

# Desenvolvimento e procedimentos de validação de uma metodologia analítica por GC/MS/MS para a determinação de antidepressivos em sangue total

Liliana Adelina Afonso Novo de Almeida Truta

2011



---

<b>Curso</b>	Mestrado em Engenharia Química, Ramo de Optimização Energética na Indústria Química
<b>Título</b>	Desenvolvimento e procedimentos de validação de uma metodologia analítica por GC/MS-MS para a determinação de antidepressivos em sangue total
<b>Orientação</b>	Professora Doutora Maria Goreti Ferreira Sales Professora Doutora Helena Teixeira Mestre Sónia Maria Lemos Heleno Tarelho Mestre André Alexandre Lobo Lopes de Castro
<b>Data</b>	Janeiro de 2012

---

*Esta publicação não pode ser reproduzida nem transmitida, no seu todo ou em parte, por qualquer processo aleatório, mecânico, fotocópia, gravação ou outra, sem prévia autorização escrita do autor.*

## Agradecimentos

Um agradecimento muito especial à Professora Doutora Goreti Sales pela oportunidade concedida, por todo o esforço no sentido de me transmitir os seus conhecimentos e, acima de tudo, pela confiança e amizade revelada ao longo de todos os momentos.

Agradeço, também, à Professora Doutora Helena Teixeira pela oportunidade concedida, assim como, por toda a confiança demonstrada ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Aos especialistas, Mestre Sónia Tarelho e Mestre André Castro, que assumiram o árduo papel de orientar o desenvolvimento de todo este projecto, agradeço todo o empenho e disponibilidade em transmitir os seus conhecimentos científicos, e, acima de tudo, pela compreensão e amizade que manifestaram em todos os momentos.

Agradeço a todos os colaboradores do Serviço de Toxicologia da Delegação do Norte do INML, I.P., que demonstraram, desde o primeiro dia, a camaradagem necessária para a concretização deste trabalho, em especial à Mestre Paula Melo, Dr<sup>a</sup> Maria José e Eng<sup>o</sup> Pedro Costa, que sempre se prontificaram e disponibilizaram a ajudar ao longo deste percurso.

Aos meus pais e familiares, por todo o carinho, atenção e incentivo manifestados em todos os momentos.

Agradeço, em especial, à minha irmã e ao meu grupo de Amigos, pelo carinho, incentivo e, sobretudo, pela paciência com que aceitaram a minha indisponibilidade ao longo deste tempo.

Por fim, agradeço ao Corpo Dirigente do Instituto Nacional de Medicina Legal da Delegação do Norte, pelo interesse demonstrado no desenvolvimento deste trabalho e pela disponibilidade de todos os meios necessários para a realização do mesmo.

## Resumo

A depressão é uma das doenças de foro psiquiátrico que mais prevalece na nossa sociedade, subsistindo evidências epidemiológicas que indicam um aumento substancial da sua incidência nos últimos anos. Esta evidência é consubstanciada pelo aumento significativo do consumo de antidepressivos em Portugal. Este cenário pressupõe a necessidade de uma metodologia que permita analisar, com rigor e numa perspectiva de rotina, os antidepressivos que podem ser encontrados em amostras de sangue.

No contexto do Serviço de Toxicologia Forense do Instituto Nacional de Medicina Legal, Delegação do Norte, torna-se necessário o desenvolvimento de uma metodologia analítica para a determinação simultânea de 15 antidepressivos em sangue total e a sua validação relativamente a vários parâmetros analíticos. Os antidepressivos considerados foram Amitriptilina, Citalopram, Clomipramina, N-Desmetilclomipramina, Dotiepina, Fluoxetina, Imipramina, Maprotilina, Mianserina, Mirtazapina, Nortriptilina, Paroxetina, Sertralina, Trimipramina e Venlafaxina.

A técnica utilizada para este efeito foi o GC/MS/MS, aplicando um procedimento extractivo prévio apropriado, baseado em procedimentos convencionais de extracção em fase sólida. A escolha desta técnica teve por base a possibilidade de identificar inequivocamente os compostos presentes na amostra, independentemente da complexidade da matriz, e de originar metodologias com uma sensibilidade elevada e com limites de detecção muito baixos.

Os parâmetros analíticos considerados para validação da metodologia estabelecida foram selectividade/especificidade e capacidade de identificação; limites de detecção e de quantificação; linearidade e gama de trabalho; eficiência de extracção; arrastamento; exactidão (precisão, veracidade e incerteza de medição) e robustez. Com excepção da exactidão, um parâmetro que carece ainda de estudos complementares, todos os parâmetros estudados foram validados de acordo com os requisitos internos do Serviço.

De uma forma geral, os resultados obtidos com o método desenvolvido revelaram-se selectivos e apresentaram respostas analíticas tanto para concentrações de antidepressivos em níveis terapêuticos como para níveis letais destas drogas. Os procedimentos extractivos revelaram-se eficazes e não foram verificados fenómenos de arrastamento em concentrações mais elevadas. O método foi ainda considerado robusto.

**Palavras-Chave:** Antidepressivos, GC/MS/MS, Validação, SPE, Toxicologia Forense.

## Abstract

Depression is one of the most prevalent psychiatric disorders in our society. Solid epidemiological evidence suggests a substantial incidence of the disease in recent years. This is supported by a significant increase in the consumption of antidepressant drugs, creating the need of suitable methods for their accurate analysis in blood samples, carried out in a routine fashion.

Focusing the needs of the *Serviço de Toxicologia Forense do Instituto Nacional de Medicina Legal, Delegação do Norte*, it is important to develop an analytical methodology for the simultaneous determination of 15 antidepressant drugs in whole blood and to validate it with regard to several analytical parameters. The selected antidepressants are Amitriptyline, Citalopram, Clomipramine, N-Desmethylclomipramine, Dothiepin, Fluoxetine, Imipramine, Maprotiline, Mianserine, Mirtazapine, Nortriptyline, Paroxetine, Sertraline, Trimipramine e Venlafaxine.

GC/MS/MS was selected for this purpose, after carrying out suitable pre-treating solid-phase extraction procedures. This selection was grounded on the fact that the identification of every compound is ensured and the resulting method offers high sensitivity with low limits of detection.

The analytical parameters required for validation included selectivity/specificity and identification capability; limits of detection and quantification; linearity and working concentration range; extraction efficiency; carryover; accuracy (precision, trueness and uncertainty); and robustness. Excluding accuracy that still needs additional testing, all parameters were validated according to the requisites of the *Serviço de Toxicologia Forense do Instituto Nacional de Medicina Legal, Delegação do Norte*.

In general, the obtained results offered good selectivity and analytical responses for the typical concentration ranges of therapeutic and lethal levels. The extraction procedures were effective and no carryover was observed for the highest concentrations. The overall method was found robust.

**Key-words:** Antidepressants, GC/MS/MS, Validation, SPE, Forensic Toxicology.

# Índice

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>1</b>
1.1	O Instituto Nacional de Medicina Legal	1
1.2	Toxicologia Forense	2
1.3	Amostras em Toxicologia Forense	5
1.3.1	Tipo de Amostras	5
1.3.2	Conservação e Armazenamento das Amostras	7
1.3.3	Cadeia de Custódia	8
1.3.4	Amostras representativas para antidepressivos	10
1.4	Antidepressivos	11
1.4.1	Antidepressivos de primeira geração	12
1.4.1.1	Antidepressivos Tricíclicos e afins	12
1.4.1.2	Inibidores da Monoaminoxidase	13
1.4.2	Antidepressivos de segunda geração	14
1.4.2.1	Inibidores Selectivos da Recaptação da Serotonina	14
1.4.2.2	Inibidores Selectivos da recaptação da Serotonina e Noradrenalina	15
1.4.3	Conjunto de antidepressivos com interesse em Toxicologia Forense	15
1.5	Técnicas Instrumentais em Toxicologia Forense	16
1.5.1	GC/MS/MS	16
1.5.2	Técnicas de Varrimento em MS/MS	18
1.5.2.1	Varrimento dos iões produzidos ( <i>product ion scan</i> )	18
1.5.2.2	Varrimento do ião precursor ( <i>ion scan</i> )	18
1.5.2.3	Monitorização de iões seleccionados ( <i>SIM</i> )	18
1.5.3	Condições cromatográficas gerais	19
1.5.4	Processo Extractivo prévio	20
1.5.4.1	Extracção em Fase Sólida	21
1.6	Validação de um método analítico	23
1.6.1	Especificidade/Selectividade e Capacidade de Identificação	25
1.6.2	Eficiência de extracção do analito	25
1.6.3	Limites de Detecção e Quantificação	26
1.6.4	Linearidade e Gama de Trabalho	27
1.6.5	Exactidão	30
1.6.5.1	Precisão	31
1.6.5.2	Veracidade	33
1.6.5.3	Incerteza da Medição	34
1.6.6	Robustez	37
1.6.7	Arrastamento	37

1.6.8	Sistema de Controlo de Qualidade .....	37
1.6.8.1	Controlo de Qualidade Interno .....	38
1.6.8.2	Controlo de Qualidade Externo .....	39
<b>2</b>	<b>Descrição Experimental</b> .....	<b>40</b>
2.1	Instrumentação e Material .....	40
2.2	Reagentes e Padrões Analíticos .....	40
2.3	Amostras .....	42
2.4	Pré-preparação das amostras e das soluções de trabalho .....	42
2.5	Extracção em Fase Sólida .....	42
2.6	Condições Cromatográficas .....	44
<b>3</b>	<b>Resultados e Discussão</b> .....	<b>45</b>
3.1	Desenvolvimento da metodologia analítica .....	45
3.1.1	Tempos de retenção .....	46
3.1.2	Íons-diagnóstico .....	48
3.1.3	Registo cromatográfico .....	49
3.2	Validação do método .....	51
3.2.1	Especificidade/Selectividade e Capacidade de Identificação .....	51
3.2.2	Limites de Detecção e de Quantificação .....	55
3.2.3	Linearidade e Gama de Trabalho .....	59
3.2.4	Eficiência de Extracção .....	62
3.2.5	Arrastamento ( <i>Carryover</i> ) .....	64
3.2.6	Robustez .....	66
3.2.7	Exactidão .....	67
3.2.7.1	Precisão em condições de repetibilidade .....	67
3.2.7.2	Veracidade .....	68
3.2.7.3	Incerteza de Medição .....	70
<b>4</b>	<b>Conclusões e Sugestões para Trabalhos Futuros</b> .....	<b>73</b>
<b>5</b>	<b>Referências Bibliográficas</b> .....	<b>75</b>
<b>ANEXO A</b>	.....	<b>A.2</b>
<b>ANEXO B</b>	.....	<b>A.20</b>
<b>ANEXO C</b>	.....	<b>A.33</b>
<b>ANEXO D</b>	.....	<b>A.40</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.1</b>	Delegação do Norte do Instituto Nacional de Medicina Legal, I.P. ....	2
<b>Figura 1.2</b>	Representação esquemática dos Serviços Técnicos e Gabinetes Médico-Legais pertencentes à Delegação do Norte do INML, I.P (adaptado da Portaria N.º 522/2007, de 30 de Abril).....	2
<b>Figura 1.3</b>	Representação das diversas áreas que interagem com ramos da Toxicologia .....	4
<b>Figura 1.4</b>	Amostras de Sangue .....	6
<b>Figura 1.5</b>	Imagem simulada de conteúdo gástrico com medicamentos.....	7
<b>Figura 1.6</b>	Material utilizado para a recolha e armazenamento das amostras .....	8
<b>Figura 1.7</b>	Diferenciação dos conjuntos de Kits existentes para a recolha de amostras .....	10
<b>Figura 1.8</b>	Consumo de medicamentos ansiolíticos, hipnóticos, sedativos e antidepressivos no mercado do SNS, em ambulatório .....	11
<b>Figura 1.9</b>	Cromatógrafo gasoso acoplado a um Espectrómetro de Massa com detector do tipo Triplo Quadrupolo (GC/MS/MS) .....	16
<b>Figura 1.10</b>	Representação esquemática da técnica analítica GC/MS/MS .....	17
<b>Figura 1.11</b>	Colunas Capilares .....	19
<b>Figura 1.12</b>	Etapas envolvidas na extracção em fase sólida.....	22
<b>Figura 1.13</b>	Representação do copolímero de N-vinilpirrolidona e Divinilbenzeno, constituinte da coluna Oasis <sup>®</sup> HLB .....	23
<b>Figura 1.14</b>	Gama Dinâmica de uma resposta analítica .....	28
<b>Figura 1.15</b>	Relação entre Exactidão, Precisão e Veracidade .....	31
<b>Figura 2.1</b>	Extractor automatizado de SPE GX-271 ASPEC <sup>TM</sup> , da Gilson <sup>®</sup> .....	43
<b>Figura 3.1</b>	Cromatograma correspondente a todos os compostos estudados, detectados em modo SIM-SIM. ....	51
<b>Figura 3.2</b>	Confirmação da positividade para a Clomipramina em amostras aplicadas no estudo da Especificidade/Selectividade e Capacidade de Identificação. ....	53
<b>Figura 3.3</b>	Confirmação da positividade para a Sertralina em amostras aplicadas no estudo da Especificidade/Selectividade e Capacidade de Identificação. ....	54
<b>Figura 3.4</b>	Dados do estudo do LQ e LD da Clomipramina. ....	58
<b>Figura 3.5</b>	Dados do estudo do LQ e LD da Sertralina. ....	58
<b>Figura 3.6</b>	Dados do estudo da Linearidade da Clomipramina.....	61
<b>Figura 3.7</b>	Dados do estudo da Linearidade da Sertralina.....	61
<b>Figura 3.8</b>	Representação esquemática do modelo experimental aplicado ao estudo da eficiência de extracção.....	63

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.1.</b>	Factores interferentes na decomposição química dos compostos tóxicos.....	9
<b>Tabela 2.1.</b>	Produtos químicos utilizados em laboratório. ....	41
<b>Tabela 2.2.</b>	Procedimento extractivo aplicado a amostras de sangue total com colunas Oasis HLB® .....	43
<b>Tabela 2.3.</b>	Parâmetros Analíticos do Sistema GC/MS/MS.....	44
<b>Tabela 3.1</b>	Tempos de retenção dos diferentes ADs obtidos em modo SCAN.....	46
<b>Tabela 3.2</b>	Diferentes voltagens aplicadas ao ião-precursor na Célula de Colisão e os iões seleccionados, em modo SCAN, no 3º Quadrupolo. ....	48
<b>Tabela 3.3</b>	Parâmetros de aquisição em modo SIM-SIM. ....	50
<b>Tabela 3.4</b>	Valores de referência para as gamas terapêuticas, tóxicas e letais dos compostos analisados .....	55
<b>Tabela 3.5</b>	Limites de detecção e de quantificação obtidos por GC/MS/MS.....	57
<b>Tabela 3.6</b>	Valores obtidos nos testes de linearidade. ....	60
<b>Tabela 3.7</b>	Rendimento de extracção dos analitos estudados em sangue total. ....	63
<b>Tabela 3.8</b>	Representação do estudo e dos resultados qualitativos da avaliação de fenómenos de Arrastamento no estudo da Linearidade. ....	65
<b>Tabela 3.9</b>	Representação do estudo e dos resultados qualitativos da avaliação de fenómenos de Arrastamento no estudo da Eficiência de Extracção. ....	65
<b>Tabela 3.10</b>	Estimativa da precisão em condições de Repetibilidade para os dois níveis de concentração representativos da gama de trabalho da Clomipramina. ....	69
<b>Tabela 3.11</b>	Estimativa da precisão em condições de Repetibilidade para os dois níveis de concentração representativos da gama de trabalho da Sertralina. ....	69
<b>Tabela 3.12</b>	Estimativa da Veracidade para os dois níveis de concentração representativos da gama de trabalho da Clomipramina. ....	70
<b>Tabela 3.13</b>	Estimativa da Veracidade para os dois níveis de concentração representativos da gama de trabalho da Sertralina. ....	70
<b>Tabela 3.14</b>	Estimativa das incertezas para os dois níveis de concentração representativos da gama de trabalho da Clomipramina. ....	72
<b>Tabela 3.15</b>	Estimativa das incertezas para os dois níveis de concentração representativos da gama de trabalho da Sertralina. ....	72

## Lista de Abreviaturas

<b>AD</b>	Antidepressivo
<b>ADT</b>	Antidepressivo Tricíclico
<b>CC</b>	Célula de Colisão
<b>CQ</b>	Controlo de Qualidade
<b>CQI</b>	Controlo de Qualidade Interno
<b>CV<sub>r</sub></b>	Coefficiente de Variação de repetibilidade
<b>DS<sup>2</sup></b>	Diferença de variâncias
<b>EIL</b>	Ensaio Interlaboratorial
<b>EUROCHEM</b>	Rede de organizações na Europa, com a missão de estabelecer um sistema de rastreabilidade internacional das medições químicas e de promover boas práticas de qualidade.
<b>GC/MS/MS</b>	Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massa com detector triplo quadrupolo.
<b>HLB</b>	do inglês, <i>Hydrophilic-Lipophilic Balance</i> - colunas OASIS® da Waters
<b>ICH</b>	do inglês, <i>International Conference on Harmonization</i>
<b>IEC</b>	do inglês, <i>International Electrotechnical Commission</i>
<b>IMAO</b>	Inibidor da monoaminoxidase
<b>INML, I.P.</b>	Instituto Nacional de Medicina Legal
<b>IPAC</b>	Instituto Português de Acreditação
<b>IPS</b>	Instituto Português de Sangue
<b>ISO</b>	do inglês, <i>International Standardization Organization</i>
<b>ISRS</b>	Inibidor Selectivo da Recaptação da Serotonina
<b>ISRSN</b>	Inibidor Selectivo da Recaptação da Serotonina e da Noradrenalina
<b>LD</b>	Limite de Detecção
<b>LLE</b>	do inglês, <i>Liquid-Liquid Extraction</i>
<b>LQ</b>	Limite de Quantificação
<b>MAO</b>	Monoaminoxidase
<b>MRC</b>	Material de Referência Certificado
<b>MS</b>	do inglês, <i>Mass Spectrometry</i>
<b>MS/MS</b>	Espectrometria de Massa em <i>tandem</i>
<b>NP</b>	Norma Portuguesa
<b>PG</b>	Valor teste
<b>PI</b>	Padrão-Interno
<b>SIM</b>	do inglês, <i>Selected Ion Monitoring</i>
<b>SOFT</b>	do inglês, <i>Society of Forensic Toxicologists</i>
<b>SPE</b>	do inglês, <i>Solid-Phase Extraction</i>
<b>SQ</b>	Sistema de Qualidade
<b>STF</b>	Serviço de Toxicologia Forense
<b>STF-N</b>	Serviço de Toxicologia Forense da Delegação do Norte, do INML, I.P.
<b>TIAFT</b>	do inglês, <i>The International Association of Forensic Toxicologists</i>
<b>t<sub>r</sub></b>	Tempo de retenção
<b>t<sub>rr</sub></b>	Tempo de retenção relativo
<b>VIM</b>	Vocabulário Internacional de Metrologia

# 1 Introdução

---

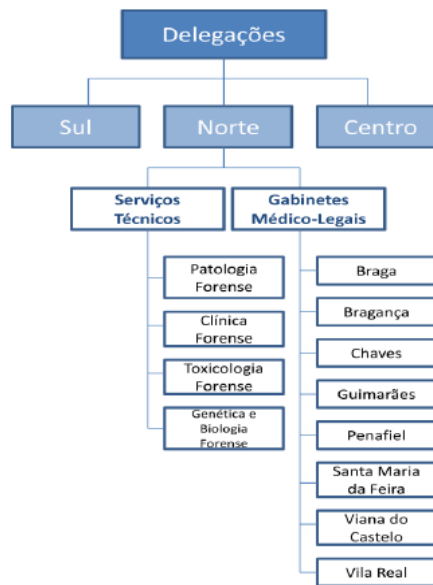
## 1.1 O Instituto Nacional de Medicina Legal

O Instituto Nacional de Medicina Legal, I.P. (INML, I.P.) é a instituição nacional de referência na área científica da Medicina Legal e de outras ciências forenses, desenvolvendo a sua missão pericial em estreita articulação funcional com as autoridades judiciárias e judiciais no âmbito da administração da justiça, no cumprimento das normas e dos princípios legais e éticos que asseguram o devido respeito pelos direitos, liberdades e garantias dos cidadãos. Esta instituição acompanha, de forma permanente, a evolução das metodologias técnico-científicas de âmbito pericial, promove a formação, bem como a investigação e a divulgação científicas no âmbito da Medicina Legal e de outras Ciências Forenses e desenvolve formas de colaboração pedagógica com outros organismos institucionais<sup>[1]</sup>.

O INML, I.P., é um organismo central com jurisdição sobre todo o território nacional, que está sediado em Coimbra, e dispõe de serviços descentralizados, denominados por Delegações, no Norte (Porto), Centro (Coimbra) e Sul (Lisboa), na dependência dos quais funcionam os Gabinetes Médico-Legais<sup>[1]</sup>. A Delegação do Norte localiza-se no coração da cidade do Porto (Figura 1.1) e tem como área de actuação directa as comarcas de Gondomar, Porto, Maia, Matosinhos, Póvoa de Varzim, Valongo, Vila do Conde e Vila Nova de Gaia. Relativamente aos Gabinetes Médico-Legais dependem de si os gabinetes de Braga, Bragança, Chaves, Guimarães, Penafiel, Santa Maria da Feira, Viana do Castelo e Vila Real (Figura 1.2).



**Figura 1.1** Delegação do Norte do Instituto Nacional de Medicina Legal, I.P. <sup>[2]</sup>.



**Figura 1.2** Representação esquemática dos Serviços Técnicos e Gabinetes Médico-Legais pertencentes à Delegação do Norte do INML, I.P. (adaptado da Portaria N.º 522/2007, de 30 de Abril <sup>[3]</sup>)

A Delegação do Norte do INML, I.P., dispõe de vários serviços técnicos (Figura 1.2), os quais desempenham actividades específicas, nomeadamente o Serviço de Patologia Forense, o Serviço de Clínica Forense, o Serviço de Toxicologia Forense (STF) e o Serviço de Genética e Biologia Forense. É no contexto do STF da Delegação do Norte (STF-N) do INML, I.P., que tem lugar o presente trabalho.

## 1.2 Toxicologia Forense

A toxicidade consiste num conjunto de processos promovidos por uma substância aquando do seu contacto com um organismo e que podem constituir efeitos adversos para esse mesmo organismo<sup>[2]</sup>. O efeito observado depende da natureza da substância propriamente dita, do organismo exposto e da quantidade/frequência de exposição. De

uma forma geral, “...não há substâncias atóxicas”, pois “todas as substâncias, sem excepção, são tóxicas, somente a dose distingue um tóxico de um medicamento” (Paracelso<sup>1</sup>, ~1500). Após a entrada de um composto tóxico no organismo, ele pode percorrer um caminho longo antes de atingir o órgão alvo e o local onde será posteriormente eliminado. O trajecto observado por cada composto a que o organismo é exposto passa por quatro etapas consecutivas<sup>[2]</sup>, nomeadamente absorção; distribuição; metabolismo e eliminação.

A Toxicologia (termo de origem grega, *Toxikon*, que significa “veneno das flechas”) corresponde, por isso, ao estudo dos compostos tóxicos e das intoxicações. É, no fundo, um ramo da ciência que sempre esteve intimamente ligada à vida da Humanidade<sup>[4,5]</sup>, levando o Homem uma busca contínua de uma forma de protecção e detecção dos “venenos”, antes e após o envenenamento<sup>[6]</sup>. Sendo a Toxicologia Moderna uma ciência multidisciplinar, divide-se nas mais diversas vertentes, dependendo do objectivo e da área de actuação<sup>[7]</sup>, de acordo com o esquema representado na Figura 1.3.

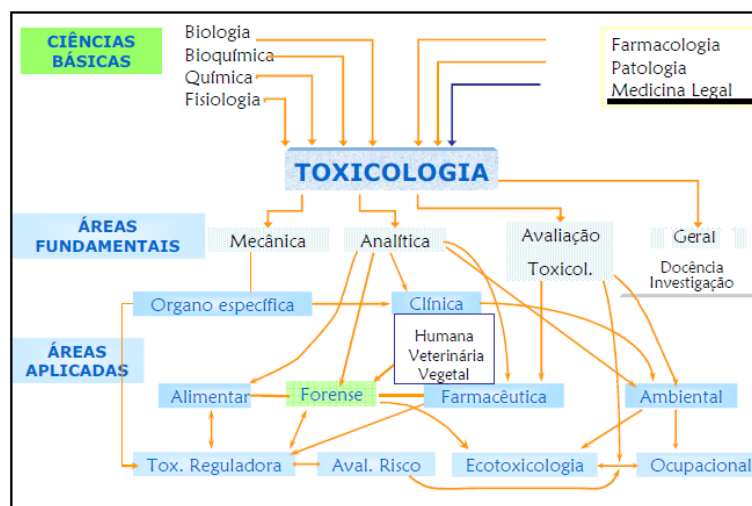
Neste sentido, a Toxicologia Forense tem por missão identificar, confirmar e quantificar a presença de qualquer substância, seja uma droga de abuso, um medicamento ou um outro tipo de substância, numa determinada amostra biológica, a partir de técnicas analíticas sensíveis que permitam uma interpretação criteriosa e adequada de cada análise<sup>[8]</sup>. A Toxicologia Forense utiliza actualmente conhecimentos adquiridos nas diversas áreas da Toxicologia Moderna, desenvolvendo-se, fundamentalmente, na área da Toxicologia Analítica, com a finalidade de contribuir para a resolução de questões judiciais. Devido à sua vasta área de acção, também pode incidir sobre o indivíduo vivo ou o cadáver bem como, quando aplicável, no âmbito do Direito do Trabalho e Ambiental<sup>[8]</sup>.

O STF-N, assegura, assim, a realização de perícias e exames laboratoriais químicos e toxicológicos<sup>[3]</sup>. Compete a este Serviço a realização de perícias e exames laboratoriais químicos e toxicológicos, quer no âmbito das actividades internas (Serviço de Patologia Forense e o Serviço de Clínica Forense), quer no âmbito das actividades externas (Delegações e Gabinete Médico-Legais que se encontrem na sua dependência, tribunais, forças policiais – GNR, PSP, PJ –, Autoridade Nacional de Segurança Rodoviária – ANSR–, entidades hospitalares e entidades particulares)<sup>[2]</sup>.

---

<sup>1</sup> Pseudónimo do médico, alquimista, físico e astrólogo suíço, de nome verdadeiro Phillipus Aureolus Theophrastus Bombastus von Hohenheim, nascido em 1493 e falecido em 1541. A sua doutrina baseava-se na consequência da visão cosmológica, teológica, filosofia natural e medicina à luz de analogias e correspondências entre o mundo exterior (macrocosmos) e as diferentes partes do organismo humano (microcosmos), sendo desta forma, considerado como o Pai da Medicina Hermética.

**Fonte:** Paracelso. 7 de Outubro de 2011. <http://pt.wikipedia.org/wiki/Paracelso> (Consultado a 10 de Outubro de 2011).



**Figura 1.3** Representação das diversas áreas que interagem com ramos da Toxicologia <sup>[2]</sup>.

Naturalmente, o STF-N deve assegurar que todas as perícias e exames laboratoriais sejam realizados em tempo útil, fornecendo os resultados com a maior brevidade e assegurando a sua divulgação dentro dos limites de tempo estabelecidos na Lei. Esta condição pressupõe que os métodos analíticos necessários para este efeito devam estar prontamente disponíveis, assim que solicitados. Para além disso, os dados resultantes dessas perícias e desses exames laboratoriais devem ser fiáveis, de forma a garantir a validade dos resultados fornecidos pelo Serviço. Esta fiabilidade está habitualmente associada à validação dos métodos analíticos utilizados neste contexto, através da verificação do cumprimento de diversos requisitos relativamente a diversos parâmetros analíticos.

De uma forma geral, qualquer análise toxicológica engloba três etapas fundamentais<sup>[9]</sup>: (i) detectar se uma amostra contém algum tipo de substância(s) nociva(s); (ii) identificar a(s) substância(s) envolvida(s); e (iii) determinar, quantitativamente, a(s) substância(s) envolvidas e interpretar os resultados, tendo em conta o objectivo da realização da análise<sup>[9]</sup>. Dependendo das circunstâncias e do propósito da análise, podem ser considerados dois tipos de abordagens: a procura directa, orientada para a pesquisa de um analito específico ou a sua classe, sendo que em alguns casos não é necessário a realização de qualquer tipo de tratamento à amostra como isolamento ou purificação<sup>[9,10]</sup>, e a procura indirecta (também designada por análise toxicológica sistemática), em que a pesquisa analítica é dirigida a uma potencial substância tóxica, cuja presença e identificação é desconhecida<sup>[9]</sup>.

Neste contexto, uma das necessidades do STF-N, prende-se com o desenvolvimento e a validação de uma metodologia analítica para a detecção de antidepressivos (ADs) em amostras biológicas, a identificação inequívoca dos ADs detectados e a sua quantificação. Esta necessidade surge no contexto da crescente utilização de ADs pela sociedade actual, o que tem levado ao aparecimento de dúvidas relativamente aos níveis destas drogas encontradas em amostras colhidas *in vivo* ou *post-mortem*. As informações procuradas habitualmente neste contexto são a identificação da presença de um dado AD e a diferenciação entre uma sobredosagem ou um uso terapêutico.

O desenvolvimento de uma metodologia analítica para a determinação de ADs assenta, por isso, em três pontos principais: (i) a escolha da amostra; (ii) a selecção do conjunto de ADs alvo; e (iii) a selecção da metodologia instrumental/técnica mais adequada, após os quais se torna necessária a implementação de procedimentos de validação da metodologia implementada. Estes aspectos são focados em detalhe de seguida.

### 1.3 Amostras em Toxicologia Forense

As amostras que chegam ao STF-N podem corresponder a colheitas *in vivo* ou *post-mortem*<sup>[11]</sup>. De uma forma geral, estas últimas acarretam alguns desafios adicionais, pelo facto das amostras disponíveis serem de natureza muito diversa e deverem adequar-se ao objectivo pretendido na investigação em causa, devendo considerar-se em cada caso o historial e o tipo de requerimentos pretendidos pelo patologista para realização da análise toxicológica<sup>[12]</sup>.

#### 1.3.1 Tipo de Amostras

Existe uma grande variedade de amostras que podem ser analisadas em toxicologia forense, incluindo tecidos ou fluidos biológicos. De uma forma geral, as amostras de maior relevância no contexto da investigação toxicológica são o sangue, a urina, o conteúdo gástrico e o fígado.

O sangue é a amostra primária em toxicologia forense *post-mortem*<sup>[13]</sup>, sendo uma das amostras com maior importância na identificação de compostos tóxicos, particularmente, quando se objectiva fazer uma análise quantitativa e uma interpretação correcta das concentrações de substâncias e respectivos metabolitos<sup>[12,14]</sup>, uma vez que os compostos tóxicos distribuem-se, pelo organismo, tipicamente através dos eritrócitos e

do plasma, encontrando-se unidos a proteínas, em proporções variáveis, consoante a natureza do tóxico<sup>[14,15]</sup>. Desta forma, este tipo de amostra (sob a forma de sangue total e plasma) é a mais representativa para uma análise toxicológica. De uma forma geral, tanto o plasma como o sangue total são amostras que apresentam vantagens para uma análise toxicológica, na medida em que o plasma garante um menor número de interferentes e pigmentos, prevenindo a formação de emulsões com os solventes orgânicos, situação frequente na manipulação de sangue total, e o sangue total assegura que tanto os compostos tóxicos ligados aos eritrócitos como os que se encontram ligados às proteínas estarão evidenciados na amostra a analisar<sup>[14]</sup>. Para além disso, a sua recolha não apresenta grandes dificuldades, como é do conhecimento geral (Figura 1.4).



**Figura 1.4** Amostras de Sangue.

A urina é também um fluído biológico de grande relevância para testes de toxicologia, uma vez que é constituído por mais de 99% de água e contém uma quantidade diminuta de substâncias endógenas que interferem com os testes cromatográficos ou de rastreio (*screening*)<sup>[13,14]</sup>. A acumulação de drogas e metabolitos na urina resulta, geralmente, em elevadas concentrações que facilitam a sua detecção<sup>[12]</sup>, podendo atingir concentrações 100 vezes superiores às no sangue<sup>[14]</sup>. No caso das drogas de abuso, esta é considerada a amostra de excelência, uma vez que é de fácil obtenção, em grandes quantidades e, geralmente, compreende concentrações de tóxico detectáveis, mesmo quando se trata de uma administração em doses terapêuticas<sup>[14]</sup>. Contudo, e apesar deste tipo de amostra ser isento de proteínas, minimizando as suas interferências aquando da sua análise<sup>[15]</sup>, apresenta como desvantagem a eliminação, quase na sua totalidade, de uma elevada quantidade de compostos tóxicos sob a forma de metabolitos, muitas das vezes comuns a várias substâncias, tornando-se, nestes casos, necessário recorrer a outro tipo de fluido ou tecido biológico para a análise do composto, para que seja possível uma identificação inequívoca do composto tóxico absorvido<sup>[14]</sup>.

Relativamente a amostras como o conteúdo gástrico/estomacal e o fígado, a sua importância para a Toxicologia Forense reside no facto de serem ricas em informações

sobre o composto tóxico numa análise toxicológica<sup>[14]</sup>. O primeiro fornece informações preciosas quando um agente tóxico é ingerido (Figura 1.5) e o segundo constitui o órgão primário de metabolização/transformação desse agente, apresentando o composto absorvido ou o(s) seu(s) metabolito(s) em concentrações elevadas. A utilização do fígado como amostra de eleição para uma análise toxicológica tem vindo a decrescer, uma vez que, com o desenvolvimento científico, as técnicas analíticas são cada vez mais sensíveis e permitem obter bons resultados com amostras de sangue<sup>[14]</sup>.



**Figura 1.5** Imagem simulada de conteúdo gástrico com medicamentos.

A realização de alguns estudos específicos implica, contudo, a recolha de outras amostras. Incluem-se aqui rins e pulmões (na determinação de pesticidas, como o paraquato), unhas e cabelo (em intoxicações crónicas por arsénio), humor vítreo<sup>2</sup> (na determinação de etanol e compostos tóxicos, em casos de putrefacção)<sup>[16]</sup>, bilis (em casos de sobredosagem por opiáceos), entre outras.

### 1.3.2 Conservação e Armazenamento das Amostras

A selecção adequada e a conservação e armazenamento correcto das amostras recolhidas para análise são requisitos imprescindíveis para uma determinação toxicológica, por forma a não invalidar todo o procedimento analítico.

De um modo geral, as amostras destinadas a uma perícia toxicológica não são, habitualmente, adicionadas de qualquer tipo de preservantes, de modo a evitar possíveis interferências ao nível da metodologia analítica provocada por estas substâncias. No entanto, e apesar de não existirem normas para a preservação específica de amostras em Toxicologia Forense, é apenas recomendado, como procedimento de rotina, a adição

---

<sup>2</sup> *Humor Vítreo*: substância gelatinosa e viscosa, incolor que preenche as câmaras oculares (cavidade do olho, entre a córnea e o cristalino).

de fluoreto de sódio a 1-5% às amostras de sangue *post-mortem*, para a determinação de etanol, cocaína, monóxido de carbono e cianetos<sup>[12]</sup>.

Todas as amostras devem ser colocadas em recipientes apropriados (tubos ou contentores de plástico), com tampas de poli(tetrafluoroetileno) (PTFE), polímero termoplástico que evidencia características hidrofóbicas e uma excelente resistência térmica (Figura 1.6). Estes devem ser de uso exclusivo, de modo a evitar contaminações, e devidamente etiquetados, com a informação de alguma particular exigência circunstancial que deva ser considerada aquando da manipulação das amostras<sup>[14]</sup>.



**Figura 1.6** Material utilizado para a recolha e armazenamento das amostras <sup>[17]</sup>.

Durante o acondicionamento de uma amostra biológica é necessário ter em conta que alguns compostos tóxicos, como a cocaína, metadona, morfina, paracetamol, benzodiazepinas, entre outros, podem decompor-se durante o seu armazenamento, a 4°C, o que impossibilitará a sua detecção analítica<sup>[14]</sup>. Existem ainda diversos factores que interferem na decomposição química e nos processos de putrefacção (tabela 1.1).

### 1.3.3 Cadeia de Custódia

O conhecimento do percurso de uma amostra constitui um elemento fulcral para uma correcta conduta de uma investigação toxicológica. Para este efeito, deve ser sempre respeitada a cadeia de custódia, que se define como sendo um processo que engloba um conjunto de normas usado para manter e documentar a história cronológica da amostra, de modo a garantir a idoneidade e a rastreabilidade das evidências utilizadas em processos judiciais<sup>[15,19]</sup>.

Para a garantia de uma recolha adequada das amostras, existem Kits específicos, que consistem num conjunto de tubos e bolsas plásticas opacas, que, juntamente com o documento de requisição toxicológica devidamente preenchido, são seladas e enviadas com a maior brevidade possível para o STF da respectiva Delegação (Figura 1.7).

**Tabela 1.1** Factores interferentes na decomposição química dos compostos tóxicos <sup>[14,18]</sup>.

Factores	Descrição da influência dos factores
Luz	<p>Algumas substâncias (alcalóides e fenotiazinas) tóxicas são fotolábeis (substâncias sensíveis à luz), o que implica que as amostras devem estar armazenadas num local protegido da luz.</p> <p>No caso de amostras de urina e soluções aquosas tóxicas (por exemplo, a metadona), que apresentam esta propriedade, é recomendável revestir os contentores com papel de alumínio.</p>
Oxidação	<p>Para os compostos facilmente oxidáveis (catecolaminas e tiobarbitúricos), os contentores devem estar completamente preenchidos pela amostra e devidamente fechados, evitando a oxidação dos compostos tóxicos por acção do oxigénio atmosférico.</p>
Hidrólise	<p>Muitos compostos tóxicos existentes são ésteres (como por exemplo, os anestésicos locais) que podem ser facilmente hidrolisáveis durante o processo de armazenamento à temperatura ambiente ou mesmo a baixas temperaturas, por intermédio das esterases presentes no sangue e nos tecidos biológicos. Quando as extracções são realizadas em meio alcalino podem conduzir à ocorrência de hidrólises. No caso da hidrólise dos ésteres, pode ocorrer uma reacção de redução, ao diminuir o pH das amostras a valores inferiores a 4.</p>
Temperatura	<p>A conservação das amostras destinadas à análise toxicológica é favorecida pelas temperaturas baixas, tornando-se desta forma recomendável o armazenamento das amostras a 4°C, sempre que a análise se realize num curto espaço de tempo. No caso de um armazenamento prolongado, as amostras devem ser acondicionadas a -20°C, tendo o cuidado de descongelar as amostras uma só vez aquando da análise. Durante o processo de congelação/descongelação pode ocorrer a redução de alguns metabolitos, que podem originar diferenças significativas entre a concentração inicial e a concentração obtida.</p>
Decomposição biológica	<p>A decomposição biológica consiste no efeito da actividade microbiana sobre alguns compostos tóxicos. Este efeito pode ter duas vertentes: destruição dos compostos tóxicos e putrefacção ou geração de substâncias como o etanol, que podem dificultar a interpretação do resultado analítico.</p>
Contaminação	<p><b>Contaminação provocada pela putrefacção:</b> Um caso típico é a produção de aminas putrefactivas que emergem nos tecidos biológicos, sangue e urina até cinco dias após a morte ou quando as amostras não são devidamente acondicionadas.</p> <p><b>Contaminação provocada pela contaminação do contentor da amostra:</b> Normalmente, são provenientes dos plastificantes (ftalatos) constituintes dos contentores e tampas, que podem contaminar as amostras. A contaminação também pode ser originada por impurezas existentes nos solventes aplicados no processo de extracção.</p>



**Figura 1.7** Diferenciação dos conjuntos de Kits existentes para a recolha de amostras <sup>[17]</sup>.

Existe ainda um conjunto adequado de processos a realizar desde a recepção das amostras até à emissão do resultado final, por forma a assegurar a cadeia de custódia<sup>[17]</sup>. No STF estes processos baseiam-se na reunião de uma série de documentos que certificam todos os trâmites de manuseio das amostras (preparação do recipiente colector, amostragem, transporte, recepção, armazenamento e conservação, análise e destruição), assim como a identificação das pessoas que intervieram em todo o processo<sup>[15,17]</sup>. Todos estes procedimentos são, em última instância, a prova de que as amostras se mantiveram intactas, não sofreram adulterações, mudanças, manuseamentos incorrectos ou foram colocadas em locais ou formas que possam comprometer a sua integridade, garantindo também a credibilidade da instituição e a confidencialidade<sup>[19]</sup>.

#### 1.3.4 Amostras representativas para antidepressivos

Considerando que todas as drogas são distribuídas pelo organismo imediatamente após a sua absorção, e que o sangue é o veículo utilizado para este efeito, esta amostra constitui uma boa selecção para a detecção de ADs, tanto em doses terapêuticas como em doses letais.

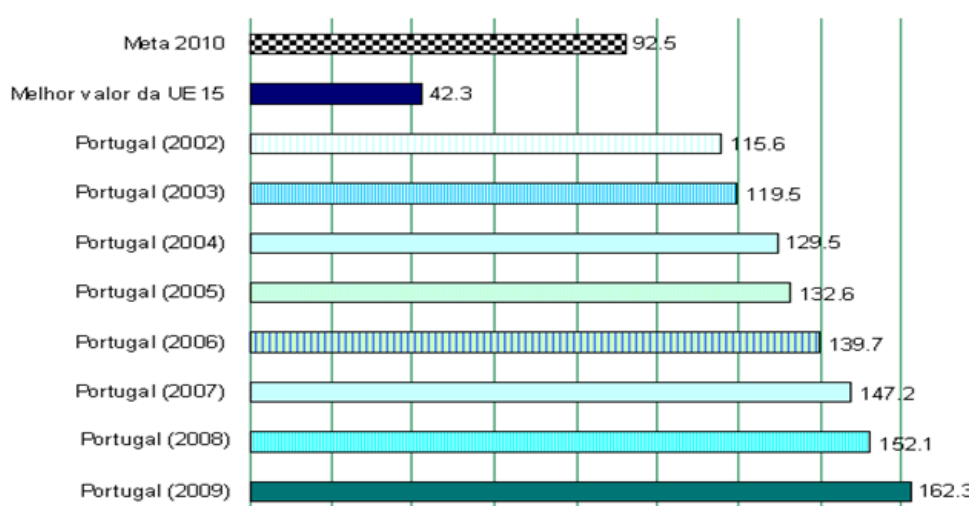
A escolha de sangue total para análise tem ainda a vantagem da sua fácil recolha, tanto em condições *post-mortem* como *in vivo*. Para além disso, as amostras detectadas no sangue não devem apresentar elevados níveis de “contaminação” por metabolitos, algo que dificultaria grandemente o procedimento analítico, uma vez que teria, de igual

forma, ser realizado o seu estudo. A existirem em concentrações significativas, estes metabolitos deveriam ser analisados conjuntamente com o AD que lhe deu origem, multiplicando assim o número de compostos a analisar simultaneamente.

## 1.4 Antidepressivos

Os ADs são compostos utilizados no tratamento de condições de depressão. A depressão é uma doença psiquiátrica bastante comum na actualidade, caracterizada por se manifestar ao nível do estado de humor do ser humano, nomeadamente, humor deprimido, perda de interesse e de prazer, sentimentos de culpa, baixa auto-estima, perturbações do sono e de apetite, cansaço e concentração reduzida. Estes problemas podem tornar-se crónicos ou recorrentes, contribuindo para deficiências substanciais na vida de um indivíduo a vários níveis: emocional, intelectual e social, podendo conduzir, em casos mais severos, ao suicídio<sup>[20]</sup>.

Os estudos relativamente ao consumo de ADs, entre o ano de 2002 e 2009, em Portugal, são escassos. Porém, os últimos indicadores revelam que o consumo de medicamentos ansiolíticos, hipnóticos, sedativos e ADs no mercado de Serviço Nacional de Saúde (SNS), em ambulatório, aumentou 40,4%, conforme demonstra a Figura 1.8. Este cenário contribuiu para que uma das principais metas estabelecidas no Plano Nacional de Saúde 2004/2010 fosse considerar a saúde mental como principal prioridade, tendo em vista, entre outros objectivos, a redução do consumo de ADs em cerca de 29% no ano de 2010<sup>[21]</sup>.



**Figura 1.8** Consumo de medicamentos ansiolíticos, hipnóticos, sedativos e antidepressivos no mercado do SNS em ambulatório (Dose Diária Definida/1000 habitantes/dia) <sup>[22]</sup>.

Existem inúmeros ADs disponíveis no mercado Português. De uma forma geral, a escolha do mais adequado a cada caso deve ter como fundamento algumas características como a particularidade da depressão, os efeitos secundários, o custo, as interacções medicamentosas, entre outras<sup>[23]</sup>. Todos os ADs possuem em comum a capacidade de aumentar intensamente a disponibilidade sináptica, de um ou mais neurotransmissores, através da acção em diversos receptores e enzimas específicos.

Segundo a Autoridade Nacional do Medicamento e Produto de Saúde, I.P. (Infarmed), a classificação mais adequada ao nível dos ADs fundamenta-se no neurotransmissor/receptor envolvido no seu mecanismo de actuação. Assim, as principais classes dos ADs são (i) os antidepressivos de primeira geração e (ii) os antidepressivos de segunda geração<sup>[24]</sup>.

#### **1.4.1 Antidepressivos de primeira geração**

Os ADs de primeira geração foram os primeiros a surgir na sociedade e incluem os ADs heterocíclicos (tricíclicos e tetracíclicos, ADTs), que são caracterizados através de uma estrutura cíclica (anéis benzénicos) ou de acordo com as propriedades farmacológicas<sup>[25]</sup>, e os inibidores da monoaminoxidase (IMAO).

##### **1.4.1.1 Antidepressivos Tricíclicos e afins**

Os ADTs são medicamentos cuja acção parece estar fundamentalmente relacionada com o bloqueio da captação neuronal dos neurotransmissores, levando a um aumento da noradrenalina, da serotonina e, em menor escala, da dopamina<sup>[26]</sup>. Estes compostos dividem-se em dois grandes grupos: as aminas terciárias (como a Amitriptilina, a Clomipramina, a Dotiepinina, a Imipramina e a Trimipramina) e as aminas secundárias (como a Nortriptilina)<sup>[25]</sup>. A Maprotilina, a Mirtazapina e a Mianserina são compostos que apresentam uma estrutura atípica à estrutura convencional dos antidepressivos tricíclicos, ou seja, é uma estrutura tetracíclica com características farmacológicas semelhantes aos antidepressivos tricíclicos que actua, particularmente, como inibidor selectivo da recaptção da norepinefrina (ISRN) com alguns efeitos de receptores histaminérgicos, adrenérgicos e colinérgicos<sup>[27]</sup>. Contudo, e de acordo com o Infarmed, estas substâncias pertencem à classe dos antidepressivos tricíclicos e afins.

O mecanismo de acção comum aos antidepressivos tricíclicos a nível pré-sináptico é o bloqueio da recaptção de monoaminas, principalmente norepinefrina e serotonina (5-hidroxitriptamina), em menor proporção de dopamina. As aminas terciárias inibem preferencialmente a recaptção de serotonina e secundárias a de norepinefrina<sup>[25]</sup>.

Os ADTs são compostos que permitem o bloqueio de receptores colinérgicos, histaminérgicos, serotoninérgicos e, mais invulgarmente, os dopaminérgicos. Contudo, estas acções não se correlacionam necessariamente com o efeito antidepressivo, mas sim com os efeitos colaterais<sup>[25]</sup>. Esta classe de compostos promove um aumento, acentuado, da eficiência da transmissão monoaminérgica, e possivelmente GABAérgica (sistema em que o ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor com actividade inibitória no SNC<sup>[28]</sup>), envolvendo os sistemas noradrenérgico e serotoninérgico através do bloqueio da recaptação de serotonina e norepinefrina, que origina o aumento da concentração sináptica destes neurotransmissores<sup>[25]</sup>.

Os ADTs são absorvidos completamente pelo tracto gastrointestinal, metabolizados em grande parte (55% a 80%) pelo efeito da primeira passagem, sendo o pico plasmático atingido mais rapidamente (1 a 3 horas) pelas aminas terciárias (como a Amitriptilina) do que pelas aminas secundárias (como a Nortriptilina) que levam 4 a 8 horas para atingi-lo. Trata-se de uma classe de medicamentos altamente lipofílica, que se concentra, principalmente, no miocárdio e nos tecidos cerebrais, e que se liga a proteínas plasmáticas, sofrendo, primariamente, metabolismo hepático<sup>[25]</sup>. Em média, o período de tempo para ocorrer o processo de eliminação varia (por exemplo, Imipramina de 4 a 34 horas; Amitriptilina de 10 a 46 horas; Clomipramina de 17 a 37 horas e a Nortriptilina de 13 a 88 horas) e atinge o estado de equilíbrio em cerca de 5 dias<sup>[25]</sup>.

#### **1.4.1.2 Inibidores da Monoaminoxidase**

Os IMAOs foram os primeiros fármacos que demonstraram ser, clinicamente, activos contra a depressão<sup>[26]</sup>. O mecanismo de acção destes medicamentos baseia-se, essencialmente, na inibição da monoaminoxidase (MAO), que provoca um aumento da concentração dos neurotransmissores a nível da fenda sináptica. Contudo, devido ao facto de todos os inibidores de MAO serem capazes de inibir numerosas enzimas e, em particular, as enzimas microssómicas hepáticas necessárias à metabolização de substâncias exógenas e de alguns fármacos, podem ocorrer diversas interacções com alimentos e medicamentos, incompatibilizando assim esta terapêutica<sup>[25]</sup>.

