

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS ANTIDEPRESSIVOS EM LEITE MATERNO

Fernanda Rodrigues Salazar

Porto Alegre, Agosto de 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS ANTIDEPRESSIVOS EM LEITE MATERNO

Fernanda Rodrigues Salazar

Porto Alegre, Agosto de 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS ANTIDEPRESSIVOS EM LEITE MATERNO

Tese apresentada por

Fernanda Rodrigues Salazar

para obtenção do GRAU DE DOUTOR

em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof^a. Dr^a Ana Maria Bergold

Porto Alegre, Agosto de 2016

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 29.08.2016, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa Dra Flavia Valladão Thiensen

Pontífica Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS

Prof Dr Martin Steppe

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Profa Dra Vera Maria Treis Trindade

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

CIP - Catalogação na Publicação

Salazar, Fernanda Rodrigues
Determinação de fármacos antidepressivos em leite materno / Fernanda Rodrigues Salazar. -- 2016.
107 f.

Orientador: Ana Maria Bergold.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. leite materno. 2. antidepressivos. 3. método bioanalítico. I. Bergold, Ana Maria, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Química Farmacêutica do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRGS. A autora recebeu bolsa de estudos CAPES.

AGRADECIMENTOS

A Prof. Ana Maria Bergold pela orientação e empenho para o desenvolvimento deste trabalho;

Ao Prof. Pedro Fröhlich pelas contribuições ao meu trabalho;

A minha família, meus pais, pessoas essenciais que acreditaram, incentivaram e apoiaram todo processo de mestrado e doutorado, minhas irmãs, pessoas incríveis que sempre estiveram do meu lado, meu cunhado Juliano pelo apoio e carinho e ao meu namorado Marcelo, pelo carinho e parceria;

Especial agradecimento à minha mãe, Dr^a Cledinara, chefe do Banco de Leite da Santa Casa de Caridade de Bagé, que com todo empenho buscou procurar as amostras para o desenvolvimento deste trabalho;

As amigas Pamela Ferreira e Graciela Carlos, por todo o apoio e carinho nos momentos finais deste trabalho;

Aos amigos e colega Andreia Wildner, Andrea Garcia, Marcella Oliveira, Leonardo Secretti, Vanessa Argoud, Tamara Castilho, Charise Bertuol, Caroline Rohr, Alexi Muchale, Layane Lenardon, Natalia Canedo, Felipe D'Avila e Leticia Flores pela colaboração, momentos de descontração e discussões científicas;

Aos funcionários e amigos Inélia, Viviane e Marcos pela colaboração e amizade.

RESUMO

Determinação de fármacos antidepressivos em leite materno

O uso de fármacos durante a lactação é uma prática comum; porém, os tratamentos farmacológicos impõem grandes dúvidas tanto aos profissionais quanto às nutrizes sobre a segurança do uso destes durante este período. A amamentação é uma forma de vínculo entre mãe e bebê e está associada a diversos benefícios nutricionais, imunológicos, cognitivos, psicoafetivos, econômicos e sociais. A depressão é um problema clínico importante durante o período pós-parto, e a vulnerabilidade para o início ou recorrência de sintomas depressivos aumenta a possibilidade de uso de psicofármacos enquanto ocorre a lactação. Os antidepressivos inibidores seletivos da recaptação da serotonina são comumente prescritos para o tratamento destes quadros depressivos, entre eles fluoxetina, sertralina, citalopram e paroxetina, sendo que a maioria destes é excretada no leite materno e há grande variabilidade na quantidade de analitos que pode ser recebida pelo lactente. Bupropiona é um fármaco antidepressivo utilizado para o tratamento do tabagismo e quadros depressivos e tem sua excreção ao leite materno relatada em literatura. Métodos bioanalíticos para determinação da excreção de fármacos antidepressivos foram desenvolvidos e validados por cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas e cromatografia líquida com detecção ultravioleta. Estes métodos demonstraram serem seletivos, lineares, precisos e exatos, com limites de quantificação de 5 ng/mL (fluoxetina, citalopram e bupropiona) e 20 ng/mL (sertralina e paroxetina) para método por LC-MS e de 200 ng/mL para todos os analitos no método por CLAE-UV. As amostras de leite materno foram coletadas em Banco de Leite de mães que declararam utilizar fluoxetina ou sertralina ou paroxetina e analisados. Os dados de concentração encontrados para os fármacos referidos estão dentro da faixa encontrada em literatura confirmando sua excreção no leite materno. Paroxetina apresentou valores abaixo do limite de quantificação. Das concentrações encontradas no leite materno, foram estimadas as doses absolutas e relativas no lactante, sendo que os resultados demonstraram baixos valores em relação a estas estimativas, podendo os fármacos analisados ser considerados seguros para manutenção do uso durante a lactação. Foi também detectada nas análises por LC-MS a presença de norfluoxetina, metabólito da fluoxetina, confirmando sua excreção nesta matriz.

Palavras-chave: fluoxetina, sertralina, citalopram, paroxetina, bupropiona, excreção, leite materno, inibidores seletivos da recaptação da serotonina, cromatografia líquida, espectrômetro de massas, detecção por ultravioleta

ABSTRACT

Determination of antidepressants in breast milk

The use of medications during lactation is a common practice; however pharmacological treatments impose serious doubts to both, professionals and nursing mothers, about the safety of drugs use during this period. Breastfeeding is a natural form of bonding between mother and baby and it is associated with many nutritional, immunological, cognitive, psychoemotional, social and economic benefits. Depression is a major clinical problem during the postpartum period and the vulnerability to onset or recurrence of depressive symptoms increases the possibility of psychotropic drug use during lactation. Selective inhibitors of serotonin reuptake are commonly prescribed for the treatment of depressive disorders, including fluoxetine, sertraline, citalopram and paroxetine. Most of these drugs are excreted in breast milk and there is great variability in the amount of analytes that can be received by the infant. Bupropion is an antidepressant used for tobacco treatment and for depression symptoms; it is also described in literature its excretion into breast milk. Bioanalytical methods for determining the excretion of antidepressants were developed and validated by liquid chromatography coupled to mass spectrometry and liquid chromatography with ultraviolet detection. These methods proved to be selective, linear, precise and accurate with quantification limits of 5 ng/mL (fluoxetine, citalopram e bupropion) and 20 ng/mL (sertraline e paroxetine) for LC-MS method and 200 ng/mL for all analytes in the CLAE-UV method. Human milk samples were collected in milk banks from mothers to which the antidepressants fluoxetine or sertraline or paroxetine were administered, and the concentrations in this matrix were verified. Found concentrations were within the range described in the literature confirming their excretion in the breast milk. Paroxetine presented values less than limit of quantification. From the found concentrations, the absolute and relative doses in nursing were estimated. The results showed low values for these estimates and so the analyzed drugs can be considered safe to continue use during lactation. The presence of norfluoxetine, a metabolite of fluoxetine, was also detected by LC-MS, confirming its excretion in this matrix.

Keywords: fluoxetine, sertraline, citalopram, paroxetine, bupropion, excretion, breast milk, selective inhibitors of serotonin reuptake, liquid chromatography, mass spectrometry, ultraviolet detection

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1	Fatores que influenciam na excreção de fármacos para o leite materno	33
Figura 3.2	Estruturas químicas dos antidepressivos fluoxetina, sertralina, citalopram, paroxetina e bupropiona	40
Figure 4.1	Molecular structures and proposed fragmentation monitored for bupropion, sertraline, fluoxetine, citalopram and paroxetine	54
Figure 4.2	LC-MS chromatogram of extracted milk samples of the analytes atenolol IS (50 ng/mL), bupropion (5 ng/mL), citalopram (5 ng/mL), paroxetine (20 ng/mL), fluoxetine (5 ng/mL) and sertraline (20 ng/mL) and extracted blank human milk	59
Figure 4.3	Chromatogram of fluoxetine milk samples with metabolite norfluoxetine and mass spectra with molecular ion (m/z 296) and fragmentation (m/z 134)	63
Figura 5.1	Cromatogramas obtidos por CLAE-UV de leite branco processado e amostra de leite materno processada com os analitos paroxetina (Par), padrão interno (PI – bupropiona), fluoxetina (Flu) e sertralina (Ser)	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1	Dados de farmacocinética dos antidepressivos fluoxetina, sertralina, citalopram, paroxetina e bupropiona	39
Tabela 3.2	Estudos reportados na literatura para determinação de fármacos antidepressivos em leite materno e outras matrizes biológicas	41
Tabela 4.1	Within and between-run precision and accuracy for antidepressants in human milk	60
Tabela 4.2	Stability of antidepressants analytes in breast milk under different conditions	61
Tabela 4.3	Found concentrations of analytes in breast milk, infant absolute dose and relative dose	62
Tabela 5.1	Resultados de precisão e exatidão intra e intercorridas das amostras de leite materno	79
Tabela 6.1	Métodos relatados em literatura para quantificação de antidepressivos em leite materno e outras matrizes	86
Tabela 6.2	Concentrações encontradas no leite materno por método LC-MS	92

LISTA DE ABREVIATURAS

BUP - Bupropiona

CG-MS – Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas

CLAE/UV – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de ultravioleta

CIT – Citalopram

CQA – Controle de qualidade alto

CQB – Controle de qualidade baixo

CQD – Controle de qualidade de diluição

CQM – Controle de qualidade médio

CV – Coeficiente de variação

EPR – Erro padrão relativo

FLU – Fluoxetina

FMN – Fator de matriz normalizado

LC-FL – Cromatografia líquida acoplada a detector de fluorescência

LC-MS - Cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas

LIQ – Limite inferior de quantificação

LSQ – Limite superior de quantificação

M/Z - Relação massa-carga

NOR - Norfluoxetina

PAR - Paroxetina

PI – Padrão interno

RT – Tempo de retenção

SER – Sertralina

TCLE – Termo de consentimento Livre e Esclarecido

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	OBJETIVOS	25
2.1	Objetivo geral	27
2.2	Objetivos específicos	27
3	REVISÃO	29
4	CAPITULO 1: Development and validation of a bioanalytical method for five antidepressants in human milk	47
4.1	Abstract	49
4.2	Introduction	50
4.3	Material and methods	51
4.3.1	Chemicals and reagents	51
4.3.2	Human milk	52
4.3.3	Standard solutions, work solutions and quality control samples	52
4.3.4	Sample preparation	53
4.3.5	Instruments	53
4.3.6	Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS)	53
4.3.7	Bioanalytical method validation	55
4.3.8	Ethics	57
4.4	Results and discussion	57
4.4.1	Method development	57
4.4.2	Method validation	58
4.4.3	Human milk sample analysis	61
4.5	Conclusions	64
4.6	Acknowledgments	64
4.7	References	64
5	CAPITULO 2: Determinação simultânea de antidepressivos em leite materno por método CLAE-UV	67

5.1	Introdução	69
5.2	Parte experimental	70
5.2.1	Materiais e reagentes	70
5.2.2	Leite materno	71
5.2.3	Solução estoque, solução de trabalho, amostras de controle de qualidade e de calibração	71
5.2.4	Preparo das amostras	72
5.2.5	Instrumentos e condições cromatográficas	72
5.2.6	Validação do método bioanalítico	73
5.2.6.1	Seletividade	73
5.2.6.2	Efeito residual	73
5.2.6.3	Efeito matriz	73
5.2.6.4	Linearidade a limite inferior de quantificação	74
5.2.6.5	Precisão e exatidão	74
5.2.6.6	Recuperação	75
5.3	Resultados e discussão	75
5.3.1	Desenvolvimento do método e otimização	75
5.3.2	Validação do método	78
5.3.2.1	Seletividade	78
5.3.2.2	Efeito residual e efeito matriz	78
5.3.2.3	Linearidade e limite inferior de quantificação	78
5.3.2.4	Precisão e exatidão	79
5.3.2.5	Recuperação	80
5.3.2.6	Estabilidade	80
5.4	Conclusão	81
6	DISCUSSÃO GERAL	83
7	CONCLUSÕES	95
8	REFERÊNCIAS	99

1 INTRODUÇÃO

O aleitamento materno é a mais sábia estratégia natural de vínculo, afeto, proteção e nutrição para a criança e constitui a mais sensível, econômica e eficaz intervenção para redução da morbimortalidade infantil. Permite ainda um grandioso impacto na promoção da saúde integral da dupla mãe/bebê. A amamentação é um processo que envolve interação profunda entre mãe e filho, com repercussões no estado nutricional da criança, em sua habilidade de se defender de infecções, fisiologia e desenvolvimento cognitivo e emocional, além de ter implicações na saúde física e psíquica da mãe (OPAS, 2003; BRASIL, 2009).

Enquanto a amamentação é altamente recomendada, tratamentos farmacológicos nas nutrizes impõem dúvidas na sua continuidade, devido à falta de certeza das consequências nas crianças que a exposição a fármacos, através do leite materno pode acarretar; por isso as mulheres tendem a comprometer a farmacoterapia ou suspender a amamentação. A interrupção da amamentação durante o uso de medicamentos só deveria ser justificada quando fármaco em questão for contraindicado durante a lactação. (ITO & LEE, 2003; BERLIN & BRIGGS, 2005; CHAVES *et al*, 2007; BRASIL, 2010; ROWE *et al*, 2015).

A depressão é um problema comum entre as mulheres no período pós-parto afetando cerca de 15% das mulheres. A depressão não tratada compromete a ligação mãe-filho, o desenvolvimento cognitivo e emocional do recém-nascido, a amamentação e outros cuidados exigidos pela criança. O tratamento é realizado com terapia farmacológica por antidepressivos ou psicoterapia, sendo os inibidores seletivos da recaptção da serotonina considerados como fármacos de primeira escolha para uso na depressão pós-parto (SCALEA & WISNER, 2009; ORSOLINI & BELLANTUONO, 2015)

Dados de diferentes estudos mostraram que a quantidade de fármaco antidepressivo excretado para o leite difere de acordo com a substância utilizada. Também foram verificados alguns relatos de eventos adversos relacionados com o fármaco administrado. O Ministério da Saúde e Academia Americana de Pediatria consideraram o uso destes medicamentos compatíveis

com a lactação, porém com acompanhamento da criança (CHAVES *et al*, 2007; WANNAMACHER, 2007; BRASIL, 2010; BERLE & SPIGSET, 2011).

O estudo da excreção de fármacos no leite materno se torna importante para obtenção de evidências que permitam a administração de farmacoterapia segura e efetiva às nutrizes. O leite materno é uma matriz não convencional utilizada para verificar a excreção de diversos fármacos e tem como principal vantagem coleta não invasiva e de fácil acesso (BERLIN & BRIGGS, 2005; FRIGULS *et al*, 2010).

É observado na literatura que muitos dos estudos que quantificaram a excreção de antidepressivos no leite materno utilizaram método por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta. Estas análises podem se beneficiar do uso de técnicas com diferentes formas de detecção mais específicas como o emprego de cromatógrafo a líquido de alta eficiência acoplado ao espectrômetro de massas, que permite a detecção e quantificação de diversos compostos em pequenas quantidades de amostra. Também a cromatografia líquida acoplada ao detector fluorescência possui alta sensibilidade e seletividade, podendo ser uma ferramenta útil nestes tipos de ensaios.

Neste contexto, este trabalho teve por objetivo desenvolver e validar métodos analíticos para detecção e quantificação de fármacos antidepressivos (fluoxetina, sertralina, citalopram, paroxetina e bupropiona) em leite materno, empregando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de fluorescência (LC-FL) e também a espectrômetro de massas (LC-MS). Desta forma, pretende disponibilizar alternativas para a detecção da excreção de fármacos antidepressivos no leite humano, contribuindo com profissionais de saúde, bancos de leite e a saúde pública disponibilizando novos dados sobre o uso destes medicamentos durante a amamentação.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar métodos analíticos para detecção e quantificação simultânea de fármacos antidepressivos frequentemente utilizados no tratamento de quadros gerais de depressão e depressão pós-parto (fluoxetina, sertralina, citalopram, paroxetina e bupropiona) excretados no leite materno de lactantes.

2.2 Objetivos específicos

Desenvolver e validar método analítico para detecção e quantificação de fármacos antidepressivos empregando LC-MS em amostras de leite materno;

Desenvolver e validar método analítico para detecção e quantificação de fármacos antidepressivos empregando LC-FL em amostras de leite materno;

Otimizar e padronizar protocolo analítico de extração e determinar o pré-tratamento ideal para amostras de leite materno;

Aplicar os métodos em amostras de leite materno coletadas de mães lactantes;

Estimar a dose de fármaco recebido pela criança através do leite, comparada com a dose materna administrada.

Desde o início da existência da humanidade, a amamentação tem sido a forma de garantia da sobrevivência da espécie devido aos nutrientes e fatores imunológicos transmitidos pelo leite materno. O aleitamento materno está associado a benefícios de ordem nutricional, imunológica, afetiva, econômica e social (CHAVES *et al*, 2007).

O leite materno é o alimento natural para os bebês. Fornece toda a energia e nutrientes que o recém-nascido necessita. Conforme recomendação do Ministério da Saúde e da Organização Mundial de Saúde, o aleitamento materno deve ser exclusivo até os seis meses de idade e mantido até dois anos ou mais (WHO, 2001; BRASIL, 2009; CARVALHO & TAVAREZ, 2010).

O leite humano apresenta composição variável com o tempo. Além de variar com o tempo de maturação gestacional (pré-parto e pós-parto); a composição também depende da hora do dia e do momento em que ocorre a mamada de modo a se adaptar às características do lactente. (CARVALHO & TAVAREZ, 2010).

O componente mais abundante do leite é a água. Nesta estão dissolvidas, suspensas ou dispersas as proteínas, os compostos nitrogenados não proteicos, os carboidratos, os minerais e as vitaminas lipossolúveis. Os lipídios formam uma emulsão em equilíbrio químico com as proteínas e alguns minerais, veiculando triglicerídeos, diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos livres, fosfolipídios, esteróis e ésteres de esteroide (CARVALHO & TAVAREZ, 2010).

Apesar dos diversos benefícios que o aleitamento traz ao bebê, existem diversos fatores que contribuem para a interrupção precoce da amamentação, dentre os quais o uso de medicamento pela nutriz. Na prática, se tem observado grande frequência de uso de medicamentos durante a lactação e dentre os fatores responsáveis pelo abandono precoce da amamentação, estão os relacionados aos riscos de exposição dos lactentes a medicações maternas. Frequentemente, por desconhecimento dos profissionais de saúde, as lactantes são aconselhadas a descontinuar a amamentação (ITO & LEE, 2003; CHAVES & LAMOUNIER, 2004, CHAVES *et al*, 2007, BRASIL, 2010).

A presença de fármacos no leite materno pode, se a concentração é suficientemente alta ou se o lactente é sensível, interagir em vários níveis fisiológicos, com atenção especial ao sistema nervoso central. Mais de 90% das nutrizes podem receber prescrição de um ou mais medicamentos na primeira semana pós-parto, e após esse período, durante a lactação, a necessidade de administração de medicamentos também ocorre (BERLIN & BRIGGS, 2005).

Em estudo realizado com mães lactantes, grande parte (41%) declarou utilizar algum tipo de medicamento durante o período de lactação (DEL CIAMPO *et al*, 2007). Outros estudos mostram que em alguns países, a prevalência de lactantes que utilizam medicamentos no período de amamentação pode chegar a 90%, considerando tanto medicamentos prescritos quanto os de automedicação (SCHIRM *et al*, 2004; MCCARTER-SPAULDING, 2005).

