD (ng/mL)</b>
<b>Levomepromazina</b>	1
<b>Clozapina</b>	1
<b>Haloperidol</b>	0,2
<b>Olanzapina</b>	0,4
<b>Clorpromazina</b>	1
<b>Quetiapina</b>	1
<b>Ciamemazina</b>	1

#### **8.4.5 Recuperação da fase de extração (Eficiência da extração)**

O ensaio de recuperação constitui o método mais utilizado para determinação da exatidão de processos analíticos, pois reflete a quantidade recuperada no processo, em relação à quantidade real presente na amostra, referente a um determinado analito. Num passado recente, o conceito de recuperação encontrava-se diretamente relacionado com a exatidão. Porém, nem sempre se verifica a veracidade desta relação, sendo que recuperações inferiores a 50% têm vindo a ser aceites, desde que a precisão seja aceitável. [23]

Os derivados analíticos não são comercializados sob a forma de material de referência. Desta forma, sempre que se verifique uma etapa de derivatização, a avaliação da recuperação total não é viável. No entanto, se for assumido que a etapa de derivatização tem uma eficiência de 100%, podemos avaliar a recuperação da fase de extração por MEPS, havendo assim a possibilidade de estimar a eficiência do procedimento extrativo. [27]

Para calcular a eficiência da extração selecionaram-se três gamas de trabalho: gama baixa (2ng/mL), gama intermédia (30ng/mL) e a gama alta (300ng/mL), sendo que para o HAL e a OLZ as concentrações são 0,4ng/mL, 6ng/mL e 60ng/mL, respetivamente. Para cada uma das concentrações em estudo houve análise de dois conjuntos de alíquotas em triplicado. Um dos conjuntos era semelhante às soluções metanólicas, isto é, para cada uma das concentrações, adicionamos o volume de eluição usado na extração (1000µL) e fortificou-se com os compostos e os padrões internos. O outro conjunto foi sujeito a extração, sendo que neste caso os padrões internos só foram adicionados à amostra depois de ter sido realizada a extração e antes a evaporação. Depois da evaporação, adicionou-se a cada um dos tubos 65µL de MSTFA-TMCS e colocou-se a derivatizar durante 20 minutos a 85°C. Posto isto, injetaram-se no GC.

A avaliação da eficiência da extração dos analitos a partir de amostras de água purificada, foi efetuada com auxílio do cálculo da recuperação (em percentagem) (Equação 5), através da equação que se segue:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Área do pico sujeito a extração} / \text{Área do PI}}{\text{Área do pico não sujeito a extração} / \text{Área do PI}} \times 100$$

#### Equação 5 – Fórmula para calcular a recuperação

A tabela 16 demonstra os resultados que foram obtidos na recuperação, no entanto, verificou-se que alguns não são significativos. Tal pode ser devido às condições climáticas do laboratório, uma vez que com o aumento da temperatura a estabilidade dos compostos é alterada, e por outro lado verifica-se que um composto (ou vários) está a contribuir nas áreas dos padrões internos, os quais deviam manter-se constantes.

**Tabela 16 – Resultados da recuperação da fase de extração**

Concentração (ng/mL)	Recuperação média ± CV (%)						
	CPZ	LVMP	OLZ	CLZ	HAL	QTP	CYA
2	28,44±7,37	63,97±7,40	88,82±12,88	24,07±29,92	79,90±1,20	33,80±3,84	44,31±13,35
30	45,37±3,98	66,66±2,44	52,68±0,09	139,69±5,41	74,85±1,86	46,74±2,38	47,35±1,37
300	61,95±0,62	83,04±0,53	64,22±5,14	73,89±1,60	103,57±9,44	56,54±7,00	77,19±6,15

## 9. CONCLUSÃO

---

As quinze semanas do Estágio Profissional II no Centro de Investigação em Ciências da Saúde da Beira Interior, contribuíram bastante para enriquecer o meu conhecimento, uma vez que foi o primeiro estágio em que estive num laboratório de investigação. Como tal, os estágios que realizei anteriormente em nada se equiparam com a experiência que vivi neste, sendo uma realidade totalmente diferente das farmácias hospitalares e comunitárias, bem como da indústria farmacêutica.

Pessoalmente, considero os estágios um período essencial na aprendizagem do estudante, pois com o estágio o estudante tem oportunidade de aplicar as suas competências teóricas e teórico-práticas, favorecendo-o na medida em que o prepara para a vida profissional de modo a que este seja capaz de responder a todas as necessidades e exigências que lhes são propostas com o objetivo final de promover a saúde e bem-estar dos doentes, tornando-se assim num profissional de saúde por excelência.

O estágio no CICS serviu para me abrir novos horizontes e oportunidades na minha carreira futura, consegui ainda por em prática os conhecimentos que adquiri ao longo da licenciatura, sendo que adquiri outros conhecimentos que me foram úteis para o desenrolar de todo o trabalho que desenvolvi ao nível do laboratório de investigação. Consciencializei-me para uma realidade que, enquanto estudante, me era totalmente desconhecida, visto que apenas possuía conhecimentos teóricos e nunca tinha contactado de perto com tal realidade e que apesar de ter aprendido bastante até à data ainda tenho muito para aprender como futuro profissional de saúde, quem sabe ao nível da investigação em ciências da saúde.

Na minha opinião, este tipo de estágios, quer seja em indústria farmacêutica, quer seja ao nível da investigação, devem ser realizados por períodos de tempo mais alargados, a fim de os alunos conseguirem reter o máximo de conhecimentos e de experiência possíveis. Isto porque, no meu caso em concreto, deixei o meu projeto de investigação a meio por falta de tempo para o conseguir acabar, o que infelizmente me deixa triste pois comecei o projeto e infelizmente não há forma de ser eu a acabá-lo, de modo que será um aluno de ciências farmacêuticas que lhe dará continuação no próximo aluno letivo.

No entanto, foi uma experiência bastante gratificante para mim, visto que sempre quis envergar pelo ramo da investigação e quem sabe este não tenha sido o

ponto de partida para o meu futuro na investigação. Agradeço ainda a oportunidade que me foi dada de estágio e apelo a que alarguem este tipo de estágio a mais alunos, pois quem sabe este não seja o ramo de um futuro próximo.

Em suma, os objetivos definidos para o Estágio Profissional II foram cumpridos com sucesso na sua íntegra e o meu percurso ao nível da investigação foi bastante satisfatório e gratificante para a minha atividade enquanto futura profissional na área da saúde.



## 10. BIBLIOGRAFIA

---

1. Escola Superior de Saúde do instituto politécnico da Guarda (2013); Regulamento Específico Estágio profissional II; Licenciatura em Farmácia
2. Decreto-Lei nº 564/99, 21 de Dezembro; Estatuto Legal da Carreira de Técnico de Diagnóstico e Terapêutica; Capítulo II; Artigos 5º e 6º.
3. Escola Superior de Saúde da Guarda. Acedido em Junho 3, 2013, em Licenciatura em Farmácia: [www.ess.ipg.pt](http://www.ess.ipg.pt)
4. APLF. Acedido em Junho 3, 2013, em O Profissional de Farmácia: [www.aplf.pt](http://www.aplf.pt)
5. Centro de Investigação em Ciências da Saúde. Acedido em Junho 5, 2013, em Apresentação: [www.fcsaude.ubi.pt/cics/index.php](http://www.fcsaude.ubi.pt/cics/index.php)
6. UBIMedical. Acedido em Junho 5, 2013, em Notícias: [www.ubi.pt/noticia.aspx?id=3676](http://www.ubi.pt/noticia.aspx?id=3676)
7. Centro de Investigação em Ciências da Saúde. Acedido em Junho 5, 2013, em Instalações: [www.fcsaude.ubi.pt/cics/facilities.php](http://www.fcsaude.ubi.pt/cics/facilities.php)
8. Dicionário médico. Acedido em Junho 5, 2013, em Biotério: [www.dicionario-medico.com](http://www.dicionario-medico.com)
9. Centro de Investigação em Ciências da Saúde. Acedido em Junho 5, 2013, em Áreas de pesquisa: [www.fcsaude.ubi.pt/cics/research\\_areas.php](http://www.fcsaude.ubi.pt/cics/research_areas.php)
10. Degani, A., Cass, Q., Vieira, P., (1998) Cromatografia um breve ensaio. Cromatografia.
11. Nogueira, J.M.F., Mikhail, S. Tswett, R. (2006) Um legado para a cromatografia moderna. Química. 100: pp. 51-56.
12. Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A., (1998) Principles of Instrumental Analysis. 5ª ed. EUA: Saunders College Publishing.
13. Ferreira, C., (2011) Caracterização por GC-MS de glúcidos, in [Dissertação de Mestrado]. Universidade de Coimbra: Coimbra.
14. Harris, D.C., (2003) Quantitative Chemical Analysis. 6ª ed.; EUS: W. H. Freeman and Company.
15. Braithwaite, A., Smith, F., (1999) Chromatographic methods. 5ª ed., Reino Unido: Kluwer Academic Publishers.
16. Neves, H.J.C., Freitas, A.M.C., (1996) Introdução à Cromatografia Gás-Líquido de Alta Resolução, Portugal: Dias de Sousa, Lda.