Devido aos efeitos colaterais indesejáveis causados pela inespecificidade da sua acção farmacológica, esta classe de ADs foi despromovida do tratamento como tratamento AD de primeira linha<sup>[25]</sup>. Em Portugal, o único representante deste grupo usado a nível clínico é a moclobemida, uma vez que se trata de um composto cuja especificidade/selectividade e riscos de interacções medicamentosas são praticamente inexistentes<sup>[26]</sup>. Este composto inibe apenas a MAO A, por um curto espaço de tempo (aproximadamente por apenas 24 horas) e de forma reversível<sup>[25]</sup>.

Os IMAOs são compostos, bem absorvidos pelo tracto gastrointestinal, que sofrem uma rápida biotransformação hepática por oxidação que pode, eventualmente, originar o aparecimento de metabolitos activos. O início de acção dá-se entre 7 a 10 dias, em determinados indivíduos, ou pode levar 4 a 8 semanas para atingir um efeito terapêutico pleno, e a eliminação, inclusive a dos metabolitos, ocorre ao nível dos rins<sup>[25]</sup>.

#### **1.4.2 Antidepressivos de segunda geração**

A procura recente de novos compostos, com variações na estrutura química e menos efeitos colaterais relativamente aos já existentes<sup>[23]</sup>, originou o aparecimento de novos grupos químicos de ADs. Incluem-se aqui os Inibidores Selectivos da Recaptação da Serotonina (ISRSs) e os Inibidores Selectivos da Recaptação da Serotonina e Noradrenalina (ISRSNs).

##### **1.4.2.1 Inibidores Selectivos da Recaptação da Serotonina**

Os ISRSs inibem de forma bastante selectiva a recaptação de serotonina, resultando numa potencialização da neurotransmissão serotoninérgica. Embora compartilhem o mecanismo de acção principal, estes compostos são estruturalmente distintos, uma vez que apresentam diferenças acentuadas ao nível do perfil farmacodinâmico e farmacocinético<sup>[26]</sup>. Esta classe de ADs, tal como todas as outras, possuem efeitos secundários. Porém, múltiplos ensaios clínicos confirmam que, de um modo geral, estes medicamentos demonstram ser os principais antidepressivos de primeira escolha no tratamento da depressão. Este facto evidencia-se através de características, como o seu tempo de latência e eficácia terapêutica, apresentarem semelhanças relativamente às mesmas características dos ADTs e de possuírem uma menor toxicidade e melhor tolerabilidade que os antidepressivos de primeira geração<sup>[26]</sup>.

Embora todos os ISRSs apresentem o mesmo mecanismo de actuação, as diferenças entre as estruturas moleculares fazem com que os diferentes compostos apresentem diversos perfis farmacocinéticos<sup>[25]</sup>. Todos os compostos desta classe de ADs apresentam uma elevada afinidade com as ligações proteicas, sendo o citalopram, o composto que apresenta menor afinidade com as proteínas. A fluoxetina é única que apresenta um metabolito com actividade clínica significativa, a norfluoxetina. O tempo de semi-vida prolongado da fluoxetina e da norfluoxetina, assim como o tempo necessário para atingir o estado de equilíbrio, demonstram, clinicamente, a maior latência para o início da acção antidepressiva<sup>[25]</sup>. Estes compostos são rapidamente absorvidos, ligam-se fortemente a proteínas plasmáticas e são metabolizados, primeiramente, pelo fígado e

podem comprometer o metabolismo de outras drogas metabolizadas através deste sistema<sup>[25]</sup>.

#### **1.4.2.2 Inibidores Selectivos da recaptção da Serotonina e Noradrenalina**

Este tipo de compostos são fármacos relativamente recentes, que, tal como os ISRSs, não possuem uma acção agonista sobre os receptores, pois a sua acção farmacológica limita-se a inibir, selectivamente, a recaptção de serotonina e noradrenalina. Desta forma, os ISRSNs são compostos que possuem um perfil farmacológico mais seguro e com menores efeitos adversos do que os ADs tricíclicos.

São exemplos destes compostos a venlafaxina e o seu metabolito activo (O-Desmetilvenlafaxina), compostos que apresentam fraca actividade como inibidores da recaptção de dopamina e da MAO e não apresentam afinidade por receptores adrenérgicos  $\alpha$ -1, receptores colanérgicos ou histamínicos<sup>[25]</sup>.

A venlafaxina é uma substância que rapidamente é absorvida, uma vez que a sua biodisponibilidade é de 45% e, quando ingerida juntamente com alimentos, retarda o fenómeno de absorção<sup>[25]</sup>. Esta substância sofre metabolização hepática com importante efeito de primeira passagem<sup>[25]</sup>, ou seja, a concentração desta substância, após a sua administração, é significativamente reduzida pelo fígado antes de atingir a circulação sanguínea.

#### **1.4.3 Conjunto de antidepressivos com interesse em Toxicologia Forense**

Segundo o STF-N, o conjunto de ADs que apresentam um interesse elevado para este Serviço são: Amitriptilina, Clomipramina, Dotiepina, N-Desmetilclomipramina, Imipramina, Maprotilina, Mianserina, Mirtazapina, Nortriptilina e Trimipramina (ADs Tricíclicos e afins), Citalopram, Fluoxetina, Paroxetina e Sertralina (ADs Inibidores selectivos da recaptção da serotonina) e Venlafaxina (ADs Inibidores selectivos da recaptção da serotonina e da noradrenalina). Estes compostos são representativos de todas as classes referidas anteriormente, com excepção dos IMAO, cuja utilização é francamente reduzida no tratamento da depressão. Aparentemente, este grupo de compostos inclui os ADs mais utilizados pela população portuguesa.

## 1.5 Técnicas Instrumentais em Toxicologia Forense

No presente trabalho, a grande diversidade de estruturas químicas dentro do grupo de ADs considerado, associada às baixas doses em que podem ser encontrados no sangue, exige o recurso a uma técnica capaz de fornecer resultados sensíveis para várias drogas em simultâneo (algumas destas quimicamente aparentadas) e que permita a confirmação inequívoca de cada estrutura química detectada na amostra de sangue. A técnica escolhida deve também oferecer garantias de que apresenta as condições técnicas adequadas à sua implementação em rotina, garantindo que os resultados obtidos são considerados válidos de acordo com os requisitos do Serviço.

De acordo com a experiência do STF-N, e considerando os métodos aí implementados para outras drogas, a técnica a escolher para a detecção e quantificação simultânea dos 15 ADs indicados anteriormente será a cromatografia gasosa (GC) acoplada à espectrometria de massa com detector triplo quadrupolo (MS/MS), associada a processos extractivos adequados. Este processo extractivo é aqui fundamental, dada a elevada complexidade da composição do sangue total, e o equipamento necessário encontra-se disponível no Serviço para este efeito (Figura 1.9).



**Figura 1.9** Cromatógrafo gasoso acoplado a um Espectrómetro de Massa com detector do tipo Triplo Quadrupolo (GC/MS/MS) <sup>[29]</sup>.

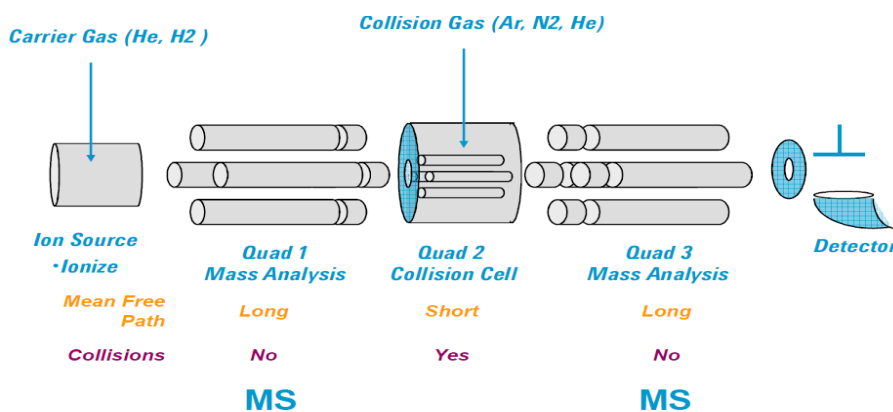
### 1.5.1 GC/MS/MS

O acoplamento de um cromatógrafo gasoso (GC) ao espectrómetro de massa (MS) resulta numa combinação das vantagens típicas das técnicas cromatográficas com as vantagens da espectrometria de massa, ou seja, combina a alta selectividade e eficiência de separação (Cromatografia) com a obtenção de informação estrutural, massa molar e um aumento adicional de selectividade (MS)<sup>[30]</sup>. Geralmente, a Ionização por Impacto Electrónico é o método de ionização mais utilizado ao nível da MS, uma vez que permite a produção, quer de iões moleculares, quer de fragmentos, que possibilitam a

determinação da massa molecular relativa e a estrutura molecular de um composto<sup>[31]</sup>. Hoje em dia, a MS é uma ferramenta analítica altamente sofisticada, que permite obter informações como a composição elementar das amostras, a estrutura molecular, a composição qualitativa e quantitativa de misturas complexas, entre outras<sup>[32]</sup>.

Actualmente, a GC acoplada à MS/MS é uma das técnicas mais vantajosas que fornece um método de detecção de compostos-alvo em matrizes complexas a níveis residuais, como amostras biológicas, metabolitos, vestígios de drogas e outros vestígios de provas forenses. Este método apresenta como vantagens um aumento na detectabilidade, uma redução da interferência espectral dos compostos presentes na matriz e um aumento da quantidade de informação estrutural possível de ser obtida<sup>[29,30]</sup>.

A espectrometria de massa em *tandem* (MS/MS) consiste numa técnica espectrométrica que, ao invés de utilizar apenas um analisador de massas para separar os iões com a mesma razão  $m/z$  gerados na fonte de ionização, utiliza dois estágios de espectrometria de massas, MS<sub>1</sub> e MS<sub>2</sub> (Figura 1.9). Um deles é utilizado para isolar o ião de interesse (ião-pai, também designado por ião-precursor) e o outro é usado para estabelecer uma relação entre este ião e os iões gerados a partir da sua decomposição induzida (iões-filho, também designados por iões-produto)<sup>[30]</sup>. Uma imagem representativa deste detector pode ser encontrada na Figura 1.10.



**Figura 1.10** Representação esquemática da técnica analítica GC/MS/MS<sup>[33]</sup>.

O analisador do tipo triplo quadrupolo é um instrumento constituído por três quadrupolos em série, sendo que o segundo quadrupolo não é utilizado para separar iões com a mesma razão  $m/z$ , mas sim como célula de colisão (CC), na qual ocorre a fragmentação dos iões seleccionados no primeiro quadrupolo (MS<sub>1</sub>), geralmente por dissociação induzida por colisão (CID, do inglês *Collision Induced Dissociation*) com um gás inerte de elevada energia (Árgon, Hélio ou Azoto) direccionando, paralelamente, os iões produzidos para o terceiro quadrupolo (MS<sub>2</sub>)<sup>[30]</sup>. A fragmentação dos iões provocada pela dissociação induzida por colisão torna o método mais vantajoso, no sentido em que

permite obter melhores informações estruturais, assim como melhorar a detectabilidade quando usada para gerar um íon característico de uma molécula<sup>[30]</sup>.

## 1.5.2 Técnicas de Varrimento em MS/MS

Para a obtenção de espectros de massa por MS/MS podem ser aplicadas diferentes técnicas de varrimento. Neste trabalho são apenas mencionadas as que apresentaram interesse analítico para os ADs, nomeadamente o Varrimento do íon precursor (*ion SCAN*), o Varrimento dos íões produzidos (*product ion SCAN*), e a Monitorização de íões seleccionados (*SIM*, do inglês *Selected Ion Monitoring*)<sup>[30]</sup>.

### 1.5.2.1 Varrimento do íon precursor (*ion SCAN*) ou Varrimento no modo *SCAN*

No triplo quadrupolo, este tipo de varrimento é realizado quando o  $MS_1$  é ajustado para transmitir um espectro de íões num intervalo de  $m/z$ , a partir do qual vai ser seleccionado o íon de interesse (íon precursor) para a realização do varrimento dos íões produzidos.

### 1.5.2.2 Varrimento dos íões produzidos (*product ion SCAN*) ou Varrimento no modo *SIM-SCAN*

Num espectrómetro de massas do tipo triplo quadrupolo, no primeiro estágio ( $MS_1$ ), o íon de interesse é isolado e, seguidamente, é fragmentado na célula de colisão. No segundo estágio ( $MS_2$ ) é realizado o varrimento dos íões produzidos através da fragmentação do íon de interesse isolado no  $MS_1$ , para obtenção do espectro de massa<sup>[30]</sup>.

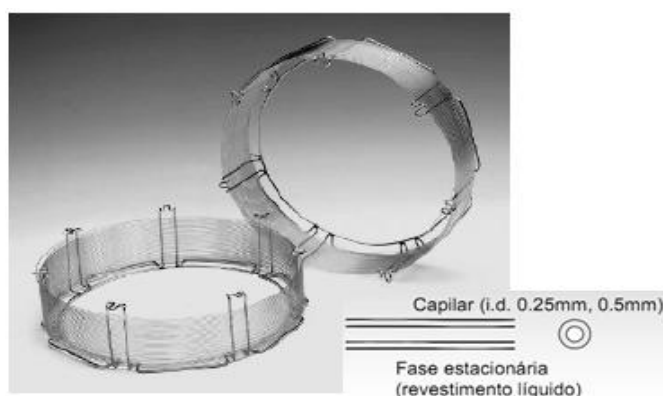
### 1.5.2.3 Monitorização de íões seleccionados (*SIM*) ou Varrimento no modo *SIM-SIM*

Este tipo de varrimento permite a ocorrência da monitorização da fragmentação de um íon precursor seleccionado no  $MS_1$  aos seus íões-produto correspondentes, que atravessam o  $MS_2$ . A aquisição dos resultados em modo *SIM* pode ocorrer através do ajuste do detector, de modo a observar-se apenas os íões de razão  $m/z$  de interesse ou através da selecção destes íões a partir de uma base de dados que contenha os espectros de massa completos<sup>[30]</sup>.

### 1.5.3 Condições cromatográficas gerais

Em GC, à semelhança de técnicas analíticas análogas, é utilizado como gás de arrastamento o Hélio, e uma vez tratando-se de uma técnica bastante desenvolvida, ainda contém um gás de colisão, o Árgon. Os gases usados são quimicamente inertes e livres de todos os vestígios de hidrocarbonetos, vapor de água e oxigénio, uma vez que estes podem provocar a deterioração da fase estacionária ou reduzir a sensibilidade dos detectores<sup>[32,34]</sup>.

A coluna cromatográfica utilizada foi do tipo capilar (Figura 1.11), a mais utilizada na actualidade para análises por GC. Estas colunas foram introduzidas nos primórdios dos anos 80 e vieram substituir as colunas de enchimento na maioria das aplicações<sup>[31]</sup>. São normalmente constituídas por sílica fundida ou um metal inerte e podem apresentar um diâmetro interno de 0,10 a 0,53 milímetros e um comprimento de 12 a 60 metros<sup>[35]</sup>. A fase estacionária consiste numa camada fina que está depositada sobre ou ligada ao interior da superfície da coluna<sup>[31]</sup>. Estas são colunas que permitem realizar análises menos demoradas, com maior sensibilidade e com uma eficiência na separação cromatográfica, uma vez que compreendem maiores comprimentos de coluna, permitem separar misturas complexas e têm maior durabilidade. O facto de admitirem uma menor quantidade de amostra, faz com que a sua capacidade de processamento de amostras seja inferior<sup>[35]</sup>. No entanto, a sua maior capacidade de separação e a melhoria da tecnologia de detecção (por exemplo, por espectrometria de massa), permite obviar esta questão.



**Figura 1.11** Colunas Capilares <sup>[34]</sup>.

A introdução da amostra é um ponto fulcral na cromatografia gasosa. Este “passo” que tem por objectivo a introdução completa da amostra, numa zona estreita do topo da coluna cromatográfica, de modo a evitar a admissão de efeitos como a discriminação dos componentes, causados pelas diferenças de volatilidade ou a degradação térmica. Os

sistemas de injeção mais importantes do ponto de vista experimental neste tipo de técnica são a injeção *split* e a injeção *splitless*<sup>[32]</sup>. Trata-se de dois tipos de injeção distintos, uma vez que a injeção *split* (injeção com repartição) consiste na introdução de uma pequena fracção de amostra, sendo a restante rejeitada; e a injeção *splitless* (injeção sem repartição) é uma técnica em que a amostra é injectada na coluna quase na sua totalidade<sup>[36]</sup>.

Nos equipamentos mais modernos de cromatografia gasosa, como é o caso do equipamento utilizado para o desenvolvimento deste trabalho (GC/MS/MS), estes dois tipos de sistemas de injeção, podem apresentar-se combinados num único sistema de injeção<sup>[31]</sup>, otimizando, desta forma, o modo de injeção das amostras no sistema.

#### 1.5.4 Processo Extractivo prévio

Mesmo com o desenvolvimento das técnicas analíticas, e consequente aumento da sensibilidade e da selectividade analítica, como é o caso da GC/MS/MS, amostras complexas como o sangue precisam de um pré-tratamento adequado (extração, pré-concentração e/ou purificação), com o intuito de reter todas as substâncias toxicologicamente relevantes e, ao mesmo tempo, eliminar todas as substâncias interferentes<sup>[9]</sup>. A complexidade dos compostos presentes nas amostras reais não permite, porém, concretizar este objectivo ideal para cada espécie em particular. Na prática, utilizam-se procedimentos sistemáticos por grupo de compostos com características físico-químicas semelhantes e aceita-se o melhor compromisso entre a eficiência do isolamento das substâncias-alvo e a sua taxa de recuperação, que deverá ser aceitável e compatível com a gama de trabalho desejada, com a remoção adequada de interferentes da matriz e com a abrangência de uma diversidade de substâncias<sup>[9]</sup>.

Ao longo dos tempos, a técnica extractiva tradicionalmente aplicada à investigação toxicológica foi a extração líquido-líquido (LLE, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*), uma vez que demonstrava ser adequada para um número substancial de casos. Contudo, este método extractivo evidenciava algumas lacunas, como a presença de interferências da matriz, a formação de emulsões, o uso de grandes volumes de solventes perigosos e de grandes quantidades de amostra<sup>[9]</sup>. Assim, em alternativa a esta técnica, surgiu, em 1970, a extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid-Phase Extraction*), uma técnica de ampla aplicação actual, que permite a extração e/ou pré-concentração de analitos em matrizes complexas<sup>[37]</sup>.

#### 1.5.4.1 Extracção em Fase Sólida

A Extracção em Fase Sólida (SPE) consiste num procedimento analítico de preparação de amostras que utiliza um material sólido para retenção de compostos específicos presentes numa determinada amostra<sup>[38]</sup>. Esta técnica baseia-se numa separação, de modo selectivo, de um ou mais componentes entre duas fases: uma fase sólida (adsorvente sólido) e uma fase, tipicamente, líquida (amostra), embora também possa ser uma emulsão, um gás ou um fluido supercrítico<sup>[39,40]</sup>. Os componentes de interesse podem ser adsorvidos, preferencialmente, para o sólido ou podem permanecer na fase líquida e, uma vez atingido o equilíbrio, as duas fases são, fisicamente, separáveis por decantação, filtração, centrifugação ou por um processo similar<sup>[40]</sup>.

No contexto das actividades do STF-N, os procedimentos extractivos por SPE são aplicados rotineiramente a amostras de urina e de sangue total. Estes procedimentos apresentam um conjunto de vantagens, nomeadamente:

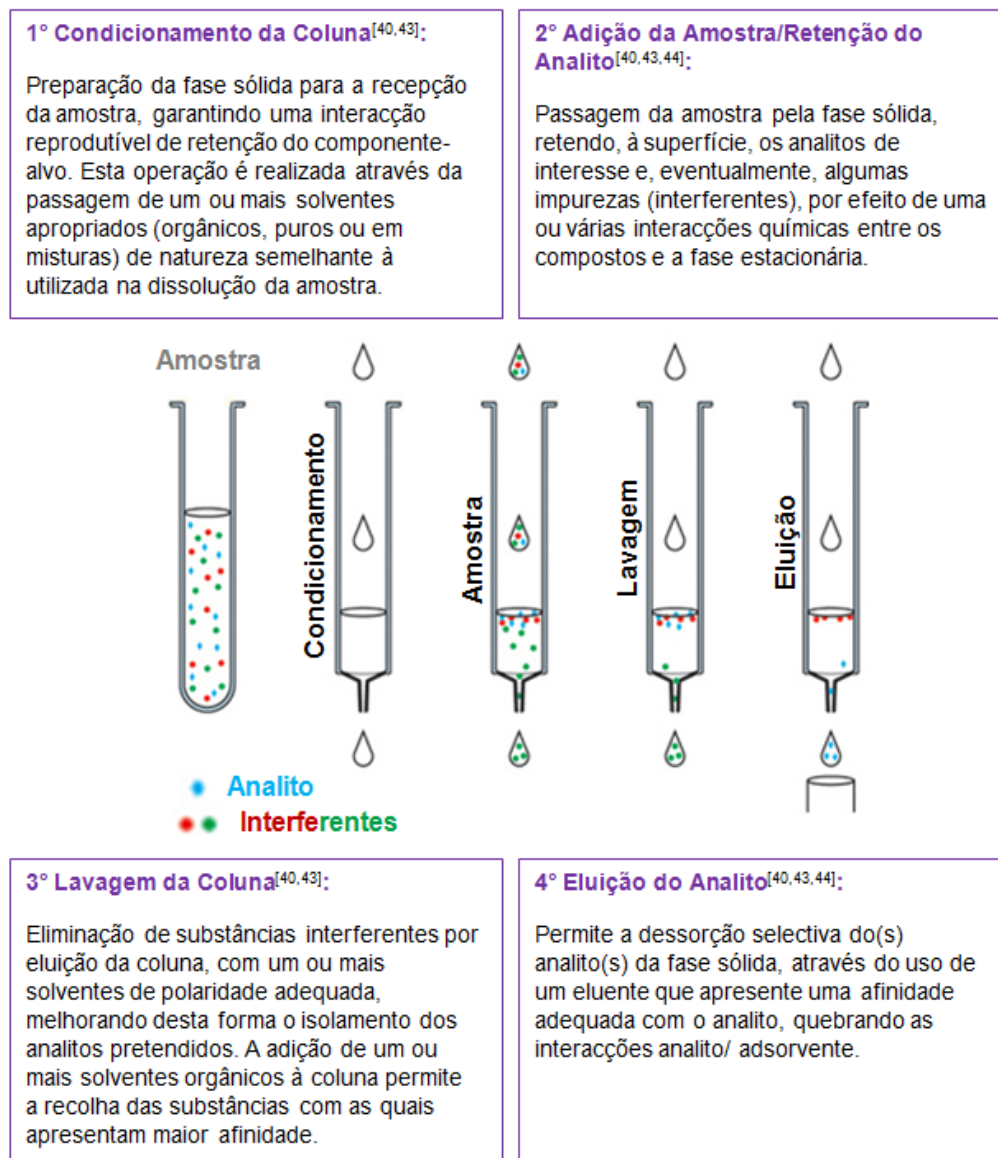
- ✓ Boa selectividade, permitindo a escolha do mecanismo de extracção mais adequado à análise, de acordo com a selecção do tipo de enchimento<sup>[40]</sup>;
- ✓ Baixo consumo de solventes orgânicos e, conseqüentemente, diminuição do volume de resíduos e da libertação de substâncias voláteis e perigosas ao ser humano<sup>[41]</sup>;
- ✓ Elevada reprodutibilidade<sup>[40,42]</sup>;
- ✓ Eficiência de extracção tipicamente elevada, com pequenas quantidades de amostra e possibilidade de automatização do processo com o intuito da manipulação programada de um elevado número de amostras<sup>[40,42]</sup>;
- ✓ Pouco morosa<sup>[40]</sup> e economicamente viável<sup>[42]</sup>.

O procedimento geral de SPE envolve, geralmente, quatro etapas: condicionamento da coluna, adição da amostra/retenção do analito, lavagem da coluna e eluição do analito<sup>[10,37]</sup>, representadas na Figura 1.12.

A SPE é uma técnica que sofreu um desenvolvimento ascendente proporcional à evolução dos materiais aplicados como fase sólida, representando uma mais-valia para este tipo de procedimento, existindo, actualmente, uma grande diversidade de suportes sólidos disponíveis no mercado. Em alternativa à sílica ou derivados da sílica, a aplicação de fases de natureza polimérica, para processos de isolamento de compostos como este, ostenta as seguintes vantagens:

- ✓ São estáveis numa gama alargada de pH, ampliando a abrangência quer de amostras de serem passíveis de ser utilizadas, quer de compostos passíveis de serem isolados;
- ✓ Apresentam boa selectividade comparativamente com a utilização da sílica, que poderia interagir com iões metálicos ou outras espécies catiónicas e, assim diminuir esta característica;

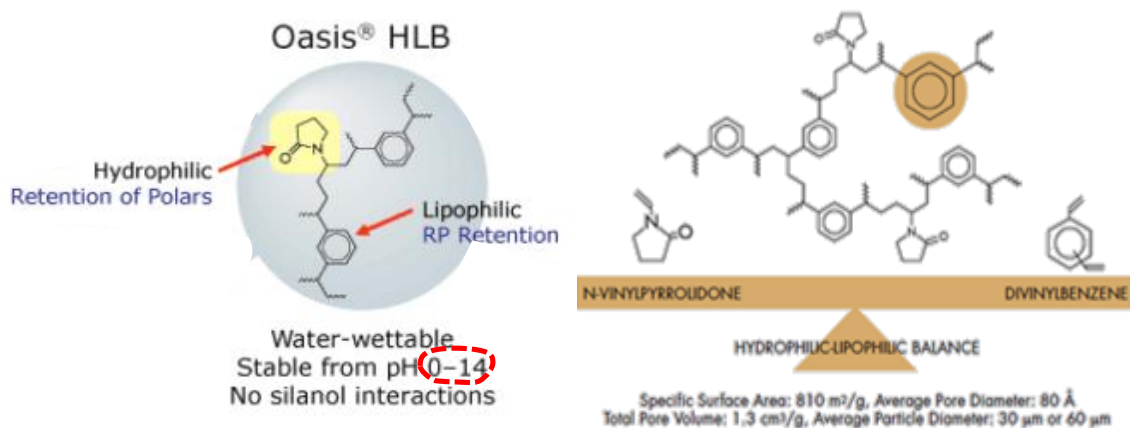
✓ Facultam a melhoria da estabilidade e da reprodutibilidade, uma vez que a forma regular da estrutura das partículas poliméricas apresenta-se mais estável do que a forma irregular das partículas de sílica<sup>[43]</sup>.



**Figura 1.12** Etapas envolvidas na extração em fase sólida.

A metodologia extractiva aplicada ao longo deste trabalho utilizou colunas Oasis<sup>®</sup> HLB (do inglês, **H**ydrophilic-**L**ipophilic-**B**alanced) da *Waters* (Figura 1.13), adequadas à retenção na fase sólida de espécies polares<sup>[45]</sup>, como é o caso dos ADs. A fase sólida destas colunas é constituída por um copolímero (Figura 1.13) de N-vinilpirrolidona (hidrofílico) e Divinilbenzeno (lipofílica), desenvolvido de forma a permitir um equilíbrio hidrofílico/lipofílico<sup>[46]</sup> capaz de extrair, quer substâncias alcalinas quer substâncias ácidas, por um procedimento de extração relativamente simples<sup>[47,48]</sup>. Os materiais da

fase sólida apresentam uma elevada resistência a pH's extremos (Figura 1.13), uma boa capacidade de retenção de compostos polares, e não apresentam efeitos negativos relativamente à secagem após a eluição dos analitos<sup>[45]</sup>.



**Figura 1.13** Representação do copolímero de N-vinilpirrolidona e Divinilbenzeno, constituinte da coluna Oasis<sup>®</sup> HLB <sup>[45]</sup>.

As colunas Oasis<sup>®</sup> HLB destinam-se a processos de SPE em fase reversa (fase estacionária apolar, com interações, analito/adsorvente, de *Van der Waals*) com adsorvente universal para compostos ácidos, básicos e neutros. A metodologia experimental aqui associada à pesquisa de vários compostos na mesma amostra deve ser o mais generalista, no sentido de abranger uma grande variedade de comportamentos exibidos pelos diversos analitos estudados.

## 1.6 Validação de um método analítico

Num laboratório é fundamental a existência de meios e critérios objectivos, que permitam evidenciar, através da validação, que os métodos internos de ensaio cumprem e transmitem resultados credíveis e adequados à qualidade exigida<sup>[49,50]</sup>. Um método de ensaio consiste num processo que envolve manipulações passíveis de acumulação de erros, sistemáticos e/ou aleatórios, que podem originar uma alteração significativa do valor do resultado final<sup>[50]</sup>. A validação de um método de ensaio consiste em demonstrar, através de evidências objectivas (determinadas a partir de amostras similares às amostras analisadas na rotina do laboratório), que ostenta os requisitos específicos para

a aplicação a que se destina<sup>[51,52]</sup>. Assim, o processo de validação deve ter em conta aspectos que visam a possibilidade de automatização, controlo de qualidade nas vertentes interna e externa, custo de análise, volume de amostra, bem como a satisfação dos requisitos ambientais, de higiene e de segurança<sup>[52]</sup>.

De forma a respeitar a sua objectividade, e de modo a comprovar a sua adequabilidade ao método, compete a cada laboratório implementar procedimentos internos de validação que permitam a verificação de requisitos essenciais para a aplicação dos procedimentos de ensaio às análises de rotina, sendo assim, recomendável a realização das seguintes etapas<sup>[51,52,53,54]</sup>: (i) definição de responsabilidades para a execução do procedimento de validação; (ii) desenvolvimento de um plano de validação; (iii) selecção do método analítico a validar de acordo com o objectivo; (iv) estudo do fundamento teórico do método; (v) estudo dos parâmetros de validação do ensaio; (vi) documentação pormenorizada do procedimento de validação, sob a forma de relatório; (vii) descrição e documentação pormenorizada do método, sob a forma de procedimento; (viii) *design* e documentação do procedimento de controlo de qualidade interno para o método validado; (ix) validação e aprovação dos documentos referidos acima; (x) e aplicação do método na rotina do laboratório<sup>[52]</sup>.

Em Toxicologia Forense, tal como noutras áreas analíticas, a fiabilidade dos resultados analíticos assume elevada importância, uma vez que estes constituem um pré-requisito para uma correcta interpretação do resultado analítico, nomeadamente, *in vivo* (em Clínica Forense e na acção de fiscalização do estado de influenciado, no âmbito do Código da Estrada) e *post-mortem* (Patologia Forense)<sup>[55]</sup>. Porque o desenvolvimento e a validação de um método analítico é, inevitavelmente, um processo moroso e com elevados custos associados, compete ao laboratório caracterizar os parâmetros relevantes à validação de cada método específico, os quais dependem das características do ensaio (quantitativo ou qualitativo), do tipo e complexidade da amostra, de ensaios interlaboratoriais realizados ou da experiência que o laboratório apresenta relativamente ao desempenho do método<sup>[56]</sup>.

No STF-N, o procedimento técnico de validação de ensaios<sup>[52]</sup> aplicado baseia-se num conjunto de normas e guias, desenvolvidos por entidades como a EUROCHEM, a ISO, a ICH, a TIAFT, a SOFT entre outras, que auxiliam na definição de critérios de aceitação e na avaliação dos procedimentos aplicados em Toxicologia Forense. A validação da metodologia analítica desenvolvida no STF-N foi orientada de acordo com o procedimento de validação aí implementado, no qual constava o estudo de parâmetros considerados importantes para uma avaliação profunda do ensaio<sup>[52]</sup>. Incluíram-se aqui (i) Especificidade/Selectividade; (ii) Capacidade de Identificação; (iii) Eficiência da Extração; (iv) Limites de Detecção e de Quantificação; (v) Linearidade; (vi) Gama de

trabalho; (vii) Exactidão: Precisão (Repetibilidade, Precisão Intermédia e Reprodutibilidade), Veracidade e Incerteza da medição; (viii) Robustez; e (ix) Arrastamento (*Carryover*).

### **1.6.1 Especificidade/Selectividade e Capacidade de Identificação**

Os termos selectividade e especificidade são frequentemente usados indistintamente ou de forma errada, especialmente na área dos métodos cromatográficos, que são dos poucos métodos analíticos que podem ser considerados verdadeiramente específicos. Deste modo, torna-se relevante explicitar as diferenças entre estes dois conceitos<sup>[49,54]</sup>.

Uma definição pragmática de selectividade consiste na capacidade para separar, fisicamente, as substâncias de uma mistura recorrendo, por exemplo, a técnicas de cromatografia<sup>[54]</sup>. Aboul-Enein aponta que o analista deve promover a selectividade máxima nos métodos analíticos e propõe, na área da cromatografia, que a selectividade seja verificada a dois níveis: selectividade da detecção e selectividade da separação<sup>[57,58]</sup>. Na primeira terminologia (selectividade da detecção), a selectividade é influenciada por processos que ocorrem em condições específicas no detector, como é o caso da existência de interferências de compostos. Relativamente à selectividade da separação, esta é estudada através das interacções que surgem entre o analito e as fases móvel e estacionária, sendo que estas podem ser influenciadas pelas variações na composição destas duas fases, assim como por possíveis interferências que possam promover uma mudança ao nível do sistema de separação<sup>[57,58]</sup>.

Segundo Enein (2000) e Ermer (2001), num processo de validação, a especificidade pode ser descrita como a capacidade do método determinar, inequívoca e individualmente, um analito na presença de outros componentes cuja presença seja expectável (como por exemplo: constituintes da matriz, impurezas, metabolitos, produtos de degradação, entre outros)<sup>[54,56,57]</sup>. A aplicação de técnicas de confirmação é aqui muito útil, no sentido em que permite verificar a identidade e a quantidade de analito em análise. Para a consolidação da segurança de uma técnica analítica aplica-se o estudo da capacidade de identificação, que tem por objectivo a demonstração da autenticação do analito a determinar<sup>[56]</sup>.

### **1.6.2 Eficiência de extracção do analito**

Nas metodologias analíticas baseadas na cromatografia, aplicáveis no âmbito da Toxicologia Forense, torna-se necessária a aplicação de uma fase extractiva para cada

analito, cuja eficiência é fundamental conhecer, de forma a ser possível avaliar as perdas do analito ao longo desta fase.

Para a avaliação deste parâmetro, o modelo experimental representa-se através da seguinte equação:

$$\% \text{recuperação}_{\text{do analito}} (\text{método}_{\text{extractivo}}) = \frac{\left( \frac{A_{\text{Analito}}(\text{Antes}_{\text{da}}_{\text{Extracção}})}{A_{\text{Padrão\_Interno}}(\text{Antes}_{\text{da}}_{\text{Extracção}})} \right)}{\left( \frac{A_{\text{Analito}}(\text{Depois}_{\text{da}}_{\text{Extracção}})}{A_{\text{Padrão\_Interno}}(\text{Antes}_{\text{da}}_{\text{Extracção}})} \right)} \times 100$$

onde:

$A_{\text{(Analito)}}$  - Área do analito

$A_{\text{(Padrão interno)}}$  - Área do padrão interno

$\left( \frac{A_{\text{Analito}}(\text{Antes}_{\text{da}}_{\text{Extracção}})}{A_{\text{Padrão\_Interno}}(\text{Antes}_{\text{da}}_{\text{Extracção}})} \right)$  - Razão das áreas das amostras brancas fortificadas antes do procedimento extractivo.

$\left( \frac{A_{\text{Analito}}(\text{Depois}_{\text{da}}_{\text{Extracção}})}{A_{\text{Padrão\_Interno}}(\text{Antes}_{\text{da}}_{\text{Extracção}})} \right)$  - Razão entre a área do analito com a amostra fortificada após o procedimento extractivo e a área do padrão-interno com a amostra fortificada antes do procedimento extractivo.

**Equação 1.1** Recuperação Extractiva do Analito <sup>[52]</sup>.

### 1.6.3 Limites de Detecção e Quantificação

Quando se pretende analisar amostras com baixos níveis de analito é importante saber qual o seu menor valor de concentração, ou de outra propriedade, de forma a que seja possível a sua detecção através do método analítico<sup>[49]</sup>. Desta forma, durante a concretização da validação do método, o limite de detecção permite apenas estabelecer um limite inferior da gama de operação prática do método<sup>[59]</sup>. Este parâmetro é, então, definido como sendo a quantidade mínima de analito presente numa amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificável como um valor exacto<sup>[56,59,60]</sup>.

$$LD = \frac{(3,3 \times S_{y/x})}{b}$$

onde:

$S_{y/x}$  - Desvio padrão residual da curva de calibração

$b$  - Declive da recta (sensibilidade)

**Equação 1.2** Limite de Detecção (LD) <sup>[61]</sup>.

O limite de quantificação (LQ) corresponde à concentração mínima do analito numa amostra que pode ser determinada com exactidão (precisão, veracidade e incerteza da medição) aceitável<sup>[49,56,60,62]</sup> (Equação 1.3).

$$LQ = \frac{(10 \times S_{y/x})}{b}$$

onde:  
 $S_{y/x}$  - Desvio padrão residual da curva de calibração  
b - Declive da recta (sensibilidade)

**Equação 1.3** Limite de Quantificação (LQ) <sup>[61]</sup>.

#### 1.6.4 Linearidade e Gama de Trabalho

A linearidade de um método analítico define-se como sendo a capacidade do método de, dentro de uma determinada gama de concentrações, obter sinais analíticos directamente proporcionais à concentração do analito na amostra<sup>[60,63]</sup>.

A gama de trabalho, ou gama dinâmica, de um dado método corresponde ao intervalo de concentrações em que se verifica essa resposta linear, apresentando um limite mínimo e um limite máximo (Figura 1.14). No limite mínimo da gama de concentrações, os factores limitantes são os valores dos limiares de detecção e/ou quantificação<sup>[56]</sup>, apesar de, em determinadas situações, estes factores serem os valores de referência correspondentes à concentração mínima da gama terapêutica. No limite máximo, a gama de concentrações corresponde, normalmente, ao limite de linearidade. Contudo, este limiar dependerá de vários factores, de acordo com o modo de resposta do instrumento<sup>[56]</sup>, assim como também poderá depender das necessidades inerentes à legislação ou normas.

A maioria dos equipamentos de detecção existentes estabelece a sua faixa dinâmica linear. Desta forma, torna-se necessário verificar até que ponto a gama de concentrações do analito coincide com a faixa dinâmica linear e, assim, assegurar que nenhum outro fenómeno tenha impacto indesejável na resposta do método<sup>[49]</sup>.

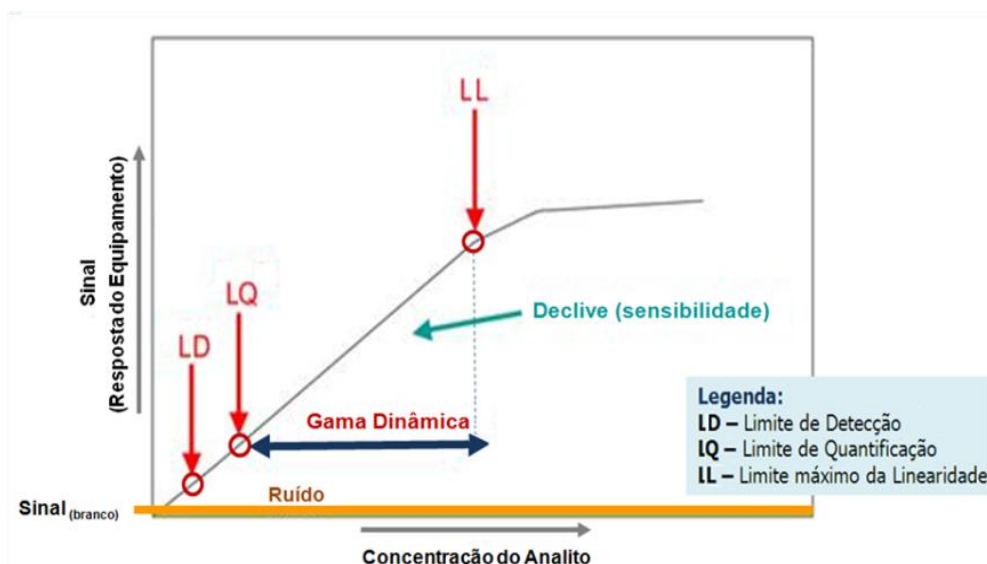


Figura 1.14 Gama Dinâmica de uma resposta analítica <sup>[64]</sup>.

A quantificação requer que se conheça a relação entre a resposta medida e a concentração do analito, expressa na Equação 1.4. Especialmente em técnicas de cromatografia gasosa, como GC/MS/MS, é frequente a adição de uma quantidade fixa de um padrão (padrão interno, PI) que tem por fim a comparação relativa com o analito, sem interferir com a resposta do mesmo. Este procedimento elimina as flutuações inerentes ao processo experimental, como erros ou alterações no volume de amostra injectado, variações na resposta do detector, e alterações da coluna cromatográfica (não muito significativas) que possam ocorrer ao longo de toda a análise<sup>[65]</sup>. Atenua, ainda, os efeitos causados pela matriz, originando, por isso, resultados mais exactos e precisos, sem evidência de erros sistemáticos.

O PI utilizado deve perfazer um conjunto de requisitos. Incluem-se aqui vários aspectos, como (i) não estar presente na amostra<sup>[63]</sup>; (ii) possuir um tempo de retenção próximo do analito<sup>[63]</sup>; (iii) ser detectável, estável e quantificável sob as mesmas condições de análise<sup>[63]</sup>; e (iv) ser quimicamente similar ao analito, de modo a não interferir com a amostra ou coeluir com os componentes que a constituem<sup>[63]</sup>. Relativamente a fenómenos de coeluição, é importante referir que este problema não se coloca na técnica utilizada neste trabalho. A utilização de MS como sistema de detecção permite a identificação dos compostos coeluídos através da monitorização dos sinais analíticos correspondentes aos iões-diagnóstico de cada composto, entendendo-se como iões-diagnóstico aqueles que no espectro de massa contribuem para a identificação inequívoca do composto que lhes deu origem.

$$y = ax + b$$

onde:  
 $y$  – Resposta medida (área do pico)  
 $x$  – Concentração do analito  
 $a$  – inclinação da curva de calibração = sensibilidade  
 $b$  – ordenada na origem

**Equação 1.4** Equação da recta <sup>[49]</sup>.

No STF-N, tal como indicam as boas práticas laboratoriais, são utilizados como PI compostos deuterados incluídos no grupo de substâncias que se pretende estudar. Estes podem exibir propriedades particulares, como efeitos isotópicos na cinética da reacção química e diferentes propriedades físicas entre hidrogénios análogos<sup>[66]</sup>.

A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados experimentais em função da concentração do analito ou então através do modelo de regressão linear simples, determinada a partir do método dos mínimos quadrados<sup>[49]</sup>. O método dos Mínimos Quadrados é uma técnica matemática de optimização que procura encontrar o melhor ajuste para um conjunto de dados, de forma a minimizar a soma dos quadrados das diferenças (valores residuais) entre o valor estimado e os dados obtidos. Este ajuste obriga a que o factor imprevisível (erro) seja distribuído aleatoriamente, ou seja, de modo a que se verifique uma distribuição normal (distribuição Gaussiana)<sup>[67]</sup> e independente.

A confirmação da existência de uma relação linear pode ser efectuada através da análise do coeficiente de correlação linear ( $r^2$ ), devendo apresentar um valor superior a 0,99<sup>[52]</sup>. Este método pode ser considerado livre de tendências (*unbiased*), ou seja, livre da combinação de erros aleatórios e sistemáticos, desde que o intervalo de confiança da recta da regressão linear englobe a origem<sup>[49,63]</sup>, uma vez que a intercepção na origem deve incluir o valor zero para um grau de confiança de 95%<sup>[52]</sup>. Este estudo pode, também, ser efectuada através de uma avaliação estatística, a partir de um conjunto de pares de valores ordenados onde é calculada a função de calibração linear (norma ISO 8466-1 para modelos lineares) e a função de calibração não linear (norma ISO 8466-2 para modelos polinomiais de 2º grau), bem como os respectivos desvios padrão residuais ( $S_{y/x}$  para a função linear e  $S_{y^2}$  para a função não linear). A relação entre estas duas funções pode, então, ser avaliada através da diferença de variâncias (Equação 1.5) e subsequente comparação do valor teste (PG, Equação 1.6) com o valor tabelado da distribuição *F* de Fisher para  $n-1$  graus de liberdade e um nível de confiança de 95%<sup>[50,52]</sup>. Para valores de  $PG \leq F$ , a regressão não linear não conduz a um ajuste

significativamente melhor, logo a função de calibração é linear<sup>[50,52]</sup>, enquanto para  $PG > F$ , a função de calibração é não linear, devendo ser avaliada a possibilidade de reduzir a gama de trabalho e o teste de linearidade repetido<sup>[50,52]</sup>.

$$DS^2 = (N - 2).S_{y/x}^2 - (N - 3).S_{y^2}^2$$

onde:

$DS^2$  – Diferença de variâncias

$N$  – Número de padrões de calibração

$S_{y/x}^2$  – Variância da função linear

$S_{y^2}^2$  – Variância da função não linear

**Equação 1.5** Diferença de Variâncias ( $DS^2$ )<sup>[50]</sup>.

$$PG = \frac{DS^2}{S_{y^2}^2}$$

onde:

$PG$  – valor teste

$DS^2$  – Diferença de variâncias

$S_{y^2}^2$  – Variância da função não linear

**Equação 1.6** Valor teste ( $PG$ )<sup>[50]</sup>.

### 1.6.5 Exactidão

A Exactidão (Figura 1.15) relaciona-se com a Precisão (Fidelidade) e a Veracidade (Justeza), tal como indicado na Figura 1.15<sup>[62,68]</sup>. A Exactidão corresponde à expressão da influência da Precisão e da Veracidade no resultado analítico, sendo que, quanto melhor a performance do ensaio nestes dois parâmetros, melhor será a exactidão, e conseqüentemente, menor será a incerteza<sup>[68]</sup>. A Veracidade de um método analítico define-se como sendo o grau de concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceite como convencionalmente verdadeiro<sup>[49,68]</sup>. Quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, implica uma combinação de erros aleatórios e sistemáticos (tendência ou, em inglês, *bias*)<sup>[49,68]</sup>. A Precisão (descrita abaixo com mais pormenor) de um dado método analítico avalia o grau de concordância entre uma série de medições obtidas a partir de uma mesma amostra homogénea, de acordo com determinadas condições definidas que caracterizam o tipo de previsão avaliada<sup>[62,67]</sup>.

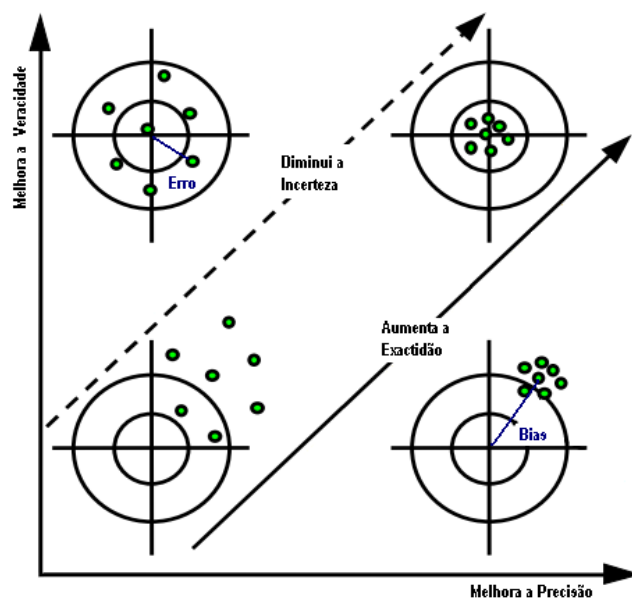


Figura 1.15 Relação entre Exactidão, Precisão e Veracidade <sup>[68]</sup>.

### 1.6.5.1 Precisão

A Precisão, designada por Fidelidade segundo o Guia ISO/IEC 99:2007 (VIM), pode ser considerada a três níveis: repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade, sendo que para o seu estudo devem ser utilizadas amostras autênticas e homogêneas. Nos casos em que isto não é possível, este parâmetro poderá ser avaliado com recurso a amostras preparadas no mesmo tipo de matriz ou a partir de soluções<sup>[62,67]</sup>. A precisão expressa-se sob a forma de variância, desvio padrão ou coeficiente de variação, sendo estudada em condições específicas para cada um dos níveis referidos anteriormente<sup>[60,61,62]</sup>.

Segundo o VIM, a repetibilidade, num laboratório, refere-se à precisão avaliada em condições de medição idênticas, ou seja, análises efectuadas pelo mesmo operador, procedimento de medição, condições operativas e localização, sistemas de medição e, a partir de medições repetidas no mesmo objecto ou objectos similares, durante um curto intervalo de tempo.

