

Mariana Marcos

Determinação de Medicamentos Antiepilépticos e Anticonvulsivantes por UPLC-MS/MS

Dissertação apresentada para provas de Mestrado em
Química Forense

Orientadores: Mestre João Miguel Franco e Dra. Paula Proença e Cunha

Co-orientadora: Professora Doutora Teresa Pinho e Melo

Julho 2011

Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra
Departamento de Química



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

RESUMO

Os fármacos antiepilépticos (AED's) são um grupo de substâncias muito heterogéneo, com mecanismos de acção distintos, ou uma combinação de vários mecanismos de acção. Os AED's são sobretudo utilizados numa combinação que conjuga quase sempre dois ou mais fármacos deste grupo terapêutico. Este trabalho quis desenvolver um método analítico onde se pudesse fazer a determinação simultânea de doze AED's (Carbamazepina, Felbamato, Fenobarbital, Fenitoína, Gabapentina, Lamotrigina, Levetiracetam, Oxcarbazepina, Primidona, Rufinamida, Topiramato e Zonisamida).

O desenvolvimento do método traduziu-se na fortificação de amostras de sangue (0,1 mL) com um padrão interno, seguida de extracção em fase sólida com recurso a colunas Oasis HLB (Waters). A análise foi feita através da injeção de 10 µL do extracto num sistema UPLC-MS/MS (Waters) e nebulização por Electrospray. A separação cromatográfica foi obtida com uma coluna ACQUITY UPLC® HSS T3 (2,1 x 100 mm I.D., 1,8 µm) (Waters), utilizando uma fase móvel composta por acetonitrilo e ácido fórmico a 0,1 %, em gradiente, com um fluxo de 0,5 mL/min. As amostras foram quantificadas após adição do padrão interno, monitorizando as respectivas transições iónicas (MRM) para cada AED. O método foi validado de acordo com o procedimento em vigor no serviço de toxicologia forense da delegação do centro do Instituto Nacional de Medicina Legal, I.P..

Os parâmetros de validação estudados incluíram, entre outros, a linearidade, precisão, exactidão, selectividade, limites de quantificação e detecção. O método mostrou ser adequadamente sensível e selectivo para os 12 AED's, obtendo-se também um desempenho linear para a gama de trabalho compreendida entre 50 e 5000 ng/mL, sempre com um coeficiente de correlação superior a 0,9925. Não foi detectado nenhum fenómeno de arrastamento ou efeito de matriz relevante.

Foi obtido um método rápido e que serve o propósito para que foi criado, capaz de detectar, identificar e quantificar simultaneamente as doze substâncias estudadas.

ABSTRACT

Antiepileptic Drugs (AED's) are a very heterogeneous group of compounds, with very diverse mechanisms of action. Epilepsy therapy is mainly treated using a combination of two, or more, drugs. The present work was elaborated with the intention of developing a single method that allowed the simultaneous determination of twelve AED's (Carbamazepine, Felbamate, Phenobarbital, Phenytoin, Gabapentin, Lamotrigine, Levetiracetam, Oxcarbazepine, Primidone, Rufinamide, Topiramate e Zonisamide), considering the ones commercialized in Portugal, and then validate the method.

The developed analytical method consisted of spiking 0.1 mL blood samples with the internal standard (Promazine), pre-concentration and clean-up by solid phase extraction (Oasis HLB 3cc, WatersTM) followed by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS), using electrospray ionization (ESI). The separation was carried out on a Waters ACQUITY UPLC® HSS T3 column (2.1 x 100 mm I.D., 1.8 µm), with a mobile phase containing acetonitrile and formic acid 0.1 % in gradient, at a flow rate of 0.5 mL/min, with a run time of 10 minutes. The samples were quantified by internal standard method detecting the ion transitions by a multiple reaction monitoring (MRM), for each AED. The described method was developed under the guidelines of Forensic Toxicology Laboratory (INML, I.P. - Centre Branch).

The results were obtained using weighed regression to calculate the calibration curves. The assay was validated in terms of linearity, accuracy and precision, achieving a sensitive (limit of quantification ranges from 45 ng/mL to 233 ng/mL) and selective method for quantification of the 12 AED's. Calibration curves for all AED's were linear from 50 to 5000 ng/mL and showed correlation coefficients (r^2) better than 0.9925. No detectable carry-over and no relevant cross-talk and matrix effect occurred.

This work describes a simple and validated method for the simultaneous determination of 12 different AED's in blood samples. Based on the analytical results and short run time, the method is suitable to support routine analysis of Antiepileptic Drugs in a forensic toxicology laboratory.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Paula Proença pela supervisão, orientação, pelo conhecimento transmitido, pelo inestimável apoio, empenho e dedicação dispensados ao longo de todo o estágio. Por toda a sua amizade, exigência e confiança que em mim depositou. Muito obrigada por tudo.

Ao Dr. João Miguel Franco pela orientação, pela oportunidade de me deixar participar activamente no funcionamento do serviço e também pela confiança em mim depositada, desde o início do meu estágio.

À Professora Doutora Teresa Pinho e Melo, por todo o apoio e orientação concedidos.

À Dra. Carla Mostra pela ajuda e disponibilidade no acompanhamento do trabalho laboratorial, pela amizade e paciência.

Ao Instituto Nacional de Medicina Legal, por permitirem a realização do meu trabalho no Serviço de Toxicologia Forense da Delegação Centro.

A todos os elementos do Serviço de Toxicologia Forense da Delegação do Centro, pela hospitalidade e acompanhamento ao longo do meu trabalho. Agradeço verdadeiramente o apoio, a paciência, a amizade e boa disposição que sempre me transmitiram. Um especial agradecimento à equipa 3, que tão bem me recebeu.

Ao departamento de Química da Faculdade de Ciência e Tecnologia da Universidade de Coimbra por me conceder a oportunidade de aí realizar o mestrado.

À minha família, amigos e a todos aqueles que, não estando aqui mencionados, de alguma forma me apoiaram na realização deste mestrado, e que sabem quem são, o meu mais sincero obrigada.

ABREVIATURAS:

ACN - acetonitrilo;

AED's - medicamentos antiepilépticos (do inglês *antiepileptic drugs*);

GABA - ácido γ -aminobutírico;

GC - cromatografia gasosa (do inglês *gas chromatography*);

H₂O - água;

HPLC - cromatografia líquida de alta pressão (do inglês *high pressure liquid chromatography*);

INML, I.P. - Instituto Nacional de Medicina Legal - Instituto Público;

LC-MS/MS - cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa sequencial (do inglês *liquid chromatography - tandem mass spectrometry*);

MeOH - metanol;

MRM - do inglês *multiple recording monitoring*;

MS - espectrometria de massa (do inglês *mass spectrometry*);

m/z - relação massa/carga

NMDA - N-metil-D-aspartato;

s/n - razão sinal/ruído (do inglês *signal/noise*)

SIR - do inglês *selected ion recording*;

STF - serviço de toxicologia forense;

TIAFT - do inglês *International Association of Forensic Toxicologists*;

TIC - do inglês *total ion chromatogram*;

TLC - cromatografia de camada fina (do inglês *thin layer chromatography*);

UPLC-MS/MS - cromatografia líquida de ultraperformance acoplada a espectrometria de massa sequencial (do inglês *ultra performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry*).

ÍNDICE

ÍNDICE	5
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABELAS	10
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	11
1. INTRODUÇÃO	12
1.1. TOXICOLOGIA FORENSE	13
1.2. FARMACOCINÉTICA E FARMACODINÂMICA	17
1.2.1. CONCEITOS BÁSICOS DE FARMACOCINÉTICA E FARMACODINÂMICA:	18
1.2.1.1. Absorção	19
1.2.1.2. Distribuição	19
1.2.1.3. Metabolismo	20
1.2.1.4. Eliminação.....	24
1.3. FÁRMACOS ANTIEPILÉPTICOS E ANTICONVULSIVANTES	25
1.3.1 IMPORTÂNCIA MÉDICO-LEGAL DO ESTUDO DE AED'S	28
1.3.2. FÁRMACOS ANTIEPILÉPTICOS E ANTICONVULSIVANTE ESTUDADOS.....	28
1.3.3. FARMACOCINÉTICA E FARMACODINÂMICA DOS AED'S EM ESTUDO	29
1.4. INTERACÇÕES MEDICAMENTOSAS	39
1.5. METABOLITOS ACTIVOS	40
1.6. REDISTRIBUIÇÃO <i>POST-MORTEM</i>	40
1.7. INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS	41
1.8. AMOSTRAS BIOLÓGICAS	42
1.9. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA	44
1.9.1. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA.....	44
1.9.2. ESPECTROMETRIA DE MASSA	46
1.9.3. UPLC-MS/MS	49
1.9.3.1. Tecnologia IntelliStart™	49
1.10. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS.....	50
2. OBJECTIVOS	52
3. MATERIAIS E MÉTODOS	54
3.1. ETAPAS DO DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE LC-MS.....	55
3.1.1. GERAL	55
3.1.2. ESPECTROMETRIA DE MASSA	56
3.1.3. CROMATOGRAFIA	57
3.1.4. PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS.....	59
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
4.1. ESTUDO DO PADRÃO DE FRAGMENTAÇÃO DOS AED'S	64
4.2. ESTUDOS PRELIMINARES DE DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO UPLC-MS/MS.....	71
4.2.1. PADRÃO INTERNO.....	75
4.2.2. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	77
4.2.4. PROCEDIMENTO DE VALIDAÇÃO.....	81
4.2.4.1. Especificidade/selectividade;	82
4.2.4.1.1. Critério de Tempo de Retenção Relativo	83
4.2.4.1.2. Critério das Relações Iónicas das transições	85

4.2.4.2. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)	95
4.2.4.3. Eficiência da Extração	98
4.2.4.4. Arrastamento (carryover):	102
4.2.4.5. Linearidade/Gama de Trabalho	104
4.2.4.6. Repetibilidade	106
4.2.4.7. Precisão Intermédia	108
4.2.4.8. Exactidão	112
4.2.4.9. Robustez	115
5. CONCLUSÕES	116
6. BIBLIOGRAFIA	120
7. ANEXOS - RESULTADOS DO PROCEDIMENTO DE VALIDAÇÃO	126
7.1. LINEARIDADE	127
7.2. LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO	128
7.3. REPETIBILIDADE	153
7.4. PRECISÃO INTERMÉDIA	166
7.5. EXACTIDÃO	179

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação de substâncias tóxicas em 7 grupos, de acordo com o seu tipo.	14
Figura 2 - Processos envolvidos na acção de uma substância. Adaptado ⁽¹⁾	18
Figura 3 - Metabolismo da Primidona a Fenobarbital e PEMA (fenilmetilmalonamida). São ambos compostos com propriedades antiepilépticas e anticonvulsivantes ⁽³⁾ ⁽⁴⁾	22
Figura 4 - Metabolismo da Fenitoína ⁽⁴⁾	22
Figura 5 - Metabolismo da Carbamazepina ⁽⁴⁾	23
Figura 6 - Mecanismo de ataque na molécula de Topiramato. A sua metabolização é feita por via renal ⁽⁴⁾	23
Figura 7 - Mecanismo de ataque do metabolismo do Felbamato. ⁽⁴⁾	24
Figura 8 - Fórmulas estruturais dos 12 AED's em estudo: (a) Carbamazepina; (b) Felbamato; (c) Fenitoína; (d) Fenobarbital; (e) Gabapentina; (f) Lamotrigina; (g) Levetiracetam; (h) Oxcarbazepina; (i) Primidona; (j) Rufinamida; (l) Topiramato; (m) Zonisamida.	29
Figura 9 - Canal de sódio dependente da voltagem. AED's (Carbamazepina, Lamotrigina e Fenitoína) ligam-se ao canal inactivando-o.	30
Figura 10 - Estrutura do GABA (A) e da Gabapentina (B) ⁽²²⁾	34
Figura 11 - Representação esquemática dos principais mecanismos de acção dos 12 AED's. Adaptado ⁽¹⁹⁾	38
Figura 12 - Sistema HPLC-MS típico. Adaptado ⁽¹⁾	46
Figura 13 - O aumento da abundância na corrente do ião total (TIC - <i>Total Ion Chromatogram</i>) está representada na figura pelo cromatograma (a). A cada "fatia" do pico correspondem os iões presentes na corrente, àquele tempo de retenção. O eixo das abcissas, que no cromatograma representa o factor tempo, passa agora a ser a razão massa/carga (m/z) (b). O espectro pode ser depois reduzido a um "stick plot", que é apenas a representação dos centroides de cada pico de massa, aumentando a resolução da informação obtida ⁽²⁶⁾	47
Figura 14 - Representação esquemática de uma análise de espectrometria de massa, com ionização por electrospray, passando por um triplo quadrupolo.	48
Figura 15 - Sistema UPLC, Waters Corp ⁽²⁶⁾	58
Figura 16 - Coluna HSS T3 (2,1 x 100 mm, 1,7 μ m), Waters ⁽²⁶⁾	58
Figura 17 - Gradiente e fases móveis usadas.	58
Figura 18 - Sistema de Extração VacElut SPE 24 (Varian), com colunas Oasis HLB 3cc (Waters), e bomba de Vácuo.	60
Figura 19 - Evaporador de amostras TurboVap. As amostras são evaporadas por submersão num banho a 40°C e ao mesmo tempo são pulverizadas com azoto.	60
Figura 20 - Fragmentação da Carbamazepina. Fragmento principal m/z 194.	64
Figura 21 - Fragmentação da Carbamazepina. Ião principal m/z 194 e fragmento m/z 179.	65
Figura 22 - Fragmentação do Felbamato. Ião principal m/z 239 e os fragmentos m/z 178 e m/z 117.	65
Figura 23 - Fragmentação da Fenitoína. Ião principal m/z 253 e os fragmentos m/z 182 e m/z 104.	66

Figura 24 - Fragmentação do Fenobarbital. Ião principal m/z 231 e os fragmentos m/z 188 e m/z 41.9.	66
Figura 25 - Fragmentação da Gabapentina. Ião principal m/z 172 e os fragmentos m/z 137 e m/z 95.	67
Figura 26 - Mecanismo de formação do fragmento da Gabapentina, com m/z 137 ⁽¹⁵⁾	67
Figura 27 - Fragmentação da Lamotrigina. Ião principal m/z 256 e os fragmentos m/z 210.9 e m/z 159.	68
Figura 28 - Fragmentação do Levetiracetam. Ião principal m/z 171 e os fragmentos m/z 154 e m/z 126.	68
Figura 29 - Fragmentação da Oxcarbazepina. Ião principal m/z 253 e os fragmentos m/z 208 e m/z 236.	69
Figura 30 - Fragmentação da Primidona. Ião principal m/z 219 e os fragmentos m/z 162 e m/z 91.	69
Figura 31 - Fragmentação da Rufinamida. Ião principal m/z 239 e o fragmento m/z 127.	70
Figura 32 - Fragmentação do Topiramato. Ião principal m/z 340 e o fragmento m/z 264.	70
Figura 33 - Fragmentação da Zonisamida. Ião principal m/z 211 e os fragmentos m/z 147 e m/z 119.	71
Figura 34 - Gradiente utilizado, com a Coluna ACQUITY YPLC [®] HSS T3.	72
Figura 35 - Gradiente com alteração (evidenciada pela marcação a laranja). Comparar com figura 34.	73
Figura 36 - Pormenor dos parâmetros MRM para a determinação do Felbamato, no software MassLynx [™]	74
Figura 37 - Gradiente UPLC com fases móveis de Acetonitrilo (A) e Ácido Fórmico 0,1 % (B).	74
Figura 38 - Cromatogramas relativos ao estudo dos padrões internos Promazina (a), Protriptilina (b) e Hidroclorotiazida (c).	76
Figura 39 - Estrutura da Vigabatrina.	78
Figura 40 - Estudo da Vigabatrina, na forma de padrão puro, em metanol, para as duas transições 130.1 > 113.1 e 130.1 > 71.1.	78
Figura 41 - Cromatogramas das transições MRM para os 12 AED's e o padrão interno.	80
Figura 42 - (a) Cromatogramas da amostra SC005-01, para a amostra não fortificada. Cálculo da razão s/n para a transição MRM principal, para a Zonisamida (em cima) e para a Primidona (em baixo). (b) Cromatograma da amostra SC005-01 fortificada, com as duas transições MRM para a Zonisamida (em cima) e para a Primidona (em baixo).	88
Figura 43 - Cromatograma da amostra SC007-01 não fortificada para a transição MRM principal do Felbamato (em baixo) e o cálculo da razão s/n para a mesma transição.	89
Figura 44 - Cromatograma da amostra SC010-01 não fortificada para a transição MRM principal do Felbamato (em baixo) e para a Oxcarbazepina (em cima), e o cálculo da razão s/n para as transições.	89

Figura 45 - Cálculo da razão s/n para a Oxcarbazepina (em cima), na amostra SC011-01, e para o Felbamato (em baixo), para a amostra não fortificada. 90

Figura 46 - Cromatogramas onde se encontra evidenciado o cálculo da razão s/n para o Felbamato (em cima) e para a Oxcarbazepina (em baixo), na amostra SC037-01, não fortificada..... 90

Figura 47 - Cálculo da razão s/n, para a amostra SC040-01, onde se evidencia a presença de interferentes no cromatograma da transição principal da Zonisamida (em cima). Para a Oxcarbazepina não foi considerada a presença de substâncias interferentes. 91

Figura 48 - Cromatogramas da Oxcarbazepina e Gabapentina, para a amostra SC039-01, onde se apresenta o cálculo da razão s/n, que evidencia a ausência de interferentes. 91

Figura 49 - Cromatogramas da Oxcarbazepina, para a amostra SC041-01. Não há sinal de presença de interferentes. 91

Figura 50 - Cálculo da razão s/n para a Oxcarbazepina e para a Zonisamida, para a amostra SC042-01. Também nesta amostra se demonstra a ausência de interferentes. 92

Figura 51 - Cromatogramas do Topiramato (b) e do cálculo da razão s/n (a). A razão s/n é 0,54. O Topiramato tem um tempo de retenção de 2,76 minutos. 93

Figura 52 - Cromatogramas da Zonisamida para as duas transições e cálculo da razão s/n para ambas (a e c). O tempo de retenção da Zonisamida é 1,51 minutos. 93

Figura 53 - Cromatogramas da Rufinamida para as duas transições e cálculo da razão s/n para ambas (b e d). O tempo de retenção da Rufinamida é 1,52 minutos.93

Figura 54 - Cromatogramas TIC dos 12 AED's nas Amostra Branca 1 (esquerda) e Amostra Branca 2 (direita). 103

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Selecção de fármacos antiepilépticos consoante o tipo de crise. Adaptado	27
Tabela 2 - Descrição das etapas envolvidas no desenvolvimento de um método LC-MS.	55
Tabela 3 - Parâmetros de espectrometria de massa e iões monitorizados, na determinação dos doze fármacos estudados.	57
Tabela 4 - Extracções SPE estudadas para a determinação de AED's em amostras de sangue.	78
Tabela 5 - Mistura-padrão utilizada na fortificação das amostras de sangue no estudo da especificidade/selectividade	82
Tabela 6 - Tempos de retenção relativos (TRR) das substâncias em cada uma das amostras de sangue.	84
Tabela 7 - Diferença relativa entre o TRR de uma dada substância na amostra e no controlo (SC002-01).	84
Tabela 8 - Tolerância máxima para as áreas relativas das transições iónicas, de acordo com as regras do STF-Centro.	85
Tabela 9 - Áreas relativas das transições iónicas, em percentagem, das respectivas substâncias.	86
Tabela 10 - Transições iónicas seleccionadas para cada substância e respectivo intervalo de tolerância.	86
Tabela 11 - Resultados obtidos no estudo da especificidade/selectividade, para as amostras não fortificadas (a) e fortificadas (b).	94
Tabela 12 - Misturas-padrão utilizadas na fortificação das amostras de sangue no estudo do limite de detecção e quantificação.	96
Tabela 13 - Preparação das curvas de calibração para o estudo dos LD e LQ.	96
Tabela 14 - Limites de Detecção, de Quantificação e dose terapêutica para cada AED. As doses terapêuticas citadas baseiam-se em informação da TIAFT ⁽²⁵⁾	98
Tabela 15 - Tabela Resumo dos resultados obtidos para a recuperação (%) obtida pela extracção SPE de dois controlos, Alto a 5000 ng/mL e Baixo a 500 ng/mL. ...	100
Tabela 16 - Curva de calibração para o estudo da Linearidade e volumes adicionados de cada mistura padrão, a 1 e a 10 µg/mL.	104
Tabela 17 - Coeficientes de correlação para os 12 medicamentos antiepilépticos, as equações da recta e respectivos coeficientes de correlação para a gama de linearidade obtida.	105
Tabela 18 - Tabela resumo resultados controlo baixo a 100 ng/mL.	107
Tabela 19 - Tabela resumo resultados controlo alto a 500 ng/mL.	107
Tabela 20 - Curva de calibração e controlos utilizados na avaliação do parâmetro de precisão intermédia.	109
Tabela 21 - Resultados do estudo da precisão intermédia, ao longo de 5 dias, para os 12 fármacos antiepilépticos.	111
Tabela 22 - Exactidão do método, expressa de acordo com a equação 12.	114

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Resultados obtidos no estudo do parâmetro de validação dos limites de Quantificação e Detecção para os 12 AED's.	97
Gráfico 2 - Resultados da Eficiência da Extração SPE.	101
Gráfico 3 - Comparação entre a recuperação da extração SPE, em percentagem, para a Gabapentina, nas duas extrações testadas, com e sem adição de ácido, a 500 ng/mL e a 5000 ng/mL.	101
Gráfico 4 - Representação gráfica dos resultados obtidos para a exactidão do método, para as duas concentrações testadas, 100 e 500 ng/mL.	114

1. INTRODUÇÃO

1.1. Toxicologia Forense

A toxicologia forense tem como principal objectivo a detecção e quantificação de substâncias tóxicas e compreende disciplinas como a bioquímica, química e a biologia, com influência em áreas bastante distintas. Contudo, a actividade do toxicologista forense aplica-se a situações com questões judiciais subjacentes para as quais importa reconhecer, identificar e quantificar o risco relativo da exposição humana a agentes tóxicos.

A toxicologia foi-se desenvolvendo naturalmente, ao longo do tempo, sendo hoje uma área multidisciplinar, à semelhança de outras ciências forenses, actuando como uma ferramenta especializada na avaliação da toxicidade, em humanos e animais, de um vasto leque de substâncias.

No século XIV Paracelso escreveu *“todas as substâncias sem excepção são venenos”* e que *“somente a dose distingue um veneno de um medicamento”*. Embora hoje a definição de tóxico seja mais complexa, O conceito proposto por Paracelso permanece actual ⁽¹⁾.

Pode definir-se como tóxico, ou veneno, toda a substância que tenha a capacidade de provocar uma lesão no organismo, quer destruindo-o, reversível ou irreversivelmente, quer afectando as suas funções vitais ⁽²⁾. Relativamente à intoxicação, pode dizer-se que é o efeito resultante da acção do tóxico em vários órgãos, havendo sempre uns mais afectados que outros. A intoxicação resulta da perturbação directa ou indirecta do meio líquido que os contém, como o sangue e o plasma intersticial ⁽²⁾.

As substâncias potencialmente tóxicas podem ser divididas de acordo com as suas características químicas ou tipo de acção, tal como é apresentado na figura 1.

As substâncias podem ainda ser classificadas de acordo com a sua origem, a sua utilidade, os órgãos em que a sua acção lesiva se faz sentir, as suas

propriedades químicas, os mecanismos bioquímicos de acção, os efeitos que produzem ou o seu potencial tóxico ⁽²⁾.

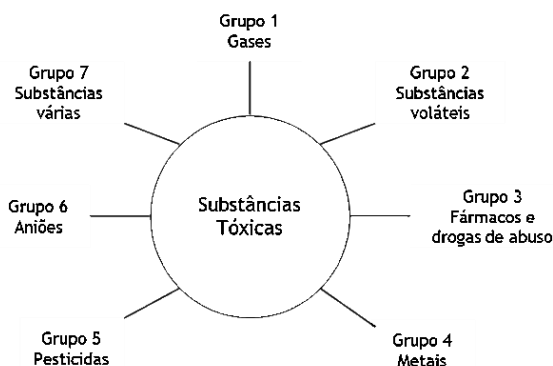


Figura 1. Classificação de substâncias tóxicas em 7 grupos, de acordo com o seu tipo.

Adaptado ⁽¹⁾

Em 1913 surgiu o primeiro trabalho internacional referindo a importância da toxicologia forense, escrito por Mathieu J. B. Orfila: "*Traité des poisons tires des règnes minéral végétal et animal, ou, Toxicologie générale, considérée sous les rapports de la physiologie, de la pathologie et de la médecine légale*". Esta publicação concedeu-lhe o título de pai da toxicologia. Orfila afirmou que "Cabe ao químico, horrorizado pelo crime de envenenamento homicida, aperfeiçoar o método para revelar o crime e auxiliar o magistrado na declaração de culpa".

Já na altura se constatou a necessidade de desenvolver os métodos científicos adequados para auxiliar a procura da verdade - adequação da prova ao crime praticado.

Cabe ao toxicologista forense colaborar na obtenção de respostas às várias perguntas possíveis de serem colocadas aquando de uma investigação criminal ou colocadas durante procedimentos judiciais. A questão principal consiste em determinar se um indivíduo estava o sob efeito de uma substância tóxica. A esta questão seguem-se outras.

Assim, é igualmente importante identificar o tóxico e a respectiva via de administração, os possíveis efeitos no indivíduo e ainda se este constitui

perigo para a vida ou é letal. Poderá ser relevante saber que quantidade estava presente no organismo. Não cabe ao toxicologista pronunciar-se acerca do intuito de matar ou sobre a etiologia do crime, mas sim auxiliar o magistrado a tomar essa decisão. Não está também nas funções do toxicologista inferir sobre a causa de morte, competindo essa responsabilidade ao patologista. Cabe assim ao toxicologista forense ⁽¹⁾:

- Avaliar se o envenenamento pode ser passível de ser causa de morte, auxiliando o patologista na decisão final;
- Investigar se houve envenenamento por parte de uma terceira pessoa (e.g. casos de envenenamentos não acidentais de crianças ou adultos, em casos de agressão sexual, etc.);
- Determinar a presença de substâncias que podem afectar o comportamento de um indivíduo e/ou a sua capacidade de decisão (e.g. condução sob efeito do álcool ou drogas, dopagem, etc.);

Uma das principais dificuldades de um toxicologista forense surge quando não é especificado num pedido de análise, o tipo de substância cuja pesquisa é pretendida. Os testes toxicológicos são, específicos e limitados por tipo de substâncias e, estando os métodos de detecção directamente relacionados com as características físico-químicas das substâncias a analisar.

Assim, não existe um método universal para a determinação de todas as substâncias tóxicas, especialmente quando é pedido não só que seja detectada a presença mas também que se quantifique. Esta também é particularmente difícil quando se está na presença de matrizes mais complexas, como é o caso das matrizes biológicas, as mais comuns em toxicologia forense. O toxicologista forense deve ter sempre em mente, tal como Orfila escreveu, que “ *a presença de uma substância tóxica deve ser comprovada em sangue e tecidos biológicos antes de poder ser considerada causa de morte*”.

Os métodos analíticos devem incluir uma fase de triagem, que deve ser o mais abrangente possível no que diz respeito ao tipo de substâncias, seguida de procedimentos de identificação e quantificação específicos para os compostos detectados. Assim, existem quatro passos essenciais que compõem um exame toxicológico:

1. **Detecção** - detectar a presença de compostos possivelmente tóxicos através de métodos de triagem;
2. **Identificação** - identificação positiva de fármacos e drogas de abuso, bem como os seus metabolitos, ou outras substâncias presentes numa amostra;
3. **Quantificação** - quantificar fármacos e drogas de abuso, os seus metabolitos, ou outros compostos presentes;
4. **Interpretação** - interpretar os achados toxicológicos conseguidos com a identificação e quantificação, no contexto do caso, para tentar responder aos quesitos propostos.

Alguns testes de triagem, como por exemplo os imunoenzimáticos, permitem determinar *a priori* o tipo de substâncias presentes numa amostra (*e.g.* opiáceos, benzodiazepinas), sendo esta depois processada de acordo com o resultado obtido. Existem numerosos métodos para a pesquisa de substâncias de interesse em amostras biológicas, actualmente a maior parte combina alguma forma de cromatografia, para a separação dos componentes da amostra, com algum tipo de espectroscopia, para a identificação das substâncias.

As técnicas cromatográficas mais utilizadas incluem a cromatografia em camada fina (TLC), cromatografia gasosa (GC), cromatografia líquida (LC) e electroforese capilar. No que diz respeito a técnicas espectroscópicas, as mais usadas são o ultravioleta-visível e a fluorescência, infravermelho, infravermelho próximo, raman e espectrometria de massa ⁽¹⁾.

As técnicas hífenadas mais comuns são a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS), a cromatografia líquida acoplada à

detecção por ultravioleta ou por fluorescência (LC-UV ou LC-F) e a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS) ⁽¹⁾.

1.2. Farmacocinética e Farmacodinâmica

Uma parte importante da interpretação dos resultados toxicológicos assenta na compreensão dos mecanismos básicos de farmacocinética e metabolismo. Os toxicologistas forenses têm uma tendência natural para interpretar as concentrações de um determinado composto em relação ao papel que teve essa substância na morte do indivíduo.

Outras questões podem ser levantadas por magistrados ou pessoas comuns. Pode eventualmente ser relevante saber a quantidade de comprimidos e há quanto tempo foram ingeridos. Para poder responder a essas questões é essencial compreender em primeiro lugar o conceito de dose - número de comprimidos ingeridos em comparação com a dose prescrita pelo médico ⁽¹⁾. Contudo, é preciso ter também em conta o conceito de concentração em sangue e a sua relação com o tempo e a dose ingerida.

Em teoria, a farmacocinética é uma ferramenta científica que pode fazer a ligação entre a concentração da substância no sangue e a dose, sendo de extrema importância para a compreensão do percurso dessa substância no organismo. Em toxicologia clínica pode ser utilizada para determinar a duração da acção ou para avaliar se uma determinada formulação farmacêutica é eficaz. No âmbito da toxicologia forense a farmacocinética raramente é passível de ser aplicada de forma objectiva, particularmente em casos *post-mortem*.

Teoricamente, a concentração de um composto pode ser determinada com relativa segurança numa amostra de sangue, mas quando se fala em casos *post-mortem*, há sempre uma incerteza associada à representatividade da amostra (e.g. sujeita a fenómenos de redistribuição *post-mortem* ou putrefacção). É ainda um procedimento incorrecto considerar que a absorção é sempre completa, particularmente em casos de intoxicações

e/ou *overdoses*. Assim, este tipo de cálculos farmacocinéticos e retrospectivos deve ser utilizado com alguma prudência.