O desenvolvimento e a presença de transtornos psiquiátricos são comuns em mulheres no período reprodutivo e seu tratamento é complexo. A depressão é um problema clínico importante com frequência estimada de 5 – 20% entre as mulheres no período pós-parto. Neste período há alto risco de desencadeamento ou reativação de quadros depressivos e a depressão pós-parto possivelmente é um quadro que se inicia durante a gestação e não é reconhecido nesta fase. A vulnerabilidade para início ou recorrência deste transtorno aumenta a possibilidade de que seja necessário o uso de antidepressivos. A depressão não tratada compromete o vínculo mãe-filho, o desenvolvimento cognitivo e emocional do recém-nascido, a amamentação e outros cuidados exigidos pela criança (PHEULA *et al*, 2003; BLAYA *et al*, 2005, ORSOLINI & BELLANTUONO, 2015).

A depressão pós-parto pode ser tratada com psicoterapia e uso de antidepressivos. Os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) são considerados fármacos de escolha para o tratamento de quadros de depressão, especialmente durante a gravidez e período pós-parto (BERLIN & BRIGGS, 2005; NOMURA & SILVA, 2007; BERLE & SPIGSET, 2011).

O Ministério da Saúde (BRASIL, 2010) realizou uma revisão de medicamentos e outras substâncias excretadas em leite materno e classificou-os

quanto ao seu uso durante a amamentação indicando a necessidade de cuidados, como acompanhamento de níveis séricos no lactente, evidências de eventos adversos correlacionados ao uso do fármaco e precauções quanto ao uso prolongado ou doses elevadas. Os fármacos antidepressivos e estabilizadores de humor tem como orientação uso criterioso quando em doses elevadas ou uso prolongado.

O leite humano é sintetizado no tecido mamário por mecanismos celulares específicos para prover as necessidades nutricionais adequadas do lactente, e neste processo existem fatores relacionados à transferência de substâncias químicas ao mesmo. Tais fatores podem estar relacionados com o leite materno, com a nutriz, com a substância química ou com o lactente (CHAVES & LAMOUNIER, 2004; BERLIN & BRIGGS, 2005; CHAVES et al, 2007; BRASIL, 2010).

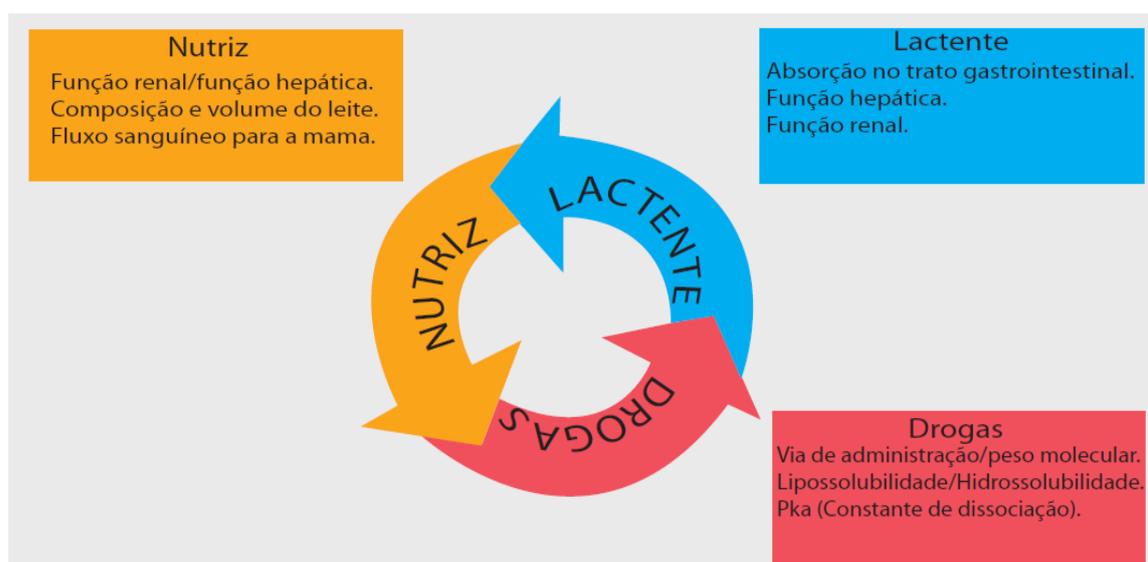


Fig. 3.1: Fatores que influenciam na excreção de fármacos para o leite materno (BRASIL, 2010)

O transporte das substâncias químicas pelo tecido mamário ocorre por mecanismos que envolvem as membranas biológicas, que possuem em sua

constituição proteínas e fosfolípidios. Após atravessar o endotélio capilar, o fármaco passa para o interstício e atravessa a membrana basal das células alveolares do tecido mamário. A maior parte dos fármacos é transferida por difusão passiva da região de maior concentração para a de menor concentração. Para algumas substâncias, como imunoglobulinas e eletrólitos, sistemas de carreamento podem estar envolvidos nesse processo (BERLIN & BRIGGS, 2005; BRASIL, 2010; FRIGULS *et al*, 2010; ROWE *et al*, 2015).

Os fármacos que são transferidos ao leite humano geralmente possuem certas características físico-químicas. Estes agentes possuem massa molecular baixa (< 500 Da), níveis plasmáticos maternos altos, baixa ligação a proteínas plasmáticas, elevada lipossolubilidade, elevada meia vida de eliminação e pKa mais elevado. A forma não ionizada das substâncias têm mais tendência de se transferir ao compartimento do leite materno. Substâncias com maior afinidade por proteínas plasmáticas aparecem em pouca quantidade no leite (BERLIN & BRIGGS, 2005, BRASIL, 2010; FRIGULS *et al*, 2010; ROWE *et al*, 2015).

No processo de transferência, também se deve considerar que o leite materno está sujeito a mudanças significativas nas concentrações de lipídios e proteínas, dependentes da fase da lactação (colostró versus leite maduro) ou até mesmo durante a mamada (leite anterior versus posterior). As proteínas e lipídios presentes no leite materno podem funcionar como transportadores de medicamentos ingeridos pela mãe. A variação da composição lipídica influi na quantidade de fármacos nele contida (CHAVES & LAMOUNIER, 2004, CHAVES *et al*, 2007, BRASIL, 2010).

O volume, também variável, pode afetar os níveis de fármacos excretados. Os fármacos transferem-se mais para o leite materno na fase de colostro devido às células alveolares serem menores e o espaço intercelular largo, porém o volume produzido de colostro é baixo comparado ao leite maduro. Com o leite maduro, um volume maior é produzido, mas uma quantidade menor de fármaco é transferida pelo crescimento das células alveolares e estreitamento dos espaços intercelulares (CHAVES & LAMOUNIER, 2004, CHAVES *et al*, 2007, BRASIL, 2010, ROWE *et al*, 2015).

Os fatores maternos têm relação com as condições fisiológicas e de saúde da mulher. Redução da capacidade de metabolizar ou excretar o fármaco pode aumentar a exposição do lactente. Então, as funções hepáticas e renais são importantes, pois influenciam os níveis séricos dos agentes e, conseqüentemente, as suas concentrações no leite (CHAVES & LAMOUNIER, 2004).

A via pela qual o medicamento é administrado tem importância pelos níveis alcançados no plasma materno e, posteriormente, no leite humano. Um fator determinante para a excreção de fármacos no leite materno é sua concentração no plasma (CHAVES & LAMOUNIER, 2004, CHAVES *et al*, 2007).

A idade da criança é uma variável importante a ser considerada para avaliar os possíveis efeitos de um fármaco utilizado pela mãe que amamenta. A grande maioria dos eventos adversos relacionados à medicação materna foi descrita em recém-nascidos e lactentes jovens, que possuem funções hepáticas e renais imaturas. Esta imaturidade pode prolongar a meia-vida dos fármacos, causando acúmulo após exposição. Além disso, a barreira hemato-encefálica é imatura em recém-nascidos e lactentes jovens, aumentando a passagem dos fármacos lipossolúveis, especialmente os que atuam no sistema nervoso central e possuem esta característica. Complicações como doenças renais, acidose metabólica entre outras, podem interferir no metabolismo e excreção dos fármacos pela criança. Contudo, lactentes com menos idade tendem a consumir menor volume de leite, com conseqüente menor exposição ao medicamento materno, e lactentes que mamam mais frequentemente em volume maior estão mais expostos às medicações maternas (CHAVES & LAMOUNIER, 2004, CHAVES *et al*, 2007; BRASIL, 2010; ROWE *et al*, 2015).

Os perfis de eventos adversos das substâncias diferem de umas para outras e influenciam na relação risco benefício de uso de medicamentos durante amamentação. Para fármacos com perfil de ocorrência de eventos adversos que se correlacionam com o aumento da dosagem, altas doses maternas podem estar associadas com maior toxicidade neonatal. O tempo de exposição e a

duração da terapia farmacológica são também fatores importantes a serem considerados (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 2015).

Alguns métodos são propostos para estimar a exposição aos fármacos dos lactentes; dentre eles temos a razão leite/plasma, dose absoluta e dose relativa no lactente. A razão leite/plasma é frequentemente usada para estimar a quantidade de fármaco transferida para o leite. É a razão entre as concentrações do fármaco no plasma e no leite em estado de equilíbrio (CHAVES & LAMOUNIER, 2004, CHAVES *et al*, 2007; BRASIL, 2010; AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 2015; ROWE *et al*, 2015).

$$\text{Razão leite/plasma} = \frac{\text{Concentração do fármaco no leite}}{\text{Concentração do fármaco no plasma}}$$

Uma baixa razão leite/plasma, em geral, indica baixa concentração do fármaco no leite. Razão maior que um não traz preocupação quando a concentração da substância no plasma materno é muito baixa ou o fármaco não é absorvido pelo lactente. Embora as concentrações no plasma e no leite sejam flutuantes, são utilizadas medidas fixas para o cálculo desta medida (CHAVES & LAMOUNIER, 2004, CHAVES *et al*, 2007; BRASIL, 2010; ROWE *et al*, 2015).

A dose recebida pelo lactente pode ser calculada conhecendo-se a concentração do fármaco no leite e o volume de leite consumido:

$$\text{Dose absoluta no lactente} = \text{concentração no leite} \times \text{volume de leite consumido}$$

A determinação precisa dessas variáveis é difícil de ser obtida, então se utiliza uma estimativa. O volume de leite consumido é altamente variável, e depende da idade da criança. Também há influência do tipo de aleitamento praticado, se exclusivo ou não. O volume de leite consumido é estimado em aproximadamente 150 mL/kg/dia. Na prática, é possível comparar a dose absoluta diretamente com a dose terapêutica normal para idade do lactente se esta é disponível (CHAVES & LAMOUNIER, 2004, CHAVES *et al*, 2007; BRASIL, 2010; FRIGULS *et al*, 2010; ROWE *et al*, 2015).

A dose relativa no lactente ou porcentagem da dose materna é a estimativa da porcentagem da dose materna recebida pelo lactente através do leite.

$$\text{Dose relativa do lactente (\%)} = \frac{\text{Dose absoluta no lactente } (\mu\text{g/kg/dia}) \times 100}{\text{Dose materna } (\mu\text{g/kg/dia})}$$

Usualmente, a dose relativa do lactente deve ser menor que 10% para o fármaco ser considerado seguro. Quando supera valor de 25%, considera-se risco elevado para efeitos adversos no lactente. Porém, este método possui limitações, pois se baseia no princípio que mãe e filho possuem mesma absorção, metabolização e excreção (CHAVES & LAMOUNIER, 2004, CHAVES *et al*, 2007; BRASIL, 2010; FRIGULS *et al*, 2010; ROWE *et al*, 2015).

Dados de diferentes estudos mostraram que a quantidade de fármaco antidepressivo excretado para o leite difere de acordo com a substância utilizada. Também foram verificados alguns relatos de eventos adversos relacionados com o fármaco administrado (CHAVES *et al*, 2007; WANNAMACHER, 2007; BRASIL, 2010; BERLE & SPIGSET, 2011).

Em estudo realizado por Anderson e colaboradores (2016) foi observado que 63% dos eventos adversos em bebês expostos a medicamentos através da amamentação ocorreram no primeiro mês de vida e 16% são relatados no segundo mês. Destes casos, 70% dos eventos adversos envolveram fármacos que agem no sistema nervoso central, como opioides, antidepressivos, anticonvulsivantes entre outros.

Mais frequentemente eventos adversos foram relatados após exposição à fluoxetina e ao citalopram. Os eventos observados foram em maior parte inespecíficos e podem ser considerados coincidentes. Choros, irritabilidade, diminuição do apetite e diarreia têm sido descritos em alguns casos para fluoxetina. Há relatos de diminuição da curva de crescimento para crianças de mães que recebiam tratamento com fluoxetina durante a lactação. Para citalopram, hipotonia, cólica, diminuição do apetite, inquietação e dificuldade de dormir foram relatados. Alguns casos de convulsões foram relatados após uso

de bupropiona em crianças com cerca de seis meses que foram amamentadas por mães em tratamento com este fármaco. Também há relato para bupropiona de perturbações no sono e emese. Paroxetina parece estar associada ao vômito e desidratação em criança de 18 meses e sertralina pode estar associada a tremor em bebê de menos de uma semana (PHEULA *et al*, 2003; BERLIN & BRIGGS, 2005; WANNAMACHER, 2007; BERLE & SPIGSET, 2011, FRIGULS *et al*, 2010, ANDERSON *et al*, 2016).

Os fármacos fluoxetina, sertralina, citalopram e paroxetina pertencem a classe dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS), estando estes entre os mais prescritos desta classe. Os ISRSs são fármacos que não interferem nos neurotransmissores além da serotonina. Eles atuam no neurônio pré-sináptico inibindo especificamente a recaptação desse neurotransmissor, dando assim um efeito principal, que é o antidepressivo. Esses fármacos possuem ampla aplicação: transtornos psiquiátricos como esquizofrenia, ansiedade, enxaqueca e transtornos de ansiedade. (BLAYA *et al*, 2005; BRUNTTON *et al*, 2010).

Bupropiona é um inibidor da recaptação da norepinefrina e da dopamina. Seu mecanismo de ação é ainda desconhecido, mas, presume-se, esteja envolvido com os mecanismos dopaminérgicos e noradrenérgicos (BLAYA *et al*, 2005; BRUNTTON *et al*, 2010).

Estudo realizado sobre uso de antidepressivos em população adulta relata os inibidores seletivos da recaptação de serotonina como o grupo mais utilizado (60,2%) (GARCIAS *et al*, 2008). Em outro estudo sobre uso de psicofármacos, os fármacos inibidores seletivos da recaptação da serotonina, fluoxetina e sertralina, foram relatados como os mais utilizados entre os antidepressivos, sendo a fluoxetina a substância com maior consumo (28,6%) entre os entrevistados (ROCHA & WERLANG, 2013).

Informações relativas à farmacocinética dos fármacos estudados, como meia vida, ligação a proteínas plasmáticas, pKa, metabólitos, são apresentados na tabela 3.1. Suas estruturas moleculares são apresentadas na figura 3.2.

Diversos estudos foram realizados quanto à quantificação de fármacos antidepressivos no leite materno. Os métodos desenvolvidos realizaram a quantificação das substâncias no leite, plasma materno e também no plasma infantil (Tabela 3.2).

Tabela 3.1: Dados de farmacocinética dos antidepressivos fluoxetina, sertralina, citalopram, paroxetina e bupropiona (Drugdex®)

	Massa molecular	Ligação a proteínas plasmáticas	pKa	Meia vida	Pico plasmático	Metabólito
Fluoxetina	309,3	94,5%	9,8	1 a 3 dias (dose única) e 4 a 6 dias após uso contínuo	6 a 8 h	Norfluoxetina – atividade farmacológica similar, meia vida longa de 4 a 16 dias
Sertralina	306,2	99%	9,85	26h concentrações estáveis por até uma semana	4,5 a 8,4h	Desmetilsertralina-fracamente ativo
Citalopram	324,4	80%	9,78	36h	2 a 4h	Desmetilcitalopram, didesmetilcitalopram – ativos; estudos in vitro indicam que citalopram é oito vezes mais potente que seus metabólitos e estes não contribuem para sua eficácia clínica
Paroxetina	329,3	95%	9,77	21 a 24h	6h	Não possui metabólitos com atividade significativa
Bupropiona	239,7	84%	8,22	19 a 21h	6h	Hidroxibupropiona, treidrobupropiona, eritroidrobupropiona – atividade menor que bupropiona

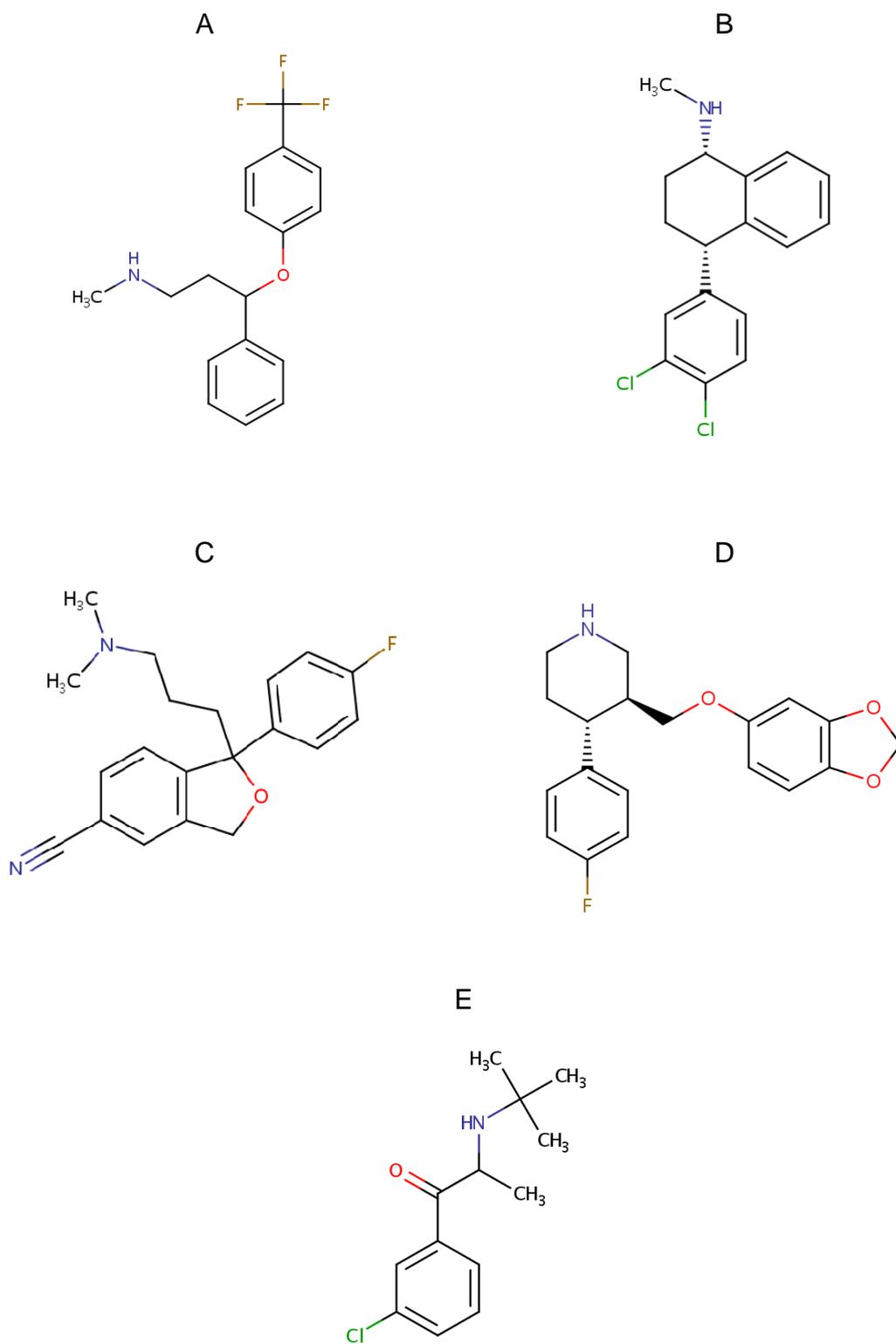


Fig. 3.2: Estruturas químicas dos antidepressivos fluoxetina (A), sertralina (B), citalopram (C), paroxetina (D) e bupropiona (E) (DRUGDEX®)