A precisão intermédia refere-se ao estudo intra-laboratorial da precisão avaliada segundo um conjunto de condições de medição que incluem o mesmo procedimento de medição, no mesmo local e com medições repetidas do mesmo objecto ou objectos similares, durante um intervalo de tempo alargado, mas que pode incluir outras condições que se fazem variar, nomeadamente, novas calibrações, padrões, operadores, sistemas de medição, bem como diferentes equipamentos extractivos<sup>[62]</sup>.

Relativamente à avaliação da precisão em condições de reprodutibilidade, a técnica é aplicada noutro laboratório e a precisão define-se como sendo o grau de concordância

entre os resultados das medições de um mesmo mensurando, efectuadas sob variação de algumas condições de medição (diferentes laboratórios, operadores e sistemas de medição e com medições repetidas no mesmo objecto ou objectos similares)<sup>[49]</sup>. Estas metodologias descritas devem ser entendidas como recomendações, devendo-se optar pelas metodologias que melhor se adaptam às particularidades de cada ensaio.

A precisão intermédia e a repetibilidade (com o respectivo limite) podem, garantidas as condições específicas, ser determinadas por diferentes abordagens<sup>[62]</sup>. O modelo da norma ISO 5725 e a análise de variâncias através da ferramenta estatística ANOVA<sup>[69]</sup> permitem obter os valores de repetibilidade e o seu limite, assim como os valores da precisão intermédia. Contudo, para o estudo da precisão intermédia através da aplicação da norma ISO 5725 é exigido um alargado período de tempo para a recolha de todos os dados, ou seja, esta norma implica que, para todos os compostos, seja efectuado o estudo de 10 sub-gamas, num número estatisticamente aceitável. Para a aplicação da ferramenta estatística ANOVA também estão associados alguns constrangimentos, uma vez que esta abordagem requer um conjunto de condições como diferentes operadores, diferentes equipamentos e diferentes sistemas de medição. Justifica-se assim, o estudo da precisão em condições idênticas às existentes em ambiente de rotina no início da vida útil de um procedimento de ensaio no STF-N, nomeadamente, condições de repetibilidade (um operador e duas réplicas)<sup>[52]</sup>.

Desta forma, a estimativa deste parâmetro foi efectuada pela avaliação da precisão em condições de repetibilidade ( $s_r$ ) através do estudo do comportamento do coeficiente de variação, em dois níveis de calibração representativos da gama de trabalho. O coeficiente de variação de repetibilidade ( $CV_r$ , usualmente expresso em %), para cada sub-gama pode ser determinado a partir da Equação 1.7.

$$s_r = \sqrt{\frac{1}{2t} \times \sum_{j=1}^t (y_{j1} - y_{j2})^2}$$

onde:  
t - Número de amostras analisada  
 $y_{j1}$  - Valor obtido para a alíquota 1  
 $y_{j2}$  - Valor obtido para a alíquota 2

**Equação 1.7** Desvio-padrão da Repetibilidade <sup>[49,62]</sup>.

$$CV_r(\%) = \frac{s_r}{\bar{X}} \times 100$$

onde:

$\bar{X}$  – Média dos valores das amostras para cada sub-gama

$s_r$  – Desvio-padrão obtido da repetibilidade (Equação 1.7)

**Equação 1.8** Coeficiente de Variação da Repetibilidade <sup>[49,62]</sup>.

A estimativa do desvio-padrão da repetibilidade,  $s_r$ , pode ser usada para o cálculo do respectivo limite que deverá ser usado como critério de aceitação de um resultado médio obtido através da execução do procedimento de ensaio para as duas réplicas analisadas<sup>[50]</sup>. O limite de repetibilidade representa a diferença absoluta entre dois resultados obtidos em condições de repetibilidade. Para ensaios com duplicados, com um intervalo de confiança de 95%, a ISO 5725-6 propõe uma forma simples para a determinação do limite de repetibilidade,  $r$ , através da seguinte equação:

$$r = 2,8 \times s_r$$

onde:

$f(n=2) = 2,8$  (Factor de gama crítico para o intervalo de confiança de 95%)<sup>[67]</sup>;

$s_r$  - Desvio-padrão da repetibilidade (Equação 1.7).

**Equação 1.9** Limite de Repetibilidade ( $r$ ) <sup>[50]</sup>.

### 1.6.5.2 Veracidade

A veracidade pode ser expressa quantitativamente através do erro de veracidade que pode abranger vários níveis do sistema analítico, nomeadamente, as séries analíticas, o laboratório e o método analítico. Quanto menor o erro de veracidade maior será a veracidade da medição<sup>[52]</sup>.

Após a validação e a implementação do ensaio na rotina do laboratório, a veracidade deve ser monitorizada regularmente. Desta forma, o estudo deste parâmetro pode ser efectuado simultaneamente com a análise de amostras de rotina funcionando neste caso como mecanismo de controlo interno de qualidade.

A avaliação do erro de veracidade pode ser efectuada a partir da análise do uso de Materiais de Referência Certificados (MRC)<sup>[49]</sup>, através da análise de materiais de referência (materiais caracterizados pelo produtor, não acompanhados pela respectiva

determinação da incerteza; materiais caracterizados no laboratório ou materiais provenientes de ensaios inter-laboratoriais) ou a partir de ensaios de recuperação<sup>[52]</sup>.

Na ausência dos MRCs e dos materiais de referência, o erro de veracidade pode ser avaliado através de ensaios de recuperação em amostras brancas e amostras fortificadas, com o intuito de investigar a existência de erros sistemáticos e de definir factores de correcção<sup>[52]</sup>. Quando a veracidade do método é avaliada através da análise de amostras sem o analito nativo, às quais foi previamente adicionada uma quantidade conhecida de analito, a recuperação média,  $\bar{R}_m$ , do método pode ser determinada através da Equação 1.10.

$$\bar{R}_m = \frac{\bar{C}_{obs}}{C_{fortificada}}$$

onde:

$\bar{C}_{obs}$  – Concentração média de uma série de análises de amostras fortificadas (ng/mL);

$C_{fortificada}$  – Concentração da amostra fortificada (ng/mL).

**Equação 1.10** Recuperação média do método <sup>[52]</sup>.

### 1.6.5.3 Incerteza da Medição

A Incerteza da medição é um parâmetro associado ao resultado de uma medição de uma determinada grandeza, que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos à mensuranda a partir das informações usadas<sup>[62]</sup>. De acordo com o Guia para a Quantificação da Incerteza em Ensaios Químicos (IPAC)<sup>[70]</sup>, para a quantificação da incerteza da medição são, vulgarmente, aplicáveis as seguintes abordagens:

- ✓ Abordagem “passo a passo”, “componente a componente”, ou seja, subanalítica;
- ✓ Abordagem baseada em informação interlaboratorial;
- ✓ Abordagem baseada em dados da validação e/ou controlo da qualidade do método analítico recolhidos em ambiente intralaboratorial.

Quando possível, o laboratório pode utilizar resultados de ensaios interlaboratoriais (EILs), com o intuito de estimar a incerteza associada aos resultados reportados. Uma vez participando em ensaios interlaboratoriais, em que é usado o mesmo método analítico pelos vários participantes, o desvio padrão da reprodutibilidade  $s_R$  (associado aos resultados dos diversos laboratórios com desempenho satisfatório) quantifica a incerteza padrão,  $u(y)$ <sup>[70]</sup>.

A aplicação de linhas de orientação interlaboratorial e intralaboratorial são vantajosas para os laboratórios acreditados pela norma ISO/IEC EN NP 17025, uma vez

que permite uma majoração da estimativa da incerteza associada ao resultado, salvaguardando, assim, as expectativas do cliente<sup>[70]</sup>.

A quantificação da incerteza da medição baseada em dados de validação e/ou do controlo interno da qualidade (Precisão em condições de Repetibilidade e Erro de Veracidade) consiste na utilização de parâmetros do desempenho global do método, estimados em ambiente intralaboratorial, para a quantificação de grande parte da incerteza associada ao ensaio. Nesta abordagem, as componentes de incerteza são combinadas como componentes independentes de uma expressão multiplicativa ou, em casos particulares, como componentes de uma expressão aditiva, dependendo do facto de se considerar uma gama variada ou uma gama estreita de concentrações, respectivamente<sup>[70]</sup>.

Usualmente, nos ensaios químicos, a precisão estimada em condições de repetibilidade é a componente maioritária da incerteza global, pelo que necessita de ser devidamente avaliada em todo o âmbito de aplicação do método. Desta forma, e de modo a que a incerteza associada à repetibilidade (Equação 1.11) seja o mais realista possível, é recomendável que esta seja avaliada em condições idênticas às que serão condicionantes em ambiente de rotina.

$$u_{\text{precisão}} = S_r$$

onde:  
 $S_r$  - Desvio-padrão da repetibilidade (Equação 1.7).

**Equação 1.11** Incerteza associada à Repetibilidade <sup>[70]</sup>.

A incerteza-padrão,  $u(\bar{R}_m)$ , que está associada à recuperação média,  $\bar{R}_m$ , parâmetro que permite a avaliação da veracidade do método (Equação 1.10), consiste na função da incerteza associada à fortificação da amostra e traduz-se na Equação 1.12.

$$u(\bar{R}_m) = \bar{R}_m \times \sqrt{\left(\frac{s_{obs}^2}{n \times \bar{c}_{obs}^2}\right) + \left(\frac{u(c_{fortificada})}{c_{fortificada}}\right)^2}$$

onde:  
 $s_{obs}$  - Desvio-padrão de uma série de análises de amostras fortificadas;  
 $n$  - Número de análises da amostra fortificada;  
 $u(c_{fortificada})$  - Incerteza padrão associada ao teor das amostras fortificadas.

**Equação 1.12** Incerteza associada à fortificação da amostra <sup>[70]</sup>.

Através de uma selecção cuidada dos padrões e das operações gravimétricas e/ou volumétricas envolvidas na fortificação da amostra, o último termo da equação acima representada  $[u(C_{fortificada})/(C_{fortificada})]$  pode ser considerado desprezável. Para além desta consideração, dado que um laboratório deve ter disponíveis resultados da análise de amostras fortificadas a diversas concentrações, o termo  $[s^2_{obs}/(n \times \bar{c}^2_{obs})]$ , deve ser substituído pela variância associada às recuperações individuais estimadas a dividir pelo número de ensaios realizados, ou seja, deve ser substituído pelo termo  $(s^2_{recup}/n)$ . Desta forma, a incerteza associada à veracidade pode ser obtida pela Equação 1.13.

$$u(\bar{R}_m) = \bar{R}_m \times \sqrt{\left(\frac{s^2_{recup}}{n}\right)}$$

onde:

$\bar{R}_m$  – Recuperação média do analito;  
 $s_{recup}$  - Desvio-padrão da recuperação do analito;  
 $n$  - Número de análises da amostra fortificada.

**Equação 1.13** Incerteza associada à Veracidade <sup>[70]</sup>.

As componentes de incerteza-padrão relativa estimadas a partir dos dados de validação e/ou do controlo da qualidade do ensaio, devem ser combinadas, tendo como base a Lei da Propagação das Incertezas (Equação 1.13). Quando o método é aplicável a uma abrangente gama de concentrações, como é comum no STF-N, as componentes de incertezas devem ser contabilizadas como componentes independentes de uma expressão multiplicativa, e sempre que as incertezas associadas à precisão avaliada nas condições de repetibilidade e à veracidade são estimadas recorrendo a um número elevado de ensaios experimentais, a incerteza expandida combinada (Equação 1.14) pode ser estimada, para um nível de confiança aproximadamente igual a 95%, multiplicando  $u(y)$  por um factor de expansão ( $k$ ) igual a 2 <sup>[70]</sup>.

$$u(y) = y \times \sqrt{(s_r)^2 + (u(\bar{R}_m))^2}$$

onde:

$y$  - grandeza avaliada (exemplo: concentração conhecida);  
 $s_r$  - Desvio-padrão da repetibilidade (Equação 1.7);  
 $u(\bar{R}_m)$  - Incerteza associada à Veracidade.

**Equação 1.14** Incerteza padrão combinada, de uma determinada grandeza  $y$  <sup>[70]</sup>.

$$U(y) = k \times u(y)$$

onde:  
 $k$  – factor de expansão ( $k=2$ );  
 $u(y)$  – Incerteza padrão combinada, de uma determinada grandeza  $y$ .

**Equação 1.15** Incerteza expandida combinada <sup>[70]</sup>.

### 1.6.6 Robustez

A robustez é a medida da capacidade de um método para permanecer inalterado após a introdução deliberada de pequenas alterações nos seus parâmetros, fornecendo informações sobre o comportamento do método em condições normais de utilização<sup>[49,56]</sup>. Um método diz-se robusto caso se revele (praticamente) insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando este está a ser executado<sup>[49]</sup>.

### 1.6.7 Arrastamento

Em Toxicologia Forense pode ser frequente a análise de amostras em que os compostos de interesse se encontram em concentrações elevadas, sendo que, por esta razão, a avaliação deste parâmetro não pode ser negligenciada e, no caso da confirmação da ocorrência de arrastamento, deverão ser adoptadas medidas correctivas, de forma a eliminá-lo<sup>[52]</sup>.

A avaliação do arrastamento (*Carryover*) consiste em verificar se um analito pode transitar de uma mistura reaccional para outra à qual não pertence<sup>[71]</sup>, ou seja, uma amostra com uma elevada concentração de analito pode influenciar o resultado obtido na amostra seguinte, e eventualmente, conduzir a um resultado “Falso Positivo”. Este parâmetro pode ser avaliado simultaneamente com qualquer um dos parâmetros referenciados anteriormente.

### 1.6.8 Sistema de Controlo de Qualidade

Para qualquer método a ser utilizado em análises de rotina, deve ser projectado e implementado um plano de Controlo de Qualidade (Interno e Externo)<sup>[52]</sup>. Qualquer análise química está sujeita a erros, sendo essencial prevenir o seu aparecimento (Garantia da Qualidade - GQ) e controlar a sua ocorrência (Controlo de Qualidade – CQ), de modo a garantir e melhorar a eficácia do Sistema da Qualidade (SQ) adoptado<sup>[72]</sup>.

O Controlo de Qualidade é uma ferramenta essencial para garantir a confiança entre os clientes e os fornecedores, pois a “Qualidade” consiste no conjunto de atributos e características de uma entidade ou produto que determinam a sua aptidão para satisfazer necessidades e expectativas da sociedade<sup>[73]</sup>. Para se verificar a garantia da qualidade e o controlo da exactidão dos resultados no dia-a-dia, torna-se necessário avaliar, pontualmente no tempo, a veracidade dos resultados (Controlo de Qualidade Externo) e controlar continuamente a precisão (Controlo de Qualidade Interno) entre estas avaliações<sup>[72]</sup>.

O plano de Controlo de Qualidade (Interno e Externo) a ser projectado e implementado deve ter em conta algumas recomendações como a selecção, o manuseamento e a análise de padrões/amostras brancas fortificadas de controlo de qualidade; o tipo e frequência dos controlos e calibrações; o tipo e a frequência dos testes de adequação do sistema, assim como o tipo e a frequência da análise de amostras de controlo de qualidade interno incluídas no modelo das séries de trabalho<sup>[52]</sup>.

#### **1.6.8.1 Controlo de Qualidade Interno**

O Controlo de Qualidade Interno define-se como um conjunto de mecanismos capazes de garantir a verificação da conformidade de parâmetros predefinidos para aceitação dos resultados de ensaios, cuja metodologia se adapta a diferentes tipos de procedimentos de ensaio<sup>[72]</sup>. Os procedimentos de ensaio dividem-se em procedimentos de rastreio, em procedimentos de confirmação qualitativa e em procedimentos de quantificação.

O controlo de qualidade interno aplicado aos procedimentos de confirmação qualitativa de medicamentos antidepressivos consiste na verificação dos seguintes parâmetros relacionados com a separação cromatográfica:

- ✓ Conformidade do tempo de retenção relativo;
- ✓ Conformidade do tempo de retenção<sup>[73]</sup>.

No âmbito do controlo de qualidade interno, na detecção por espectrometria de massa, em modo SIM, os parâmetros analisados, qualitativamente, são<sup>[73]</sup>:

- ✓ Monitorização de três iões com intensidade significativa no espectro;
- ✓ Análise das intensidades relativas para os três iões-diagnóstico seleccionados aquando da validação do procedimento de ensaio, sendo que, para o caso da tecnologia em estudo, ou seja, GC/MS/MS, os três iões-diagnóstico devem incluir o ião-precursor.
- ✓ Análise do valor da razão sinal/ruído para o ião-diagnóstico menos intenso;
- ✓ Aceitação dos resultados qualitativos obtidos para dois níveis de controlo e uma amostra branca.

Relativamente ao controlo de qualidade interno aplicado aos procedimentos de ensaio de quantificação são estudados parâmetros como a conformidade com o limite de repetibilidade; a aceitação, em cartas de controlo, dos resultados quantitativos obtidos através dos resultados relativos a dois níveis de controlo; a aceitação do resultado obtido através da injeção cromatográfica de uma amostra branca e a aceitação da curva de calibração para a quantificação, contemporânea à análise das amostras<sup>[73]</sup>.

#### **1.6.8.2 Controlo de Qualidade Externo**

As acções do controlo de qualidade externo são acções que permitem evidenciar um dos objectivos da acreditação de um laboratório, ou seja, a comparabilidade de resultados. Estas englobam:

- o uso de Materiais de Referência Certificados (MRC) ou padrões equivalentes<sup>[72]</sup>;
- a participação em EILs apropriados, nomeadamente de aptidão, que apresentam como objectivo a avaliação do comportamento dos laboratórios<sup>[72,74]</sup>.

Um MRC é obtido por um processo tecnicamente válido, contendo um valor de concentração, ou outra grandeza, com uma incerteza associada, e fazendo-se acompanhar por um certificado ou outro documento produzido pela entidade certificadora. O objectivo deste processo é avaliar o desempenho do laboratório, sendo que, quando o valor obtido não se encontra dentro do intervalo da incerteza indicado para o valor certificado, o laboratório deve procurar averiguar as causas desse desvio e, assim, tentar eliminá-las ou aceitá-las, dependendo dos critérios de aceitação implementados<sup>[49]</sup>.

A participação em EIL permite ao laboratório uma evolução técnica, uma vez que implica trabalhar com amostras que vão sendo diferentes e cujo valor correcto é desconhecido<sup>[72]</sup>.

## 2 Descrição Experimental

---

O presente trabalho experimental foi desenvolvido nas instalações do STF-N, tendo-se utilizado os equipamentos e os materiais, reagentes e consumíveis aí disponíveis.

### 2.1 Instrumentação e Material

Os estudos cromatográficos foram realizados num Cromatógrafo gasoso *Varian GC-450*, acoplado a um espectrómetro de massa *Varian 300-MS*, com um detector triplo quadrupolo e com um auto-amostrador *Varian CP-8400*. Foram ainda utilizados outros equipamentos para o tratamento de amostras, nomeadamente uma centrífuga Rotofix 32A da Hettisch, um evaporador rotativo (*CentriVap Concentrator* da LABCONCO), um extractor automatizado de SPE GX-271 ASPEC™, da Gilson® e um Vórtex V-3, 12VDC 700 mA, ELMI *Sky Line*. A grande parte das manipulações foi realizada numa Câmara de Fluxo Laminar VFRS 1806 da DanLaf.

Entre os vários materiais utilizados neste trabalho incluem-se colunas SPE Oasis HLB® 3 cc, da Waters™, filtros de seringas 0,45 µm GHP Acrodisc 13, da Pall™, Vials WO Screw Vial (32x12 mm) de 2 mL, tubos de ensaio de fundo redondo (12x120x0,8 mm e 12x75x0,8 mm) e micropipetas de volume variável e pontas respectivas: (0,5-10 µL) da VWR™, 200 µL da Gilson e (10-100 µL) e (100-1000 µL) da Rainin.

### 2.2 Reagentes e Padrões Analíticos

Neste estudo, todas as soluções aquosas utilizadas foram preparadas com água desionizada adquirida a partir de um sistema de purificação Milli-Q da Millipore®. Os

reagentes utilizados foram listados na Tabela 2.1, conjuntamente com as suas fórmulas químicas, fornecedores e referências em catálogo.

**Tabela 2.1.** Produtos químicos utilizados em laboratório.

Tipo de Produto		Produto	Fórmula Química	Fornecedores e Referência	Peso Molecular
Solventes e Reagentes		Acetato de Etilo	$C_4H_8O_2$	Merck (1.00868.1000)	88,12
		Metanol, <i>Gradient Grade</i>	$CH_3OH$	Merck (1.06007.1000)	32,05
		Água Ultrapura	$H_2O$	Millipore	18,02
Gases	Colisão	Árgon	Ar	Air Liquide	39,95
	Arrastamento	Hélio	He	Air Liquide	4,00
Padrões analíticos de ADs (soluções em metanol a 1000 ppm)		Amitriptilina	$C_{20}H_{23}N \cdot HCl$	Cerilliant (A-923)	313,90
		Citalopram	$C_{20}H_{21}FN_2O \cdot HBr$	Cerilliant (C-095)	405,34
		Clomipramina	$C_{19}H_{23}N_2Cl$	Cerilliant (C-903)	314,89
		Dotiepina	$C_{19}H_{21}NS$	Cerilliant (D-908)	295,48
		N-Desmetilclomipramina	$C_{18}H_{21}ClN_2 \cdot HCl$	Cerilliant (D-916)	337,32
		Fluoxetina	$C_{17}H_{18}F_3NO \cdot HCl$	Cerilliant (F-918)	345,82
		Imipramina	$C_{19}H_{24}N_2 \cdot HCl$	Cerilliant (I-902)	316,91
		Maprotilina	$C_{20}H_{23}N \cdot HCl$	Cerilliant (M-920)	313,90
		Mianserina	$C_{18}H_{20}N_2 \cdot HCl$	Cerilliant (M-919)	300,86
		Mirtazapina	$C_{17}H_{19}N_3$	Cerilliant (M-128)	265,39
		Nortriptilina	$C_{19}H_{21}N \cdot HCl$	Cerilliant (N-907)	299,87
		Paroxetina	$C_{19}H_{20}FNO_3 \cdot C_4H_4O_4$	Cerilliant (P-916)	445,48
		Sertralina	$C_{17}H_{17}C_{12}N \cdot HCl$	Cerilliant (S-021)	415,93
		Trimipramina	$C_{20}H_{26}N_2$	Cerilliant (T-904)	294,48
		Venlafaxina	$C_{17}H_{27}NO_2 \cdot HCl$	Cerilliant (V-004)	313,91
PIs de ADs (soluções em metanol a 100 ppm)		Clomipramina-d3	$C_{19}H_{20}ClD_3N_2$	Cerilliant (C-901)	317,89
		Trimipramina- d3	$C_{20}H_{23}D_3N_2 \cdot C_4H_4O_4$	Cerilliant (T-071)	297,48

## 2.3 Amostras

Sendo um dos objectivos do presente trabalho a validação de uma metodologia analítica destinada à integração em análises de rotina do STF-N, o tipo de amostra seleccionada teria que ser representativa da realidade presenciada no laboratório. Desta forma, as amostras usadas para o estudo da validação desta metodologia resultaram de amostras procedentes do Instituto Português do Sangue (IPS), com excepção das amostras empregues no estudo da Especificidade/Selectividade, nas quais são aplicadas *pools* de amostras de sangue total referentes a processos do STF-N que respeitam os prazos legais para a sua eliminação.

## 2.4 Pré-preparação das amostras e das soluções de trabalho

De acordo com os factores interferentes que foram citados na Tabela 1.1 do Capítulo 1, todas as amostras biológicas recebidas no STF têm que ser conservadas e armazenadas segundo o procedimento de recepção de amostras. Assim, as amostras biológicas (como o sangue), após a sua recepção, são conservadas e armazenadas à temperatura de -20°C. Antecipadamente à sua utilização, as amostras de sangue são descongeladas e homogeneizadas por agitação num vórtex.


A partir das soluções-*stock*, descritas na Tabela 2.1, foram preparadas soluções de trabalho individuais para todos os analitos em estudo, através da diluição em metanol, de forma a obter soluções com uma concentração de 5,0 mg/L.

Para a validação do método analítico foram escolhidos como padrões internos os compostos deuterados Clomipramina-d3 e Trimipramina-d3, uma vez que estes apresentam um comportamento semelhante aos analitos em análise durante o processo extractivo, a separação cromatográfica e o processo de ionização, sendo que a razão de massa entre o padrão interno e o analito, não é afectada por qualquer uma destas operações<sup>[75]</sup>.

## 2.5 Extracção em Fase Sólida

O procedimento de SPE foi aplicado a amostras de sangue total fortificadas com os compostos estudados (Tabela 2.1) e desenvolvido através da utilização de colunas Oasis<sup>®</sup> HLB, conforme indicado na Tabela 2.2.

**Tabela 2.2.** Procedimento extractivo aplicado a amostras de sangue total com colunas Oasis HLB<sup>®</sup>.

<p><b>Aparelho</b></p>	<div style="text-align: center;">  </div> <p><b>Figura 2.1</b> Extractor automatizado de SPE GX-271 ASPEC<sup>™</sup>, da Gilson<sup>®</sup> [76].</p>
<p><b>Coluna de Extração</b></p>	<p>Oasis HLB<sup>®</sup> 3 cc da Waters</p>
<p><b>Procedimento</b></p>	<div style="text-align: center;"> <p><b>Preparação da Amostra</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Diluição de 1 mL de amostra em 4 mL de água destilada e desionizada.</li> <li>✓ Homogeneização através de um vórtex.</li> <li>✓ Centrifugação a 4000 rpm durante 30 minutos.</li> </ul> <hr/> <p><b>Extração em Fase Sólida (SPE)</b></p> <div style="text-align: center;"> <p>Condicionamento da coluna 2 mL de metanol</p> <p>↓</p> <p>Equilíbrio 2 mL de água ultra-pura</p> <p>↓</p> <p>Adição da amostra 1 mL de amostra diluído em 4 mL de água destilada e desionizada</p> <p>↓</p> <p>Lavagem da coluna 2 mL de metanol em água a 5%</p> <p>↓</p> <p>Eluição 2 mL de metanol</p> </div> <hr/> <p><b>Filtração dos eluatos</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Filtração dos eluatos através de seringas de 1 mL <i>U-100 Insulin</i> e filtros de seringas 0,45 µm GHP Acrodisc 13, da Pall.</li> </ul> <hr/> <p><b>Evaporação</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Evaporação à secura, num evaporador rotativo, a 45°C durante 2 horas, sob vácuo.</li> </ul> <hr/> <p><b>Retoma dos Extractos</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Retoma do extracto em 100 µL de metanol.</li> <li>✓ Transferência dos 100 µL para um <i>insert</i> de reacção introduzido no interior de um <i>vial</i> de injeção cromatográfica.</li> </ul> </div>

## 2.6 Condições Cromatográficas

A Tabela 2.3 descreve, pormenorizadamente, os parâmetros analíticos aplicados ao sistema de GC/MS/MS. A aquisição dos sinais cromatográficos foi realizada através da utilização do *Software MS Workstation version 6.9.2.* e os espectros de massa obtidos em SCAN foram comparados com a base de dados, *NIST MS Search 2.0*, disponíveis no equipamento.

**Tabela 2.3.** Parâmetros Analíticos do Sistema GC/MS/MS.

<b>Injector</b>	Temperatura	250°C
	Volume da Amostra	2,0 µL
	Modo de Injecção	<i>Split</i>
	Pressão	10,4 <i>psi</i>
<b>Coluna</b>	Capilar, <i>Factor Four VF 5ms</i>	0,25 mm / 30 m / 0,25 µm
	Fluxo Constante	1,0 mL/min
<b>Forno</b>	Temperatura Inicial/Final	100°C / 295°C
	Rampa de Temperaturas	<p><b>Rampa de Temperaturas</b></p> <p>O gráfico mostra a temperatura em graus Celsius (eixo Y, de 0 a 350) versus o tempo em minutos (eixo X, de 0,00 a 35,00). A curva de aquecimento é composta por: uma etapa isotérmica de 3 minutos a 100°C; uma rampa de aquecimento de 40°C/min de 100°C a 200°C; uma rampa de aquecimento de 7°C/min de 200°C a 295°C; e uma etapa isotérmica final de 10 minutos a 295°C.</p>
	Tempo Total de Corrida	29,07 min
<b>MS</b>	Linha de Transferência	280°C
	Temperatura do Quadrupolo	40°C
	Temperatura da Fonte de Ionização	250°C
	Modo de Ionização	EI ( <i>Electron Impact</i> )
	Solvent Delay	7,50 min
	Parâmetros de Aquisição	Quad1: Modo SIM ( <i>Selected Ion Monitoring</i> ) Quad3: Modo SIM ( <i>Selected Ion Monitoring</i> )

## 3 Resultados e Discussão

---

O trabalho apresentado refere-se ao desenvolvimento e validação de um método analítico baseado em GC/MS/MS para a determinação de diferentes classes de ADs em amostras de sangue total. O seu desenvolvimento teve como finalidade a sua aplicação nas determinações efectuadas no STF-N, no âmbito das análises toxicológicas de rotina.

Os analitos incluídos neste estudo são os ADs mais pertinentes do ponto de vista da toxicologia forense e pertencem às classes dos Tricíclicos e afins (Amitriptilina, Clomipramina, Dotiepina, N-Desmetilclomipramina, Imipramina, Maprotilina, Mianserina, Mirtazapina, Nortriptilina e Trimipramina), Inibidores selectivos da recaptção da serotonina (Citalopram, Fluoxetina, Paroxetina e Sertralina), e Inibidores selectivos da recaptção da serotonina e da noradrenalina (Venlafaxina). Incluíram-se ainda os compostos deuterados Clomipramina-d3 e Trimipramina-d3 como PIs.

De acordo com o indicado na secção 1.6, a validação do método analítico desenvolvido para a determinação de ADs consistiu na avaliação de parâmetros de validação exigidos pelo STF-N. O tratamento dos dados experimentais relativamente ao estudo de cada parâmetro implementado no procedimento de validação foi efectuado através de folhas de cálculo do Microsoft Office Excel<sup>®</sup> específicas, previamente desenvolvidas e validadas como registos do Sistema de Gestão da Qualidade do STF-N.

### 3.1 Desenvolvimento da metodologia analítica

O estudo de validação para a implementação da metodologia analítica iniciou-se com a análise individualizada das soluções-padrão dos compostos em estudo, por GC/MS/MS, em modo SCAN. Este procedimento inicial teve como objectivo a identificação dos diferentes analitos, baseada essencialmente em tempos de retenção e nos dados recolhidos por MS para cada um.

### 3.1.1 Tempos de retenção

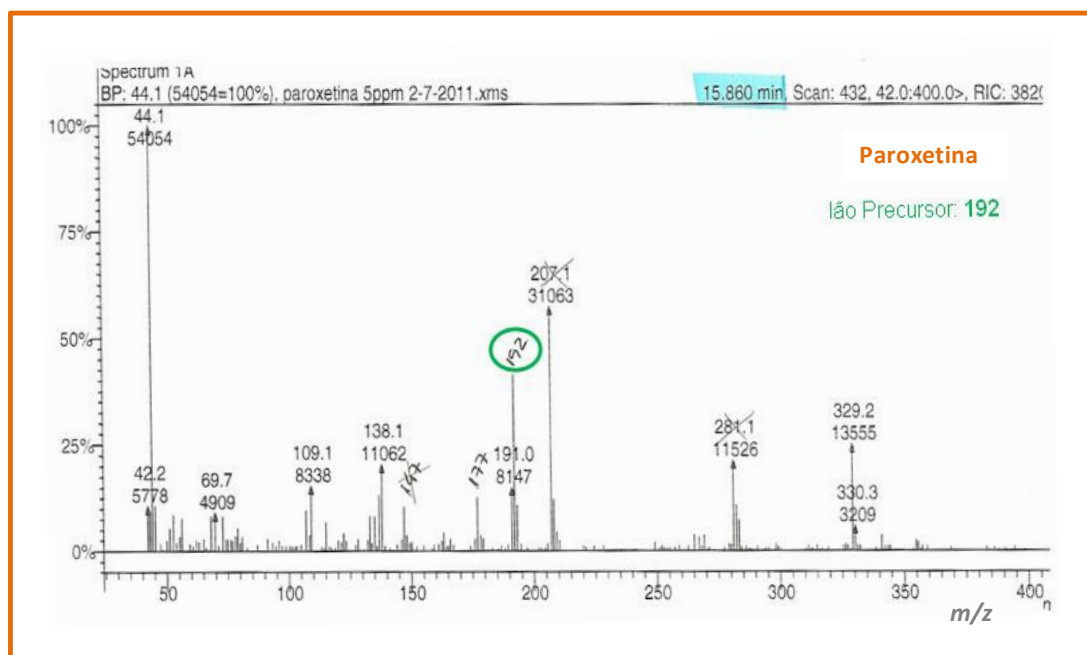
Usando as condições cromatográficas estabelecidas na sequência dos estudos prévios realizados no STF-N, os analitos foram injectados individualmente e associados ao seu tempo de retenção. Os valores obtidos foram indicados na Tabela 3.1, e corresponderam ao tempo que decorreu desde a injeção até à eluição, não se tendo descontado o tempo morto, relativo ao percurso no sistema cromatográfico sem qualquer retenção.

**Tabela 3.1** Tempos de retenção dos diferentes ADs obtidos em modo SCAN.

Composto	Tempo de retenção (min)	Íões seleccionados em modo SIM (m/z)
Fluoxetina	8,48	162, 183, 309
Venlafaxina	10,59	134, 135, 179
Amitriptilina	11,74	202, 203, 215
Trimipramina	11,92	193, 208, 294
Nortriptilina	11,94	202, 203, 220
Mianserina	11,96	193, 249, 264
Imipramina	12,04	193, 234, 280
Mirtazapina	12,41	195, 208, 265
Maprotilina	13,21	203, 217, 277
Sertralina	13,60	159, 262, 274
Dotiepina	13,77	202, 203, 204
Citalopram	13,95	208, 221, 238
Clomipramina	14,02	268, 269, 314
N-Desmetilclomipramina	14,32	229, 268, 300
Paroxetina	15,86	138, 192, 329
PI: Trimipramina- d3	11,89	196, 211, 297
PI: Clomipramina-d3	14,01	271, 272, 317

Cada composto, eluído a tempos de retenção diferentes, originou um espectro de MS singular. A título de exemplo, apresenta-se na Figura 3.1 o espectro de massa da Paroxetina. O conjunto de espectros relativos a todos os ADs pode ser encontrado no

Anexo A.1. Para cada um destes espectros, e de forma a garantir maior sensibilidade, foi efectuada uma selecção a partir dos iões representativos obtidos nos espectros de massa em modo SCAN para análise destes em modo SIM (no 1º Quadrupolo). Nesta triagem de iões foram escolhidos três representativos de cada analito, tendo em conta características como a intensidade dos iões, a razão  $m/z$  dos iões e a ausência de interferências provenientes da matriz, que permitem uma selecção mais adequada dos iões e, assim, a correspondente identificação inequívoca do analito.



**Figura 3.1** Espectro de massa da Paroxetina, obtido em modo SCAN, e seu ião-precursor (círculo verde).

Os iões seleccionados para cada analito encontram-se listados na Tabela 3.1. Esta escolha considerou alguns aspectos fundamentais, no sentido de permitirem a identificação inequívoca do composto e a inibição de possíveis interferências. Neste contexto, foram ignorados os iões 207 e 281 por estarem presentes em amostras brancas, considerando-se originários da matriz. Os iões com elevada intensidade mas com unidades de massa baixa (como o ião 44 e o ião 58) não foram, também, considerados, uma vez que a fragmentação destes iões originaria ainda fragmentos menores, que se combinariam posteriormente com o sinal de ruído. Os iões dos compostos com a disponibilidade dos deuterados homólogos, ou seja, a Clomipramina e a Trimipramina, foram seleccionados de acordo com a análise da razão  $m/z$  dos iões equivalentes.

### 3.1.2 Iões-diagnóstico

Após a selecção de três iões em modo *SIM*, procedeu-se à eleição do ião-precursor no 1º Quadrupolo e ao estudo das voltagens na célula de colisão no 2º Quadrupolo, correndo o método com o 3º Quadrupolo em modo *SCAN*. Para este estudo consideraram-se apenas os 3 iões com maior intensidade, tendo em conta as considerações indicadas anteriormente.

Na Tabela 3.2 estão indicadas as diferentes voltagens avaliadas. Este estudo foi efectuado por recursividade para cada composto dentro das gamas de voltagem testadas, sendo necessário, em alguns casos, realizar o ajuste destas gamas, de modo a obter a voltagem mais adequada para a fragmentação do ião-precursor.

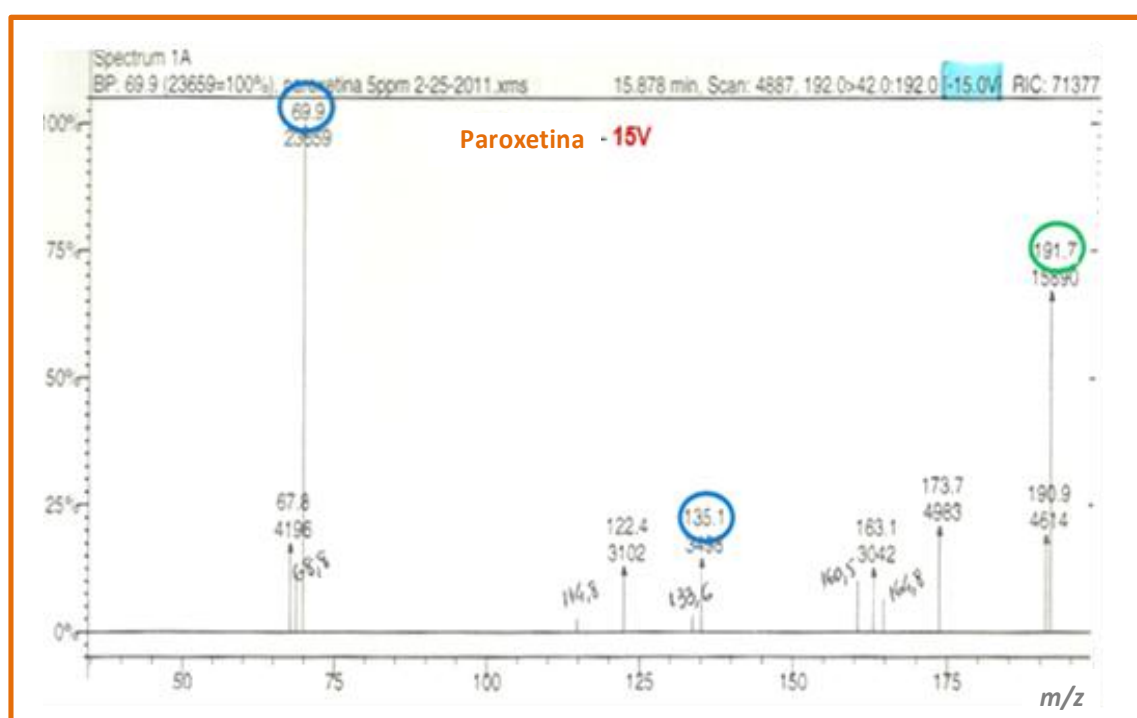
**Tabela 3.2** Diferentes voltagens aplicadas ao ião-precursor na Célula de Colisão e os iões seleccionados, em modo *SCAN*, no 3º Quadrupolo.

Composto	1º Quadrupolo (modo <i>SIM</i> )	Energias de Colisão (V)	3º Quadrupolo Iões seleccionados* ( <i>m/z</i> )
	Ião Precursor		
Fluoxetina	162	10, 20, 30, 40, 50	112, 143, 162
Venlafaxina	134	10, 20, 30, 40, 50	91, 119, 134
Amitriptilina	215	10, 12, 14, 20, 30, 40, 50	202, 213, 215
Trimipramina	294	10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 30, 40, 50	84, 99, 294
Nortriptilina	202	10, 12, 14, 15, 16, 18, 20, 25, 30, 40, 50	176, 200, 202
Mianserina	193	10, 20, 30, 40, 50	165, 178, 193
Imipramina	234	10, 20, 30, 40, 50	117, 218, 234
Mirtazapina	195	10, 20, 30, 40, 50	151, 167, 195
Maprotilina	277	10, 12, 14, 20, 30, 40, 50	59, 218, 277
Sertralina	262	10, 15, 20, 30, 40, 50	116, 227, 262
Dotiepina	202	10, 20, 25, 30, 40, 50	150, 175, 202
Citalopram	238	10, 15, 20, 30, 40, 50	183, 218, 238
Clomipramina	314	2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40, 50	58, 85, 314
N-Desmetilclomipramina	268	10, 20, 30, 40, 50	217, 252, 268
Paroxetina	192	10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 30, 40, 50	70, 135, 192
<b>PI:</b> Trimipramina-d3	297	10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 30, 40, 50	87, 102, 297
<b>PI:</b> Clomipramina-d3	317	2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40, 50	61, 88, 317

\* detecção em modo *SCAN*

Relativamente ao 3º Quadrupolo, que operou em modo *SCAN*, foram obtidos vários espectros de massa para cada composto, correspondentes a cada uma das voltagens aplicadas. A voltagem seleccionada para cada composto foi aquela que produziu iões com maior abundância relativa. A título de exemplo, representa-se um desses espectros na Figura 3.2, podendo visualizar-se o espectro seleccionado para cada composto no Anexo A.2.

Usando o espectro relativo à voltagem mais adequada para cada um dos analitos seleccionaram-se os três iões-diagnóstico, i.e., um ião-precursor e dois iões-produto. Este estudo foi baseado nos mesmos pressupostos que no estudo anterior. Os valores identificados para cada analito encontram-se listados na Tabela 3.2.



**Figura 3.2** Espectro de massa da Paroxetina, obtido a 15 V, em modo *SIM-SCAN*, destacando o ião-precursor (círculo verde) e iões-produto (círculo azul).

### 3.1.3 Registo cromatográfico

Uma vez seleccionados os parâmetros fundamentais para uma identificação inequívoca dos compostos, como o ião-precursor, as voltagens da célula de colisão e os iões-produto, realizou-se uma corrida cromatográfica em modo *SIM-SIM*, cujos resultados se traduzem na Tabela 3.3 e na Figura 3.3.

De uma forma geral, o cromatograma obtido permite a separação de todos os ADs injectados, apresentando picos bem resolvidos em menos de 16 minutos. Apenas os pares citalopram/clomipramina e amitriptilina/trimipramina aparentam uma ligeira sobreposição entre os picos individuais, na sequência da sua eluição com tempos de retenção muito próximos. Do ponto de vista qualitativo este aspecto não representa qualquer problema, já que a detecção fornece informação desta natureza. No entanto, do ponto de vista quantitativo torna-se necessária a avaliação do desempenho analítico da metodologia proposta.

**Tabela 3.3** Parâmetros de aquisição em modo SIM-SIM.

Composto	MS <sub>1</sub> (m/z)	Energia de Colisão (V)	MS <sub>2</sub> (m/z)		Tempo de retenção (min)
			Iões-produto		
Fluoxetina	162	20	112	143	8,47
Venlafaxina	134	20	91	119	10,59
Amitriptilina	215	14	202	213	11,75
Trimipramina	294	10	84	99	11,92
Nortriptilina	202	25	176	200	11,95
Mianserina	193	20	165	178	11,98
Imipramina	234	20	117	218	12,04
Mirtazapina	195	30	151	167	12,42
Maprotilina	277	12	59	218	13,22
Sertralina	262	15	116	227	13,61
Dotiepinga	202	30	150	175	13,79
Citalopram	238	15	183	218	13,97
Clomipramina	314	10	58	85	14,05
N-Desmetilclomipramina	268	20	217	252	14,34
Paroxetina	192	15	70	135	15,87
<b>PI:</b> Trimipramina-d3	297	10	87	102	11,89
<b>PI:</b> Clomipramina-d3	317	10	61	88	14,00

## 3.2 Validação do método

### 3.2.1 Especificidade/Selectividade e Capacidade de Identificação

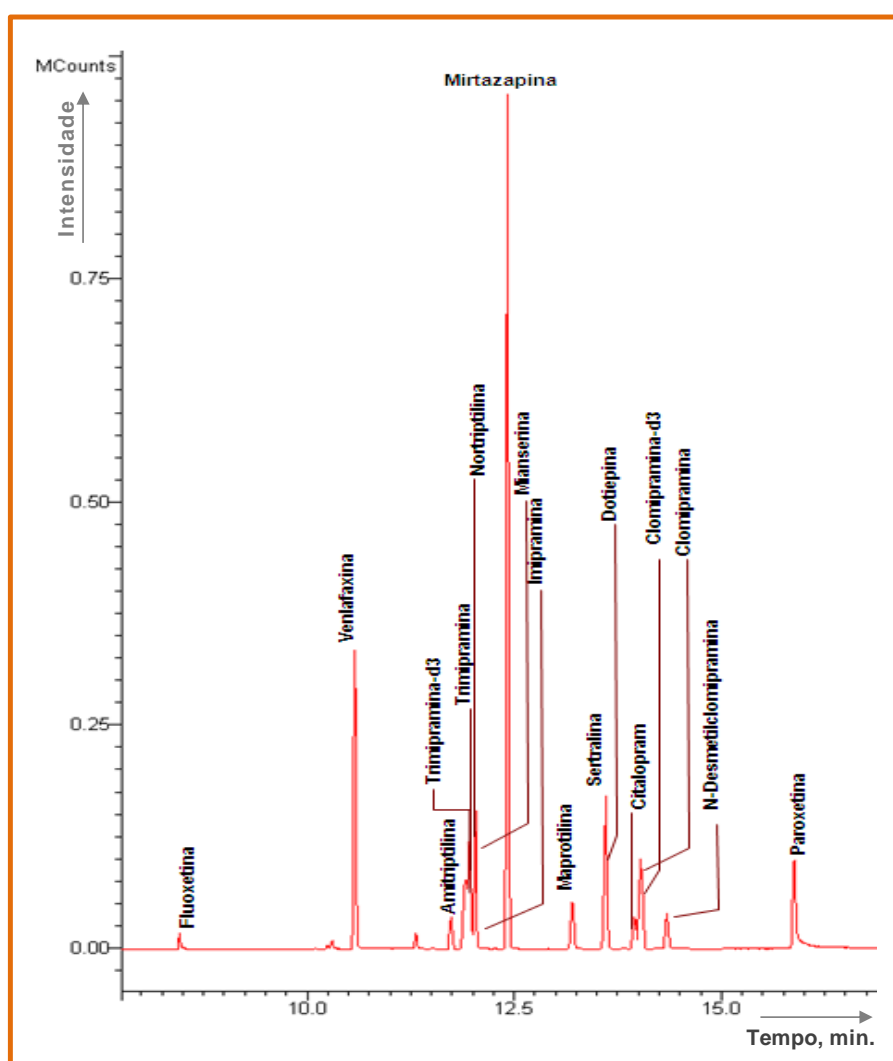
Na análise qualitativa é necessário demonstrar a especificidade e a selectividade do método para a identificação, de forma inequívoca, dos compostos que constituem uma mistura ou que estejam presentes em amostras de rotina, sem que ocorra interferência de outros compostos que façam parte da composição desta mistura ou das amostras em análise<sup>[50,52,54]</sup>. Este facto deve ser confirmado através da obtenção de resultados positivos na análise de amostras que contenham o analito em estudo e da obtenção de resultados negativos obtidos com amostras que não contenham o analito, mas que possam apresentar compostos que teoricamente potenciem a possibilidade de obtenção de resultados “Falsos Positivos”, sendo que nestes casos a(s) interferência(s) detectadas devem ser confirmadas qualitativamente<sup>[52]</sup>. A avaliação da capacidade de identificação do procedimento deve ser efectuada através da análise das amostras contendo o analito<sup>[52]</sup>, simultaneamente com a avaliação da especificidade/selectividade.

Para este estudo preparou-se um volume de amostra de sangue total de 30 mL, composto por uma *pool* de 30 amostras reais brancas (amostras de sangue de homens/mulheres, amostras de sangue periférico/cardíaco/total obtidas *in vivo/post-mortem*) referentes a processos, já analisados, no STF-N que respeitavam os prazos legais para a sua eliminação<sup>[52]</sup>, e cujos resultados, analisados noutras metodologias analíticas, foram negativos ao grupo de compostos seleccionado para validação. Posteriormente, procedeu-se à homogeneização da *pool* e prepararam-se duas alíquotas para análise. A primeira alíquota destinou-se a uma análise directa (sem adição de ADs) e a segunda foi fortificada com o grupo de ADs em estudo<sup>[52]</sup>.

A fortificação do sangue foi efectuada com uma mistura de padrões analíticos de ADs e com os PIs a uma concentração de 500 ng/mL. Os níveis de concentração escolhidos para cada AD e PI incluíam toda a gama de concentração terapêutica, de acordo com valores de referência apresentados na bibliografia<sup>[77]</sup> (ver Tabela 3.4). Apesar do procedimento ideal passar por incluir um PI para cada AD, que seria o seu análogo deuterado, os PIs incluídos neste estudo foram apenas a Clomipramina-d3 e a Trimipramina-d3. Esta escolha foi condicionada à disponibilidade de padrões deuterados no STF-N. Desta forma, a preferência do PI para cada substância em estudo foi realizada através da avaliação da razão das áreas ( $A_P/A_{PI}$ ), para 10 réplicas de cada composto, para as duas propostas de PI.