17. Grob, R.L., Barry, E.F., (2004) *Modern Practice of Gas Chromatography*. 4<sup>a</sup> ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc.
18. Vékey, K., (2001) Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. *Journal of Chromatography A*. v. 921, pp. 227-236.
19. Sebben, V. C. (2007) Análise de efedrinas e anfetamina em urina empregando SPE e SPME por CG/EM/EM, in [Dissertação de Mestrado]. Faculdade de Farmácia-UFRGS, Porto Alegre.
20. F Kitson, B Larsen, C McEwen. *Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A practical guide*. 1<sup>a</sup> edição, cap. 1.
21. Moliner A., (2008) Otimização e validação de metodologia analítica empregando SPE e LC-ESI-MS/MS para determinação de multiclases de agrotóxicos e metabolitos em água de superfície de abastecimento público, in [Dissertação de mestrado]. Universidade Federal do Rio Grande. Brasil.
22. Bergo P.L.S., (2007) Desenvolvimento de um método de screening para anfetaminas em urina empregando EMI-MS com confirmação por GC-MS, in [Dissertação de Mestrado]. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.
23. Oliveira A.C.P., (2010) Desenvolvimento e validação de uma metodologia bioanalítica para quantificação de Zolpidem em plasma humano utilizando a técnica de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS), in [Dissertação de Mestrado]. Universidade São Francisco.
24. Hoffmann, E.; Stroobant, V., (2007) *Mass Spectrometry Principles and Applications*. Chichester: John Wiley & Sons. p. 489.
25. Queiroz, S.C.N., Collins, C. H., Jardim, I., (2001) Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluídos biológicos para posterior determinação cromatográfica. *Quim. Nova*. 24(1): pp. 68-76.
26. Kataoka, H., (2005) Recent advances in solid-phase microextraction and related techniques for pharmaceutical and biomedical analysis. *Current Pharmaceutical Analysis*. 1(1): pp. 65-84.
27. Costa, S., (2007) Métodos de análise de piperazinas em fluidos biológicos, in [Dissertação de Mestrado]. Universidade de Aveiro: Aveiro.
28. Orlando, R., et al, (2009) Pré-tratamento de amostras. *Vitae t Sanitas*, Trindade-Go. n. 03.

29. Novakova, L., Vlckova, H., (2009) A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: chromatography and sample preparation. *Analytica Chimica Acta*. 656(1-2): pp. 8-35.
30. Jonsson, S., Hagberg, J., Van Bavel, B., (2008) Determination of 2,4,6-Trichloroanisole and 2,4,6-Tribromoanisole in Wine Using Microextraction in Packed Syringe and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 56: pp. 4962-4967.
31. Gallardo, E., Costa, S., Barroso, M., (2009) A microextracção em fase sólida como técnica de preparação de amostras em química analítica e toxicologia: Teoria e aplicações. *Rev. Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde*. 6: pp. 105-124.
32. Vlckova, H., Solichova, D., Bláha, M., Solich, P., Novakova, L., (2011) Microextraction by packed sorbent as sample preparation step for atorvastatin and its metabolites in biological samples-Critical evaluation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 55 pp. 301-308.
33. Abdel-Rehim, M., (2004) New trend in sample preparation: on-line microextraction in packed syringe for liquid and gas chromatography applications: I. Determination of local anaesthetics in human plasma samples using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 801(2): pp. 317-321.
34. Abdel-Rehim, M., (2010) Recent advances in microextraction by packed sorbent for bioanalysis. *Journal of Chromatography A*. 1217 pp. 2569-2580.
35. Abdel-Rehim, M., (2009) Microextraction by packed sorbent in bioanalysis. *Bioanalysis*. 1(4): pp. 687-691.
36. Simpson, N.J.K., (2000) Solid-phase extraction: principles, techniques, and applications. N. J. K. Simpson. Harbor City, California, Marcel Dekker.
37. Telepchak, M.J., Chaney, G., (2004) Forensic and Clinical Applications of Solid Phase Extraction. H. Press. Totowa, New Jersey.
38. Thurman, E.M., Mills, M. S., (1998) Solid-phase extraction: principles and practice. Wiley New York.
39. Halket, J.M. et al., (2005) Chemical Derivatization and Mass Spectral Libraries in Metabolic Profiling by GC/MS and LC/MS/MS. *Journal of Experimental Botany*. 56, pp. 219-243.
40. Words, K., (1997) Guide to Derivatization Reagents for GC. Supelco. Sigma-Aldrich. pp. 1-12.

41. F. Orata (2012). Derivatization Reactions and Reagents for Gas Chromatography Analysis. InTech, ISBN: 978-953-51-0298-4.
42. J. Beale, J. Brock., (2011) Wilson and Gisvold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry. 12<sup>a</sup> edição, cap.12.
43. T. Lemke, D. Williams, V. Roche, S. Zito. Foye's principles of Medicinal Chemistry. 6.<sup>a</sup> edição, cap. 22.
44. J. Dipiro, R. Talbert, G. Yee, G. Matzke, B. Weels, L. Posey. Pharmacotherapy, A Pathophysiological Approach. 7<sup>a</sup> edição, cap. 70.
45. E. Gallardo, JA Queiroz., (2008) The role of alternative specimens in toxicological analysis. Biomed Chromatogr. vol.22(8), pp. 795-821.
46. Calisto, V., Esteves, V.I., (2009) Psychiatric pharmaceuticals in the environment. Chemosphere. pp. 1257-1274.
47. Fonseca, B.M., Moreno, I.E.D., Barroso, M., Costa, S., Queiroz, J.A., Gallardo, E., (2013) Determination of seven selected antipsychotics drugs in human plasma using microextraction in packed sorbent and gas chromatography-tandem mass spectrometry. Springer.
48. Costa, S., Barroso, M., Castañera, A., Dias, M., (2010) Design of experiments, a powerful tool for method development in forensic toxicology: application to the optimization of urinary morphine 3-glucuronide acid hydrolysis. Anal Bioanal Chem. 396: p. 2533-2542.