Tabela 3.2: Estudos reportados na literatura para determinação de fármacos antidepressivos em leite materno e outras matrizes biológicas

Autor	Ano	Substância analisada	Matriz	Método	Concentração encontrada no leite materno (ng/mL)	N	Relato evento adverso
TADDIO <i>et al</i>	1996	Fluoxetina, norfluoxetina	Leite materno	CG - MS	23,1 – 189,1	10	Não
JENSEN <i>et al</i>	1997	Citalopram, desmetilcitalopram	Leite materno, serum materno	CLAE/UV	300 – 500*	1	Não
SPIGSET <i>et al</i>	1997	Citalopram	Leite materno, plasma materno	CLAE/UV	Baixas concentrações	3	Não
STOWE <i>et al</i>	1997	Sertralina, desmetilsertralina	Leite materno, plasma infantil	CLAE/UV	8 – 92	11	Não
KRISTENSEN <i>et al</i>	1998	Sertralina, desmetilsertralina	Leite materno, plasma infantil	CLAE/UV	670 – 4640** 144 – 7897**	8	Não
BEGG <i>et al</i>	1999	Paroxetina	Leite materno, plasma infantil	CLAE/UV	26 – 81	10	Não
KRISTENSEN <i>et al</i>	1999	Fluoxetina, norfluoxetina	Leite materno, plasma materno	CLAE/UV	26 – 384*** 25 -321***	10	Sim
MISRI <i>et al</i>	2000	Paroxetina	Leite materno, serum infantil, serum materno	CG - MS	Baixas concentrações	24	Não
SCHIMIDT <i>et al</i>	2000	Citalopram	Leite materno, plasma materno	CLAE/UV	205	1	Sim
STOWE <i>et al</i>	2000	Paroxetina	Leite materno, plasma materno, plasma infantil	CLAE/UV	2 – 101	16	Não
HENDRICK <i>et al</i>	2001	Fluoxetina, norfluoxetina	Leite materno, plasma materno, plasma infantil	CLAE/UV	31 – 235 16 – 222	19	Não
HEIKKINEN <i>et al</i>	2002	Citalopram	Leite materno, plasma infantil	CLAE/UV	Baixas concentrações	11	Não
SURI <i>et al</i>	2002	Fluoxetina, norfluoxetina	Leite materno,	CLAE/UV	3 – 242 18 – 324	10	Não

Autor	Ano	Substância analisada	Matriz	Método	Concentração encontrada no leite materno (ng/mL)	N	Relato evento adverso
			plasma materno				
HAAS <i>et al</i>	2004	Bupropiona, hidroxibupropiona, eritroidroxibupropiona, treoidrobupropiona	Leite materno, plasma, saliva e urina materno	LC-MS	26 – 81	10	Não
HOSTETTER <i>et al</i>	2004	Fluoxetina, norfluoxetina, fluvoxamina, paroxetina, sertralina, desmetilsertralina, doxepina, nordoxepina, desipramina, imipramina, nortriptilina, amitriptilina	Leite materno, plasma infantil	CLAE/UV	Sertralina: 11 – 938 Desmetilsertralina: 20 -1498 Paroxetina: 5 – 101 Fluoxetina: 2 – 316 Norfluoxetina: 2 – 303	75	Não

* concentrações calculadas em nmol/L **AUC (µg/L.h) *** concentrações calculadas em µg/L

No estudo de Kristensen e colaboradores (1999) os valores no plasma infantil encontrados variaram de 38 a 412 µg/L de fluoxetina quantificada e para norfluoxetina de 59 a 397 µg/L. A dose relativa infantil média foi calculada em 6,81%. Hendrick e colaboradores (2001) encontraram concentrações de <1 a 84 ng/mL para fluoxetina e <1 a 265 ng/mL para norfluoxetina no plasma infantil.

A farmacocinética da fluoxetina e norfluoxetina durante a gravidez e lactação foi estudada por Heikkinen e colaboradores (2003) sendo que a média de exposição estimada através do leite materno obtida foi de 2,4% para fluoxetina e 3,8% para norfluoxetina. As concentrações no plasma infantil foram de 65% e 72 % respectivamente com relação às concentrações encontradas no plasma materno. O crescimento e desenvolvimento neurológico das crianças foram acompanhados até um ano de idade e considerados como normais.

Stowe e colaboradores (1997) determinaram a excreção de sertralina no leite humano em amostras de 11 mães que eram tratadas com este fármaco. Concentrações mais elevadas de sertralina foram observadas nas coletas realizadas 7 a 10 horas após a administração do fármaco. Concentrações detectáveis de sertralina e desmetilsertralina foram encontradas em três de seis amostras de plasma infantil analisadas. Para Kristensen e colaboradores (1998)

a dose relativa infantil média encontrada foi respectivamente de 0,9% e 1,32% para sertralina e desmetilsertralina.

A farmacocinética da excreção da sertralina no leite materno foi estudada por Stowe e colaboradores (2003) e foi verificado que as concentrações encontradas no leite tiveram média de 129,2 ng/mL e para desmetilsertralina foi 257,7 ng/mL. O estudo foi conduzido com amostras coletadas de 26 mães. O pico de concentração foi encontrado para ambos os analitos após 8 a 9h da ingesta do medicamento. A partir destas análises, é sugerido pelos autores, o descarte do leite materno após este período de administração do fármaco, como estratégia para diminuir a exposição do bebê. Com esta estratégia do descarte, os autores sugerem uma diminuição da exposição de até 17,1%. Das amostras de plasma infantil analisadas, 18% apresentaram concentrações detectáveis de sertralina e para 50% delas concentrações detectáveis de desmetilsertralina. Nestes estudos também foi observado que uma maior concentração plasmática materna resultou em maior concentração do fármaco no leite materno.

Em revisão e meta-análise realizadas por Pinheiro e colaboradores (2015) sobre uso de sertralina e amamentação verificaram que das concentrações de plasma infantil relatados nos estudos 87,4% se encontravam abaixo do limite de detecção e a meta-análise não foi significativa para correlação entre concentração materna e infantil. O mesmo também foi observado para seu metabólito desmetilsertralina. Também foram verificados poucos relatos de eventos adversos nos estudos incluídos na revisão.

Nos estudos realizados com citalopram, Spigset e colaboradores (1997), Jensen e colaboradores (1997) e Schimidt e colaboradores (2000) encontraram baixas concentrações deste fármaco no leite excretado sendo que estes estudos envolveram poucas pacientes ($n < 3$). O estudo de Schimidt e colaboradores (2000) é um relato de caso onde o lactente apresentou eventos adversos após amamentação com leite da mãe que utilizava o medicamento. A concentração encontrada no plasma infantil foi de 12,5 ng/mL, sendo observado no bebê inquietação para dormir; por isso a dosagem de citalopram foi diminuída. Para

Heikkinen e colaboradores (2002) as concentrações de citalopram e seus metabólitos no plasma infantil foram muito baixas ou não detectáveis.

No estudo de Begg e colaboradores (1999), que envolveu mães que recebiam administração de paroxetina, foram quantificados entre 12 e 140 µg/L nas amostras de plasma infantil analisadas e dose relativa variando entre 0,38 a 2,24%. Stowe e colaboradores (2000) analisaram amostras de leite, plasma materno e plasma infantil, sendo que no plasma das crianças a paroxetina não foi detectada. Já Misri e colaboradores (2001) obtiveram dose relativa infantil média de 1,1% após análise de amostras de 24 nutrizes. Em todas as amostras de plasma infantil, as concentrações de paroxetina encontradas estavam abaixo do limite inferior de quantificação.

Para bupropiona, um estudo foi realizado por Haas e colaboradores (2004) em mães que recebiam este fármaco para tratamento do tabagismo e a dose infantil relativa esperada para o fármaco e seus metabólitos foi de cerca de 2% no total.

Em revisão sistemática realizada por Scalea & Wisner (2009) sobre uso de antidepressivos e amamentação, após análise dos dados da literatura foi verificado que sertralina e paroxetina apresentaram pouca probabilidade de desenvolver níveis séricos detectáveis. As crianças expostas à fluoxetina através do leite materno mostraram maior probabilidade de apresentar níveis elevados do fármaco, especialmente se as futuras mães já iniciaram o tratamento durante a gravidez. Os dados de citalopram foram considerados limitados quando comparados aos de outros fármacos do grupo, mas sugeriram que algumas crianças desenvolveram níveis plasmáticos quantificáveis o que pode ser associado a eventos adversos (SCALEA & WISNER, 2009).

Weissman e colaboradores (2004) reportaram em seu estudo que para citalopram, paroxetina e fluoxetina eventos adversos em curto prazo puderam ser identificados, sendo que dados para eventos a longo prazo são limitados. Os autores concluíram que a amamentação pode ser realizada durante o uso de antidepressivos, porém a detecção rotineira dos fármacos em plasma infantil faz-se necessária. Estas medições são consideradas importantes, pois os níveis dos

fármacos no plasma infantil são influenciados pela ingesta através do leite e pela capacidade de metabolização da substância.

Para determinação de antidepressivos e outros fármacos psicotrópicos em plasma, diversos estudos relatam o uso do LC-MS. Juan e colaboradores (2005) desenvolveram método para quantificação de fluoxetina, citalopram, paroxetina e venlafaxina após procedimento de extração em fase sólida. Castro e colaboradores (2008), após procedimento de extração de plasma e fluido oral em fase sólida, realizaram a quantificação de nove antidepressivos incluindo paroxetina, sertralina, citalopram e fluoxetina. Kirchherr e Kuhn-Velten (2006), Vecchione e colaboradores (2012) e Uřinovska e colaboradores (2012) utilizaram técnica de precipitação de proteínas e realizaram a quantificação de 48, 18 e 9 psicotrópicos respectivamente, incluindo citalopram, fluoxetina, paroxetina e sertralina. Fernández & Wille (2012) determinaram a concentração de 27 antidepressivos com utilização de técnica de extração líquido-líquido.

Foi encontrado apenas um estudo utilizando LC-MS para determinação de bupropiona e metabólitos em leite materno (HAAS *et al*, 2004). No entanto, determinação simultânea com os antidepressivos propostos, não foi localizada.

Também, até o momento não foram encontradas referências sobre estudos com fármacos antidepressivos em leite materno utilizando LC-FL. Foram relatados métodos desenvolvidos para determinação dos fármacos fluoxetina, citalopram e paroxetina em plasma e sangue (RAGGI *et al*, 1998, MENG & GAUTHIER, 2005, KOVACEVIC *et al*, 2006, MANDRIOLI *et al*, 2007, FREITAS *et al*, 2010). Tem-se relato de métodos para determinar sertralina em plasma, mas com derivatização deste com cloreto de dansila (SEREBRUANY *et al*, 2005). Alguns métodos multi-analito envolvendo as substâncias citadas são reportados (KRISTOFFERSEN *et al*, 1999; FREITAS *et al*, 2010), envolvendo derivatização das substâncias com cloreto de dansila (LUCCA *et al*, 1999). A aplicação deste método parece ser promissora pela possibilidade de informações adicionais que podem ser fornecidas complementando as técnicas já encontradas na literatura.

4 CAPÍTULO 1

Development and validation of a bioanalytical method for five antidepressants in human milk by LC-MS

Publicado no periódico Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 129, p. 502-508, 2016

Development and validation of a bioanalytical method for five antidepressants in human milk by LC–MS

Fernanda Rodrigues Salazar, Felipe Bianchini D'Avila, Marcella Herbstrith de Oliveira, Pamela Lukasewicz Ferreira, Ana Maria Bergold

Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil

4.1 Abstract

The use of medications during lactation is a common practice; however, pharmacological treatments impose serious doubts to both professionals and nursing mothers regarding the safety of drugs used during this period. Most of drugs are excreted in breast milk and there is great variability in the amount of analytes that can be received by the infant. Dilemmas about breastfeeding arise most commonly in relation to postpartum depression. Depression is a major clinical problem during the postpartum period and the vulnerability to onset or recurrence of depressive symptoms increases the possibility of psychotropic drug use during lactation. Selective inhibitors of serotonin reuptake are commonly prescribed for the treatment of depressive disorders, including fluoxetine, sertraline, citalopram, and paroxetine. A validated bioanalytical method using liquid chromatography coupled to mass spectrometry was developed and validated for determination of antidepressants in human milk following protein precipitation. The bioanalytical method was successfully applied to assess milk samples from nursing mothers. From found concentrations, infant absolute (4.36 – 12.26 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) and relative dose (0.60 – 2.90%,) were estimated and low values were obtained indicating safe use during lactation. However, other factors such as complementary feeding and hepatic or renal disorders in the infant should be considered.

Keywords: human milk, liquid chromatography-mass spectrometry, antidepressants, excretion, selective inhibitors of serotonin reuptake

4.2 Introduction

Breastfeeding is an essential physiological process with health and social benefits. It provides nutrition, immunological and many other bioactive factors and can prevent many diseases in the infant. The World Health Organization (WHO) and Pediatric Academics around the world have endorsed breast milk as the ideal form of nutrition for the newborn and they emphasize the physical and emotional benefits for the baby. They also recommend exclusive breastfeeding for the first six months of life and to continue breastfeeding for at least the first year of life [1,2].

The need for pharmacological treatment is common in the postpartum period. Postpartum women often take either prescription or over-the-counter medications. Many of these mothers are advised to stop breastfeeding or avoid drug therapy based on information obtained from product literature [3,4].

There is a substantial incidence of immediate postpartum disorders, such as depression, and it has focused attention on the dilemma regarding the use of psychotropic medications in postpartum women. Depression that is not treated can compromise the infant's development, breastfeeding, and other essential needs [1].

Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) are often the first choice for the treatment of depression, especially in the postpartum period. This group includes fluoxetine, sertraline, citalopram, and paroxetine [1,3-5]. In Brazil, these drugs were the most frequently prescribed among the antidepressants [6]. Bupropion is an atypical antidepressant that acts as a dopaminergic and noradrenergic reuptake inhibitor. It is an effective therapy for smoking cessation and relapse prevention and can be particularly useful in preventing postpartum relapse [7].

Data from breast milk studies are important to defining the risk-benefit assessment of antidepressant therapy in nursing women. Breast milk is an unconventional matrix that has been used to assess infant exposure to various drugs. It has an advantage of easy and non-invasive collection, although

extraction of drugs is an analytical challenge because of its high protein/fat content and changing composition during postpartum period [1,3,4].

Many studies have been published for the determination of antidepressants in plasma and human milk. Quantification method for breast milk was mainly liquid chromatography with ultraviolet detection and liquid-liquid extraction or solid phase extraction technique as an extraction procedure [8-16]. Single drug determination was established in these studies; only one reported simultaneous determination of antidepressants in human milk [15]. A bupropion study in breast milk using LC-MS as a quantification method has been reported [16]. Moreover, multi-drug methods for determination of antidepressants and other psychotropic drugs in plasma have been generated using LC-MS [17-19]. Therefore, a liquid chromatography-mass spectrometry method to measure and detect five antidepressants (fluoxetine, sertraline, citalopram, paroxetine, and bupropion) in human milk after protein precipitation as a cleaning and extraction procedure was developed and validated. This method was applied to analyze breast milk samples collected from the milk bank of two hospitals in Rio Grande do Sul, Brazil. The aim of this paper is to contribute an alternative method to analyze human milk samples and provide data on drug therapy during breastfeeding.

4.3 Material and methods

4.3.1 Chemicals and reagents

Fluoxetine (FLU), sertraline (SER), citalopram (CIT), paroxetine (PAR), and bupropion (BUP) were obtained from Pharmanostra Ltda (Campinas, Brazil). Atenolol, used as an internal standard, was obtained also from same company. Methanol, acetonitrile, and acetic acid used in the analyses were from Merck® (Frankfurt, Germany) and ammonium acetate from FMaia Ind e Com (Cotia, SP). All solvents were of analytical grade. Ultrapure water was obtained using a Mili-Q Plus system from Milipore (Bedford, MA, USA).

4.3.2 Human milk

Samples of human milk were obtained from mothers in the lactation period that were taking antidepressants and agreed to participate in this study. The samples were collected at two hospitals – Santa Casa de Caridade de Bagé and Hospital Materno Infantil Presidente Vargas, Porto Alegre, Brazil, where the volunteers were being treated. A nurse supervised collection of the samples, which were stored at -20 ± 2 °C. Drug-free milk was collected from volunteer mothers and donated by Santa Casa de Caridade de Bagé, Brazil.

4.3.3 Standard solutions, work solutions, and quality control samples

Stock solutions of fluoxetine, sertraline, citalopram, paroxetine, bupropion, and atenolol (IS) at 1 mg/mL were prepared in acetonitrile. Work solution of IS was prepared by diluting stock solution to 1 µg/mL in acetonitrile. Work solutions of the antidepressant compounds were freshly prepared at 1, 2, 4, 8, 20, and 40 µg/mL in water. All solutions were stored at -20 ± 2 °C. Quality control samples were prepared in 1 mL of drug-free milk. For fluoxetine, citalopram, and bupropion, quality control concentrations were prepared at 15 ng/mL (low quality control - LQC), 160 ng/mL (middle quality control – MQC), 240 ng/mL (high quality control – HQC), and 640 ng/mL (dilution quality control – DQC). Sertraline and paroxetine were prepared at 60 ng/mL (LQC), 300 ng/mL (MQC), 450 ng/mL (HQC), and 1200 ng/mL (DQC). Dilution quality samples were diluted to 320 and 600 ng/mL, respectively. Lower limit of quantification (LLOQ) was prepared at 5 ng/mL (fluoxetine, citalopram, and bupropion) and 20 ng/mL (sertraline and paroxetine). Calibration standards were made by spiking drug-free milk with suitable amounts of work solutions at concentrations of 5, 10, 20, 40, 80, 160, and 320 ng/mL (fluoxetine, citalopram, and bupropion) and 20, 40, 80, 120, 200, 400, and 600 ng/mL (sertraline and paroxetine). Drug-free milk used for calibration standards and quality control samples was collected from a pool of 15 donors.

4.3.4 Sample preparation

A 250 μL volume of milk sample (blank, quality control, calibrators, and real samples) was transferred to a 1.5 mL polypropylene conical tube and 50 μL of IS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were added. Acetonitrile (700 μL) ice-cold ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) was added to the tube. This mixture was vortexed for 1 min and centrifuged at 14000 rpm for 15 min at 4°C . After this procedure, the supernatant was filtered in 0.22 μm PTFE 13 mm Millex directly to a vial.