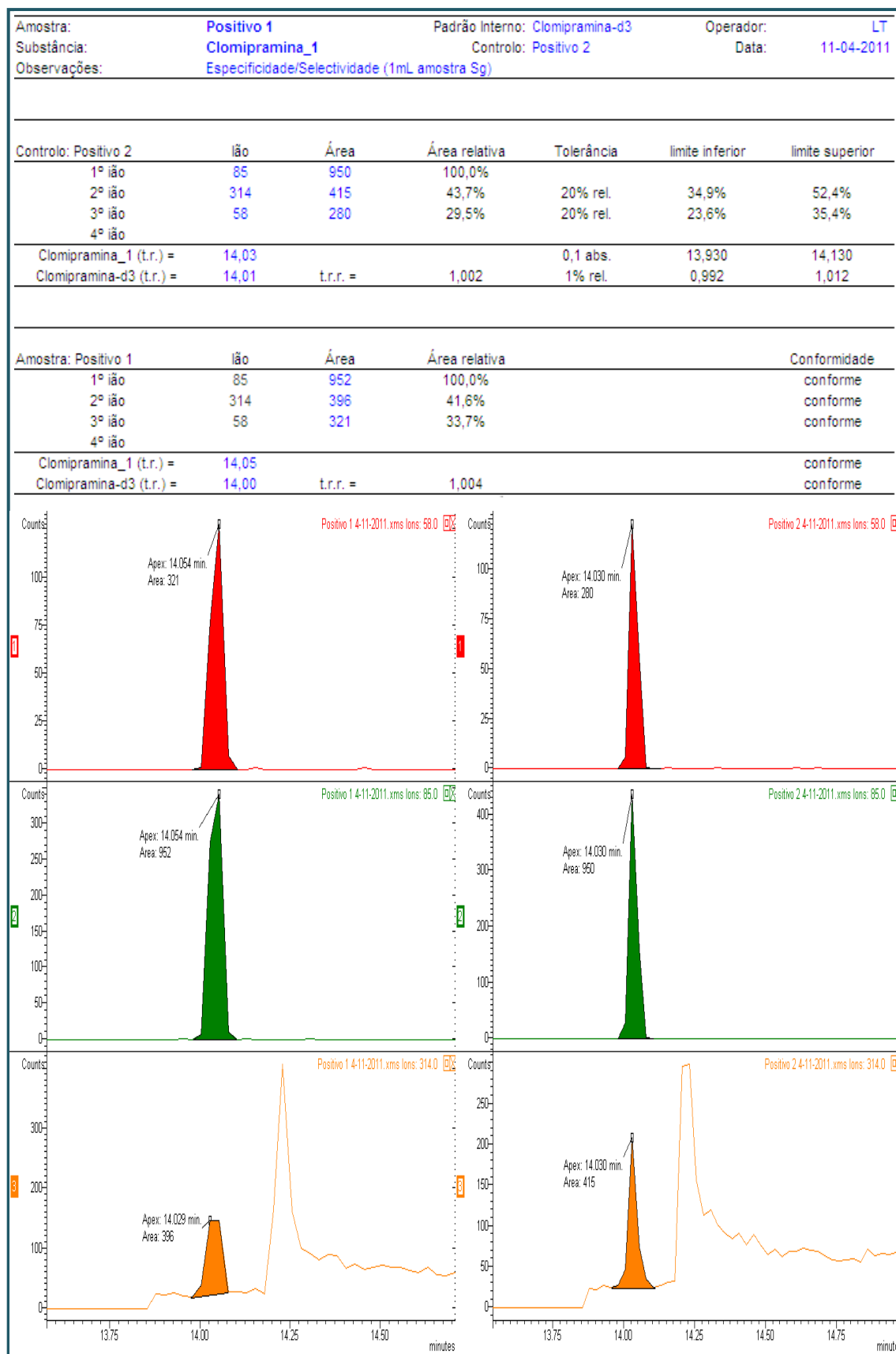
A injeção cromatográfica das amostras referidas anteriormente não originou falsos resultados positivos ou negativos. A avaliação destes resultados teve como critérios de

aceitação os seguintes requisitos, que constituem o procedimento de validação implementado no STF-N<sup>[52]</sup>: (1) o tempo de retenção ( $t_r$ ) não diferiu mais do que 2 % relativamente a um dos controlos positivos ou mais do que  $\pm 0,1$  minutos (o menor dos dois); (2) o tempo de retenção relativo ( $t_{r,r}$ ) não diferiu mais do que 1 % relativamente a um dos controlos positivos; (3) estavam presentes os três iões-diagnóstico no espectro; (4) o valor da razão sinal/ruído para o ião-diagnóstico menos intenso foi superior a 3; (5) o critério de aceitação de intensidades relativas dos três iões-diagnóstico seleccionados compreendidas entre 50 e 100 %, 25 e 50 %, 5 e 25 % e 0 e 5 %, permitiam uma tolerância de  $\pm 10$  unidades,  $\pm 20\%$ ;  $\pm 5$  unidades; e  $\pm 50\%$ , respectivamente; (6) e a amostra branca foi negativa perante estes mesmos critérios de aceitação.

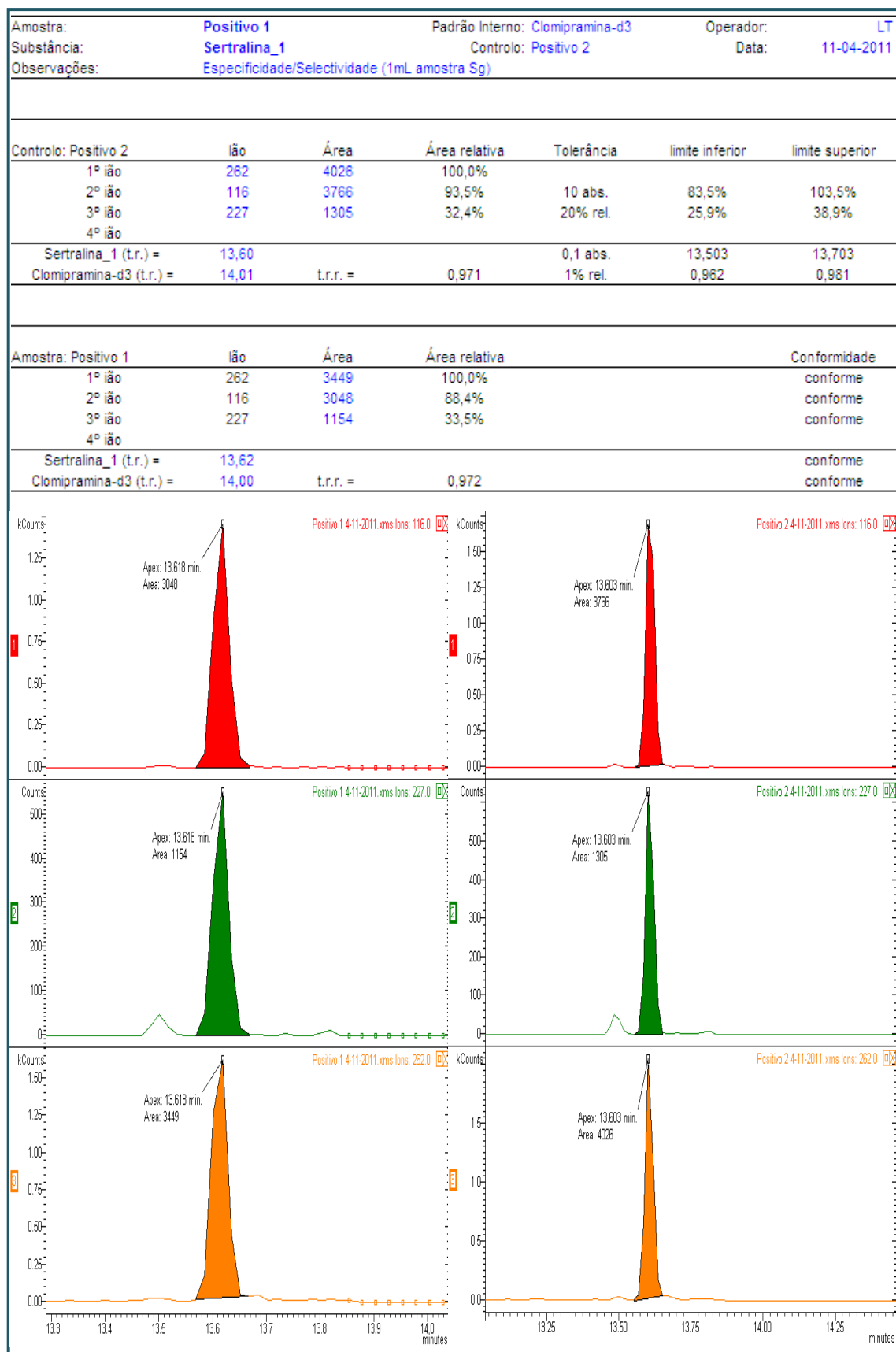


**Figura 3.3** Cromatograma da mistura de ADs e PIs, detectados em modo *SIM-SIM*.

De uma forma geral, todos os resultados obtidos confirmaram a inexistência de interferências provenientes da matriz e, por consequência, que o método analítico apresentava uma Capacidade de Identificação adequada ao fim a que se destina.



**Figura 3.4** Confirmação da positividade para a Clomipramina em amostras aplicadas no estudo da Especificidade/Selectividade e Capacidade de Identificação.



**Figura 3.5** Confirmação da positividade para a Sertralina em amostras aplicadas no estudo da Especificidade/Selectividade e Capacidade de Identificação.

### 3.2.2 Limites de Detecção e de Quantificação

O método desenvolvido deve ser capaz de analisar amostras com concentrações terapêuticas, tóxicas e letais de todos os ADs em estudo. Neste sentido, antes de definir as gamas de concentração de calibração para cada AD foi necessário identificar os valores de concentração terapêutica, tóxica e letal enunciados em dados bibliográficos. Neste contexto existem apenas valores bibliográficos referentes a plasma e soro<sup>[77]</sup>, o que obriga a que sejam estes os considerados para o estudo destes parâmetros em sangue total. (Tabela 3.4).

**Tabela 3.4** Valores de referência para as gamas terapêuticas, tóxicas e letais dos compostos analisados<sup>[77]</sup>.

Composto	Gamas de referência (mg/L)		
	Terapêutica	Tóxica	Letal
Fluoxetina <sup>a)</sup>	0,15 - 0,5	2	1,3 - 6,8
Venlafaxina <sup>a)</sup>	sum 0,25 - 0,75	sum 1 - 1,5	6,6 <sup>c)</sup>
Amitriptilina <sup>a)</sup>	0,05 - 0,3	—	—
Trimipramina <sup>a)</sup>	0,01 - 0,3	0,5	8,7 <sup>c)</sup>
Nortriptilina <sup>a)</sup>	0,05 <sup>c)</sup> / 0,075 - 0,25	> 0,25	1 - 3
Mianserina <sup>a)</sup>	0,015 - 0,07 / 0,14 <sup>c)</sup>	0,5 - 5	—
Imipramina <sup>a)</sup>	0,045 - 0,15	0,4 - 0,5	2
Mirtazapina <sup>a)</sup>	0,02 - 0,1 / -0,3 <sup>c)</sup>	—	—
Maprotilina <sup>a)</sup>	0,075 - 0,25 / 0,1 <sup>c)</sup> - 0,6 <sup>c)</sup>	0,3 - 0,8	1 - 5
Sertralina <sup>a)</sup>	0,05 - 0,25 / -0,5 <sup>c)</sup>	0,29 <sup>c)</sup> ; 1,6 <sup>c)</sup>	—
Dotiepina <sup>a)</sup>	0,02 - 0,15 / 0,4 <sup>c)</sup>	0,8	1 <sup>c)</sup> / 5 - 19
Citalopram <sup>b)</sup>	0,02 - 0,2	—	0,5
Clomipramina <sup>a)</sup>	0,02 <sup>c)</sup> / 0,09 - 0,25	—	—
N-Desmetilclomipramina <sup>a)</sup>	sum 0,15 - 0,55	sum 0,4	sum 1 - 2
Paroxetina <sup>a)</sup>	0,01-0,075/0,1 <sup>c)</sup> e 0,015 <sup>d)</sup> -0,15 <sup>d)</sup> /0,25 <sup>c),d)</sup>	0,35 - 0,4	—

*Sum*: inclui a concentração dos metabolitos; a) gamas de concentração em soro; b) gamas de concentrações em plasma; c) valores de *Case Reports* em revistas científicas da área da Toxicologia Forense; d) valores relativos a amostras colhidas 1 a 2 horas após administração da substância.

Perante esses valores, foram seleccionados intervalos de concentração que incluíssem em cada caso o menor valor de concentração existente no plasma ou no soro. O nível mais baixo das gamas de concentrações foi adoptado tendo em conta o primeiro valor de referência da gama de concentrações terapêuticas evidenciadas na Tabela 3.4, assim como a experiência laboratorial na análise de ADs com outras metodologias analíticas actualmente implementadas no STF-N. O nível mais elevado das gamas de concentrações de cada composto foi ponderado de forma a abranger a zona do limite superior da gama de concentrações terapêuticas. Os intervalos seleccionados para cada AD encontram-se indicados na tabela 3.5.

A calibração propriamente dita foi efectuada com amostras brancas fortificadas nesses intervalos de concentração. Para cada AD foram utilizados 10 níveis de concentração, o mais equidistantes possível. As amostras utilizadas foram fornecidas pelo Instituto Português de Sangue, I.P. (IPS), tendo sido testadas anteriormente por outra metodologia analítica aplicada à determinação de ADs, de modo a evitar possíveis interferências.

A avaliação dos LD e LQ foi efectuada simultaneamente para todos os compostos. Tendo em conta as equações 1.2, 1.3 e 1.4, apresentadas no subcapítulo 1.6.4, obtiveram-se os resultados descritos na tabela 3.5. As Figuras 3.6 e 3.7 representam, a título exemplificativo, os resultados adquiridos no estudo destes parâmetros para a Clomipramina e para a Sertralina, respectivamente. Os dados relativos aos restantes compostos estudados encontram-se no Anexo C.

Os valores de LD e LQ mencionados na tabela 3.5 coadunaram-se com os valores plasmáticos ou serológicos típicos de todos os compostos em estudo (tabela 3.4), assegurando, desta forma, a possibilidade de iniciar a gama de trabalho nos níveis de concentração necessários para a determinação de AD, no âmbito do contexto da Toxicologia Forense.

**Tabela 3.5** Limites de detecção e de quantificação obtidos por GC/MS/MS.

Composto	Gama de Concentrações (ng/mL)	Regressão da curva de calibração	LD (ng/mL)	LQ (ng/mL)
Fluoxetina	[100-180]	Y=0,0101x-0,4353 r <sup>2</sup> =0,9944 S <sub>y/x</sub> =0,0217	7,13	21,60
Venlafaxina	[40-130]	y=0,0907x+1,2345 r <sup>2</sup> =0,9935 S <sub>y/x</sub> =0,2566	9,34	28,30
Amitriptilina	[10-100]	y=0,0028x-0,0011 r <sup>2</sup> =0,9982 S <sub>y/x</sub> =0,0034	3,98	12,06
Trimipramina	[10-100]	y=0,0036x-0,0159 r <sup>2</sup> =0,9989 S <sub>y/x</sub> =0,0034	3,10	9,40
Nortriptilina	[30-120]	y=0,0021x-0,0161 r <sup>2</sup> =0,9980 S <sub>y/x</sub> =0,0032	5,15	15,61
Mianserina	[10-100]	y=0,0262x-0,0768 r <sup>2</sup> =0,9980 S <sub>y/x</sub> =0,0308	3,88	11,74
Imipramina	[10-100]	y=0,0222x-0,0205 r <sup>2</sup> =0,9991 S <sub>y/x</sub> =0,0220	3,27	9,92
Mirtazapina	[10-100]	y=0,0976x-0,2612 r <sup>2</sup> =0,9992 S <sub>y/x</sub> =0,0974	3,29	9,98
Maprotilina	[30-120]	y=0,0034x-0,0106 r <sup>2</sup> =0,9965 S <sub>y/x</sub> =0,0071	6,80	20,61
Sertralina	[10-100]	y=0,0135x-0,0761 r <sup>2</sup> =0,9932 S <sub>y/x</sub> =0,0394	9,65	29,26
Dotiepina	[10-100]	y=0,0004x+0,0075 r <sup>2</sup> =0,9964 S <sub>y/x</sub> =0,0007	5,23	15,85
Citalopram	[10-100]	y=0,0016x-0,0058 r <sup>2</sup> =0,9977 S <sub>y/x</sub> =0,0025	5,03	15,24
Clomipramina	[10-100]	y=0,0025x+0,0081 r <sup>2</sup> =0,9953 S <sub>y/x</sub> =0,0053	7,10	21,50
N-Desmetilclomipramina	[20-110]	y=0,0023x-0,0110 r <sup>2</sup> =0,9939 S <sub>y/x</sub> =0,0048	6,82	20,68
Paroxetina	[80-170]	y=0,0154x-0,6041 r <sup>2</sup> =0,9915 S <sub>y/x</sub> =0,0434	9,31	28,21

y: razão entre a área do padrão analisado e a do PI; x concentração do AD em ng/mL

x: concentração do padrão analisado, em ng/mL.

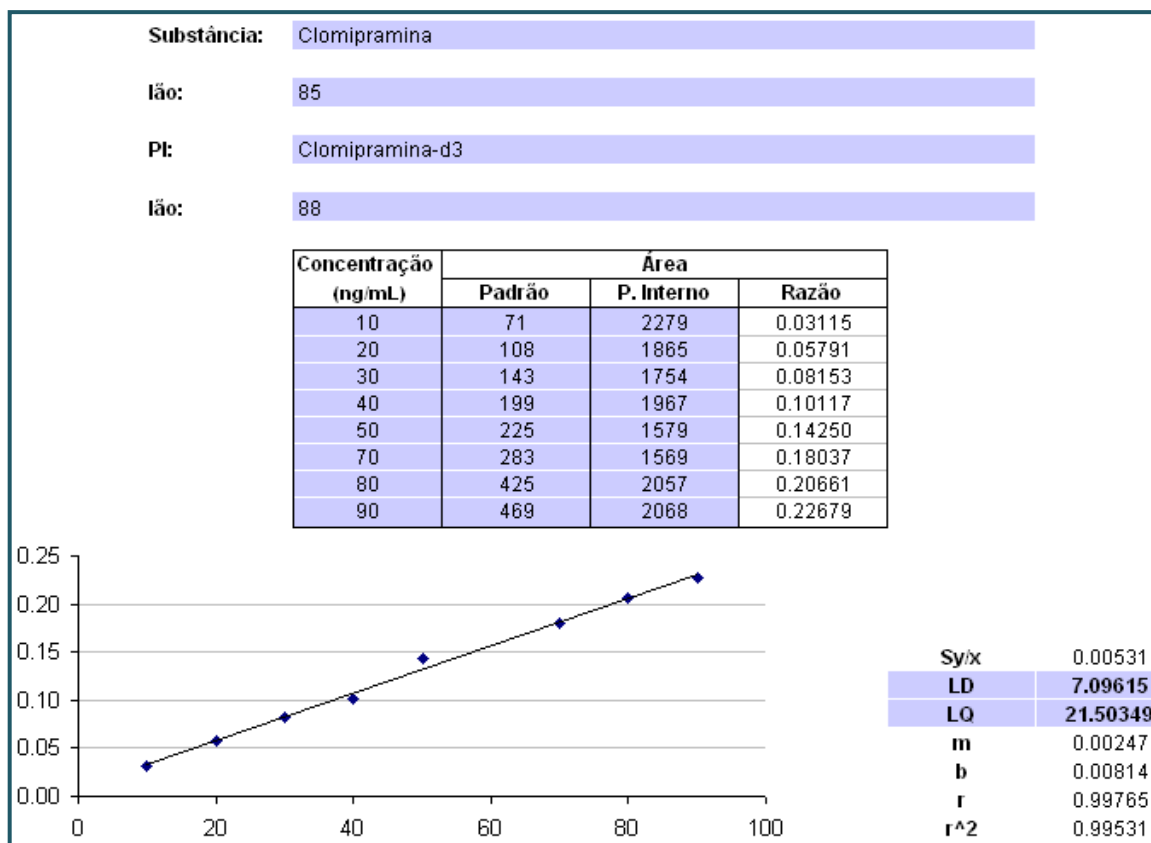


Figura 3.6 Dados do estudo dos limites de detecção e de quantificação da Clomipramina.

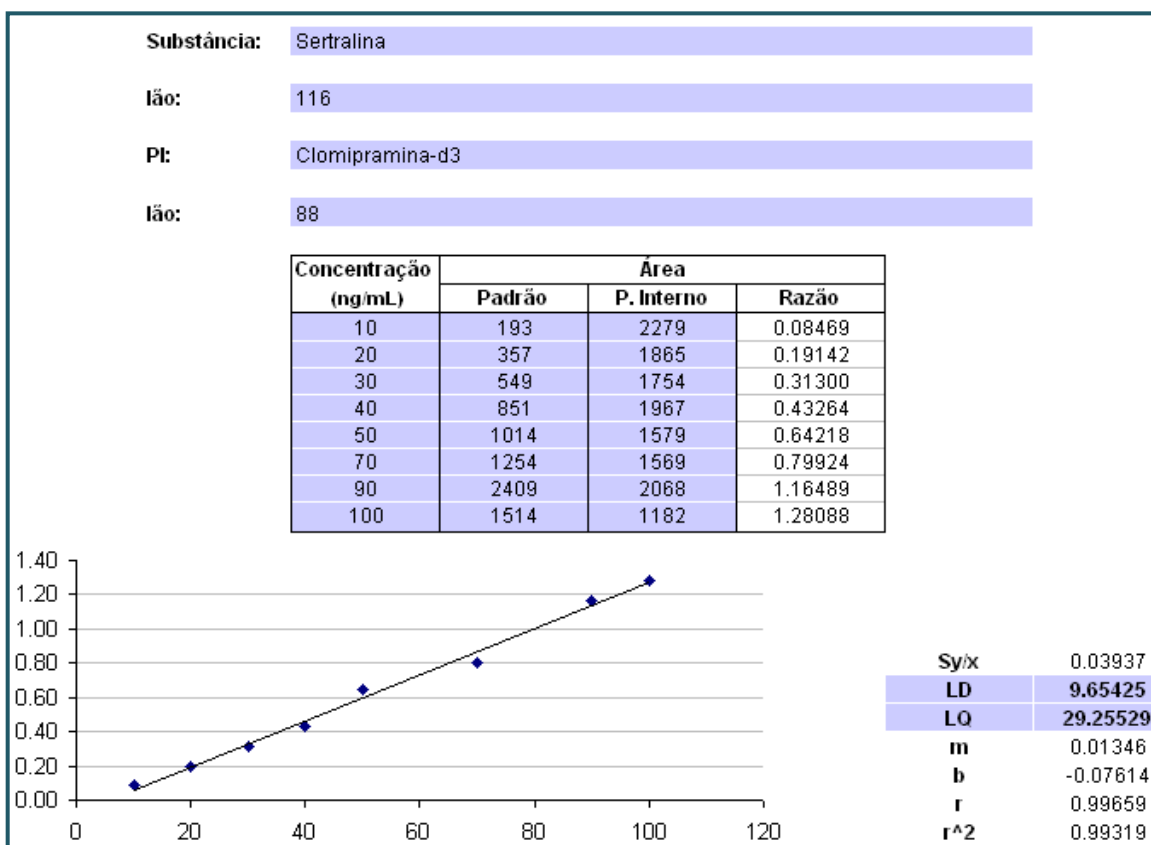


Figura 3.7 Dados do estudo dos limites de detecção e de quantificação da Sertralina.

A avaliação dos LD e LQ foi realizada de modo a cumprir os requisitos de aceitação implementados pelo STF-N, que consistiam em não rejeitar mais do que 20% dos pontos utilizados durante este estudo, e, visto que se trata de um método quantitativo que visa a sua aplicabilidade à rotina, o coeficiente de correlação dado pela equação da recta de calibração correspondente a cada composto teria de ser igual ou superior a 0,98. Uma vez verificados estes pressupostos, a gama de concentrações adoptada pode ser aceite.

### 3.2.3 Linearidade e Gama de Trabalho

O estudo da gama de trabalho e da linearidade procura identificar um determinado intervalo de concentrações em que os sinais analíticos são directamente proporcionais às concentrações utilizadas. A norma ISO 8466-1 estabelece um teste estatístico para a avaliação da linearidade, o qual foi adoptado pelo STF-N nos seus procedimentos de validação. Face ao histórico do STF-N relativamente à definição de gamas de trabalho e à aplicação das mesmas em rotina laboratorial, considerou-se a homocedasticidade das variâncias, relativamente à razão das áreas<sup>[52]</sup>.

Para o estudo da linearidade foram preparadas curvas de calibração com 10 níveis de concentração, distribuídos de forma regular ao longo do intervalo de concentrações, para cada um dos compostos em estudo<sup>[52]</sup>. Os níveis de concentração escolhidos foram definidos de forma a incluir o menor valor de referência da gama de concentrações terapêuticas, indicadas na Tabela 3.4. As concentrações máximas testadas, na maioria dos compostos, foram de cerca de 4000 ng/mL, com excepção da dotiepina em que o valor máximo de concentração analisado foi cerca de 10000 ng/mL, abrangendo, desta forma, quase todas as doses letais aí indicadas.

O estudo da linearidade foi determinado através da aplicação das equações Equação 1.5 e Equação 1.6 (apresentadas no subcapítulo 1.6.4) e da análise do coeficiente de correlação ( $r^2 > 0,99$ ) e da intercepção da recta na origem, incluindo o valor zero para um grau de confiança de 95%<sup>[52]</sup>. A título de exemplo, representam-se nas Figura 3.8 e Figura 3.9 os dados decorrentes deste estudo para a Clomipramina e a Sertralina, respectivamente. Os estudos relativos aos demais ADs podem ser encontrados no Anexo D. Os dados extraídos a partir das curvas de calibração encontram-se na Tabela 3.6.

**Tabela 3.6** Valores obtidos nos testes de linearidade.

Composto	Obs.*	Erro-padrão (função linear)	DS <sup>2</sup>	PG	r <sup>2</sup>	Intercepção (recta na origem)
Fluoxetina	9	0,632	0,407	1,022	0,994	[-0,318; 1,473]
Venlafaxina	9	20,995	1,240x10 <sup>3</sup>	4,030	0,992	[-44,943; 15,015]
Amitriptilina	8	0,119	2,538x10 <sup>-2</sup>	2,148	0,999	[-0,018; 0,357]
Trimipramina	10	0,171	2,936x10 <sup>-4</sup>	8,846x10 <sup>-3</sup>	0,999	[-0,208; 0,256]
Nortriptilina	8	0,321	0,196	2,321	0,998	[-0,065; 0,893]
Mianserina	10	1,890	3,595	1,007	0,997	[-1,101; 4,042]
Imipramina	10	2,901	17,769	2,511	0,995	[-5,914; 2,005]
Mirtazapina	8	14,376	35,686	0,148	0,997	[-38,298; 6,090]
Maprotilina	8	0,999	2,181	2,865	0,995	[-0,152; 2,830]
Sertralina	8	1,074	7,967x10 <sup>-2</sup>	5,818x10 <sup>-2</sup>	0,997	[-3,045; 0,617]
Dotiepina	8	0,175	1,844x10 <sup>-3</sup>	5,079x10 <sup>-2</sup>	0,994	[-0,062; 1,782]
Citalopram	9	0,204	0,162	7,405	0,995	[-0,102; 0,499]
Clomipramina	9	0,210	0,131	4,441	0,998	[-0,051; 0,570]
N-Desmetilclomipramina	8	0,617	0,690	2,159	0,992	[-0,062; 1,782]
Paroxetina	8	2,373	15,502	4,238	0,994	[-0,178; 7,322]

\*Obs. – Número de Observações

Os resultados obtidos indicaram que todos os compostos se ajustam a uma função de calibração linear, uma vez que os valores teste (PG) são inferiores a 647,8, valor da distribuição F de Fisher tabelado para n-1 graus de liberdade e um nível de confiança de 95%<sup>[69]</sup>. Verificou-se também que os coeficientes de correlação (r<sup>2</sup>) foram superiores a 0,99 e que a intercepção da recta incluiu o zero para um grau de confiança de 95%.

Relativamente às gamas de trabalho e de linearidade, é importante referir que os valores encontrados podem ser sujeitos a uma reavaliação posterior, durante a fase de validação/implementação do método de ensaio e sempre que este estudo se justifique, como em casos em que se torna necessário modificar a gama de trabalho, de forma a responder a fenómenos relacionados com a capacidade de resposta do equipamento ou de forma a ir ao encontro de novas informações químico-toxicológicas.

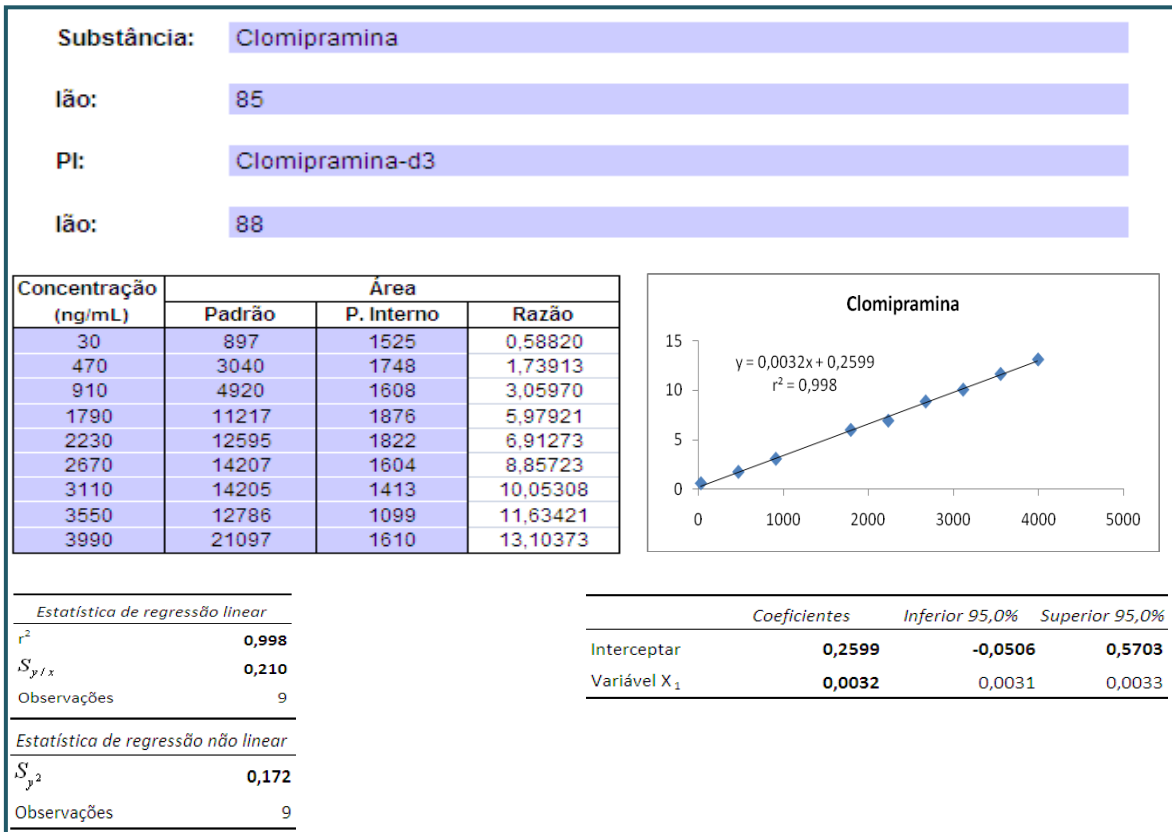


Figura 3.8 Dados do estudo da Linearidade da Clomipramina.

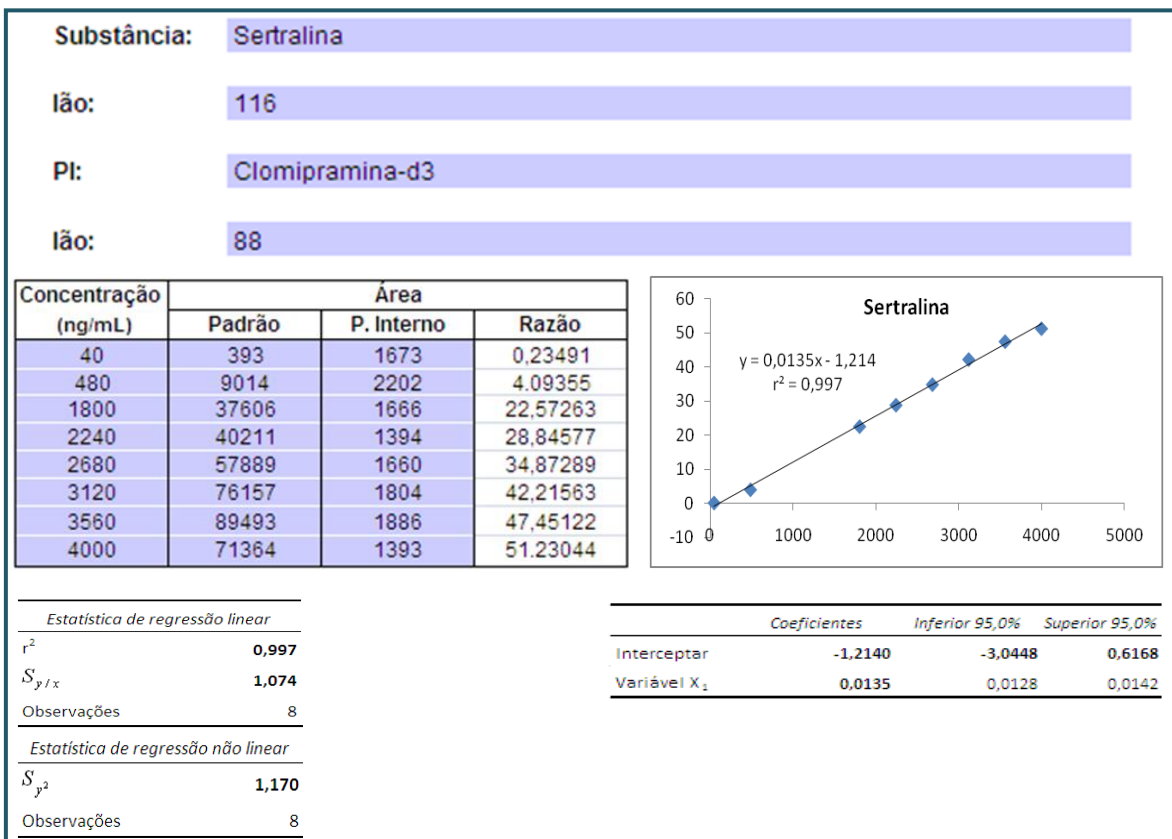


Figura 3.9 Dados do estudo da Linearidade da Sertralina.

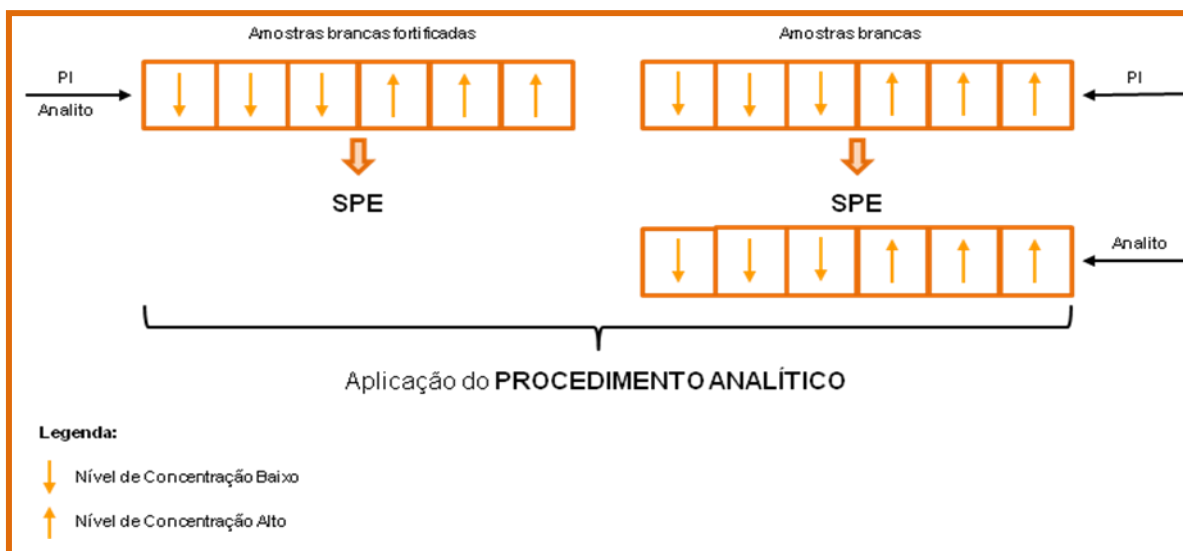
### 3.2.4 Eficiência de Extração

Os procedimentos extractivos são de extrema importância nos métodos cromatográficos mas originam perdas de analito. Estas perdas podem ser estimadas através de ensaios de recuperação, avaliando o rendimento de extração e, conseqüentemente, a eficiência do processo extractivo usado na preparação da amostra<sup>[78]</sup>.

Os ensaios de recuperação são realizados através da fortificação de uma amostra com uma quantidade conhecida de analito e da monitorização do montante de analito recuperado após o processo extractivo. As concentrações de analito testadas para este efeito devem obedecer aos critérios implementados pelo STF-N<sup>[52]</sup>, objectivando a sua implementação no mesmo serviço. Para este efeito, a concentração correspondente à gama baixa de concentração deve ser igual ou superior ao LQ e a concentração correspondente à gama alta de concentração deve ser igual ou inferior ao último nível da gama de trabalho (nível de concentração mais elevado).

Para o estudo da eficiência de extração aplicou-se o procedimento de ensaio em duas operações distintas. Deste modo foi necessário preparar, em triplicado, alíquotas de uma amostra branca fortificadas com duas concentrações distintas do analito em estudo (gama alta e baixa) e aplicar o procedimento extractivo descrito na Tabela 2.2 do subcapítulo 2.5. Paralelamente aplicou-se o mesmo procedimento extractivo a um número idêntico de alíquotas de amostras brancas e adicionou-se, aos extractos originários desta extração, a mesma quantidade de analito utilizada nas alíquotas referidas acima. A adição do PI aos conjuntos de amostras de ambas as fases foi efectuada antes do procedimento extractivo<sup>[52]</sup>. A Figura 3.10 tem por objectivo exemplificar o procedimento de ensaio aplicado ao estudo da eficiência de extração, sem a apresentação das amostras brancas usadas como controlo negativo.

Após a concretização de todo o procedimento de ensaio, foi aplicada a Equação 1.1 apresentada no subcapítulo 1.6.2, que permitiu a determinação da eficiência da fase extractiva para cada um dos analitos em estudo através de uma comparação directa entre o quociente das áreas dos picos correspondentes ao analito e ao PI, obtidas a partir de amostras fortificadas antes da extração, e a razão das áreas dos picos do mesmo analito adicionado após a extração, com a adição do padrão interno antes da fase extractiva<sup>[79]</sup>. Desta forma, e mantendo constantes todas as variáveis associadas à metodologia analítica de quantificação, incluindo a adição do PI, obtiveram-se as percentagens de analito recuperado que se encontram representadas na Tabela 3.7.



**Figura 3.10** Representação esquemática do modelo experimental aplicado ao estudo da eficiência de extração.

**Tabela 3.7** Rendimento de extração dos analitos estudados em sangue total.

Composto	Concentrações (ng/mL)	Rendimento médio de extração (%)	
		Nível baixo	Nível alto
Fluoxetina	[40] e [3000]	78	56
Venlafaxina	[40] e [3000]	121	74
Amitriptilina	[40] e [3000]	113	78
Trimipramina	[20] e [3000]	79	82
Nortriptilina	[40] e [3000]	32	51
Mianserina	[20] e [3000]	89	74
Imipramina	[20] e [3000]	93	80
Mirtazapina	[20] e [3000]	96	72
Maprotilina	[40] e [3000]	41	61
Sertralina	[40] e [3000]	38	60
Dotiepina	[20] e [7000]	74	112
Citalopram	[20] e [3000]	94	81
Clomipramina	[40] e [3000]	78	79
N-Desmetilclomipramina	[40] e [3000]	31	50
Paroxetina	[40] e [3000]	46	60

Para a avaliação da eficiência de extração foi necessário ter em conta os critérios de aceitação de resultados para este parâmetro, implementados pelo STF-N, nos quais constava que, para métodos qualitativos, a percentagem de recuperação deveria compreender valores entre os 20% e os 120%<sup>[52]</sup>.

Tendo em conta os valores apresentados na Tabela 3.7 pode-se verificar o cumprimento destes requisitos, com a excepção do nível baixo para a Venlafaxina. No entanto, tendo em conta o desvio apresentado relativamente ao valor definido como critério de aceitação (1 %), não se considera como sendo um factor crítico, dado que para o nível alto deste composto, o resultado apresenta-se dentro dos parâmetros estabelecidos. Através da análise dos resultados obtidos constata-se que os valores de analito recuperado, em sangue total, abrangem desde os valores de referência da gama de concentração terapêutica até à gama de concentração letal (valores enunciados na Tabela 3.4<sup>[77]</sup>).

No caso da Fluoxetina, Venlafaxina, Amitriptilina, Trimipramina, Mianserina, Imipramina, Mirtazapina, Citalopram e Clomipramina, os valores de recuperação abrangeram com segurança os valores de referência dos níveis da gama terapêutica, uma vez que evidenciaram valores acima dos LQ obtidos, até aos níveis da gama letal. Os compostos como a Nortriptilina, Maprotilina, Sertralina, Dotiepinina, N-Desmetilclomipramina e a Paroxetina apresentaram uma boa capacidade de recuperação desde níveis sub-terapêuticos, compreendidos entre os valores obtidos de LD e LQ (Tabela 3.5), e permitiram uma quantificação na gama dos níveis terapêuticos.

### **3.2.5 Arrastamento (*Carryover*)**

O estudo de eventuais fenómenos de arrastamento, parâmetro que visa verificar se uma amostra com uma elevada concentração de analito pode influenciar o resultado obtido na amostra seguinte, tal como foi mencionado no ponto 1.6.7., pode ser efectuado simultaneamente com qualquer um dos parâmetros de validação estudados que compõem o procedimento de validação realizado no STF da Delegação do Norte<sup>[52]</sup>.

Na sequência desta abordagem, a avaliação deste parâmetro foi analisada, simultaneamente, com o estudo da linearidade (Tabela 3.8) e com o estudo da eficiência de extração (Tabela 3.9), em que para cada um destes parâmetros foi preparada uma sequência analítica, com uma ou mais amostras brancas analisadas entre replicados positivos da gama alta<sup>[52]</sup>. Os valores obtidos encontram-se, respectivamente, na Tabela 3.8 e na Tabela 3.9.

No estudo de fenómenos de arrastamento com o parâmetro da linearidade foi preparada uma sequência de uma amostra branca (AMB) que foi analisada entre

replicados da injeção do nível de concentração mais elevado (Nível 10) de cada curva de calibração correspondente a cada um dos compostos analisados. Desta forma, a Tabela 3.8 demonstra uma forma representativa do procedimento realizado para a análise deste parâmetro.

**Tabela 3.8** Representação do estudo e dos resultados qualitativos da avaliação de fenómenos de Arrastamento no estudo da Linearidade.

Amostra	Nível 10	AMB	Nível 10	AMB	Nível 10	AMB
<b>Resultado</b>	+	-	+	-	+	-

Como foi referido no parâmetro da eficiência de extracção foram preparadas, em triplicado, alíquotas de uma amostra branca fortificadas com duas concentrações distintas (gama alta e gama baixa) do analito em estudo, e aplicado o procedimento de ensaio descrito no ponto 3.2.4. Assim, para o estudo de fenómenos de arrastamento foi realizada uma sequência analítica com uma amostra branca (AMB) analisada intercaladamente com os replicados do nível de concentração mais elevado estudado para cada um dos compostos. Este estudo foi realizado quer com amostras fortificadas com o analito, antes do procedimento extractivo, quer com a adição da mesma quantidade de analito aos extractos provenientes do procedimento extractivo. A Tabela 3.9 demonstra uma forma representativa do procedimento realizado para a análise deste parâmetro.

**Tabela 3.9** Representação do estudo e dos resultados qualitativos da avaliação de fenómenos de Arrastamento no estudo da Eficiência de Extracção.

Amostra	NA <sub>1</sub>	AMB	NA <sub>1</sub>	AMB	NA <sub>1</sub>	AMB	NA <sub>2</sub>	AMB	NA <sub>2</sub>	AMB	NA <sub>2</sub>	AMB
<b>Resultado</b>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-

AMB – Amostra Branca; NA<sub>1</sub> – Nível alto de concentração do analito adicionado antes do procedimento extractivo; NA<sub>2</sub> – Nível alto de concentração do analito adicionado após o procedimento extractivo

De acordo com a representação sequencial aplicada a cada uma das avaliações anteriormente descritas (Tabela 3.8 e Tabela 3.9) foi possível verificar que não se evidenciam fenómenos de arrastamento de amostras com um nível de concentração elevado, o que denota que as amostras posteriores não são influenciadas pela fase extractiva ou pela fase cromatográfica (GC/MS/MS).

### 3.2.6 Robustez

O estudo da robustez de um método de ensaio pretende avaliar a capacidade dos resultados não sofrerem alterações significativas, após a introdução deliberada de perturbações nas variáveis do respectivo método, fornecendo, assim, informação sobre o seu comportamento em condições normais de utilização<sup>[56,80]</sup>. Um método diz-se robusto quando se revela praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer aquando da sua execução<sup>[50]</sup>.

Desta forma, ao longo do processo de validação foram efectuadas variações de alguns factores, uns de forma propositada (extracção de forma automatizada e extracção manual, diferentes amostras brancas, diferentes solventes, soluções de trabalho, PIs e diferentes equipamentos de medição volumétrica) e outros no âmbito do normal funcionamento do equipamento (alteração da coluna cromatográfica, da seringa, do *liner* e do septo, limpeza da fonte, entre outros), a partir dos quais não se evidenciaram diferenças nos resultados analíticos.

O procedimento extractivo (mencionado na Tabela 2.2 do subcapítulo 2.5) pode ser realizado através de um procedimento manual ou de um procedimento automatizado, sendo que a aplicação do procedimento extractivo manual relativamente à utilização do procedimento extractivo automatizado não permite evidenciar variações significativas ao nível do sinal analítico.

Para um funcionamento normal e adequado de um equipamento analítico é necessário realizar um plano de manutenção interno (com intervenções diárias, semanais ou mensais), de modo a aumentar a sua longevidade e a garantir a obtenção de uma boa resposta analítica por parte do equipamento, permitindo assim ganhos ao nível da qualidade do resultado<sup>[81]</sup>. Obviamente que, adicionalmente, podem ser necessárias intervenções não programadas, sempre que o responsável pelo equipamento considere pertinente.

O plano de manutenção interna, no caso do GC/MS/MS, implica acções preventivas ou correctivas, como a mudança da coluna cromatográfica, do *liner*, do septo e da seringa, assim como a limpeza da fonte de ionização e a lavagem e mudança do *ion volume*, que devem ser realizadas sempre que ocorram alterações importantes nos sinais analíticos. Relativamente à seringa, a sua mudança também pode ser necessária no caso de esta estar inutilizada, devido a uma possível obstrução do canal da seringa que impedirá uma injeção reprodutível.

No caso de ser detectada a ocorrência de variações significativas nos factores acima mencionados, deve ser aplicado o sistema de CQI adoptado pelo laboratório, de forma a permitir a detecção dessas alterações no decorrer de análises de rotina<sup>[52]</sup>. Deste

modo, a aplicação do CQI permite garantir que o método é robusto, resistindo às eventuais variações da fase de preparação da amostra e da fase cromatográfica.

### **3.2.7 Exactidão**

Tal como já foi referido no ponto 1.6.5, a exactidão corresponde à expressão da influência da Precisão e da Veracidade no resultado analítico, sendo que quanto melhor o desempenho do ensaio nestes dois parâmetros, melhor a exactidão e, conseqüentemente, menor a incerteza associada ao resultado<sup>[70]</sup>.

No estudo deste parâmetro apenas serão apresentados os resultados correspondentes a dois dos compostos, nomeadamente, para a Clomipramina e para a Sertralina, que evidenciaram ser representativos do conjunto de ADs estudados.

#### **3.2.7.1 Precisão em condições de repetibilidade**

Tal como referido anteriormente, a precisão pode ser verificada em três condições distintas: repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade. Neste estudo avaliou-se a precisão apenas em condições de repetibilidade, uma vez que este modo de avaliação está associado à precisão obtida em condições semelhantes (mesmo laboratório, mesmo operador e equipamento, num curto intervalo de tempo)<sup>[62]</sup>.

Para a avaliação da precisão em condições de precisão intermédia no método de validação, seria necessária a aquisição de dados obtidos em ambiente de rotina, de forma a ser possível uma avaliação mais aprofundada do comportamento da gama de trabalho, isto é, através do estudo de sub-gamas previamente definidas. Todo este processo tornou-se condicionado pelo factor tempo, uma vez que, para aglomerar todos os resultados necessários para o estudo deste parâmetro, seria necessário um longo período de tempo de estudo, factor que não se coaduna com o período de tempo previsto para o desenvolvimento desta dissertação. Por fim, para a avaliação da precisão em condições de reprodutibilidade seria necessária a variação de algumas condições, como diferente operador e diferente laboratório, o que não é aplicável ao modo de operar dos STF do INML, I.P..