1.2.1. Conceitos básicos de farmacocinética e farmacodinâmica:

A administração de um fármaco inicia uma série de processos interdependentes, que vão determinar a cada instante a sua concentração no local onde se pratica a sua acção:

- Absorção;
- Distribuição;
- Metabolismo;
- Excreção.

Aos processos de metabolismo e excreção pode também ser atribuído o nome de eliminação, uma vez que funcionam em conjunto para a eliminação pelo organismo da substância em questão.

Pode dizer-se que a farmacocinética descreve o perfil temporal e de concentração da substância no sangue e tecidos. Já a farmacodinâmica refere-se à relação entre a dose e a resposta farmacológica pretendida ⁽¹⁾.

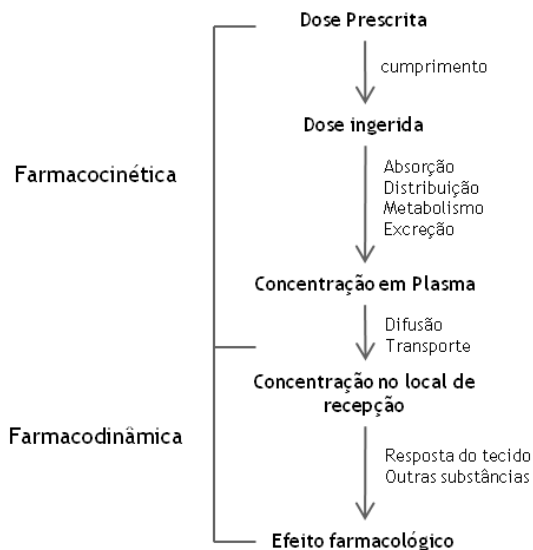


Figura 2. Processos envolvidos na acção de uma substância. Adaptado ⁽¹⁾.

1.2.1.1. Absorção

A fase de absorção pretende relacionar a entrada da substância com o local de absorção. A absorção é um processo de extrema importância para a farmacocinética de uma determinada substância. A via de administração por seu lado é um factor importante na determinação da taxa de absorção. As vias de administração podem ser: oral, rectal, ocular, inalação pela boca ou nariz, absorção cutânea e outras superfícies corporais, intravenosa ou intramuscular, entre outras. Todas estas vias de absorção possuem diferentes taxas e extensão de absorção.

A absorção propriamente dita, é um processo dependente do tempo e varia grandemente entre diferentes tecidos, bem como entre substâncias distintas. Uma vez que a maior parte dos medicamentos é administrado por via oral, este é o mecanismo de absorção de maior importância para o toxicologista ⁽¹⁾.

1.2.1.2. Distribuição

A distribuição dos fármacos pelos diferentes tecidos é um processo dependente de diversos factores, incluindo o fluxo sanguíneo nos tecidos, o grau de absorção do fármaco no organismo, o grau de ionização do composto ao pH a que o plasma se encontra, o seu peso molecular, bem como a extensão da sua ligação a proteínas, nos tecidos e no sangue.

Um aspecto importante na interpretação de resultados analíticos é a compreensão do mecanismo de distribuição do composto entre o sangue e os tecidos, em particular quando há apenas um tipo de amostra. Muitos fármacos e drogas, se não mesmo todos, ligam-se a proteínas plasmáticas logo após entrarem no organismo com uma afinidade suficiente capaz de alterar a sua actividade biológica. As proteínas predominantes são a albumina (com maior afinidade para compostos ácidos), a β -globulina e α 1-acidoglicoproteína ⁽¹⁾.

Assim, devido à sua importância, o grau de ligação às proteínas deve ser tido em consideração no momento da interpretação dos resultados toxicológicos.

1.2.1.3. Metabolismo

As substâncias ingeridas podem ser alvo de destruição no estômago, por acção das enzimas presentes no tracto gastrointestinal, ou podem não ser absorvidas de todo devido à sua natureza química. Estes factores têm grande influência no que diz respeito à biodisponibilidade, reduzindo-a.

Os mecanismos do metabolismo de uma substância podem dividir-se em dois tipos: fase I e fase II ⁽¹⁾.

- ◆ **Fase I:** Inclui reacções de oxidação, hidroxilação, N- e O-desalquilação, formação de sulfóxidos, redução e hidrólise.
- ◆ **Fase II:** Compreende os processos que envolvem reacções de conjugação, com ácido glucorónico, por acetilação ou metilação ou ainda por conjugação com aminoácidos e sulfatos.

Muitos compostos sofrem uma combinação de reacções de fase I e fase II. A reacção de fase II, mais comum, é a conjugação de ácido glucorónico com grupos fenólicos ou grupos hidroxilo alcoólicos, que são produtos comuns de reacções de fase I. A biodisponibilidade relativa de um fármaco pode ser determinada com base na comparação das vias de administração, tendo como referência, por exemplo, a via oral ou ainda entre diferentes formulações desse fármaco.

Os compostos absorvidos após ingestão por via oral passam para a circulação mesentérica e para o fígado antes de entrarem na circulação sistémica. Numa primeira passagem, estes são substancialmente metabolizados pelo fígado antes de ser obtido qualquer efeito farmacológico. De uma forma geral, os fármacos que são metabolizados por enzimas hepáticas têm uma menor biodisponibilidade comparativamente com aqueles que não sofrem esta acção.

O efeito esperado de um primeiro metabolismo é a redução do efeito da substância mãe mas, no caso de uma substância ser administrada por via oral e metabolizada no fígado na sua forma activa (pró fármaco), esta terá um perfil de actividade diferente daquele que ocorre quando uma substância é administrada já na sua forma activa, pois a formação de metabolitos activos modifica o perfil da acção de um fármaco. Os fármacos e os seus metabolitos podem também ser excretados para a bÍlis. Este processo de excreção biliar pode ocorrer inúmeras vezes até que a substância seja completamente eliminada do organismo.

O metabolismo é por isso, parte integrante do processo de eliminação. Para além de facilitar a excreção pode também afectar a resposta farmacológica à substância, alterando a potência do efeito e/ou a duração da acção do mesmo. Os metabolitos podem ser farmacologicamente activos ou inactivos. Metabolitos activos podem ter diferentes modos de acção e diferentes potências. Um exemplo ilustrativo é a desalquilação da Primidona (primeiro passo da reacção metabólica descrita na figura 3) e do Metilfenobarbital, ambos metabolizados em Fenobarbital, um outro AED com um efeito mais duradouro que os dois primeiros.

Apresentam-se, seguidamente, alguns exemplos dos processos metabólicos de alguns AED's.

A Lamotrigina, por exemplo, é um AED da classe das feniltriazinas (compostos por um grupo fenil e um grupo triazina - $C_3H_3N_3$), e é metabolizado predominantemente por glucuronização.

A Primidona é metabolizada via CPY2C9/19 a Fenobarbital e PEMA (eniletilmalonamida) (Figura 3).

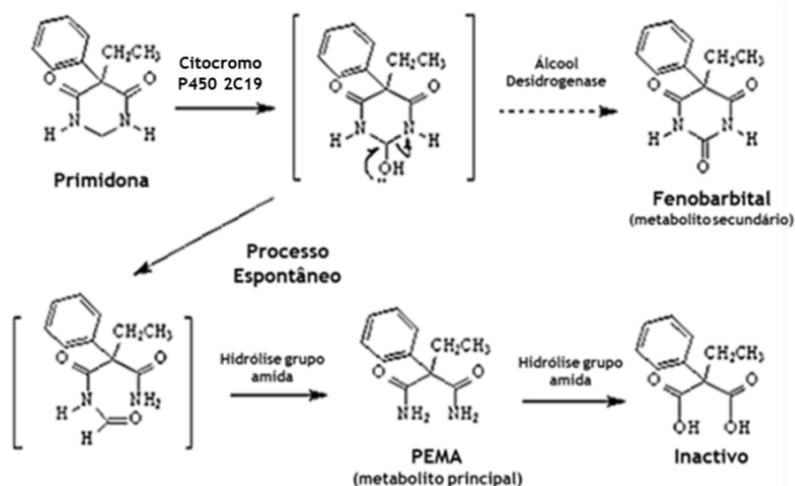


Figura 3. Metabolismo da Primidona a Fenobarbital e PEMA (fenilmetilmalonamida). São ambos compostos com propriedades antiepilépticas e anticonvulsivantes^{(3) (4)}.

A Fenitoína é também metabolizada por hidroxilação aromática, catalisada pelas isozimas CPY2C9/19 no Citocromo P450. O seu metabolismo é apresentado de seguida (figura 4).

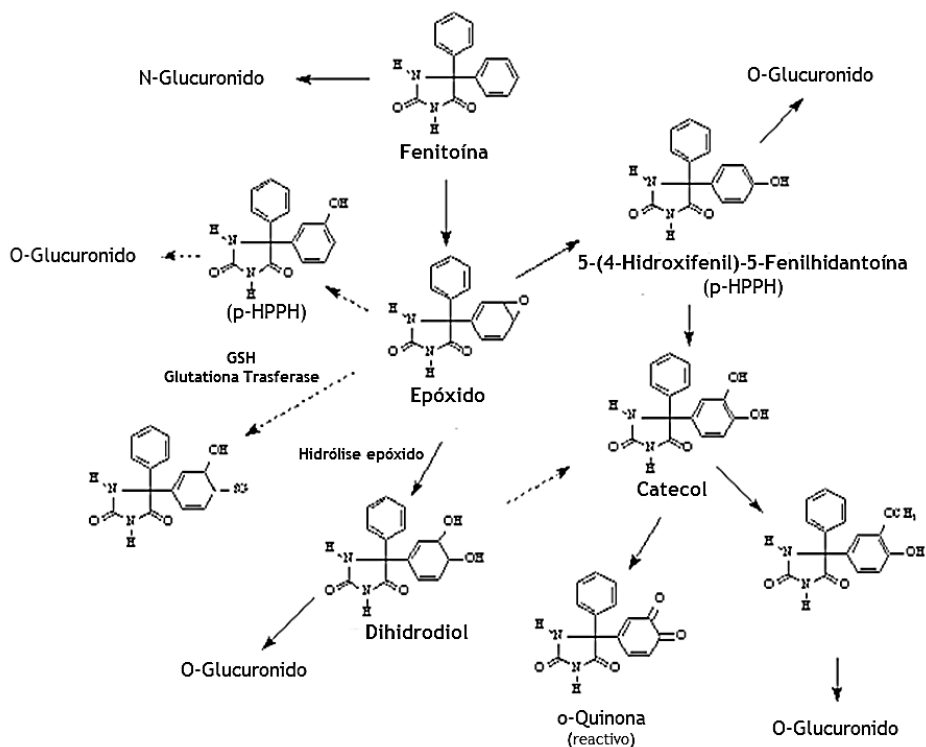


Figura 4. Metabolismo da Fenitoína⁽⁴⁾.

A Carbamazepina é maioritariamente metabolizada num composto estável, o 10,11 - Carbamazepina-epóxido, pela isozima CYP3A4 do Citocromo P450, no fígado. Este metabolito reage depois por acção de uma epóxido hidrolase para dar origem ao metabolito inactivo 10,11 - Carbamazepina-diol, que é excretado sob a forma de um glucunorido (figura 5).

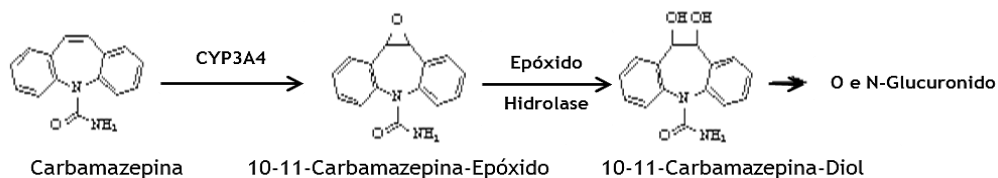


Figura 5. - Metabolismo da Carbamazepina ⁽⁴⁾.

O Topiramato é um monossacárido substituído e, é um derivado que ocorre naturalmente do açúcar D-Frutose (figura 6). Apenas uma pequena parte do Topiramato é eliminada por via hepática (CYP2C19), sendo a restante metabolizada por via renal. O éster é hidrolisado pela sulfatase para o correspondente álcool primário, que é depois oxidado no ácido carboxílico correspondente.

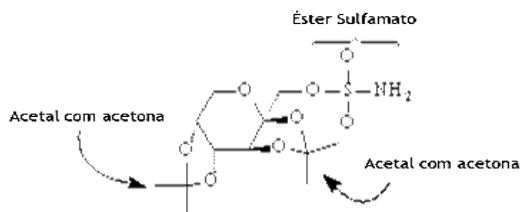


Figura 6. Mecanismo de ataque na molécula de Topiramato. A sua metabolização é feita por via renal ⁽⁴⁾.

O Felbamato é um éster carbamato de 2-Fenil-1,3-propanediol. Os locais para o “ataque” metabólico são o carbono benzílico (hidroxilação benzílica via CYP3A4/2E1 para dar origem ao principal metabolito) e o carbono em posição *para* no anel aromático (hidroxilação *p*-aromática via CYP2C19 para dar origem ao metabolito secundário) (figura 7).

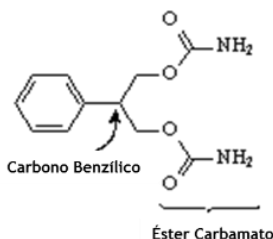


Figura 7. Mecanismo de ataque do metabolismo do Felbamato. ⁽⁴⁾

O metabolismo pode ocorrer noutros tecidos para além do fígado, tais como tracto gastrointestinal, rins e pulmões. A sua contribuição depende particularmente da via de administração.

Em casos *post-mortem*, é preciso ter em conta a bioconversão anaeróbica que ocorre por acção de enzimas endógenas activas ou por “invasão” das bactérias provenientes do tracto gastrointestinal - processo natural de putrefacção do cadáver.

1.2.1.4. Eliminação

Grande parte das substâncias é eliminada do organismo através do metabolismo por via hepática ou da excreção por via renal.

Para a compreensão da fase de eliminação é importante abordar os conceitos de *clearance* e semivida.

Designa-se por *clearance* a totalidade do processo de eliminação do metabolismo, incluindo o metabolismo renal e outros processos menores ⁽¹⁾. Este conceito é de extrema utilidade em toxicologia clínica, pois representa uma maneira simples de determinar a relação entre a dose ingerida ao longo de um determinado espaço de tempo e a concentração plasmática média do composto. O *clearance* renal é geralmente medido através da quantidade de creatinina - produto do metabolismo de proteínas que não é reabsorvido nem secretado nos túbulos. A concentração de creatinina pode ser usada para medir o grau de concentração do filtrado glomerular na urina. Apesar da sua utilidade clínica, o conceito de *clearance* traz algumas limitações ao

toxicologista forense, uma vez que não dá uma indicação da existência imediata da substância no organismo.

Pode definir-se como semivida de uma substância o tempo necessário para a concentração plasmática decrescer em cerca de 50 %. Este decréscimo é resultado directo do processo de eliminação e ocorre na forma de um sistema de primeira ordem ⁽¹⁾.

A excreção propriamente dita ocorre maioritariamente a nível renal através da urina. O *clearance* renal pode resultar tanto do efeito da filtração glomerular como da secreção tubular. A filtração é um processo passivo e apenas a substância livre (não ligada a proteínas) é eliminada por este mecanismo. Em alguns casos pode haver reabsorção, o que reverte o processo de secreção.

A extensão do processo de eliminação pelos rins é extremamente variável e depende, sobretudo, de qual destes três é o processo determinante: filtração, secreção ou reabsorção. É de notar que muitos compostos apresentam uma farmacocinética não linear, isto é, a taxa de excreção e o grau de metabolização são dependentes da dose.

Ao interpretar os dados toxicológicos é preciso ter também em consideração se o consumo foi agudo ou se era um consumo crónico. A acumulação de determinada substância pode levar a uma toxicidade progressiva e potencialmente perigosa.

1.3. Fármacos antiepilépticos e anticonvulsivantes

A epilepsia pode ser caracterizada como uma condição neurológica que afecta o sistema nervoso central, através da ocorrência de crises onde há descarga neuronal, com ou sem a existência de convulsões.

Uma crise epiléptica é determinada pelo aparecimento súbito de actividade eléctrica no cérebro. O termo crise refere-se a uma alteração transitória do comportamento, resultante de um distúrbio, síncrono, do disparo de uma população de neurónios cerebrais. A designação de epilepsia refere-se a uma

perturbação da função cerebral caracterizada por crises periódicas de ocorrência imprevisível.

As crises epiléticas podem ser classificadas tendo em consideração a escolha da terapêutica ⁽⁵⁾, em parciais (com início localizado/focal), generalizadas, não-classificadas e estado de mal (com crises prolongadas parciais ou generalizadas, sem recuperação entre as crises). As crises parciais podem ainda ser simples (sem perturbação da consciência), complexas (com perturbação da consciência) ou com generalização secundária.

Na tabela 1 estão listados os fármacos antiepiléticos existentes no mercado, agrupados consoante o tipo de crise epilética. Encontram-se sublinhados os AED's estudados no âmbito deste trabalho.

O primeiro fármaco antiepilético conhecido foi o brometo de potássio (1957, em Inglaterra), constituindo a sua utilização o início do tratamento moderno da epilepsia ⁽⁶⁾. Contudo, a era farmacológica da terapia antiepilética começou de facto com a descoberta do Fenobarbital, por Alfred Hauptmann. Até hoje, o Fenobarbital é um dos fármacos antiepiléticos mais prescritos em todo o mundo ⁽⁶⁾. Depois do Fenobarbital surgiu a Fenitoína, também ainda hoje usada na terapia antiepilética. Durante os anos de 1940's surge no mercado o Valproato de Sódio. Mais tarde, nos anos 60, é disponibilizada a Carbamazepina, sintetizada por Schindler em 1953, para a Geigy. Também durante os anos 60, os laboratórios Roche reconhecem as propriedades antiepiléticas das benzodiazepinas por eles sintetizadas e ainda hoje utilizadas para esse efeito ⁽⁶⁾.

Ao longo dos últimos anos houve uma enorme evolução da medicina no sentido da compreensão da patofisiologia da epilepsia, especialmente no que diz respeito à sua fisiologia celular. Na era mais moderna da terapia antiepilética, desde 1975, foram sintetizados mais de 28000 substâncias

potencialmente comercializáveis, mas apenas algumas passaram pela aprovação das organizações mundiais ⁽⁶⁾. Desde essa altura foram introduzidos 11 novos AED's no mercado mundial: Valproato de Sódio, Vigabatrina, Tiagabina, Lamotrigina, Oxcarbazepina, Felbamato, Topiramato, Gabapentina, Levetiracetam, Zonisamida e Pregabalina ⁽⁷⁾.

Todas estas substâncias possuem mecanismos de acção distintos, ou uma combinação de vários mecanismos de acção, mas têm em comum o facto de reduzirem a actividade excitatória neuronal ou de aumentar a inibição da actividade neuronal. Os medicamentos antiepilépticos e anticonvulsivantes não são substâncias propícias ao abuso, mas podem levar a situações de intoxicação (acidental, suicida ou por efeito colateral ou secundário da medicação prescrita pelo médico). Os AED's podem ainda pôr em causa a capacidade de condução ou de operação de maquinaria pesada. Assim, é importante que seja determinada a presença, ou ausência, de um determinado medicamento antiepiléptico. Está nas funções do toxicologista forense poder fazer a determinação deste tipo de medicamentos, sempre que possível em sangue.

Tabela 1 - Selecção de fármacos antiepilépticos consoante o tipo de crise. Adaptado ⁽⁸⁾

a - Inclui crise parcial simples, complexa, e crises secundárias generalizadas, b - Como terapia adjuvante

	Tónico-Clónico Primário Generalizado	Parcial ^a	Ausência	Ausência Atípica, Mioclónica, Atónica
Primeira Linha	Ácido Valpróico <u>Lamotrigina</u>	<u>Carbamazepina</u> <u>Fenitoína</u> <u>Lamotrigina</u> Ácido Valpróico	Ácido Valpróico	Ácido Valpróico
Alternativos	<u>Fenitoína</u> <u>Carbamazepina</u> <u>Topiramato</u> ^b <u>Zonisamida</u> ^b <u>Felbamato</u> <u>Primidona</u> <u>Fenobarbital</u> Vigabatrina	<u>Topiramato</u> ^b <u>Levetiracetam</u> ^b <u>Tiagabina</u> ^b <u>Zonisamida</u> ^b <u>Gabapentina</u> ^b <u>Primidona</u> <u>Fenobarbital</u> Acetato de Esllicarbazepina	<u>Lamotrigina</u> Clonazepam	<u>Lamotrigina</u> <u>Topiramato</u> ^b Clonazepam <u>Felbamato</u> Piracetam

1.3.1 Importância médico-legal do estudo de AED's

A presença, ou ausência, do fármaco antiepiléptico pode ser um elemento chave na determinação da causa de morte de um indivíduo, ou da explicação do comportamento de um indivíduo aquando de um evento a ser investigado pelas entidades competentes. Pode ser relevante em situações onde há negligência médica, por exemplo no caso de um diagnóstico errado (indivíduo não epilético diagnosticado como epilético), ou no caso de uma epilepsia não ser diagnosticada de todo, dando origem a complicações decorrentes da doença, podendo estas ser fatais, ou ainda o facto de o médico não informar correctamente os pacientes acerca do efeito dos fármacos antiepilépticos, nomeadamente no que diz respeito ao facto de descontinuar a medicação prescrita, ou ainda de erros na determinação da dosagem do medicamento.

É, por isso, importante compreender o efeito que cada fármaco, particularmente os presentes no mercado português, pode ter sobre um determinado indivíduo, incluindo casos *post-mortem*, ajudando assim, através da toxicologia forense ou clínica, a desvendar a causa da morte ou grau de influência, em situações relacionadas com a terapêutica da epilepsia.

1.3.2. Fármacos antiepilépticos e anticonvulsivante estudados

Os antiepilépticos são uma classe de medicamentos quimicamente heterogénea e, por essa razão, é difícil a criação um método de triagem capaz de os incluir a todos. Estão referidos na literatura numerosos trabalhos onde é feita a determinação de alguns medicamentos antiepilépticos por LC-UV^{(9) (10)}, LC-MS⁽¹¹⁾, LC-MS/MS^{(12) (13) (14) (15)} e GC-MS^{(16) (17)}. Não foi, contudo, encontrado qualquer artigo que refira a determinação simultânea de mais de nove AED's.

Para além dos doze fármacos estudados (figura 8), no mercado português encontram-se ainda comercializados como AED's o Acetato de

Eslicarbazepina, o Ácido Valpróico, o Clonazepam, o Piracetam, a Pregabalina, a Tiagabina, o Valproato de Sódio e a Vigabatrina ⁽⁵⁾.

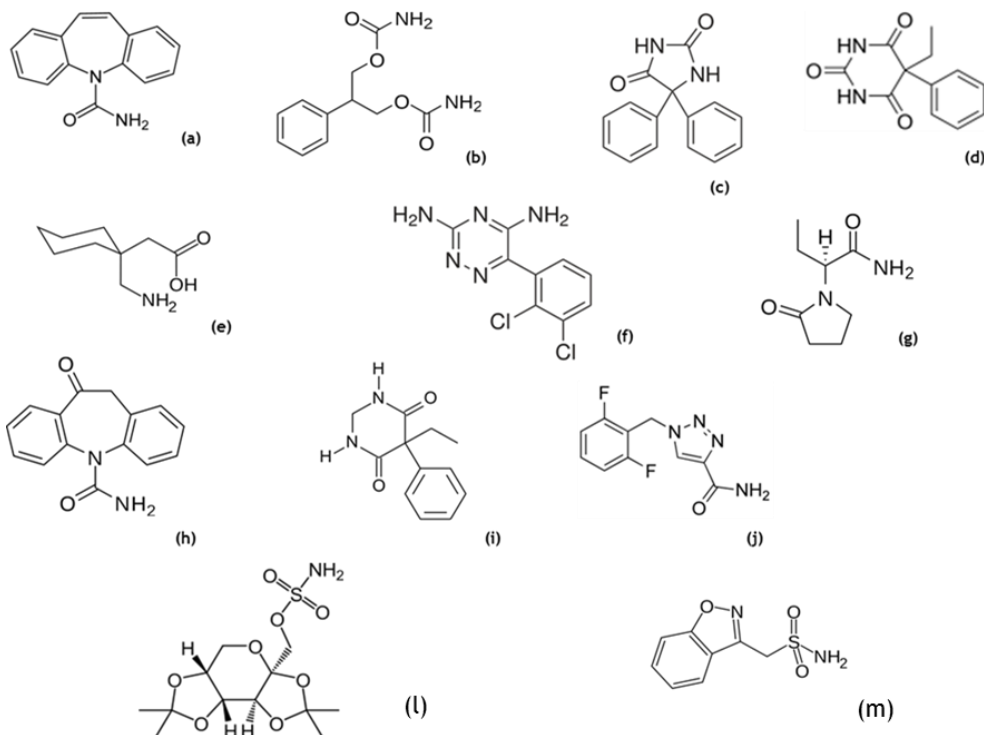


Figura 8 - Fórmulas estruturais dos 12 AED's em estudo: (a) Carbamazepina; (b) Felbamato; (c) Fenitoína; (d) Fenobarbital; (e) Gabapentina; (f) Lamotrigina; (g) Levetiracetam; (h) Oxcarbazepina; (i) Primidona; (j) Rufinamida; (l) Topiramato; (m) Zonisamida.

1.3.3. Farmacocinética e Farmacodinâmica dos AED's em estudo

O conhecimento dos mecanismos de acção e da farmacocinética dos AED's é muito importante, tanto em toxicologia forense como em toxicologia clínica, sobretudo quando são utilizados como co-medicação.

São muitas as estruturas e sistemas do organismo que estão envolvidos durante uma crise epiléptica, como sejam os neurónios, os canais iónicos, receptores, células da glia e sinapses inibitórias e excitatórias. Assim, os AED's foram desenvolvidos com o propósito de modificar estes processos no sentido de favorecer a inibição em função da excitação, com a finalidade de evitar e prevenir as crises epilépticas.

Ainda que os doze fármacos antiepilépticos que se pretendeu estudar neste trabalho tenham propriedades físico-químicas bastante distintas eles podem agrupar-se em 7 grandes grupos: bloqueadores dos canais de sódio dependentes da voltagem (Carbamazepina, Fenitoína, Oxcarbazepina, Lamotrigina e Rufinamida), inibidores das correntes de cálcio, potenciadores do ácido γ -aminobutírico, vulgarmente designado por GABA, (Gabapentina), antagonistas do glutamato (Felbamato), inibidores da anidrase carbónica (Zonisamida), agonistas do receptor GABA_A (Fenobarbital e Primidona) e fármacos com mecanismos de acção desconhecidos ou com mais do que um mecanismo de acção (Levetiracetam e Topiramato) ⁽³⁾.

De seguida, são apresentadas as propriedades farmacocinéticas e modos de acção mais relevantes para as substâncias com propriedades antiepilépticas no âmbito deste trabalho.

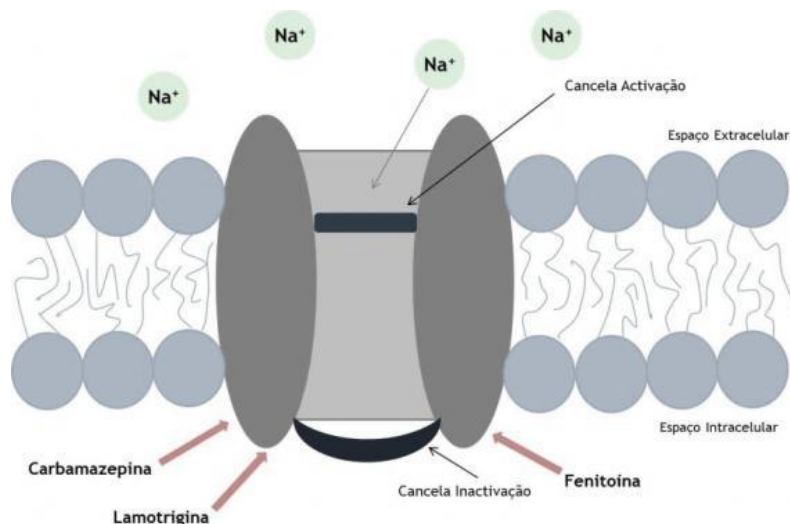


Figura 9 - Canal de sódio dependente da voltagem. AED's (Carbamazepina, Lamotrigina e Fenitoína) ligam-se ao canal inativando-o.

CARBAMAZEPINA

Desde 1968 que a Carbamazepina é utilizada como AED e como estabilizador de humor. É o principal fármaco antiepiléptico de primeira linha utilizado no tratamento de crises parciais e crises generalizadas tónico-clónicas (tabela 1). É um composto tricíclico, também utilizado no tratamento da doença

bipolar, entre outras patologias, como por exemplo no tratamento da hiperactividade e da esquizofrenia.

O principal modo de acção da Carbamazepina é através do bloqueio dos canais de sódio dependentes da voltagem (figura 9) ^{(6) (3) (18)}, uma vez que a sua estrutura química lhe permite ligar-se, logo após a sua abertura, impedindo o influxo de iões de sódio. Consequentemente, as membranas neuronais excitadas são estabilizadas, as descargas neuronais repetitivas são inibidas e a propagação sináptica dos impulsos excitatórios em neurónios despolarizados é restringida, isto é, leva a que os neurónios exibam uma menor frequência de disparo, diminuindo a sua actividade.

A Carbamazepina é extensivamente biotransformada no fígado e tem a capacidade de induzir a sua própria biotransformação, bem como a de outros fármacos antiepilépticos. A principal via metabólica ocorre por epoxidação a 10,11-epóxido de Carbamazepina, que é um metabolito activo, e a 10,11-*trans*-di-hidrodiol, um metabolito inactivo. A semivida de eliminação varia entre 5-26 % e é afectada pelo facto de a Carbamazepina induzir a sua própria biotransformação ⁽³⁾.

FELBAMATO

O Felbamato é considerado um potente anticonvulsivante, com uso em diferentes tipos de crises ⁽³⁾. Possui, no entanto, muitos efeitos adversos que limitam a sua utilização.

Este AED, actua modulando os canais de sódio dependentes da voltagem, os canais de cálcio, actua nos receptores GABA_A e bloqueia os receptores do tipo NMDA (figura 11) ^{(6) (19)}. Apesar do mecanismo de acção ser complexo este composto não tem efeito sobre o GABA ^{(3) (18)}.