4.3.5 Instruments

The LC system consisted of an Agilent 1260 Infinity Series instrument equipped with a G1311B quaternary pump, a G1329B auto sampler, G1314F UV/VIS detector, and a G1316A thermostatizer coupled to an Agilent 6120B series quadrupole mass detector. Analytical data were acquired and analyzed using Chem Station software (v. 1.4.1), all from Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA). An Eppendorf 5430R (Hamburg, Germany) centrifuge was used to prepare all samples.

4.3.6 Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS)

LC optimal conditions were achieved with a Nucleosil C8 column (5 μm , 150 x 4.6 mm Macherey Nagel, Düren, Germany) protected by a C8 guard column (4 x 2.0 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA). Temperature for analyses was set at $35\text{ }^{\circ}\text{C}$. The mobile phase was composed of 20mM ammonium acetate pH 6.0 (adjusted with 0.1% acetic acid) and acetonitrile (25: 75 v/v) in isocratic condition with a flow rate of 0.7 mL/min. Injection volumes were 10 μL .

Single ion monitoring was performed for quantitative analyses. Mass detector was operated with an electrospray ionization source in positive mode (ESI+) and the following parameters were set: nebulizer pressure at 55 psi, drying gas flow at 12L/min, drying gas temperature at 350°C , and capillary voltage at 1000V. Gain value was kept at 1. Quantification and confirmation ions (m/z) were

monitored for each compound with different fragmentation voltage. Ions monitored for fluoxetine were 310 and 148 (m/z), sertraline 306 and 275 (m/z), citalopram 325 and 109 (m/z), paroxetine 330 and 192 (m/z) and finally for bupropion 240 and 184 (m/z). Fragmentation voltage was set at 70 V for bupropion and paroxetine and 100 V for fluoxetine, sertraline and citalopram. IS monitored ions (m/z) were 267 and 145 with fragmentation voltage at 100V. Figure 4.1 represents the proposed fragmentation for the analytes fluoxetine, sertraline, citalopram, paroxetine, and bupropion.

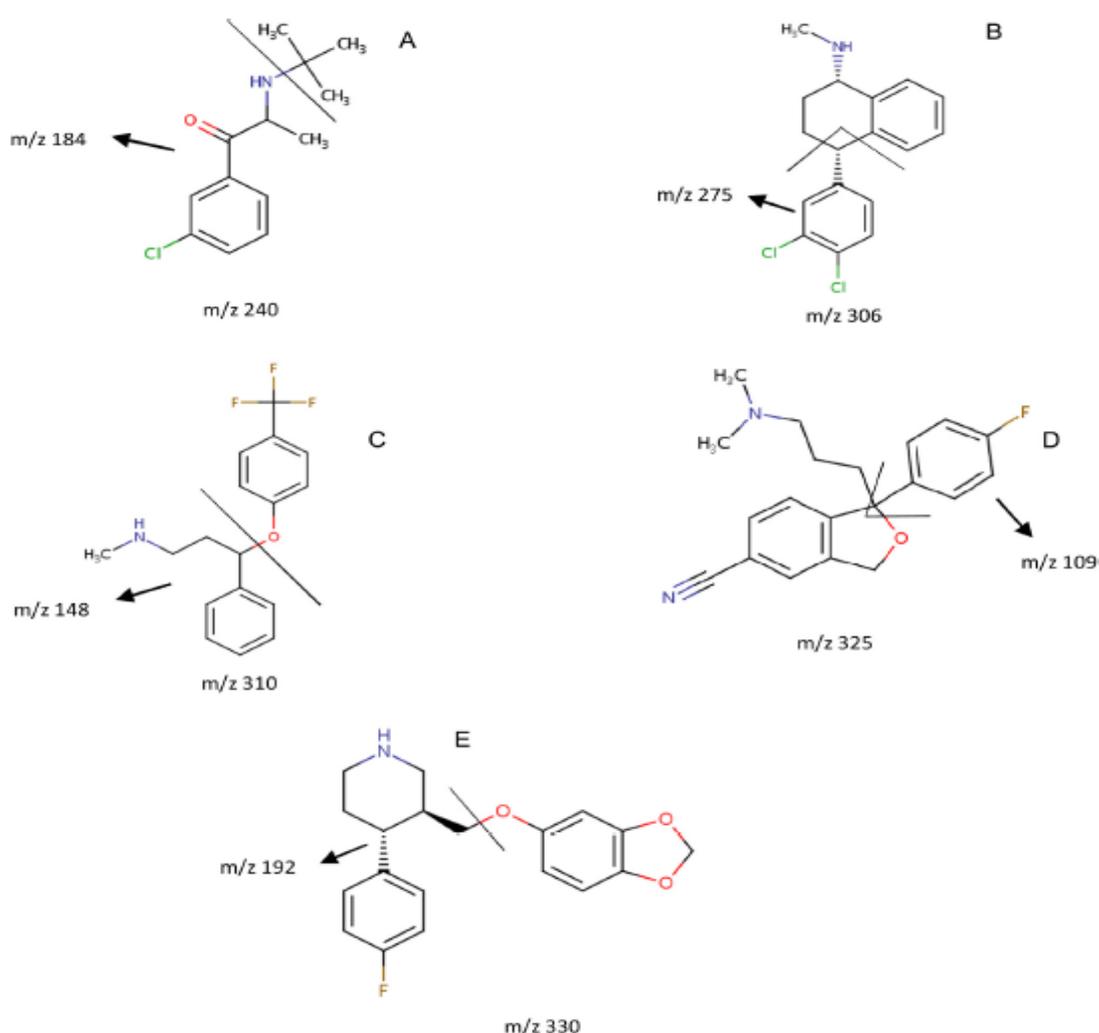


Fig. 4.1 Molecular structure and proposed fragmentation monitored for bupropion (A), sertraline (B), fluoxetine (C), citalopram (D) and paroxetine (E)

4.3.7 Bioanalytical method validation

Validation was performed according to the Guideline on Bioanalytical Method Validation by the European Medicines Agency (2012) [20]. The assessed parameters were: selectivity, sensitivity, linearity, precision, accuracy, carryover, matrix effect, and stability of analytes.

Selectivity of the method was evaluated by analyzing six blank milk samples from different donors. Results obtained were compared with those obtained from samples spiked with analytes at the lower limit of quantification (LLOQ) concentration. In addition, samples added with other psychotropic drugs, like diazepam, bromazepam, chlorpromazine, levopromazine, sulpiride, amitriptyline, and nortriptyline, observed in the treatment of donor patients, were tested to assess selectivity.

Carryover was tested during validation, injecting blank samples three times, one time before and two times after analyzing the sample in the highest analytical level. The matrix effect was investigated by comparing signals from six samples of milk spiked with analytes and solutions prepared with antidepressant compounds, both in low and high quality control concentrations. The matrix factor was calculated for each sample to evaluate the matrix effect; coefficient of variation - CV (%) was obtained and must be below 15%. The matrix factor was calculated by using the following formula:

$$MF = (\text{peak area of analyte in matrix} / \text{peak area of IS in matrix}) / (\text{peak area of analyte in solution} / \text{peak area of IS in solution})$$

A seven-point calibration curve of all analytes was made to assess linearity of the method. Three calibration curves were prepared by spiking drug-free milk with analytes and internal standard solutions. Calibration curves were made plotting the ratio of peak area of analyte and IS versus concentration. Regression equation and correlation coefficients (r) were obtained from calibration curves and linearity was assessed evaluating linear regression analysis, the correlation coefficients, and standardized residual plots to check outliers (± 3 standard deviations). Lower limit of quantification (LLOQ) was determined experimentally

by injection of decreasing concentrations of all analytes; it was defined as the lowest concentration that could be measured with precision (CV%) and deviation from nominal concentration less than 20 %.

Samples at five different concentrations (LLOQ, LQC, MQC, HQC, and DQC) of all analytes were prepared in five replicates and analyzed to evaluate precision and accuracy. DQC was not within the calibration curve range so dilution was necessary (1:2). Within-run assays were performed in a batch and between run assays over three consecutive days. Precision was determined by calculating the coefficient of variation (%) and accuracy expressed as relative bias (%) according to the following equation:

$$\text{Relative bias (\%)} = (\text{calculated concentration} - \text{theoretical concentration}) \times 100 / \text{Theoretical concentration}$$

For both assays, values were expected to be lower than 15% for LQC, MQC, HQC, and DQC and lower than 20% for LLOQ.

Recovery was performed at LQC, MQC, and HQC using the proposed extraction procedure. Samples were prepared in human milk and in solutions. The percentage of recovery was evaluated by comparing responses from extracted samples with responses in the solution (unextracted) samples that represent 100% recovery.

Stability of the analytes was assayed to evaluate different conditions that could occur during sample preparation and sample analysis, as well as storage conditions. Samples at low and high QC levels were employed for all experiments in triplicate. Freshly prepared and processed samples were compared with samples after the storage period. Freeze thaw stability was determined over freeze-thaw cycles. In each cycle, frozen milk samples were thawed at room temperature and refrozen. Short-term stability was assessed after keeping milk samples on bench top (room temperature) for 6h. Long-term stability was evaluated after storage milk samples for 30 days frozen (-20 °C). Processed milk samples were left in the autosampler overnight, and then analyzed to determine their stability. Stability of stock solutions was evaluated by keeping solutions refrigerated (4 – 8°C) for 10 days.

4.3.8 Ethics

Informed consents were given by all participating mothers in the study, with explanations regarding the procedure, purposes, and possible harm of the research. Ethics committees from both hospitals where samples were collected approved this study.

4.4 Results and discussion

4.4.1 Method development

Although LC methods have been developed for determining antidepressants in human milk, they have mainly focused on single drug determination and used the ultraviolet detector for quantification [8-15]. For other biological matrices, such as plasma, various studies with multidrug detection for antidepressants have been reported using the LC method coupled to mass spectrometric detection due to its high sensitivity and selectivity [16-19]. Therefore, an LC method with mass spectrometric detection was developed for simultaneous analysis of antidepressants in the breast milk.

Optimized chromatographic conditions allow greater sensitivity and selectivity to the bioanalytical method. Since each analyte (fluoxetine, sertraline, citalopram, paroxetine, and bupropion) has different physicochemical properties, chromatographic parameters that produce sharp peaks and adequate responses were tested. Therefore, different pH, flow rates, oven temperature, buffer molarity, and mobile phase composition values were assayed. Acetonitrile-ammonium acetate buffer (pH 6.0; 20 mM) (75:25, v/v) as a mobile phase was deemed most appropriate and gave a better peak shape, spectral response, and sensitivity. Nucleosil C8 column (5 μ m, 150 x 4.6 mm) and optimized flow rate of 0.7 mL/min improved chromatographic separation of all compounds. Also, these optimized conditions allowed analytes to be measured in isocratic elution. Total analytical run was 15 min and retention times of 3.8 (atenolol IS), 5.7 (bupropion), 7.8 (citalopram), 8.2 (paroxetine), 9.9 (fluoxetine), and 11.8 min (sertraline) (Fig. 2).

Reported methods have employed the liquid-liquid extraction and SPE procedure to extract the analytes (fluoxetine, sertraline, citalopram, paroxetine, and bupropion) from plasma and human milk [8-17], techniques that are complex and time-consuming. Protein precipitation is a simple and efficient method for sample treatment. A few studies used protein precipitation as an extraction procedure in plasma with acetonitrile and methanol as solvents [18,19], confirming it as a useful procedure. Accordingly, various organic solvents were tested and optimized based on analyte recovery. Ice-cold acetonitrile (stored at -20 °C) resulted in good simultaneous recovery of all analytes (Table 1). Peak shape and responses of all compounds were proved to be sufficient. In addition, only small quantities of human milk and solvent were needed to perform the procedure.

4.4.2 Method validation

A chromatogram of blank human milk (Fig. 4.2) was compared to the chromatogram of the analytes at LLOQ level and IS (Fig. 4.2) to evaluate selectivity. A few interfering peaks were observed next to the citalopram peak and the IS peak, but with responses that did not interfere with these analytes. No other interfering peaks were observed. Moreover, spiked samples with other psychotropic drugs showed no interfering peaks.

Potential carryover was assessed and the absence of any signal on the chromatograms was confirmed. For the matrix effect assay, signals of human milk samples and solutions at LQC and HQC were analyzed. The matrix effect evaluated by CV% of the matrix factor were: 5.6% for fluoxetine, 6.7% for sertraline, 6.2% for citalopram, 6.5% for paroxetine, and 5.9% for bupropion. These results indicated the absence of a significant matrix effect.

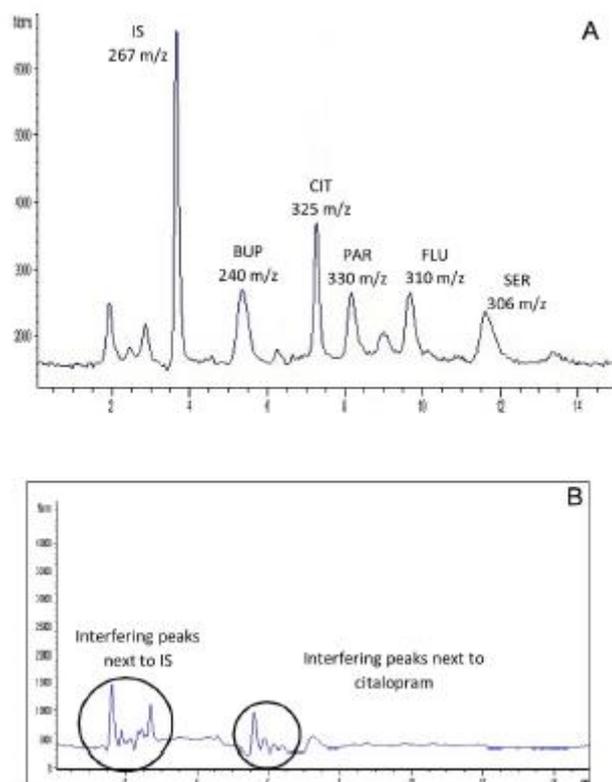


Figure 4.2. LC-MS chromatogram of extracted milk sample of the analytes atenolol IS (50 ng/mL), bupropion (5 ng/mL), citalopram (5 ng/mL), paroxetine (20 ng/mL), fluoxetine (5 ng/mL) and sertraline (20 ng/mL) (A) and (B) extracted blank human milk sample.

Calibration curves with seven points ranged from 5 to 320 ng/mL for fluoxetine, citalopram, and bupropion and from 20 to 600 ng/mL for sertraline and paroxetine. The method was found to be linear in the proposed concentration range presenting suitable correlation coefficients (r): fluoxetine (0.9930), sertraline (0.9984) citalopram, (0.9996), paroxetine (0.9992), and bupropion (0.9951). Significant linear regression ($p < 0.05$) was also presented, as well as standardized residual plots within the limit (± 3 standard deviations). Lower limit of quantification was determined for each analyte. Fluoxetine, citalopram, and bupropion obtained LLOQ of 5 ng/mL, sertraline and paroxetine obtained 20 ng/mL. All LLOQ results presented precision (CV%) and deviation from nominal concentration that did not exceed 20 % (Table 4.1).

For checking precision and accuracy, CV% and relative bias (%) were calculated. Within and between- run CV% presented adequate results, ranging from 2.1 to 14.1%. Sertraline at LLOQ level showed the worst result (18.6%), well below the

recommended limit (20%). Accuracy assays indicate that relative bias (%) values were lower than 15% for QC samples, except for bupropion at LLOQ level (-17.6). Results for precision and accuracy are presented in Table 4.1. All values are within the limits recommended by the EMEA guideline [20].

Table 4.1: Within and between-run precision and accuracy for antidepressants in human milk and extraction recoveries

	Mean concentration	Within-run		Between-run		Extraction recovery (%)
		CV%	Relative bias (%)	CV%	Relative bias (%)	
Bupropion						
LLOQ	4.2	7.2	-17.6	10.8	-15.1	-
LQC	14.3	8.6	-3.3	12.3	-4.4	90.7
MQC	172.7	7.8	0.2	9.2	7.9	91.3
HQC	241.8	9.4	-10.9	13.9	0.7	97.1
DQC	332.2	7.2	-11.5	13.4	3.8	-
Citalopram						
LLOQ	4.7	10.2	-12.7	16.8	-5.1	-
LQC	14.9	10.0	-4.3	12.8	-0.5	84.3
MQC	172.7	9.2	-3.7	9.9	7.9	84.9
HQC	256.8	4.9	-3.6	10.8	6.9	93.5
DQC	333.9	3.9	-7.9	10.5	4.4	-
Paroxetine						
LLOQ	19.6	15.8	7.9	18.6	-1.9	-
LQC	62.8	9.4	12.5	14.1	4.7	93.9
MQC	326.6	8.6	11.3	7.9	8.9	94.8
HQC	491.2	2.9	9.3	5.7	9.2	97.4
DQC	627.8	10.9	-6.0	12.9	4.6	-
Fluoxetine						
LLOQ	5.3	9.5	-6.2	16.8	5.4	-
LQC	14.1	10.9	4.2	12.6	-6.2	90.2
MQC	172.9	9.1	5.3	7.4	8.0	87.2
HQC	262.2	5.5	7.1	5.9	9.3	97.8
DQC	344.2	1.8	7.3	8.4	7.6	-
Sertraline						
LLOQ	19.3	16.0	-1.8	11.3	-3.4	-
LQC	63.2	5.9	5.3	11.6	5.3	84.4
MQC	329.9	12.9	11.1	8.5	9.9	86.3
HQC	502.9	2.1	13.5	5.5	11.7	90.0
DQC	635.1	6.6	2.9	11.2	5.9	-

Extraction recoveries for all analytes were evaluated. IS recovery was 94.2%. The recoveries of antidepressants found in the human milk samples ranged from 84.3 to 97.8% (Table 4.1). Thus, the protein precipitation method proved to be efficient in terms of recovery and useful in extracting the drugs from breast milk. Stability assays were carried out by analyzing human milk samples under different conditions at LQC and HQC levels. All analytes demonstrated adequate

results (Table 4.2) when compared with freshly prepared samples and showed to be stable after freeze thaw cycles, bench top for 6h, and long term stability after 30 days. Stability was also confirmed after post processed samples were left at auto sampler for an overnight period. Stock solution stability was performed by comparing area response of the analytes with the response from fresh stock solution and proved to be stable in refrigerated storage (4 – 8 °C). Stability data for antidepressants in human milk was not informed in previous studies [8-16]. In plasma, antidepressants analytes were stable when submitted to these assays [17-19].