Para o estudo de repetibilidade foram preparados dois níveis de concentração (nível de concentração baixo e alto) representativos da gama de trabalho de cada um dos compostos, com dez ensaios para cada nível, sendo que estes se realizaram em cinco dias diferentes, com duplicados em cada um dos dias, para cada nível de concentração seleccionado<sup>[52]</sup>. A título exemplificativo dos resultados obtidos na estimativa da precisão nas condições de repetibilidade, estudo efectuado através do comportamento do

coeficiente de variação (Equação 1.8, na página 33) nos dois níveis de calibração representativos da gama de trabalho, serão apenas apresentados os valores referentes a dois dos compostos estudados, sendo estes representativos do comportamento de um composto com o seu PI deuterado homólogo (Clomipramina) e de um composto com o PI que lhe permitiu adquirir o melhor sinal analítico (Sertralina).

Para além dos resultados do estudo do coeficiente de variação obtidos a partir da média e do desvio-padrão da repetibilidade (Equação 1.7, na página 32), também serão apresentados os valores obtidos na determinação do limite de repetibilidade (Equação 1.9, na página 33), cujo valor serve, posteriormente, de critério de aceitação para a avaliação, e eventual aceitação, da diferença absoluta entre os dois resultados obtidos em condições de repetibilidade, com um intervalo de confiança de 95%<sup>[52]</sup>. Desta forma, e analisando os resultados apresentados, se se verificar a aceitação deste valor, o resultado final corresponde à média das duas determinações efectuadas.

Para a avaliação da precisão em condições de repetibilidade foi necessário ter em conta os critérios de aceitação de resultados implementados pelo STF-N para este parâmetro, ou seja, um coeficiente de variação menor do que 20%. Nas tabelas 3.10 e 3.11 é possível constatar que os valores de coeficiente de variação, nos dois casos, cumprem estes requisitos de aceitação.

### **3.2.7.2 Veracidade**

O estudo da Veracidade pode ser avaliado de diversas formas, como já foi evidenciado no ponto 1.6.5.2. Para o âmbito deste trabalho, o método escolhido para a obtenção da estimativa do valor de veracidade foi a avaliação do erro da veracidade a partir de ensaios de recuperação em amostras brancas fortificadas<sup>[1]</sup>.

O modelo experimental aplicado ao estudo da recuperação do método obrigou à preparação de dois níveis de concentração (nível de concentração baixo e alto) representativos da gama de trabalho de cada um dos compostos, com cinco ensaios para cada nível analisados em cinco dias diferentes. Posteriormente, para cada dia e nível de concentração determinou-se a recuperação e calculou-se, já numa fase final do estudo, a recuperação média (Equação 1.10, na página 34).

As tabelas 3.12 e 3.13 representam os resultados da estimativa da veracidade, nos dois níveis de calibração representativos da gama de trabalho, para os exemplos da Clomipramina e da Sertralina, respectivamente.

**Tabela 3.10** Estimativa da precisão em condições de Repetibilidade para os dois níveis de concentração representativos da gama de trabalho da Clomipramina.

100 ng/mL					
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
Réplica 1	159,66	95,15	171,34	143,19	64,7
Réplica 2	189,41	88,72	133,47	143,98	67,98
$s_r$	10,89				
CV(%)	6,24	11,85	7,15	7,58	16,42
<b>CV<sub>médio</sub>(%)</b>					
9,85					
<b>Limite de repetibilidade (%)</b>					
27,57					

2500 ng/mL					
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
Réplica 1	3381,16	2787,66	1351,48	2285,69	1908,57
Réplica 2	3028,6	2423,83	1343,55	2457,43	1843,63
$s_r$	120,51				
CV(%)	3,76	4,62	8,94	5,08	6,42
<b>CV<sub>médio</sub>(%)</b>					
5,77					
<b>Limite de repetibilidade (%)</b>					
16,15					

**Tabela 3.11** Estimativa da precisão em condições de Repetibilidade para os dois níveis de concentração representativos da gama de trabalho da Sertralina.

100 ng/mL					
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
Réplica 1	129,06	614,62	77,19	584,77	125,10
Réplica 2	140,60	619,26	88,08	578,28	119,61
$s_r$	4,16				
CV(%)	3,08	0,67	5,03	0,71	3,40
<b>CV<sub>médio</sub>(%)</b>					
2,58					
<b>Limite de repetibilidade (%)</b>					
7,22					

2500 ng/mL					
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
Réplica 1	2362,94	2516,91	1565,99	2436,74	2175,13
Réplica 2	2025,93	2180,15	1498,32	2472,45	2155,98
$s_r$	107,98				
CV(%)	4,92	4,60	7,05	4,40	4,99
<b>CV<sub>médio</sub>(%)</b>					
5,19					
<b>Limite de repetibilidade (%)</b>					
14,53					

**Tabela 3.12** Estimativa da Veracidade para os dois níveis de concentração representativos da gama de trabalho da Clomipramina.

100 ng/mL					
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
Réplica	95,15	88,72	143,19	143,98	133,47
R <sub>recuperação</sub>	0,9515	0,8872	1,4319	1,4398	1,3347
S <sub>Recup</sub>	0,2686				

$\bar{R}_m$
1,2090

2500 ng/mL					
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
Réplica	1908,57	2285,69	2423,83	2457,43	2787,66
R <sub>recuperação</sub>	0,7634	0,9143	0,9695	0,9830	1,1151
S <sub>Recup</sub>	0,1273				

$\bar{R}_m$
0,9491

**Tabela 3.13** Estimativa da Veracidade para os dois níveis de concentração representativos da gama de trabalho da Sertralina.

100 ng/mL					
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
Réplica	88,08	119,61	125,10	129,06	140,60
R <sub>recuperação</sub>	0,8808	1,1961	1,2510	1,2906	1,4060
S <sub>Recup</sub>	0,1969				

$\bar{R}_m$
1,2049

2500 ng/mL					
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
Réplica	2180,15	2362,94	2436,74	2472,45	2516,91
R <sub>recuperação</sub>	0,8721	0,9452	0,9747	0,9890	1,0068
S <sub>Recup</sub>	0,0528				

$\bar{R}_m$
0,9575

Os resultados obtidos foram avaliados tendo em conta os critérios de aceitação de resultados para métodos quantitativos implementados pelo STF-N, para este parâmetro, ou seja, os valores de recuperação média não deveriam ser significativamente diferentes de 100%<sup>[1]</sup>. Assim sendo, e tendo em conta os resultados apresentados nas Tabela 3.12 e Tabela 3.13, pode-se constatar que, nos dois casos apresentados, as recuperações não excedem os 20%, em média, do valor teoricamente considerado como ideal (100%), o que se traduz no cumprimento dos critérios de aceitação implementados.

### 3.2.7.3 Incerteza de Medição

O cálculo da incerteza é uma característica que acompanha todo o procedimento de validação de um método analítico, sendo um processo dinâmico, com uma avaliação

indexada ao ciclo de vida do procedimento de ensaio analítico. A Incerteza de medição é um parâmetro que visa caracterizar a dispersão dos valores da grandeza que são atribuídos à mensuranda a partir das informações usadas<sup>[62]</sup>.

Tal como descreve o ponto 1.6.5.3, a avaliação deste parâmetro pode ser realizada por diversas abordagens, sendo que, para o âmbito deste trabalho, se optou por quantificar a incerteza de medição, tendo por base os dados de validação e/ou controlo interno de qualidade (precisão em termos de repetibilidade e erro de veracidade). Nesta abordagem, as componentes de incerteza, componentes individuais de cada um dos parâmetros referidos anteriormente, são combinadas (Incerteza-padrão combinada). As determinações da incerteza associada à precisão avaliada em condições de repetibilidade e da incerteza associada à veracidade foram obtidas a partir das Equação 1.11 e Equação 1.12, respectivamente, e a combinação destas duas componentes independentes foi calculada através da expressão demonstrada na Equação 1.14.

Como também foi referido na parte introdutória, quando o método é aplicável a uma elevada gama de concentrações, os componentes de incertezas devem ser contabilizados como componentes independentes de uma expressão multiplicativa e, sempre que as incertezas associadas à precisão avaliada em condições de repetibilidade e à veracidade são estimadas recorrendo a um número elevado de ensaios experimentais, a incerteza pode ser determinada para um nível de confiança aproximadamente igual a 95%, designando-se por incerteza expandida combinada<sup>[62]</sup> (Equação 1.15).

Nas Tabela 3.14 e Tabela 3.15 são apresentados os resultados estimados para a incerteza associada à precisão em condições de repetibilidade, para a incerteza associada à veracidade, para a incerteza-padrão combinada e para a incerteza expandida combinada, nos dois níveis de calibração representativos da gama de trabalho, correspondentes aos exemplos dos compostos admitidos anteriormente (Clomipramina e Sertralina), respectivamente.

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, pode-se dizer que:

- Para o nível de calibração baixo: Clomipramina =  $100 \pm 30,27$  ng/mL;  
Sertralina =  $100 \pm 21,54$  ng/mL.
- Para o nível de calibração alto: Clomipramina =  $2500 \pm 288,36$  ng/mL;  
Sertralina =  $2500 \pm 125,04$  ng/mL.

**Tabela 3.14** Estimativa das incertezas para os dois níveis de concentração representativos da gama de trabalho da Clomipramina.

100 ng/mL		
Repetibilidade	$u_{\text{precisão}} = s_r$ (%)	2,02
Veracidade	$u(\bar{R}_m)$ (%)	14,52
Padrão Combinada	$u(y)$	15,14
Expandida Combinada	$U(y)$	30,27

2500 ng/mL		
Repetibilidade	$u_{\text{precisão}} = s_r$ (%)	2,02
Veracidade	$u(\bar{R}_m)$ (%)	5,40
Padrão Combinada	$u(y)$	144,18
Expandida Combinada	$U(y)$	288,36

**Tabela 3.15** Estimativa das incertezas para os dois níveis de concentração representativos da gama de trabalho da Sertralina.

100 ng/mL		
Repetibilidade	$u_{\text{precisão}} = s_r$ (%)	1,87
Veracidade	$u(\bar{R}_m)$ (%)	10,61
Padrão Combinada	$u(y)$	10,77
Expandida Combinada	$U(y)$	21,54

2500 ng/mL		
Repetibilidade	$u_{\text{precisão}} = s_r$ (%)	1,07
Veracidade	$u(\bar{R}_m)$ (%)	2,26
Padrão Combinada	$u(y)$	62,52
Expandida Combinada	$U(y)$	125,04

## 4 Conclusões e Sugestões para Trabalhos Futuros

---

Relativamente ao desenvolvimento da metodologia analítica, incluíram-se neste estudo a determinação dos tempos de retenção e a caracterização dos respectivos espectros de massa e o estudo dos parâmetros de aquisição para 15 antidepressivos e dois padrões internos deuterados. Foi possível separar e identificar inequivocamente todos os compostos considerados neste estudo através dos tempos de retenção, que compreenderam valores entre os 8,48 e os 15,86 minutos, e dos respectivos espectros de massa, adquiridos em modo SIM-SIM.

O método revelou-se específico e selectivo, quando confrontado com amostras reais, dada a ausência de falsos resultados positivos e negativos e, conseqüentemente, de interferências provenientes da matriz. A identificação dos compostos analisados foi, mais uma vez, inequívoca.

Os LD e LQ obtidos para os quinze ADs estudados com o método implementado permitem a detecção de valores inferiores aos níveis de concentração sub-terapêuticos e, por isso, a determinação directa do teor destes fármacos em sangue total.

Relativamente à Linearidade/Gama de trabalho, o intervalo de concentrações obtido dependeu do AD considerado, estando localizado entre 10 e 9910 ng/mL para toda a gama de compostos analisados. De um modo geral, as menores concentrações do intervalo linear foram obtidas para os ADs Citalopram, Dotiepina, Trimipramina e Mianserina, e as maiores para a Sertralina.

A extracção por SPE revelou-se de extrema importância, já que as amostras de sangue não podem ser injectadas directamente no cromatógrafo. A eficiência desta extracção foi também adequada, uma vez que se encontrava compreendida entre os valores limite previstos para estas metodologias no STF-N.

Durante todo o procedimento de validação, o método comprovou ser robusto, salvaguardando sempre a aplicação dos planos de manutenção aos equipamentos e a adequada rastreabilidade de padrões e de reagentes. Paralelamente, verificou-se a inexistência de fenómenos de arrastamento durante a fase extractiva e a fase analítica, ocorrência que protege o método de situações comuns, como a análise de amostras com concentrações elevadas.

Por fim, a avaliação da Exactidão do método, ou seja, a determinação da Precisão, da Veracidade e da Incerteza de medição foi concretizada nas condições disponíveis aquando do período de validação de um método. Desta forma, a precisão foi avaliada em condições de repetibilidade, tendo-se evidenciado coeficientes de variação inferiores a 20%, valores que cumpriam os critérios de aceitação de resultados implementados pelo STF-N. O mesmo se constatou com a avaliação da veracidade, na qual se obteve valores de recuperação que não excederam os 120%.

De um modo geral, e tendo como finalidade a aplicação do método às análises toxicológicas de rotina do STF-N, o estudo dos parâmetros, qualitativos e quantitativos, permitiu confirmar a adequabilidade do método ao seu propósito, uma vez que, quando comparado a outras técnicas analíticas, como por exemplo GC-MS e HPLC-MS, aplicáveis à detecção de ADs, permite a obtenção de resultados com maior sensibilidade. No entanto, é importante considerar que este método deve, como qualquer outro, ser alvo de constantes melhorias. Neste sentido, propõem-se algumas abordagens que poderão ser tidas em conta em trabalhos futuros neste domínio:

- Avaliação da Precisão Intermédia, após a implementação deste método em análises toxicológicas de rotina, assim como o estudo da Veracidade e da estimativa da Incerteza de medição através de participações em ensaios interlaboratoriais.
- Optimização da fase extractiva, de forma a garantir a aquisição de melhores sinais analíticos, nomeadamente, a Microextração em Fase Sólida.
- Estudo de factores de diluição, de forma a estimar o factor de diluição das amostras mais concentradas que as enquadre na gama de trabalho definida.
- Avaliação da estabilidade dos analitos na fase extractiva e na fase cromatográfica, a longo prazo, ou seja, no âmbito do tempo necessário para a execução de uma série de trabalho, assim como em ciclos de congelação/descongelação da amostra ou do extracto da amostra.
- e por fim, o estudo do comportamento dos diferentes analitos com o seu PI deuterado homólogo.

## 5 Referências Bibliográficas

---

- [1] Presidência da República: Aprova a orgânica do Instituto Nacional de Medicina Legal, I.P., no Diário da República, 1ª série – N.º82 – 27 de Abril de 2007, 2643-2648 (Decreto-Lei nº 131/2007 de 27 de Abril).
- [2] Teixeira, H.. Curso Superior de Medicina Legal 2010/2011 – *Introdução à Toxicologia Forense*. Instituto Nacional de Medicina Legal, I.P. da Delegação do Norte.
- [3] Presidência da República: Aprova os Estatutos do Instituto Nacional de Medicina Legal, I.P., no Diário da República, 1ª série – N.º83 – 30 de Abril de 2007, 2833-2838 (Portaria nº 522/2007 de 30 de Abril).
- [4] Fontes, I.; Família C. (2010-2011). *Psicofármacos: Antidepressivos e Anti-psicóticos – Abordagem Clínica e Forense, Perícia Toxicológica e Aspectos Analíticos*. Licenciatura em Ciências Forenses e Criminais, 3ºano – 1ºsemestre, do Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz.
- [5] *História – Toxicologia Aplicada*. Disponível em <http://lrc.nutes.ufrj.br/toxicologia/ml.hist.htm>, consultado a 2 de Setembro de 2011.
- [6] Maurer, H.H. (2006). *Hyphenated mass spectrometric techniques-indispensable tools in clinical and forensic toxicology and doping control*. *Journal of Mass Spectrometry* **41**: 1399-1413. John Wiley & Sons, Ltd.
- [7] Rangel, R. (2003/2004). *Medicina Legal/Noções gerais sobre outras Ciências Forenses*, Capítulo 1: *Toxicologia Forense*. Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.

- [8] Cañadas, E.V. (2001). *Medicina Legal y Toxicología*. Masson. Capítulo 51: Introducción a la toxicología, pp. 597-604.
- [9] Franke, J.P.; Zeeuw, R.A. (1998). *Solid-phase extraction procedures in systematic toxicological analysis - Review*. *Journal of Chromatography B*, **713** 51-59. Elsevier.
- [10] Karch, S.B., MD, FFLM (2008). *Post-mortem Toxicology of Abuse Drugs*. Chapter 3: *Common Methods in Post-mortem Toxicology*, pp.32-49. CRC Press, Taylor & Francis Group: New York.
- [11] Karch, S.B., MD, FFLM (2008). *Postmortem Toxicology of Abuse Drugs*. Chapter 2: *Specimen Selection, Collection, Preservation and Security*, pp.14-26. CRC Press, Taylor & Francis Group: New York.
- [12] Skoop, G. (2004). *Preanalytic aspects in post-mortem toxicology*. *Forensic Science International*, **142** 75-100. Elsevier.
- [13] Jickells, S.; Negrusz, A. (2008). *Clarke's Analytical Forensic Toxicology*. Chapter 7: *Post-mortem toxicology*, 191-217. Pharmaceutical Press: London.
- [14] Cañadas, E. V.; Martínez, A.P.; Jerez, A. F. (2001). *Medicina Legal y Toxicología*. Masson. Capítulo 58: Investigación toxicológica, pp.686-701.
- [15] Repetto, M.; Repetto, G. (2009). *Toxicología Fundamental*. 4ª Edición. Sevilla : Díaz de Santos. Capítulo 14: *El análisis químico toxicológico*, pp. 494-519.
- [16] Drummer, O. H. (2004). *Postmortem toxicology of drugs of abuse*. *Forensic Science International*, **142** 101-113. Elsevier.
- [17] Costa, P.; Curso Superior de Medicina Legal 2010/2011 – *Perícia Toxicológica. A importância da cadeia de custódia em Toxicologia Forense*. Instituto Nacional de Medicina Legal, I.P. da Delegação do Norte.
- [18] Repetto, M. (2009). *Toxicología Fundamental*. 4ª Edición. Sevilla : Díaz de Santos. Capítulo 8, 342-364.
- [19] Wolff, K.; Farrell, M.; Marsden, J.; Monteiro, M.G.; Ali, R.; Welch, S.; Strang, J. (1999). *A review of biological indicators of illicit drug use, practical considerations and clinical usefulness*. s.l. : Addiction. pp. 94:1279-98.

- [20] World Health Organization (2010). *Mental health - Disorders management*. Disponível em:[http://www.who.int/mental\\_health/management/depression/definition/en/index.html](http://www.who.int/mental_health/management/depression/definition/en/index.html) (Consultado a 7 de Agosto de 2011).
- [21] Ministério da Saúde e Instituto Nacional de Farmácia e do Medicamento (2002). *Evolução do Consumo de Antidepressivos em Portugal Continental de 1995 a 2001: Impacto das medidas reguladoras*. Observatório do Medicamento e dos Produtos de Saúde.
- [22] *Indicadores e Metas do PNS* (2010). Disponível em: <http://www.acs.min-saude.pt/pns/acessibilidade-ao-medicamento/consumo-de-medicamentos-ansioliticos-hipnoticos-e-sedativos-e-antidepressivos-no-mercado-do-sns-em-ambulatorio/> (Consultado a 15 de Outubro de 2011).
- [23] Souza, F. (Maio, 1999). *Tratamento da depressão*. Rev. Bras. Psiquiatr.: Depressão – Vol.21, pp. 18-23. (versão PDF descarregada a 15 de Outubro de 2011).
- [24] Infarmed, Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde I.P. (Março, 2010). *Prontuário Terapêutico: Sistema Nervoso Central – Psicofármacos: Antidepressores*, pp.120 – 135. Ministério da Saúde (versão PDF descarregada a 29 de Março de 2011).
- [25] Moreno, R.; Moreno, D.; Soares, M. (Maio 1999). *Psicofarmacologia de Antidepressivos: Depressão* – vol.21, pp. 24-40. Revista Brasileira de Psiquiatria.
- [26] Costa, E. (2010). *Depressão: Consumo de Antidepressivos em Portugal e na Europa*. Licenciatura em Ciências Farmacêuticas da Universidade Fernando Pessoa/Faculdade Ciências da Saúde.Porto.
- [27] Hajhashemi, V.; Sadeghi, H.; Minaiyan, M.; Movahedian, A.; Talebi, A. (2010). *Central and peripheral anti-inflammatory effects of maprotiline on carrageenan-induced paw edema in rats*. Inflammation Research 59:1053-1059, ©Springer Basel AG.
- [28] Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Aspectos das Vias de Neurotransmissão (PUC-Rio – Certificação Digital N°0610324/CA). [http://www2.dbd.puc-rio.br/pergamum/tesesabertas/0610324\\_07\\_cap\\_03.pdf](http://www2.dbd.puc-rio.br/pergamum/tesesabertas/0610324_07_cap_03.pdf) (versão PDF descarregada a 30 de Março de 2011).

- [29] Actlabs - *Quality Analysis, Innovative Technologies GC/MS & GC/MS/MS Methods*. Disponível em <http://www.actlabs.com/page.aspx?menu=65&app=221&cat1=534&tp=2&lk=no>, consultado a 13 de Janeiro de 2011.
- [30] Chiaradia, M.C.; Collins, C.H.; Jardim, I.C. (2008). *O Estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos – revisão*. *Quim. Nova*, Vol.31, nº3, 623-636.
- [31] Jickells, S.; Negrusz, A. (2008). *Clarke's Analytical Forensic Toxicology. Chapter 18 – Gas Chromatography*, pp. 469-511. © Pharmaceutical Press. London.
- [32] Niessen, W.M.A. (2001). *Current Practice of Gas Chromatography-Mass Spectrometry. Part I: Principles and Instrumentation of Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, pp. 1-29. Marcel Dekker, Inc.: New York.
- [33] Agilent Technologies. *Topic 1: 7000A Quadrupole GC/MS/MS*. (versão PDF descarregada a 13 de Janeiro de 2011).
- [34] Rouessac, F.; Rouessac, A. (2007). *Chemical Analysis, Modern Instrumentation Methods and Techniques*. 2th edition. *Part 1: Separation Methods*, pp. 1-161. John Wiley & Sons, Ltd. France.
- [35] Grande, M.. *Cromatografia Gasosa – Princípios Básicos*. Scientific Instruments CO. do Brasil, Instrumentação Científica, Ltda. (versão PDF descarregada em 24 de Agosto de 2011).
- [36] Neves, H.; Freitas, A. (1996). *Introdução à Cromatografia Gás-Líquido de Alta Resolução*. 1ª edição. Capítulo 3: *Técnicas de introdução da amostra*, pp. 59-88. Dias de Sousa, Ltd, Portugal.
- [37] Caldas, S.S.; Gonçalves, F.F.; Primel, E.G.; Prestes, O.D.; Martins, M.L.; Zanella, R. (2011). *Principais técnicas de preparo de amostras para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjos de diodos e por espectrometria de massas-Revisão*. *Quim. Nova*, Vol. XY, nº 00, 1-14.

- [38] *Sample preparation in Chromatography. Journal of Chromatography library* – volume 65. Chapter 11 – *Sorbent Extraction*, pp.341-399 (versão PDF descarregada a 15 de Janeiro de 2011).
- [39] Scott, K.S.; Oliver, J.S. (July/August 1997). *Development of a Supercritical Fluid Extraction Method for the Determination of Temazepam in Whole Blood. Journal of Analytical Toxicology*. Vol. 21, pp. 297-300.
- [40] McDonald, P.D. (2001). *A Sample Preparation Primer and Guide to Solid Phase Extraction Methods Development*. ©Waters Corporation, PDF edition (versão PDF descarregada a 17 de Agosto de 2011).
- [41] Beney, P.J.; Breuer, G.M.; Jacobs, G.H.; Larabee-Zierath, D.; Mollenhauer, P.J.; Norton, K.K.; Wichman, M.D. (December 1996). *Review, Evaluation and Application of Solid Phase Extraction Methods*. Hotline - Solid Phase Extraction. The University of Iowa : Hygienic Laboratory. Vol. 35, nº 6, pp. 1-5.
- [42] Stimpfl, T.; Vycudilik, W. (2004). *Automatic screening in post-mortem toxicology. Forensic Science International*, **142** 115-125. Elsevier Ireland Ltd.
- [43] Christian G.D. (2004). *Analytical Chemistry*. 6th edition. Wiley International Edition. John Wiley Sons. Hoboken.
- [44] Fritz, J. S. (2000). Analytical Solid-Phase Extraction. *Talanta* **51**, 1235.
- [45] *Waters Oasis® sample extraction products* (2003). ©Waters Corporation (versão PDF descarregada a 18 de Agosto de 2011).
- [46] Inoue, H.; Maeno, Y.; Iwasa, M.; Matoba, R.; Nagao, M., (Sep 11 2000). *Screening and determination of Benzodiazepines in whole blood using solid-phase extraction and gás chromatography/mass spectrometry. Forensic Science International*, **113** (1-3), 367-373.
- [47] Waters Corporation. *Pharmaceutical Applications Notebook*. Waters Oasis Sample Extraction Products, 2202.
- [48] Waters Corporation (2001). *Forensic Applications Notebook*. Waters Oasis Sample Extraction Products.

- [49] Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. DOQ-CGCRE-008 (Revisão 01 – Março/2003). *Orientação sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos*. InMetro (documento de carácter orientativo em versão PDF descarregada em 18 de Agosto de 2011).
- [50] Relacre (Fevereiro, 2000). *Guia Relacre 13 - Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química*. Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal.
- [51] NP EN ISO 9001:2000. *Sistemas de Gestão da Qualidade – Fundamentos e vocabulário*.
- [52] *Procedimento Técnico: Validação de Ensaio* (2010), Serviço de Toxicologia Forense, da Delegação do Norte do INML, IP.
- [53] NP EN ISO/IEC 17025:2005. *Requisitos Gerais para Competência de Laboratórios de Ensaio e de Calibração*.
- [54] Ermer, J. (2001). *Validation in pharmaceutical analysis. Part I: An integrated approach*. Elsevier Science. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (24): 755-767.
- [55] Peter, F.T., Maurer, H.H. (2002). *Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology – A review*. © Springer-Verlag. *Accred Qual Assur* (7): 441-449.
- [56] EUROCHEM Guide (December 1998). *The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. 1st Internet version (versão PDF descarregada em 18 de Agosto de 2011).
- [57] Hassan Y. Aboul – Enein (2000). *Selective versus Specificity in chromatographic analytical methods*. © Springer-Verlag. *Accred Qual Assur* (5): 180-181.
- [58] Vessman J., Stefan R., Staden J., Danzer K., Lindner W., Burns D., Fajgelj A., Müller H. (2001). *Selectivity in Analytical Chemistry*. © 2001 IUPAC. *Pure Appl. Chem.*, Vol.73, Nº.8, pp. 1381-1386.
- [59] Ellison, S.L.R., Rosslein, M., Williams, A. (2002). *Primeira Edição Brasileira do Guia EURACHEM/CITAC - Determinando a Incerteza na Medição Analítica*. 2ª edição. Capítulo 3, pp.14-18 (versão PDF descarregada a 19 de Agosto de 2011).

- [60] ICH-Q2A (March 1995). *Guideline for Industry – Text on Validation of Analytical Procedures*. (versão PDF descarregada em 18 de Agosto de 2011).
- [61] ICH (November 1996). *Guideline for Industry – Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology*. (versão PDF descarregada em 18 de Agosto de 2011).
- [62] Instituto Português da Qualidade (Novembro, 2008). *Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM) – Guia ISO/IEC 99:2007 – Versão portuguesa, 3ª edição*.
- [63] Moffat, A.C.; Osselton, M.D.; Widdop, B. (2004). *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and post-mortem material*. 3rd edition. London: Pharmaceutical Press. Volume I, Capítulo 28, pp.442.
- [64] Skoog, Douglas A.; Holler, F. James; Crouch, Stanley R. (2007). *Principles of Instrumental Analysis*. Pacific Grove: Brooks Cole. pp.1039.
- [65] Repetto, M.; Repetto, G. (2009). *Toxicología Fundamental*. 4ª Edición. Sevilla : Díaz de Santos.
- [66] Lide, D. R., ed (2005). *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. 86th edition. Boca Raton (FL): CRC Press.
- [67] Miller, J.N.; Miller, J.C. (2005). *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. 5th edition. Chapters 2, 4, 5 and Appendix 2: *Statistical tables – Table A.2*. Prentice Hall. England.
- [68] Analytical Methods Committee No.13 (Sep 2003). *Amc technical brief: Terminology – the key to understanding analytical science, Part 1: Accuracy, precision and uncertainty*. ©Royal Society of Chemistry 2003.
- [69] Sánchez, A.M. (Outubro, 2002). *Incertidumbre en Métodos Analíticos de Rutina*. Universitat Rovira i Virgili (Tarragona): Departament de Química Analítica i Química Orgànica, Àrea de Química Analítica (Tese de Doutoramento em Química, em versão PDF descarregada a 25 de Novembro de 2011).
- [70] Instituto Português de Acreditação (2007). *Guia para a Quantificação de Incertezas em Ensaios Químicos (OGC007)*.
- [71] American Board of Forensic Toxicology™ - ABFT. *Forensic Toxicology Laboratory Accreditation Manual*. (versão PDF descarregada a 19 de Agosto de 2011).

- [72] OGC002. 2005. *Guia para Acreditação de Laboratórios Químicos*. Instituto Português de Acreditação (IPAC).
- [73] *Procedimento Técnico: Controlo da Qualidade Interno* (2010), Toxicologia Forense do INML, IP da Delegação do Norte.
- [74] ISO/IEC 17043:2010. *Conformity assessment - General requirements for proficiency testing*.
- [75] Foltz, R.; Fentiman, A.; Foltz, R. (August 1980). *GC/MS Assays for Abused in Body Fluids*. Chapter 2: *Experimental Considerations and Operations Common to All of the Assays*. National Institute on Drug Abuse, Research Monograph 32.
- [76] European Virtual Institute for Speciation Analysis (EVISA), © 2003-2010. Gilson, Inc - GX-271 ASPEC™ Solid Phase Extraction System. Disponível em <http://www.speciation.net/Database/Instruments/Gilson-Inc/GX271-ASPEC-SolidPhase-Extraction-system> [consultado a 18 de Setembro de 2011].
- [77] The International Association of Forensic Toxicologists. *Therapeutic and Toxic Drug Concentrations List*. [www.tiaft.org](http://www.tiaft.org) (consultado a 10 de Fevereiro de 2011).
- [78] Chasin, A.A.M.; Nascimento, E.S.; Ribeiro-Neto, L.M.; Siqueira, M.E.P.B.; Andraus, M.H.; Salvadori, M.C.; Fernícola, N.A.G.; Gorni, R.; Salcedo, S. (1998). *Validação de Métodos em Análises Toxicológicas: uma Abordagem Geral*. *Revista Brasileira de Toxicologia* **11** 1-6.
- [79] Coutinho, F. (2007). *Uso do Método de LC-DAD-MS na Análise de Benzodiazepinas em Amostras post-mortem*. Dissertação de Mestrado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.
- [80] Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. DOQ-CGCRE-008 (Revisão 01 – Março/2003). *Orientação sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos*. InMetro (documento de carácter orientativo em versão PDF descarregada em 18 de Agosto de 2011).
- [81] *Instrução de Equipamento: Guia de Utilização GCMSMS001* (2011), Serviço de Toxicologia Forense, da Delegação do Norte do INML, IP.

# ANEXOS

---

# ANEXO A

Desenvolvimento de um método analítico

## ANEXO A.1, Espectros de Massa em Modo SCAN

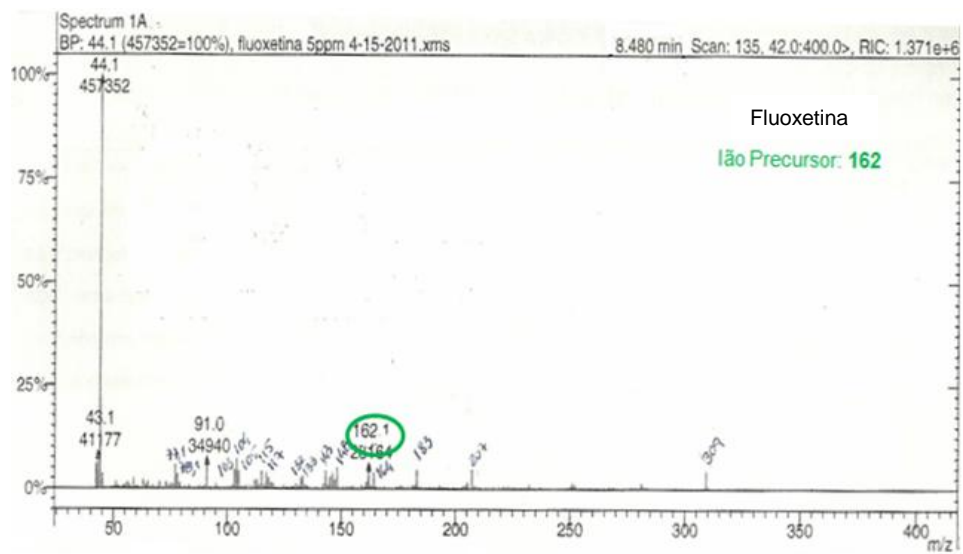


Figura A.1.1 Selecção do ião-precursor, no espectro de massa obtido em modo SCAN, para a Fluoxetina.

## ANEXO A.1 (continuação)

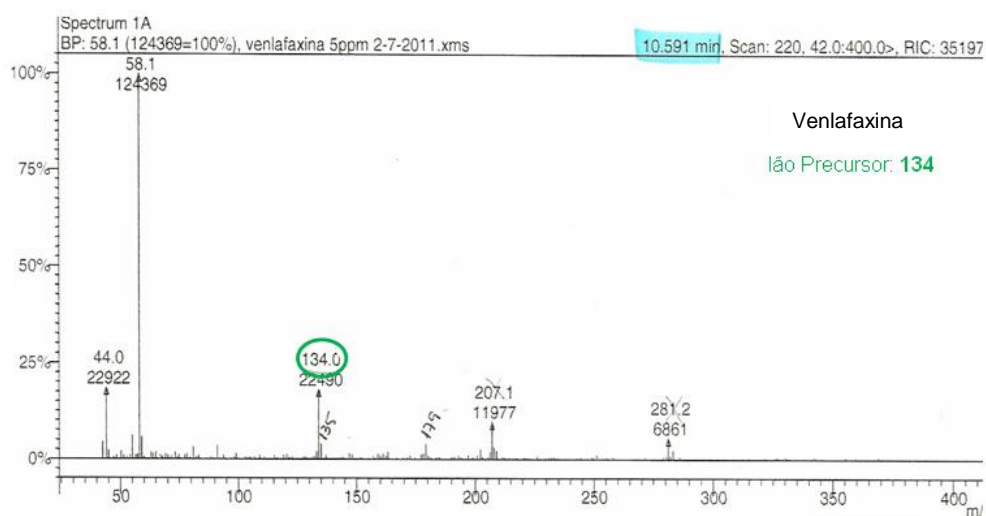


Figura A.1.2 Selecção do ião-precursor, no espectro de massa obtido em modo SCAN, para a Venlafaxina.

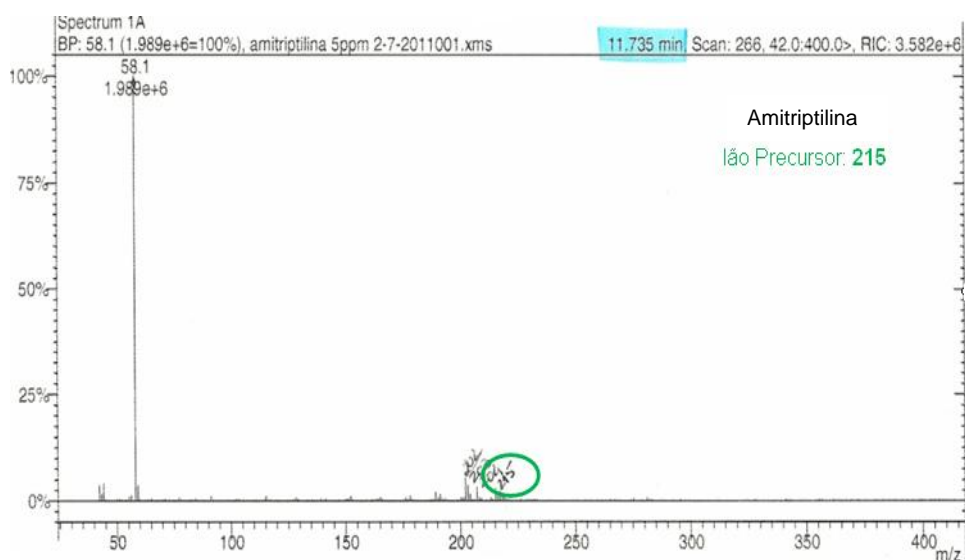


Figura A.1.3 Selecção do ião-precursor, no espectro de massa obtido em modo SCAN, para a Amitriptilina.

## ANEXO A.1 (continuação)

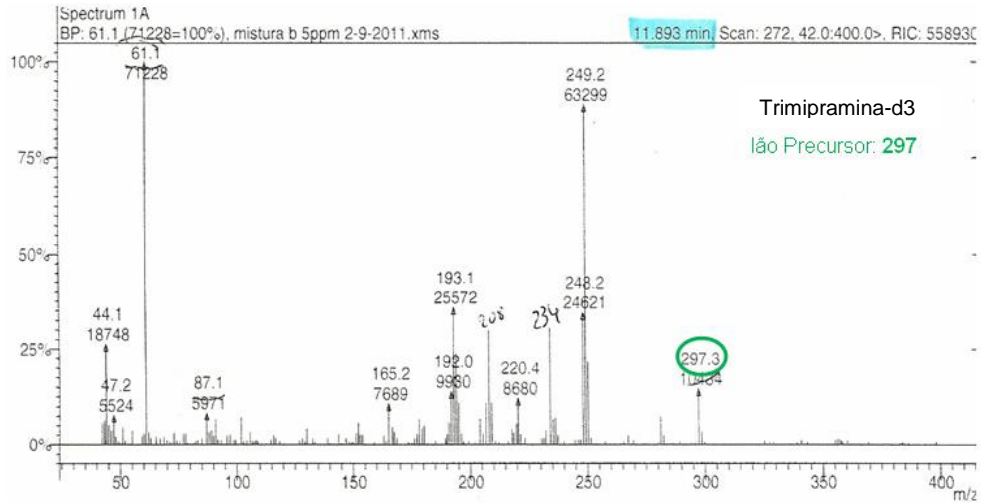


Figura A.1.4 Seleção do ião-precursor, no espectro de massa obtido em modo SCAN, para a Trimipramina-d3.

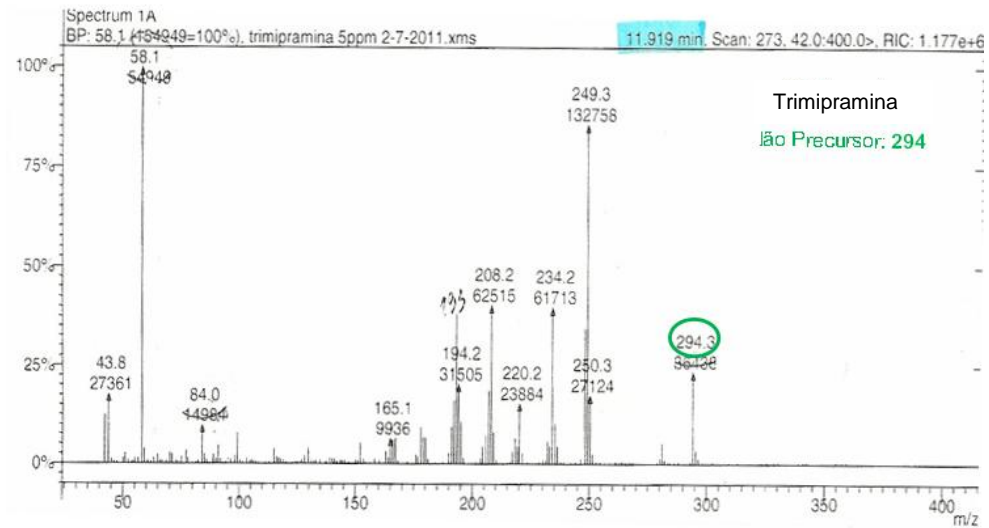


Figura A.1.5 Seleção do ião-precursor, no espectro de massa obtido em modo SCAN, para a Trimipramina.

## ANEXO A.1 (continuação)

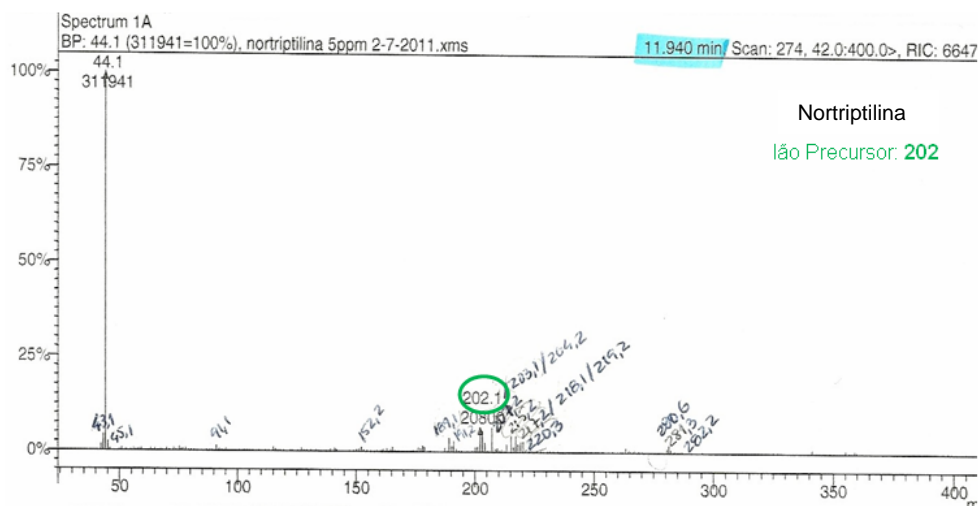


Figura A.1.6 Selecção do ião-precursor, no espectro de massa obtido em modo SCAN, para a Nortriptilina.

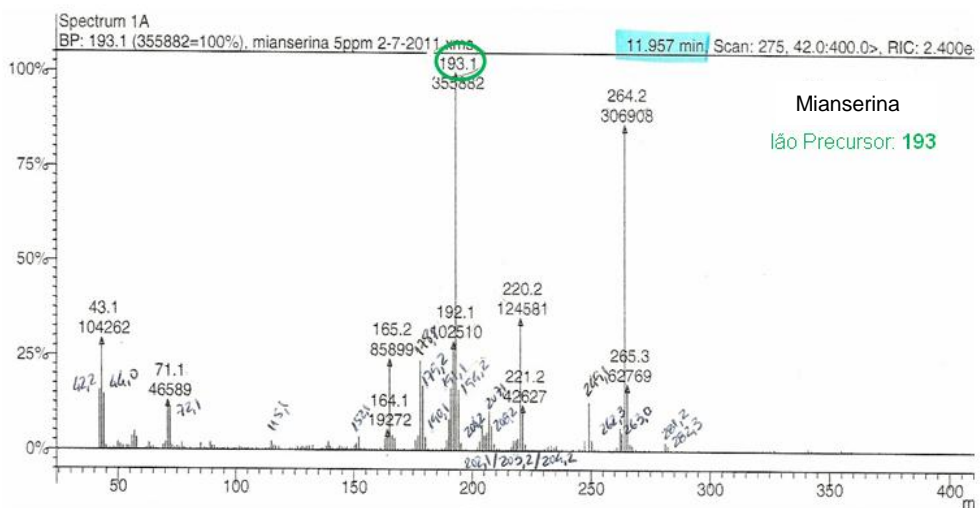


Figura A.1.7 Selecção do ião-precursor, no espectro de massa obtido em modo SCAN, para a Mianserina.

## ANEXO A.1 (continuação)

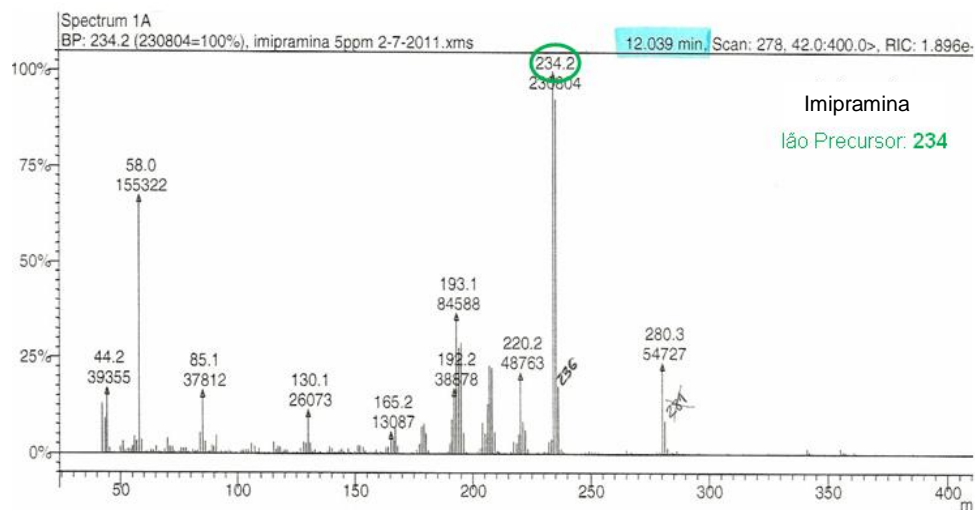


Figura A.1.8 Seleção do ião-precursor, no espectro de massa obtido em modo SCAN, para a Imipramina.

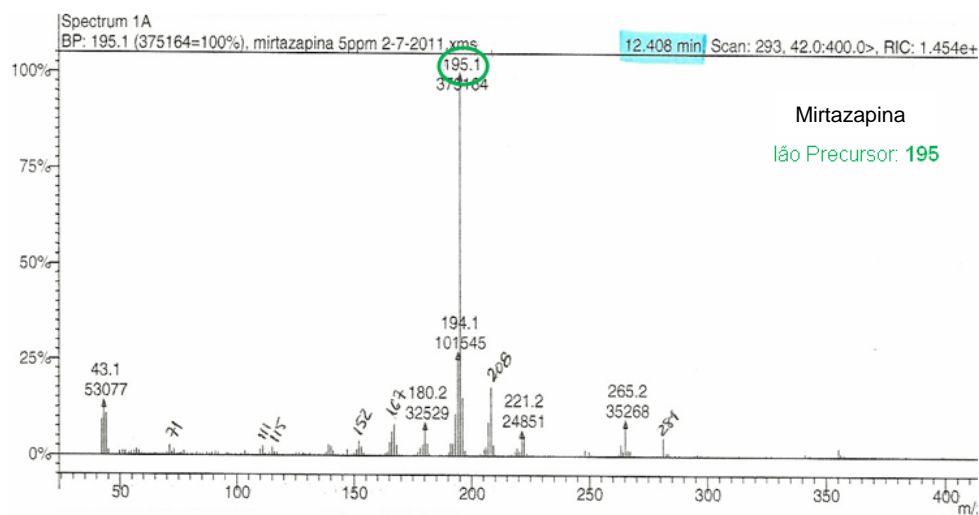


Figura A.1.9 Seleção do ião-precursor, no espectro de massa obtido em modo SCAN, para a Mirtazapina.

## ANEXO A.1 (continuação)

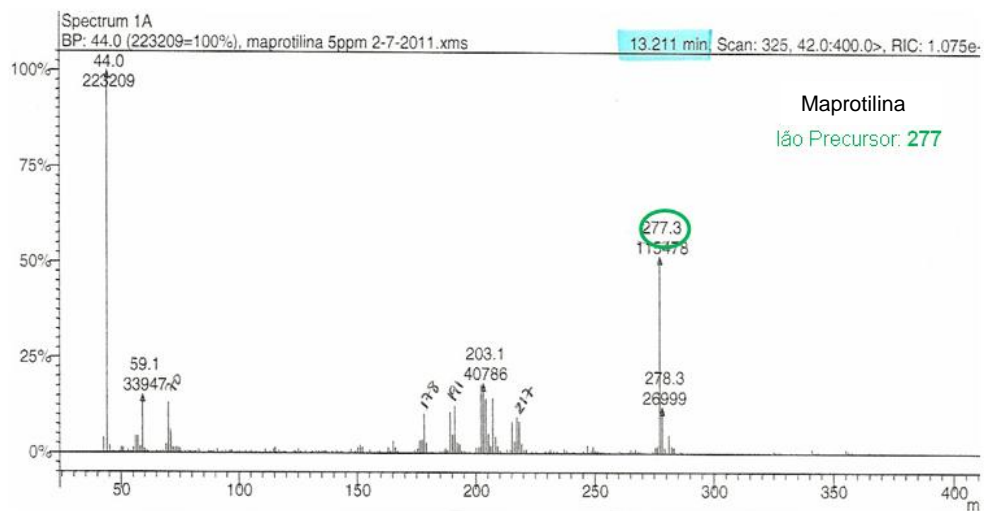


Figura A.1.10 Seleção do íão-precursor, no espectro de massa obtido em modo SCAN, para a Maprotilina.