**Anexos**

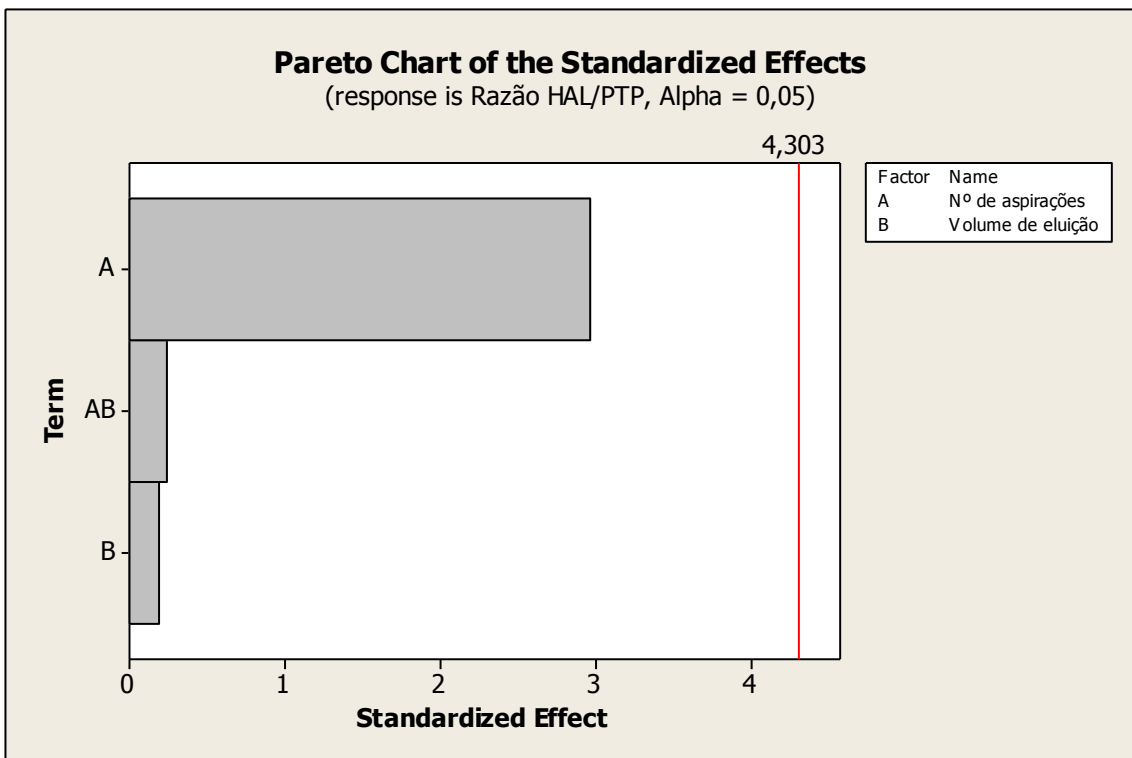
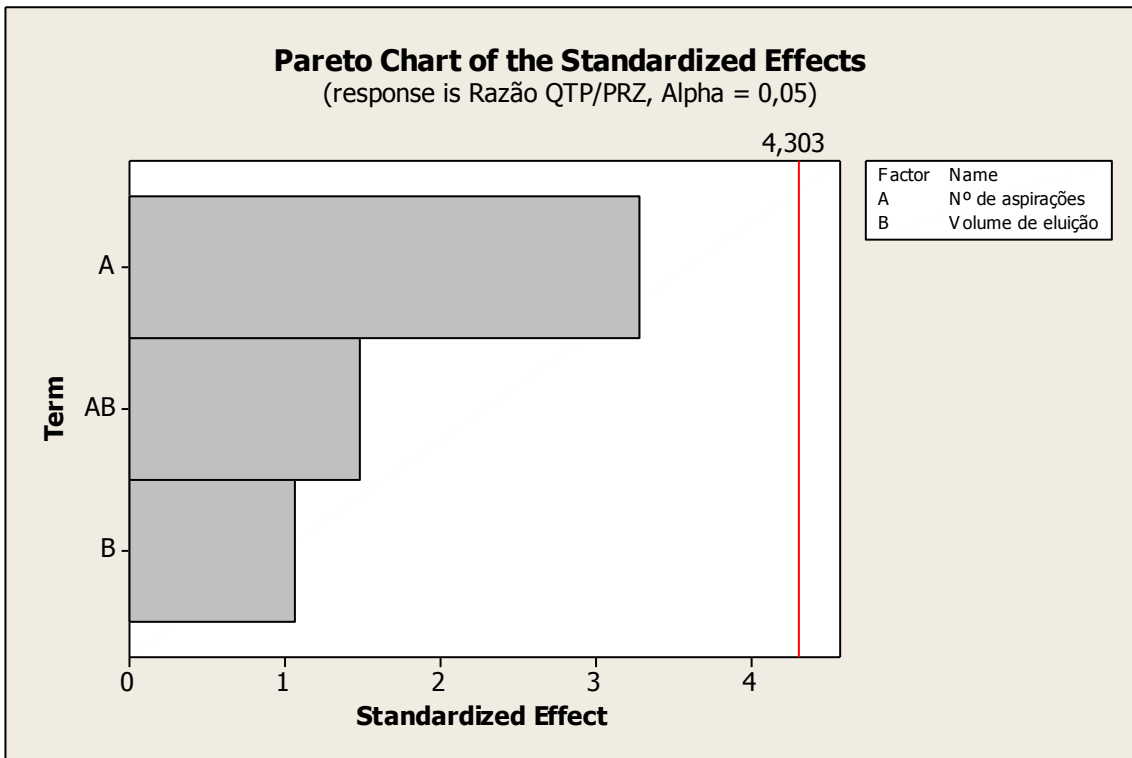
**Anexo I** → Revisão de metodologias analíticas que visam a determinação de antipsicóticos em matrizes biológicas

Analito	Amostra	Técnica de extração	Análise	Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) (ng/mL)	Recuperação (%)	Referência
<b>Clozapina Clorpromazina Levomepromazina Quetiapina Olanzapina Haloperidol Ciamemazina</b>	0,25 mL de plasma	MEPS	GC-MS/MS	CLOZ – 0,6; 1 CPZ – 0,3; 1 QTP – 1; 4 CYA – 1; 4 LVMP – 1; 4 HAL – 0,8; 6 OLZ – 0,2; 0,8	62-92	B.M. da Fonseca 2012
<b>Clorpromazina</b>	500 µL de sangue	SPE (Oasis HLB)	GC/EI-MS	3; 10	81	Eugenia Gallardo 2007
<b>Amissulprida</b>	100 µL de plasma	-	HPLC	-	110-140	Julia Sachse 2003
<b>Levomepromazina Olanzapina</b>	Matriz aquosa	SPE (coluna C-18)	HPLC e GC-MS	-	-	Joanna Karpinska 2011
<b>Quetiapina</b>	300 µL de plasma	SPE	HPLC-UV	0,8; 2,5	> 94	Maria Saracino 2006
<b>Quetiapina Ziprasidona</b>	60 µL de soro humano	-	UHPLC-MS/MS	-	Quetiapina – 95 Ziprasidona – 70	Jorgen Hasselstrom 2010
<b>Clozapina Olanzapina Quetiapina Risperidona</b>	500 µL de plasma	-	HPLC-MS/ESI	-	> 91	Zhiling Zhou 2003

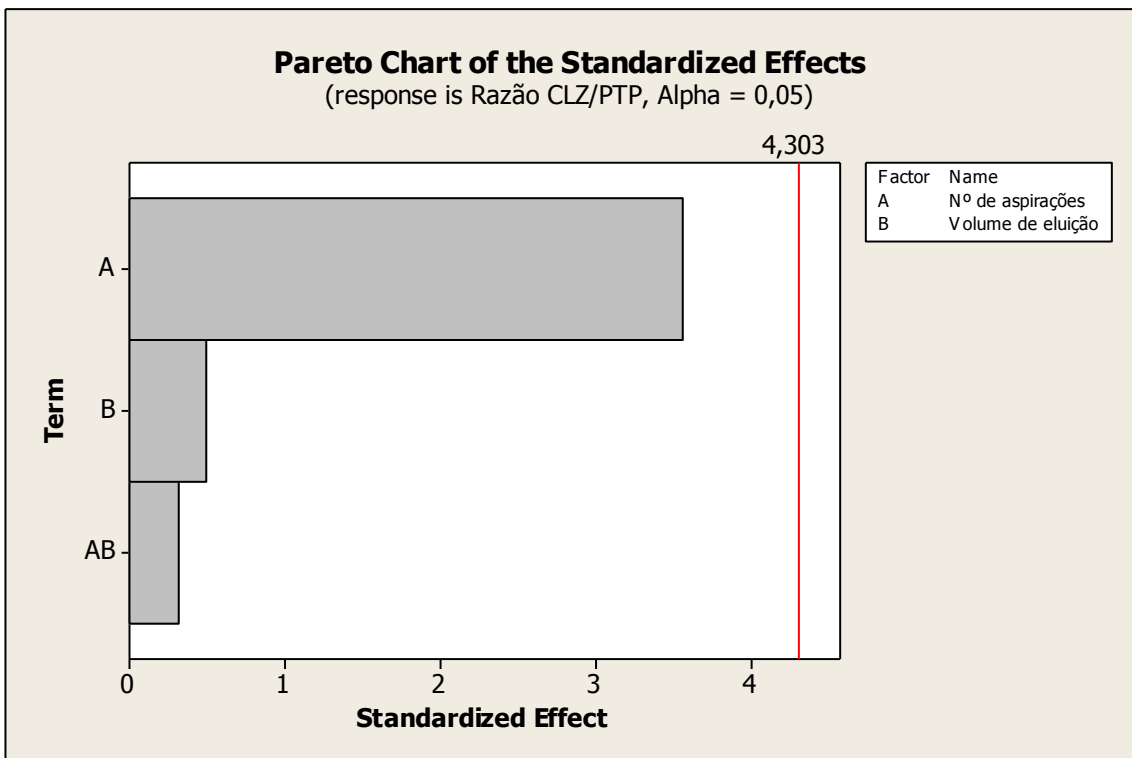
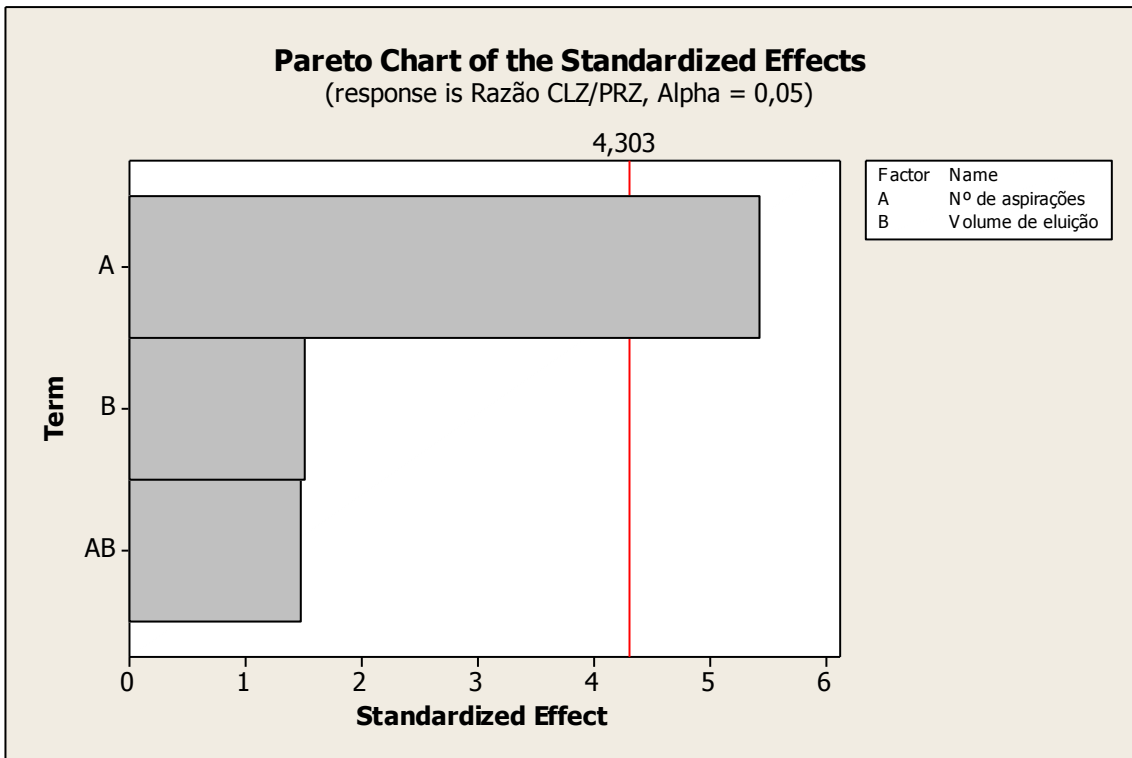
**Anexo II** → Revisão do volume de amostra de água (matriz aquosa) e número de aspirações utilizado em MEPS