O Felbamato sofre uma biotransformação extensa no fígado. Possui interacções com alguns AED's, como a Fenitoína, Carbamazepina e Valproato de Sódio, alterando os seus níveis plasmáticos ⁽³⁾.

O Felbamato é bem absorvido por via oral e liga-se às proteínas plasmáticas com uma extensão que vai dos 20 aos 25 %. É amplamente biotransformado

no fígado (> 50 %), dando origem a metabolitos inactivos, e tem uma semivida de 13 - 30 horas. A sua semivida de eliminação é fortemente afectada pelos indutores enzimáticos ⁽³⁾ ⁽²⁰⁾.

Devido aos efeitos secundários tóxicos e potencialmente fatais (anemia aplástica e hepatotoxicidade) o uso deste AED está limitado a casos em que os indivíduos não respondem ao tratamento com outros fármacos antiepilépticos.

FENITOÍNA

A Fenitoína, ou Difenilhidantoína, foi introduzida no mercado em 1938 ⁽³⁾ e tem sido utilizado desde então como um AED de primeira linha no tratamento de crises parciais e generalizadas. A sua capacidade anticonvulsivante foi descoberta em 1936 após ter sido desvendada a sua capacidade protectora contra convulsões induzidas por electrochoques em modelo animal (gato) ⁽⁷⁾. É dos fármacos antiepilépticos mais utilizados em terapia coadjuvante, embora apresente um perfil de interacções farmacológicas bastante problemático, em parte devido ao facto de se ligar a proteínas plasmáticas (> 90 %) e também por sofrer biotransformação via Citocromo P450 ⁽³⁾. A Fenitoína é uma substância lipofílica, o que lhe permite atravessar as membranas plasmáticas com relativa facilidade e tem características de um ácido fraco (pK_a entre 8,3 e 9,2), sendo por isso solúvel em soluções alcalinas ⁽³⁾.

O alvo da Fenitoína são os canais de sódio dependentes da voltagem, bloqueando-os de forma semelhante à Carbamazepina, tal como ilustrado nas figuras 9 e 11 ⁽³⁾ ⁽⁶⁾ ⁽¹⁸⁾.

FENOBARBITAL

O Fenobarbital foi sintetizado pela Bayer em 1902 como hipnótico (Luminal[®]) mas só em 1912, com a sua comercialização e com a descoberta das propriedades antiepilépticas e anticonvulsivantes, deu início à era farmacológica do tratamento da epilepsia ⁽⁶⁾.

O Fenobarbital, o fármaco antiepiléptico mais vendido no século XX, pertence ao grupo dos barbitúricos e é um potente anticonvulsivante, com um largo espectro de acção⁽³⁾. A sua acção é complexa e ocorre ao nível dos canais de cálcio reduzindo o seu influxo, receptores GABA_A, mais especificamente ao nível dos canais de cloro onde se fixa no local específico de ligação dos barbitúricos e, ainda, ao nível dos receptores do Glutamato, deprimindo a excitabilidade glutaminérgica^{(3) (18)}.

O Fenobarbital é considerado um forte indutor das enzimas microsómicas do fígado. A sua taxa de absorção é influenciada pelo consumo de álcool (aumenta a taxa de absorção) e a sua distribuição é afectada pelas variações de pH (em condições de pH ácido a concentração de Fenobarbital aumenta). Este fármaco possui uma semivida de eliminação muito longa (entre 75 a 120 horas, podendo atingir as 400 horas em crianças) e sofre transformação hepática, sendo o seu principal metabolito o *p*-hidroxifenobarbital. O Fenobarbital está sujeito a uma intensa reabsorção renal, a qual poderá ser reduzida pela alcalinização da urina⁽³⁾.

Nos dias de hoje, a utilização do Fenobarbital encontra-se mais limitada devido à intensidade e tipo de efeitos secundários, tal como acontece com outros barbitúricos, e devido também às interacções farmacológicas que possui com outros medicamentos antiepilépticos quando usados em terapêutica conjunta (*e.g.* Valproato de sódio, Felbamato e Fenitoína). Este AED pode ainda causar dependência física e agravar as crises com a sua utilização crónica⁽³⁾.

GABAPENTINA

Apesar de ser um análogo estrutural do GABA (figura 10) não possui actividade sobre o seu receptor. Sabe-se que a Gabapentina actua aumentando os níveis de GABA no cérebro, mas o mecanismo pelo qual isso acontece não está ainda bem esclarecido^{(3) (20) (17) (21)}.

A Gabapentina actua também aumentando a actividade da descarboxilase do glutamato, mas de forma pouco intensa. Actua nos canais de cálcio e é

também um inibidor da transferase dos ácidos aminados ramificados - mecanismo que reduz os níveis cerebrais de glutamato ^{(6) (3) (18)}.

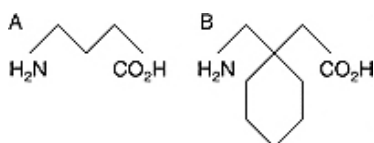


Figura 10 - Estrutura do GABA (A) e da Gabapentina (B) ⁽²²⁾.

A Gabapentina foi desenvolvida para o tratamento de crises parciais, como terapêutica de segunda linha. Apresenta algumas propriedades analgésicas ^{(5) (17) (21)}.

Tem particular importância para indivíduos mais idosos e crianças, devido ao facto de não ser metabolizada no fígado, não induz as enzimas hepáticas nem se liga a proteínas plasmáticas. Esta substância é excretada exclusivamente por via renal ⁽¹⁷⁾.

A Gabapentina não possui interacções com outros fármacos, embora a sua biodisponibilidade possa ser reduzida pelo uso de antiácidos.

LAMOTRIGINA

A Lamotrigina, sendo um composto triazínico, é quimicamente bastante diferente de todos os outros AED's. Apesar disso tem um mecanismo de acção semelhante a outros fármacos antiepilépticos, actuando como agente bloqueador dos canais de sódio dependentes da voltagem ^{(6) (18)}. Tem também uma acção despolarizante da membrana pré-sináptica glutaminérgica, inibindo a libertação de glutamato ⁽³⁾. Está ainda descrita actividade bloqueante ao nível dos canais de cálcio dependentes da voltagem (figura 11) ^{(18) (19)}. É usada como antiepiléptico de primeira linha em crises parciais e generalizadas ⁽³⁾.

A Lamotrigina é rápida e completamente absorvida pelo tracto gastrointestinal e cerca de 50 a 60 % vai ligar-se a proteínas plasmáticas. A sua semivida é de 24 a 41 horas ^{(3) (20)}. É extensivamente metabolizada, principalmente por glucuronização, num metabolito inactivo. De forma

semelhante ao que acontece com a Carbamazepina, esta substância possui a capacidade de auto-indução, por essa razão, o seu metabolismo é fortemente afectado pela terapêutica conjunta com outros indutores enzimáticos⁽²⁰⁾.

LEVETIRACETAM

O Levetiracetam é um fármaco bastante recente e possui um mecanismo de acção ainda por desvendar, mas sabe-se que exerce actividade ao nível dos canais de cálcio e também ao nível do sistema gabaminérgico apesar desses não serem os seus alvos de acção directos^{(3) (6) (18) (19)}.

O Levetiracetam é fácil e rapidamente absorvido quando administrado por via oral, com uma biodisponibilidade de 100 %. Não se liga a proteínas plasmáticas e sofre biotransformação (27 %), principalmente por hidrólise do grupo acetamida, sem implicação do Citocromo P450. Esta substância não dá origem a metabolitos com o efeito terapêutico significativo⁽³⁾.

Apesar de ter uma semivida de eliminação de 6 a 8 horas a semivida farmacocinética é mais extensa⁽³⁾.

Não são conhecidas interacções medicamentosas relevantes e não possui efeitos secundários significativos, estando apenas descrito que provoca sonolência, vertigens, síndrome do tipo gripal e dores de cabeça, sendo que estes sintomas tendem a desaparecer ao fim de quatro semanas de tratamento^{(3) (19)}.

OXCARBAZEPINA

A Oxcarbazepina é um análogo estrutural da Carbamazepina (figura 8) e o seu desenvolvimento teve como objectivo recriar o efeito benéfico da Carbamazepina mas sem os efeitos secundários indesejados desta, como seja a auto-indução enzimática hepática, ou o perfil de interacções medicamentosas a ela associadas.

Porque é estruturalmente muito próxima da Carbamazepina, também o efeito farmacológico é semelhante, actuando por bloqueio dos canais de sódio dependentes da voltagem (figura 11)^{(3) (6) (18) (19)}.

Sofre absorção quase total após administração oral sendo biotransformada por via hepática e dando origem ao metabolito activo derivado 10-mono-hidróxido (ou licarbazepina). Este metabolito é responsável pelos efeitos farmacológicos da Oxcarbazepina, que é na realidade um pró-fármaco ⁽²⁰⁾. A licarbazepina liga-se às proteínas com uma extensão de cerca de 38 % e atravessa com relativa facilidade a membrana hematoencefálica ⁽³⁾.

A Oxcarbazepina é indutora de algumas enzimas do Citocromo P450, embora em menor grau do que a Carbamazepina. Possui uma semivida de 8 a 10 horas e é excretada por via renal ^{(3) (20)}.

Este AED interactua com contraceptivos orais, reduzindo o seu efeito ^{(3) (19)}.

PRIMIDONA

A Primidona é metabolizada em Fenobarbital e Fenilmetilmalonamida (PEMA) e pensa-se que o seu efeito farmacológico depende da formação do Fenobarbital (figura 3).

A Primidona é absorvida por via oral com uma biodisponibilidade de praticamente 100 % e possui uma taxa de ligação a proteínas baixa (25 %). Tem uma semivida de eliminação de 5 a 18 horas sendo o seu efeito prolongado pela metabolização em Fenobarbital, com uma semivida de eliminação mais elevada (ver *FENOBARBITAL*). Tal como descrito na figura 3, a Primidona é metabolizada pelo sistema do Citocromo P450 ⁽³⁾.

As reacções adversas atribuídas à Primidona são semelhantes às do Fenobarbital.

RUFINAMIDA

A Rufinamida é um dos AED's mais recentes no mercado, aprovado para uso na Europa apenas em 2007. Esta substância tem actividade ao nível dos canais de sódio dependentes da voltagem, inibindo-os.

A Rufinamida é facilmente absorvida, com uma extensão que ronda os 85 %, quando administrada por via oral, sendo a sua absorção significativamente aumentada pela ingestão concomitante de alimentos. Esta substância é

extensivamente metabolizada via hidrólise enzimática mediada pela carboxiesterase num metabolito inactivo, eliminado na urina ⁽²⁰⁾.

O metabolismo da Rufinamida pode ser acelerado pela toma conjunta de outros fármacos indutores da actividade enzimática, como a Carbamazepina ⁽²⁰⁾.

TOPIRAMATO

O Topiramato é talvez o mais singular de todos os AED's porque é um derivado estrutural da D-frutose e foi desenvolvido com o propósito de actuar como fármaco antidiabético. O Topiramato tem uma actividade muito diversa actuando ao nível dos canais de sódio dependentes da voltagem, dos canais de cálcio e potenciando os níveis de GABA no organismo. Possui também um efeito bloqueante nos receptores do glutamato do tipo AMPA. Está também descrita uma ligeira inibição da anidrase carbónica ⁽³⁾.

O Topiramato é rapidamente absorvido após administração oral com uma biodisponibilidade que se pode dizer próxima dos 100 %, ligando-se a proteínas plasmáticas em cerca de 15 %. Entre 15 a 50 % da dose absorvida é metabolizada por via hepática (Citocromo P450) sendo o seu metabolismo potenciado pela toma conjunta de indutores enzimáticos. Nenhum dos seus metabolitos possui actividade antiepiléptica. O Topiramato é praticamente excretado na totalidade, inalterado, através da urina (85 %) ^{(3) (20)}.

ZONISAMIDA

A Zonisamida é uma substância derivada das sulfonamidas e quimicamente distinta de qualquer outro AED. Actua ao nível dos canais de sódio dependentes da voltagem, bloqueando-os e influencia a actividade dos canais de cálcio de tipo T ^{(3) (18) (19)}. Está ainda descrita a actividade desta substância ao nível da inibição da anidrase carbónica ⁽²³⁾.

Este AED é usado na terapêutica de crises parciais, como coadjuvante, e a sua utilização tem a vantagem de não apresentar interacções com outros fármacos antiepilépticos, não alterando os níveis plasmáticos de outros AED's.

A Zonisamida é rapidamente absorvida quando administrada por via oral e tem uma semivida de cerca de 60 horas. Contudo, a Fenitoína, a Carbamazepina e o Fenobarbital diminuem a semivida da Zonisamida (para cerca de 27 a 46 horas) ⁽³⁾. Apresenta uma elevada taxa de ligação às proteínas plasmáticas (40 %). Este fármaco é parcialmente biotransformado pelo fígado (70 %), via Citocromo P450, seguido de glucuronocjugação. A Zonisamida utiliza o Citocromo P450 mas não o induz. Os seus metabolitos são inactivos. Cerca de 35 % da Zonisamida é excretada na urina ⁽³⁾.

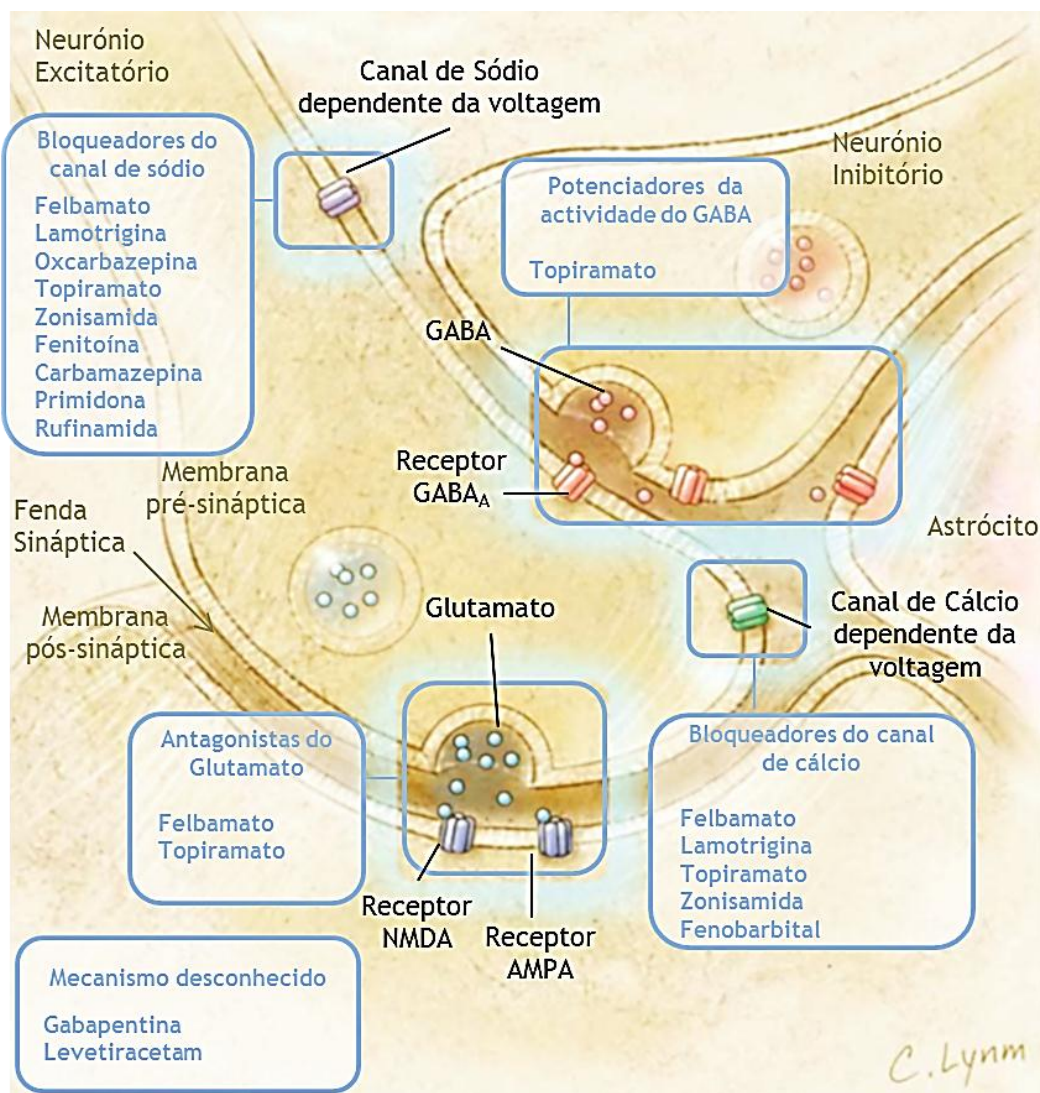


Figura 11 - Representação esquemática dos principais mecanismos de acção dos 12 AED's. Adaptado ⁽¹⁹⁾.

1.4. Interações medicamentosas

Um outro aspecto importante para a interpretação dos dados toxicológicos são as interações entre diferentes substâncias, neste caso específico, interações medicamentosas, especialmente relevantes no caso dos AED's pois é bastante comum que o tratamento seja feito com recurso a mais do que um medicamento.

Na grande parte dos casos, clínicos ou forenses, está presente mais do que uma substância. Este factor associado a automedicação, com recurso a medicamentos que podem ser adquiridos sem receita médica, ao consumo de álcool e drogas ilícitas, contribui de forma activa para a ocorrência de interações.

Na teoria, os dados farmacocinéticos descritos na literatura são referentes apenas a uma substância mas, na prática, dificilmente o toxicologista estará na presença isolada de um composto. Os resultados analíticos devem, por isso, ser cuidadosamente interpretados, sobretudo no que diz respeito aos efeitos sinérgicos resultantes da combinação entre substâncias.

As interações entre substâncias podem ser divididas em dois tipos ⁽¹⁾:

- as que afectam a concentração da substância (isto é, alterações no processo de absorção, distribuição e eliminação);
- as que afectam a resposta da substância (alterando a duração e severidade da acção).

Outros mecanismos de interacção relevantes incluem:

- interferências na absorção de outras substâncias;
- modificação da via e/ou velocidade do metabolismo;
- alteração do acesso a receptores e tecido alvo.

As consequências de grande parte das interações podem ser antecipadas pelo conhecimento prévio dos efeitos das substâncias consideradas individualmente. Substâncias com efeito farmacológico oposto têm um

efeito antagonista. Pelo contrário, em duas substâncias cuja acção farmacológica seja semelhante o seu efeito será aditivo.

1.5. Metabolitos activos

Existem numerosas substâncias que se tornam activas após serem modificadas por um processo metabólico. Isto pode ser feito com o intuito de facilitar o processo de absorção por via oral ou para reduzir a toxicidade.

Quando um metabolito activo contribui activamente para o efeito farmacológico obtido, a interpretação dos resultados toxicológicos pode ficar dificultada. Situações reais envolvendo estes metabolitos podem levar a interpretações menos correctas se só é tido em conta o efeito da substância mãe. Assim sendo, revela-se importante contabilizar também as concentrações dos metabolitos activos.

1.6. Redistribuição *Post-mortem*

Uma distribuição desequilibrada das substâncias pelos tecidos pode conduzir a alterações na concentração destas no sangue, após a morte. Este processo designa-se por redistribuição *post-mortem* e ocorre sobretudo através de um processo de difusão dos tecidos ou órgãos adjacentes para a corrente sanguínea. Este processo adquire elevada importância para compostos com grande solubilidade lipídica, pois esses tendem a apresentar concentrações díspares em tecidos e sangue.

A redistribuição *post-mortem* é um processo de alguma complexidade e que, possivelmente envolve pelo menos três mecanismos ⁽¹⁾, o de libertação e difusão da substância, para tecidos ou órgãos perto do coração e pulmões, o de difusão simples da substância directamente do conteúdo gastrointestinal para locais adjacentes e o de distribuição incompleta.

Até para substâncias que sofrem pouca, ou mesmo nenhuma, redistribuição *post-mortem* podem existir grandes diferenças de concentração no sangue, dependendo de onde é feita a recolha (sangue arterial *versus* sangue periférico), especialmente em situações de *overdose*.

A recolha de sangue periférico (artéria femoral ou subclávia) reduz significativamente a extensão deste tipo de alterações *post-mortem*, pois este encontra-se menos sujeito ao fenómeno de redistribuição. O sangue periférico é, por isso, a matriz de eleição para análises toxicológicas, sobretudo quando está em causa a quantificação de substâncias.

1.7. Interpretação de resultados

Na interpretação de resultados toxicológicos é preciso ter em conta as diferenças entre concentração terapêutica, tóxica e fatal.

Atribui-se a designação de concentração terapêutica à concentração do fármaco esperada, quando é seguida a dose recomendada ⁽¹⁾. O termo concentração terapêutica não é naturalmente aplicável a algumas substâncias, como é o caso de drogas ilícitas ou álcool.

O conceito de concentração tóxica surge quando a dose de uma determinada substância ingerida tem como consequência reacções adversas no organismo. Já a concentração fatal está directamente relacionada com níveis da substância, que possa por si conduzir à morte.

Existem alguns dados na literatura que têm à disposição as concentrações terapêuticas, tóxicas e potencialmente fatais (*e.g.* TIAFT ⁽²⁴⁾). Este tipo de informação constitui uma ferramenta valiosa na avaliação de resultados mas deve ser utilizada com extrema precaução nos casos *post-mortem*.

A interpretação dos resultados analíticos pode ser feita comparando os resultados obtidos com a informação disponível na literatura ou com respostas clínicas obtidas em casos semelhantes.

Factores como sejam a tolerância, a variabilidade inter-individual da resposta farmacológica, interacções, presença ou ausência de uma patologia e as circunstâncias da morte são muito variáveis, dificultando a interpretação de resultados. Os dados farmacocinéticos e toxicológicos devem ser usados tendo em conta as circunstâncias específicas do caso

examinado, pois existe sempre a possibilidade de se interpretar incorrectamente por não se ter tido em atenção uma situação específica e particular.

Infelizmente o que acontece em muitos casos forenses é que não existe muita informação acerca do incidente, o que pode implicar que os resultados obtidos possam ser incorrectamente interpretadas. Uma maneira de contornar esta situação será determinar as concentrações na urina, bÍlis ou fÍgado e relacioná-las com a concentração em sangue ou, em alternativa, determinar a concentração da substância mãe e dos seus metabolitos, relacionando-os.

A análise de vários Órgãos e tecidos, e o confronto desses valores pode constituir a resposta às perguntas que se pretendem respondidas. Infelizmente o elevado número de casos a analisar impossibilita, regra geral, esta prática.

Para a conclusão de uma causa de morte por intoxicação o médico patologista deve fazer a integração dos vários elementos disponíveis, como sejam, a informação da polícia, o exame do local, os achados autópticos e os resultados dos exames toxicológicos e histopatológicos.

Compete pois ao patologista forense valorizar os resultados analíticos em função de cada caso.

1.8. Amostras Biológicas

Existe uma grande diversidade de amostras que podem ser analisadas em toxicologia forense (e.g. Órgãos colhidos na autópsia, fluídos biológicos obtidos do cadáver ou do vivo, produtos orgânicos e inorgânicos). Conforme a especificidade do caso e o tipo de análise pretendida, procede-se assim à selecção e colheita da amostra, ou amostras, mais apropriadas.

É da responsabilidade do laboratório definir o tipo e quantidades de amostra necessária para as análises pretendidas pelos requisitantes, bem como o tipo

de preservantes. Cabe também ao laboratório que recebe as amostras dar as indicações que achar necessárias para o seu correcto armazenamento.

O STF está a trabalhar no sentido da uniformização destas regras, com a criação de uma norma procedimental que regulamenta a colheita e acondicionamento de amostras em toxicologia forense.

Deverá ser tido em conta que a colheita determina a qualidade dos resultados analíticos. O perito médico-legal deve assegurar-se de que a colheita é feita de modo adequado, tendo sempre em mente a análise pretendida.

Os frascos de amostra devem ser novos, hermeticamente fechados, sem qualquer conservante e devem ainda ser selados e devidamente rotulados (incluindo a entidade que solicita a análise, nome da vítima, designação do conteúdo e assinatura do perito) e devem ser acondicionados em caixas isotérmicas (5 - 10°C). São excepção, as amostras de sangue enviadas para determinação de etanol e monóxido de carbono. Esses tubos devem conter 0,1 g de fluoreto de sódio por cada 10 mL de sangue e deve encher-se o tubo até à sua capacidade máxima.

Para a determinação de medicamentos, nomeadamente os medicamentos antiepilépticos, a matriz de eleição é o sangue, se possível sangue femoral ou, em alternativa, sangue da cavidade cardíaca (só em casos *post-mortem*). Recomenda-se aos médicos patologistas que a recolha do sangue periférico seja feita da veia femoral, antes de serem retirados os órgãos, num volume de 10 mL⁽²⁵⁾.

Outras matrizes relevantes para a toxicologia forense são a urina, importante para triagem (principal via de eliminação), o estômago e conteúdo gástrico, em casos de intoxicação aguda por via oral e humor vítreo, uma matriz alternativa na ausência de sangue e em cadáveres em início de putrefacção (matriz mais protegida de infecções bacterianas). Outras amostras podem ser colhidas, apesar de não fazer parte do

procedimento de rotina. São elas a bÍlis, fÍgado, rim, pulmão, coração e cérebro, estes podem ser particularmente importantes em situações de suspeita de intoxicação. Poderão adicionalmente ser colhidas amostras de cabelo e unhas (e.g. determinação de metais pesados).

No STF estão disponíveis tubos e contentores próprios para a colheita e acondicionamento das amostras, bem como sacos de embalagem adequados para o envio destas.

Deve ser sempre tido em atenção a manutenção da cadeia de custódia das amostras, pois se esta for quebrada, a validade dos resultados será colocada em causa.

A análise toxicológica pode ser prejudicada, ou mesmo inviabilizada, se as amostras forem inadequadas à análise pretendida, se forem mal acondicionadas, em recipientes e preservantes inadequados, se houver um armazenamento incorrecto e se houver um atraso significativo no seu envio para o STF. Assim, na conservação das amostras deve ser eliminado todo e qualquer factor de contaminação. O acondicionamento deve ser feito tendo em conta as condições de luz, humidade e calor - fontes prováveis de reacções de oxidação ou hidrólise que podem acelerar a decomposição dos produtos.

Quanto menor for o tempo decorrido entre a morte, ou qualquer outro evento traumático, e a recolha das amostras, mais fidedignos serão os resultados obtidos. Este aspecto é particularmente relevante no caso de substâncias como o monóxido de carbono, etanol e alguns produtos farmacêuticos (passíveis de alterações *post-mortem*).

1.9. Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa

1.9.1. Cromatografia Líquida

A cromatografia líquida sofreu uma grande evolução até ao HPLC, e mais recentemente ao UPLC, permitindo separar e analisar amostras complexas.

As técnicas de separação por cromatografia líquida oferecem um enorme poder de resolução, detecção, quantificação, bem como uma grande rapidez e aplicabilidade a diferentes tipos de amostras.

A cromatografia líquida assenta no princípio de que uma determinada substância, quando passa através de uma coluna com um determinado enchimento e eluente (fase móvel), pode ser expressa como tempo de retenção - dependente também do fluxo, do comprimento e diâmetro da coluna.

Ao falar de cromatografia líquida é importante clarificar alguns termos. Considera-se a resolução como o parâmetro que descreve o poder de separação de todo o sistema cromatográfico em relação a determinados componentes da mistura em análise. A sensibilidade de uma análise cromatográfica é a medida do nível mais baixo detectado de um determinado componente e é dependente da razão sinal-ruído para a detecção⁽¹⁾. Considera-se normalmente que o limite de detecção é 3 vezes a razão sinal/ruído, e que o limite de quantificação é 10 vezes esta razão.

A instrumentação de um LC inclui uma bomba, um injector, uma coluna, um detector e um sistema de tratamento de dados (computador) onde ficam armazenados os resultados (*workstation*).

A separação cromatográfica ocorre na coluna analítica, constituída por um enchimento (fase estacionária) que deve ser adequado à análise a efectuar, e que é composta por partículas microporosas com diâmetros da ordem dos micrómetros.

É necessária uma bomba de alta pressão para fazer passar a fase móvel através da coluna. O processo cromatográfico propriamente dito começa com a injeção da amostra no início da coluna e a separação dos componentes ocorre quando os analitos e a fase móvel são bombeados pela coluna. Eventualmente, cada componente será eluído da coluna e será registado na forma de um pico, a um determinado tempo de retenção. A resposta do detector a cada componente é registada na forma de um

cromatograma (intensidade relativa vs. tempo). Os dados são depois processados com recurso a ferramentas informáticas específicas para o efeito.

Na figura 12 encontra-se esquematizado um sistema de LC-MS típico.

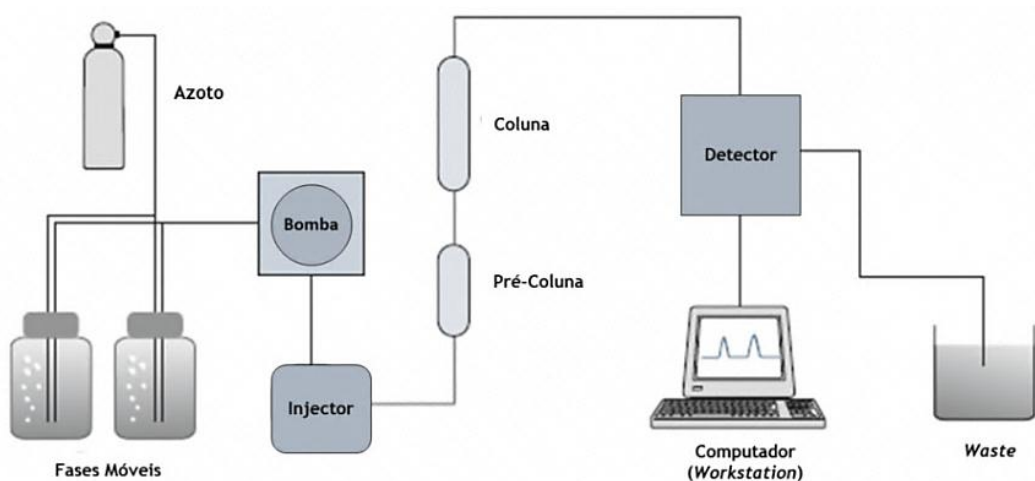


Figura 12. Sistema HPLC-MS típico. Adaptado ⁽¹⁾.

1.9.2. Espectrometria de Massa

Até aos dias de hoje os espectrómetros de massa provaram ser capazes de funcionar tanto como instrumentos qualitativos, como quantitativos.

A unidade de medida da massa é o Dalton (Da) - um Dalton corresponde a 1/12 da massa de um único átomo do isótopo de carbono 12 (^{12}C).