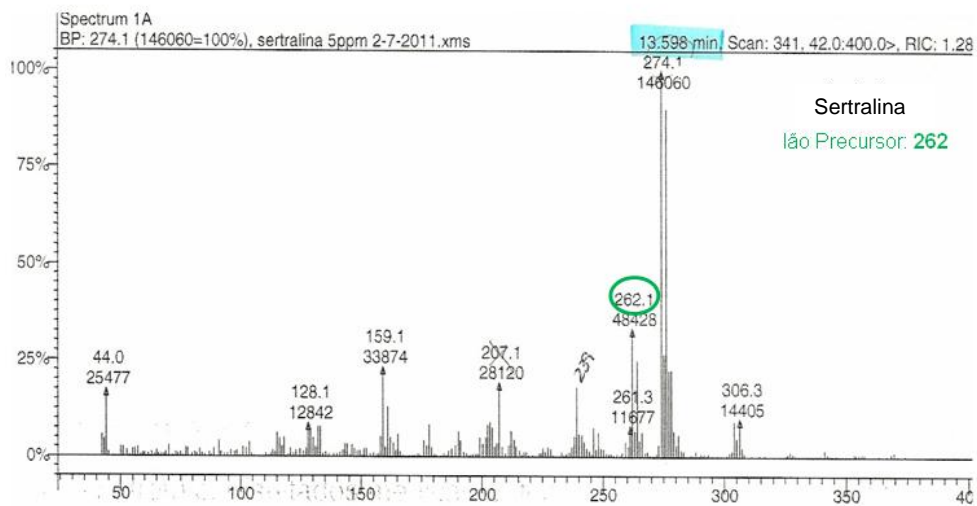


Figura A.1.11 Seleção do íão-precursor, no espectro de massa obtido em modo SCAN, para a Sertralina.

## ANEXO A.1 (continuação)

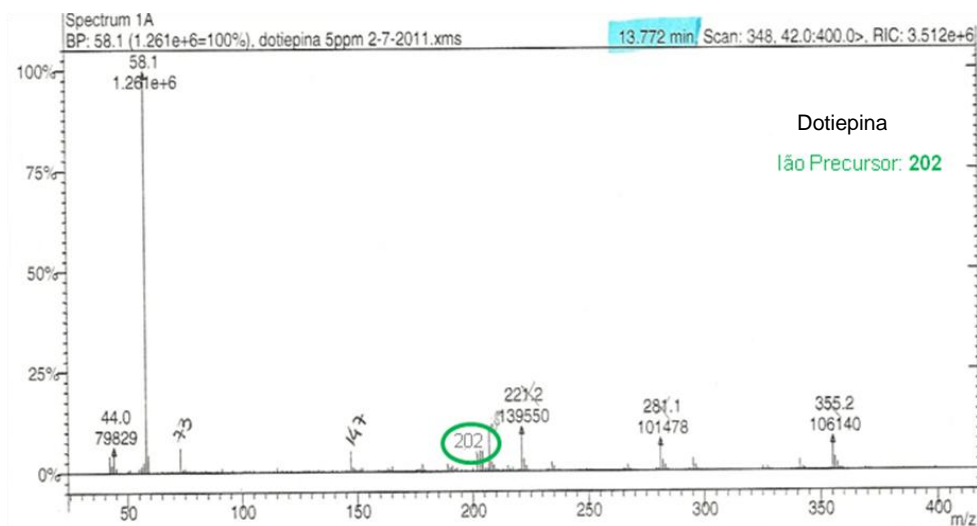


Figura A.1.12 Seleção do íão-precursor, no espectro de massa obtido em modo SCAN, para a Dotiepinga.

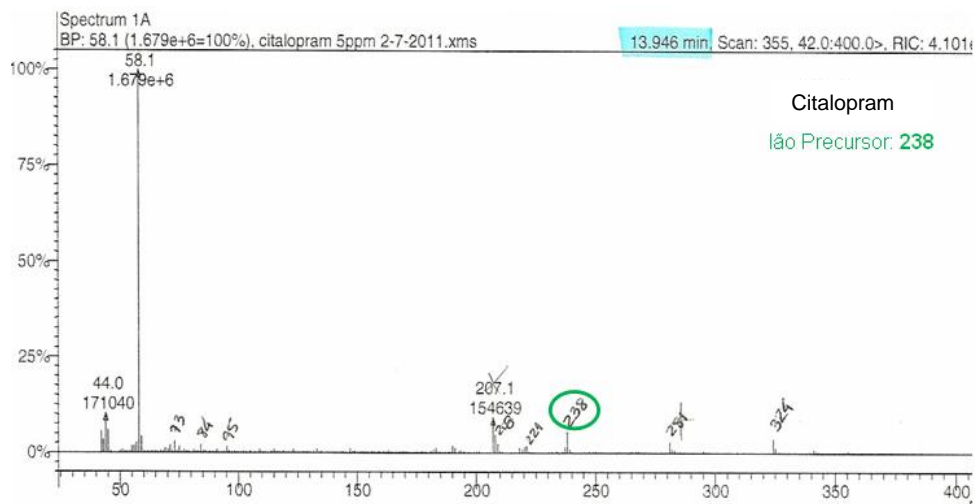


Figura A.1.13 Seleção do íão-precursor, no espectro de massa obtido em modo SCAN, para a Citalopram.

## ANEXO A.1 (continuação)

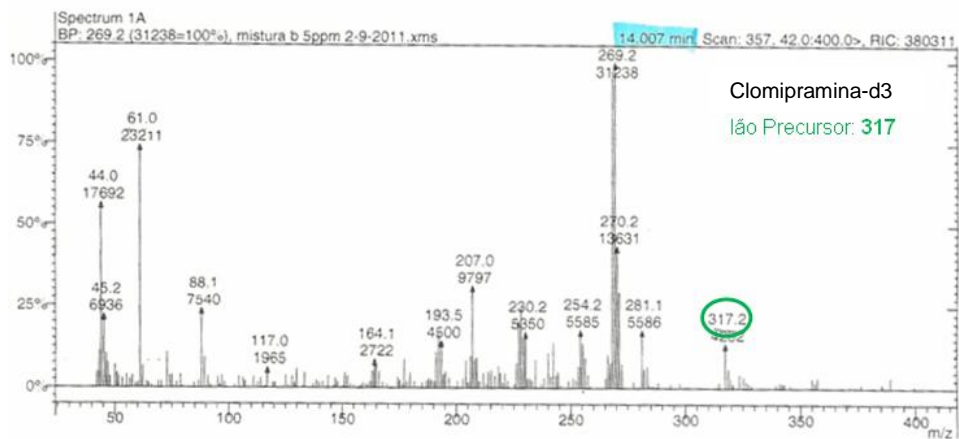


Figura A.1.14 Seleção do Ião-precursor, no espectro de massa obtido em modo SCAN, para a Clomipramina-d3.

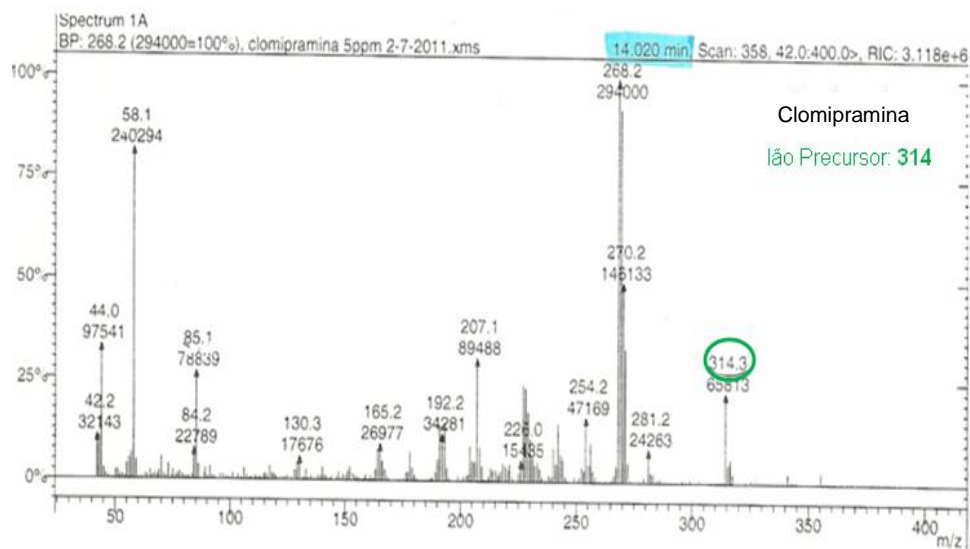


Figura A.1.15 Seleção do Ião-precursor, no espectro de massa obtido em modo SCAN, para a Clomipramina.

## ANEXO A.1 (continuação)

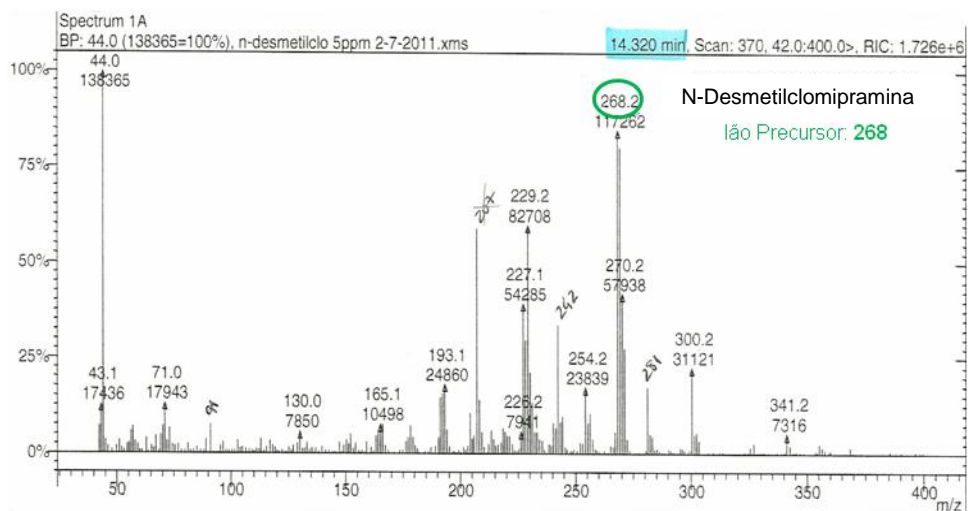


Figura A.1.16 Seleção do Ião-precursor, no espectro de massa obtido em modo SCAN, para a N-Desmetilclomipramina.

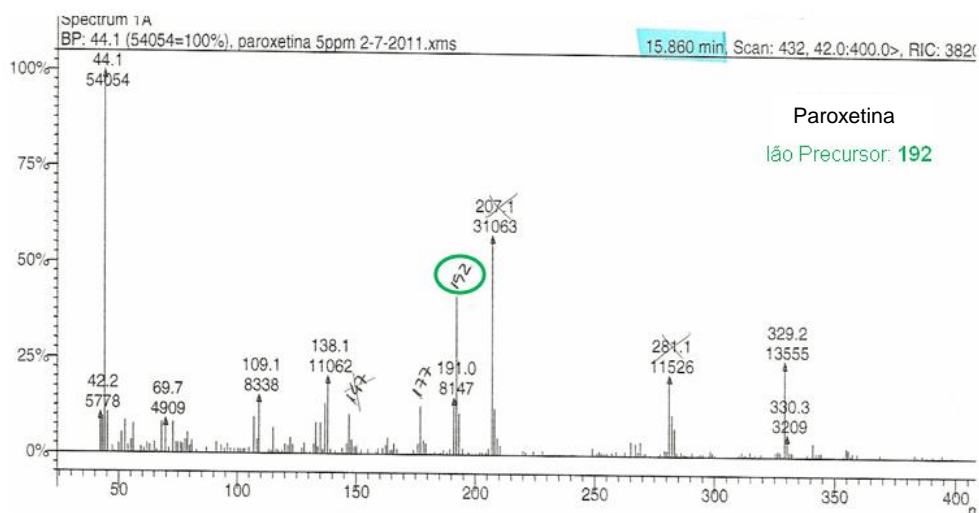


Figura A.1.17 Seleção do Ião-precursor, no espectro de massa obtido em modo SCAN, para a Paroxetina.

## ANEXO A.2, Espectros de Massa em Modo SIM-SCAN

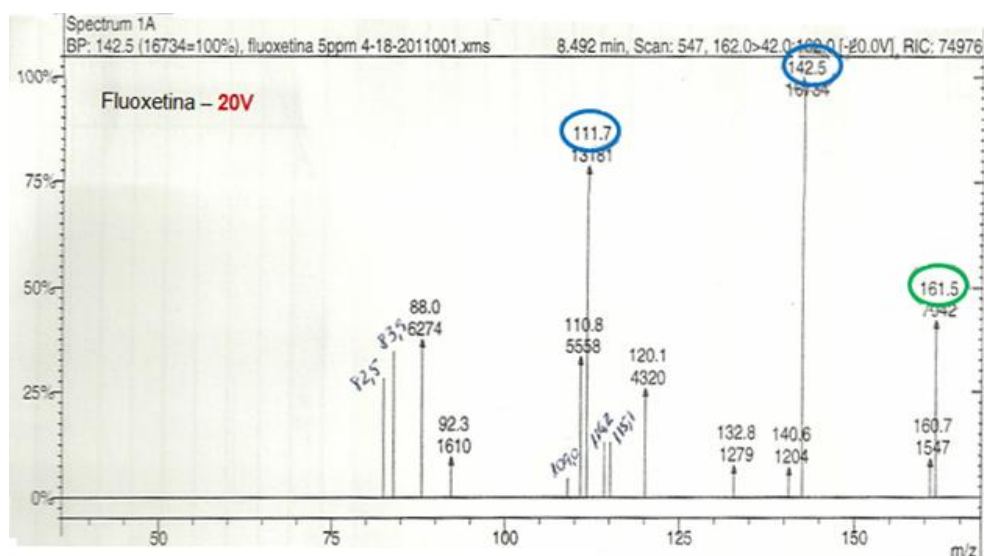


Figura A.2.1 Selecção do ião-precursor e dos iões-produto com a energia de colisão seleccionada, no espectro de massa obtido em modo SIM-SCAN, para a Fluoxetina.

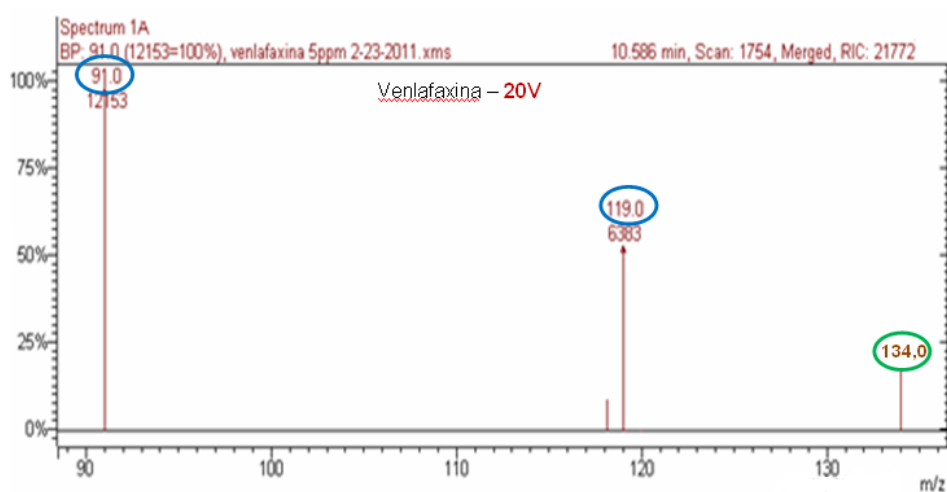
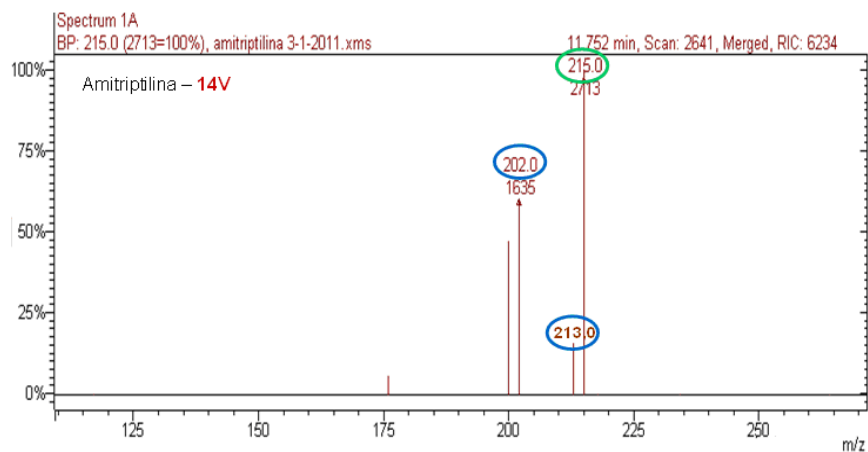
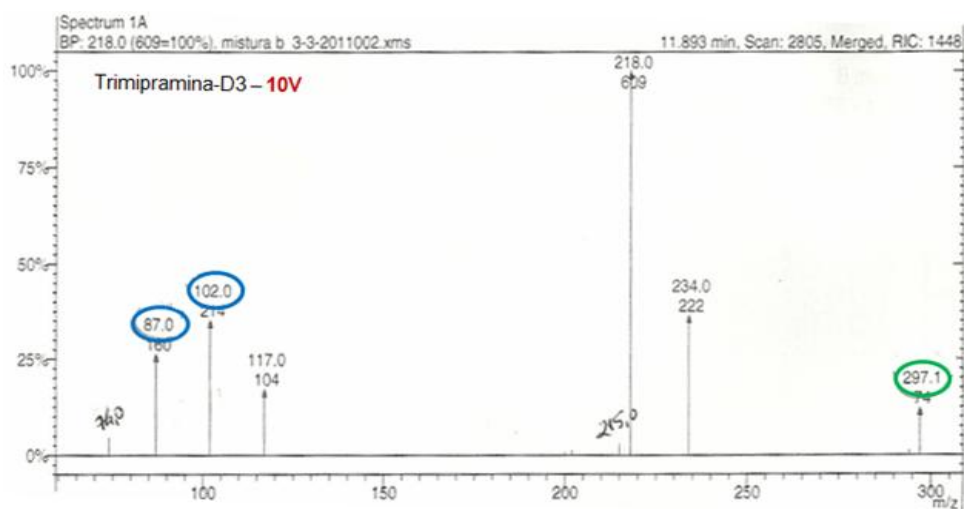


Figura A.2.2 Selecção do ião-precursor e dos iões-produto com a energia de colisão seleccionada, no espectro de massa obtido em modo SIM-SCAN, para a Venlafaxina.

## ANEXO A.2 (continuação)

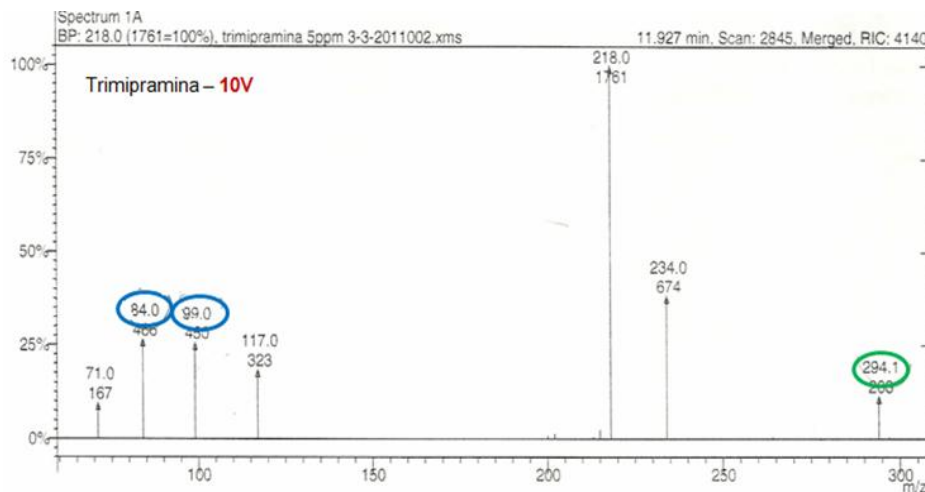


**Figura A.2.3** Selecção do ião-precursor e dos iões-produto com a energia de colisão seleccionada, no espectro de massa obtido em modo *SIM-SCAN*, para a Amitriptilina.

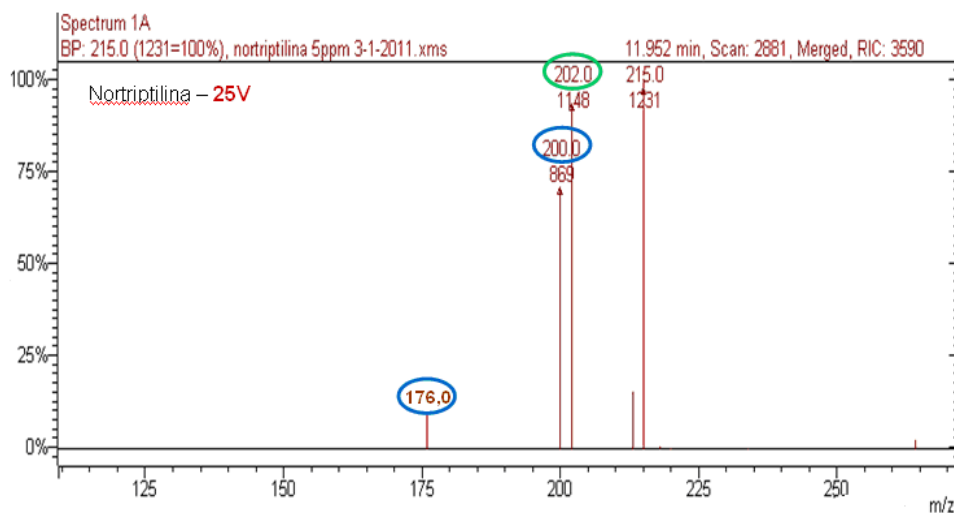


**Figura A.2.4** Selecção do ião-precursor e dos iões-produto com a energia de colisão seleccionada, no espectro de massa obtido em modo *SIM-SCAN*, para a Trimipramina-d3.

## ANEXO A.2 (continuação)

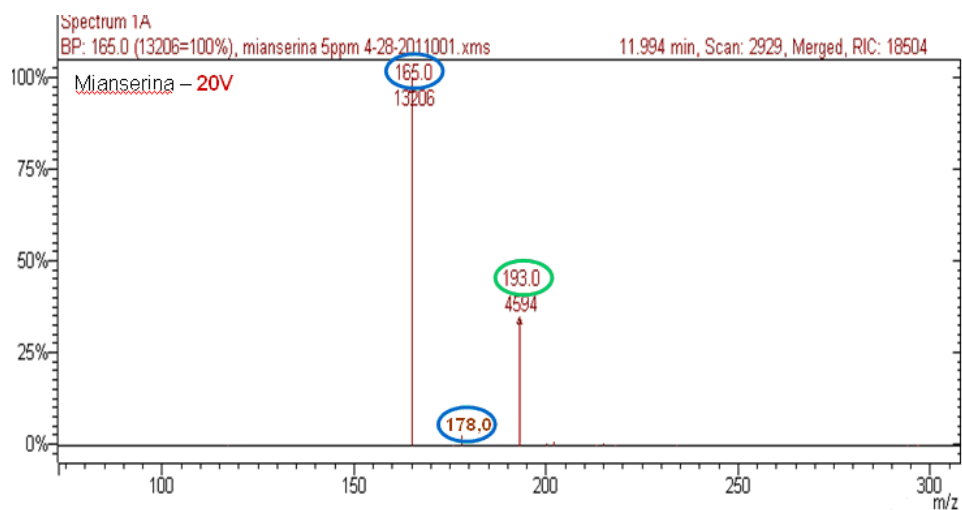


**Figura A.2.5** Selecção do ião-precursor e dos iões-produto com a energia de colisão seleccionada, no espectro de massa obtido em modo *SIM-SCAN*, para a Trimipramina.

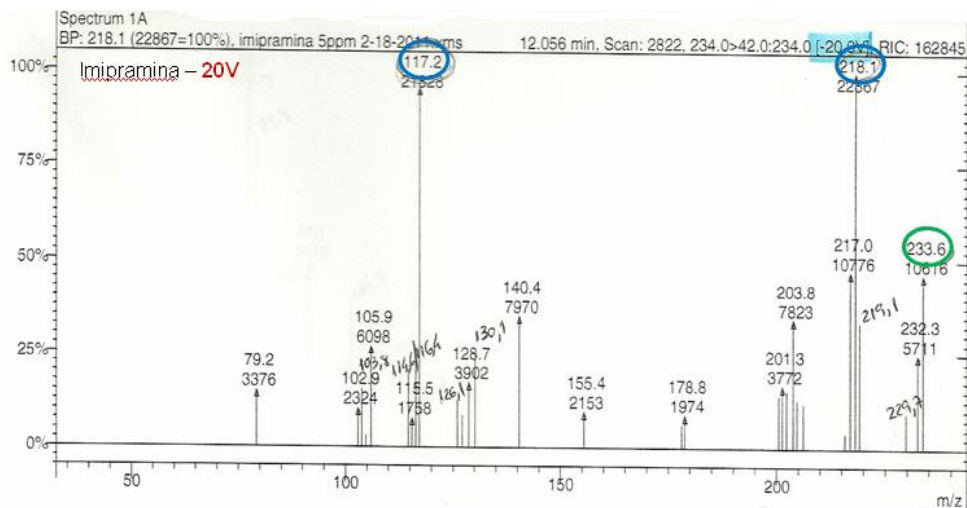


**Figura A.2.6** Selecção do ião-precursor e dos iões-produto com a energia de colisão seleccionada, no espectro de massa obtido em modo *SIM-SCAN*, para a Nortriptilina.

## ANEXO A.2 (continuação)

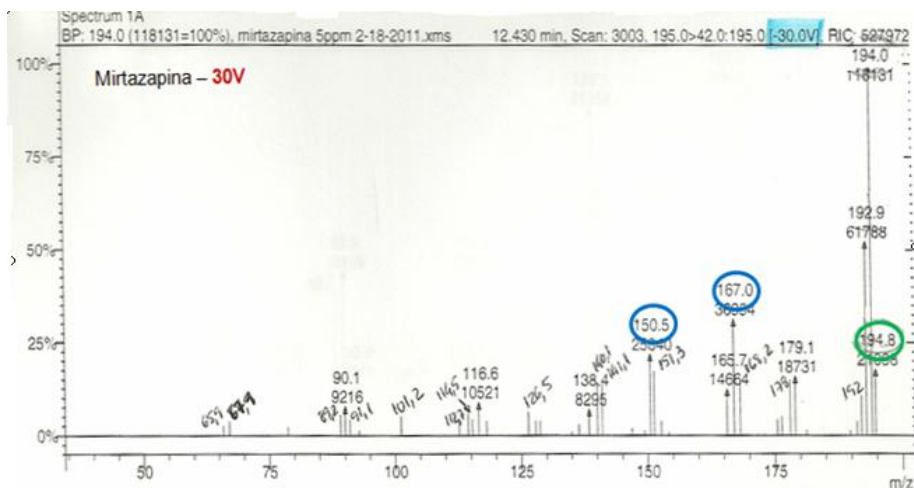


**Figura A.2.7** Selecção do ião-precursor e dos iões-produto com a energia de colisão seleccionada, no espectro de massa obtido em modo *SIM-SCAN*, para a Mianserina.

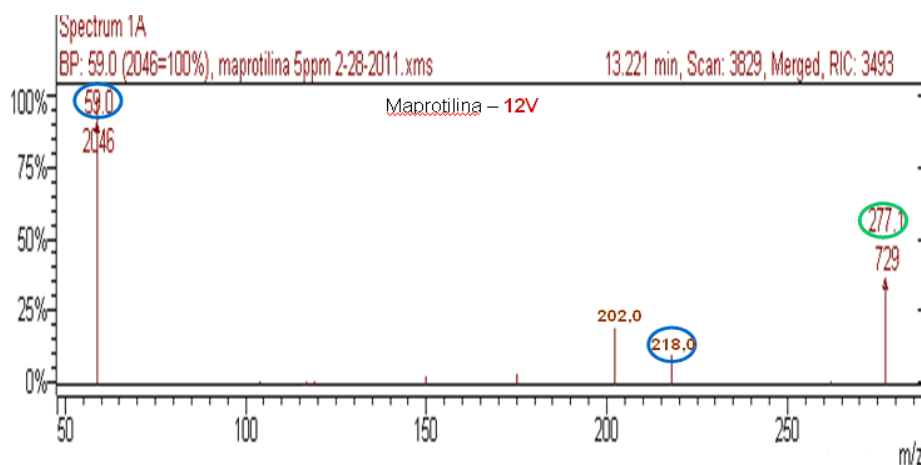


**Figura A.2.8** Selecção do ião-precursor e dos iões-produto com a energia de colisão seleccionada, no espectro de massa obtido em modo *SIM-SCAN*, para a Imipramina.

## ANEXO A.2 (continuação)

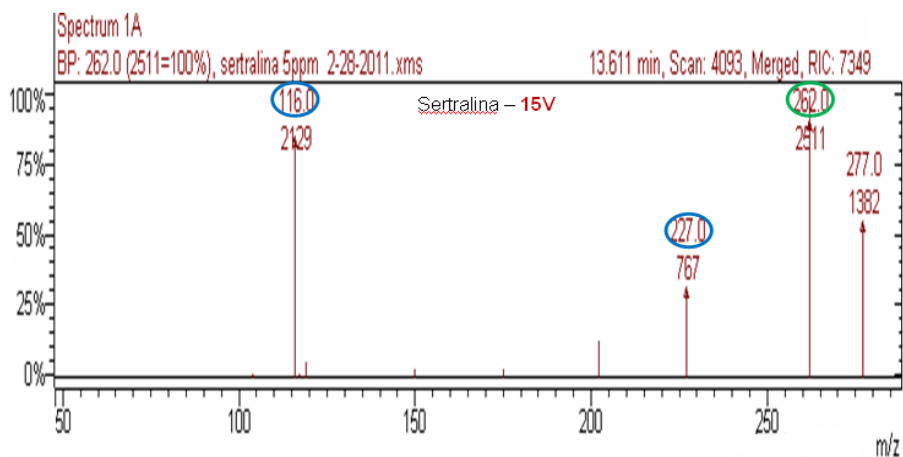


**Figura A.2.9** Selecção do ião-precursor e dos iões-produto com a energia de colisão seleccionada, no espectro de massa obtido em modo SIM-SCAN, para a Mirtazapina.

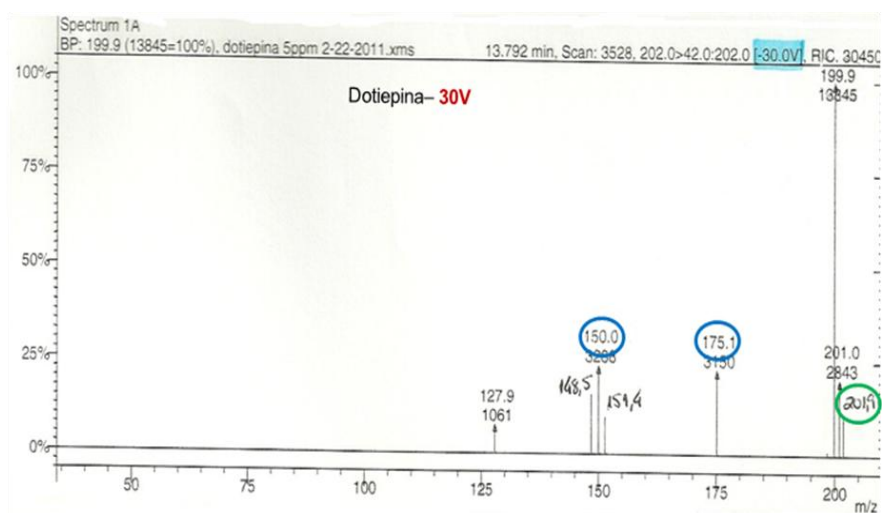


**Figura A.2.10** Selecção do ião-precursor e dos iões-produto com a energia de colisão seleccionada, no espectro de massa obtido em modo SIM-SCAN, para a Maprotilina.

## ANEXO A.2 (continuação)

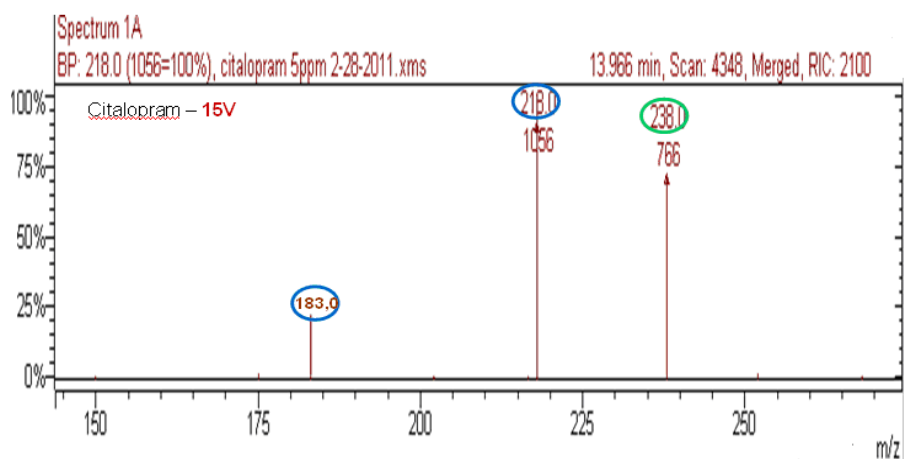


**Figura A.2.11** Selecção do ião-precursor e dos iões-produto com a energia de colisão seleccionada, no espectro de massa obtido em modo *SIM-SCAN*, para a Sertralina.

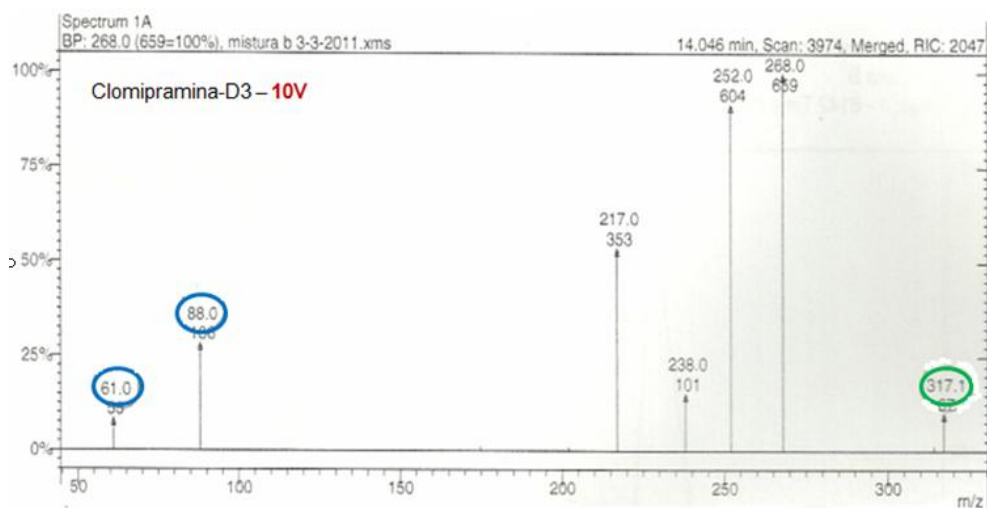


**Figura A.2.12** Selecção do ião-precursor e dos iões-produto com a energia de colisão seleccionada, no espectro de massa obtido em modo *SIM-SCAN*, para a Dotiepina.

## ANEXO A.2 (continuação)

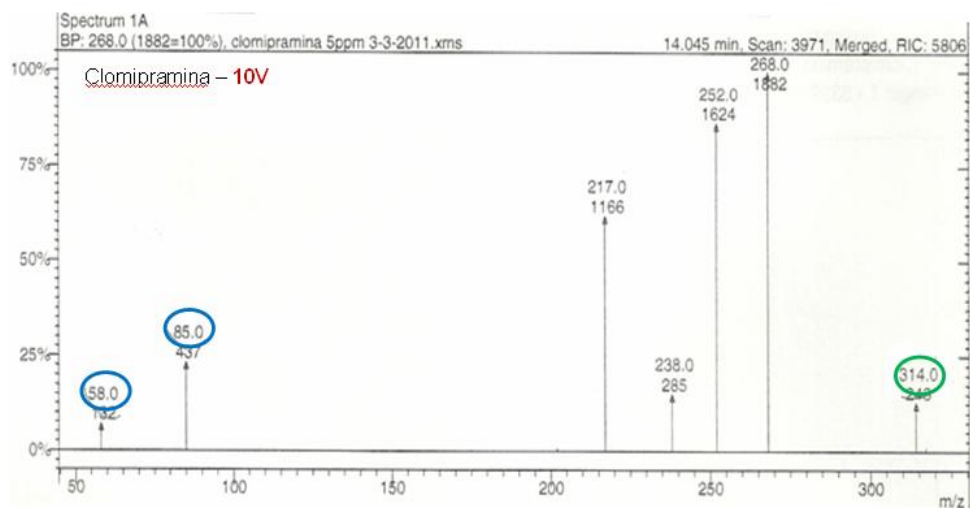


**Figura A.2.13** Selecção do ião-precursor e dos iões-produto com a energia de colisão seleccionada, no espectro de massa obtido em modo *SIM-SCAN*, para a Citalopram.

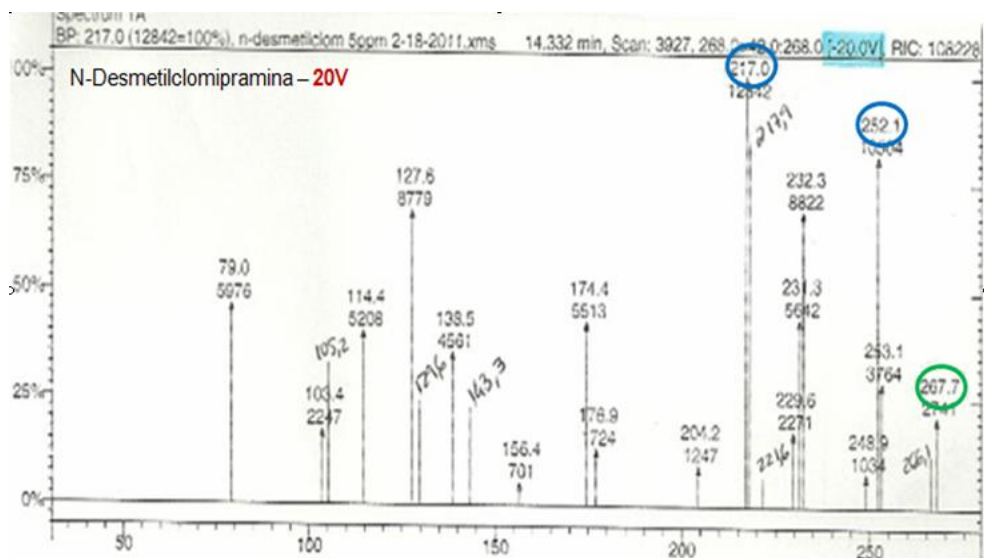


**Figura A.2.14** Selecção do ião-precursor e dos iões-produto com a energia de colisão seleccionada, no espectro de massa obtido em modo *SIM-SCAN*, para a Clomipramina-d3.

## ANEXO A.2 (continuação)

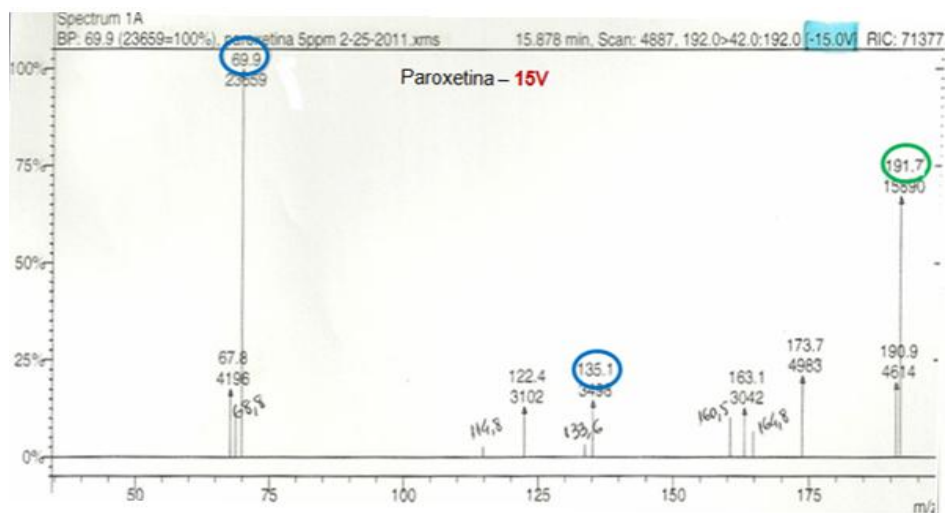


**Figura A.2.15** Seleção do íão-precursor e dos íões-produto com a energia de colisão seleccionada, no espectro de massa obtido em modo *SIM-SCAN*, para a Clomipramina.



**Figura A.2.16** Seleção do íão-precursor e dos íões-produto com a energia de colisão seleccionada, no espectro de massa obtido em modo *SIM-SCAN*, para a N-Desmetilclomipramina.

## ANEXO A.2 (continuação)



**Figura A.2.17** Seleção do íão-precursor e dos íões-produto com a energia de colisão seleccionada, no espectro de massa obtido em modo *SIM-SCAN*, para a Paroxetina.

# ANEXO B

## Especificidade/Selectividade e Capacidade de Identificação

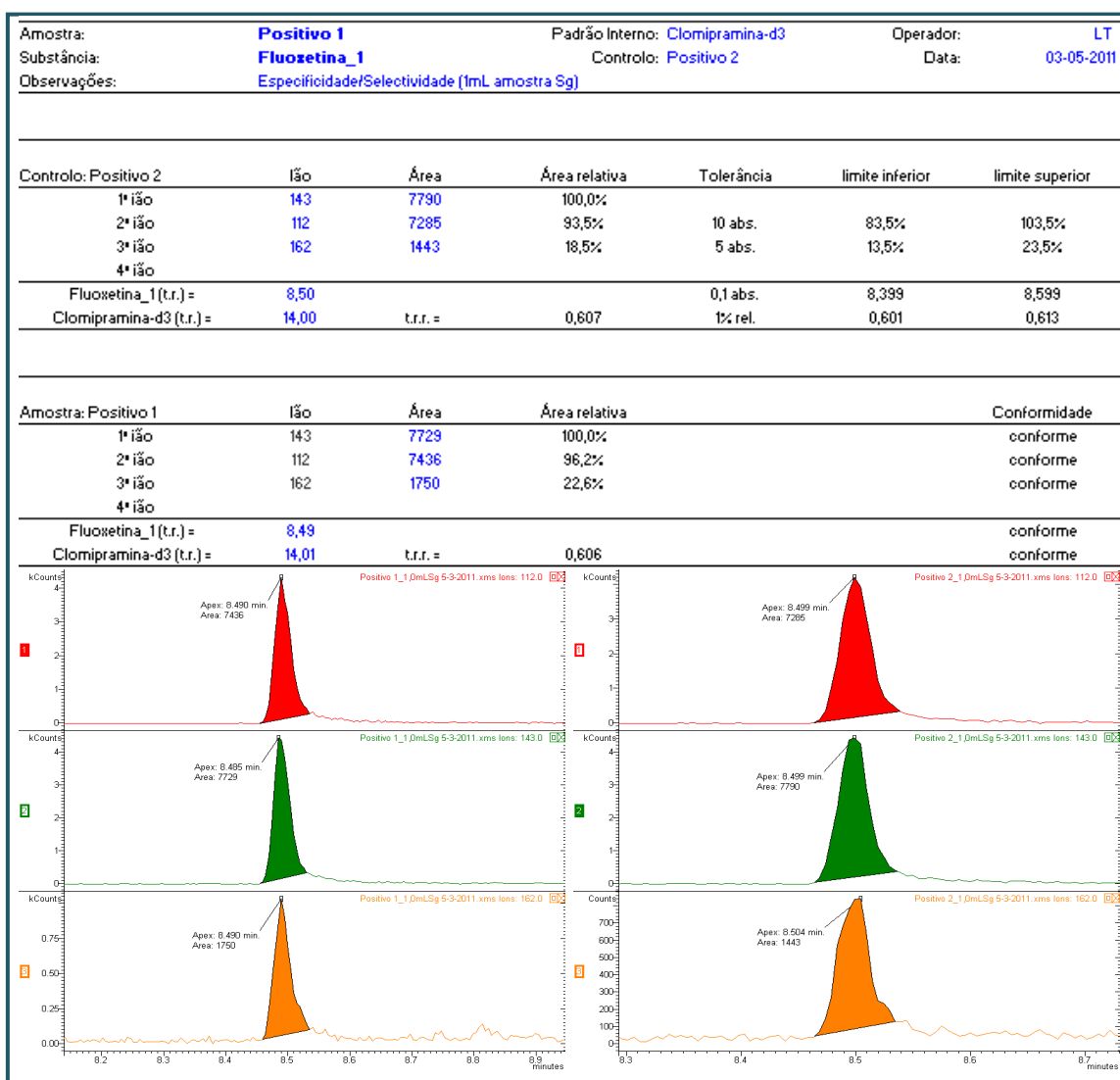


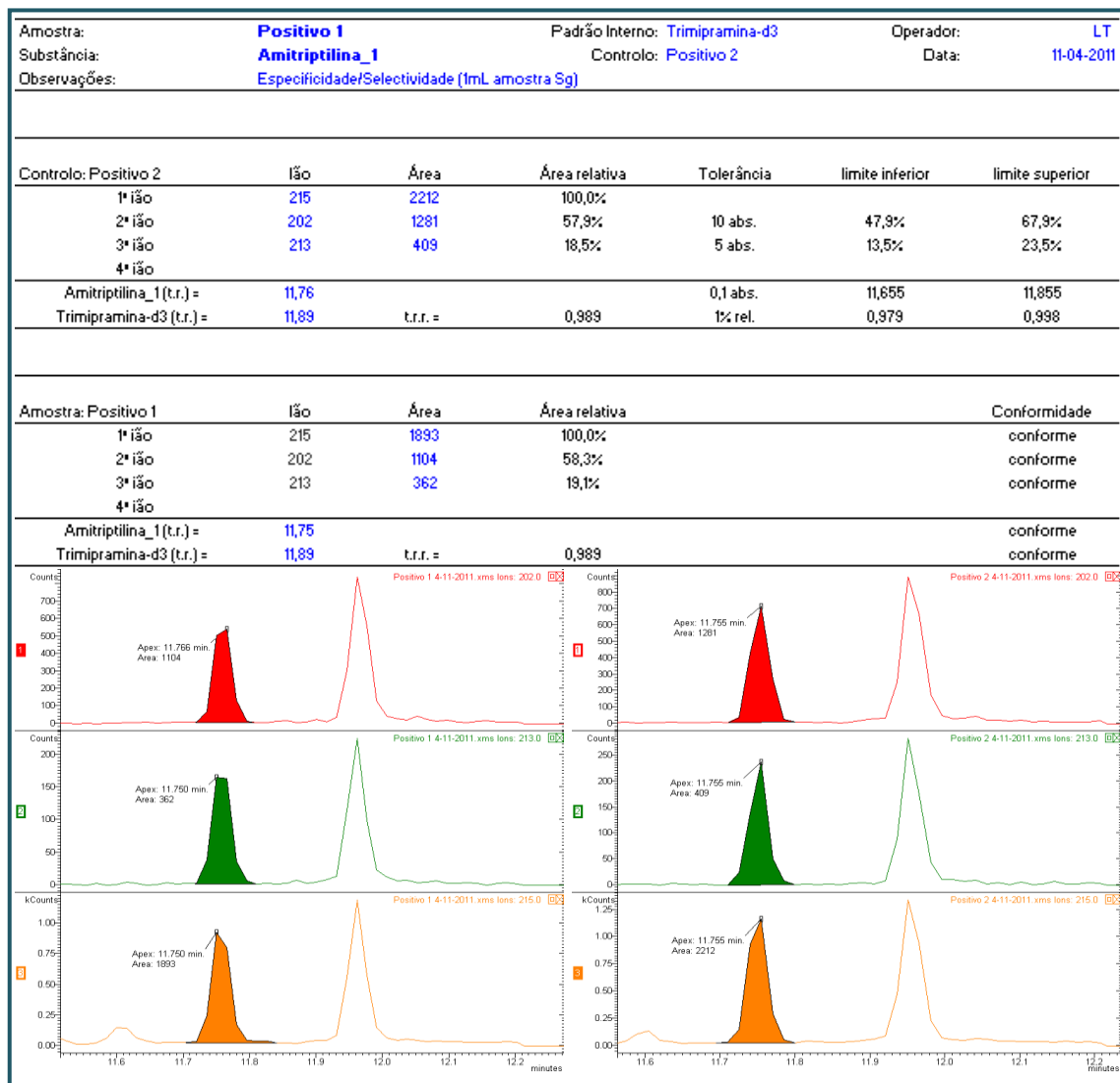
Figura B.1 Confirmação da positividade para a Fluoxetina em amostras aplicadas no estudo da Especificidade/Selectividade e Capacidade de Identificação.