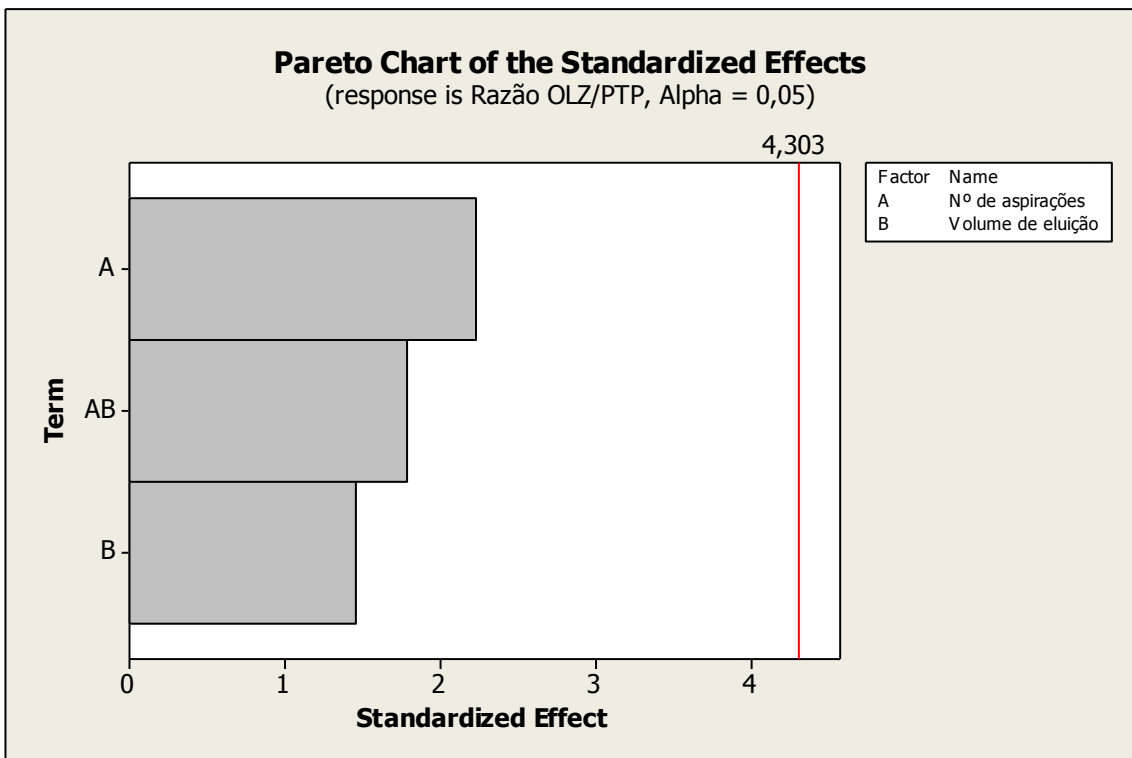
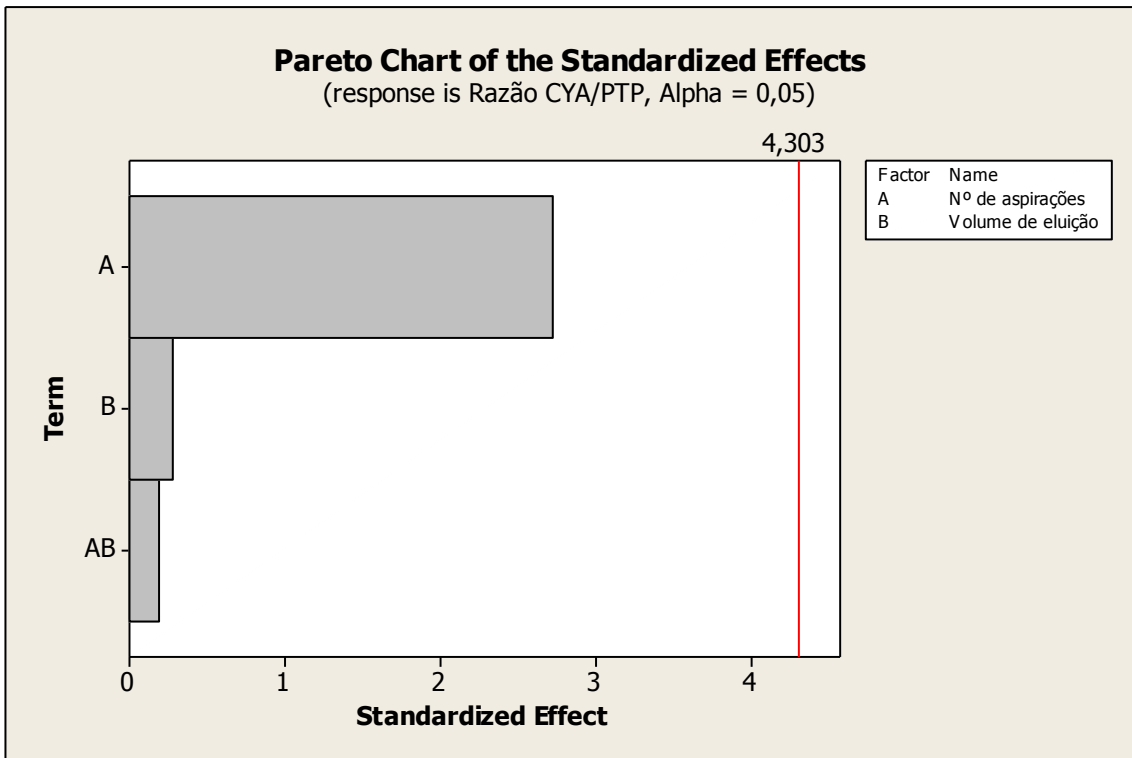
Volume de amostra	Número de aspirações	Referência
5 mL	--	M.L. Polo-Luque 2011
5 mL	3 ciclos de 250µL	Gloria Grueiro Noche 2011
5,5 mL	-- ciclos de 100µL	J. Cavalheiro 2013
2 mL	20 ciclos de 100µL	Iria González-Mariño 2010
1,4 mL	7 ciclos de 200µL	Mohammad T. Jafari 2012
--	10 ciclos de 500µL	Miguel del Nogal Sánchez 2012
2 mL	40 ciclos de 50µL	Shuai Fu 2012
1 mL	60 ciclos de 50µL (automático)	Aziza El-Beqqali 2006
0,8 mL	--	Jana Aufartová 2011
0,8 mL	-- ciclos de 100µL (automático)	A. Prieto 2010
0,8 mL	8 ciclos de 100µL (automático)	Monika Moeder 2010
0,8 mL	-- ciclos de 100µL	A. Prieto 2011