O espectrómetro de massa pode medir a massa de uma molécula apenas depois de ter convertido a molécula num ião em fase gasosa, isto é, a molécula tem de ser ionizada. Para tal é preciso aplicar uma carga eléctrica e converter o fluxo de iões carregados resultante, numa corrente eléctrica proporcional que o sistema de análise (software) consiga registar. O sistema de análise converte a corrente criada em informação digital, traduzida na forma de um espectro de massa (intensidade relativa vs. razão massa/carga). Os iões são separados, detectados e medidos de acordo com a razão massa-carga (m/z).

O sinal correspondente à corrente iónica relativa é expresso num espectro de massa em função da razão m/z . Assim, a cada instante representado pelo pico cromatográfico é possível fazer corresponder os iões presentes nesse momento e passar a representar essa relação em função da razão m/z (figura 13 - (b) e (c)).

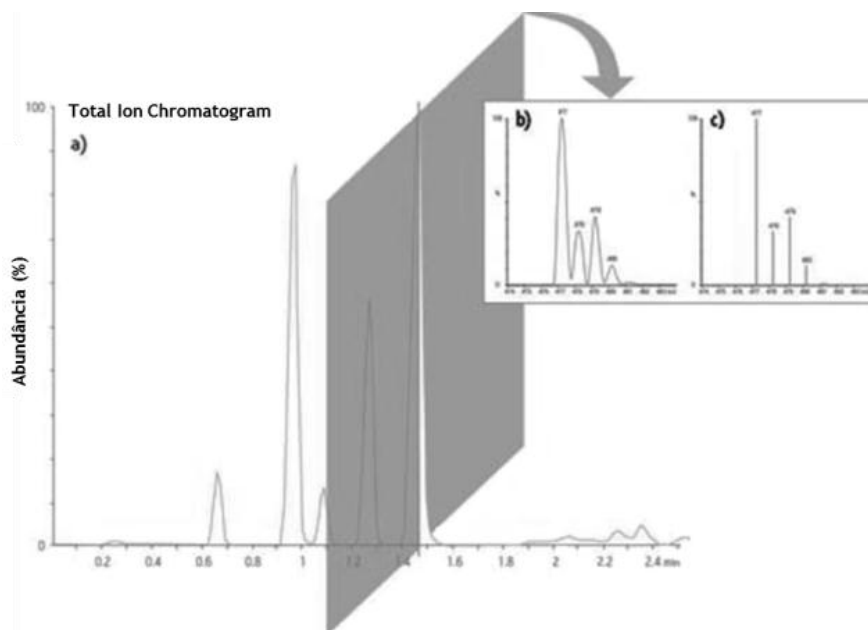


Figura 13 - O aumento da abundância na corrente do ião total (TIC - *Total Ion Chromatogram*) está representada na figura pelo cromatograma (a). A cada “fatia” do pico correspondem os iões presentes na corrente, àquele tempo de retenção. O eixo das abcissas, que no cromatograma representa o factor tempo, passa agora a ser a razão massa/carga (m/z) (b). O espectro pode ser depois reduzido a um “stick plot”, que é apenas a representação dos centroides de cada pico de massa, aumentando a resolução da informação obtida ⁽²⁶⁾.

Existem vários métodos de ionização que podem ser utilizados em LC-MS, incluindo ionização electrónica, ionização química, FAB (*fast atom bombardment*), *thermospray*, *electrospray* e APCI (*atmospheric-pressure chemical ionization*).

Vão apenas ser discutidas, brevemente, algumas das características da ionização por *electrospray* (ESI), por ser o tipo de ionização utilizado na execução deste trabalho, e a sua aplicação em espectrometria de massa.

Em contraste com outras técnicas de ionização, o *electrospray* funciona à pressão atmosférica. Os espectros são produzidos por passagem de um feixe

líquido por um capilar metálico mantido a voltagens elevadas (3 - 4 kV). É esta voltagem que faz dispersar o feixe líquido, formando uma névoa de gotas de iões carregados que sofrem desolvatação durante a sua passagem pela fonte. À medida que vai diminuindo o tamanho das gotas atinge-se um ponto em que as forças repulsivas entre as cargas à sua superfície é suficientemente grande para ultrapassar a tensão superficial destas. Este processo vai dar origem a gotas cada vez mais pequenas. Este processamento é repetido até se obter iões dos analito de interesse, os quais são depois transferidos através de uma série de lentes até ao espectrómetro de massa.

O triplo quadrupolo é talvez o sistema mais utilizado em MS/MS. Na prática, é constituído por três quadrupolos em série (figura 14 - Q1, Q2 e Q3), onde o segundo quadrupolo (Q2) não é utilizado para separação das massas, mas sim como célula de colisão, onde os iões separados no primeiro quadrupolo são fragmentados e encaminhados para o terceiro quadrupolo e, depois, para o detector.

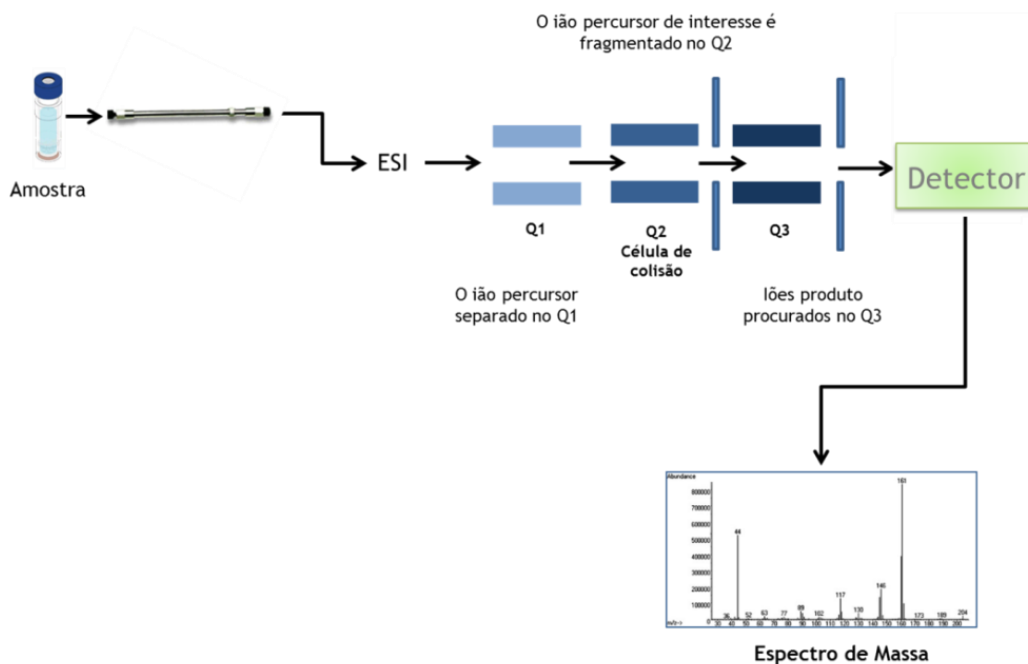


Figura 14 - Representação esquemática de uma análise de espectrometria de massa, com ionização por electrospray, passando por um triplo quadrupolo.

1.9.3. UPLC-MS/MS

O sistema ACQUITY UPLC[®], utilizado neste trabalho, foi desenvolvido pela Waters para permitir o uso de velocidades, fluxos e pressões mais elevadas do que as obtidas com os sistemas HPLC comuns⁽²⁶⁾. Esta tecnologia pode ser considerada como uma evolução do HPLC e foi aplicada com sucesso em numerosos laboratórios a nível internacional, bem como no nosso país - este sistema está presente nos três serviços de Toxicologia Forense do INML, nas Delegações Centro, Norte e Sul.

A principal característica que diferencia este sistema de outros é o facto de permitir o uso de colunas cromatográficas com uma fórmula patenteada que possibilita o uso de partículas de 2 µm (em vez de 5 µm, mais comuns para sistemas de HPLC). Este sistema permite também atingir pressões da ordem dos 15000 psi, consideravelmente superiores às com conseguidas nos HPLC, onde a pressão máxima ronda os 2000 - 6000 psi.

Em comparação com o HPLC, o sistema de UPLC[®] provou ser uma ferramenta bastante valiosa, obtendo-se uma técnica de separação com maior sensibilidade, resolução e tempos de análise reduzidos⁽²⁷⁾.

1.9.3.1. Tecnologia IntelliStart[™]

Esta tecnologia foi desenvolvida pela Waters e funciona como um sistema integrado e automatizado que permite ao utilizador injectar directamente no detector de massa uma substância, ou uma solução contendo até 4 substâncias distintas, onde através de uma série de testes totalmente automatizados, se obtêm informações acerca das condições mais adequadas para a análise das substâncias. Esta tecnologia representa uma ferramenta muito útil quando se está a lidar com compostos em que só é conhecido o seu peso molecular, permitindo otimizar o método para a sua análise de forma mais rápida e eficiente⁽²⁶⁾.

Antes de ser feita a injeção directa no detector de massa é introduzido no software apenas o peso molecular do composto e o equipamento faz a determinação de parâmetros como a voltagem do cone, fragmentação da molécula, energias de colisão mais adequadas para a fragmentação e ainda o modo de ionização (positivo ou negativo).

Os resultados obtidos com o auxílio desta tecnologia devem contudo ser considerados como meramente indicativos. O uso do IntelliStart só será útil quando se está na presença de substâncias conhecidas, pois é necessário fornecer o peso molecular da substância e não dispensa que sejam feitos outros testes de optimização do método (Scan, SIR, estudo padrão fragmentação (*Daughter Scan*), etc.).

1.10. Validação de Métodos

A validação de métodos analíticos, especialmente em casos forenses, é um procedimento extremamente importante para provar que o método é adequado ao fim a que se destina e tem como objectivo estimar a eficiência do método na rotina de um laboratório. É importante referir que a qualidade do método analítico depende maioritariamente de como é desenvolvido, mais do que da validação propriamente dita. Assim, um laboratório deve validar os métodos não normalizados, métodos criados ou desenvolvidos pelo próprio laboratório ou modificações de métodos normalizados, com o objectivo de confirmar a sua adequabilidade. Isto é particularmente importante quando está em causa o controlo de qualidade e acreditação do laboratório, o que está a ocorrer neste momento no STF.

Os parâmetros a estudar dependem das características do método, do tipo e complexidade da amostra e da experiência que o laboratório possa ter na utilização do método. Depende ainda do propósito do método, podendo alguns dos parâmetros abaixo apresentados não serem avaliados, se tal for adequado. Os parâmetros de validação de métodos analíticos incluem: especificidade, selectividade, capacidade de identificação, gama de trabalho, linearidade, sensibilidade, exactidão, precisão (repetibilidade,

precisão intermédia e reprodutibilidade), limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e robustez. Deve salientar-se que o método pode ser considerado validado mesmo que alguns parâmetros não se enquadrem nos limites estabelecidos na literatura, desde que sejam conhecidos e também adequados aos objectivos do estudo a ser realizado.

No âmbito deste trabalho foram cumpridos os critérios de validação em vigor no STF para a validação de métodos de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa, os quais serão apresentados em maior pormenor no capítulo 4 (resultados e discussão).

2. OBJECTIVOS

Este trabalho teve como propósito o desenvolvimento de um método analítico que permitisse, com recurso à cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa sequencial (ULPC-MS/MS), a identificação e quantificação simultânea de fármacos com propriedades antiepilépticas e anticonvulsivantes, tendo em consideração os AED's disponíveis no mercado português e os padrões disponíveis no serviço de toxicologia forense da delegação do Centro do INML, I.P..

O método será devidamente validado de acordo com as normas do STF, que se encontra neste momento em processo de acreditação do laboratório, de acordo com a norma NP EN ISO/IEC 17025:2005.

Pretende-se que este método seja posteriormente inserido na rotina do STF, e aplicado a casos forenses reais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Etapas do desenvolvimento de um método de LC-MS

O desenvolvimento de um método de LC-MS envolve essencialmente 6 etapas (28).

Tabela 2 - Descrição das etapas envolvidas no desenvolvimento de um método LC-MS.

Etapa	Parâmetro	
1	Geral	Definir quais os analitos, a matriz, procurar literatura, seleccionar PI
2	Espectrometria de Massa	Modo ionização, optimização parâmetros ionização (voltagem ESI, fluxo gás), estudar efeito pH na ionização, estudo da fragmentação e optimização da energia de colisão
3	Cromatografia	Escolha da coluna, optimização da composição da fase móvel, optimização do fluxo, testar a estabilidade do sistema após várias injeções de analito e PI
4	Preparação de amostras	Escolher um método de preparação adequado, preparar extractos na matriz de interesse, optimizar a preparação das amostras para melhor recuperação do analito
5	Validação preliminar	Estabelecer e testar uma curva de calibração e aplicação a amostras controlo
6	Validação completa	Estudo dos parâmetros especificidade, selectividade, capacidade de identificação, gama de trabalho, linearidade, sensibilidade, exactidão, precisão (repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade), limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e robustez.

3.1.1. Geral

Actualmente, o LC-MS/MS é considerado uma técnica de referência em toxicologia, uma vez que a elevada selectividade da espectrometria de massa sequencial (MS/MS) conduz praticamente à inexistência de interferências, mesmo na presença de concentrações relativamente elevadas de compostos co-eluídos, permitindo identificações com elevado, se não total, grau de confiança (28). Na generalidade, a quantificação de compostos envolve seis etapas (tabela 2) mas, dada a interdependência destas etapas, sobretudo no que se refere a interligação entre o LC e o MS, o processo de desenvolvimento de um método LC-MS/MS é considerado um processo

iterativo, pois, com frequência, quando uma determinada etapa está otimizada torna-se necessário reavaliar a anterior⁽²⁸⁾.

Para a concretização deste trabalho pretendeu-se fazer a determinação por UPLC-MS/MS de doze AED's em amostras de sangue, usando um volume de 0,1 mL.

A curva de calibração e os controlos devem ser preparados numa matriz o mais semelhante possível à das amostras e a regra é fortificar esses calibradores e controlos com padrões, numa concentração conhecida. Aos calibradores, controlos e amostras deverá ser também adicionado um padrão interno, estruturalmente semelhante às substâncias a detectar, idealmente deuterado.

É importante referir que, tal como acontece para os padrões, também às fases móveis foi atribuído um código que as identifica, de cada vez que esta é preparada de novo, e onde consta o operador, os solventes utilizados, uma data de preparação e uma data de validade.

3.1.2. Espectrometria de massa

A vasta maioria dos fármacos e seus metabolitos são geralmente quantificados por GC ou LC, tendencialmente acoplados a detectores de massa.

Em LC, começa a ser cada vez mais comum o uso de espectrometria de massa sequencial (MS/MS), que confere maior sensibilidade e especificidade assentando principalmente na monitorização das transições obtidas por fragmentação do ião principal. Por natureza, o uso de detectores de massa resulta numa maior especificidade e sensibilidade que outros detectores mais tradicionais (fotodiodos (*Diode Array*), UV-VIS, fluorescência, etc.). Este factor é particularmente significativo quando se lida com amostras *post-mortem*, por estas estarem mais sujeitas à presença de interferentes (e.g. produtos de putrefacção).

Assim, foi usado um espectrômetro de massa triplo quadrupolo com capacidade de adquirir espectros de massa sequenciais (MS/MS), com uma fonte de ionização ESI, em modo positivo e negativo, com um potencial capilar de 3,50 kV. As temperaturas da fonte e fluxos de gás do cone e de desolvatação foram 150°C e 0 L/hora, e 450°C e 750 L/hora, respectivamente. O gás de colisão utilizado foi o Argon, a um fluxo de 0,15 mL/min.

Os espectros de massa foram adquiridos em modo MRM, de acordo com os parâmetros estabelecidos na tabela 3.

Tabela 3 - Parâmetros de espectrometria de massa e iões monitorizados, na determinação dos doze fármacos estudados.

AED's	Parent	Daughter	Daughter	Cone (V)	Energia Col (eV)	Energia Col (eV)	Modo ESI
Carbamazepina	237.2	178.9	193.9	35	20	15	+
Felbamato	239.2	117.0	178.0	20	18	7	+
Fenitoína	253.0	104.2	182.2	24	32	18	+
Fenobarbital	231.2	41.9	188.0	28	18	11	-
Gabapentina	172.2	95.2	137.2	35	20	20	+
Lamotrigina	256.2	159.0	210.9	35	28	28	+
Levetiracetam	171.2	126.2	154.0	22	15	20	+
Oxcarbazepina	253.2	208.2	236.2	20	18	15	+
Primidona	219.0	91.2	162.2	26	24	12	+
Rufinamida	238.9	127.0	100.8	24	20	42	+
Topiramato	340.2	264.2	-----	26	8	-----	+
Zonisamida	210.9	146.8	118.7	28	10	16	-

3.1.3. Cromatografia

Segundo as *guidelines* internacionais ⁽²⁹⁾, a identificação forense deve ser feita com recurso a duas técnicas que empreguem princípios físicos e

químicos distintos, como GC-MS e LC-MS, por exemplo, procedimento que é seguido no STF. Este trabalho pretendeu, contudo, apenas contemplar a determinação por LC-MS, tal como será descrito seguidamente.

Para tal, foi utilizado um sistema UPLC-MS/MS (Waters (figura 15)). A separação cromatográfica foi obtida com uma coluna ACQUITY® UPLC HSS T3, 2,1 x 100 mm, 1,7 µm (figura 16) a 40°C, seguindo um gradiente com acetonitrilo e ácido fórmico 0,1 %, com um tempo de corrida de 10 minutos (figura 17). As amostras encontram-se refrigeradas a 15°C. Para preparação das fases móveis foi utilizado um sistema de filtração de eluentes e filtros de membrana, e posteriormente sujeitas a degaseificação por ultra-sons.



Figura 15 - Sistema UPLC, Waters Corp (26).



Figura 16 - Coluna HSS T3 (2,1 x 100 mm, 1,7 µm), Waters (26).

	Time (min)	Flow (mL/min)	%A	%B	Curve
1	0.00	0.500	25.0	75.0	6
2	1.00	0.500	25.0	75.0	6
3	6.00	0.500	60.0	40.0	6
4	7.00	0.500	25.0	75.0	6
5	8.00	0.500	25.0	75.0	6
6					

Figura 17 - Gradiente e fases móveis usadas.

Todos os solventes utilizados na composição das fases móveis possuem um grau de pureza adequado a análises por UPLC-MS/MS, e foram adquiridos à Merck.

O software utilizado no tratamento dos dados foi o **MassLynx™**. Este software controla todo o sistema de UPLC-MS/MS

3.1.4. Preparação de Amostras

A injeção de amostras biológicas em sistemas de cromatografia, quer gasosa quer líquida, exige um passo de extracção que tem como propósito a purificação da amostra ao máximo e concentração dos analitos de interesse, para que seja minimizado o efeito de matriz. No caso de amostras biológicas este traduz-se maioritariamente por proteínas e outros constituintes celulares, que apenas interferem diminuindo a sensibilidade dos aparelhos, podendo mesmo tornar impossível a detecção dos analitos de interesse, sobretudo quando se utilizam sistemas altamente sensíveis.

Extracções do tipo líquido-líquido ou por fase sólida (SPE) são ambas adequadas para amostras biológicas como sangue ou urina ⁽¹⁾. Outros métodos de extracção foram descritos na literatura, como a precipitação de proteínas, promovida pelo uso de agentes, como é o caso do acetonitrilo ⁽³⁰⁾ ⁽³¹⁾ ⁽³²⁾ ⁽³³⁾, mas estes são pouco adequados para técnicas que exijam quantificação de substâncias, pois há sempre a possibilidade de perda de analito que pode ficar co-precipitado com as proteínas.

Neste trabalho experimental as amostras foram purificadas através de extracção SPE, com colunas Oasis® HLB 3cc (Waters Corporation), um extractor VacElut SPE 24 (Varian), com uma bomba de vácuo (figura 18). As amostras foram evaporadas num evaporador TurboVap (figura 19). O fornecimento de azoto para a evaporação bem como para o detector de massa foi feito através de um gerador de azoto.



Figura 18 - Sistema de Extração VacElut SPE 24 (Varian), com colunas Oasis HLB 3cc (Waters), e bomba de Vácuo.



Figura 19 - Evaporador de amostras TurboVap. As amostras são evaporadas por submersão num banho a 40°C e ao mesmo tempo são pulverizadas com azoto.

Para a execução deste trabalho foram adquiridos padrões dos seguintes medicamentos: Carbamazepina (Cerilliant, a 1 mg/mL, em Metanol), Felbamato (Sigma Aldrich, 10 mg, em pó), Fenitoína (Cerilliant, 1 mg/mL, em MeOH), Gabapentina (Sigma Aldrich, 10 mg, em pó), Lamotrigina (Sigma Aldrich, 10 mg, em pó), Levetiracetam (Toronto Research Chemicals, 100 mg, em pó), Oxcarbazepina (Cerilliant, a 1 mg/mL, em ACN), Primidona (Dr. Ehrenstorfer GmbH, 100 mg, em pó), Rufinamida (Sigma Aldrich, 10 mg, em pó), Topiramato (Sigma Aldrich, 10 mg, em pó) e Zonisamida (Sigma Aldrich, 10 mg, em pó). O Fenobarbital (Sigma Aldrich, em pó) já existia no Laboratório do STF.

Todos os padrões foram preparados a 1 mg/mL, em metanol Lichrosolv (Merck), com exceção da Carbamazepina, da Oxcarbazepina e da Fenitoína que foram adquiridos já na forma de solução. Para todos os padrões foi feita uma ficha de registo, onde está explicitado a data de abertura, a quantidade de padrão gasta, os materiais e solventes utilizados na preparação, a data de preparação e de validade, bem como o operador, e foi-lhes atribuído um

código interno do STF, que permite a rastreabilidade dos padrões até à sua origem inicial, o que é essencial para o processo de acreditação.

O sangue branco utilizado para a elaboração das curvas e controlos nos primeiros estudos foi fornecido pelo Instituto Português do Sangue; na validação foram utilizadas *pools* de sangues *post-mortem*. Em ambos os casos o sangue foi triado por UPLC-MS/MS para a presença de medicamentos e foi dado como negativo.

O método de preparação de amostras consistiu na fortificação de 0,1 mL de sangue com Promazina (PI), 5 µL de padrão a 10 µg/mL, ao qual se adicionou 1 mL de água ultrapura. As amostras foram posteriormente agitadas no agitador mecânico (vórtex) e centrifugadas a 3000 rpm, durante 5 min.

As colunas SPE foram acondicionadas com 2 mL de metanol e depois com 2 mL de água ultrapura. Seguidamente adicionadas as amostras e depois feita uma lavagem com metanol Lichrosolv a 5 %, em água ultrapura (qualidade LC-MS). Depois, foi feita a secagem das colunas sob vácuo e, de seguida eluição com 2 mL de metanol. As amostras foram evaporadas num banho a 40° e sob um fluxo de azoto, até secagem completa dos extractos. As amostras foram reconstituídas em 100 µL de fase móvel (acetonitrilo: ácido fórmico 0,1 % - 25:75, v:v) e injectados 10 µL no sistema UPLC-MS/MS.

Para além do material de vidro corrente em laboratório, foram utilizados tubos de centrífuga, com capacidade de 10 mL, micropipetas de volume variável, agitadores vórtex, centrífuga, evaporador turbovap, balanças analíticas e *vials* próprios para o sistema UPLC-MS/MS.

Os procedimentos em vigor recomendam que as curvas de calibração sejam criadas com pelo menos 5 pontos, devendo possuir linearidade ao longo da gama considerada como gama de trabalho (deve incluir a dose terapêutica do fármaco). Caso o resultado esteja acima do limite da curva de calibração a análise deverá ser repetida, ou diluindo a amostra, ou alargando a curva até valores onde caiba o valor de concentração presente na amostra.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O primeiro passo no estudo das 12 substâncias antiepilépticas e anticonvulsivantes constou do estudo dos padrões certificados, em solução metanólica e, onde se estudaram os parâmetros de cromatografia e de detecção de massa mais adequados.

No caso de padrões nunca antes adquiridos e utilizados no laboratório, e acerca dos quais apenas se possuía informação sobre o seu peso molecular e alguma informação da literatura, recorreu-se ao IntelliStart. Tal como já foi referido anteriormente, esta ferramenta desenvolvida pela Waters® tem como objectivo a obtenção do ião principal, dos fragmentos que dele originam, bem como informação acerca das voltagem e energias de colisão mais adequadas, para cada composto. O padrão é injectado directamente no detector de massa, individualmente ou numa mistura de um máximo de 4 substâncias distintas, e o resultado é obtido sob a forma de um relatório.

As indicações dadas pelo IntelliStart são depois testadas em *MRM (multiple recording monitoring)*, sob condições de cromatografia mais adequadas.

Este tipo de estudo recorrendo ao IntelliStart é particularmente relevante quando se tem pouca, ou nenhuma, informação acerca do composto que se pretende analisar. De qualquer modo, deve considerar-se esta ferramenta como meramente indicativa, assim existem alguns passos que devem ser seguidos para todas as substâncias antes de ser criado o método LC-MS:

SCAN - com o objectivo de encontrar o ião principal, neste modo é possível estudar qual a voltagem do cone mais adequada para a sua ionização posterior detecção (varrimento entre 50 a 500 aum).

SIR - Depois de ter um analito alvo, podem definir-se os parâmetros tal que, o aparelho transmita apenas as razões m/z para o analito presente.

DAUGHTER SCAN - com o propósito de encontrar os fragmentos resultantes do ião principal. É neste passo que são procuradas e escolhidas as melhores energias de colisão para os principais fragmentos.

Depois destes dois passos devem ser testadas as melhores transições em modo **MRM**, com o objectivo de se obter um cromatograma com intensidade adequada.

Os estudos efectuados no âmbito deste trabalho, e testados em modo **MRM**, para várias condições cromatográficas são a seguir explicitados.

4.1. Estudo do Padrão de Fragmentação dos AED's

De seguida são apresentados os espectros de massa obtidos, corroborados pelo que está descrito na literatura, para o ião principal (*parent*) e para os seus fragmentos. Essas transições foram depois escolhidas para a identificação das substâncias por UPLC-MS/MS.

- Carbamazepina:

Foi feito o *Daughter Scan* e foram obtidos os seguintes espectros, concordantes com os resultados obtidos também na literatura ^{(13) (34) (35) (36) (37)}.

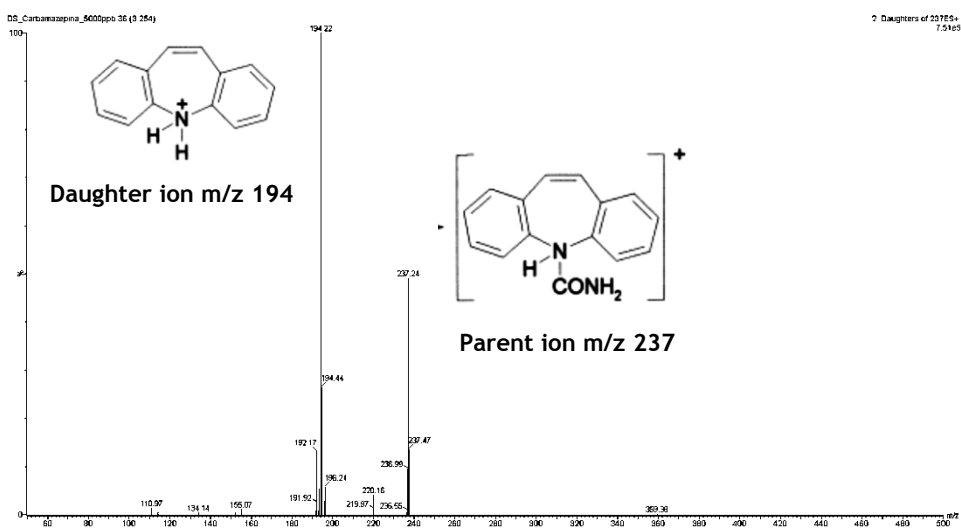


Figura 20 - Fragmentação da Carbamazepina. Fragmento principal m/z 194.

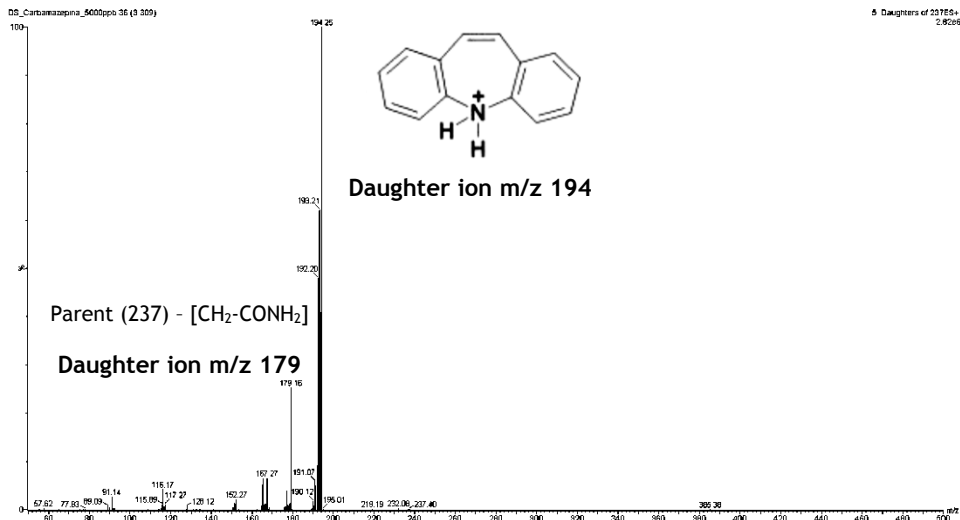


Figura 21 - Fragmentação da Carbamazepina. Ião principal m/z 194 e fragmento m/z 179.

- Felbamato:

Com base no que está descrito na literatura ⁽¹¹⁾ ⁽¹⁴⁾, foi possível também confirmar as transições resultantes da fragmentação do Felbamato.