Table 4.2: Stability of antidepressants analytes in breast milk under different conditions

Stability	FLU		SER		CIT		PAR		BUP	
	LQC	HQC	LQC	HQC	LQC	HQC	LQC	HQC	LQC	HQC
Freeze-thaw cycles	91.1	102.5	94.1	97.3	105.4	105.3	98.9	106.3	107.8	114.6
Short term (6h at room temperature)	96.3	100.2	106.9	98.2	110.2	111.2	98.4	108.1	85.2	107.4
Post processing (overnight at autosampler)	92.3	97.5	103.7	102.5	111.9	114.3	107.1	101.2	105.7	103.2
Long term (30 days at -20 °C)	85.6	96.1	114.9	98.7	108.6	89.9	112.1	97.5	88.3	97.8

4.4.3 Human milk sample analysis

The bioanalytical method was applied to determine the concentrations of antidepressants in thirteen breast milk samples that were collected from mothers who were taking fluoxetine, sertraline, and paroxetine. About 5 mL of breast milk were collected and for Subject 4, 6, and 8, more than one collection was made on distinct days. There was no collection of samples with citalopram and bupropion. From the concentrations in milk samples, infant absolute and relative doses, which are measures of infant exposure to a drug, were obtained. Absolute dose is calculated with the drug concentration in the milk sample and the amount of milk consumed by the infant. Since the amount of consumed milk is variable, an intake estimate of 150 mL/kg/day [4,5] was applied. Relative infant dose is an

estimated percentage of the maternal dose received by the infant and is calculated as follows:

$$\text{Infant relative dose (\%)} = (\text{Infant absolute dose } (\mu\text{g/kg/day}) \times 100) / \text{Maternal dose } (\mu\text{g/kg/day})$$

For maternal doses, values of 340 $\mu\text{g/kg/day}$ for fluoxetine and 728 $\mu\text{g/kg/day}$ for sertraline were considered. These values were obtained from studies of antidepressants excretions in breast milk [16-19] and are a mean of daily maternal drug intake and maternal post partum weight. All results are presented in Table 4.3.

Table 4.3. Found concentrations of analytes in breast milk, infant absolute dose and relative dose

Subject	Drug informed	Daily dose intake (mg/day)	Found concentration (ng/mL)	Absolute dose ($\mu\text{g/kg/day}$)	Relative dose (%)
1	Fluoxetine	20	42.4	6.35	1.57
2	Fluoxetine	20	51.8	7.73	2.29
3	Fluoxetine	20	65.7	9.85	2.90
4.1	Fluoxetine	20	30.4	6.58*	1.94
4.2			57.3	-	
5	Sertraline	50	53.9	8.08	1.11
6.1	Sertraline	25	24.2	4.36*	0.60
6.2			33.9	-	
7	Sertraline	50	81.7	12.26	1.68
8.1	Sertraline	50	42.4	5.86*	0.80
8.2			48.3		
8.3			26.5		
9	Paroxetine	20	<LLOQ	-	-

*mean of found concentration

Concentrations found in samples from mothers who were taking fluoxetine (n = 6) ranged from 42.4 up to 65.7 ng/mL. These low values of excretion resulted in low values of relative dose percentages, which could mean that the baby was receiving a low percentage of the maternal drug. The same can be observed with samples from mothers who were taking sertraline (n = 7). Concentrations ranged from 24.2 to 81.7 ng/mL and low values of relative dose percentage were observed. Subject 6 was using 25 mg of sertraline, probably resulting in lower values of its excretion. The highest concentrations were observed in Subject 3 (fluoxetine) and Subject 7 (sertraline). Concentrations for paroxetine did not

exceed the lower limit of quantification. According to previous studies, low concentrations of paroxetine are expected [13,14]. Results for fluoxetine in this study did not vary widely, but they were within the reported range (26 – 384 ng/mL) [8,9]. Sertraline results were similar to previous report and also were within range (8 – 92 ng/mL) [10].

Relative infant doses were not higher than 3% and if this parameter value does not exceed 10%, drug administration could be considered safe during lactation [4]. However, other factors should also be considered, such as infant age, complementary feeding, renal disease, or hepatic disorder [3-5].

During the analysis of fluoxetine samples, an extra peak with different retention time (4.5 min) was observed, which did not appear when the bioanalytical method was validated. When checking the mass spectra, it was confirmed that the peak corresponded to norfluoxetine (m/z 296), a fluoxetine metabolite (Fig. 4.3 a-b). Fluoxetine studies describe that the metabolite is also excreted in human milk. Therefore, this finding agreed with previous studies [8,9,15].

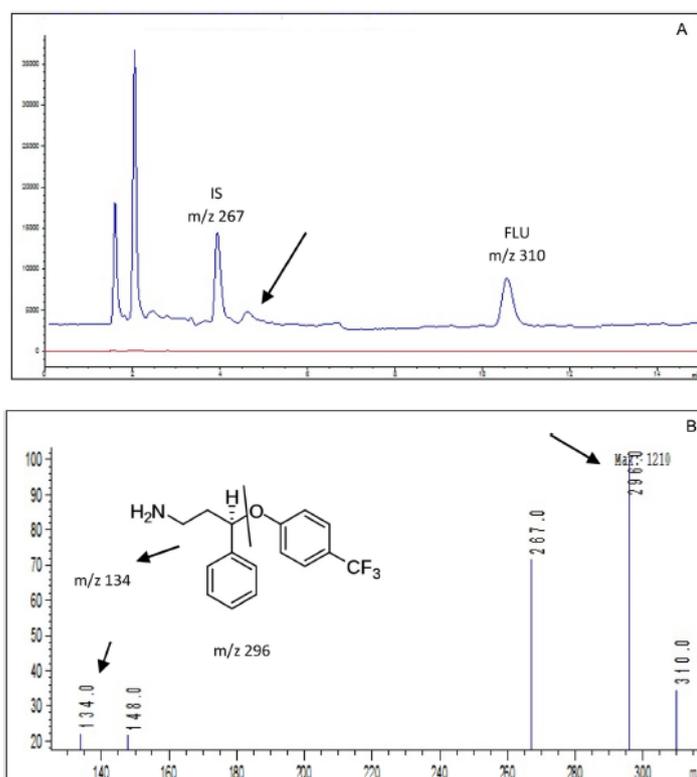


Figure 4.3. Chromatogram of fluoxetine milk samples with metabolite norfluoxetine (A) and mass spectra with molecular ion (m/z 296) and fragmentation (m/z 134)

4.5 Conclusions

The proposed method was developed and validated for simultaneous determination of five antidepressants in breast milk and proved to be sensitive, specific, linear, precise, and accurate. The protein precipitation cleaning procedure was effective in drug extraction from the biological matrix with good recovery values. Small quantities of organic solvent and minor sample handling were necessary. This validated biological method was successfully applied to analyze breast milk samples and can be used for drug monitoring. In all analyzed samples, the proposed drugs were detected and their concentrations determined with exception of paroxetine whose concentration was below the limit of quantification. The fluoxetine metabolite, norfluoxetine, was also detected during analysis; its identity and excretion were confirmed in the milk samples. Infant absolute and relative doses were estimated and the values could be considered safe for drug use during lactation. Nevertheless, other factors should be considered.

4.6 Acknowledgments

The authors want to thank all volunteers who participated in this study and the staff of both hospitals that provided breast milk samples, especially the staff of Santa Casa de Caridade de Bagé, Brazil, which also provided blank milk samples. We also thank CNPq and the Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences (UFRGS) for financial support.

4.7 References

- [1] J. O. Berle, O. Spigset, Antidepressant Use during Breastfeeding, *Curr. Women's Health Rev.* 7 (2011) 28 – 34
- [2] AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, COMMITTEE ON DRUGS, The Transfer of Drug and other Chemicals into human milk, *Pediatric* 108 (2001) 776 – 789

- [3] S. Ito, A. Lee, Drug excretion into breast milk – Overview, *Advanc. Drug Deliv. Rev.* 55 (2003) 617 – 627
- [4] H. Rowe, T. Baker, T. Hale, Maternal medication, drug use and breastfeeding, *Child. Adolesc. Psychiatric. Clin. N. Am.* 24 (2015) 1-20
- [5] C. M. Berlin; G. G. Briggs, Drugs and chemicals in human milk, *Semin in Fetal & Neonatal Medic.* 10 (2005) 149 – 159
- [6] B. S. Rocha, M. C. Werlang, Psychotropic drugs in the Family Health Strategy: profile, access and strategies to promote rational use, *Cien & Saude Col* 18 (2013) 3291 – 3300
- [7] DRUGDEX Consults® System. MICROMEDEX® Truven Health Analytics. The Healthcare Business of Thomson Reuters. Available in <http://www.micromedexsolutions.com/home/dispatch>. Accessed in: 14 jan. 2016
- [8] V. Hendrick, Z. N. Stowe, L. L. Altshuler, J. Mintz, S. Hwang, A. M. Hostetter, R. Suri, K. Leight, A. Fukuchi, Fluoxetine and Norflouxetine Concentrations in Nursing Infants and Breast Milk, *Biol. Psychiatry.* 50 (2001) 775 – 782
- [9] J. H. Kristensen, K. F. Illett, L. P. Hackett, P. Yapp, M. Paech, E. J. Begg, Distribution and excretion of fluoxetine and norfluoxetine in human milk, *J. Clin. Pharmacol.* 48 (1999) 521-527
- [10] Z. N. Stowe, M. J. Owens, J. L. Landry, C. D. Kilts, T. Ely, A. Llewellyn, C. D. Nemeroff, Sertraline and desmethylsertraline in human breast milk and nursing infants, *Am. J. of Psychiatry* 154 (1997) 1255 – 1260
- [11] J. Rampono, J. H. Kristensen, L. P. Hackett, M. Paech, R. Koram, K. F. Illet, Citalopram and demethylcitalopram in human milk; distribution, excretion, and effects in breast fed infants, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 50 (2000) 263 – 268
- [12] O. Spigset, L. Carleborg, R. Öhman, A. Norström, Excretion of citalopram in breast milk, *J. Clin. Pharmacol.* 44 (1997) 295 – 298
- [13] E. J. Begg, S. B. Duffull, D. A. Saunders, R. C. Buttimore, K. F. Illett, L. P. Hackett, P. Yapp, D. A. Wilson, Paroxetine in human milk, *J. Clin. Pharmacol.* 48 (1999) 142-147
- [14] Z. Stowe, L. Cohen, A. Hostetter, J. C. Ritchie, M. J. Owens, C. B. Nemeroff, Paroxetine in Human Breast Milk and Nursing Infants, *Am J Psychiatry* 157 (2000) 185 – 189

[15] A. L. Hostetter, Z. N. Stowe, M. Cox, J. C. Ritchie, A Novel System for the Determination of Antidepressant Concentrations in Human Breast Milk, *Ther. Drug Monit.* 26 (2004) 47 – 52

[16] J. S. Haas, C. P. Kaplan, D. Barenboin, P. Jacob, N. L. Benowitz, Bupropion in breast milk: an exposure assessment for potential treatment to prevent post-partum tobacco use, *Tobacco Control* 13 (2004) 52 – 56

[17] H. Juan, Z. Zhiling, L. Huande, Simultaneous determination of fluoxetine, citalopram, paroxetine, venlafaxine in plasma by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-MS/ESI), *J. Chromatogr. B* 820 (2005) 33 – 39

[18] H. Kirchherr, W. N. Kühm-Velten, Quantitative determination of forty-eight antidepressants and atypical antipsychotics in human serum by HPLC tandem mass spectrometry: A multi-level, single-sample approach, *J. Chromatogr. B* 843 (2006) 100 – 113

[19] R. Uřinová, H. Brozmanová, P. Šišťík, P. Šilhán, I. Kacířová, Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of five antidepressants and four atypical antipsychotics and their main metabolites in human serum, *J. Chromatogr. B* 907 (2012) 101 - 107

[20] EUROPEAN MEDICINES AGENCY, Guidelines on Bioanalytical Method Validation, EMEA/CHMP/EWP/192217/2009, 21 July 2012. Available in: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC5001109686.pdf Accessed in: 01 mar. 2015.

5 CAPITULO 2

**Determinação simultânea de antidepressivos em leite materno por método
CLAE-UV**

5.1 Introdução

O desenvolvimento de transtornos psiquiátricos é comum em mulheres em período pós-parto devido a mudanças hormonais que ocorrem nesta fase. A prevalência de depressão pós-parto pode ser estimada em 10 a 16% e a depressão materna não tratada pode comprometer o vínculo mãe-filho, bem como o desenvolvimento cognitivo e emocional do bebê, a amamentação e outros cuidados exigidos pela criança (SCALEA & WISNER, 2009; ORSOLINI & BELLANTUONO, 2015).

O tratamento da depressão pós-parto pode ser realizado através da administração de antidepressivos, porém as mães preferem evitar o tratamento farmacológico devido a preocupações sobre os efeitos adversos destes medicamentos em suas crianças (BERLE & SPIGSET, 2011). Os inibidores seletivos da recaptação da serotonina tornaram-se os fármacos de escolha para o tratamento de quadros de depressão, especialmente no período pós-parto e gravidez (SCALEA & WISNER, 2009; ORSOLINI & BELLANTUONO, 2015; ROWE *et al*, 2015;). Dentro desta classe, fluoxetina, sertralina e paroxetina foram relatados como os fármacos com maior número de prescrições entre os antidepressivos no Brasil (ROCHA & WERLANG, 2013).

A passagem dos fármacos para o leite materno depende de diversas características, como peso molecular, ionização, ligação a proteínas plasmáticas, pKa e lipofilicidade. Substâncias com baixa ligação a proteínas plasmáticas, alta lipofilicidade, pH baixo facilitam sua excreção ao leite materno. A maior parte dos fármacos é transferida através de processo de difusão passiva. O período da lactação também é importante, pois maiores quantidades de compostos são transferidas ao leite na fase de colostro, mas este é produzido em pouca quantidade, portanto menores concentrações são recebidas pelo bebê. Já, o leite maduro é produzido em maior volume, porém os espaços intracelulares são menores diminuindo a passagem dos fármacos ao leite (FRÍGULS *et al*, 2010; ROWE *et al*, 2015).

A literatura relata a excreção de fármacos antidepressivos no leite materno em concentrações variadas. Eventos adversos nos bebês foram

correlacionados ao uso de fluoxetina após ingestão de leite materno. Foram descritos choros, irritabilidade, diminuição do apetite e diarreia com uso de fluoxetina, sendo que na maior parte foram considerados inespecíficos podendo ser coincidentes (BERLE & SPIGSET, 2011).

O desenvolvimento de métodos analíticos para determinar a excreção de fármacos em leite materno é importante para definir risco/benefício de terapia farmacológica em mães que estão em período de amamentação (FRÍGULS *et al*, 2010). Diversos métodos foram desenvolvidos para quantificar antidepressivos no leite materno utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (TADDIO *et al*, 1996; MISRI *et al*, 2000) e cromatografia líquida com detecção por ultravioleta (STOWE *et al*, 1997; BEGG *et al*, 1999; KRISTENSEN *et al*, 1999; STOWE *et al*, 2000; HENDRICK *et al*, 2001; SURI *et al*, 2002; HOSTETTER *et al*, 2004). Para plasma, métodos de quantificação simultâneos de antidepressivos e outros psicotrópicos por cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (LC-MS) principalmente foram desenvolvidos (JUAN *et al*, 2005; KIRCHHERR & KÜHN-VELTEN, 2006, UŘINOVSÁ *et al*, 2012; VECCHIONE *et al*, 2012). O tratamento das amostras nestes métodos foi realizado por técnicas de extração em fase sólida e extração líquido-líquido, procedimentos complexos que envolvem várias etapas. Método por CLAE-UV com tratamento das amostras por precipitação de proteínas foi desenvolvido e validado para detectar e quantificar simultaneamente antidepressivos em leite materno.

5.2 Parte experimental

5.2.1 Materiais e reagentes

Fluoxetina, sertralina e paroxetina foram adquiridas de Pharmanostra Ltda (Campinas, Brasil). Como padrão interno, foi utilizada bupropiona também obtida da mesma empresa (Campinas, Brasil). Acetonitrila, metanol, bem como fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio bibásico que foram utilizados para o preparo da solução tampão foram Merck® (Frankfurt, Alemanha). Hidróxido de

sódio e sulfato de zinco foram fornecidos por CAQ Ind e Com Ltda (Diadema, SP). Em todas as análises, os solventes usados eram grau CLAE de pureza e a água ultrapura foi obtida por sistema MILI-Q PLUS (Milipore® Bedford, MA, USA).

5.2.2 Leite materno

As amostras de leite materno branco foram obtidas de mães em período de lactação. A coleta foi realizada em Banco de Leite do hospital Santa Casa de Caridade de Bagé. Uma enfermeira treinada neste procedimento supervisionou a retirada do leite e após a coleta, as amostras foram armazenadas congeladas.

5.2.3 Solução estoque, soluções de trabalho, amostras de controle de qualidade e de calibração

As soluções estoque de fluoxetina, sertralina, paroxetina e bupropiona foram preparadas na concentração de 1 mg/mL e dissolvidas em acetonitrila. A solução de trabalho do padrão interno (bupropiona) foi preparada na concentração de 5 µg/mL em acetonitrila. Os antidepressivos analisados (fluoxetina, sertralina e paroxetina) tiveram suas soluções de trabalho preparadas em acetonitrila e água (50:50 v/v) nas concentrações de 4, 6, 10, 14, 20 e 30 µg/mL. Todas as soluções foram armazenadas refrigeradas em temperatura entre 2 e 8 °C.

Para o preparo das amostras de controle de qualidade, leite branco foi utilizado adicionando os fármacos para obter as concentrações de 200 ng/mL (limite inferior de quantificação - LIQ), 600 ng/mL (controle de qualidade baixo - CQB), 850 ng/mL (controle de qualidade médio - CQM), 1250 ng/mL (controle de qualidade alto - CQA) e 3000 ng/mL (controle de qualidade de diluição - CQD). As amostras de CQD foram diluídas para obter a concentração de 1500 ng/mL e analisadas nesta concentração. As amostras da curva de calibração também foram realizadas adicionando quantidades adequadas das soluções de trabalho

ao leite branco e obtendo as concentrações de 200, 300, 500, 700, 1000 e 1500 ng/mL.

5.2.4 Preparo das amostras

As amostras para análise foram preparadas adicionando a 200 µL de leite branco, 50 µL de padrão interno, 50 µL das soluções de trabalho e 700 µL de solução de precipitação em tubos de polipropileno de 1,5 mL. Esta mistura foi agitada por 30s em vortex. Após agitação, os tubos foram levados a centrifugação por 15 min a 4°C na rotação de 14000 rpm. Terminada a centrifugação, que tinha por objetivo a precipitação das proteínas, o sobrenadante foi filtrado para os vials e injetado diretamente no CLAE-UV para análise. Tanto as amostras da curva de calibração quanto as de controle de qualidade foram preparadas da mesma forma. A solução de precipitação consistiu de solução de sulfato de zinco a 0,05% preparada em acetonitrila.

5.2.5 Instrumentos e condições cromatográficas

As análises foram realizadas em um cromatógrafo a líquido SHIMADZU LC-20AT PROMINANCE equipado com detector UV-VIS SPD-10AVAVP, central de controle COMUNICADOR BUS MODULE CBM-20A, auto-injetor AUTOSAMPLER SIL-20A, forno para coluna CTO-20A. A aquisição e análise dos dados foram feitos através de aplicativo CLASS-VP. Centrífuga Eppendorf 5430R (Hamburg, Alemanha) foi utilizada para o preparo das amostras.

Para a determinação da concentração dos antidepressivos em leite materno, o método cromatográfico foi desenvolvido e otimizado, sendo que as condições cromatográficas satisfatórias obtidas foram: coluna Agilent C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm), protegida por pré coluna C18 (4 x 2,0 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA), fase móvel constituída de acetonitrila e solução tampão fosfato de sódio 50mM pH 5.5 (70:30 v/v) em modo isocrático, fluxo de 0,6 mL/min, temperatura de análise de 35 °C e volume de injeção de 100 µL. A detecção foi realizada em 215 nm. O tempo total de análise ficou em 15 min.