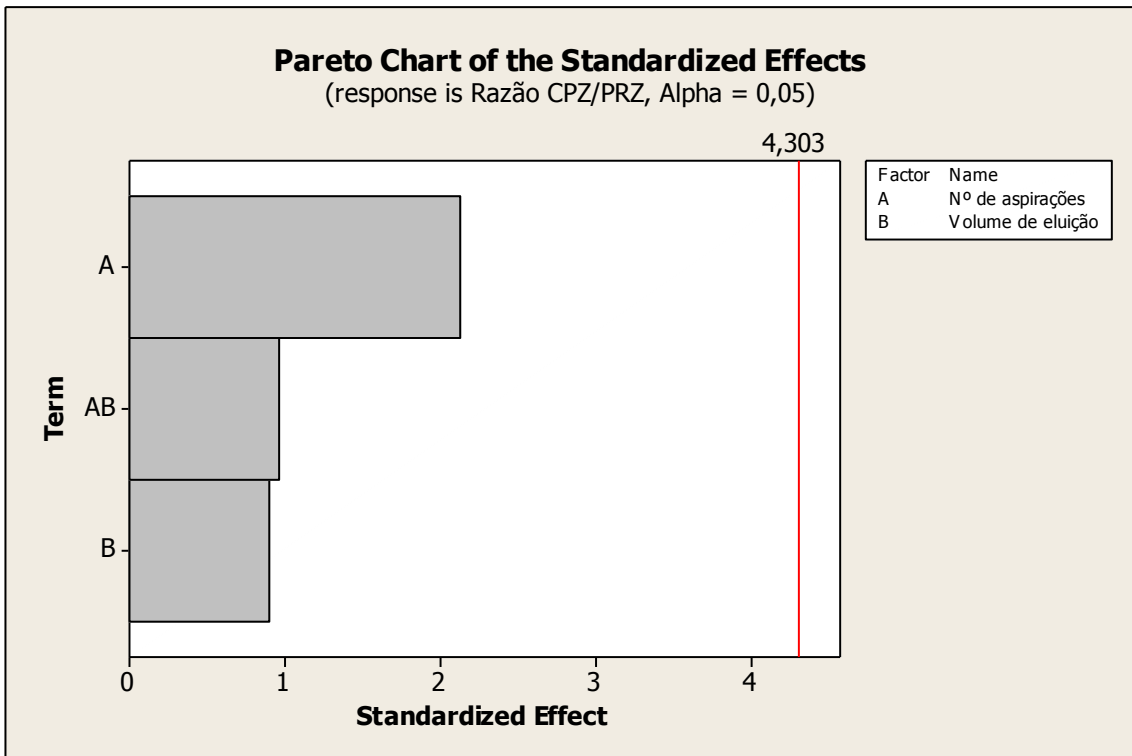
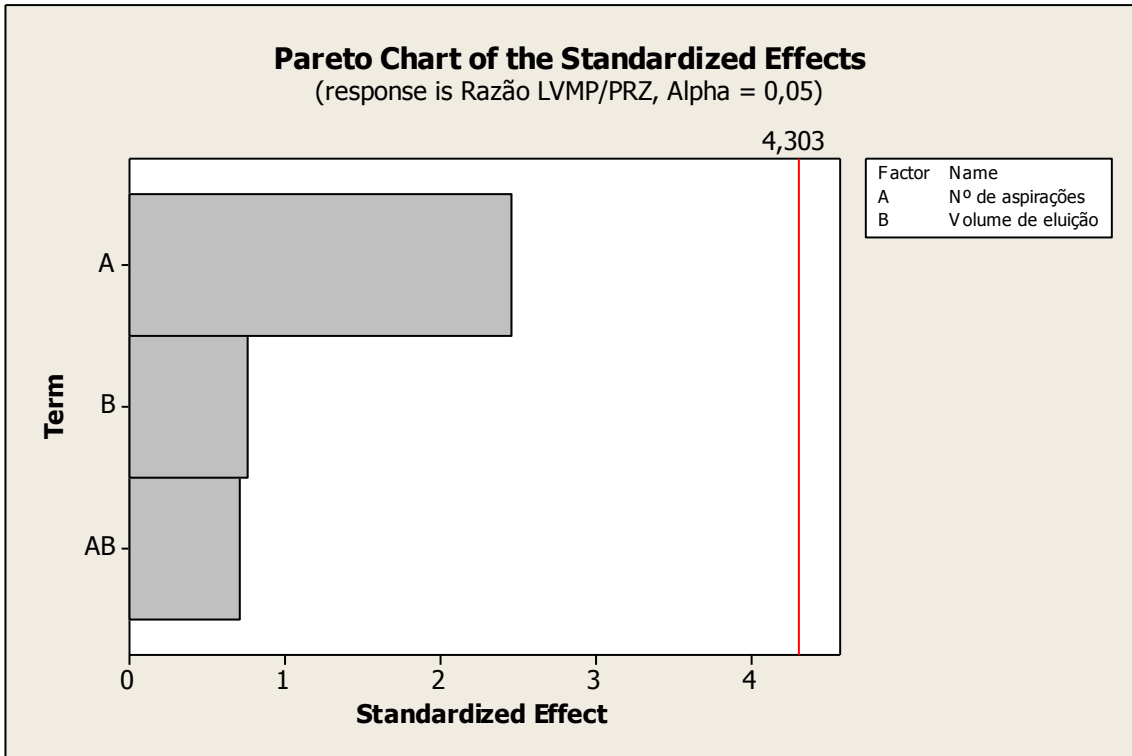
Anexo III → Diagramas dos efeitos de Pareto