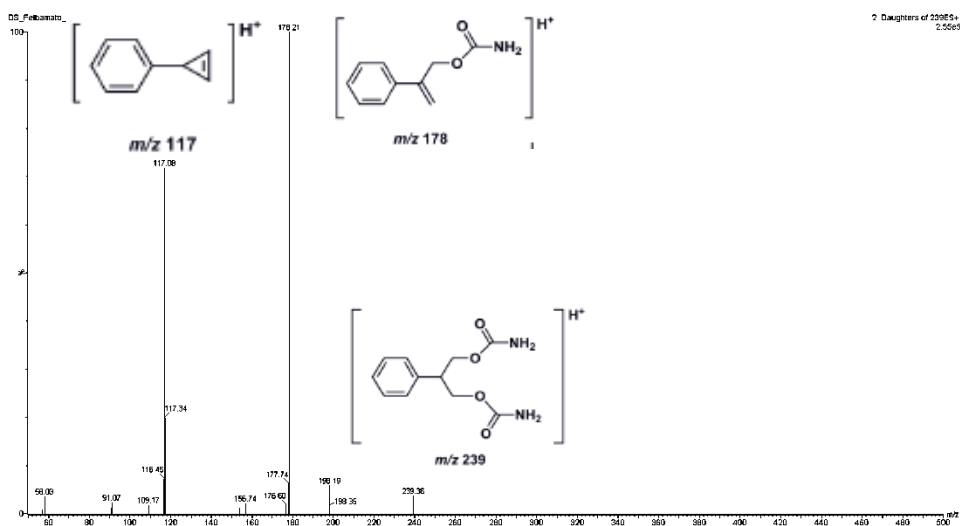


Figura 22 - Fragmentação do Felbamato. Ião principal m/z 239 e os fragmentos m/z 178 e m/z 117.

- Fenitoína:

Tendo em consideração o que está descrito ⁽³⁸⁾ ⁽³⁹⁾, as fragmentações da Fenitoína encontram-se clarificadas de seguida.

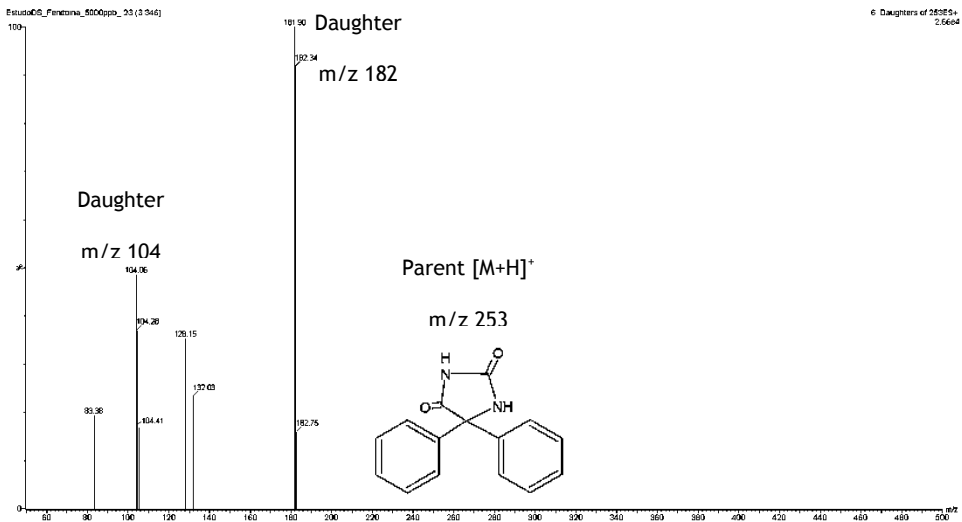


Figura 23 - Fragmentação da Fenitoína. Ião principal m/z 253 e os fragmentos m/z 182 e m/z 104.

- Fenobarbital:

Tal como nas substâncias anteriores, foi feito o mesmo estudo para o Fenobarbital, tendo como base a literatura especializada ⁽⁴⁰⁾.

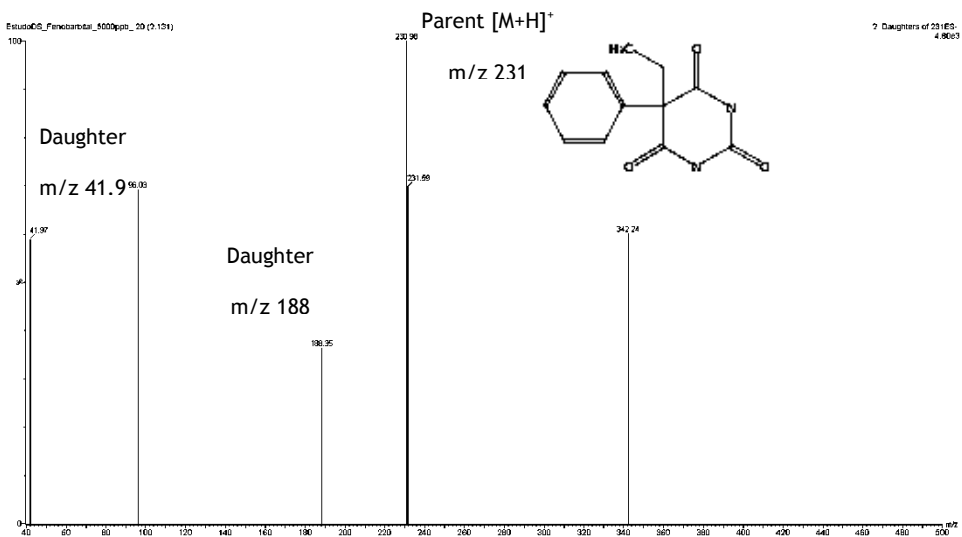


Figura 24 - Fragmentação do Fenobarbital. Ião principal m/z 231 e os fragmentos m/z 188 e m/z 41.9.

- Gabapentina:

O mesmo estudo foi feito para a Gabapentina, tendo em consideração as referências disponíveis ^{(11) (15) (41) (42)}.

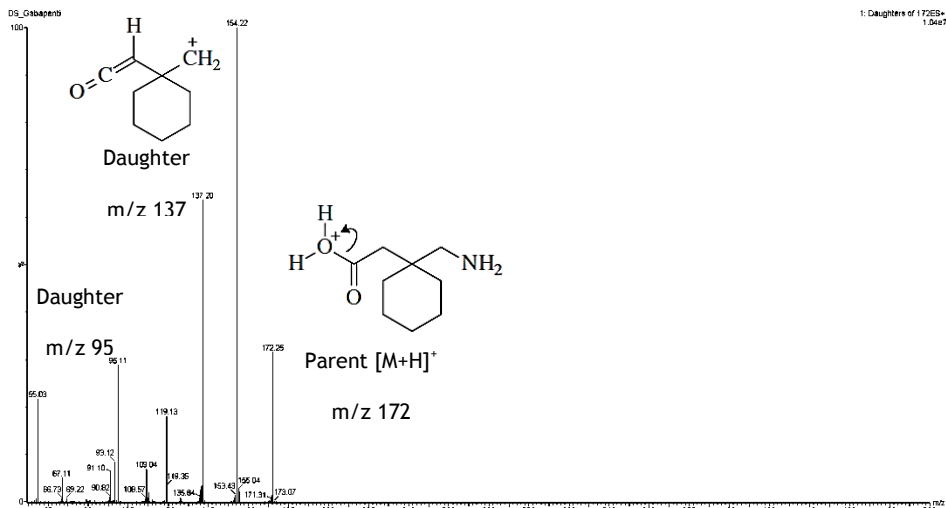


Figura 25 - Fragmentação da Gabapentina. Ião principal m/z 172 e os fragmentos m/z 137 e m/z 95.

Não foi incluído o m/z 154 e sim o m/z 95 devido ao facto do Levetiracetam ter uma transição semelhante ($171 > 154$), o que causa o aparecimento de dois picos quando se obtêm os cromatogramas. Assim, para evitar que isso aconteça foi escolhido o ião m/z 95 como segunda transição. Na figura 26 encontra-se a representação esquemática da formação do fragmento com m/z 137 ⁽¹⁵⁾.

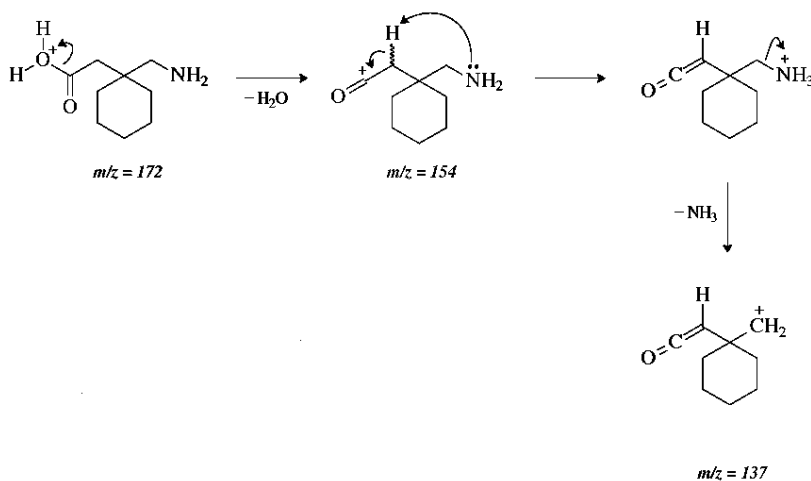


Figura 26 - Mecanismo de formação do fragmento da Gabapentina, com m/z 137 ⁽¹⁵⁾.

- Lamotrigina:

Para a Lamotrigina, tendo em conta a literatura disponível ⁽⁴³⁾, foi possível determinar o padrão de fragmentação, tal como é descrito de seguida.

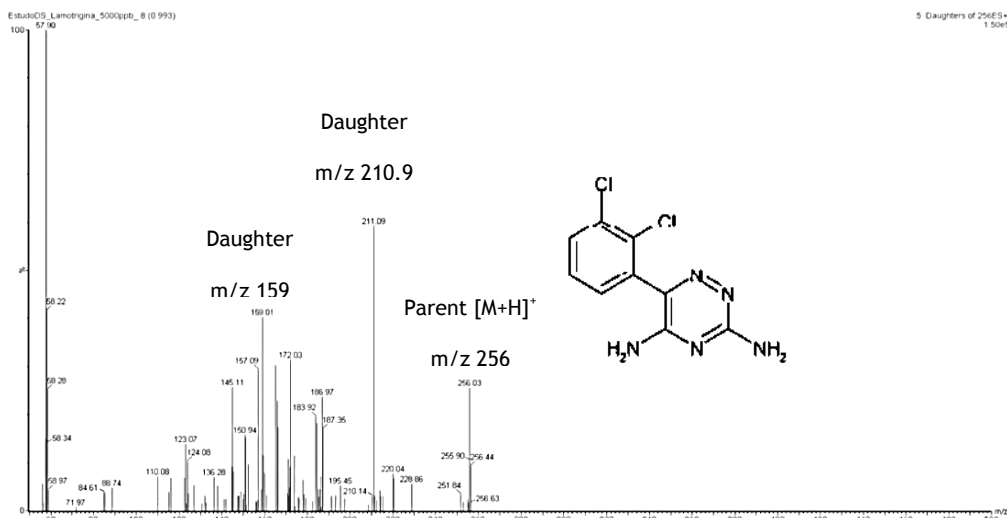


Figura 27 - Fragmentação da Lamotrigina. Ião principal m/z 256 e os fragmentos m/z 210.9 e m/z 159.

- Levetiracetam:

O Levetiracetam possui o padrão de fragmentação a seguir descrito, corroborado pela literatura ⁽⁴⁴⁾ ⁽⁴⁵⁾ ⁽⁴⁶⁾.

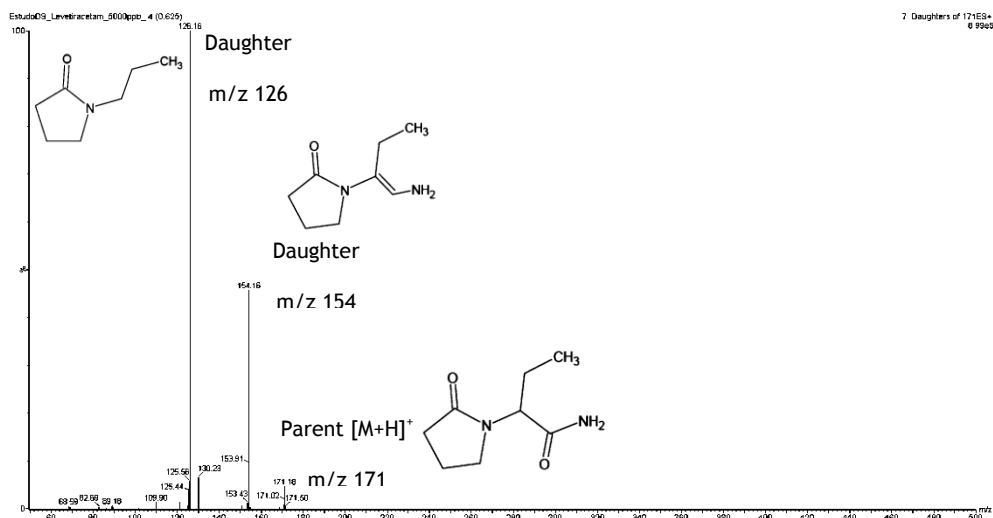


Figura 28 - Fragmentação do Levetiracetam. Ião principal m/z 171 e os fragmentos m/z 154 e m/z 126.

- Oxcarbazepina:

De seguida encontram-se os resultados do estudo de *Daughter Scan* feito para determinar o padrão de fragmentação da Oxcarbazepina, apoiado pelos dados da literatura ^{(11) (47) (48) (49) (50)}.

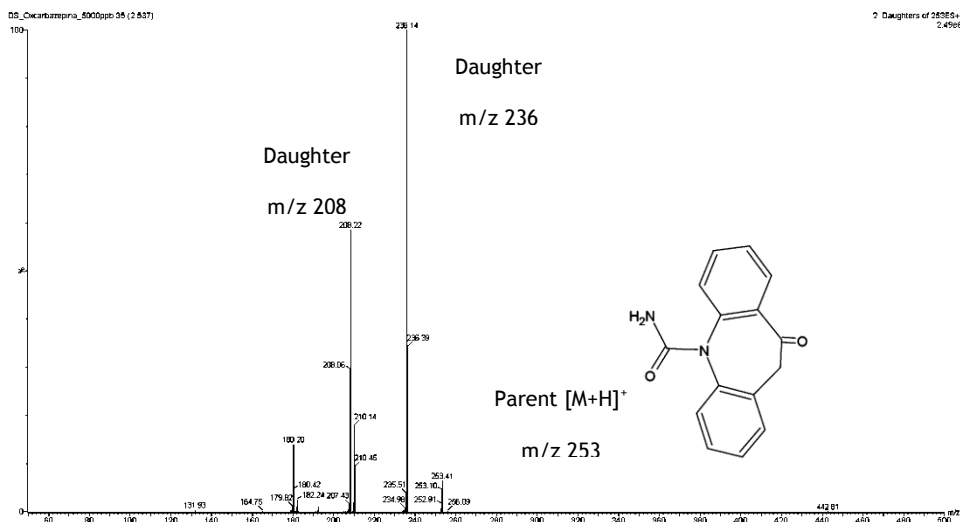


Figura 29 - Fragmentação da Oxcarbazepina. Ião principal m/z 253 e os fragmentos m/z 208 e m/z 236.

- Primidona:

O espectro de massa seguinte pretende elucidar acerca do padrão de fragmentação da Primidona e está fundamentado na literatura consultada ^{(40) (51) (52)}.

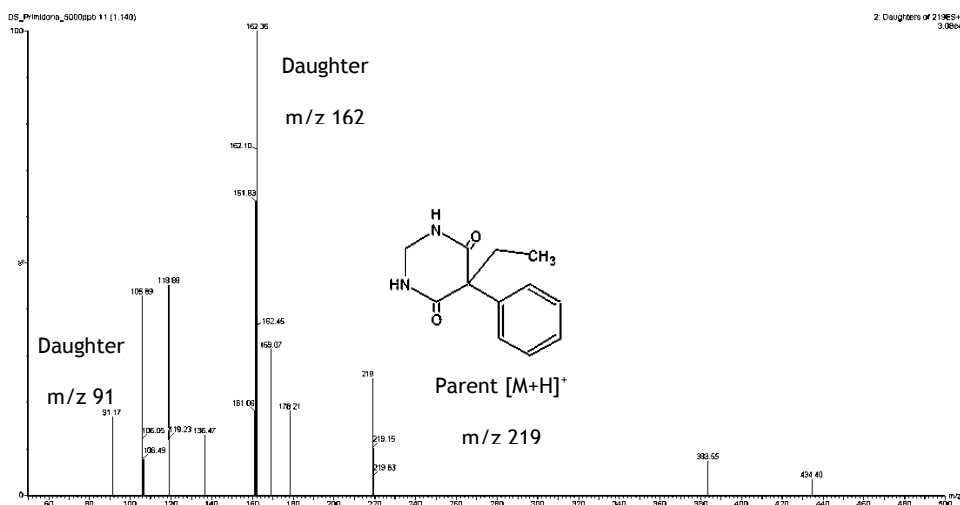


Figura 30 - Fragmentação da Primidona. Ião principal m/z 219 e os fragmentos m/z 162 e m/z 91.

- Rufinamida:

Para o estudo da fragmentação da Rufinamida, teve-se em conta o resultado do estudo do IntelliStart, bem como a informação disponível na literatura (53).

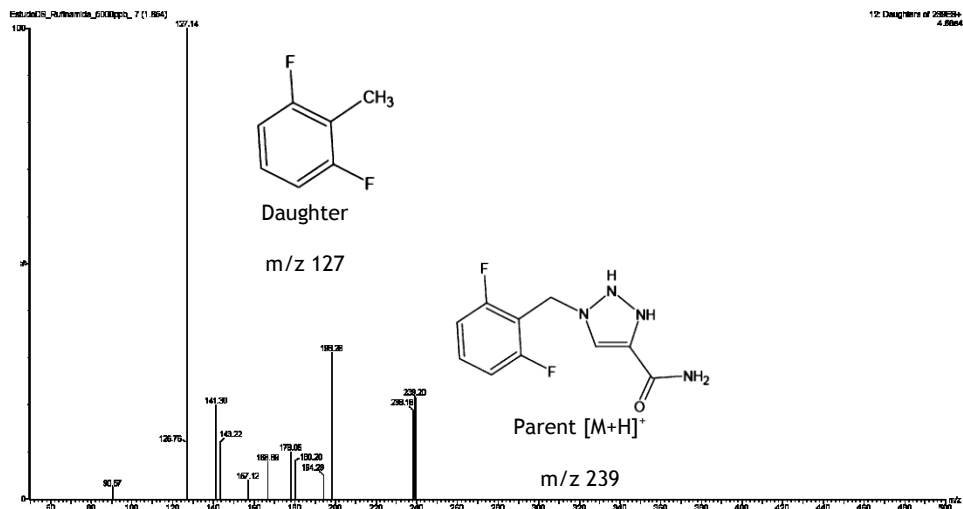


Figura 31 - Fragmentação da Rufinamida. Ião principal m/z 239 e o fragmento m/z 127.

Apesar de não ter sido obtido um *Daughter Scan* em que estivesse evidente a transição $239 > 100$, esta foi resultado do Scan feito no Detector de Massa.

- Topiramato:

De seguida está o resultado obtido para a fragmentação do Topiramato. O resultado encontra-se confirmado pela literatura (54).

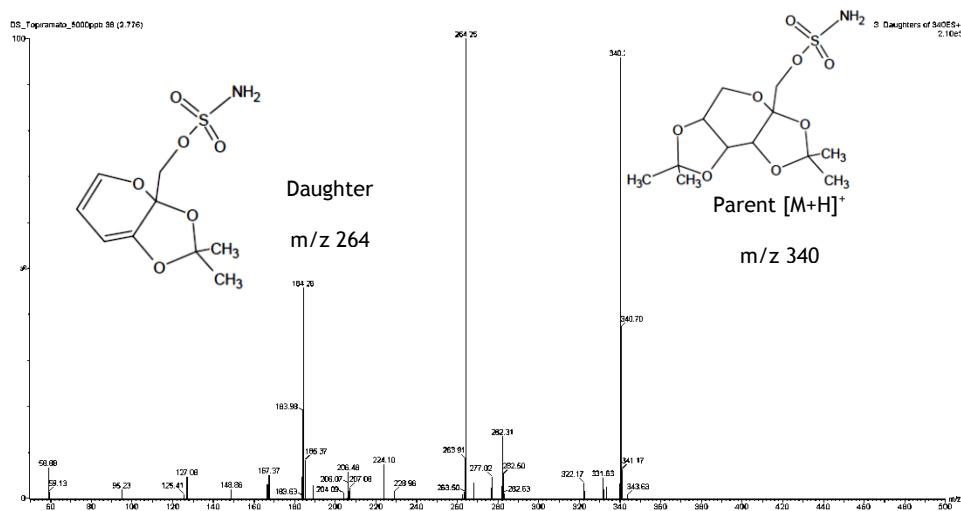


Figura 32 - Fragmentação do Topiramato. Ião principal m/z 340 e o fragmento m/z 264.

- Zonisamida:

Por fim, apresentam-se de seguida os resultados do estudo da fragmentação da Zonisamida, tendo em conta a literatura ⁽¹¹⁾ e o estudo feito no espectrómetro de massa.

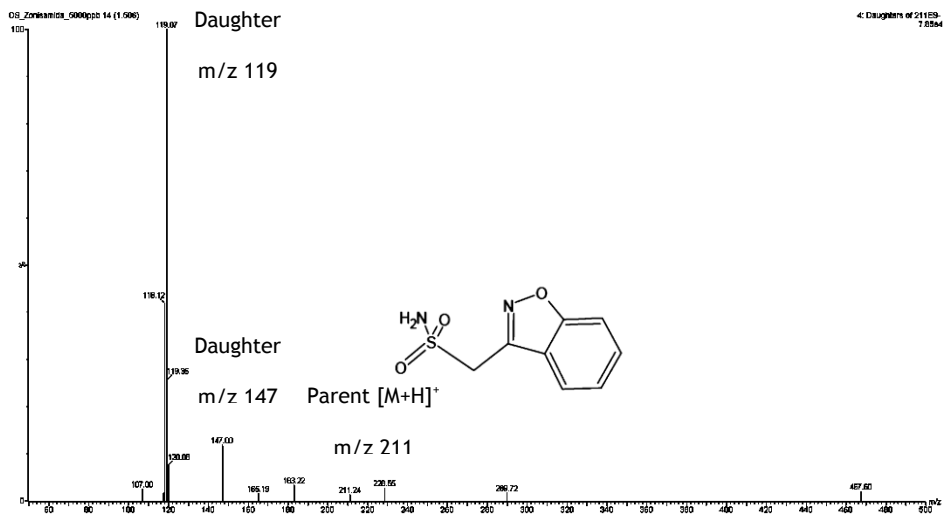


Figura 33 - Fragmentação da Zonisamida. Ião principal m/z 211 e os fragmentos m/z 147 e m/z 119.

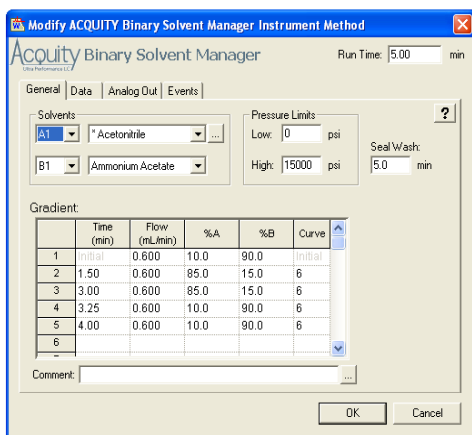
4.2. Estudos Preliminares de desenvolvimento do método UPLC-MS/MS

O primeiro padrão a ser estudado foi o Felbamato, por ser uma das substâncias para a qual não havia qualquer informação prévia.

Foi seguido o gradiente descrito na literatura para a determinação de Felbamato ⁽¹⁴⁾, usando como fase móvel um tampão de acetato de amónio a 10mM e acetonitrilo, com uma coluna ACQUITY UPLC[®] BEH C18 (2,1 x 50 mm). A escolha desta coluna teve a ver com o facto de ser do tipo C18, que é de longe a coluna mais universal, com aplicabilidade a compostos com características muito distintas porque existe na literatura como referência para o estudo de medicamentos antiepiléticos ⁽⁵⁵⁾, e também já estava a ser usada no STF com um método estabelecido e validado para determinação de Ácido Valpróico, também ele um antiepilético, excluído deste trabalho por

exigir condições de preparação da amostra (sangue) distinta das usadas para os doze AED's e que será discutida no decorrer deste trabalho.

Começou-se por fazer um **SCAN**, tanto no modo positivo como no modo negativo, fazendo variar a voltagem do cone, com razões m/z entre os 50 e 500. Depois um **SIR**, variando a voltagem do cone, agora já para um m/z fixo: 239,2 - m/z do ião *parent*. De seguida, e após ter sido determinado qual a melhor voltagem do cone (22 V), foi feito um **Daughter Scan**, para determinar quais os fragmentos formados e escolher a melhor energia de colisão para a sua ocorrência. Assim, fez-se variar a energia de colisão, para determinar os iões “filhos” do *Parent* m/z 239,2. Por fim, depois de determinar os possíveis iões “filhos”, fez-se o estudo MRM onde se testaram as transições encontradas (figura 36). Porque os resultados obtidos foram insatisfatórios, sobretudo no que diz respeito à separação cromatográfica e à definição dos picos obtidos, decidiu-se testar o mesmo gradiente mas com a coluna ACQUITY UPLC® HSS T3 (2,1 x 100 mm). Com o gradiente descrito na referência (14) (figura 34).



	Time (min)	Flow (mL/min)	%A	%B	Curve
1	Initial	0.600	10.0	90.0	Initial
2	1.50	0.600	85.0	15.0	6
3	3.00	0.600	85.0	15.0	6
4	3.25	0.600	10.0	90.0	6
5	4.00	0.600	10.0	90.0	6
6					

Figura 34 - Gradiente utilizado, com a Coluna ACQUITY YPLC® HSS T3.

Apesar de ter chegado a resultados satisfatórios com o uso da coluna ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 μm (2,1 x 100 mm), e do uso da fase móvel em gradiente com acetonitrilo e tampão acetato de amónia 10 mM, acabou por se testar outras opções, uma vez que mais do que criar um método analítico

por si só, pretende-se também adaptá-lo e aplica-lo á rotina de um laboratório de toxicologia forense.

Para melhorar a separação entre picos foi feita uma pequena alteração no gradiente:

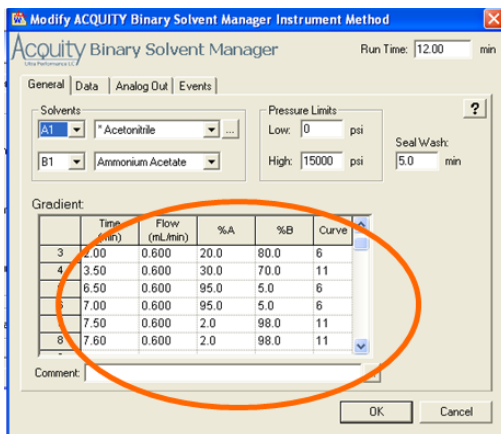


Figura 35 - Gradiente com alteração (evidenciada pela marcação a laranja). Comparar com figura 34.

Esta alteração permitiu uma melhor separação dos componentes da mistura, no entanto, e porque se verificaram aumentos de pressão abruptos na coluna quando a fase móvel era tampão, decidiu-se testar a fase móvel já usada no serviço para a determinação de Medicamentos em amostras de sangue, e que é constituída por um gradiente de acetonitrilo e ácido fórmico a 0,1 % em água ultrapura (para LC-MS) (figura 37).

É um facto que o uso de tampões, para além de ter mais riscos de causar estragos no sistema (precipitação na fonte, por exemplo), constitui também uma maior fonte de erro, devido à sua preparação exigir pesagens e outras medições, o que tem tendência a causar mais variações na análise (tempos de retenção, pH das amostras, etc.) e tem também uma durabilidade mais limitada. Parece por isso mais lógico e acertado o uso de ácido fórmico em vez de uma solução tampão, caso resulte igualmente bem, mas para isso é também necessário voltar à coluna ACQUITY UPLC HSS T3® (2,1x100 mm, 1,8 µm).

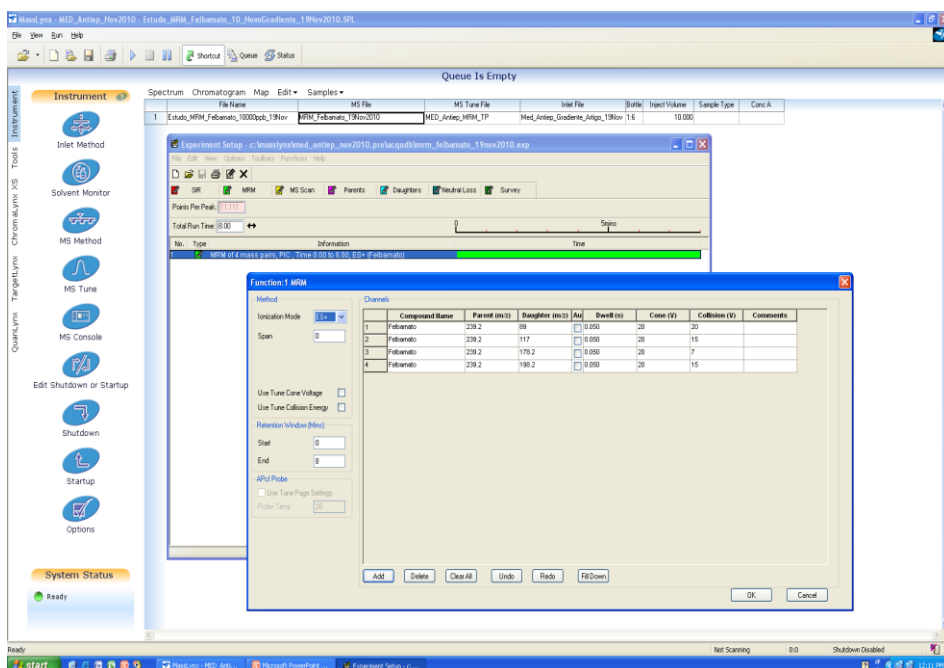


Figura 36 - Pormenor dos parâmetros MRM para a determinação do Felbamato, no software MassLynx™.

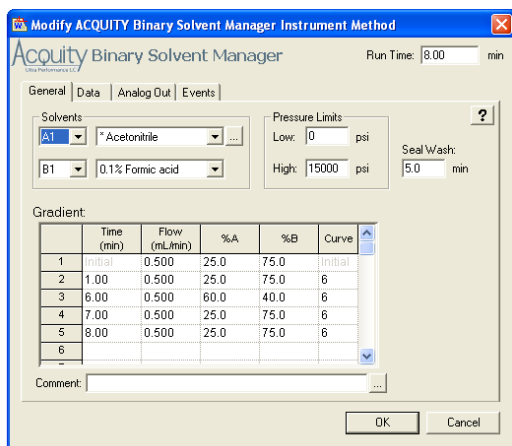


Figura 37 - Gradiente UPLC com fases móveis de Acetonitrilo (A) e Ácido Fórmico 0,1 % (B).

Foi feito o mesmo estudo para os restantes padrões, para os quais estava disponível apenas informação da literatura.