A adequabilidade do sistema foi verificada injetando soluções dos analitos (n = 3) em suas concentrações mais altas. As variações obtidas para tempo de retenção e área dos picos analisados foram consideradas adequadas (CV% < 2%). A resolução dos picos foi considerada aceitável ($R_s > 2$).

5.2.6 Validação do método bioanalítico

A validação foi realizada conforme recomendações do Guideline on Bioanalytical Method Validation da European Medicines Agency (2012). Os parâmetros avaliados foram seletividade, linearidade, precisão, exatidão, efeito residual e efeito matriz.

5.2.6.1 Seletividade

A seletividade do método foi verificada analisando seis amostras de leite materno branco de fontes distintas comparando os resultados obtidos com amostras adicionadas dos fármacos propostos na concentração do limite inferior de quantificação. Foram também verificadas potenciais interferências de outros fármacos psicotrópicos utilizados no tratamento de quadros depressivos como diazepam, doxepina, amitriptilina, nortriptilina e imipramina.

5.2.6.2 Efeito residual

Para avaliar o efeito residual do método, três injeções de amostras de leite branco foram realizadas, sendo que uma injeção foi realizada antes e duas injeções após análise de amostra processada no limite superior de quantificação – LSQ.

5.2.6.3 Efeito matriz

O efeito matriz foi investigado analisando seis amostras distintas processadas nas concentrações do controle de qualidade baixo e controle de

qualidade alto e soluções dos analitos nestas mesmas concentrações. A partir dos resultados obtidos, foi calculado para cada amostra o fator de matriz normalizado (FMN) conforme a seguinte fórmula:

$$\text{FMN} = (\text{resposta do analito em matriz/resposta do PI em matriz}) / (\text{resposta do analito em solução/resposta do PI em solução})$$

Para o FMNs relativos obtidos, foram calculados os coeficientes de variação (CV%) de todas as amostras. Os coeficientes de variação devem ser inferiores a 15%.

5.2.6.4 Linearidade e limite inferior de quantificação

Para verificar a linearidade do método, curvas de calibração de seis pontos foram analisadas nas concentrações de 200, 300, 500, 700, 1000 e 1500 ng/mL. Foram construídas três curvas em dias diferentes e obtidas as equações das respectivas retas que representavam a relação da razão entre as áreas dos analitos de interesse e a área do padrão interno e as concentrações dos analitos. Foram obtidos também os coeficientes de correlação (r) correspondentes. A linearidade foi avaliada realizando análise estatística da regressão, correlação e cálculo da análise da variância (ANOVA). Os resíduos padrão foram analisados para verificar a presença de *outliers*.

O limite inferior de quantificação foi determinado experimentalmente através de injeções de concentrações decrescentes dos analitos. Este foi definido como a menor concentração que pode ser medida com precisão e exatidão que não exceda 20% de coeficiente de variação e erro padrão relativo.

5.2.6.5 Precisão e exatidão

A precisão e exatidão do método foram avaliadas analisando amostras de leite materno processadas em cinco diferentes concentrações – LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD. Todas as amostras foram preparadas em cinco replicatas. As amostras de CQD foram diluídas na proporção de 1:2 antes de serem

analisadas, pois encontravam-se com concentração acima da curva de calibração. A precisão e exatidão intracorridas foram determinadas em corridas do mesmo dia e intercorridas foram determinadas em três corridas realizadas em dias distintos e consecutivos.

Para realizar avaliação da precisão, foi obtido o coeficiente de variação (CV%). A exatidão foi verificada a partir do cálculo do erro padrão relativo (EPR) expresso como:

$$\text{EPR} = (\text{concentração média experimental} - \text{valor nominal}) \times 100 / \text{valor nominal}$$

Para o método ser considerado tanto preciso quanto exato, os valores obtidos de CV% e EPR não devem exceder 15%, exceto para as amostras na concentração de LIQ, para as quais valores acima de 20% não são permitidos.

5.2.6.6 Recuperação

A recuperação dos analitos nos extratos foi avaliada analisando amostras em três concentrações diferentes: CQB, CQM e CQA. As amostras (n = 3) foram preparadas em leite materno branco e submetidas ao processo de extração proposto. Para determinar a recuperação, a percentagem foi obtida comparando as respostas dos analitos após processamento, com as respostas dos analitos em solução.

5.3 Resultados e discussão

5.3.1 Desenvolvimento do método e otimização

Devido às características distintas dos fármacos analisados no método, diferentes parâmetros cromatográficos foram analisados a fim de alcançar adequada sensibilidade, separação cromatográfica e resolução entre os picos.

Composição da fase móvel, fluxo, temperatura e coluna utilizada foram testados para obter condições cromatográficas otimizadas. Para a realização das

análises foi selecionada coluna Agilent C18 (250 x 4,6 mm, 5µm) devido à boa separação dos picos e adequado tempo de análise obtidos. Diversas soluções tampão foram testadas como acetato de amônio, acetato de sódio, fosfato de potássio e fosfato de sódio. Os melhores resultados foram obtidos quando utilizados como solução tampão fosfato de sódio 50 mM pH 5,5 e acetonitrila como fase móvel. A proporção destas foi variada e melhores respostas foram obtidas quando utilizado 30:70 v/v, respectivamente. O fluxo que obteve melhor simetria e resolução dos picos ficou estabelecido em 0,6 mL/min e a temperatura de análise, variada entre 30 e 35 °C, foi estabelecida em 35 °C. A eluição foi realizada em modo isocrático. Os fármacos tiveram tempos de retenção de 8,1 min (paroxetina), 9,4 min (bupropiona – PI), 10,2 min (fluoxetina) e 13,7 min (sertralina) (Fig. 1).

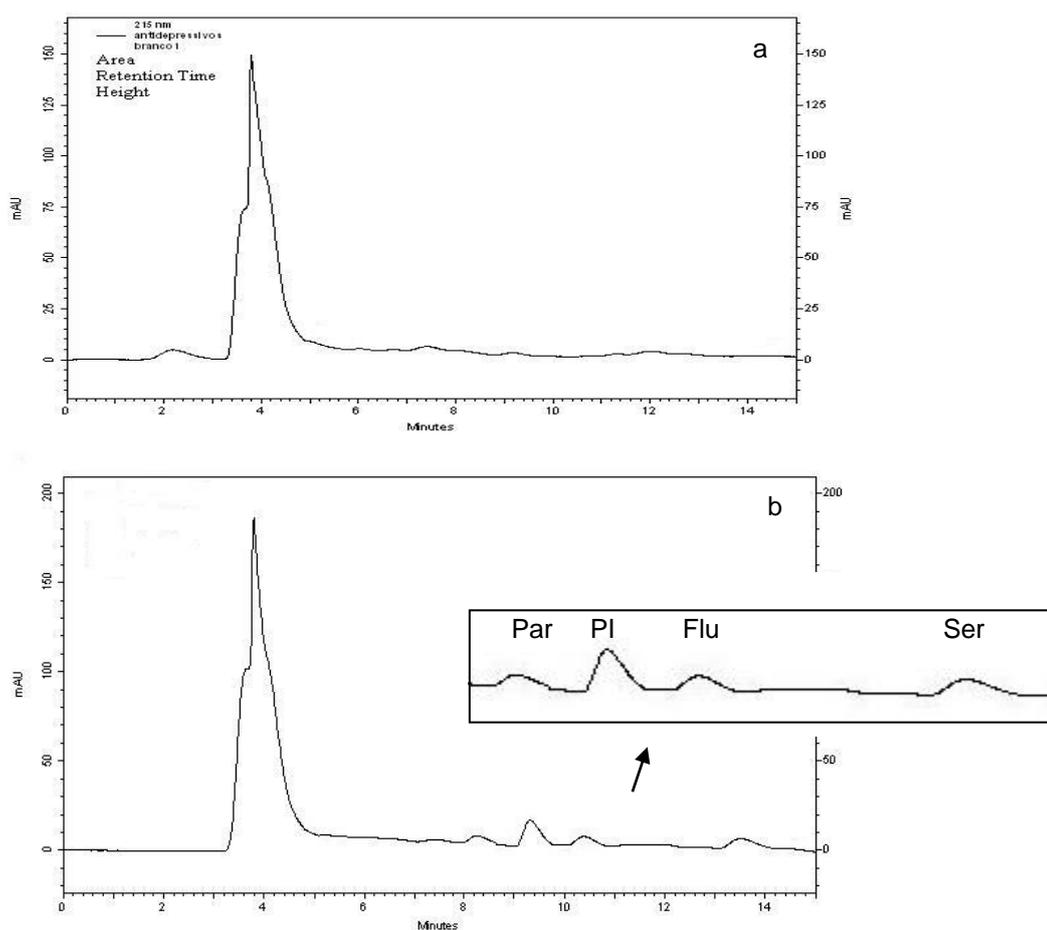


Figura 5.1: Cromatogramas obtidos por CLAE-UV de (a) leite branco processado, (b) amostra de leite materno processada com os analitos paroxetina (Par), padrão interno (PI – bupropiona), fluoxetina (Flu) e sertralina (Ser)

Os fármacos fluoxetina (Flu), sertralina (Ser) e paroxetina (Par) exibem perfis de absorção no ultravioleta diferenciados e assim, utilizando detector PDA, foram avaliados os efeitos dos comprimentos de onda que obtivessem maior absorção e melhor resposta. Para todos os compostos, o comprimento de onda mais adequado sob as condições otimizadas do método foi o de 215 nm.

O detector de UV acoplado ao CLAE é equipamento comumente encontrado na maioria dos laboratórios de pesquisa. A maior parte dos estudos relatados em literatura que realizaram a quantificação da excreção de fármacos antidepressivos em leite materno utilizou como método o CLAE-UV. Alguns estudos relataram o uso de cromatógrafo gasoso acoplado à espectrometria de massas (CG-MS) (TADDIO *et al*, 1996; MISRI *et al*, 2000). Estes estudos desenvolveram métodos para a quantificação de um fármaco apenas (STOWE *et al*, 1997; KRISTENSEN *et al*, 1998; BEGG *et al*, 1999; KRISTENSEN *et al*, 1999; STOWE *et al*, 2000; HENDRICK *et al*, 2001; SURI *et al*, 2002) sendo que a quantificação simultânea de mais de um fármaco antidepressivo é relatada em poucos estudos utilizando o CLAE-UV (HOSTETTER *et al*, 2004) com preparo elaborado das amostras, utilizando técnicas de extração líquido-líquido ou extração em fase sólida que empregam grande quantidade de solventes e procedimentos complexos envolvendo várias etapas. O método proposto realiza a quantificação simultânea de antidepressivos eluídos de forma isocrática, sendo mais simples quando comparado ao gradiente.

Para o preparo das amostras, foi utilizada a técnica de precipitação de proteínas, procedimento simples, eficiente, com baixo consumo dos solventes necessários e que envolve apenas uma etapa de tratamento das amostras biológicas. Entre os solventes testados para a realização da técnica, metanol e acetonitrila foram variados em suas proporções. Acetonitrila obteve os melhores resultados com relação à recuperação dos analitos. Para uma limpeza mais eficiente da amostra, foi observado que a adição de sulfato de zinco na concentração de 0,05% obteve melhores resultados com relação ao tratamento, sem prejudicar a extração dos analitos.

5.3.2 Validação do método

5.3.2.1 Seletividade

Não foram observados picos interferentes próximos aos tempos de retenção dos analitos quando amostras de leite materno foram analisados (Fig 5.1). Quando testados outros fármacos psicotrópicos (diazepam, doxepina, amitriptilina, nortriptilina e imipramina), picos extras que interferissem nos tempos de retenção também não foram observados.

5.3.2.2 Efeito residual e efeito matriz

Os cromatogramas obtidos a partir dos ensaios não apresentaram picos interferentes aos picos dos analitos de interesse e do padrão interno indicando ausência de efeito residual. Para análise do efeito matriz, fator de matriz normalizado para cada amostra de CQB e CQA foi obtido e os coeficientes de variação calculados foram de 7,3% para fluoxetina, 8,3% para sertralina e 4,5% para paroxetina. Estes valores de CV% encontram-se dentro do limite permitido (EMEA, 2012) indicando ausência de efeito matriz significativo.

5.3.2.3 Linearidade e limite inferior de quantificação

A curva de calibração apresentou linearidade na faixa proposta de 200 a 1500 ng/mL. Através da análise estatística por regressão e cálculo da ANOVA, foi verificado que as curvas de calibração apresentaram regressão linear significativa ($p < 0,05$) e não apresentaram desvio de linearidade. Os coeficientes de correlação obtidos foram de 0,9976 para fluoxetina, 0,9996 para sertralina e 0,9977 para paroxetina. Os desvios padrão foram verificados e encontram-se dentro da faixa aceitável (± 3 desvios padrão) e não foi verificada presença de *outliers*.

Os limites inferiores de quantificação (LIQ) para os analitos foram determinados na concentração de 200 ng/mL. Os resultados para precisão e

exatidão do LIQ apresentaram-se dentro da variação permitida (abaixo de 20%) (Tabela 5.1).

5.3.2.4 Precisão e exatidão

Coeficientes de variação e erro padrão relativo foram obtidos a partir das amostras em cinco concentrações diferentes para verificar a precisão e exatidão do método. Todos os resultados obtidos (Tabela 5.1) encontraram-se dentro dos limites permitidos para o método ser considerado preciso e exato. Maiores variações de CV% foram encontrados nos analitos paroxetina e sertralina nos ensaios intercorridas, assim como para amostras de LIQ para paroxetina, porém todos menores que os limites recomendados.

Tabela 5.1: Resultados de precisão e exatidão intra e intercorridas das amostras de leite materno

		Concentração média (ng/mL)	Intracorrida		Intercorrida	
			CV%	EPR (%)	CV%	EPR (%)
Paroxetina						
LIQ	200	195	17	11,5	17,8	-2,5
CQB	600	560,6	3,1	-13,8	13,8	-6,5
CQM	850	782,1	9,5	-14,6	13,9	-7,9
CQA	1250	1298,1	10,3	-9,7	12,4	3,8
CQD	1500	1276,3	6,4	-13,1	13,6	-14,9
Fluoxetina						
LIQ	200	191,2	11,2	-2,3	11,5	-4,4
CQB	600	555,3	4,2	-13,4	9,6	-7,5
CQM	850	902,4	9,3	-6,3	11,6	6,1
CQA	1250	1278,9	7,3	6,9	10,3	2,3
CQD	1500	1527,8	7,1	14,7	12,9	1,9
Sertralina						
LIQ	200	224,2	14,9	1,3	13,3	12,1
CQB	600	539,6	13,6	-5,8	10,3	10,1
CQM	850	836,1	5,8	-2,8	13	-1,6
CQA	1250	1227,3	12,2	-3,2	14,8	-1,8
CQD	1500	1332,9	3,3	-11,5	13,6	-14,9

5.4.2.5 Recuperação

A recuperação média (n=3) nas amostras de leite materno processadas foi fluoxetina (89%), sertralina (85,9%), paroxetina (88,6%) e para o padrão interno bupropiona (94,3%). O tratamento das amostras foi realizado pelo procedimento de precipitação de proteínas, procedimento simples que envolveu apenas a adição da solução precipitante e centrifugação para o processamento da amostra. Os resultados obtidos demonstraram a eficiência do procedimento na extração dos compostos.

5.3.2.6 Estabilidade

A estabilidade dos analitos foi verificada previamente ao desenvolvimento deste método por técnica de análise estabelecida em LC-MS. Foram realizados os ensaios de estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento das amostras, estabilidade de curta e longa duração, estabilidade pós processamento e estabilidade dos analitos em solução. Estes testes foram realizados com amostras de controle de qualidade baixo e alto e os resultados foram comparados com respostas de amostras recém-preparadas.

As amostras que passaram por ciclos de congelamento e descongelamento demonstraram ser estáveis quando submetidas a estas condições, com médias de recuperação de 98,6% para fluoxetina, 95,7% para sertralina e 102,6% para paroxetina. A estabilidade de curta duração, com as amostras processadas permanecendo em bancada por 6h à temperatura ambiente também indicou que os analitos permaneceram estáveis, tendo como resultados para fluoxetina, sertralina e paroxetina 96,8, 102,6, 103,3% respectivamente. Para o ensaio de pós processamento, as amostras foram reanalisadas após haverem permanecido no autoinjeter durante a noite, e suas estabilidades foram comprovadas. A estabilidade de longa duração foi analisada após as amostras permanecerem congeladas por 30 dias. Os resultados obtidos para as amostras congeladas por 30 dias foram de 90,9, 106,3 e 104,8% e para 180 dias foram 95,5, 104,8 e 87,6% para fluoxetina, sertralina e paroxetina respectivamente, dentro da variação recomendada (EMEA, 2012).

5.4 Conclusão

O CLAE-UV é um equipamento imprescindível e comumente encontrado em laboratórios de pesquisa. Sendo assim, uma metodologia utilizando este equipamento torna acessível a quantificação de diversos fármacos tanto em matriz biológica como em produto farmacêutico. A precipitação de proteínas com a solução precipitante de sulfato de zinco 0.05% em acetonitrila demonstrou ser eficiente no tratamento das amostras e extração dos analitos. O método desenvolvido para determinar antidepressivos em leite materno provou ser seletivo, linear, preciso e exato na faixa de 200 ng/ml a 1500ng/ml, demonstrando ser rápido e de fácil execução podendo ser aplicado a amostras que se encontram nesta faixa de concentração.

6 DISCUSSÃO GERAL

A amamentação é forma ideal de alimentação dos bebês devido a todas as suas características biológicas e nutricionais e também pelos benefícios de ordem física e emocional que proporciona tanto para criança quanto para mãe. É recomendado que seja realizada de forma exclusiva até os seis meses de idade e continuada até os dois anos de idade. Porém o uso de medicamentos durante este período torna-se um fator negativo, sendo que muitas mulheres são aconselhadas a descontinuar a amamentação ou evitar o tratamento farmacológico devido à preocupação com os possíveis eventos adversos que podem ocorrer em seus bebês (BRASIL, 2009; AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 2015)

A depressão pós-parto é uma condição comumente encontrada neste período, podendo afetar cerca de 15% das mulheres. O tratamento da pode ser realizado através da administração de antidepressivos, entre eles os inibidores seletivos da recaptção da serotonina, sendo estes geralmente os fármacos de escolha (BERLIN & BRIGGS, 2005; BLAYA et al, 2005; BERLE & SPIGSET, 2011).

Dados sobre a excreção de fármacos tornam-se importantes para definir os riscos e benefícios da administração de fármacos durante a lactação. A literatura relata a excreção de fármacos antidepressivos no leite em diversas concentrações (BERLIN & BRIGGS, 2005; BERLE & SPIGSET, 2011).

O presente trabalho apresenta o desenvolvimento e validação de dois métodos bioanalíticos para determinação de fármacos antidepressivos em amostras de leite materno. Um dos métodos foi desenvolvido por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas e realizou a análise de cinco antidepressivos: fluoxetina, sertralina, citalopram, paroxetina e bupropiona. O outro método desenvolvido e validado com os fármacos fluoxetina, sertralina e paroxetina, foi por CLAE-UV

A cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas é uma técnica que pode ser empregada para determinação de fármacos em diversas matrizes devido à sua alta sensibilidade e seletividade (MAURER, 2005). Este método foi amplamente utilizado para quantificação de antidepressivos em plasma humano (JUAN et al, 2005; CASTRO et al, 2006, KIRCHHERR & KUHN

VELTEN, 2006; VECCHIONE *et al*, 2012; UŘINOVSKA *et al*, 2012; FÉRNANDEZ *et al*, 2012). Um método por LC-MS para determinação de antidepressivos em leite materno é relatado para quantificação do fármaco bupropiona e seus metabólitos (HAAS *et al*, 2004). A determinação simultânea de antidepressivos é reportada apenas em um método por CLAE-UV (HOSTETTER *et al*, 2004). Então, método por LC-MS foi desenvolvido para determinar simultaneamente cinco antidepressivos em leite materno.