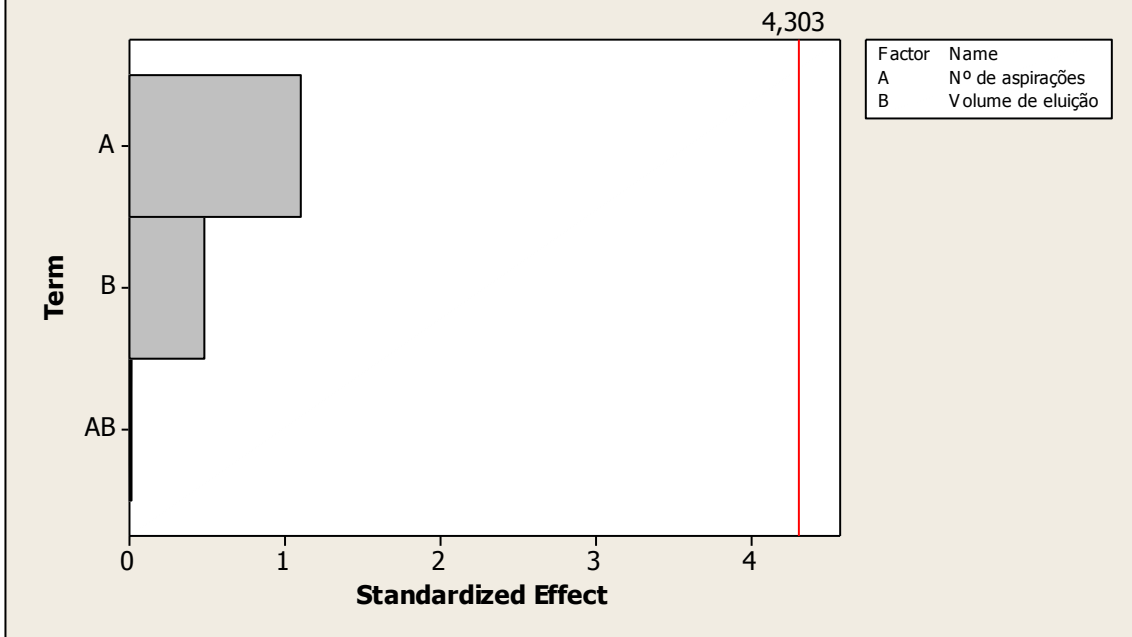




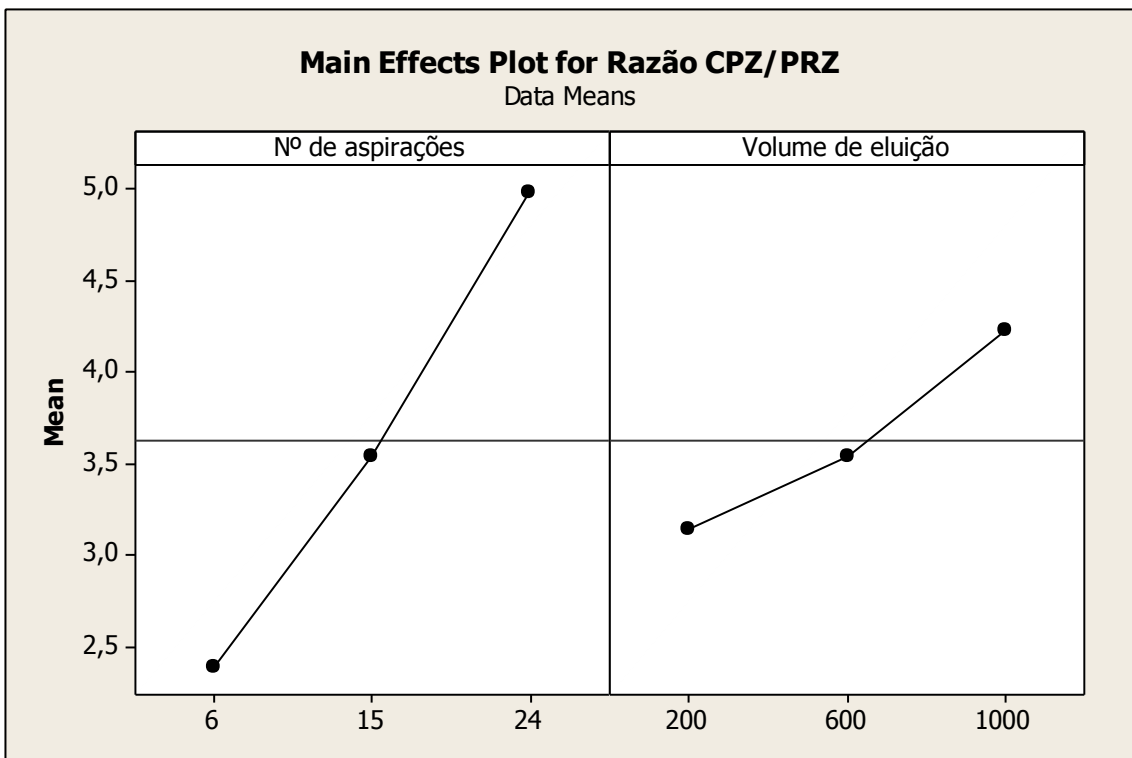
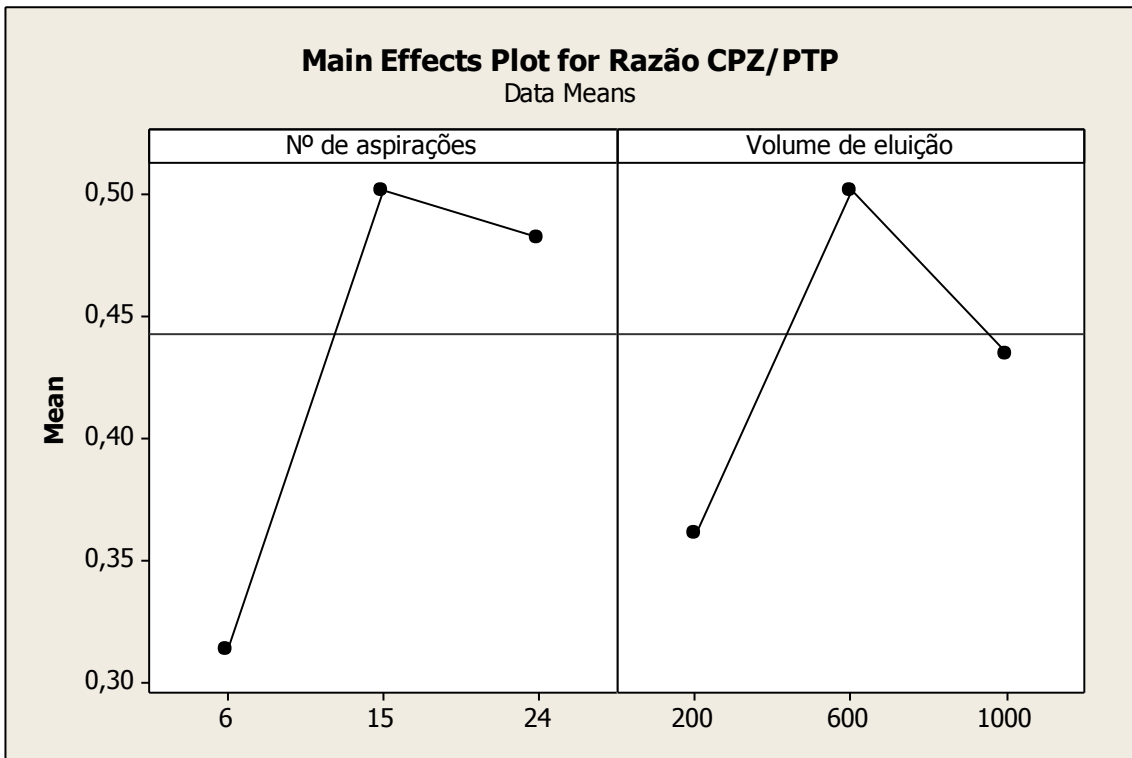