Para o estudo destes AED's foi seguido o mesmo procedimento que já tinha sido feito para o estudo do Felbamato.

Os padrões foram reconstituídos em metanol:água (50:50), na tentativa de obtenção de sinais mais intensos e mais definidos.

Foi ainda testada a reconstituição com 100 % de água ultrapura e também com fase móvel (ACN:ácido fórmico 0,1 % - 25:75, v:v), tendo sido apurado que esta última produzia melhores resultados em termos de definição do pico cromatográfico, para a maior parte das substâncias.

4.2.1. Padrão Interno

O padrão interno é utilizado em métodos quantitativos de LC-MS/MS para compensar as diferenças entre análises, resultantes sobretudo da eficiência da extracção, da repetibilidade das injeções ou da eficiência da ionização. A selecção adequada do padrão interno constitui uma decisão difícil, mas vital para o sucesso da metodologia, sobretudo no âmbito deste trabalho, onde está em causa a quantificação de substâncias em amostras reais.

A escolha do padrão interno recai preferencialmente por padrões deuterados, por serem compostos que não existem na Natureza, e que não existirão na amostra para além do que lhe é adicionado, e que é escolhido para ser o mais semelhante possível aos analitos. Porque os AED's são um grupo muito heterogéneo de compostos, esta escolha mostrou-se bastante difícil. Alguns autores acabam mesmo por descrever o uso de mais do que um padrão interno ⁽¹¹⁾, quando na presença de grupos heterogéneos de compostos.

Apenas existia no laboratório disponível para este estudo o Clonazepam-D4, que foi o primeiro padrão interno a ser testado.

Foram testadas as transições que encontradas na literatura (m/z 319,9 > 218,1 e m/z 319,9 > 274,1), usando a mesma coluna analítica e as mesmas condições cromatográficas usadas anteriormente. No entanto, os resultados não foram os esperados. Para além disso não fazia muito sentido ter como padrão interno uma benzodiazepina deuterada, quando nenhum dos AED's da mistura pertence a este grupo de substâncias.

Para além do Clonazepam-D4 não se ter mostrado adequado ao estudo dos AED's, há ainda uma outra limitação devido ao facto de só haver disponível 1 mL de solução a 100 µg/mL. Para as doses de AED's seria necessário um gasto muito grande deste padrão, para que se pudesse adequar a concentração de padrão interno com os valores da curva de calibração usada para quantificar.

Assim, tendo estas limitações em consideração foram testadas outras opções de padrão interno. Foram eles a Hidroclorotiazida, a Protriptilina e a Promazina, já utilizados no STF - Centro, como padrões internos noutros métodos quantitativos e qualitativos de determinação de fármacos em amostras de sangue, por GC-MS e LC-MS.

Foi feito um estudo destes três padrões internos, com extracção SPE de 0,1 mL de sangue fortificado e reconstituição em fase móvel (ACN: ácido fórmico 0,1 % - 25:75, v:v). Os cromatogramas resultantes deste estudo são apresentados na figura 38. Apesar dos três padrões internos testados serem adequados, verificou-se alguma variação de intensidade, e consequentemente de áreas de pico, na Hidroclorotiazida e na Protriptilina, quando comparadas com a Promazina, o que eventualmente levava à ocorrência de mais erros na quantificação das amostras. Assim, tendo isso em consideração, decidiu escolher-se a Promazina como padrão Interno.



Figura 38 - Cromatogramas relativos ao estudo dos padrões internos Promazina (a), Protriptilina (b) e Hidroclorotiazida (c).

4.2.2. Preparação das amostras

Depois de estudadas as transições e condições para todos os padrões foram testadas várias extracções para amostras de sangue, de modo a encontrar a mais adequada, isto é, a que mostrasse extractos mais limpos, com menos interferentes e picos mais intensos.

O sangue que foi usado para a extracção é o chamado “sangue branco”, que como já foi referido anteriormente, é sangue que foi triado para a presença de medicamentos e foi obtido um resultado negativo. Esse sangue pode ser fortificado para ser utilizado nas extracções, com o objectivo de se obter controlos e calibradores para se poder fazer uma curva de calibração, com o propósito de quantificar amostras reais.

A extracção por fase sólida já é utilizada rotineiramente no Serviço de Toxicologia Forense do INML. Foram testas dois tipos de extracção SPE: uma primeira (A) já utilizada no STF para a extracção de Benzodiazepinas e Medicamentos Gerais, e uma segunda (B), utilizada rotineiramente para a extracção de Ácido Valpróico (VPA), um antiepiléptico e que necessita de acidificação da amostra, obrigando a ser extraído separadamente dos outros medicamentos gerais.

As amostras foram fortificadas com a mistura de 12 AED's, com o padrão interno e ainda com o ácido Valpróico, com o objectivo de testar se este pode ser incluído na mesma corrida cromatográfica. Em ambos os casos foram injectados 10 µL de amostra no sistema UPLC-MS/MS. Para cada extracção foi feito um controlo baixo (a 100 ng/mL) e um controlo alto (a 2000 ng/mL).

Inicialmente estava também prevista a inclusão da Vigabatrina (figura 39) no método, uma vez que esta faz parte dos medicamentos antiepilépticos comercializados em Portugal e foi adquirida pelo STF com esse propósito. No entanto, apesar de ter sido feito o seu estudo na forma de padrão puro, em

metanol, verificou-se depois que não era possível extraí-la juntamente com os outros AED's. Isto verificou-se para as extracções estudadas (tabela 4).

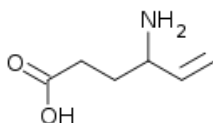


Figura 39 - Estrutura da Vigabatrina.

A injeção de padrão puro, em metanol, permite detectar a substância (figura 40), com as condições já estudadas e adequadas para as restantes substâncias estudadas mas, após a extracção, a Vigabatrina não se encontra nas amostras. Foram efectuadas várias extracções, acontecendo sempre o mesmo.

Tabela 4 - Extracções SPE estudadas para a determinação de AED's em amostras de sangue.

Extracção A (Benzodiazepinas e Medicamentos Gerais)	Extracção B (Ácido Valpróico)
0,5 mL de Sangue + PI + 2 mL H ₂ O Centrifugar 3000rpm, 5mn.	0,5 mL de Sangue + PI + 2 mL H ₂ O + 25 µL de Ácido Ortofosfórico 10 % Centrifugar 3000rpm, 5mn.
SPE	SPE
Acondicionamento das colunas - 2mL MeOH + 2mL H ₂ O	Acondicionamento das colunas - 2mL MeOH + 2mL H ₂ O
Amostras	Amostras
Lavagem - 2mL MeOH 5 %	Lavagem - 2mL MeOH 5 %
Secagem com vácuo	Secagem com vácuo
Eluição - 2mL MeOH	Eluição - 2mL MeOH
Amostras evaporadas num banho a 40°C, sob Azoto.	Amostras evaporadas num banho a 40°C, sob Azoto.
Reconstituição em 150 µL de MeOH:H ₂ O (50:50).	Reconstituição em 150 µL de MeOH:H ₂ O (50:50).

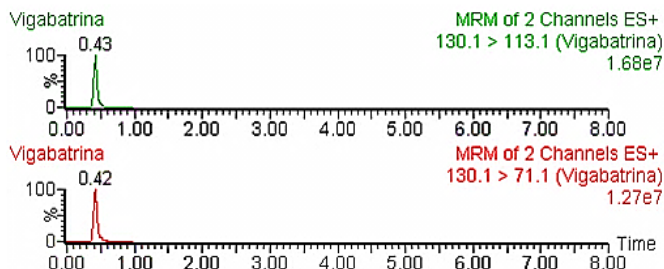


Figura 40 - Estudo da Vigabatrina, na forma de padrão puro, em metanol, para as duas transições 130.1 > 113.1 e 130.1 > 71.1.

Depois de um estudo mais intensivo desta substância poderá ser implementado um método personalizado, que permitirá a sua determinação, tal como já acontece com o Ácido Valpróico, que devido às suas características ácidas levou ao desenvolvimento de um método separado do já existente para os outros medicamentos no STF - Centro.

Devido às elevadas concentrações terapêuticas características destes compostos decidiu-se usar 0,1 mL de amostra, que permite um gasto menor de soluções padrão. Assim foi feita uma extracção SPE para testar estes novos parâmetros cromatográficos, de forma semelhante à extracção A anteriormente descrita (tabela 4), com a alteração na quantidade de sangue utilizada (0,1 mL) e a diluição é feita com 1 mL de água ultrapura (em oposição aos 2 mL, usados para diluir 0,5 mL de sangue (tabela 4)).

As amostras foram reconstituídas em 100 µL de fase móvel (25:75, v:v - ACN: ácido fórmico 0,1 %) e foram injectados 10 µL de amostra no sistema UPLC-MS/MS. Depois de optimizadas condições foi possível fazer uma extracção SPE e injectar as amostras de sangue, já com os 12 AED's. Com esse propósito foi criada uma mistura padrão com os medicamentos antiepilépticos, em metanol: Carbamazepina, Felbamato, Fenitoína, Fenobarbital, Gabapentina, Lamotrigina, Levetiracetam, Oxcarbazepina, Primidona, Rufinamida, Topiramato e Zonisamida.

4.2.3. Validação preliminar

Em seguida (figura 41) são apresentadas as transições MRM para os 12 AED's. Os cromatogramas são relativos a um calibrador a 3000 ng/mL, usado para a curva do estudo da linearidade do método, e encontram-se ordenados de acordo com o seu tempo de retenção, do menor para o maior. O padrão interno utilizado foi a Promazina.

Depois das condições optimizadas foi possível iniciar o procedimento de validação, tal como é apresentado de seguida, seguindo as normas estabelecidas pelo INML.

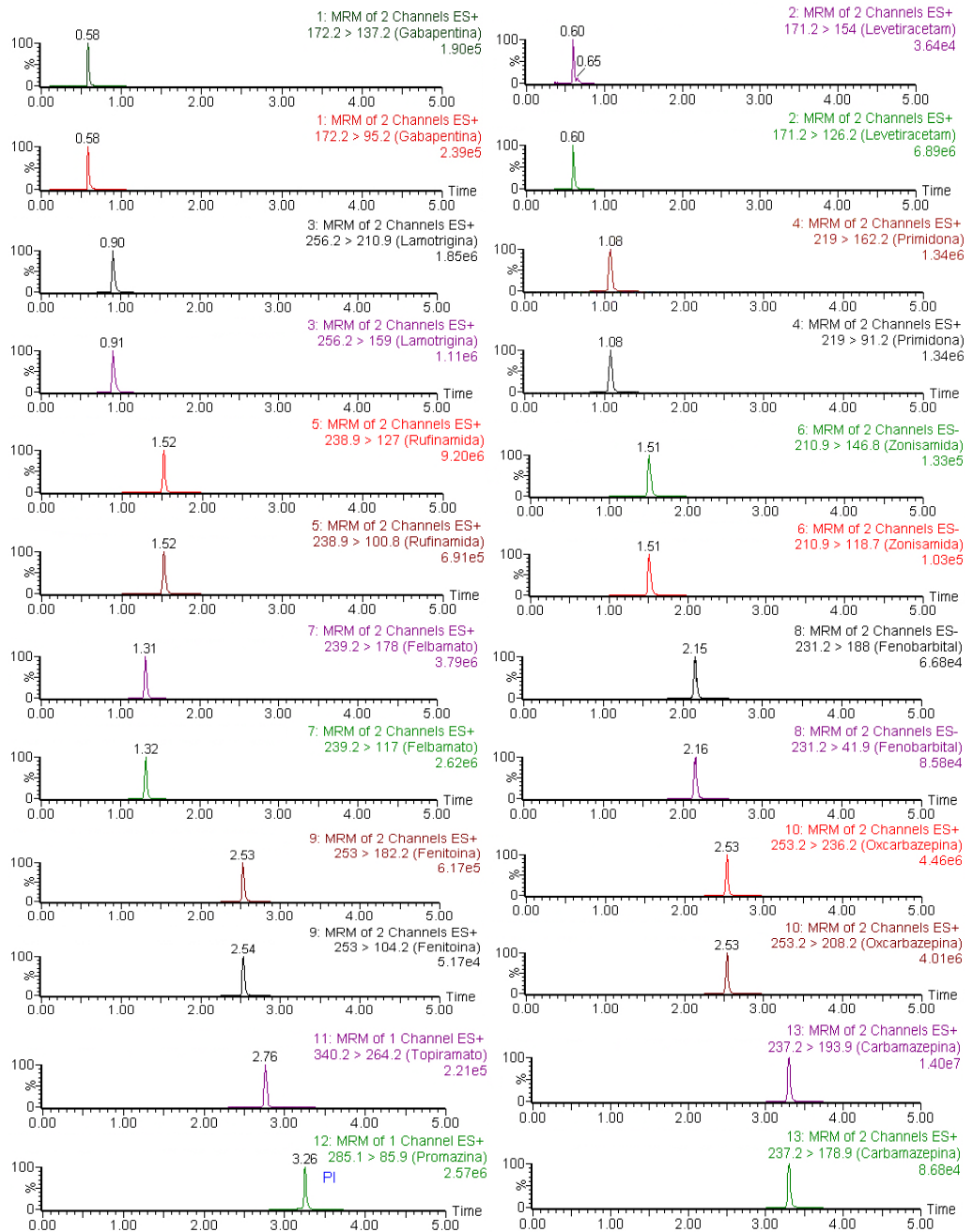


Figura 41 - Cromatogramas das transições MRM para os 12 AED's e o padrão interno.

4.2.4. Procedimento de Validação

Em alguns sectores da química analítica, como é o caso da química forense, é requerido que os laboratórios introduzam medidas de garantia de qualidade de forma a provar que são capazes de fornecer informação com a qualidade adequada, e o laboratório do STF não é excepção. Tais medidas incluem: o uso de métodos de análise validados; o uso de procedimentos com controlo interno de qualidade bem definido; participação em testes de competência; acreditação baseada na norma NP EN ISO/IEC 17025:2005, e estabelecimento da rastreabilidade dos resultados das medições. Dados analíticos não confiáveis podem comprometer os resultados, e a sua interpretação, podendo levar a decisões judiciais desacertadas, eventualmente com consequências graves.

Para que sejam garantidas as informações geradas a partir de um determinado método, este deve sofrer uma avaliação, mais especificamente uma validação.

Na validação do método de determinação dos 12 AED's por UPLC-MS/MS foi aplicada a metodologia analítica descrita anteriormente, em amostras de sangue, tendo sido avaliados os seguintes parâmetros:

- Especificidade/selectividade;
- Limites de detecção e de quantificação;
- Eficiência de extracção;
- Arrastamento (*carryover*).
- Gama de trabalho/Linearidade;
- Repetibilidade;
- Exactidão;
- Precisão intermédia;
- Robustez.

4.2.4.1. Especificidade/selectividade;

A especificidade/selectividade é a capacidade que o método possui de medir um composto em presença de outros componentes, como sejam impurezas, produtos de degradação ou componentes da matriz. É por isso necessário mostrar a selectividade do método entre compostos com estruturas relacionadas, que possam estar presentes numa amostra.

Para avaliar este parâmetro foram utilizadas dez misturas (*pools*) de sangues diferentes, cada uma constituída por várias amostras negativas para medicamentos previamente analisadas por ensaio imunoenzimático (CODA; Bio-Rad). Para realizar este ensaio foram seleccionados sangues da cavidade cardíaca (*post-mortem*). Foram utilizadas duas alíquotas de 0,1 mL de cada uma das misturas. A uma das alíquotas foi aplicado directamente o procedimento de ensaio, enquanto a segunda foi previamente fortificada com 500 ng/mL de cada um dos AED's em estudo, a partir de uma mistura padrão a 10 µg/mL (tabela 5).

Tabela 5 - Mistura-padrão utilizada na fortificação das amostras de sangue no estudo da especificidade/selectividade

Concentração da mistura padrão	AED's
10 µg/mL	Carbamazepina, Felbamato, Fenitoína, Fenobarbital, Gabapentina, Lamotrigina, Levetiracetam, Oxcarbazepina, Primidona, Rufinamida, Topiramato, Zonisamida.

Para estimar a positividade/negatividade das amostras foram utilizados os critérios de identificação de substâncias - o tempo de retenção relativo (TRR) e as relações iónicas das transições estudadas, de acordo com a equação 1.

$$\text{TRR} = \text{Tr}_{\text{substância}} / \text{Tr}_{\text{PI}} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

TRR é o tempo de retenção relativo;

$\text{Tr}_{\text{substância}}$ o tempo de retenção do AED;

Tr_{PI} o tempo de retenção do padrão interno.

Às amostras foi atribuído um código interno do STF, que será utilizado no decorrer deste trabalho para identificação das mesmas. Foi utilizado como controlo positivo uma alíquota preparada a partir da fortificação de um dos brancos de sangue (SC002-01).

4.2.4.1.1. Critério de Tempo de Retenção Relativo

A diferença entre o TRR de uma dada substância na amostra e o TRR dessa mesma substância no controlo deve ser inferior a 2% ou 0,4 min, em termos de diferença de tempos de retenção absolutos. A diferença relativa de TRR é determinada de acordo com a equação 2.

$$\Delta TRR = \frac{TRR_{\text{Suspeito}} - TRR_{\text{Controlo}}}{TRR_{\text{Controlo}}} \quad (\text{Equação 2})$$

onde:

TRR_{Suspeito} - Tempo de retenção relativo da substância na amostra;

TRR_{Controlo} - Tempo de retenção relativo da substância no controlo;

ΔTRR - Diferença relativa de TRR.

Os resultados do estudo da especificidade/selectividade relativos ao critério de tempo de retenção relativo encontram-se nas tabelas 6 e 7. A vermelho encontram-se assinaladas os ΔTRR com um TRR superior a 2%, relativamente à amostra controlo (SC002-01) .

Tabela 6 - Tempos de retenção relativos (TRR) das substâncias em cada uma das amostras de sangue.

AED	Código das amostras de sangue									
	SC005-01	SC007-01	SC010-01	SC011-01	SC037-01	SC039-01	SC040-01	SC041-01	SC042-01	SC005-01
Carbamazepina	1,012	1,009	1,012	1,009	1,009	1,012	1,012	1,012	1,015	1,012
Felbamato	0,415	0,413	0,415	0,405	0,405	0,407	0,407	0,407	0,407	0,407
Fenitoína	0,784	0,781	0,784	0,777	0,78	0,78	0,78	0,78	0,78	0,78
Fenobarbital	0,665	0,666	0,665	0,662	0,662	0,664	0,664	0,664	0,664	0,664
Gabapentina	0,174	0,173	0,174	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
Lamotrigina	0,293	0,292	0,293	0,284	0,284	0,284	0,284	0,284	0,284	0,284
Levetiracetam	0,183	0,182	0,183	0,186	0,186	0,187	0,187	0,187	0,187	0,187
Oxcarbazepina	0,78	0,778	0,78	0,777	0,777	0,78	0,78	0,78	0,78	0,78
Primidona	0,335	0,334	0,338	0,335	0,335	0,33	0,33	0,33	0,33	0,336
Rufinamida	0,476	0,471	0,473	0,47	0,466	0,468	0,468	0,468	0,468	0,471
Topiramato	0,851	0,848	0,851	0,848	0,848	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85
Zonisamida	0,47	0,468	0,47	0,466	0,466	0,468	0,468	0,468	0,468	0,468
Promazina (PI)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabela 7 - Diferença relativa entre o TRR de uma dada substância na amostra e no controle (SC002-01).

AED	Código das amostras de sangue									
	SC005-01	SC007-01	SC010-01	SC011-01	SC037-01	SC039-01	SC040-01	SC041-01	SC042-01	
Carbamazepina	-0,003	0,000	-0,003	-0,003	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	
Felbamato	-0,003	0,000	-0,022	-0,022	-0,019	-0,019	-0,019	-0,019	-0,019	
Fenitoína	-0,003	0,000	-0,008	-0,004	-0,005	-0,005	-0,005	-0,005	-0,005	
Fenobarbital	0,002	0,000	-0,005	-0,005	-0,002	-0,002	-0,002	-0,002	-0,002	
Gabapentina	-0,003	0,000	0,035	0,035	0,038	0,038	0,038	0,038	0,038	
Lamotrigina	-0,003	0,000	-0,031	-0,031	-0,028	-0,028	-0,028	-0,028	-0,028	
Levetiracetam	-0,003	0,000	0,017	0,017	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	
Oxcarbazepina	-0,003	0,000	-0,004	-0,004	-0,001	-0,001	-0,001	-0,001	-0,001	
Primidona	-0,003	0,009	0,000	0,000	-0,015	-0,015	-0,015	-0,015	0,003	
Rufinamida	-0,009	-0,006	-0,013	-0,019	-0,016	-0,016	-0,016	-0,016	-0,01	
Topiramato	-0,003	0,000	-0,004	-0,004	-0,001	-0,001	-0,001	-0,001	-0,001	
Zonisamida	-0,003	0,000	-0,006	-0,006	-0,003	-0,003	-0,003	-0,003	-0,003	

4.2.4.1.2. Critério das Relações Iónicas das transições

Com base no critério áreas relativas das transições de uma dada substância na amostra, estas não devem diferir mais do que o valor apresentado na tabela 8, relativamente às áreas relativas das mesmas transições na amostra controlo.

Tabela 8 - Tolerância máxima para as áreas relativas das transições iónicas, de acordo com as regras do STF-Centro.

Áreas relativas (% do pico base)	Tolerância máxima
> 50%	± 15% (absoluto)
> 25% e < 50%	± 25% (absoluto)
< 25%	± 10% (absoluto)

Os resultados do estudo da especificidade/selectividade relativos ao critério das relações iónicas das transições encontram-se na tabela 9. Assinalado a vermelho encontram-se as amostras que não cumprem o critério de tolerância máxima para uma determinada substância, de acordo com a tabela 8.

Na tabela 10 encontram-se as transições iónicas seleccionadas para cada substância e o respectivo intervalo de tolerância tendo por base a tabela 8 e as áreas relativas obtidas no controlo positivo (tabela 9).

A tabela 11 reúne os resultados obtidos no estudo da especificidade/selectividade. Os valores foram calculados tendo como base apenas o critério das áreas relativas.

Tabela 9 - Áreas relativas das transições iónicas, em percentagem, das respectivas substâncias.

Substância	Código das amostras de sangue										
	Transição	SC002-01	SC005-01	SC007-01	SC010-01	SC011-01	SC037-01	SC039-01	SC040-01	SC041-01	SC042-01
	MRM										
Carbamazepina	237.2>178.9	0,5	0,5	0,6	0,5	0,6	0,5	0,5	0,5	0,6	0,5
Felbamato	239.2>178	55,5	55	91	81,2	80,6	58,3	52,1	42,9	54,5	48,3
Fenitoína	253.2>104.2	9	5,7	6,3	6,8	9,5	6,7	8,5	6,7	8,9	7,5
Fenobarbital	231.2>188	63,6	65,7	73,8	68	74,8	69,1	67,7	70	66,3	69,5
Gabapentina	172.2>95,2	63,3	65,9	55,7	59,7	53,3	58	78,8	63,8	66,3	54,2
Lamotrigina	256.2>159	85,8	91,4	87,8	90,6	74,1	77,8	100	94	95,1	79,5
Levetiracetam	171.2>154	0,2	0,2	0,4	0,4	0,9	0,6	0,5	0,5	0,6	0,8
Oxcarbazepina	253.2>236.2	44,5	50,4	52,6	74,1	85,1	73,3	71,1	63,8	89,9	75,4
Primidona	219.0>91.2	66,6	45	54,2	53,3	72,6	45,5	55,8	62	67	78,9
Rufinamida	238.9>100.8	22,7	18,4	22,8	21,3	15,3	14,2	20,3	17,6	16,7	16,9
Topiramato*	340.2>264.2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Zonisamida	210.9>118.7	68,1	84,2	79,3	75,1	75,9	76,9	75,9	83,4	78	83,5

*O Topiramato só tem uma transição, por isso a área relativa é sempre 100 %.

Tabela 10 - Transições iónicas seleccionadas para cada substância e respectivo intervalo de tolerância.

Substância	Transições iónicas		Tolerância	
	1ª Transição	2ª Transição	Mínima	Máxima
Carbamazepina	237.2>193.9	237.2>178.9	-9,50%	10,50%
Felbamato	239.2>117	239.2>178	40,50%	70,50%
Fenitoína	253.2>182.2	253.2>104.2	-1%	19%
Fenobarbital	231.2>41.9	231.2>188	48,60%	78,60%
Gabapentina	172.2>137.2	172.2>95.2	48,30%	78,30%
Lamotrigina	256.2>210.9	256.2>159	73,50%	103,50%
Levetiracetam	171.2>126.2	171.2>154	-9,80%	10,20%
Oxcarbazepina	253.2>208.2	253.2>236.2	33,40%	55,60%
Primidona	219.0>162.2	219.0>91.2	51%	81%
Rufinamida	238.9>126.8	238.9>100.8	12,70%	32,70%
Topiramato	340.2>264.2		100 % *	
Zonisamida	210.9>146.8	210.9>118.7	53,10%	83,10%

*O Topiramato só tem uma transição, por isso a tolerância é sempre de 100%.

A percentagem de falsos negativos calculada numa primeira análise, apenas com base nos valores numéricos das áreas relativas, foi de 13,3 %, situando-se ligeiramente acima do estabelecido pelo STF, que determina que deve ser inferior a 10%. Isto pode ser justificado pelo facto de ter sido escolhida como amostra controlo a amostra SC002-01, que talvez não fosse a mais adequada para algumas amostras (Oxcarbazepina foi negativa nas amostras SC010-01, SC011-01, SC037-01, SC039-01, SC040-01, SC041-01 e SC042-01, mas positiva para as restantes), apesar de estar dentro dos parâmetros para outras. Por outro lado, pequenas variações no tempo de retenção do analito, e/ou do padrão interno, podem fazer com que deixem de estar dentro dos parâmetros estabelecidos, apresentando-se na forma de falsos negativos. O resultado poderá ainda ser afectado pela extracção SPE, onde pequenas variações no tempo de secagem das colunas, por exemplo, pode ter grande influência na sensibilidade do aparelho, fazendo com as razões das áreas relativas caiam fora dos parâmetros (que foi o caso das Oxcarbazepina), especialmente se estiver a ser confrontada com uma amostra controlo que já contém algum erro como os que já foram descritos. Este estudo foi feito confrontando as amostras com entre elas, de modo a escolher o controlo mais adequado, mas o resultado foi sempre superior a 10 % de falsos negativos.

É importante mencionar a relevância da determinação ser feita sempre com base em duplicados, ou mesmo triplicados, pois pode haver um problema numa das amostras e assim há sempre outra(s) que podem ser usada(s) para obter o resultado, quer de confirmação, quer de quantificação. Isto é válido para amostras e também para controlos.

Existem contudo autores⁽⁵⁶⁾ que defendem que o teste de selectividade, no âmbito da toxicologia forense, deve ser feito apenas com base no critério de ausência de sinais interferentes nas amostras não fortificadas, e que este é o factor determinante na selectividade da amostra. Tendo isto em consideração, as amostras usadas para o estudo da selectividade foram analisadas para pesquisa de possíveis interferentes, por cálculo da razão

sinal/ruído, que deverá ser sempre inferior a 3 para se considerar a ausência de interferências. Estes cálculos foram efectuados para as amostras que demonstraram falsos negativos, com base no critério da área relativa (13,3 %), para permitir a comparação e daí concluir qual é a percentagem de falsos negativos efectivamente presente.

Na amostra SC005-01, não há de facto evidências de interferências (figura 42). Mesmo após calcular a razão sinal/ruído, esta mostrou-se menor que 3 (s/n=2,33), no caso da Primidona o software nem conseguiu fazer este cálculo, pois o ruído sobrepõe em grande parte o sinal obtido ao tempo de retenção desta substância (1,06 minutos).

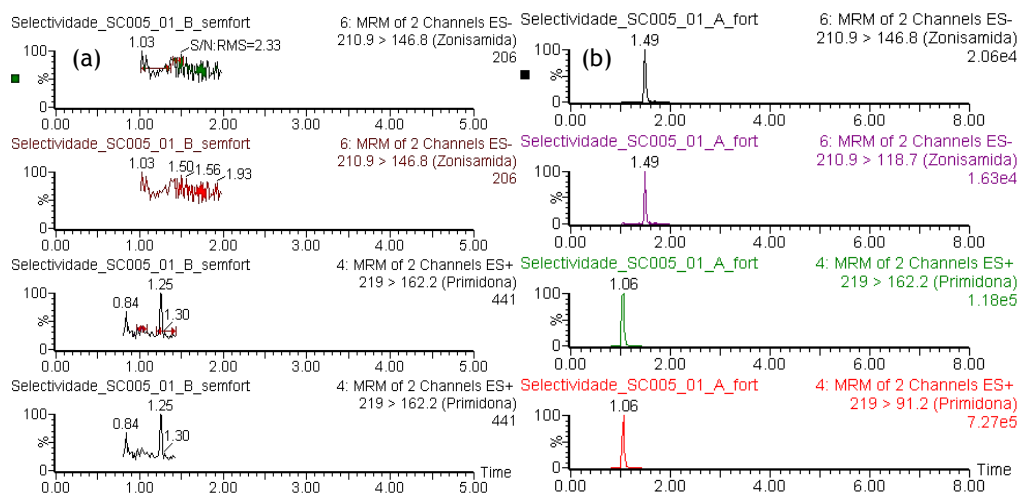


Figura 42 - (a) Cromatogramas da amostra SC005-01, para a amostra não fortificada. Cálculo da razão s/n para a transição MRM principal, para a Zonisamida (em cima) e para a Primidona (em baixo). **(b)** Cromatograma da amostra SC005-01 fortificada, com as duas transições MRM para a Zonisamida (em cima) e para a Primidona (em baixo).

A amostra SC007-01 mostra presença de interferentes, como pode ser visualizada na figura 43, onde está apresentado o cromatograma desta amostra não fortificada e onde é possível ver o resultado do cálculo da razão s/n, com o valor de 8,29.

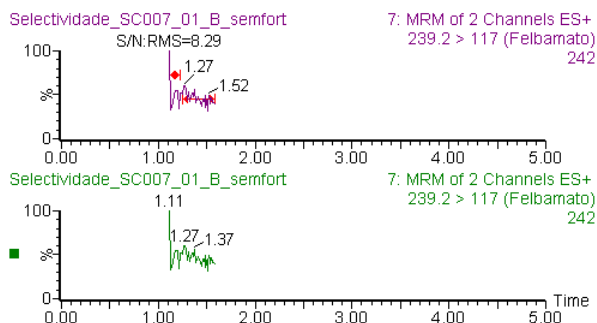


Figura 43 - Cromatograma da amostra SC007-01 não fortificada para a transição MRM principal do Felbamato (em baixo) e o cálculo da razão s/n para a mesma transição.