## ANEXO B (continuação)



**Figura B.2** Confirmação da positividade para a Venlafaxina em amostras aplicadas no estudo da Especificidade/Selectividade e Capacidade de Identificação.

## ANEXO B (continuação)



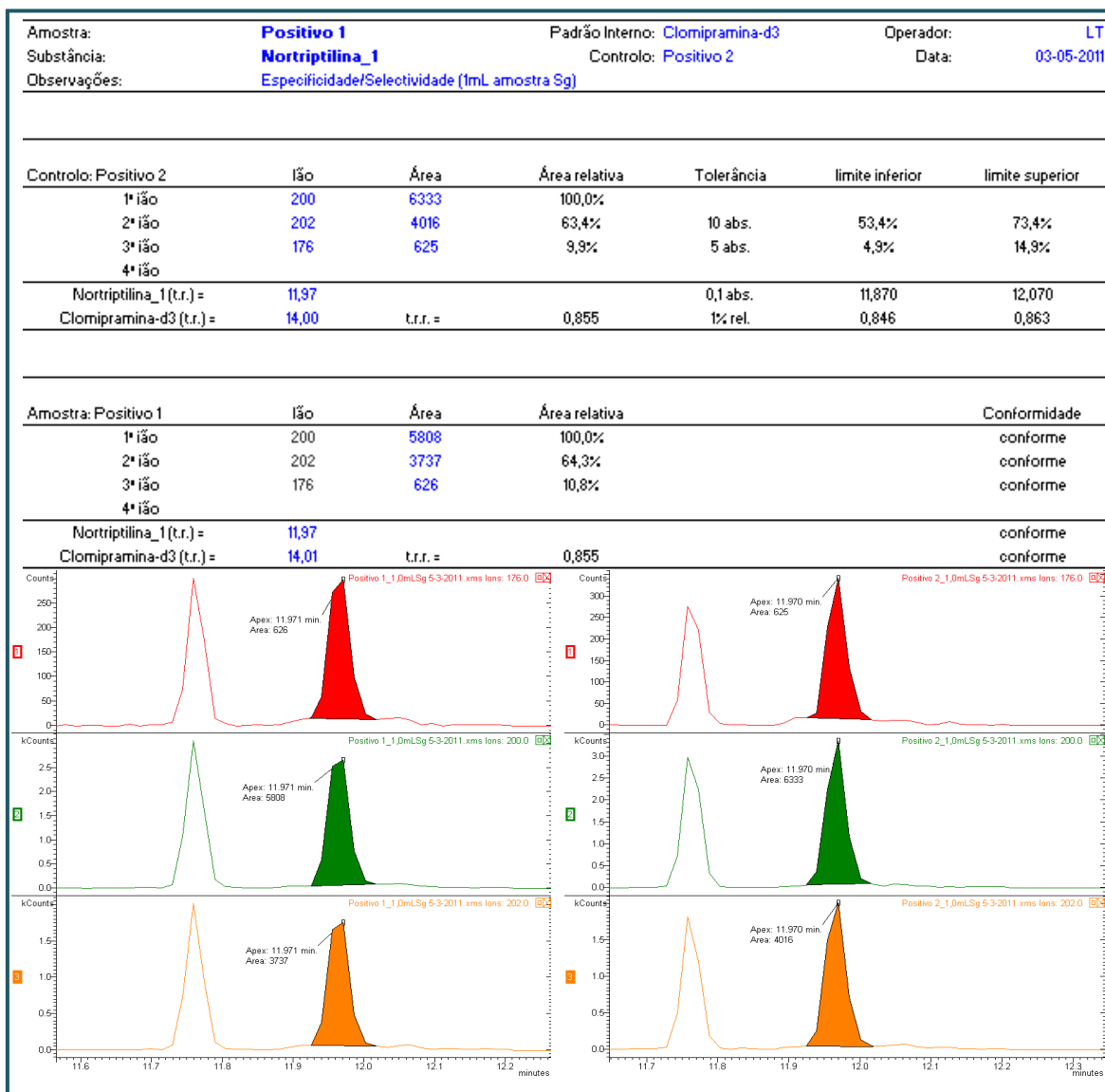
**Figura B.3** Confirmação da positividade para a Amitriptilina em amostras aplicadas no estudo da Especificidade/Selectividade e Capacidade de Identificação.

## ANEXO B (continuação)



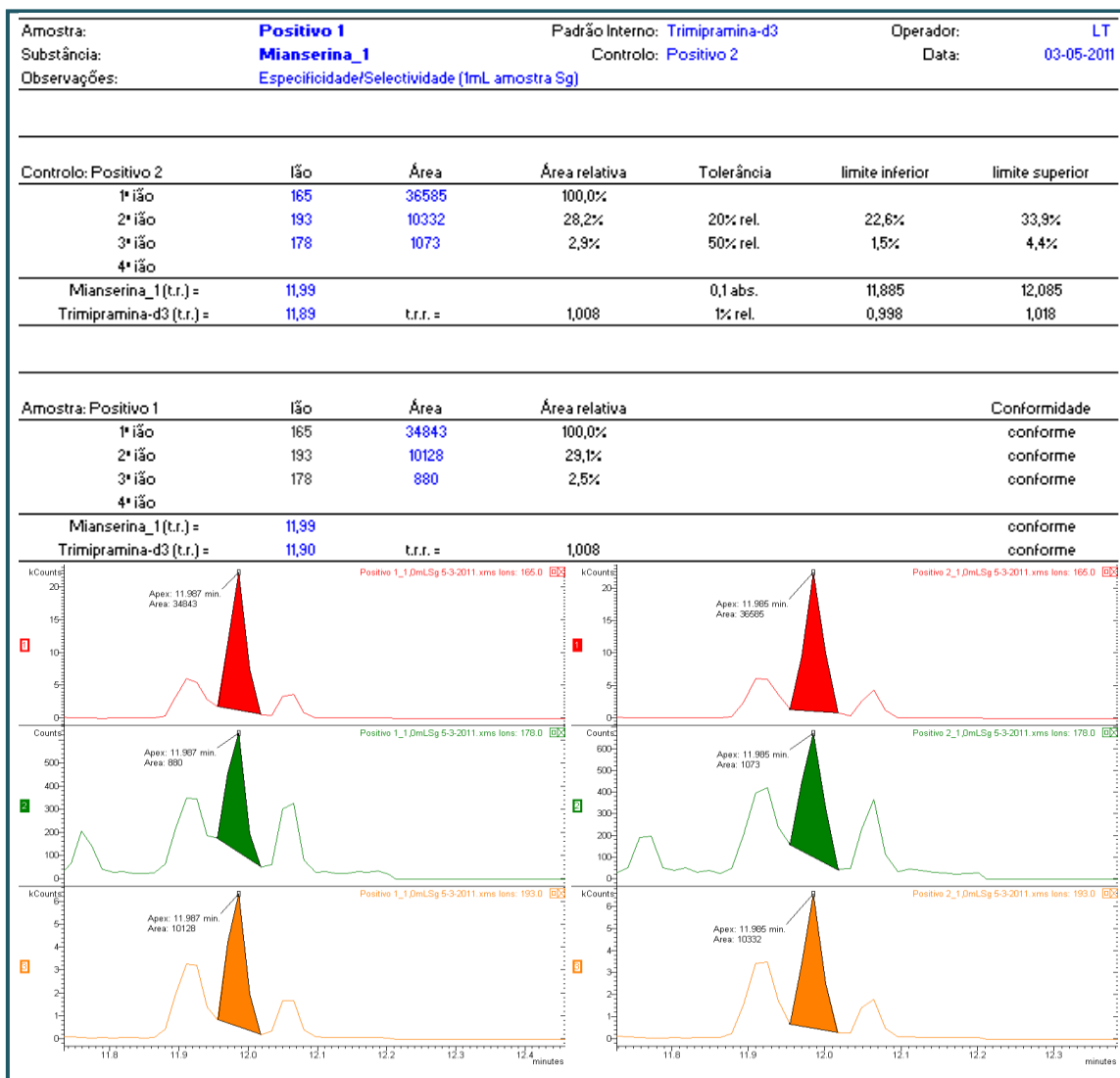
**Figura B.4** Confirmação da positividade para a Trimipramina em amostras aplicadas no estudo da Especificidade/Selectividade e Capacidade de Identificação.

## ANEXO B (continuação)



**Figura B.5** Confirmação da positividade para a Nortriptilina em amostras aplicadas no estudo da Especificidade/Selectividade e Capacidade de Identificação.

## ANEXO B (continuação)



**Figura B.6** Confirmação da positividade para a Mianserina em amostras aplicadas no estudo da Especificidade/Selectividade e Capacidade de Identificação.

## ANEXO B (continuação)

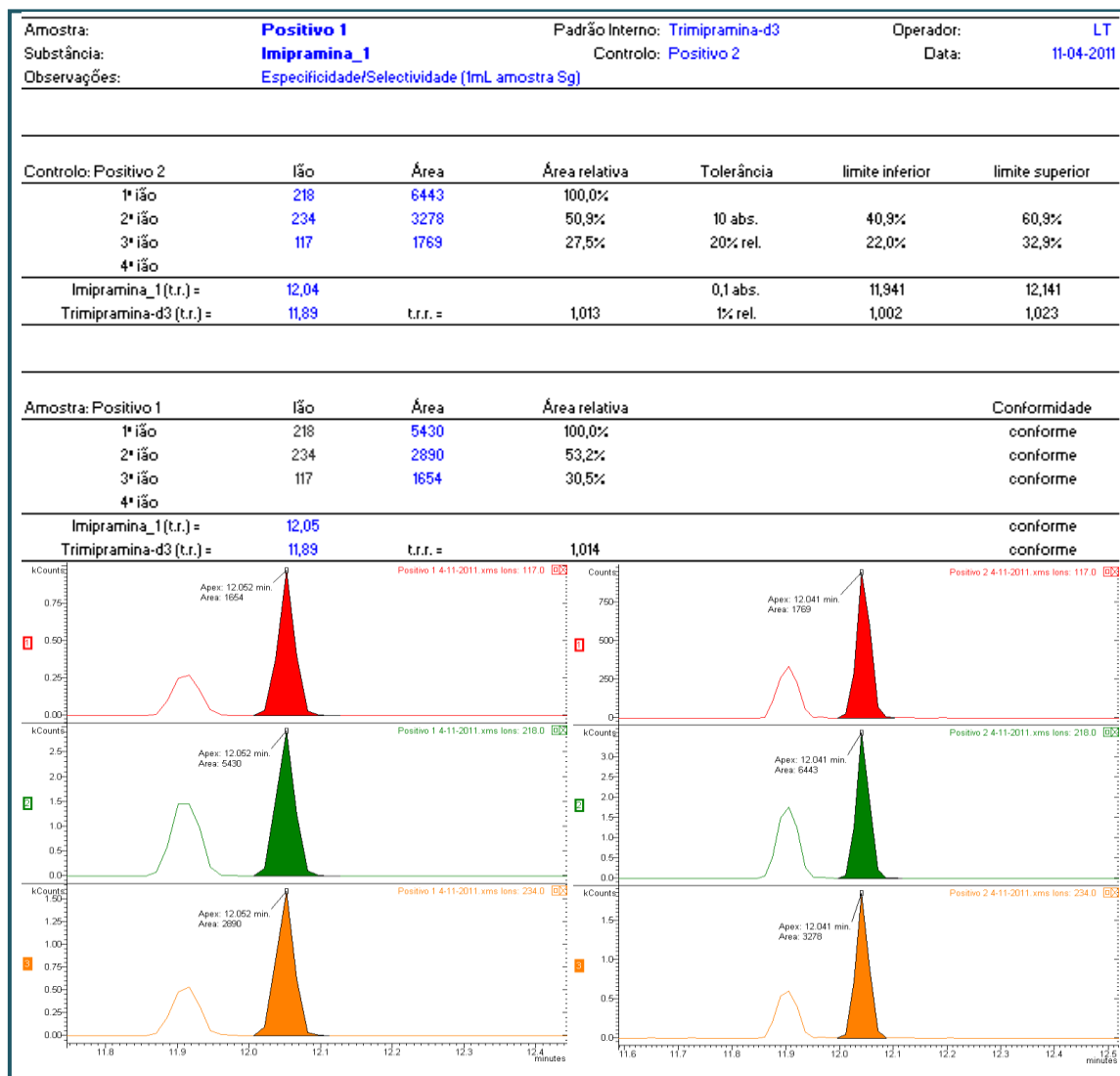


Figura B.7 Confirmação da positividade para a Imipramina em amostras aplicadas no estudo da Especificidade/Selectividade e Capacidade de Identificação.

## ANEXO B (continuação)

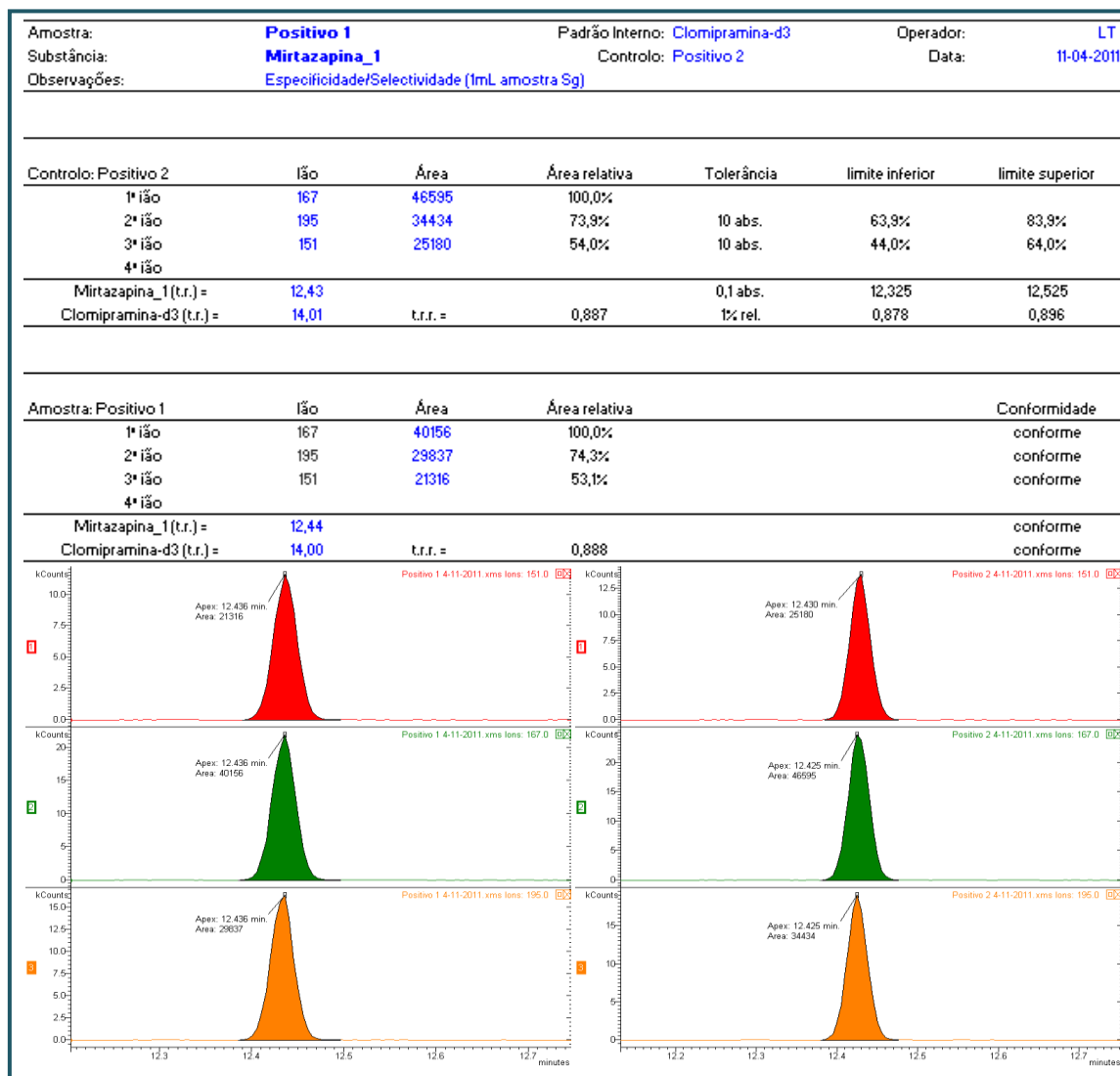


Figura B.8 Confirmação da positividade para a Mirtazapina em amostras aplicadas no estudo da Especificidade/Selectividade e Capacidade de Identificação.

## ANEXO B (continuação)

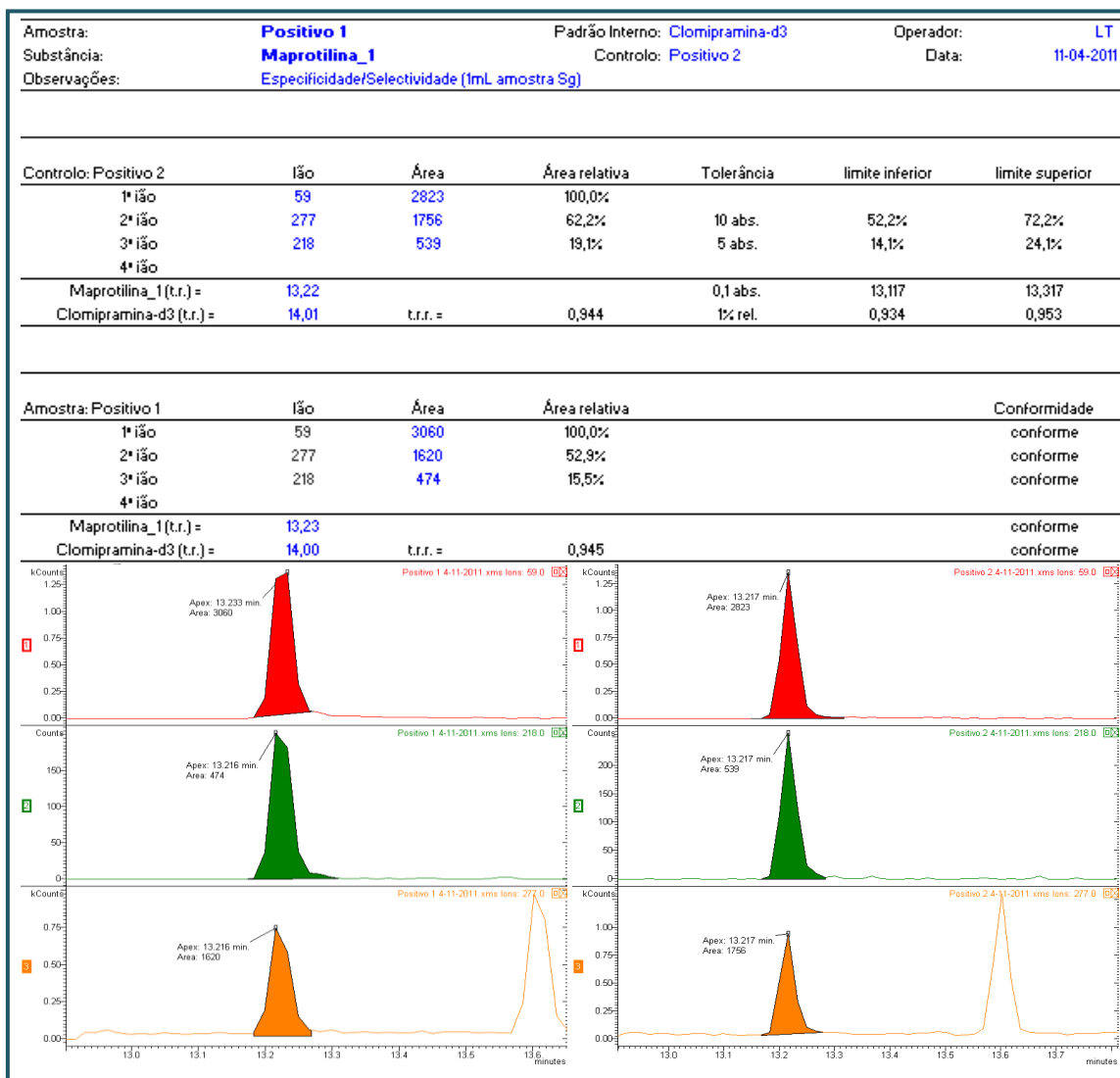
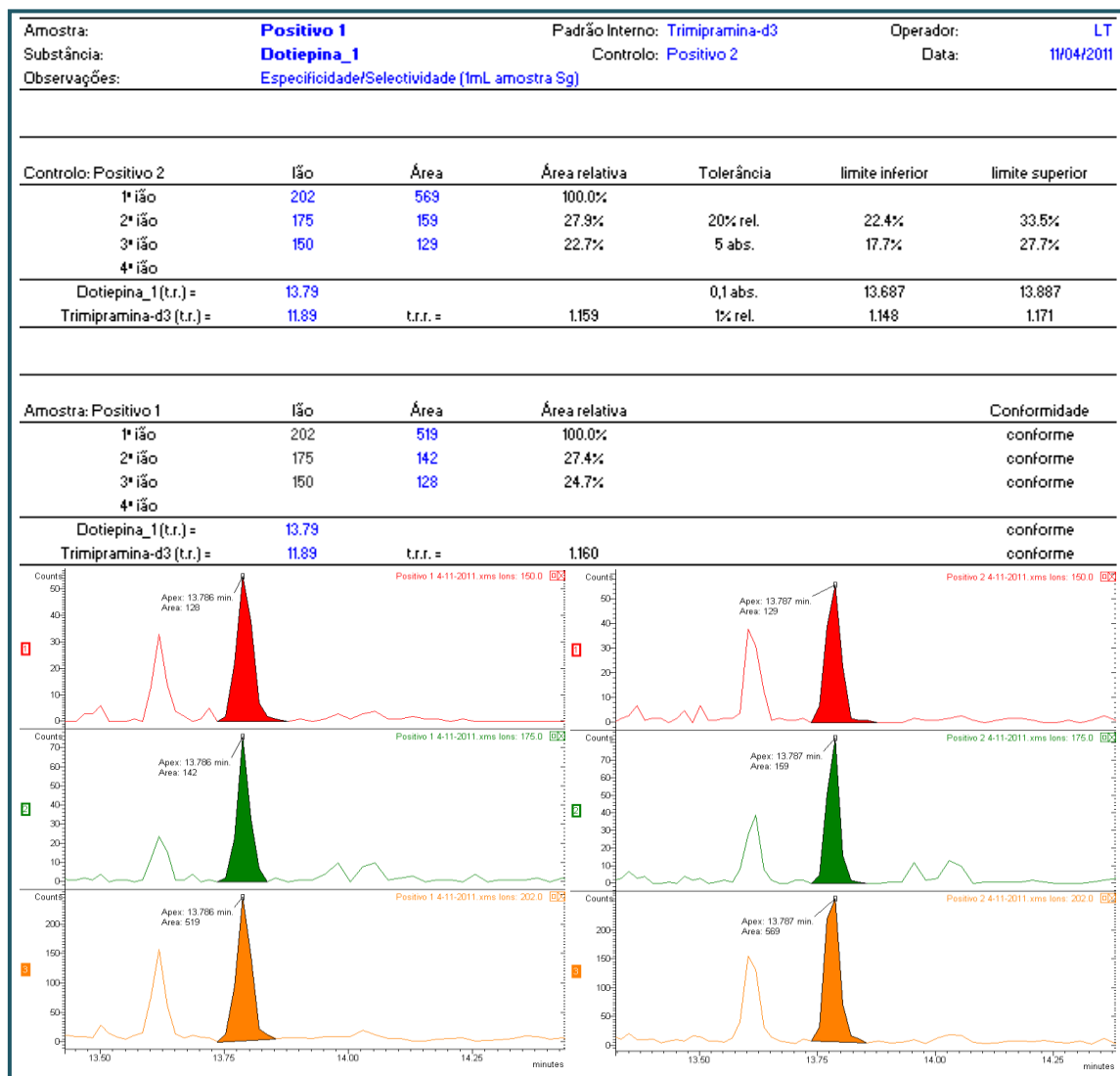


Figura B.9 Confirmação da positividade para a Maprotilina em amostras aplicadas no estudo da Especificidade/Selectividade e Capacidade de Identificação.

## ANEXO B (continuação)



**Figura B.10** Confirmação da positividade para a Dotiepina em amostras aplicadas no estudo da Especificidade/Selectividade e Capacidade de Identificação.

## ANEXO B (continuação)

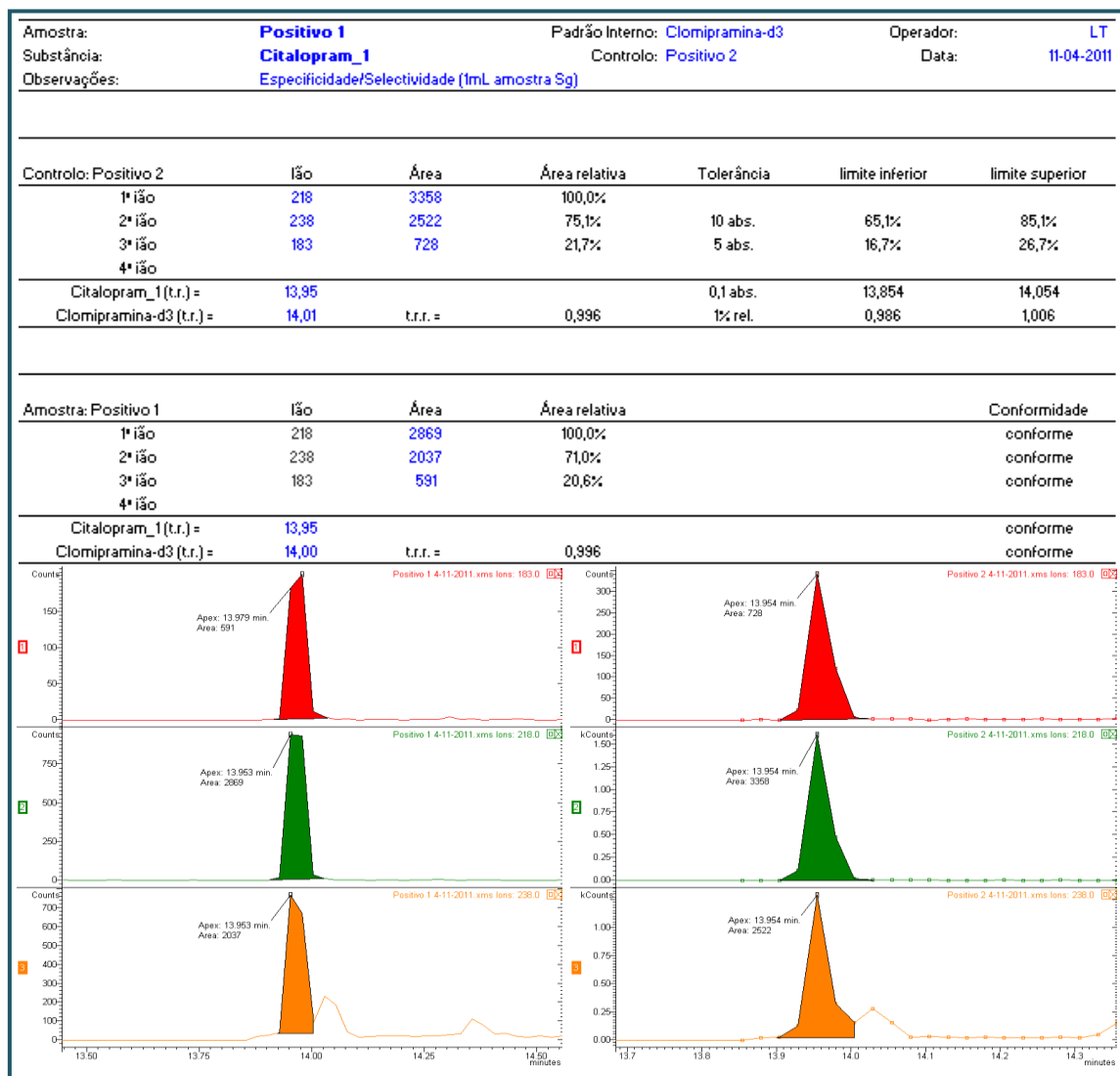


Figura B.11 Confirmação da positividade para a Citalopram em amostras aplicadas no estudo da Especificidade/Selectividade e Capacidade de Identificação.

## ANEXO B (continuação)



**Figura B.12** Confirmação da positividade para a N-Desmetilclomipramina em amostras aplicadas no estudo da Especificidade/Selectividade e Capacidade de Identificação.

## ANEXO B (continuação)

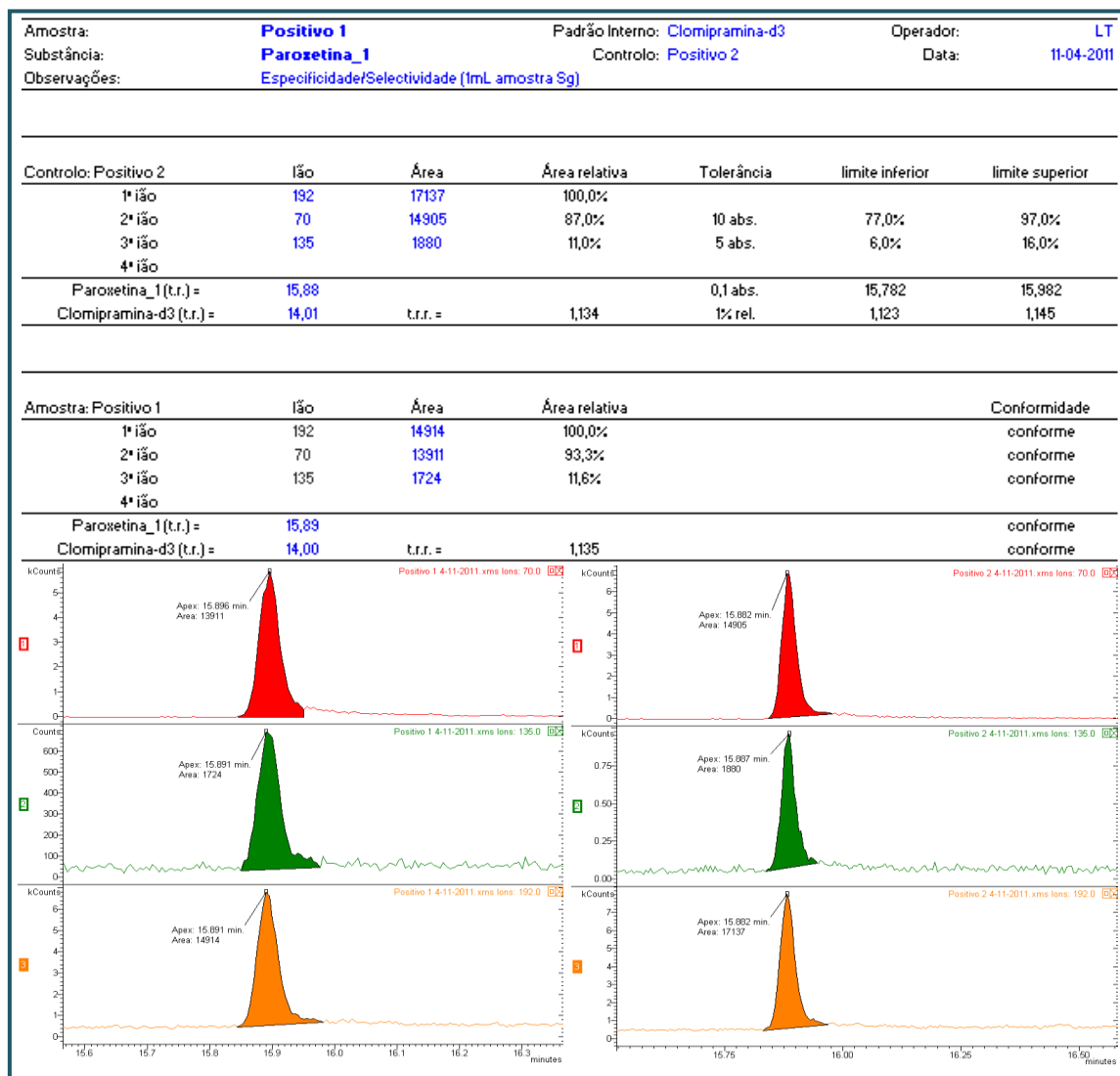


Figura B.13 Confirmação da positividade para a Paroxetina em amostras aplicadas no estudo da Especificidade/Selectividade e Capacidade de Identificação.

# ANEXO C

## Limites de Detecção e de Quantificação

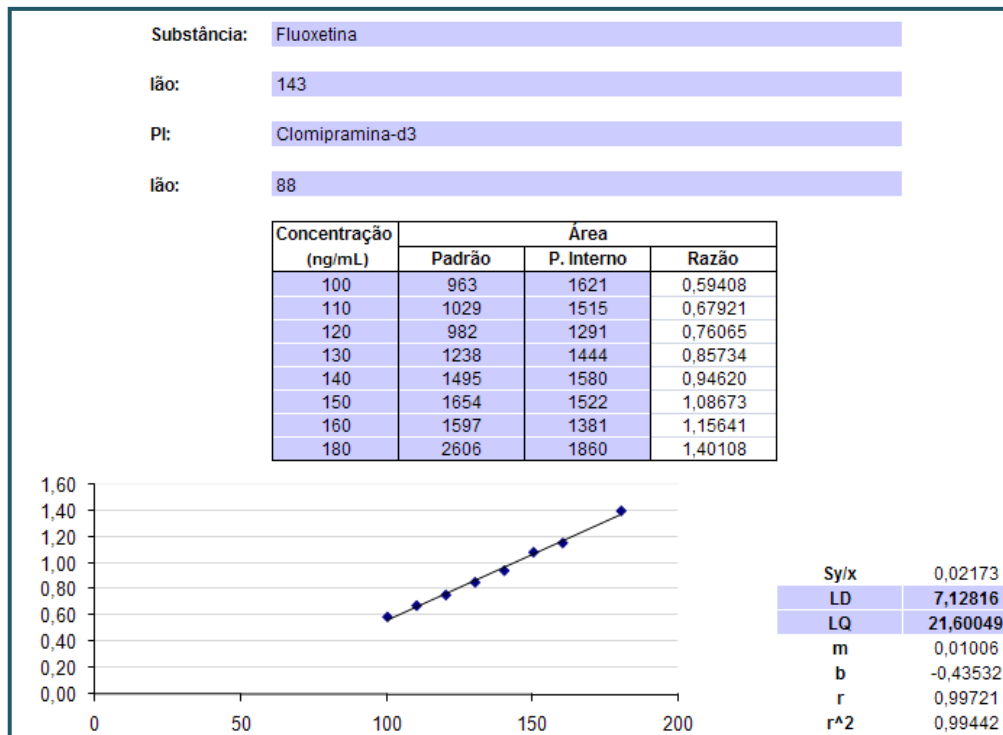


Figura C.1 Dados do estudo do LQ e LD da Fluoxetina.

## ANEXO C (continuação)

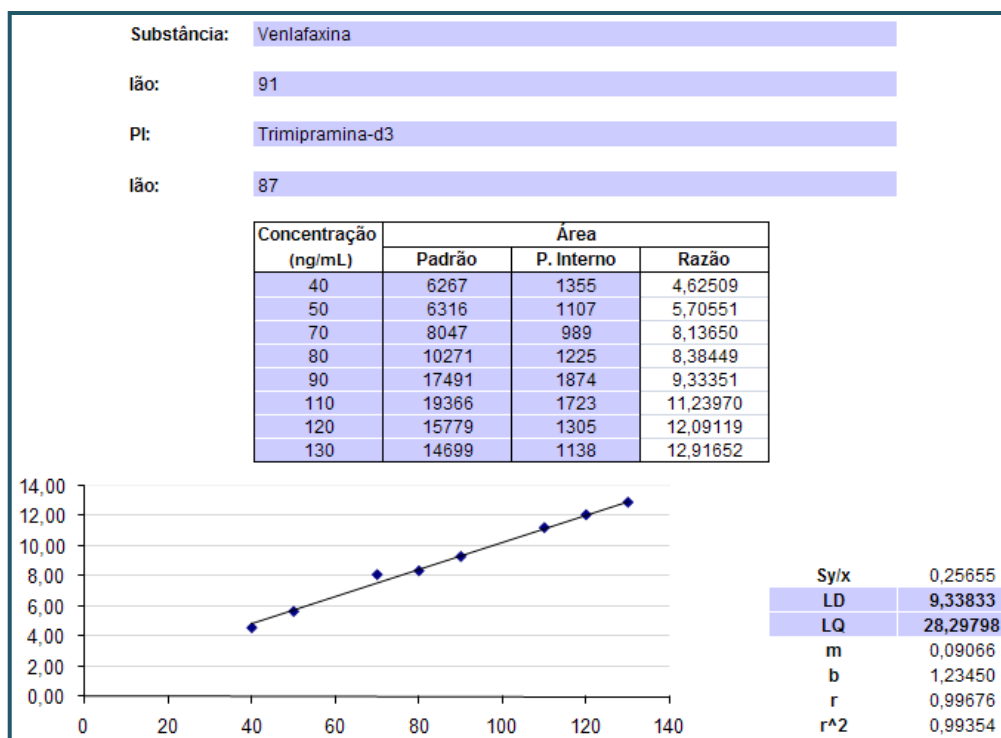


Figura C.2 Dados do estudo do LQ e LD da Venlafaxina.

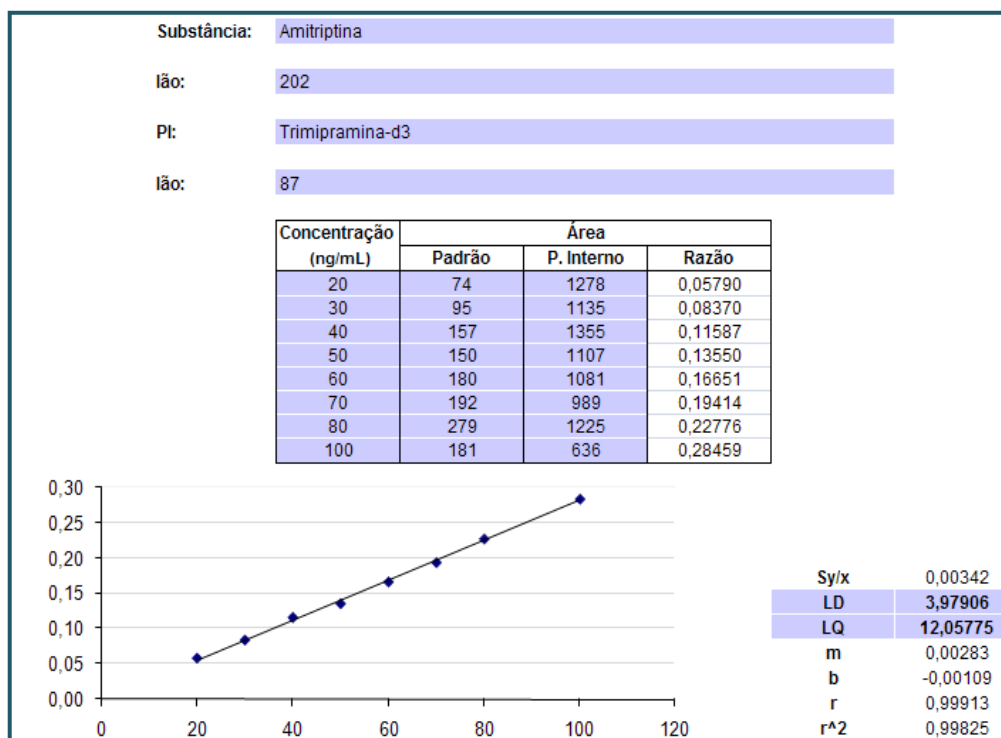


Figura C.3 Dados do estudo do LQ e LD da Amitriptina.

## ANEXO C (continuação)

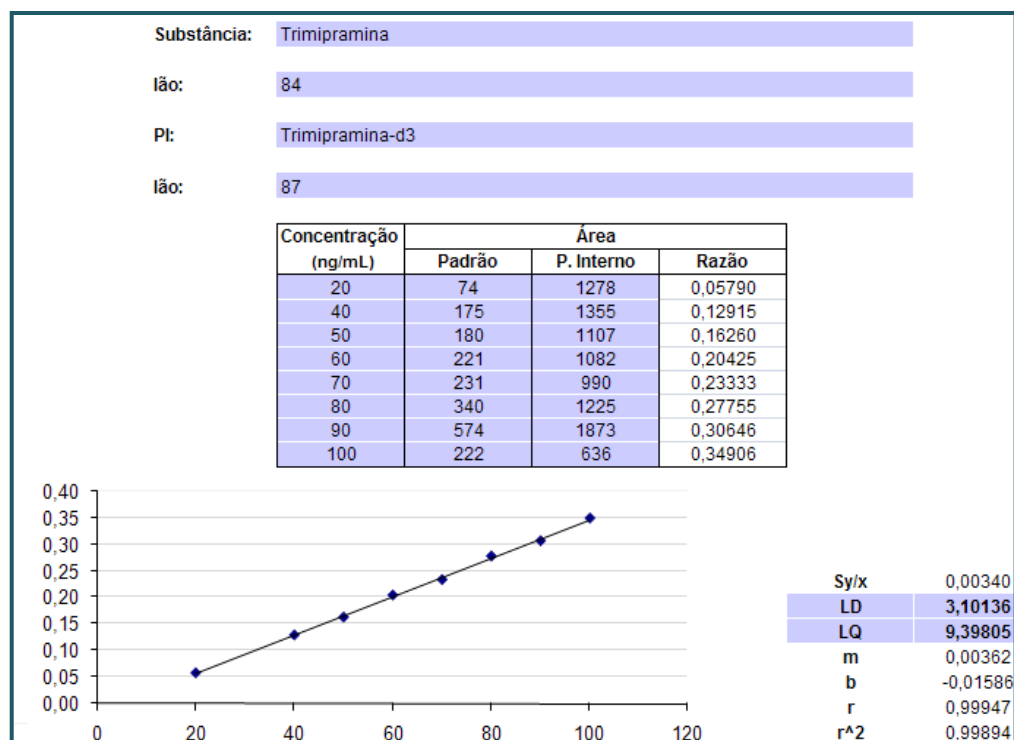


Figura C.4 Dados do estudo do LQ e LD da Trimipramina.

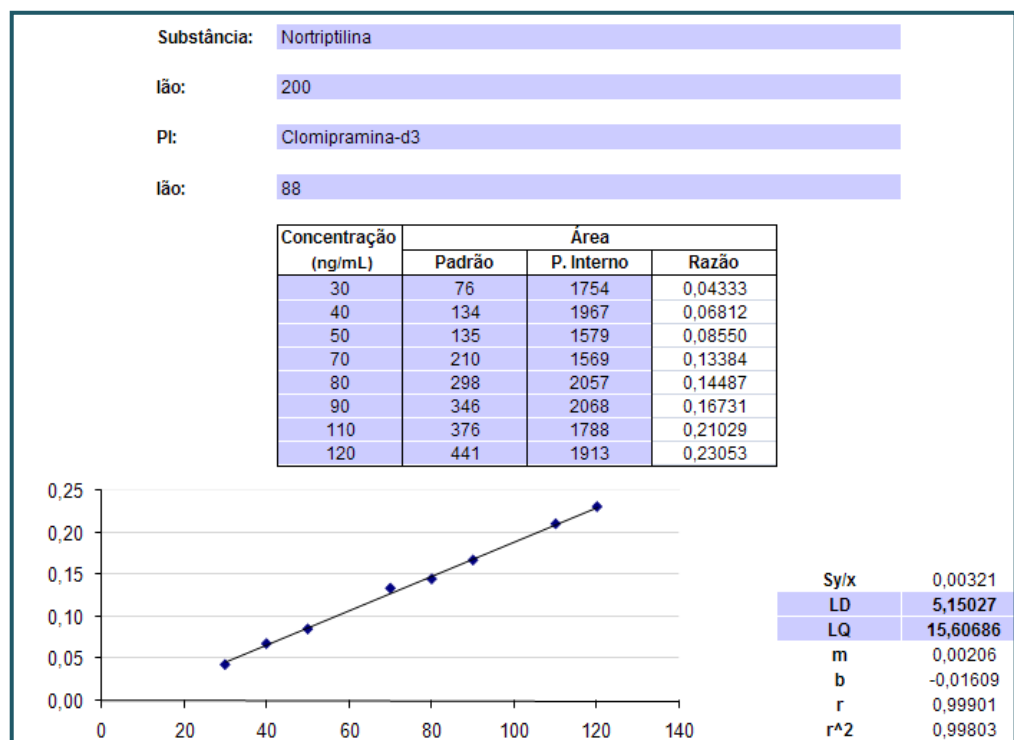


Figura C.5 Dados do estudo do LQ e LD da Nortriptilina.

## ANEXO C (continuação)

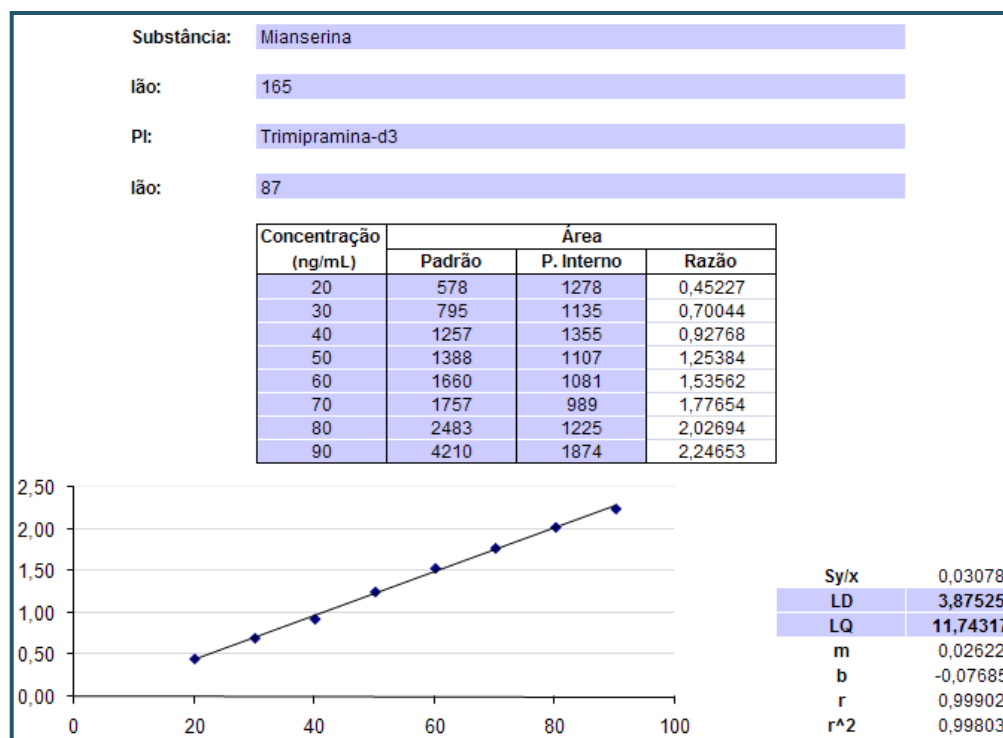


Figura C.6 Dados do estudo do LQ e LD da Mianserina.

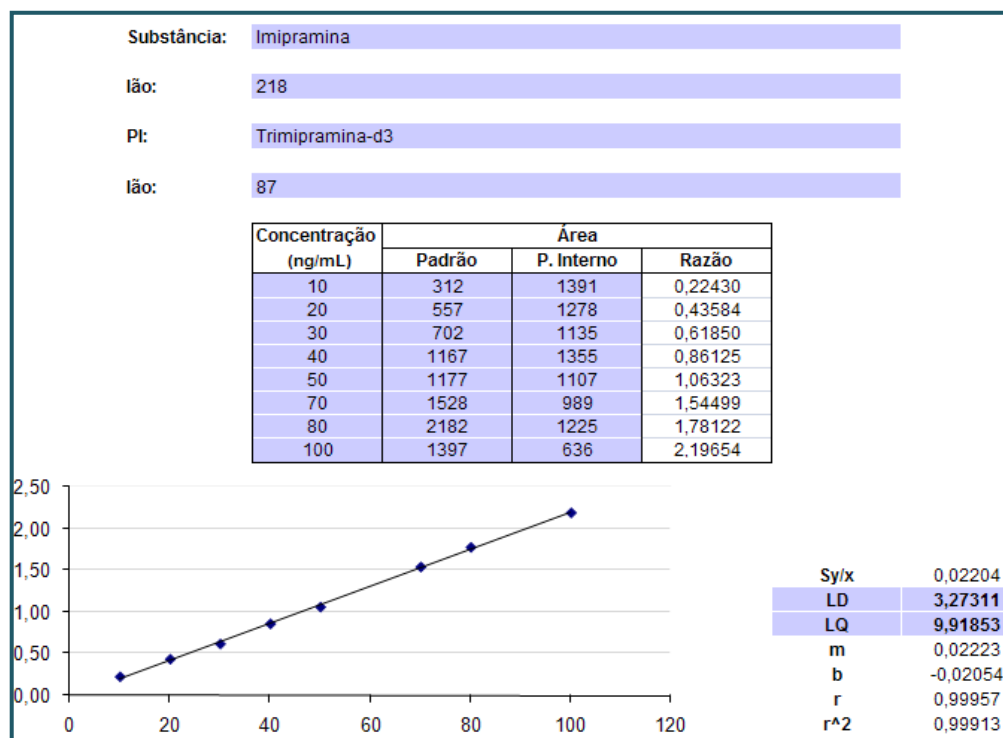


Figura C.7 Dados do estudo do LQ e LD da Imipramina.