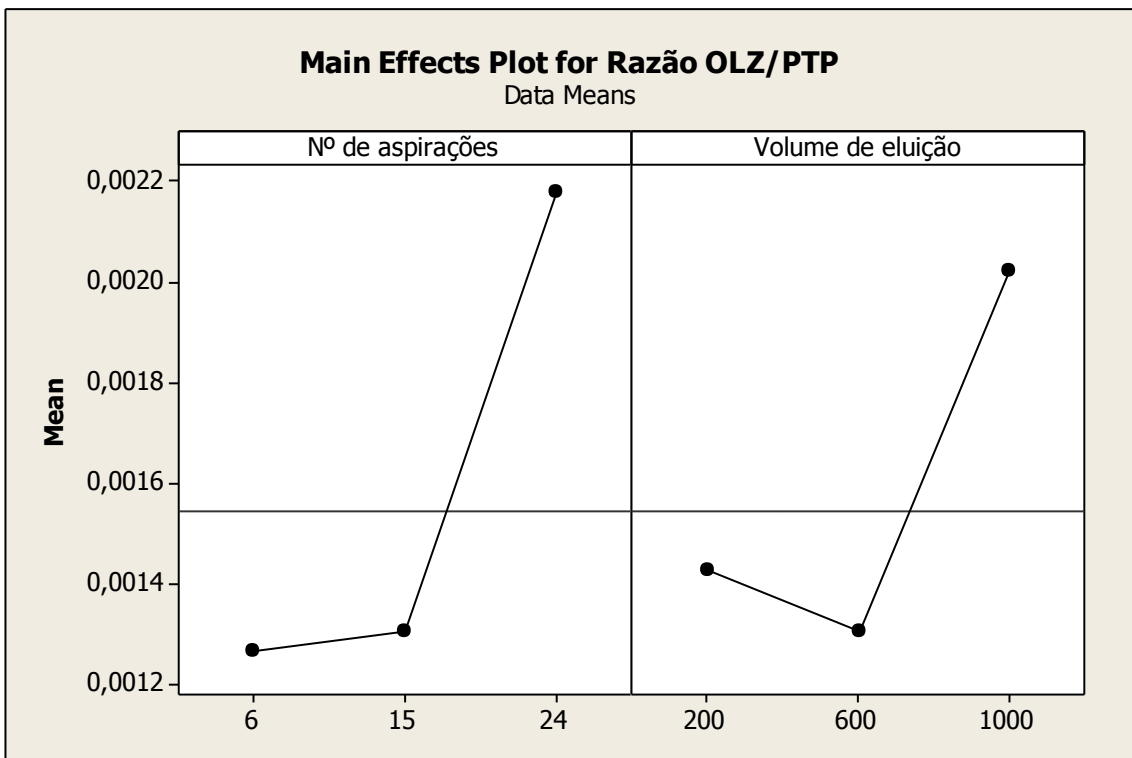
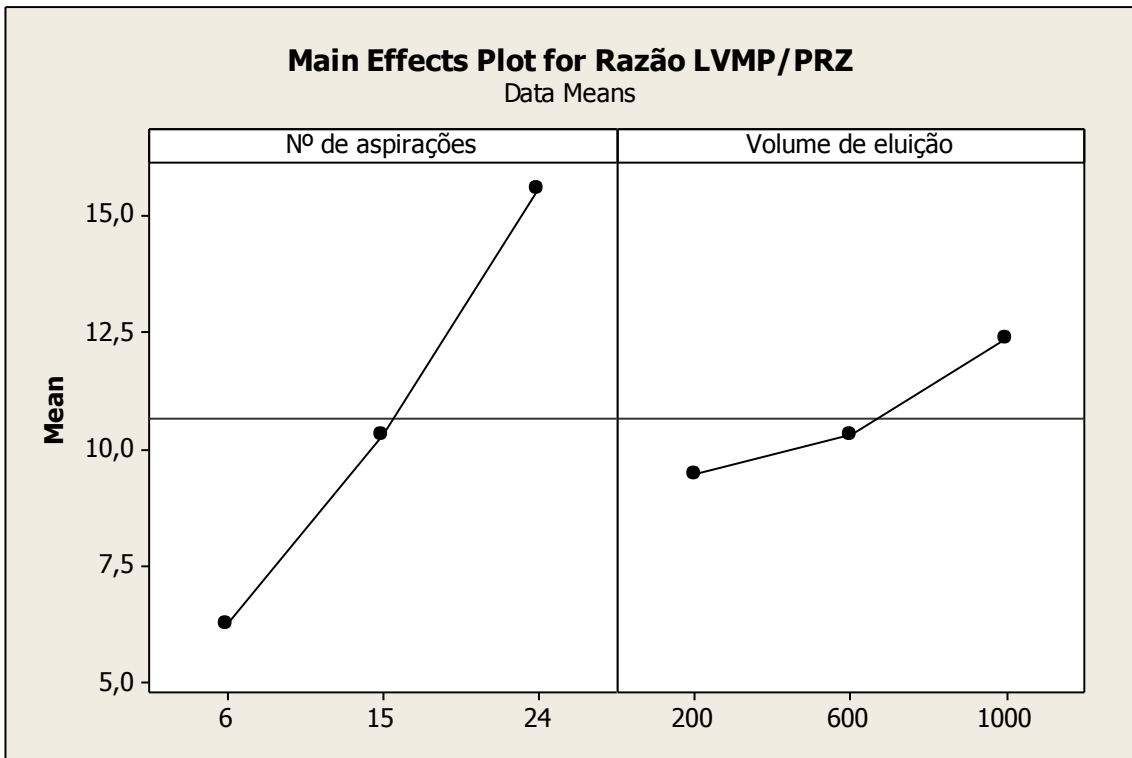
### Pareto Chart of the Standardized Effects

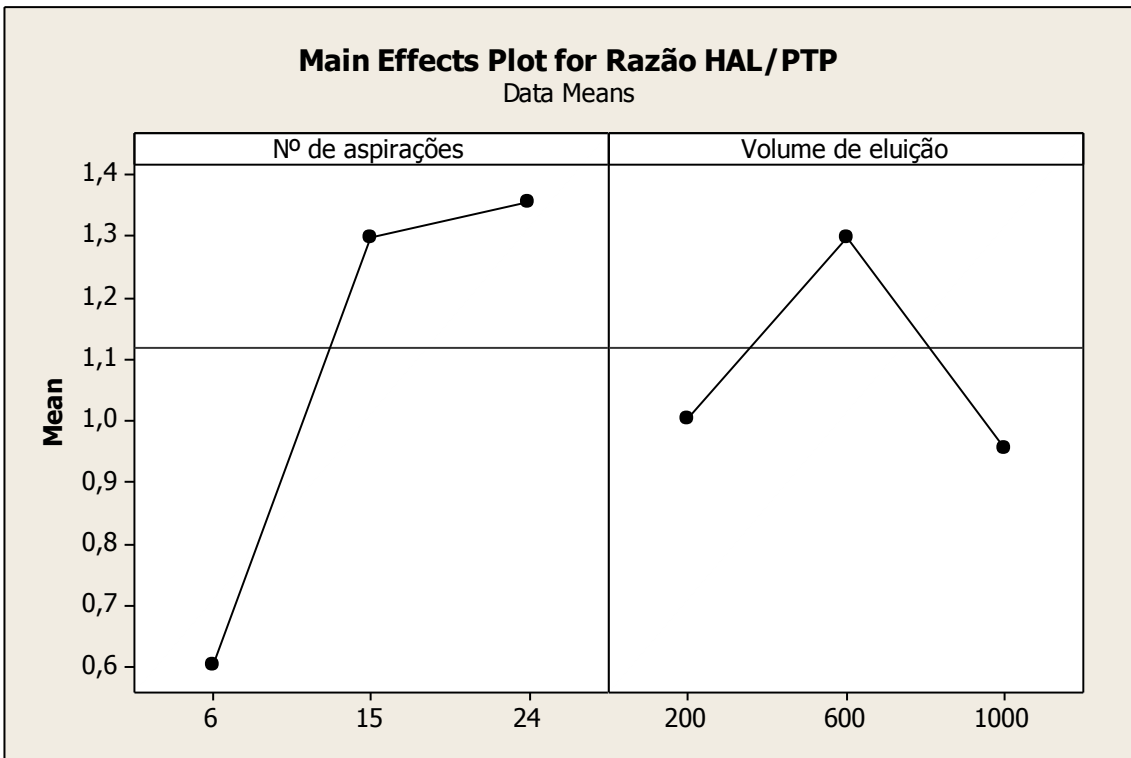
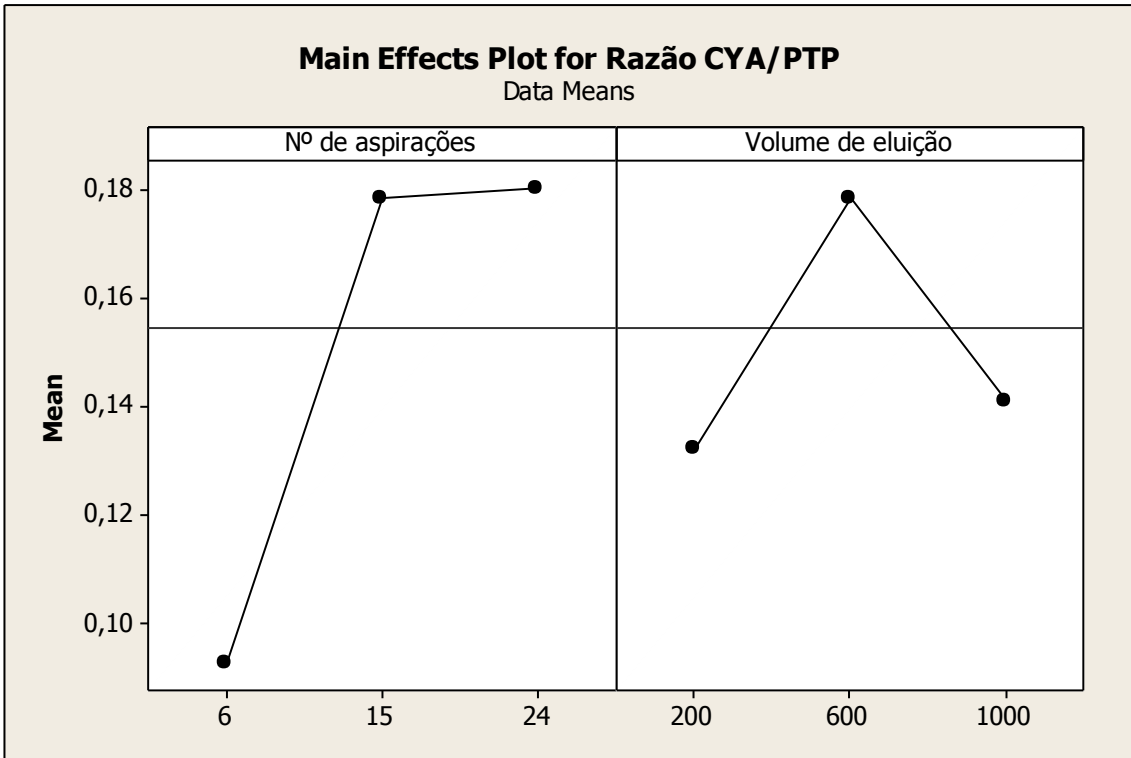
(response is Razão CPZ/PTP, Alpha = 0,05)