A amostra SC010-01 não apresenta falsos negativos uma vez que, tal como para as amostras anteriores, foi calculada a razão s/n na amostra branca não fortificada (figura 44), tendo-se demonstrado menor que 3 para a Oxcarbazepina (ruído muito mais intenso que o sinal) e para o Felbamato (s/n=1,29).

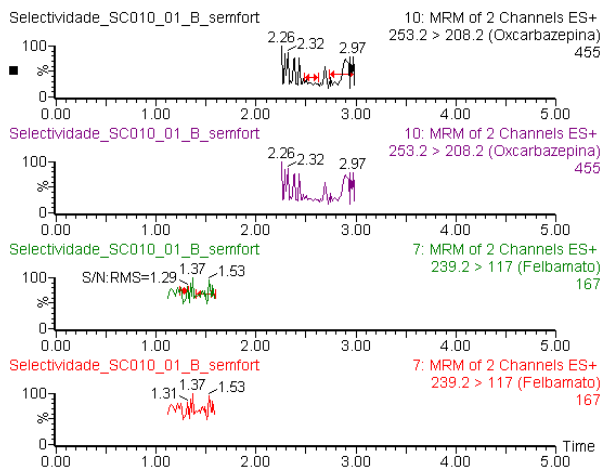


Figura 44 - Cromatograma da amostra SC010-01 não fortificada para a transição MRM principal do Felbamato (em baixo) e para a Oxcarbazepina (em cima), e o cálculo da razão s/n para as transições.

Na amostra SC011-01 também se demonstrou a ausência de interferentes para a Oxcarbazepina, pelo cálculo da razão s/n (0,73), tal como é apresentado na figura 45. O mesmo se verificou para o Felbamato.

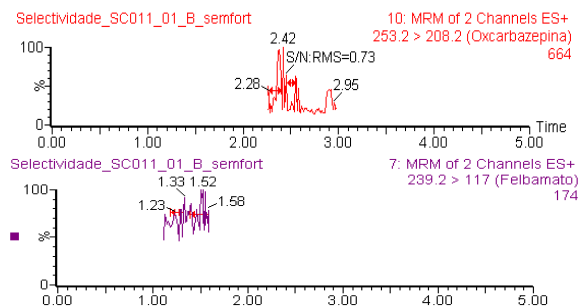


Figura 45 - Cálculo da razão s/n para a Oxcarbazepina (em cima), na amostra SC011-01, e para o Felbamato (em baixo), para a amostra não fortificada.

A amostra SC037-01 demonstrou a presença de interferentes para a Oxcarbazepina ($s/n = 5,74$) mas não para a Primidona (Figura 46).

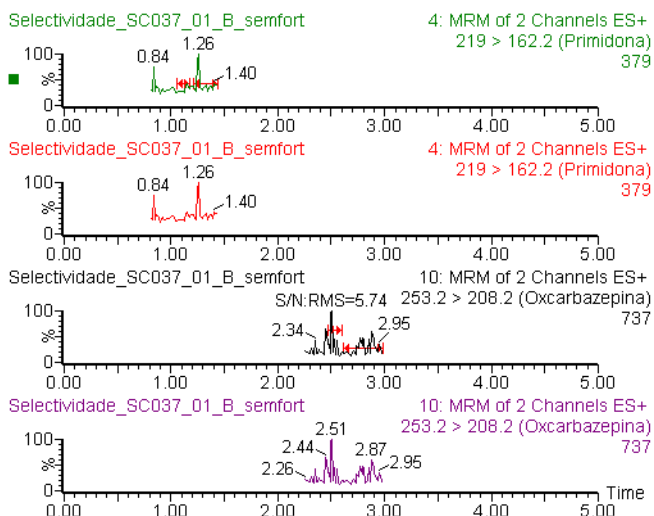


Figura 46 - Cromatogramas onde se encontra evidenciado o cálculo da razão s/n para o Felbamato (em cima) e para a Oxcarbazepina (em baixo), na amostra SC037-01, não fortificada.

A amostra SC040-01 mostrou também presença de interferências para Zonisamida (figura 47), contudo nas restantes amostras (SC039-01, SC041-01 e SC042-01) não existem evidências de sinais que interfiram com a detecção e quantificação das amostras fortificadas (figuras 48, 49 e 50).

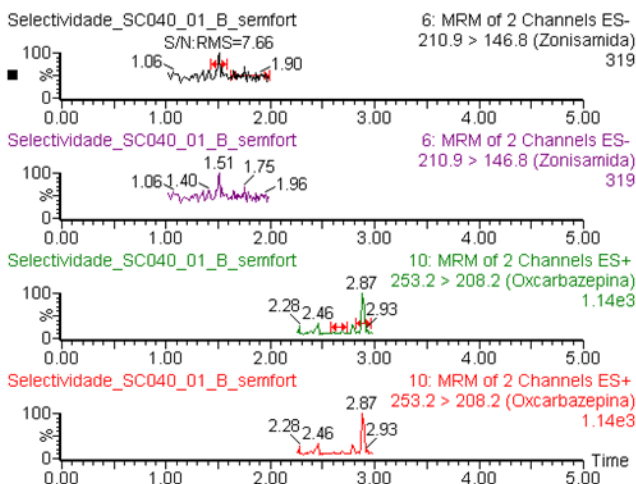


Figura 47 - Cálculo da razão s/n, para a amostra SC040-01, onde se evidencia a presença de interferentes no cromatograma da transição principal da Zonisamida (em cima). Para a Oxcarbazepina não foi considerada a presença de substâncias interferentes.

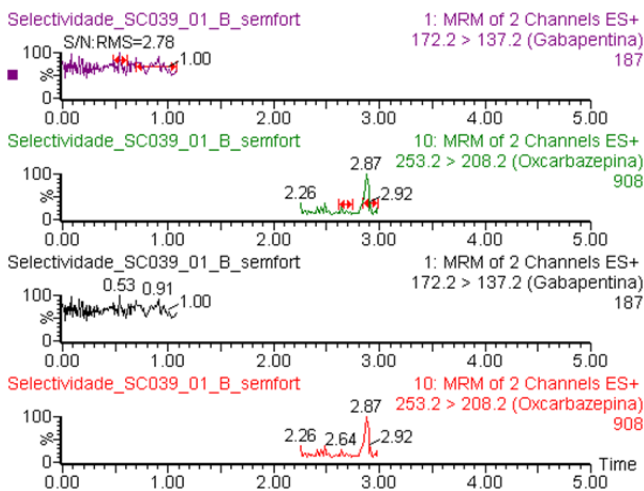


Figura 48 - Cromatogramas da Oxcarbazepina e Gabapentina, para a amostra SC039-01, onde se apresenta o cálculo da razão s/n, que evidencia a ausência de interferentes.

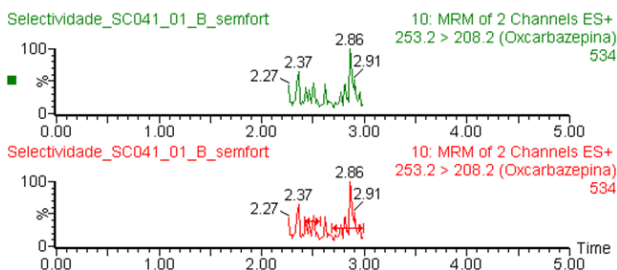


Figura 49 - Cromatogramas da Oxcarbazepina, para a amostra SC041-01. Não há sinal de presença de interferentes.

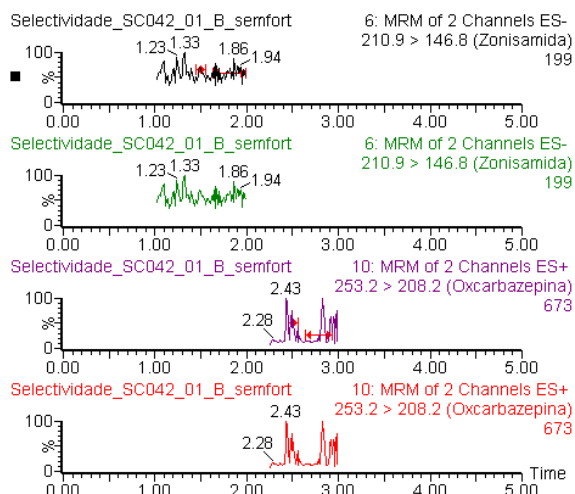


Figura 50 - Cálculo da razão s/n para a Oxcarbazepina e para a Zonisamida, para a amostra SC042-01. Também nesta amostra se demonstra a ausência de interferentes.

Contudo, após usar o critério da presença de interferentes, pelo cálculo da razão sinal/ruído, pode concluir-se que existem interferentes nas amostras não fortificadas SC007-01 (Felbamato), SC037-01 (Oxcarbazepina) e SC040-01 (Zonisamida), que podem contribuir para a não confirmação destas substâncias nas amostras fortificadas.

Com base nos dois critérios, das áreas relativas e do cálculo da razão sinal/ruído, a percentagem de falsos positivos é de 0 %. Algumas amostras não fortificadas mostraram positividade para o Topiramato, Rufinamida e Zonisamida, usando o critério da área relativa, no entanto, esses resultados foram excluídos após o cálculo da razão sinal/ruído (s/n), que deverá ser maior que 3, para se considerar a detecção de um pico cromatográfico.

Pela rápida observação dos cromatogramas é possível depreender que o sinal detectado é apenas ruído e, mesmo depois de ser determinada a razão s/n, esta é sempre inferior a 3 e, em alguns casos, o software nem consegue fazer o cálculo, devido ao valor ser muito baixo. Os cromatogramas seguintes (figuras 51, 52 e 53) demonstram que, apesar de cumprirem os critérios de áreas relativas das transições iônicas, se está na presença de uma falsa positividade, confirmada pelo cálculo da razão s/n.

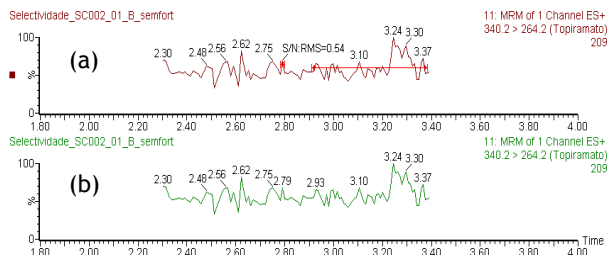


Figura 51 - Cromatogramas do Topiramato (b) e do cálculo da razão s/n (a). A razão s/n é 0,54. O Topiramato tem um tempo de retenção de 2,76 minutos.

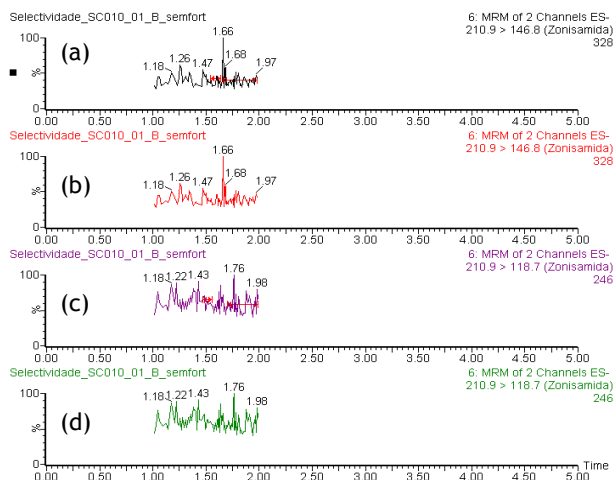


Figura 52 - Cromatogramas da Zonisamida para as duas transições e cálculo da razão s/n para ambas (a e c). O tempo de retenção da Zonisamida é 1,51 minutos.

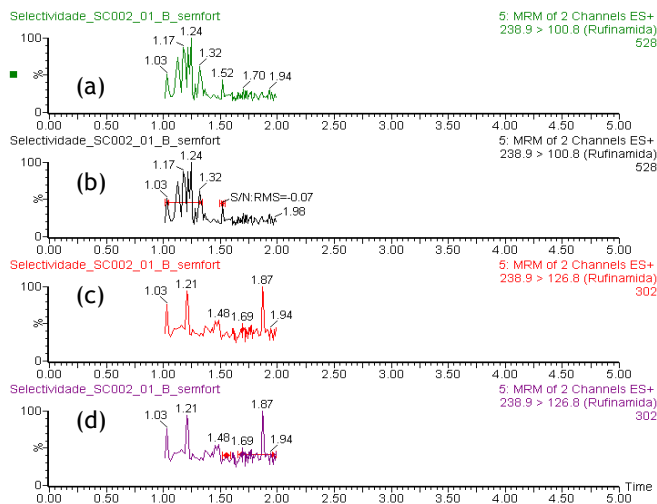


Figura 53 - Cromatogramas da Rufinamida para as duas transições e cálculo da razão s/n para ambas (b e d). O tempo de retenção da Rufinamida é 1,52 minutos.

Tabela 11 - Tabela Resumo dos resultados obtidos no estudo da especificidade/selectividade, para as amostras não fortificadas (a) e fortificadas (b).

Tabela 11a - Análise das Amostras Não Fortificadas

Código da amostra	Resultado	Observações
SC002-01	Negativo	_____
SC005-01	Negativo	_____
SC007-01	Negativo	_____
SC010-01	Negativo	_____
SC011-01	Negativo	_____
SC037-01	Negativo	_____
SC039-01	Negativo	_____
SC040-01	Negativo	_____
SC041-01	Negativo	_____
SC042-01	Negativo	_____
Percentagem de Falsos Positivos		0%

Tabela 11b - Análise das Amostras Fortificadas

Código da amostra	Resultado	Observações
SC002-01	Positivo	_____
SC005-01	Positivo	_____
SC007-01	Positivo/Negativo	Negativo para Felbamato
SC010-01	Positivo	_____
SC011-01	Positivo	_____
SC037-01	Positivo/Negativo	Negativo para Oxcarbazepina
SC039-01	Positivo	_____
SC040-01	Positivo/Negativo	Negativo para Zonisamida
SC041-01	Positivo	_____
SC042-01	Positivo	_____
Percentagem de Falsos Negativos		2,5%

4.2.4.1. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

O limite de detecção é considerado a menor quantidade do analito presente na amostra que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas para o método analítico utilizado. A sensibilidade do método é o limite de detecção do mesmo.

Para o caso de métodos cromatográficos a estimativa do limite de detecção (LD) pode ser feita tendo em conta a seguinte relação:

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

onde:

$S_{y/x}$ é o desvio residual da curva de calibração

b é o declive da recta

O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito que pode ser determinada numa amostra, com precisão e exactidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas, de acordo com a seguinte equação:

$$LQ = (10 \times S_{y/x}) / b \quad (\text{Equação 4})$$

O LQ pode também ser determinado pela relação sinal/ruído. Neste caso é determinado o ruído da linha de base e considera-se o limite de quantificação a concentração para a qual a razão sinal/ruído é de 10:1.

O cálculo do coeficiente de variação (CV) foi feito de acordo com a equação 5.

$$CV (\%) = \frac{\text{Desvio Padrão} \times 100}{\text{Concentração}_{\text{média}}} \quad (\text{Equação 5})$$

Assim, para estabelecer os limites de detecção e de quantificação das substâncias em estudo, foi preparada uma curva de calibração com 15 pontos para cada AED, distribuídos uniformemente e perto do limite de detecção esperado, por fortificação de um branco de sangue a partir de duas

misturas padrão preparadas em metanol a 0,1 µg/mL e 1 µg/mL. Na tabela 12 estão apresentadas as soluções utilizadas na fortificação das amostras.

Tabela 12 - Misturas-padrão utilizadas na fortificação das amostras de sangue no estudo do limite de detecção e quantificação.

Concentração da mistura padrão	AED's
1 µg/mL	Carbamazepina, Felbamato, Fenitoína, Fenobarbital, Gabapentina, Lamotrigina, Levetiracetam, Oxcarbazepina, Primidona, Rufinamida, Topiramato, Zonisamida.
0,1 µg/mL	Carbamazepina, Felbamato, Fenitoína, Fenobarbital, Gabapentina, Lamotrigina, Levetiracetam, Oxcarbazepina, Primidona, Rufinamida, Topiramato, Zonisamida.

As concentrações escolhidas para os pontos das diferentes curvas de calibração e os respectivos volumes utilizados das misturas-padrão encontram-se na tabela 13. O volume de sangue utilizado foi de 0,1 mL. Utilizou-se como padrão interno uma solução metanólica de Promazina a 10 µg/mL. O volume utilizado de padrão interno foi de 5 µL (concentração final nas amostras: 500 ng/mL).

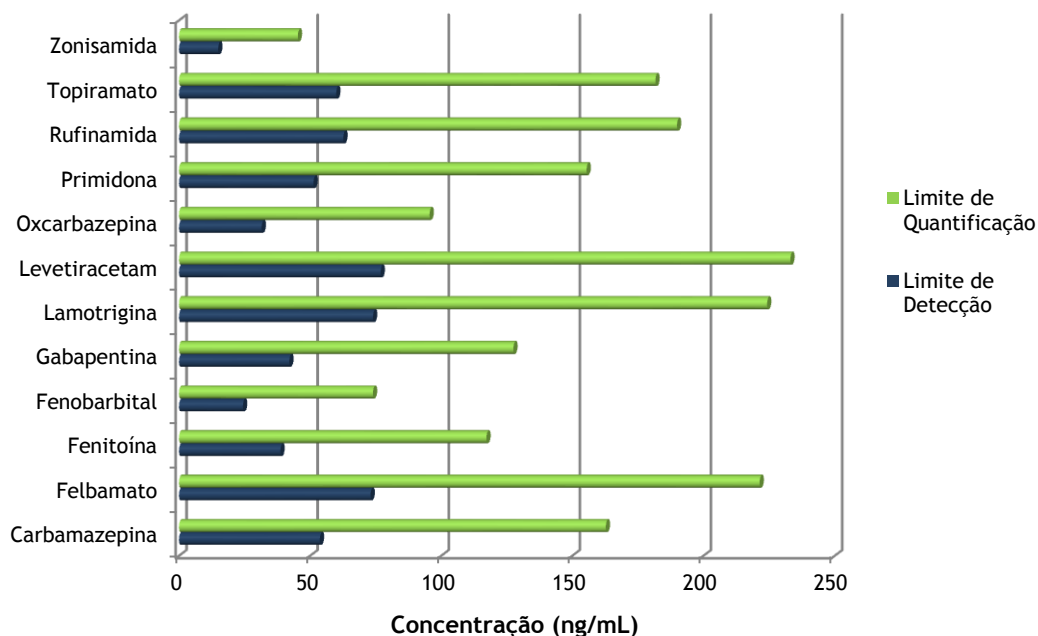
Tabela 13 - Preparação das curvas de calibração para o estudo dos LD e LQ.

Pontos da curva de calibração	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Concentração (ng/mL)	10	15	20	25	30	40	50	70	90	100	120	150	200	250	300
Volume (µL)	10	15	20	25	30	40	5	7	9	10	12	15	20	25	30
Conc. Sol. (µg/mL)	0,1						1								

Uma vez obtida a curva de calibração, os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) são calculados aplicando as equações 1 e 2, já descritas acima.

Apresenta-se de seguida, sob a forma de um gráfico de barras, o resultado do tratamento estatístico dos valores LD e LQ obtidos para os diferentes AED's.

Gráfico 1 - Resultados obtidos no estudo do parâmetro de validação dos limites de Quantificação e Detecção para os 12 AED's.



Os cálculos efectuados com o auxílio do Excel estão apresentados no **Anexo I** (Limites de Detecção e Quantificação). Os limites de quantificação e detecção mostraram-se adequados à determinação dos 12 AED's.

Pela rápida observação da tabela 14 pode verificar-se que os limites se encontram todos abaixo da dose terapêutica, o que na prática representa que cada substância poderá ser quantificada sempre que presente, dentro das suas doses terapêuticas e abaixo das mesmas, que é o objectivo da aplicação do método na rotina do STF.

Tabela 14 - Limites de Detecção, de Quantificação e dose terapêutica para cada AED. As doses terapêuticas citadas baseiam-se em informação da TIAFT ⁽²⁴⁾.

Substância	LD (ng/mL)	LQ (ng/mL)	Dose Terapêutica (ng/mL)
Carbamazepina	53,72	162,79	4000 - 12000
Felbamato	73,06	221,39	30000 - 60000
Fenitoína	38,70	117,26	8000 - 20000
Fenobarbital	24,41	73,97	2000 - 30000 (40000)
Gabapentina	42,08	127,52	2000 - 20000
Lamotrigina	74,01	224,26	2000 - 15000
Levetiracetam	76,92	233,11	6000 - 20000 (40000)
Oxcarbazepina	31,54	95,57	<i>sem informação</i>
Primidona	51,30	155,45	10000 - 20000
Rufinamida	62,68	189,95	<i>sem informação</i>
Topiramato	59,97	181,72	4000 - 10000 (20000)
Zonisamida	14,96	45,33	10000 - 40000

4.2.4.3. Eficiência da Extração

As amostras biológicas devido à sua composição complexa são submetidas a processos de extração que visam eliminar possíveis interferências e extrair os analitos em condições adequadas à análise instrumental. No entanto, todas estas etapas conduzem a perda inevitável de analitos, sendo por isso importante estimar a capacidade de recuperação destes a partir da matriz biológica. A eficiência da extração do processo analítico é a recuperação, expressa como a percentagem da quantidade conhecida de um analito, obtida da comparação dos resultados analíticos de amostras fortificadas com padrão, com os resultados analíticos de amostras não fortificadas, ambas submetidas ao processo de extração.

Os ensaios de recuperação consistem em sujeitar ao procedimento analítico global, amostras fortificadas com quantidades conhecidas do analito, sendo o processo tanto mais exacto quanto mais próximo de 100% se situar a relação entre a quantidade de analito adicionada e a quantidade de analito

recuperada. Pode, no entanto, considerar-se que recuperações acima dos 50 % são suficientes para proporcionar uma boa sensibilidade e precisão do método ⁽²⁸⁾.

Para o estudo da eficiência de extracção foram seleccionados dois níveis de concentração: baixa e alta, a 100 ng/mL e 500 ng/mL, respectivamente. Para cada uma destas gamas foram preparados dois conjuntos de amostras de sangue, um primeiro conjunto que foi fortificado antes da extracção, e um segundo que foi fortificado antes do passo de evaporação do extracto eluido na extracção SPE. As fortificações foram feitas a partir de soluções metanólicas a 1 µg/mL e a 10 µg/mL da mistura padrão dos 12 AED's em estudo. O volume de sangue utilizado foi de 0,1 mL. O padrão interno utilizado foi a Promazina, numa solução metanólica a 10 µg/mL, e foi adicionado um volume de 5 µL (concentração final nas amostras: 500 ng/mL). O padrão interno só foi adicionado a todas as amostras imediatamente antes do passo da secagem por evaporação do extracto eluido.

A eficiência da extracção foi calculada com base na aplicação da equação 6.

$$\% \text{ Recuperação do método} = \frac{Arel_{Ensaio} \times 100}{Arel_{SemExtracção}} \quad (\text{Equação 6})$$

Onde:

$Arel_{Ensaio}$ - Razão das áreas (analito/padrão interno) obtidas após a aplicação do procedimento extractivo

$Arel_{SemExtracção}$ - Razão das áreas (analito/padrão interno) obtidas sem a aplicação do procedimento extractivo

Na tabela 15 e gráfico 2 estão os resultados relativos ao estudo da eficiência de extracção.

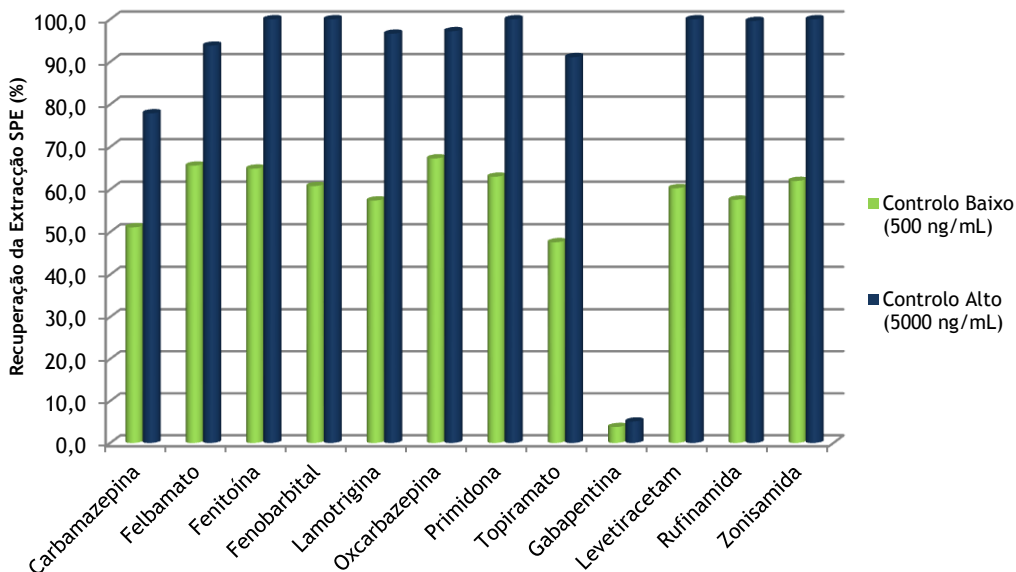
Tabela 15 - Tabela Resumo dos resultados obtidos para a recuperação (%) obtida pela extracção SPE de dois controlos, Alto a 5000 ng/mL e Baixo a 500 ng/mL.

AED's	Recuperação (%)	
	Controlo Baixo	Controlo Alto
Carbamazepina	51,1	77,9
Felbamato	65,6	93,8
Fenitoína	64,9	102,1
Fenobarbital	60,8	105,7
Lamotrigina	57,4	96,6
Oxcarbazepina	67,3	97,2
Primidona	63,0	103,2
Topiramato	47,6	91,1
Gabapentina	3,8	5,1
Levetiracetam	60,3	105,8
Rufinamida	57,6	99,6
Zonisamida	62,0	103,4

Pela observação do gráfico 2 pode ver-se que a recuperação para a Gabapentina é extremamente baixa (3 a 5 %), contudo no que respeita às restantes substâncias os valores são satisfatórios. É de notar a diferença entre os valores de recuperação para os controlos baixos *versus* os controlos altos. A perda de substância é mais notória no controlo baixo, uma vez que a quantidade de padrão adicionada é menor (5 µL) que no controlo alto (50 µL), a perda de substância vai ser mais evidente, isto é, uma perda de 10 % de padrão adicionado em 5 µL será muito mais acentuada que uma perda de 10 % em 50 µL, naturalmente.

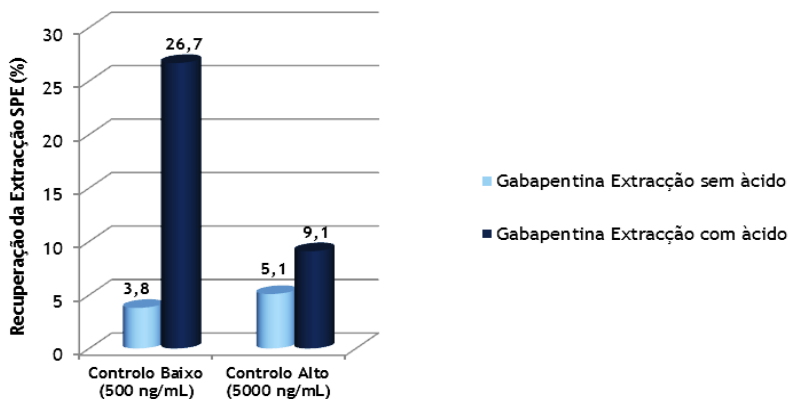
Relativamente à Gabapentina, apesar das grandes perdas verificadas, essas ínfimas quantidades foram detectadas pelo equipamento. Decidiu-se então uma extracção ácida, já usada no laboratório para determinação de outros medicamentos (Ácido Valpróico) e tendo também em conta o que está descrito na literatura⁽⁵⁷⁾.

Gráfico 2 - Resultados da Eficiência da Extração SPE.



Depois de testar a extração com adição de ácido fosfórico (20 µL, a 8,5 %, em seguida do passo de fortificação das amostras, imediatamente antes de diluir com 1mL de água ultrapura) os valores de recuperação da extração para a Gabapentina foram: 26,7 % para o controlo baixo (500 ng/mL) e 9,1 % para o controlo alto (5000 ng/mL), tal como é apresentado no gráfico 3.

Gráfico 3 - Comparação entre a recuperação da extração SPE, em percentagem, para a Gabapentina, nas duas extrações testadas, com e sem adição de ácido, a 500 ng/mL e a 5000 ng/mL.



Verificou-se um aumento significativo da recuperação. Apesar de não estar ainda de acordo com os valores calculados para as outras substâncias, há, de facto, uma melhoria significativa o que leva a concluir que talvez para a quantificação da Gabapentina esta extracção seja mais adequada. Contudo este facto necessita de um estudo mais aprofundado, que já não se encontra no âmbito deste trabalho. Após o estudo, o novo método poderá ser ajustado ao procedimento de determinação de medicamentos do laboratório, permitindo fazer um procedimento de triagem onde é apenas detectada a presença de Gabapentina, seguindo-se um procedimento de quantificação que pode ter uma extracção distinta e mais adequada que a primeira.

O Topiramato possui também uma recuperação abaixo dos 50 % (47,6 %) para o controlo baixo e, que poderá ser justificada pelo facto de 100 ng/mL ser uma concentração abaixo do seu LQ, tal como acontece para a Gabapentina.

À excepção da Gabapentina e do Topiramato no controlo baixo, todos os outros AED's cumprem o requisito de uma recuperação superior a 50 %.

4.2.4.4. Arrastamento (*carryover*):

Foi estudada a existência de fenómenos de arrastamento em conjunto com a eficiência de extracção. Juntamente com as amostras fortificadas para o estudo da eficiência da extracção foram preparadas duas amostras de brancos de sangue, que foram injectados entre as amostras correspondentes á gama alta - amostras a 5000 ng/mL - para detectar uma possível contaminação.

A análise destas amostras foi feita por observação dos cromatogramas das amostras brancas injectadas.

Os cromatogramas resultantes do estudo de arrastamento entre amostras numa mesma corrida de LC-MS/MS estão na figura 54, e pela sua observação é possível concluir que não está presente qualquer fenómeno de arrastamento entre amostras.