## ANEXO C (continuação)

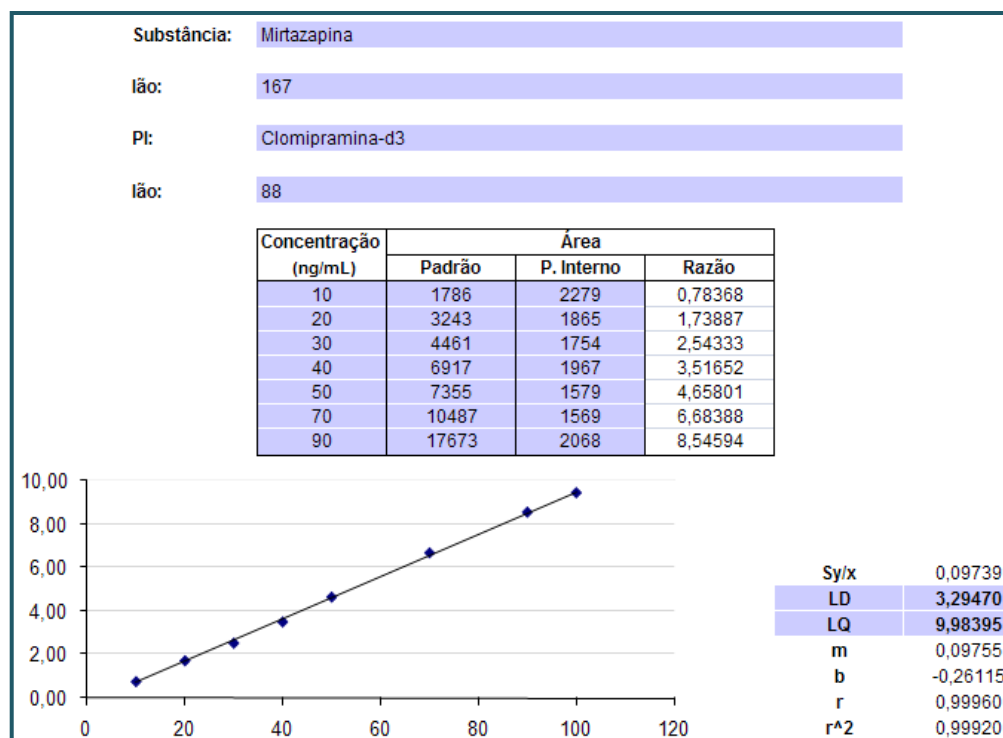


Figura C.8 Dados do estudo do LQ e LD da Mirtazapina.

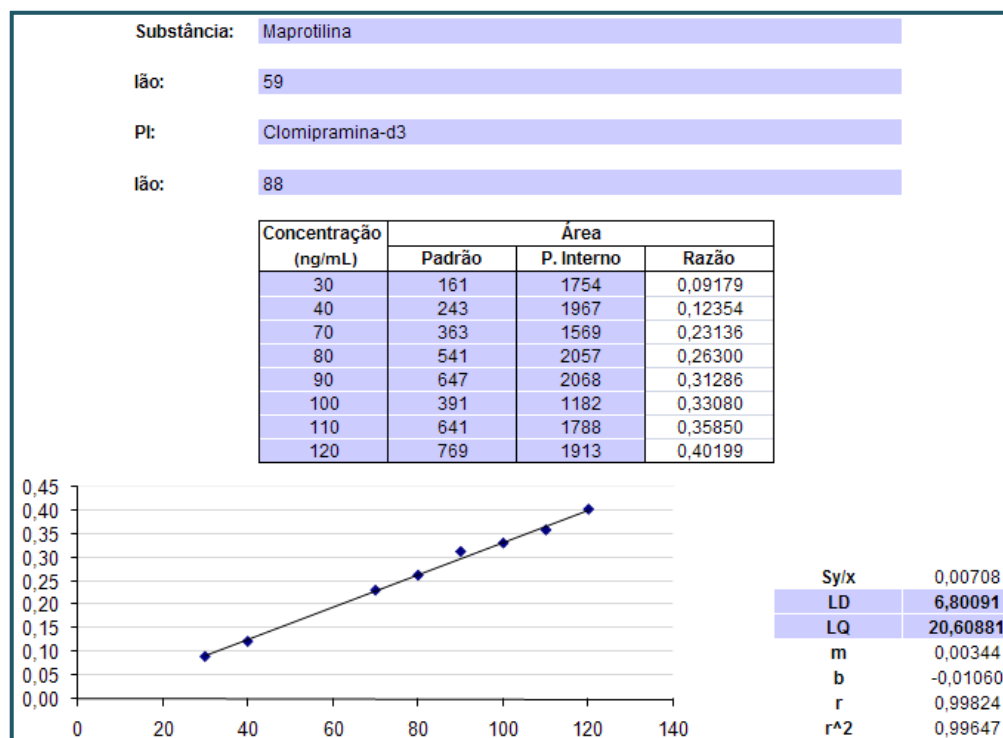


Figura C.9 Dados do estudo do LQ e LD da Maprotilina.

## ANEXO C (continuação)

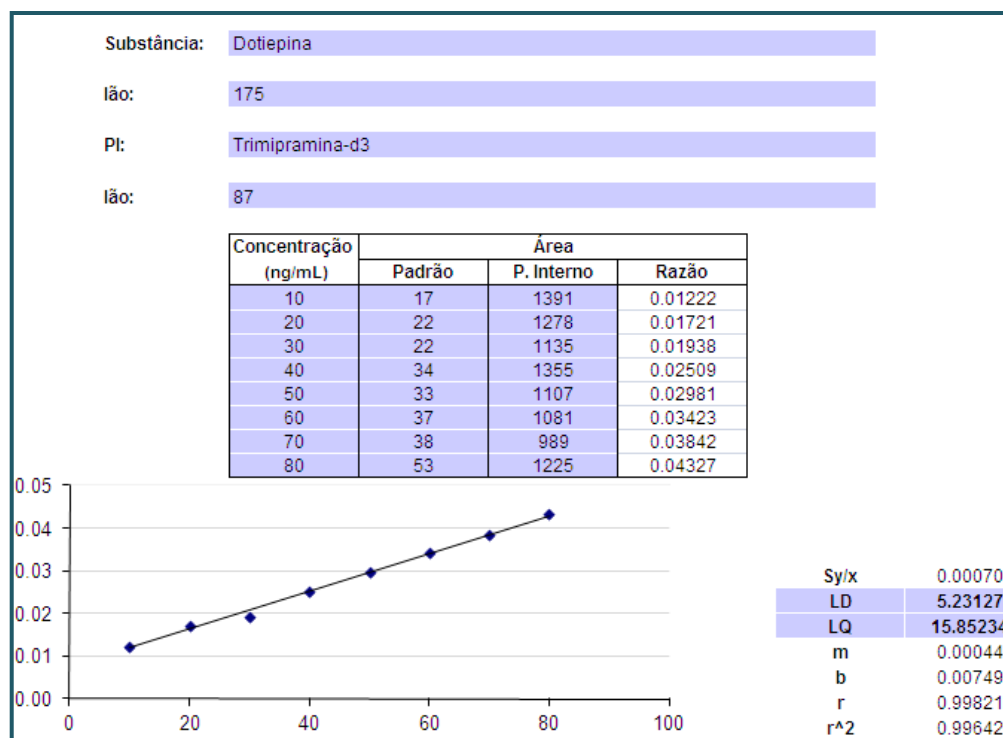


Figura C.10 Dados do estudo do LQ e LD da Dotiepinga.

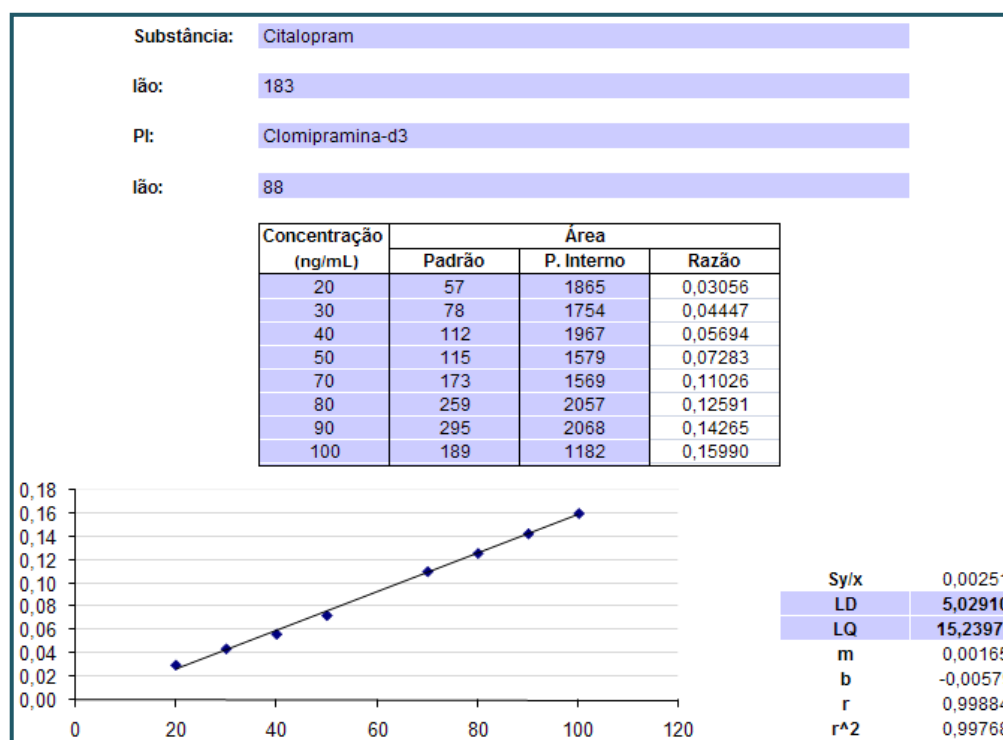


Figura C.11 Dados do estudo do LQ e LD da Citalopram.

## ANEXO C (continuação)

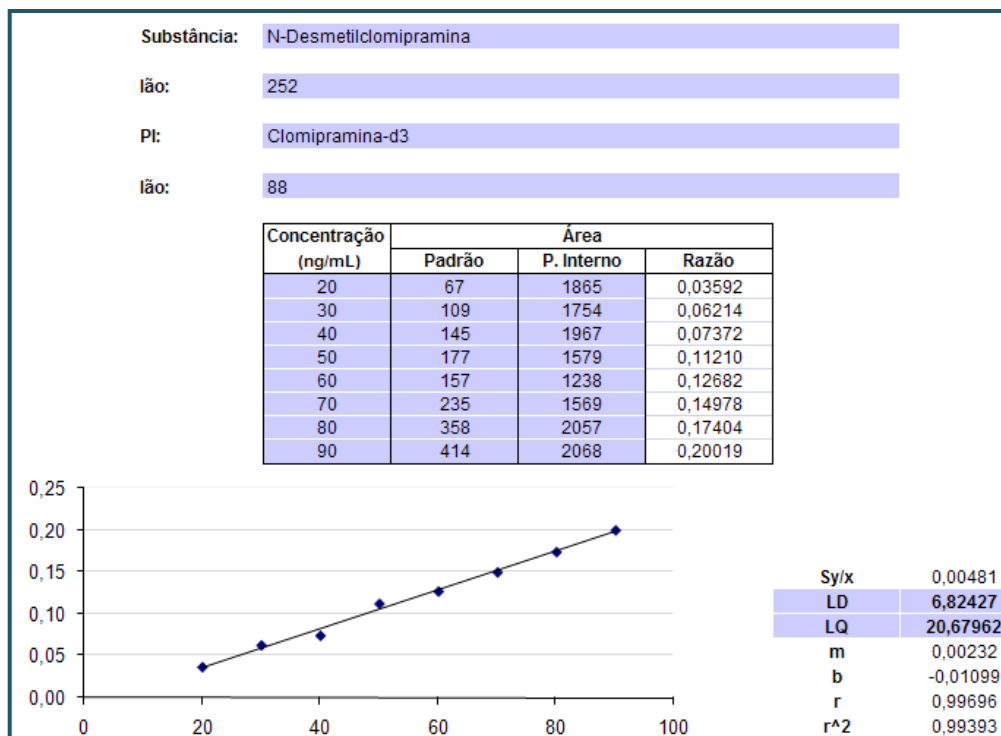


Figura C.12 Dados do estudo do LQ e LD da N-Desmetilclomipramina.

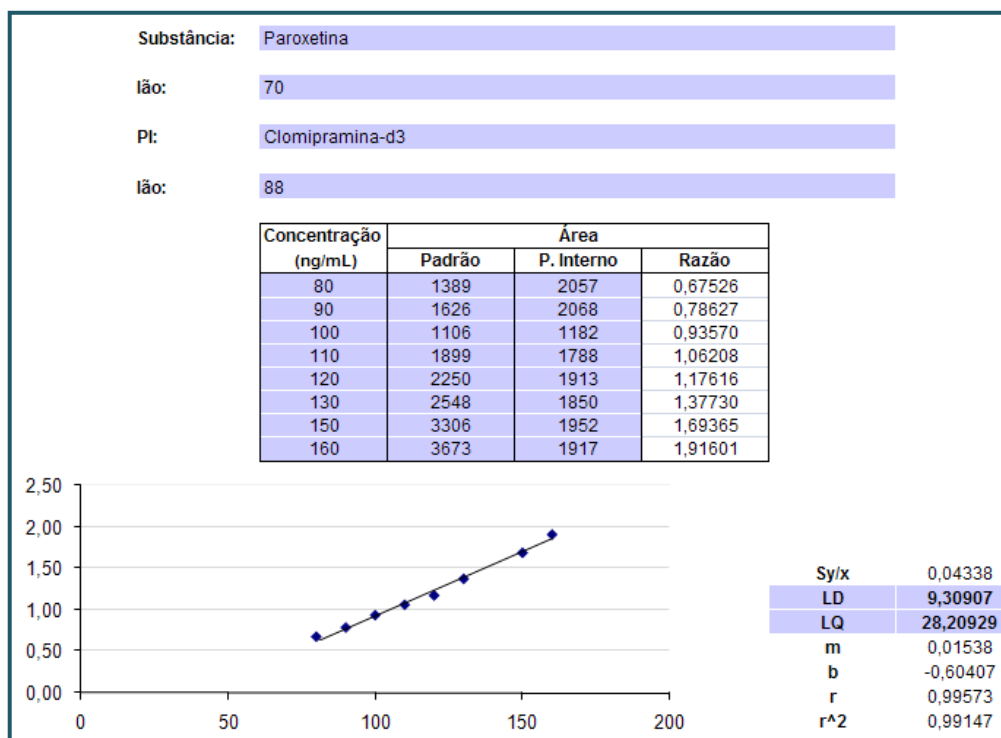


Figura C.13 Dados do estudo do LQ e LD da Paroxetina.

# ANEXO D

## Linearidade

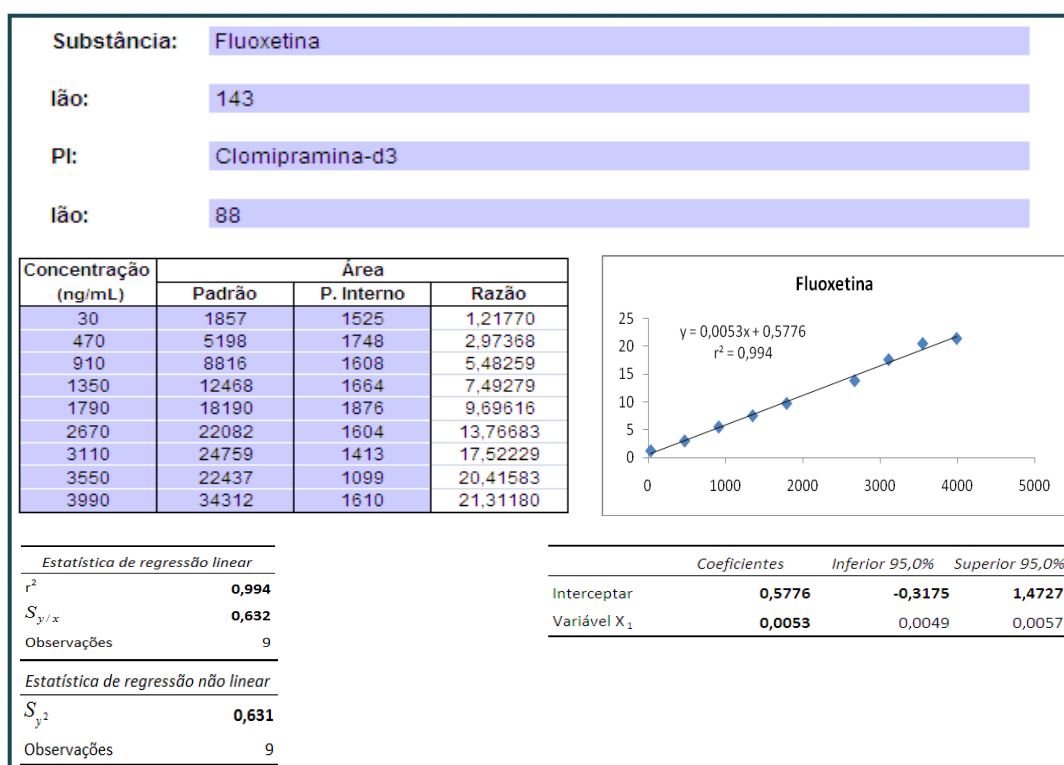


Figura D.1 Dados do estudo da Linearidade da Fluoxetina.

## ANEXO D (continuação)

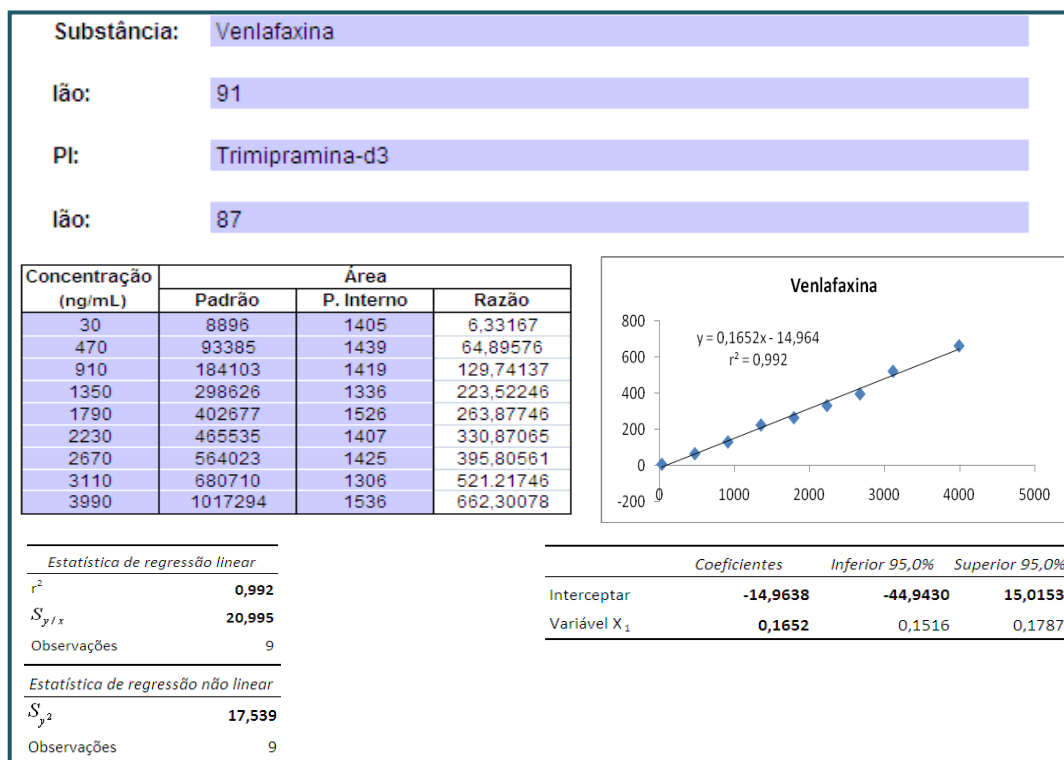


Figura D.2 Dados do estudo da Linearidade da Venlafaxina.

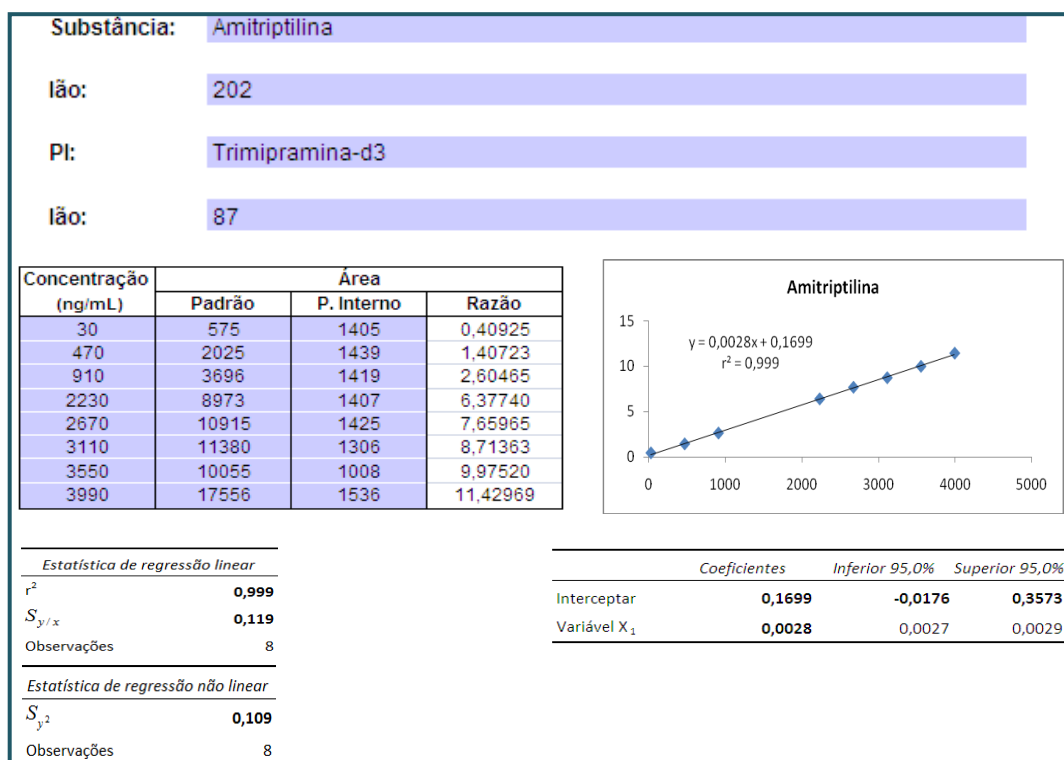


Figura D.3 Dados do estudo da Linearidade da Amitriptilina.

## ANEXO D (continuação)

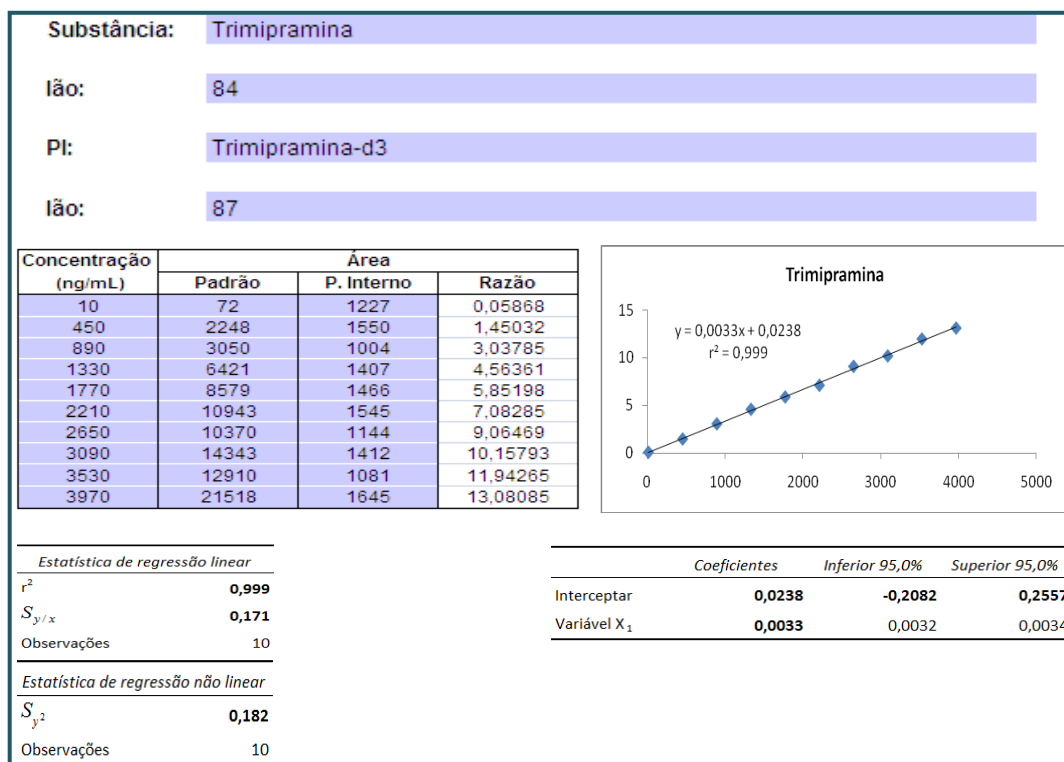


Figura D.4 Dados do estudo da Linearidade da Trimipramina.

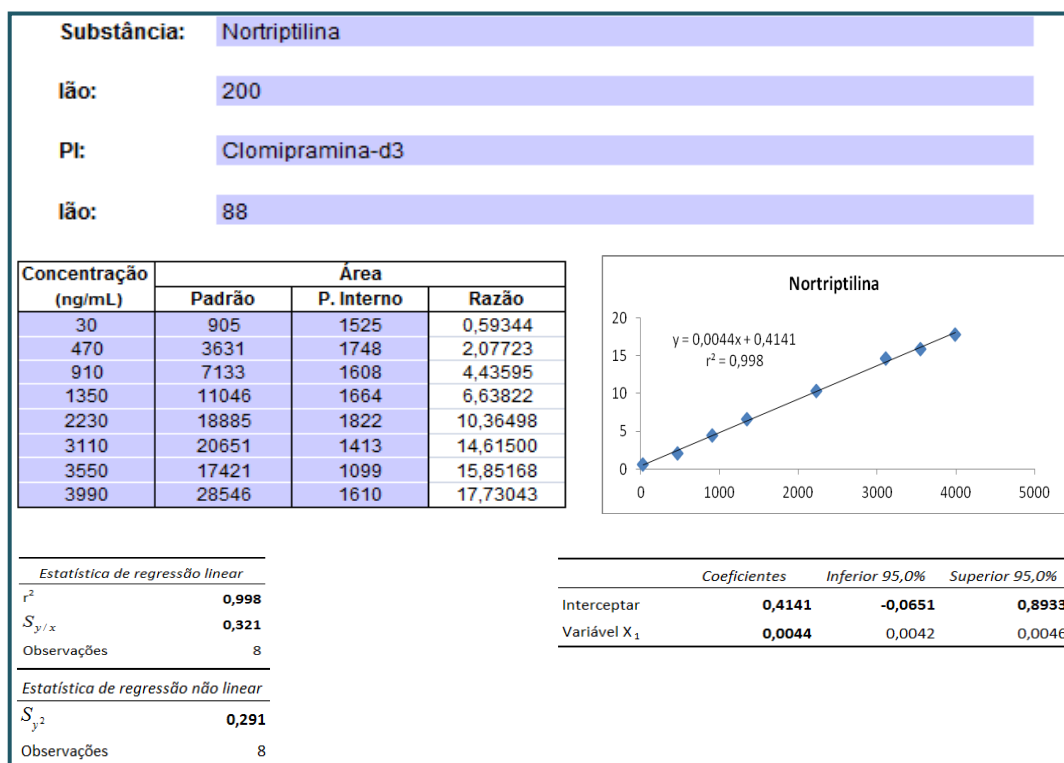


Figura D.5 Dados do estudo da Linearidade da Nortriptilina.

## ANEXO D (continuação)

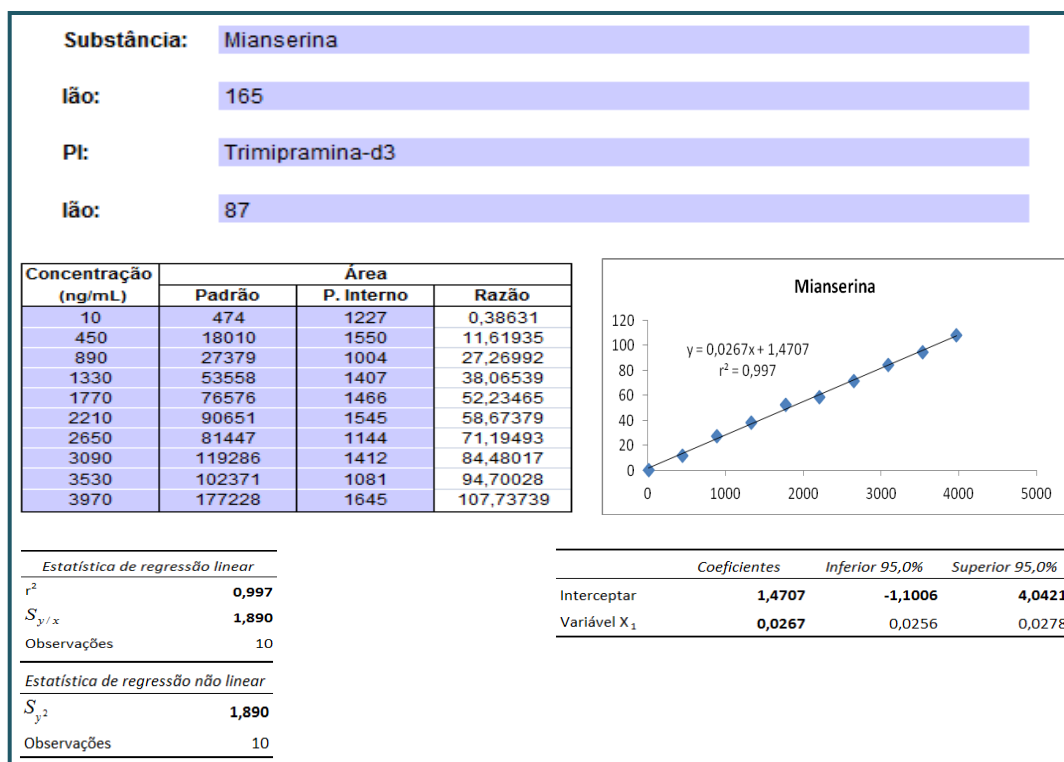


Figura D.6 Dados do estudo da Linearidade da Mianserina.

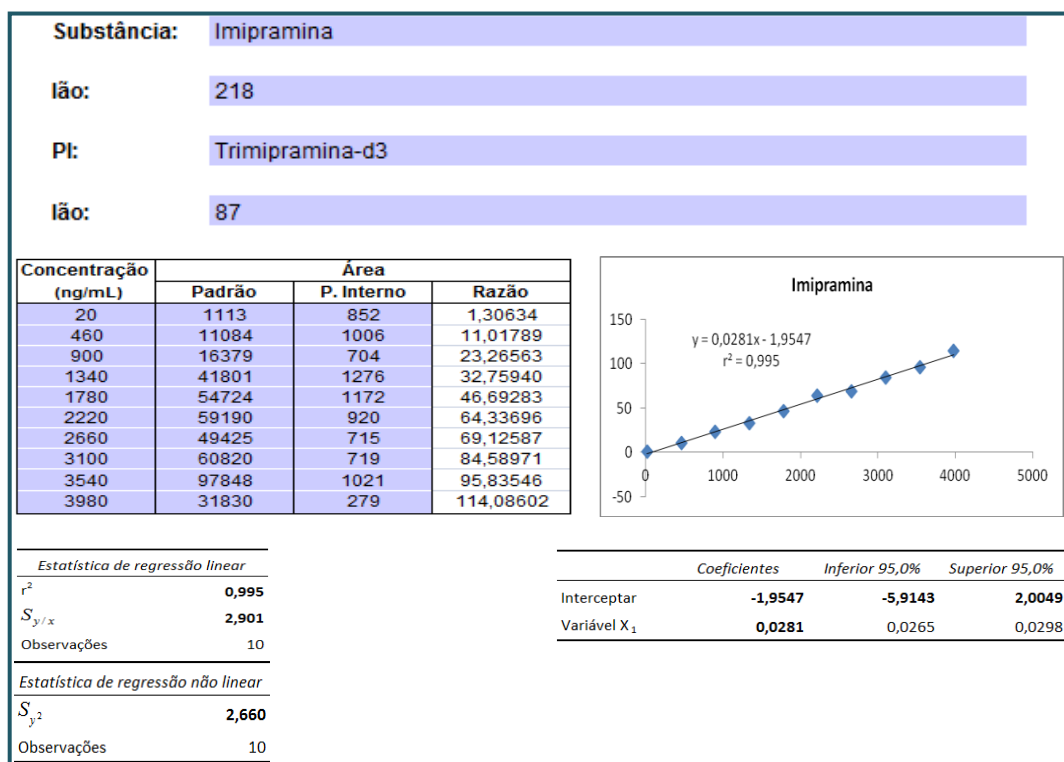


Figura D.7 Dados do estudo da Linearidade da Imipramina.

## ANEXO D (continuação)

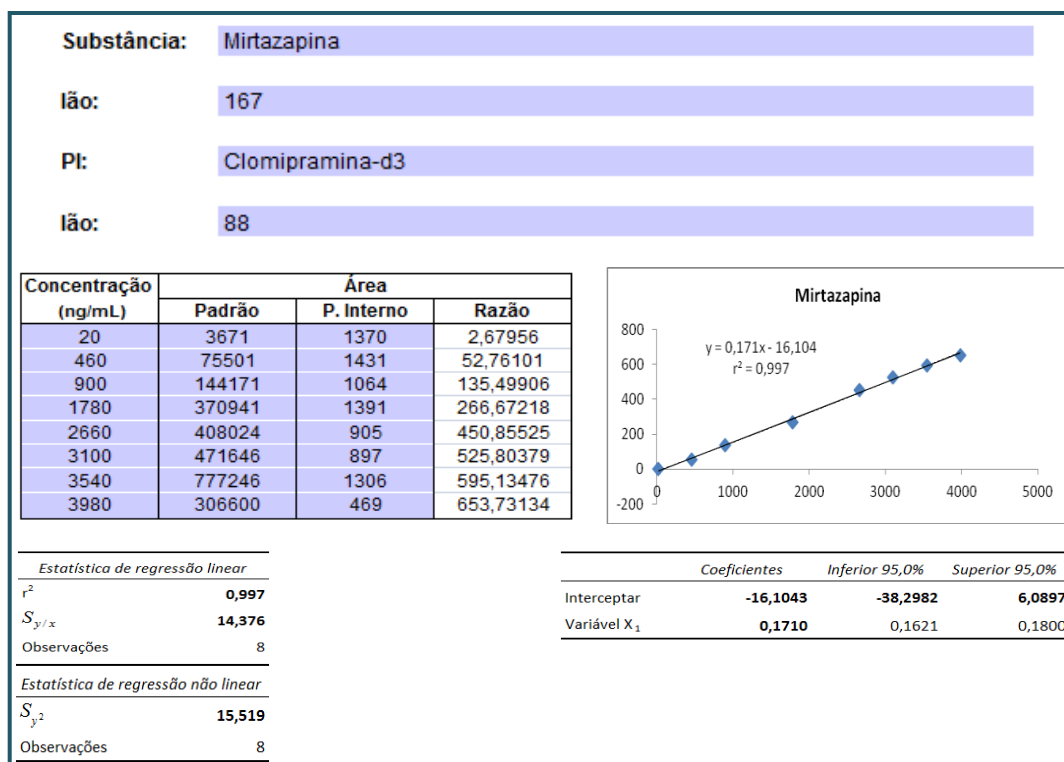


Figura D.8 Dados do estudo da Linearidade da Mirtazapina.

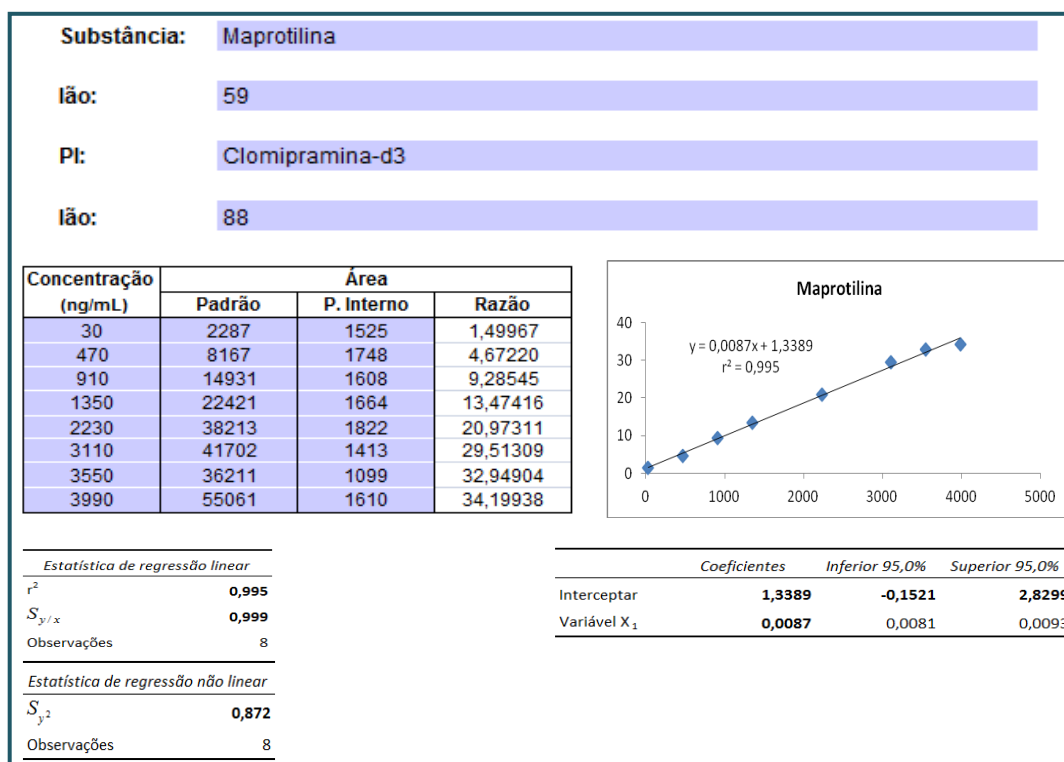


Figura D.9 Dados do estudo da Linearidade da Maprotilina.

## ANEXO D (continuação)

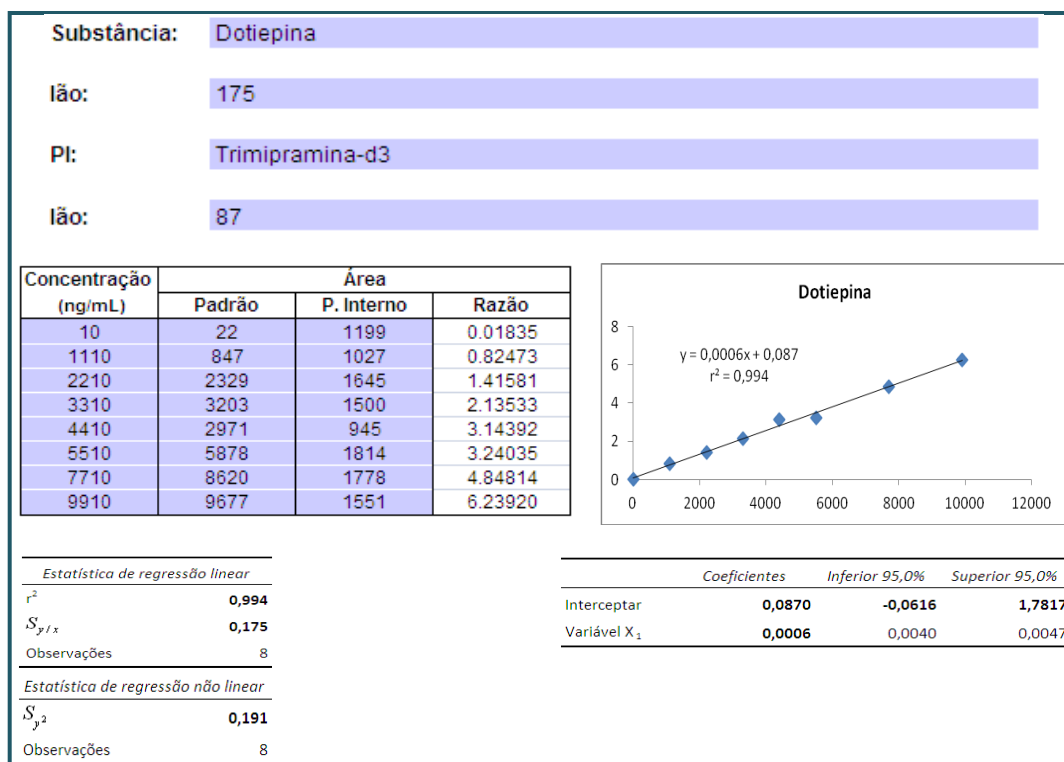


Figura D.10 Dados do estudo da Linearidade da Dotiepina.

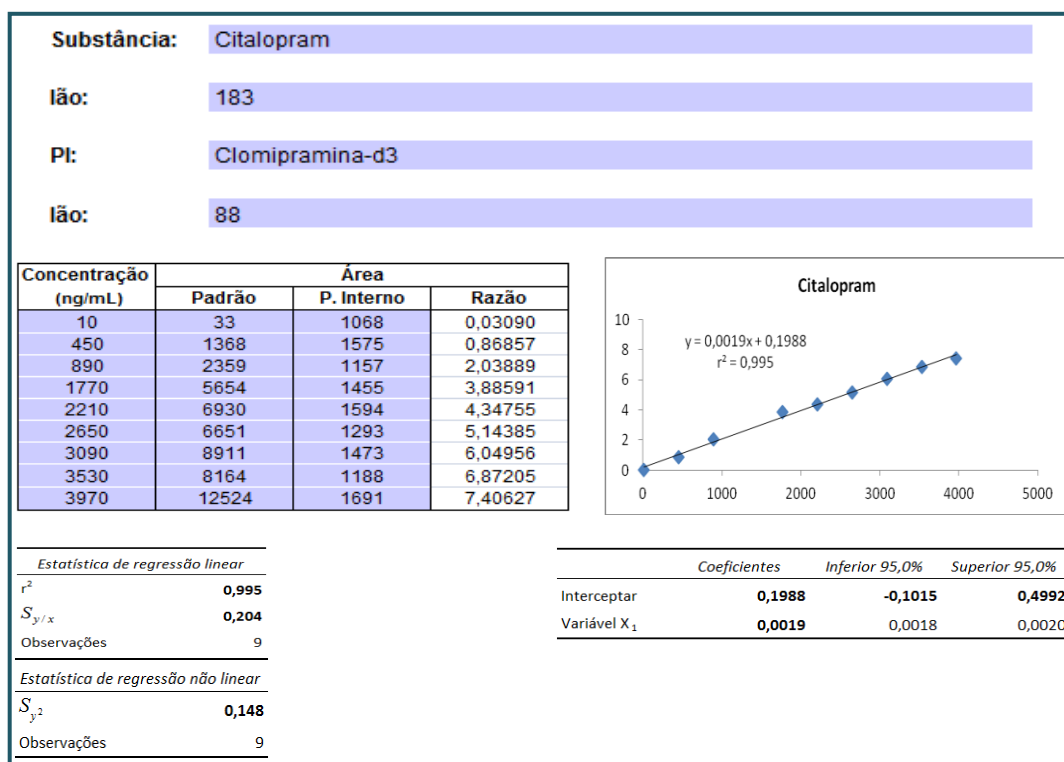


Figura D.11 Dados do estudo da Linearidade da Citalopram.

## ANEXO D (continuação)

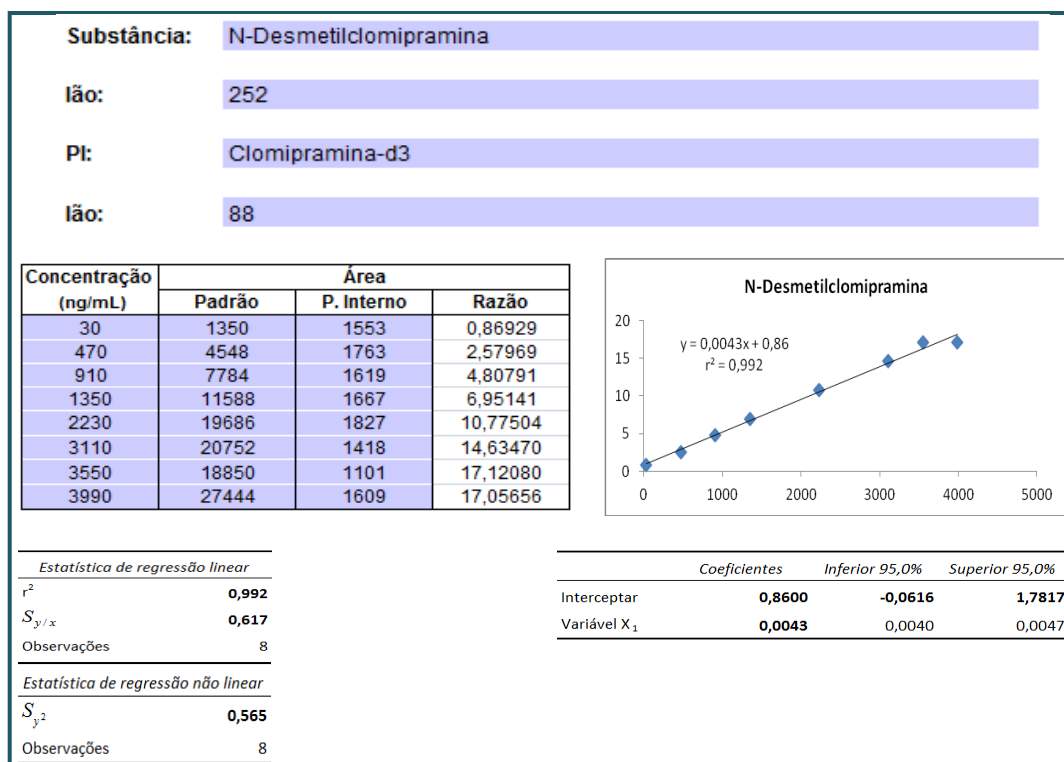


Figura D.12 Dados do estudo da Linearidade da N-Desmetilclomipramina.

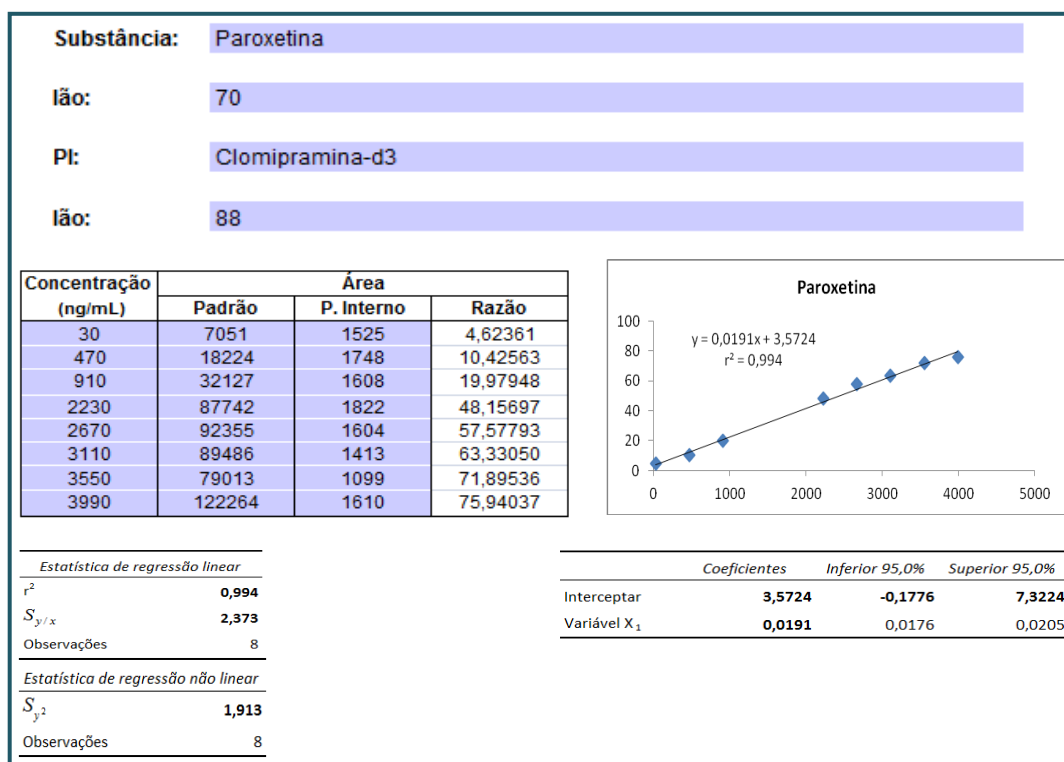


Figura D.13 Dados do estudo da Linearidade da Paroxetina.