Outro método a ser desenvolvido seria por cromatografia líquida com detecção por fluorescência. Após serem realizados diversos testes, a fim de determinar os parâmetros cromatográficos ideais, o mesmo demonstrou não ser reprodutível impossibilitando a validação do método e análise das amostras biológicas. Sendo assim, método alternativo por CLAE-UV foi desenvolvido com os fármacos fluoxetina, sertralina e paroxetina e validado.

Os métodos foram validados conforme recomendações do Guideline on Bionalytical Method Validation (EMEA, 2012) e Resolução RDC nº 27/2012 que dispõe sobre os requisitos mínimos para validação de métodos bioanalíticos (BRASIL, 2012).

Na tabela 6.1 são apresentados métodos descritos para quantificação dos antidepressivos tanto em leite materno quanto em outras matrizes.

Tabela 6.1 Métodos relatados em literatura para quantificação de antidepressivos em leite materno e outras matrizes

Autor	Ano	Analito	Matriz	Condições cromatográficas	Método extração
Spigset et al*	1997	Citalopram e metabólitos	Leite materno, plasma materno	CLAE-UV: Coluna 150x4,6mm 3µm; Metanol, acetonitrila e amônia 25% (65:345:1,6); Fluxo 2,2 mL/min; λ = 254 nm	Extração líquido - líquido
Kristensen et al*	1998	Sertralina desmetilsertralina	Leite materno, plasma materno, plasma infantil	CLAEU-UV: Coluna C8 Ultraspher 250x4,6mm 5µm; Acetonitrila: 0,086% 1-ácido octasulfônico e 0,01 % nnnn-tetrametilenediamino em água pH 2,5; Fluxo 1,6 mL/min; λ = 210 nm	Extração líquido - líquido
Begg et al*	1999	Paroxetina	Leite materno, plasma materno, Plasma infantil	CLAE-UV: Coluna RP Select B 250x4,6mm; Acetonitrila:NaCl 0,01% e H3PO4 0,01% em água pH 2,5 (35:75 v/v); Fluxo 1,5 mL/min; λ = 210 nm	Extração líquido - líquido

Autor	Ano	Analito	Matriz	Condições cromatográficas	Método extração
Kristensen et al*	1999	Fluoxetina norfluoxetina	Leite materno, plasma materno, plasma infantil	CLAEU-UV: Coluna C8 Ultraspher 250x4,6mm 5µm; Acetonitrila: 0,086% 1-ácido octasulfônico e 0,01 % nnn-tetrametilenediamino em água pH 2,5; Fluxo 1,6 mL/min; λ = 230 nm	Extração líquido-líquido
Hendrick et al*	2001	Fluoxetina Norfluoxetina	Leite materno, plasma materno, plasma infantil	CLAE-UV: Leite - Coluna Hypersensil C8 100x2mm 3µm; Tampão fosfato de sódio 0,02M/110 µl n-n-dimetiloctilamina:acetonitrila pH 6,5 (70:30 v/v) Plasma – tampão fosfato sódio 0,012M pH 6,2, acetonitrila, metanol (12:38:50 v/v) λ = 225nm	Extração líquido-líquido e extração fase sólida
Suri et al*	2002	Fluoxetina norfluoxetina	Leite materno, plasma materno, plasma infantil	CLAE-UV: Leite - Coluna Hypersensil C8 100x2mm 3µm; Tampão fosfato de sódio 0,02M/110 µl n-n-dimetiloctilamina:acetonitrila pH 6,5 (70:30 v/v) Plasma – tampão fosfato sódio 0,012M pH 6,2, acetonitrila, metanol 12:38:50 v/v λ = 225nm	Extração líquido-líquido e extração fase sólida
Hostetter et al	2004	9 antidepressivos incluindo fluoxetina e paroxetina (método 1), sertralina (método 2), tricíclicos (método 3)	Leite materno	CLAE-UV: Coluna Hypersensil C8 100x2mm 3µm; Método 1: tampão fosfato potássio 0,02M + 110 µL n,n-dimetiloctilamina pH 6,0 e acetonitrila (70:30 v/v); Fluxo 0,6 mL/min; λ = 225 nm Método 2: tampão fosfato potássio 0,02M + 120 µL n,n-dimetiloctilamina pH 6,5 e acetonitrila (65:35 v/v); Fluxo: 0,6 mL/min; λ = 215 nm Método 3: tampão fosfato potássio 0,02M + 85 µL n,n-dimetiloctilamina pH 6,5 e acetonitrila (66:34 v/v); Fluxo: 0,5 mL/min; λ = 242 nm	Extração líquido-líquido e extração fase sólida; Recuperação dos analitos: 90 – 109,1%
Juan et al	2005	Fluoxetina, citalopram, paroxetina, venlafaxina	Plasma	LC-MS: Coluna Macherey-Nagel C18 250x4,6mm 5µm; Acetato de amônio 30 mmol/L + ácido fórmico 0,6%, acetonitrila (35:75 v/v); Fluxo: 0,85 mL/min; ESI positivo; Modo SIR (selected ion recording)	Extração em fase sólida; Recuperação dos analitos: 73 – 96%
Kirchherr & Kühn	2006	48 psicotrópicos incluindo citalopram, fluoxetina, paroxetina, sertralina	Plasma	LC-MS: Coluna Chromolith C18 50x4,6mm 5µm; Metanol, ácido acético 5mM pH 3,9 em modo gradiente; Fluxo 1,0 mL/min; ESI positivo; Modo MRM (multiple reaction monitoring)	Precipitação de proteína (acetonitrila/metanol 9:1 v/v); Recuperação dos analitos: 92 – 111%
Castro et al	2008	9 antidepressivos incluindo	Fluido oral e	LC-MS: Coluna sunfire C18 20x 2,1 mm 3,5 µm; Tampão	Extração em fase sólida;

Autor	Ano	Analito	Matriz	Condições cromatográficas	Método extração
		citalopram, sertralina e fluoxetina	plasma	formiato de amônio 2mM pH 3,0 e acetonitrila em modo gradiente; Fluxo: 0,4 mL/min; ESI positivo; Modo MRM (multiple reaction monitoring)	Recuperação dos analitos: 49 – 72%
Uřinová et al	2012	9 psicotr3picos incluindo sertralina, fluoxetina, citalopram e paroxetina	Plasma	LC-MS: Coluna Acquity C18 50x2,1mm 1,7µm; A - Acetato de amônio 2mmol/L, 0,1% 3cido f3rmico e acetonitrila 5% B- Acetato de amônio 2 mmol/L, 0,1% 3cido f3rmico e acetonitrila 95%; Modo gradiente; Fluxo: 0,4 mL/min; ESI positivo; Modo MRM (multiple reaction monitoring)	Precipitaç3o de prote3na (sulfato de zinco 0,05% em acetonitrila/metanol 40:60 v/v); Recuperaç3o dos analitos: 88,1 – 108,2%
Vecchione et al	2012	18 psicotr3picos incluindo paroxetina e sertralina	Plasma	LC-MS: Coluna Chromolith C18 50x2 mm 5 µm; Acetonitrila e H2O contendo 0,2% 3cido ac3tico em modo gradiente; Fluxo: 0,6 mL/min; ESI positivo e negativo; Modo sMRM (schedule multiple reaction monitoring)	Precipitaç3o de prote3nas (metanol e acetonitrila 1:9 v/v); Recuperaç3o dos analitos: ≥ 94%
Fern3ndez et al	2012	27 antidepressivos incluindo citalopram, fluoxetina, paroxetina e sertralina	Plasma	LC-MS: Coluna Acquity C18 100x2,1mm 1,7 µm; Acetato de am3nia 5mmol/L, 3cido f3rmico 0,05 g/dL e acetonitrila em modo gradiente; Fluxo: 0,3 mL/min; ESI positivo; Modo MRM (multiple reaction monitoring)	Extraç3o l3quido-l3quido Recuperaç3o do analito: 59 – 85%

* os m3todos n3o informam dados de recuperaç3o dos analitos da matriz

Para quantificaç3o dos antidepressivos em leite materno, a maior parte dos m3todos utilizou CLAE-UV e a metodologia descrita foi desenvolvida para determinaç3o de apenas um f3rmaco. M3todo para determinaç3o simult3nea de nove antidepressivos por CLAE-UV, incluindo fluoxetina, paroxetina e sertralina 3 relatado; por3m para realizar a determinaç3o dos analitos propostos 3 necess3ria a adequaç3o dos par3metros cromatogr3ficos, especialmente em relaç3o 3 fase m3vel e ao comprimento de onda para a detecç3o de cada um dos f3rmacos. M3todos para outras matrizes, como plasma, utilizaram CLAE-MS e descreveram determinaç3o simult3nea dos antidepressivos e tamb3m outros psicotr3picos com eluiç3o da fase m3vel em modo gradiente. Os m3todos propostos tanto por CLAE-UV como por CLAE-MS descreveram como forma de extraç3o a extraç3o l3quido-l3quido e extraç3o em fase s3lida com v3rias etapas para realizaç3o destes procedimentos. Alguns m3todos descreveram o uso da precipitaç3o de prote3nas para o tratamento das amostras (KIRCHHER & KUHN,

2006; UŘINOVSKA *et al*, 2012; VECCHIONE *et al*, 2012) e é possível observar boa recuperação dos analitos com o uso deste procedimento.

A estabilidade dos analitos foi verificada através do método LC-MS. As amostras foram submetidas a diversas condições como ciclos de congelamento e descongelamento, estabilidade de curta duração com as amostras processadas deixadas em bancada por 6h à temperatura ambiente, estabilidade de longa duração após congelamento das amostras de leite por 30 dias. A estabilidade após 180 dias de congelamento também foi verificada, obtendo como resultados 95,5, 104,8 e 87,6, 86,9, e 78,6% para fluoxetina, sertralina, paroxetina, citalopram e bupropiona respectivamente. As amostras permaneceram estáveis em ambos os períodos analisados, a exceção de bupropiona que apresentou degradação maior que o limite recomendado para o período de 180 dias (BRASIL, 2012). A estabilidade não foi descrita em outros métodos para leite materno. Para plasma, é relatada boa estabilidade dos antidepressivos quando analisados por LC-MS.

Em ambos os métodos desenvolvidos, o tratamento da amostra foi realizado pela técnica de precipitação de proteínas. Este procedimento apresenta como vantagem o fato de ser simples, eficiente, consumir baixa quantidade de solvente gerando pouco resíduo e envolver apenas uma etapa para o tratamento das amostras biológicas. Os procedimentos de precipitação de proteínas utilizados no desenvolvimento dos métodos deste trabalho basearam-se nestes descritos em literatura e obtiveram bons resultados. Para o método desenvolvido por LC-MS foi utilizado como solução precipitante acetonitrila refrigerada (-20 °C); já no método por CLAE-UV a acetonitrila também foi utilizada, porém com adição de sulfato de zinco na concentração de 0,05% para auxiliar na limpeza de amostra. A adição do sulfato de zinco demonstrou não afetar a extração dos analitos. As recuperações dos extratos foram verificadas, e tanto para método por LC-MS e por CLAE-UV foram consideradas adequadas apresentando valores variando de 84,3% a 97,8% (LC-MS) e 85,9 a 89% (CLAE-UV).

O método cromatográfico desenvolvido por LC-MS apresentou maior sensibilidade com relação ao método CLAE-UV com limites de quantificação de 5 (fluoxetina, citalopram e bupropiona) e 20ng/mL (sertralina e paroxetina) provavelmente devido as características de sensibilidade inerentes a este equipamento. Nos métodos descritos na literatura para plasma também são descritos limites de quantificação em torno dos limites encontrados neste trabalho. Ambos os métodos apresentaram como vantagem a determinação simultânea dos antidepressivos em leite materno com eluição isocrática dos compostos. Através destas metodologias, mais de uma substância pôde ser analisada com o mesmo método, sem a necessidade de variar fase móvel ou outras condições cromatográficas e de tratamento da amostra com a mesma eficiência.

Durante as análises com o método LC-MS, foi observado pico extra com tempo de retenção diferenciado dos demais analitos para os quais o método foi validado. Após análise do espectro de massas, verificou-se pertencer ao metabólito da fluoxetina, norfluoxetina. Este fato confirmou sua excreção nesta matriz, assim como demonstrado nos dados da literatura (TADDIO *et al*, 1996; KRISTENSEN *et al*, 2001; SURI *et al*, 2002 e HOSTETTER *et al*, 2004).

A American Academy of Pediatrics (2015) recomenda que para avaliar os riscos e benefícios do uso de medicamentos durante a amamentação, alguns fatores devem ser considerados como: a necessidade do tratamento farmacológico pela mãe, os efeitos potenciais da substância na produção do leite materno, a quantidade de fármaco excretado no leite, a extensão da absorção oral através da amamentação. Também a idade da criança deve ser observada, pois muitos eventos adversos são relatados em bebês abaixo de dois meses expostos a fármacos por amamentação e menos relatados para bebês acima de seis meses.

Anderson e colaboradores (2016) observaram em estudo da prevalência de eventos adversos em bebês expostos a medicamentos pela amamentação que 63% dos relatos ocorreram no primeiro mês de vida e 16% relativos ao segundo mês. Há relatos na literatura de eventos adversos que foram

relacionados à exposição dos bebês aos antidepressivos pela amamentação, sendo que as idades dos bebês variaram entre uma semana e 18 meses (PHEULA *et al*, 2003; BERLIN & BRIGGS, 2005; WANNAMACHER, 2007; BERLE & SPIGSET, 2011, FRIGULS *et al*, 2010, ANDERSON *et al*, 2016).

Substâncias com baixa ligação a proteínas plasmáticas, alta lipofilicidade e pH tem sua excreção facilitada ao leite materno (FRÍGULS *et al*, 2010; ROWE *et al*, 2015). Os fármacos analisados neste trabalho (fluoxetina, sertralina, citalopram, paroxetina e bupropiona) possuem alto pKa, baixas massas moleculares e alta ligação a proteínas plasmáticas (Tabela 3.1, p. 20), e conforme suas características é esperada sua excreção no leite resultando em concentrações detectadas e quantificadas nesta matriz (TADDIO *et al*, 1996; JENSEN *et al*, 1997; STOWE *et al*, 1997; KRISTENSEN *et al*, 1998; BEGG *et al*, 1998; KRISTENSEN *et al*, 1999; MISRI *et al*, 2000; SCHIMIDT *et al*, 2000; STOWE *et al*, 2000; HENDRICK *et al*, 2001; HEIKKINEN *et al*, 2002; SURI *et al*, 2002; HAAS *et al*, 2004; HOSTETTER *et al*, 2004).

Das amostras analisadas neste trabalho (no total 13), cinco são referentes à fluoxetina (amostras 1 a 4), sete são referentes à sertralina (amostras 5 a 8) e uma referente à paroxetina (amostra 9). As amostras 4, 6 e 8 tiveram mais de uma coleta realizada. As amostras citadas acima foram analisadas pelo método de LC-MS (Tabela 6.2). Não foi possível avaliar amostras de leite materno oriundas de mães usuárias de antidepressivos por CLAE-UV pela indisponibilidade das mesmas.

Fluoxetina foi administrada à mãe da amostra 1 no momento da internação e o leite coletado trata-se do colostro. Amostra 2 foi relativa à mãe que declarou usar fluoxetina por cerca de dois meses no momento da doação (leite mais maduro). As concentrações encontradas entre as amostras foram similares.

Amostra 3 tratava-se de leite maduro, sendo que das amostras analisadas de fluoxetina, apresentou a maior concentração determinada. As amostras 4 foram coletadas em momentos distintos: a primeira no turno da manhã e a segunda no turno da tarde, sendo que a mãe declarou tomar o medicamento no

período da manhã. Estas amostras apresentaram concentrações diferenciadas, sendo a primeira com menor concentração de fluoxetina e a segunda com maior concentração. Devido à diferença entre o tempo de coleta e a administração do fármaco, possivelmente a coleta do leite foi realizada próximo ao pico de

Tabela 6.2. Concentrações encontradas no leite materno por método LC-MS

Amostra	Fármaco administrado	Dose diária informada (mg/dia)	Concentração encontrada (ng/mL)	Leite materno (fase)	Dose absoluta (µg/kg/dia)	Dose relativa (%)
1	Fluoxetina	20	42,4	Colostro	6,35	1,57
2	Fluoxetina	20	51,8	Maduro	7,73	2,29
3	Fluoxetina	20	65,7	Maduro	9,85	2,90
4.1	Fluoxetina	20	30,4	Colostro	6,58*	1.94
4.2	Fluoxetina		57,3	Colostro	-	
5	Sertralina	50	53,9	Maduro	8,08	1,11
6.1	Sertralina	25	24,2	Colostro	4,36*	0,60
6.2	Sertralina		33,9	Colostro	-	
7	Sertralina	50	81,7	Maduro	12,26	1,68
8.1	Sertralina	50	42,4	Colostro	5,86*	0, 80
8.2	Sertralina		48,3	Colostro		
8.3	Sertralina		26,5	Colostro		
9	Paroxetina	20	<LIQ	Maduro	-	-

As amostras 6 foram coletadas de mãe que declarou usar sertralina na dosagem de 25 mg. É possível observar que resultaram em concentrações menores que as outras amostras de mães que declararam tomar dosagem de 50mg. Esta amostra era de colostro e período de administração do fármaco declarado foi no turno da noite e as coletas realizadas na manhã. As diferenças nas concentrações podem ser relacionadas com o fato de uma coleta ter sido feita antes e outra após a mamada.

No restante das amostras, as mães declararam usar sertralina na dosagem de 50 mg. Em relação à amostra 5 a mãe declarou estar usando o medicamento há cerca de 15 dias, sendo a coleta realizada no turno da tarde e administração no turno da noite. Amostra 7 com a maior concentração observada, tratava-se de leite maduro, sendo a mãe usuária deste medicamento mesmo na gravidez. As amostras 8, coletadas em momentos distintos, eram

colostro e provavelmente também sofreram influência por haverem sido coletadas antes e após a mamada.

A amostra 9 (paroxetina) apresentou concentrações abaixo dos limites de quantificação para método LC-MS. Baixas concentrações são relatadas nos estudos reportados em literatura (BEGG *et al*, 1998; MISRI *et al*, 2000; STOWE *et al*, 2000; HOSTETTER *et al*, 2004).

Hostetter e colaboradores (2004) em seu estudo observaram concentrações de aproximadamente 900 ng/mL para sertralina, diferindo de outras concentrações encontradas na literatura, sendo que os pesquisadores atribuíram esta larga diferença a características farmacocinéticas individuais.