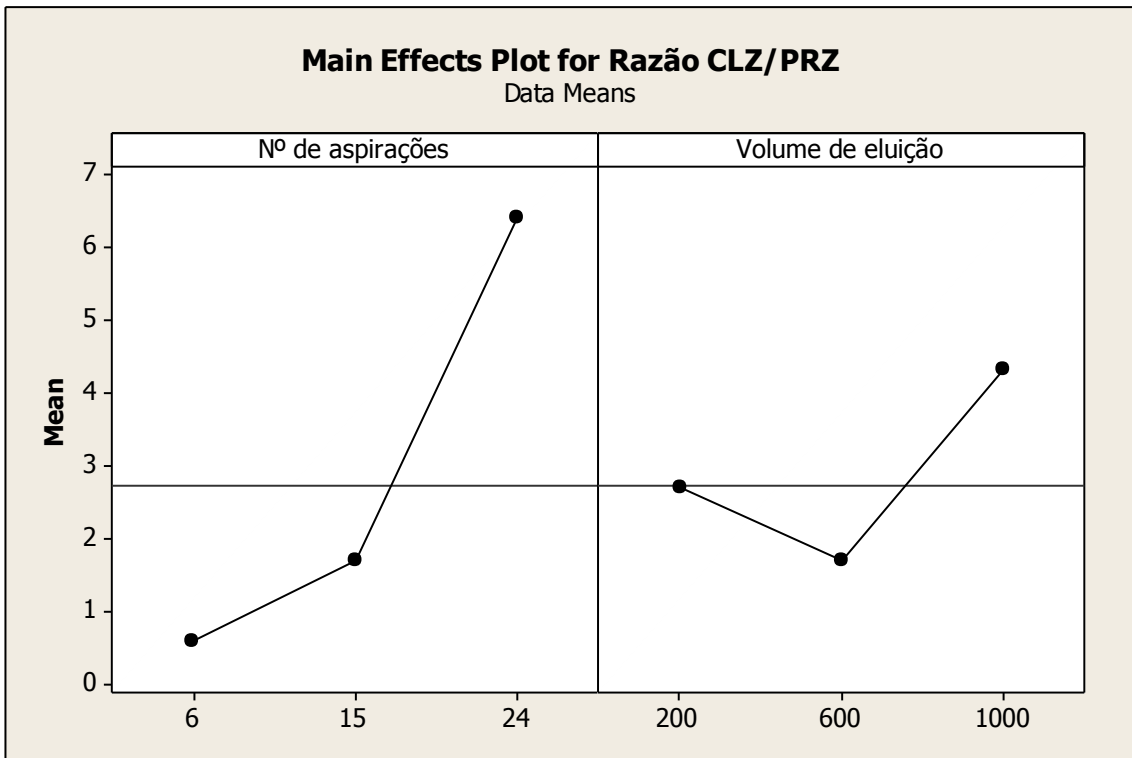
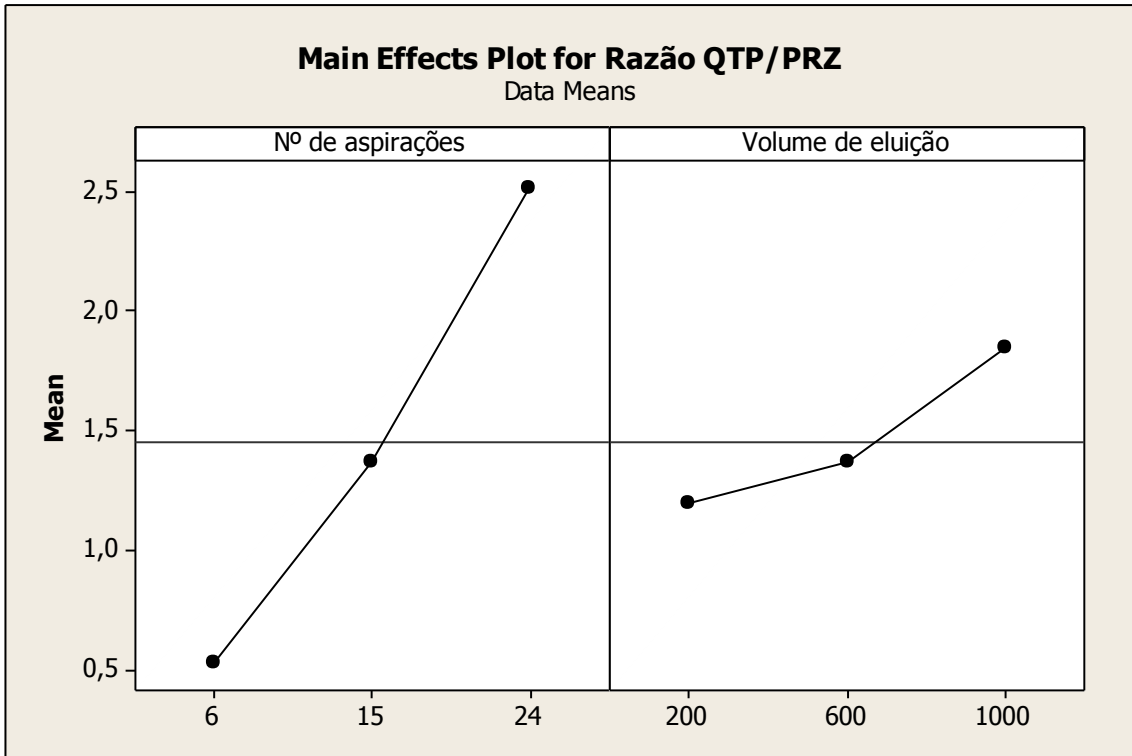


Anexo IV → Gráficos dos efeitos principais





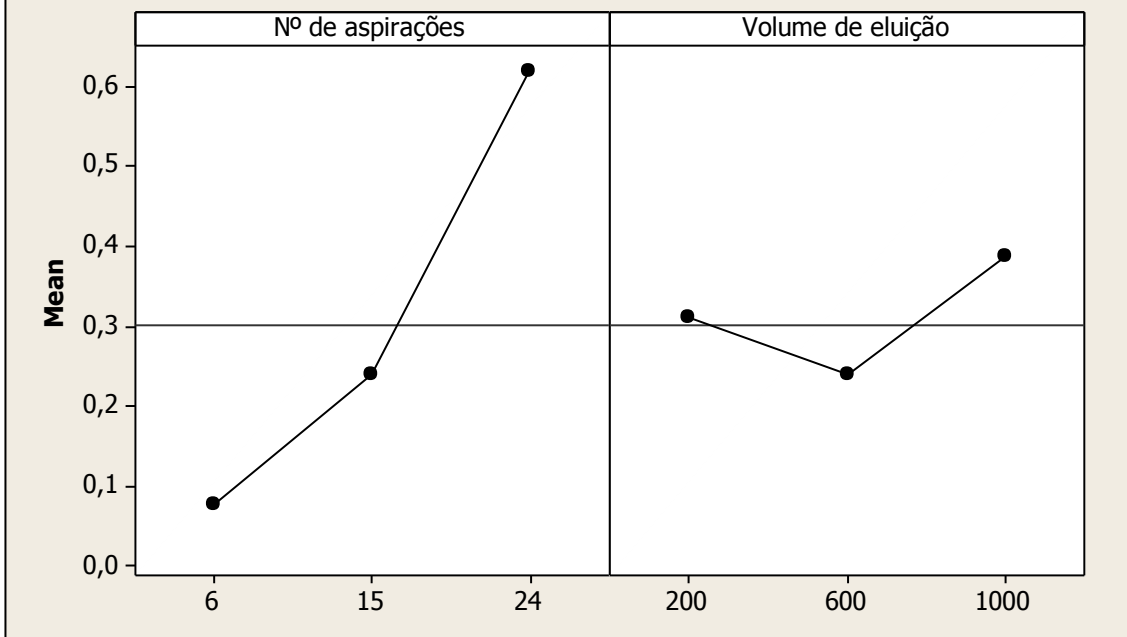






### Main Effects Plot for Razão CLZ/PTP

Data Means



## Anexo V → Gráficos das interações