Stowe e colaboradores (2003) observaram que maiores concentrações foram encontradas no leite 8 a 9 h após a administração de sertralina à mãe, sendo que sertralina possui pico plasmático de 4 a 8 h. Estes pesquisadores também observaram que devido às diferenças farmacocinéticas individuais, especialmente em bebês que possuem seus sistemas ainda imaturos, torna-se difícil correlacionar as concentrações plasmáticas determinadas nos bebês com a quantidade de fármaco encontrado no leite. A quantificação da exposição através do leite materno deve preferencialmente ser obtida a fim de avaliar a segurança da administração do fármaco durante a amamentação. A American Academy of Pediatrics (2015) em sua última revisão sobre uso de medicamentos e amamentação recomenda como fator importante a ser avaliado a quantidade do fármaco excretado no leite assim como a extensão da absorção oral através da exposição. Os fármacos antidepressivos aqui analisados são bem absorvidos através do trato gastrointestinal e tiveram suas concentrações detectadas no plasma infantil, com exceção de paroxetina que possui relatos de concentração abaixo da detecção no plasma infantil (WEISSMAN *et al*, 2004; SCALEA *et al*, 2015).

A exposição dos fármacos através do leite materno pode ser estimada através do cálculo das doses absolutas e doses relativas infantis. Doses relativas menores que 10% podem ser consideradas seguras para o uso do medicamento durante a lactação (BRASIL, 2010; FRIGULS *et al*, 2010; ROWE *et al*, 2015).

Foram obtidas doses relativas de cerca de 3% para os fármacos analisados neste estudo, ou seja, os lactentes estariam recebendo apenas 3% da dose materna, podendo assim ser considerado seguro seu consumo durante a amamentação. A dose relativa é apenas uma estimativa e outros fatores devem ser considerados, como a idade do lactente, bem como a presença de distúrbios hepáticos ou renais na criança.

7 CONCLUSÕES

Método por LC-MS para detecção e quantificação de fármacos antidepressivos de interesse (fluoxetina, sertralina, citalopram, paroxetina e bupropiona) foi desenvolvido e validado, demonstrando ser seletivo, linear, preciso e exato.

- ✓ Método por CLAE-UV para detecção e quantificação de fármacos antidepressivos de interesse (fluoxetina, sertralina e paroxetina) foi desenvolvido e validado, demonstrando ser seletivo, linear, preciso e exato.
- ✓ Protocolo analítico de extração e tratamento das amostras de leite materno foi desenvolvido e padronizado para ambas as metodologias.
- ✓ Os fármacos analisados apresentaram boa estabilidade tanto na matriz biológica quanto em solução, a exceção de bupropiona que apresentou degradação maior que o limite recomendado.
- ✓ O método validado por LC-MS para quantificação dos antidepressivos foi aplicado nas amostras coletadas em Banco de Leite e demonstrou ser sensível e de fácil execução, podendo ser usado para o monitoramento da excreção destes analitos em leite materno.
- ✓ Os fármacos antidepressivos foram detectados nas amostras de leite materno, confirmando sua excreção nesta matriz e suas concentrações foram determinadas.
- ✓ Foi detectado nas amostras de leite materno analisadas por LC-MS norfluoxetina, metabólito da fluoxetina, confirmando sua excreção nesta matriz.
- ✓ A partir das concentrações determinadas dos fármacos por LC-MS, foram estimadas as doses recebidas pelas crianças amamentadas, e as mesmas foram consideradas baixas, podendo-se inferir ser segura a utilização destes durante a lactação.

8 REFERÊNCIAS

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, COMMITTEE ON DRUGS, The Transfer of Drug and Therapeutics Into Human Breast Milk: An Update on Selected Topics, *Pediatric*, v. 132, p. 796 – 807, 2015

ANDERSON, P. O.; MANOQUERRA, A. S.; VALDÉS, V.; A Review of Adverse Reactions in Infants From Medications in Breastmilk, *Clin. Pediatr.*, v. 55(3), p. 236 – 244, 2016

BEGG, E. J.; DUFFULL, S. B.; SAUNDERS, D. A.; BUTTIMORE, R. C.; ILLETT, K. F.; HACKETT, L. P.; YAPP, P.; WILSON, D. A., Paroxetine in human milk, *J. Clin. Pharmacol.*, v. 48, p. 142-147, 1999

BERLE J. O.; SPIGSET O., Antidepressant Use During Breastfeeding, *Curr. Women's Health Rev.*, v. 7 (1), p. 28 – 34, 2011

BERLIN C. M.; BRIGGS, G. G., Drugs and chemicals in human milk, *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, v. 10, p. 149 – 159, 2005

BLAYA, C.; LUCCA, G.; BISOL, L.; ISOLAN, L., Diretrizes para o uso de psicofármacos durante a gestação e lactação, *Psicofármacos: Consulta rápida; Artmed*, Porto Alegre, p. 393, 2005

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RDC nº 27 de 17 de maio de 2012, Dispõe sobre os requisitos mínimos para validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós registro de medicamento In: *Diário Oficial da União*, Brasília, 22 de junho de 2012

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Promovendo o Aleitamento Materno, *Álbum seriado*, 2º Ed., 18 p, 2009

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Amamentação e uso de medicamentos e outras substâncias, *Normas e Manuais Técnicos*, 2º Ed., Serie A, Brasília, 2010

BRUNTON, L.; PARKER, K.; BLUMENTHAL, D.; BUXTON I., Goodman & Gilman: *Manual de Farmacologia Terapêutica*, AMGH Editora Ltda, Porto Alegre, p. 1003-1004, 2010.

CARVALHO, M. R.; TAVARES, L. A. M., Amamentação: bases científicas, 3^o Ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 26 – 31, 2010

CASTRO, A.; CONCHEIRO, M.; QUINTELA, O.; CRUZ, A.; LÓPEZ-RIVADULLA, M., LC-MS/MS method for the determination of nine antidepressants and some of their main metabolites in oral fluid and plasma Study of correlation between venlafaxine concentrations in both matrices, J. Pharma. Biomed., v. 48, p. 183 – 193, 2008

CHAVES, R. G.; LAMOUNIER, J. A., Uso de medicamentos durante a lactação, J. Pediatr., v. 80(5), p. 189 – 198, 2004

CHAVES, R. G.; LAMOUNIER, J. A., CÉSAR, C. C., Medicamentos e amamentação: atualização e revisão aplicadas à clínica materno-infantil, Rev. Paul. Pediatr., v. 25 (3), p. 276 – 288, 2007

DEL CIAMPO, L. A.; FERRAZ, I. S.; DANELUZZI, J. C.; RICCO, R. G.; MARTINELLI JR, C. E., Aleitamento materno e uso de medicamentos durante a lactação, Rev. Paul. Pediatr., v. 25(4), p. 355 – 357, 2007

DRUGDEX Consults® System. MICROMEDEX® Truven Health Analytics. The Healthcare Business of Thomson Reuters. Disponível em: <http://www.micromedexsolutions.com/home/dispatch>. Acesso em: 14 jun. 2014.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY-EMA, Guidelines on Bioanalytical Method Validation, EMEA/CHMP/EWP/192217/2009, 21 July 2012. Disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC5001109686.pdf Acesso em: 01 mar. 2015.

FERNÁNDEZ, M. M. R.; WILLE, SAMYN, N., Quantitative Method Validation for the Analysis of 27 Antidepressants and Metabolites in Plasma With Ultraperformance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, Ther. Drug. Monit., v. 34, p. 11 – 24, 2012

FREITAS, D. F.; PORTO, C. E. D.; VIEIRA, E. P.; SIQUEIRA, M. E. P. B., Three-phase, liquid-phase microextraction combined with high performance liquid chromatography-fluorescence detection for the simultaneous determination of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma, J. Pharma. Biomed, v. 51, p. 170 – 177, 2010

FRÍGULS, B.; JOYA, X.; GARCÍA-ALGAR, O.; PALLÁS, C. R.; VALL, O.; PICHINI, S., A comprehensive review of assay methods to determine drugs in breast milk and safety of breastfeeding when taking drugs, *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 397, p. 1157 – 1179, 2010

GARCÍAS, C. M. M.; PINHEIRO, R. T.; GARCÍAS, G. L.; HORTA, B. L.; BRUM, C. B., Prevalência e fatores associados ao uso de antidepressivos em adultos de área urbana de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil, em 2006, *Cad. Saúde Pública*, v. 24(7), p. 1565 – 1571, 2008

HAAS, J. S.; KAPLAN, C. P.; BARENBOIN, D.; JACOB, P.; BENOWITZ, N. L., Bupropion in breast milk: an exposure assessment for potential treatment to prevent post-partum tobacco use, *Tobacco Control*, v. 13, p. 52 – 56, 2004

HEIKKINEN T.; EKBLAD U.; KERO P.; EKBLAD S.; LAINE K., Citalopram in pregnancy and lactation, *Clin. Pharmacol. & Ther.*, v. 72, p. 184 – 191, 2002

HEIKKINEN T.; EKBLAD U.; PALO P.; LAINE K., Pharmacokinetics of fluoxetine and norfluoxetine in pregnancy and lactation, *Clin. Pharmacol. & Ther.*, v. 73, p. 330 – 337, 2003

HENDRICK, V.; STOWE, Z. N.; ALTSHULER, L. L.; MINTZ, J.; HWANG, S.; HOSTETTER, A. M.; SURI, R.; LEIGHT, K.; FUKUCHI, A., Fluoxetine and Norfluoxetine Concentrations in Nursing Infants and Breast Milk, *Biol. Psychiatry.*, v. 50, p. 775 – 782, 2001

HOSTETTER, A. L.; STOWE, Z. N.; COX M.; RITCHIE, J. C., A Novel System for the Determination of Antidepressant Concentrations in Human Breast Milk, *Ther. Drug Monit.*, v. 26 (1), p. 47 – 52, 2004

ITO, S.; LEE, A., Drug excretion into breast milk – Overview, *Advanc. Drug Deliv. Rev.*, v. 55, p. 617 – 627, 2003

JENSEN, P. N.; OLESEN, O. O.; BERTELSEN, A.; KRISTIAN, L., Citalopram and desmethylcitalopram concentrations in breast milk and in serum of mother and infant, *Ther. Drug Monitor.* v. 19(2), p. 236-239, 1997

JUAN, H.; ZHILING, Z.; HUANDE, L.; Simultaneous determination of fluoxetine, citalopram, paroxetine, venlafaxine in plasma by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*, v. 820, p. 33 -39, 2005

KIRCHHERR, H.; KUHN-VELTEN, W. N., Quantitative determination of forty-eight antidepressants and antipsychotics in human serum by HPLC tandem mass spectrometry: A multi-level, single-sample approach, *J. Chromatogr. B*, v. 843, p. 100 -113, 2006

KOVACEVIC, I.; POKRAJAC, M.; MILJKOVIC, B.; JOVANOVIC, D.; PROSTRAN, M., Comparison of liquid chromatography with fluorescence detection to liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma, *J. Chromatogr. B*, v. 830, p. 372 – 376, 2006

KRISTENSEN, J. H.; ILETT, K. F.; DUSCI, L. J.; HACKETT, L. P.; YAPP, P.; WOJNAR-HORTON, R. E., Distribution and excretion of sertraline and N-desmetilsertraline in human milk, *Br. J. Pharmacol.*, v. 45, p. 453 – 457, 1998

KRISTENSEN, J. H.; ILETT, K. F.; HACKETT, L. P.; YAPP, P.; PAECH, M.; BEGG, E. J., Distribution and excretion of fluoxetine and norfluoxetine in human milk, *J. Clin. Pharmacol.*, v. 48, p. 521-527, 1999

KRISTOFFERSEN, L.; BUGGE, A.; LUNDANES, E.; SLORDAR, L., Simultaneous determination of citalopram, fluoxetine, paroxetine and their metabolites in plasma and whole blood by high-performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection, *J. Chromatogr. B*, v. 734, p. 229-246, 1999

LUCCA, A.; GENTILINI, G.; LOPEZ-SILVA, S.; SOLDARINI, A., Simultaneous determination of human plasma levels of four selective serotonin reuptake inhibitors by high performance liquid chromatography, *Ther. Drug. Monit.* v. 22, p. 271 – 276, 2000

MANDRIOLI, R.; MERCOLINI, L.; FERRANTI, A.; FURLANETTO, S.; BOMCOMPAGNI, G.; RAGGI, M. A., Determination of the antidepressant paroxetine and its three main metabolites in human plasma by liquid chromatography with fluorescence detection, *Anal. Chim. Acta*, v. 591, p. 141-147, 2007

MAURER, H. H., Multi-analyte procedures for screening and for quantification of drugs in blood, plasma, or serum by liquid chromatography-single stage or tandem mass spectrometry (LC-MS or LC-MS/MS) relevant to clinical and forensic toxicology, *Environ. Internat.*, v. 54, p. 141 -163, 2013

MENG, Q. H.; GAUTHIER, D., Simultaneous analysis of citalopram and desmethylcitalopram by liquid chromatography with fluorescence detection after solid-phase extraction, *Clin. Biochem.*, v. 38, p. 282 – 285, 2005

MCCARTER-SPAULDING, D. E., Medication in pregnancy and lactation, *Am. J. Matern. Child Nurs.*, v. 30, p. 10 – 17, 2005

MISRI, S.; KIM, J.; RIGGS, K. W.; KOSTARAS, X., Paroxetine levels in postpartum depressed, breast milk and infant serum, *J. Clin. Psychiatry.*, v. 61(11), p. 828-832, 2000

NOMURA, M. L.; SILVA, J. L., Riscos e benefícios do uso de inibidores seletivos da recaptção de serotonina para depressão durante gravidez e lactação, *Rev. Bras. Ginecol. Obstetr.*, v. 29 (7), p. 331 – 334, 2007

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICA DA SAÚDE – OPAS, Amamentação, 2003, disponível em <http://www.opas.org/sistema/fotos/amamentação.pdf>, acessado em 04 de julho de 2012

ORSOLINI L.; BELLANTUONO C., Serotonin reuptake inhibitors and breastfeeding: a systematic review, *Hum. Psychopharmacol. Clin.*, v. 30, p. 4 -20, 2015

PHEULA, G. F.; DALGALARRONDO, P.; CELERI, E. H.; VILELA, W. A., Uso de psicofármacos na lactação: revisão e proposta de manejo, *J. Bras. Psiquiatr.*, v. 52 (6), p. 413 – 425, 2003

PINHEIRO, E.; BOGEN, D.L.; HOXHA, D.; CIOLINO, J. D.; WISNER, K. L., Sertraline and breastfeeding: review and meta-analysis, *Arch. Womens Ment Health*, v. 18, p.139 – 146, 2015

RAGGI, M. A.; MANDRIOLI, R.; CASAMENTI, G.; BUGAMELLI, F.; VOLTERRA, V., Determination of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma by high-pressure liquid chromatography with fluorescence detection, *J. Pharma. Biomed.*, v. 18, p. 193 – 199, 1998

ROCHA, B. S.; WERLANG, M.C., Psicofármacos na Estratégia Saúde da Família: perfil de utilização, acesso e estratégias para promoção do uso racional, *Cien. & Saúde Colet.*, v. 18(11), p. 3291 – 3300, 2013

ROWE, H.; BAKER, T.; HALE, T., Maternal medication, drug use and breastfeeding, *Child. Adolesc. Psychiatric. Clin. N. Am.*, v. 24, p. 1-20, 2015

SEREBRUANY, V. L.; SUCKOW, R. F.; COOPER, T. B.; O'CONNOR, C. M.; MALININ, A. I.; KRISHNAN, K. R.; ZYL, L. T.; LEKHT, V.; GLASSMAN, A.; Relationship Between Release of Platelet/Endothelial Biomarkers and Plasma Levels of Sertraline and N-Desmethylsertraline in Acute Coronary Syndrome Patients Receiving SSRI Treatment for Depression, *Am. J. Psychiatry*, v. 162, p. 1165 – 1170, 2005

SCALEA, T. L.; WISNER, K. L., Antidepressant Medication Use during Breastfeeding, *Clin. Obstet. Gynecol.*, v. 53(2), p. 483 – 497, 2009

SCHMIDT, K.; OLESEN, O. V.; JENSEN, P. N., Citalopram and Breast-Feeding: Serum Concentration and Side Effects in the Infant, *Biol. Psychiatry*, v. 47, p. 164 – 165, 2000

SCHIRM, E.; SCHWAGERMAN, M. P.; TOBI, H.; JONG-VAN DEN BERG, L. T., Drug use during breastfeeding: A survey from the Netherlands, *Eur. J. Clin. Nutr.*, v. 58, p. 386 -390, 2004

SPIGSET, O.; CARLEBORG, L.; ÖHMAN, R.; NORSTRÖM A., Excretion of citalopram in breast milk, *J. Clin. Pharmacol.*, v. 44, p. 295 – 298, 1997

STOWE Z. N.; OWENS, M. J.; LANDRY, J. L.; KILTS, C. D.; ELY, T.; LLEWELLYN, A.; NEMEROFF, C. D., Sertraline and desmethylsertraline in human breast milk and nursing infants, *Am. J. of Psychiatry*, v. 154(9), p. 1255 – 1260, 1997

STOWE, Z.; COHEN, L.; HOSTETTER, A.; RICHIE, J. C.; OWENS, M. J.; NEMEROFF C. B., Paroxetine in Human Breast Milk and Nursing Infants, *Am. J. Psychiatry*, v. 157, p. 185-189, 2000

STOWE, Z. N.; HOSTETTER, A. L.; OWENS, M. J.; RITCHIE, J. C.; STERNBERG, K.; COHEN, L. S.; NEMEROFF, C. B., The Pharmacokinetics of Sertraline Excretion Into Human Breast Milk: Determinants of Infant Serum Concentrations, *J. Clin. Psychiatry*, v. 64, p. 73 – 80, 2003

SURI, R.; STOWE, Z. N.; HENDRICK, V.; HOSTETTER, A.; WIDAWSKI, M.; ALTSHYLLER, L. L., Estimates of Nursing Infant Daily Dose of Fluoxetine through Breast Milk, *Biol. Psychiatry*, v. 52, p. 446 – 451, 2002

TADDIO, A.; ITO, S.; KOREN, G., Excretion of fluoxetine and its metabolite, norfluoxetine, in human milk, *J. Clin. Pharmacol.*, v. 36(1), p. 42-47, 1996

UŘINOVSKÁ, R.; BROZMANOVÁ, H.; ŠIŠTÍK, P.; ŠILHÁN, P.; KACÍŘOVÁ, I.; LEMR, K.; GRUNDMANN, M., Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of five antidepressants and four atypical antipsychotics and their main metabolites in human serum, *J. Chromatogr. B*, v. 907, p. 101 -107, 2012

VECCHIONE, G.; CASSETTA, B.; CHIAPPARINO, A.; BERTOLINO, A.; TOMAIUOLO, M.; CAPPUCCI, F.; GATTA, R.; MARGAGLIONE, M.; GRANDONE, E., A reliable and rapid tool for plasma quantification of 18 psychotropic drugs by ESI tandem mass spectrometry, *J. Pharma. Biomed.*, v. 67, p. 104 -113, 2012

WANNAMACHER, L., Depressão perinatal: balance entre uso de antidepressivos e risco no concepto, *Uso Racional de Medicamentos: Temas Seleccionados*, v. 4 (11), p. 1 – 6, 2007

WEISSMAN, A. M.; LEVY, B. T.; HARTZ, A. J., BLENTER, S.; DONOHUE, M.; ELLINGROD, K. L.; WISNER, K. L., Pooled analysis of antidepressants levels in lactating mothers, breast milk and nursing infants, *Am. J. Psychiatry*, v 161, p. 1066 – 1078, 2004

WORLD HEALTH ORGANIZATION, The optimal duration of exclusive breastfeeding, Geneva, Switzerland, 2001