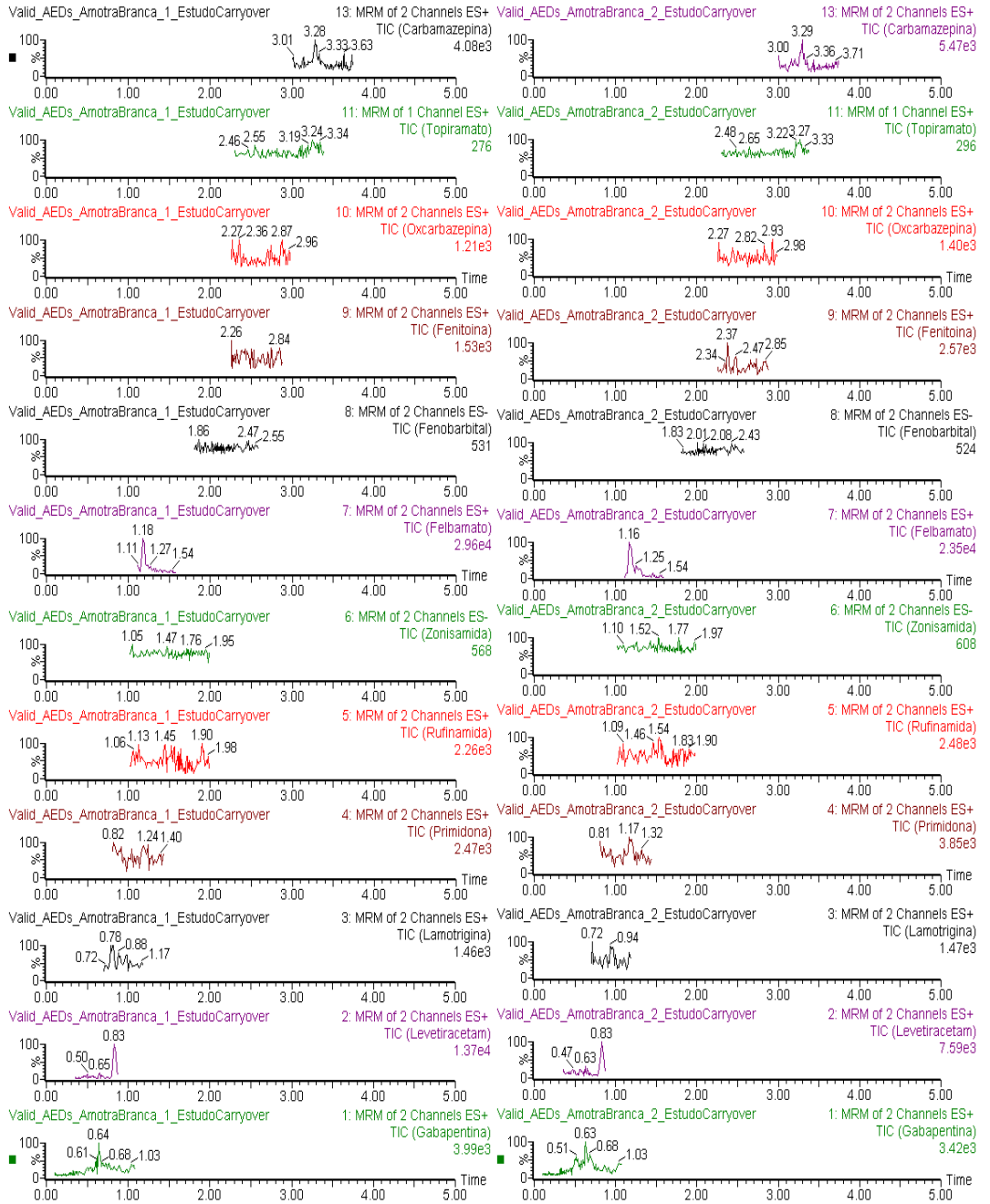


Figura 54 - Cromatogramas TIC dos 12 AED's nas Amostra Branca 1 (esquerda) e Amostra Branca 2 (direita).

4.2.4.5. Linearidade/Gama de Trabalho

A linearidade de um método corresponde à capacidade deste demonstrar que os sinais analíticos obtidos são directamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro do intervalo especificado. É recomendável que este estudo seja feito com pelo menos 5 concentrações distintas. A análise do ajuste dos dados ao modelo seleccionado foi elaborada através do coeficiente de determinação (r^2), que deverá ser próximo de 1, e do gráfico de resíduos, no qual os resíduos deverão ter uma distribuição aleatória.

Assim, para a determinação da linearidade foi preparada uma curva de calibração com 15 pontos de concentrações de 50 a 5000 ng/mL, por fortificação de alíquotas de 0,1 mL sangue branco, a partir de soluções padrão dos 12 AED's em metanol, a 1 µg/mL e 10 µg/mL.

A tabela 16 resume os volumes utilizados de cada solução padrão para a preparação dos calibradores. Foi utilizado um volume de 5 µL de Promazina (padrão interno), em solução metanólica a 10 µg/mL (concentração final nas amostras 500 ng/mL).

Tabela 16 - Curva de calibração para o estudo da Linearidade e volumes adicionados de cada mistura padrão, a 1 e a 10 µg/mL.

Pontos da curva de calibração	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Concentração (ng/mL)	50	100	200	500	700	1000	1500	2000	2500	2700	3000	3500	4000	4500	5000
Volume (µL)	5	10	20	5	7	10	15	20	25	27	30	35	40	45	50
Conc. Sol. (µg/mL)	1			10											

Depois de injectadas as amostras procedeu-se à análise das curvas de calibração. Verificou-se que havia uma relação linear e os resultados foram sujeitos a um tratamento estatístico.

Em seguida, na tabela 17, encontram-se os coeficientes de correlação obtidos no estudo da linearidade.

Tabela 17 - Coeficientes de correlação para os 12 medicamentos antiepilépticos, as equações da recta e respectivos coeficientes de correlação para a gama de linearidade obtida.

AED's	Linearidade (ng/mL)	Equação da recta	Coefficiente de correlação (r^2)
Carbamazepina	50 - 5000	$y = 0,0018x - 0,0138$	0,9925
Felbamato	50 - 5000	$y = 0,0004x - 0,0281$	0,9943
Fenitoína	50 - 5000	$y = 6E-05x - 0,0023$	0,9944
Fenobarbital	50 - 5000	$y = 1E-05x + 0,0007$	0,9949
Gabapentina	50 - 5000	$y = 2E-05x + 0,0047$	0,9930
Lamotrigina	50 - 5000	$y = 0,0002x - 0,0159$	0,9947
Levetiracetam	50 - 5000	$y = 0,0005x + 0,0208$	0,9945
Oxcarbazepina	50 - 5000	$y = 0,0005x + 0,0235$	0,9941
Primidona	50 - 5000	$y = 0,0002x - 0,0047$	0,9988
Rufinamida	50 - 5000	$y = 0,001x - 0,0495$	0,9943
Topiramato	50 - 5000	$y = 2E-05x - 0,0018$	0,9952
Zonisamida	50 - 5000	$y = 2E-05x + 0,0003$	0,9966

Os critérios de aceitação das curvas de calibração, no que diz respeito à linearidade foram: inclusão do valor zero na intersecção da curva com o eixo das ordenadas, um intervalo de confiança de 95%, um coeficiente de correlação (r^2) superior a 0,99 e a análise dos gráficos de valores residuais, considerando aberrantes os pontos cujo desvio seja superior ao dobro do erro padrão estimado no estudo da regressão para a curva de calibração. Para todos os doze AED's verificou-se linearidade de 50 a 5000 ng/mL, sempre com um coeficiente de correlação maior que 0,9925, o que cumpre os critérios de aceitação, com a excepção da Gabapentina que não inclui o valor zero na intersecção, o que pode ser justificado pela baixa intensidade dos picos registada no equipamento, que se traduz num declive da recta de calibração muito baixo, não permitindo a intersecção com o zero.

No que diz respeito à gama de trabalho, para alguns destes AED's uma concentração de 5000 ng/mL pode ainda não estar dentro da sua dose terapêutica e possivelmente será necessário que seja criada uma curva de calibração que abranja valores mais elevados, da ordem dos microgramas por mililitro. Este estudo compreendeu apenas o estudo da linearidade de 50 a 5000 ng/mL, pois abarca parte das concentrações terapêuticas destes fármacos e para evitar um grande gasto de padrões. A curva de linearidade poderá mais tarde vir a ser adaptada à rotina do laboratório, permitindo fazer um primeiro estudo de triagem com a mesma e depois proceder a uma quantificação já com uma curva mais adequada à concentração presente nas amostras.

Em anexo (7.1. Linearidade) apresentam-se, sob a forma de tabelas e gráficos, os valores obtidos para as áreas, a curva de calibração, o tratamento estatístico da regressão e os valores de linearidade obtidos para os 12 AED's, por ordem alfabética.

4.2.4.6. Repetibilidade

A avaliação da repetibilidade de um método é feita pela variação de operador, equipamentos e ao longo do tempo. Este parâmetro foi estudado em conjunto com a precisão intermédia.

A repetibilidade do método foi estudada pela da injeção de 5 replicados independentes, preparados por fortificação de amostras de sangue branco a 2 gamas de concentração (100 ng/mL e 500 ng/mL). Foi utilizada uma alíquota de 0,1 mL de sangue, tal como para os ensaios anteriores, e o padrão interno utilizado 5 µL uma solução metanólica de Promazina a 10 µg/mL (concentração final nas amostras 500 ng/mL).

Depois de aplicado o método foram obtidas as áreas e os tempos de retenção relativos (TRR) para cada AED em replicado, e calculou-se a média, desvio padrão, e o coeficiente de variação.

As tabelas 18 e 19 resumem os valores de TRR, a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação relativos às 12 substâncias em estudo. Os cálculos e os valores utilizados para efectuar esses mesmos cálculos encontram-se explicitados em Anexo (7.3. Repetibilidade).

Tabela 18 - Tabela resumo resultados controlo baixo a 100 ng/mL.

AED's	TRR	Média	Desvio Padrão	CV (%)
Carbamazepina	1,02	115,56	10,42	9,02
Felbamato	0,40	99,36	11,58	11,65
Fenitoína	0,78	100,14	4,41	4,40
Fenobarbital	0,66	98,59	11,10	11,25
Gabapentina	0,17	100,40	22,15	22,06
Lamotrigina	0,15	127,07	36,74	28,91
Levetiracetam	0,18	115,99	9,23	7,96
Oxcarbazepina	0,78	120,78	10,54	8,73
Primidona	0,33	105,19	16,14	15,34
Rufinamida	0,46	107,52	11,78	10,96
Topiramato	0,85	94,29	12,93	13,72
Zonisamida	0,46	95,02	13,97	14,70

Tabela 19 - Tabela resumo resultados controlo alto a 500 ng/mL.

AED's	TRR	Média	Desvio Padrão	CV (%)
Carbamazepina	1,02	519,14	45,81	8,82
Felbamato	0,40	440,28	28,82	6,55
Fenitoína	0,78	455,25	36,48	8,01
Fenobarbital	0,66	522,52	22,63	4,33
Gabapentina	0,17	505,59	80,35	15,89
Lamotrigina	0,28	732,47	84,59	11,55
Levetiracetam	0,18	509,95	23,19	4,55
Oxcarbazepina	0,78	537,81	27,36	5,09
Primidona	0,33	472,06	54,73	11,59
Rufinamida	0,46	528,24	19,01	3,60
Topiramato	0,85	412,15	25,98	6,30
Zonisamida	0,46	495,08	17,37	3,51

Os valores obtidos pelo estudo da repetibilidade para o coeficiente de variação, em percentagem, foram sempre inferiores a 20 %, com excepção da Gabapentina e Lamotrigina, no que diz respeito ao controlo baixo. Isto pode ser devido ao facto de 100 ng/mL se encontrar muito próximo do valor de LQ, levando a um erro maior no cálculo do coeficiente de variação (CV). O valor do controlo baixo abarca grande parte dos compostos, no que diz respeito aos limites de quantificação, verificando-se um aumento do coeficiente de variação para todas as substâncias no controlo baixo, em relação ao controlo alto.

4.2.4.7. Precisão Intermédia

A precisão intermédia pode ser definida como a harmonização entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos ao longo de 5 dias diferentes, com variação de materiais (pipetas, por exemplo) e se possível, com operadores e equipamentos diferentes. Por serem feitas em dias diferentes vai haver variações também de condições de temperatura, humidade do ar, preparação de novas fases móveis, etc.

Para a avaliação da precisão intermédia do método analítico foram contempladas as fontes de variabilidade que simulam o normal funcionamento do laboratório (tempo, reagentes, curva de calibração, temperatura e operacionalidade do equipamento). A precisão intermédia foi estudada através da preparação de curvas de calibração ao longo de 5 dias. Simultaneamente com cada curva foram preparados dois controlos (a 100 ng/mL e 500 ng/mL), em quintuplicado.

O volume de sangue utilizado foi de 0,1 mL de sangue, ao qual foi adicionado 5 µL de Promazina (padrão interno), a 10 µg/mL (concentração final de PI nas amostras 500 ng/mL).

As concentrações escolhidas para os pontos da curva de calibração, bem como os volumes de cada solução adicionados estão resumidos na tabela 20.

Tabela 20 - Curva de calibração e controlos utilizados na avaliação do parâmetro de precisão intermédia.

Pontos da curva de calibração	1	2	3	4	5
Conc AED's (ng/mL)	50	100	200	400	500
Volume (µL)	5	10	20	40	50
Conc. Solução	1 µg/mL				
Controlos	1	2	3	4	5
Controlo baixo (100 ng/mL) (µL)	100	100	100	100	100
Volume (µL)	10	10	10	10	10
Conc. Solução	1 µg/mL				
Controlo alto (500 ng/mL) (µL)	500	500	500	500	500
Volume (µL)	50	50	50	50	50
Conc. Solução	1 µg/mL				

Depois de aplicado o procedimento de ensaio, os resultados deste estudo foram tratados por aplicação da ferramenta ANOVA (factor único), através da qual podem ser extraídas estimativas de repetibilidade e da precisão intermédia, através das equações seguintes.

Fonte	Média Quadrática (MQ)	Graus de Liberdade
Entre Grupos	$MS_r = \frac{\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (x_{ij} - \bar{x}_i)^2}{p(n-1)}$	p-1
Dentro de grupos	$MS_{run} = \frac{n \sum_{i=1}^p (\bar{x}_i - \bar{x})^2}{p-1}$	p(n-1)

Total

pn-1

onde:

p é o nº de sequências de cada nível de concentração (uma sequência por dia)

n é o nº de replicados em cada sequência

x_{ij} representa um replicado individual (replicado j) obtido na sequência i

\bar{x}_i representa a média de n replicados obtidos na sequência i

\bar{x}

é a média das médias de p sequências

$$s_r = \sqrt{MS_r} \quad \text{Repetibilidade (Sr)} \quad \text{(Equação 7)}$$

$$s_{run} = \sqrt{\frac{MS_{run} - MS_r}{n}} \quad \text{Precisão entre Sequências (S_{run})} \quad \text{(Equação 8)}$$

$$s_I = \sqrt{(s_r^2) + (s_{run}^2)} \quad \text{Precisão Intermédia (S_I)} \quad \text{(Equação 9)}$$

Na execução deste parâmetro estudou-se o comportamento do desvio padrão e do coeficiente de variação ao longo da gama de trabalho.

- Se o desvio padrão for aproximadamente constante ao longo do tempo da gama de concentração, pode ser estimado o desvio padrão como o valor calculado por análise de todos os resultados obtidos ao longo da gama de trabalho. É aplicado o teste F para testar a homogeneidade das variâncias.
- Se o coeficiente de variação for aproximadamente constante ao longo da gama de trabalho, é aplicada a equação 10.

$$CV_{pool} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \times CV_1^2 + (n_2 - 1) CV_2^2 + \dots}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1) + \dots}} \quad \text{(Equação 10)}$$

- Se simultaneamente, o desvio padrão e o coeficiente de variação não forem constantes ao longo da gama de trabalho, deve ser reportado, para cada gama de trabalho o respectivo desvio padrão.

De seguida apresentam-se os resultados (tabela 21), dos cálculos referentes aos 12 AED's. Os valores de recuperação e de concentração detectada são valores médios dos 5 dias estudados.

Tabela 21 - Resultados do estudo da precisão intermédia, ao longo de 5 dias, para os 12 fármacos antiepilépticos.

AED	Concentração (ng/mL)		CV (%)	Recuperação (%)	Precisão Intermédia	Repetibilidade (S _r)	Precisão entre Sequências (S _{run})
	Adicionada	Detectada					
Carbamazepina	100	117,5	9,8	117,5	13,5	8,6	10,5
	500	510,1	6,5	102,0	44,3	35,8	26,1
Felbamato	100	103,6	4,1	103,6	9,2	8,8	2,8
	500	504,3	12,8	100,9	76,2	49,7	57,7
Fenitoina	100	109,2	18,1	109,2	22,6	13,5	18,2
	500	541,9	10,3	108,4	60,3	29,6	52,9
Fenobarbital	100	103,1	6,7	103,1	9,7	8,4	4,9
	500	529,6	6,9	105,9	43,8	29,9	32,0
Gabapentina	100	117,0	23,6	117,0	31,2	17,8	25,6
	500	511,7	11,0	102,3	76,0	62,6	43,0
Lamotrigina	100	107,9	5,5	107,9	18,7	17,0	7,8
	500	580,3	19,5	116,1	65	65,0	0,2
Levetiracetam	100	108,0	18,2	108,0	3,5	3,2	1,4
	500	528,7	23,2	105,7	129,5	36,5	124,2
Oxcarbazepina	100	110,5	6,1	110,5	11,6	11,6	0,6
	500	518,8	13,1	103,8	38,6	38,6	0,2
Primidona	100	106,1	15,7	106,1	21	15,8	13,9
	500	524,0	8,8	104,8	66,1	57,8	32,1
Rufinamida	100	106,7	10,1	106,7	12,5	7,7	9,8
	500	525,6	4,1	105,1	35,6	34,7	7,8
Topiramato	100	95,1	18,1	95,1	21,4	15,7	14,6
	500	495,7	16,6	99,1	98,6	66,7	72,5
Zonisamida	100	104,0	13,7	104,0	15,7	8,2	13,4
	500	507,5	4,3	101,5	43,5	42,1	10,9

A avaliação destes resultados tem por base o cálculo do coeficiente de variação (CV), que idealmente não deverá ser inferior a 20 %. Esse critério foi cumprido à excepção do controlo baixo da Gabapentina, o que poderá ser justificado pelo facto de a concentração ser muito baixa para a quantificação desta substância, e o controlo alto do Levetiracetam, onde se verificou que o controlo a 500 ng/mL se apresentou cronicamente elevado (acima de 500 ng/mL), ao longo dos 5 dias de precisão intermédia.

Numa análise retrospectiva, deveria ter sido escolhido um terceiro controlo, com uma concentração superior a 500 ng/mL, pois foi verificado ao longo do trabalho que o controlo a 100 ng/mL se revela, por vezes, inadequado por ser de uma concentração muito baixa para alguns AED's, como é o caso da Gabapentina.

Em Anexo (capítulo 7.4. **Precisão Intermédia**) encontram-se as tabelas resultantes dos cálculos individuais, feitos para cada substância, por ordem alfabética.

4.2.4.8. **Exactidão**

A exactidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em relação ao valor verdadeiro.

Existem várias maneiras de determinar a exactidão de um método, como por exemplo: a utilização de padrões de referência, o método de adição de padrão e comparação de métodos ou procedimentos analíticos validados. No âmbito deste trabalho foi escolhido o método de adição de padrão, de acordo com as normas estabelecidas pelo INML.

A exactidão pode ser calculada como percentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou ainda como a diferença percentual entre as medidas e o valor verdadeiro adicionado, tendo em conta os intervalos de confiança.

A exactidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, de acordo com a equação 11.

$$\text{Exactidão (\%)} = \frac{\text{Concentração média experimental} \times 100}{\text{Concentração teórica}} \quad (\text{Equação 11})$$

A grandeza principal a determinar neste estudo é a percentagem de recuperação de método (a razão entre o valor observado e o valor esperado), de forma a investigar a existência de erros sistemáticos, definir

factores de correcção e se relevante estimar a incerteza associada à recuperação do método $U_{\bar{R}}$ como dado de entrada do procedimento de cálculo de incertezas. Através dos resultados obtidos a partir da experiência de avaliação da precisão intermédia, pode-se proceder ao cálculo do $U_{\bar{R}}$ utilizando as equações apresentadas de seguida.

$$R_i = \frac{C_{Obsi}}{C_{Fori}} \quad \bar{R} = \frac{\sum_{i=1}^p R_i}{p} \quad t_{Exp} = \frac{|1 - \bar{R}|}{U_{\% \bar{R}}}$$

$$U_{\% \bar{R}} = \frac{S_{Obs}}{\sqrt{p}} \quad U_{\bar{R}} = \frac{U_{\% \bar{R}}}{\bar{R}} \quad U_{\bar{R}} = \frac{\sqrt{(U_{\% \bar{R}})^2 + \left(\frac{1 - \bar{R}}{K}\right)^2}}{\bar{R}}$$

Onde,

- S_{obs} é o desvio padrão de p valores de R_i obtidos em condições de precisão intermédia;
- R_i é a recuperação média de n replicados obtidos em condições de repetibilidade;
- t_{crit} é o valor crítico bi-caudal para p-1 graus de liberdade num intervalo de confiança de 95 %.

Para cada nível foi aplicado um teste estatístico de forma a averiguar se a recuperação média é significativamente diferente de 100 %:

- Se $t_{exp} < t_{crit}$, então \bar{R} não é significativamente diferente de 100 % e $U_{\bar{R}}$ é calculado com base na primeira equação

Assim, na tabela 22 e gráfico 4, apresentam-se os resultados da exactidão do método.

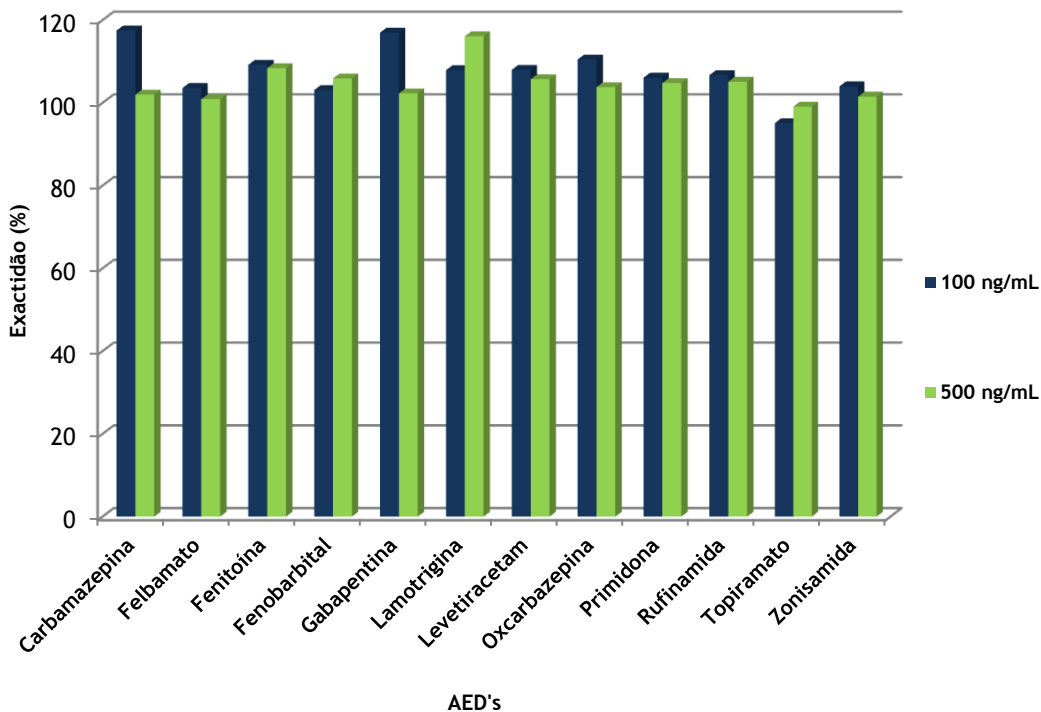
A exactidão do método nunca se mostrou-se significativamente diferente de 100 % para a maior parte dos AED's, o que está de acordo com os critérios de aceitação previamente estabelecidos. Foram excepção a este critério, o controlo baixo da Carbamazepina, o controlo baixo da Lamotrigina, e o controlo baixo da Oxcarbazepina, no entanto apresentam valores exactidão inferiores a 120 %, que é um valor aceitável tendo em conta os valores de coeficiente de variação adoptados internacionalmente (menor que 20 %).

As tabelas relativas aos restantes cálculos associados ao parâmetro de exactidão encontram-se em Anexo (capítulo 7.5. Exactidão).

Tabela 22 - Exactidão do método, expressa de acordo com a equação 12.

AED	Exactidão (%)	
	100 ng/mL	500 ng/mL
Carbamazepina	117,5	102
Felbamato	103,6	100,9
Fenitoína	109,2	108,4
Fenobarbital	103,1	105,9
Gabapentina	117,0	102,3
Lamotrigina	107,9	116,1
Levetiracetam	108,0	105,7
Oxcarbazepina	110,5	103,8
Primidona	106,1	104,8
Rufinamida	106,7	105,1
Topiramato	95,1	99,1
Zonisamida	104,0	101,5

Gráfico 4 - Representação gráfica dos resultados obtidos para a exactidão do método, para as duas concentrações testadas, 100 e 500 ng/mL.



4.2.4.9. Robustez

A robustez de uma metodologia analítica pretende avaliar a capacidade do mesmo em resistir a pequenas e deliberadas variações de parâmetros analíticos. Dependendo da análise alguns parâmetros podem resultar em variações na resposta de um método.

Durante todo o procedimento de validação foram introduzidas naturalmente pequenas variações no decurso do normal funcionamento do laboratório que permitiram avaliar a robustez do método analítico. Nomeadamente pequenas alterações de pH, da temperatura ambiente, a composição fase móvel, o lote dos reagentes utilizados, desgaste da coluna cromatográfica, manutenção do equipamento, diferentes operadores, entre outros.

Não foram verificadas variações significativas nas determinações feitas durante a validação do método que ponham em causa a sua robustez.

5. CONCLUSÕES

A detecção, identificação e quantificação de medicamentos antiepilépticos são aspectos fundamentais, tanto do ponto de vista forense como clínico. É por isso importante que se consiga dar resposta aos casos que chegam ao INML, vindos do serviço de patologia, clinica médico-legal ou de qualquer hospital, quer em casos *post-mortem*, quer no âmbito de monitorização da dose ingerida, respectivamente. A inclusão de vários AED's no mesmo método justifica-se, pois o tratamento da epilepsia compreende, na grande maioria dos casos, a toma de vários AED's e não apenas de um - terapia combinada.

Assim, considera-se que o propósito deste trabalho foi cumprido, no sentido de criar um método por UPLC-MS/MS que permitisse uma maior abrangência no que diz respeito à quantidade de substâncias detectadas, tendo em conta as disponíveis no mercado. No decorrer do desenvolvimento da metodologia analítica foram optimizados alguns parâmetros e condições experimentais tais como, as condições de ionização e fragmentação, o fluxo e a composição da fase móvel, o tipo de coluna cromatográfica, a metodologia SPE e o padrão interno.

Com a finalidade de comprovar a obtenção de resultados tecnicamente válidos e comparáveis, a metodologia desenvolvida foi validada através da avaliação de vários parâmetros analíticos, foram eles a especificidade/selectividade, a capacidade de identificação, os limites de detecção e de quantificação, a eficiência de extracção o arrastamento, a linearidade a repetibilidade, a exactidão, a precisão intermédia e a robustez.

A detecção por espectrometria de massa sequencial por triplo quadrupolo, ionização à pressão atmosférica do tipo electrospray assistida por nebulização no modo positivo e negativo, bem como a utilização da monitorização de reacções múltiplas (MRM) para aquisição de dados, revelou ser adequada em termos de sensibilidade e especificidade, garantindo, também, uma boa avaliação quantitativa dos analitos. Igualmente, as condições cromatográficas em fase líquida utilizadas demonstraram uma boa

separação dos AED's e do padrão interno, com picos cromatográficos simétricos, que garantem uma boa quantificação das amostras.

O método cromatográfico desenvolvido é rápido, permitindo a determinação dos doze AED's num intervalo de tempo inferior a 5 minutos.

Da comparação directa com os outros métodos já descritos para a determinação simultânea de vários AED's ^{(9) (11) (12) (31) (58) (59)}, o método exposto é o que inclui mais fármacos antiepilépticos por aplicação de um mesmo método LC-MS/MS.

Esta metodologia analítica poderá ser estendida à determinação de outras amostras, nomeadamente urina, plasma, humor vítreo ou órgãos potencialmente afectados, como fígado e rins, desde que verificado se o limite de detecção é apropriado, que se mostre selectivo e desde que articulado com um processo extractivo eficiente.

Atendendo aos resultados obtidos nos ensaios de validação, a metodologia analítica desenvolvida está apta a ser aplicada à análise das amostras biológicas que chegarem ao STF com informação da presença de AED's.

No futuro, com vista à evolução deste trabalho, seria pertinente dar continuidade ao estudo da Gabapentina, permitindo a criação de um método mais adequado, sobretudo no que diz respeito à extracção SPE, que poderá ser ainda optimizada e personalizada para este composto. A Gabapentina é um dos fármacos antiepilépticos mais prescritos em Portugal ⁽⁶⁰⁾, seguida do Topiramato e da Lamotrigina, e a sua importância deve ser valorizada por causa disso. Só no ano de 2009 foram vendidas em Portugal 192907 embalagens de Gabapentina ⁽⁶⁰⁾.

De acordo com os resultados obtidos parece possível a introdução e validação de outros AED's, adquiridos pelo STF, que tornariam este método numa mais-valia para o Serviço de Toxicologia Forense, o que foi também o intuito do trabalho experimental apresentado. Fica também em aberto a possibilidade de se adicionar ao método os metabolitos das substâncias

estudadas, que permitiria uma melhor interpretação dos resultados toxicológicos.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Sue Jickells, Adam Negrusz. *Clark's Analytical Forensic Toxicology*. Cambridge : Pharmaceutical Press, 2008.
2. Raul Sousa, João Almeida, Maria Leal. *Intoxicações*. Porto : s.n., 1986. Prémio BIAL de Medicina Clínica 1984, 2º Classificado.
3. Serafim Guimarães, Daniel Moura, Patrício Silva. *Terapêutica medicamentosa e suas bases Farmacológicas - Manual de Farmacologia e Farmacoterapia*. 5ª edição. s.l. : Porto Editora, 2006. pp. 175-189. Capítulo 16: Antiepilépticos.
4. Matthias C. Lu. *Apontamentos da cadeira de Pharmacy 402*. [Online] Universidade do Illinois, Chicago. <http://www.uic.edu/classes/phar/phar402/Antiepileptic%20Drug%20Metabolism7.htm>.
5. Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde. Infarmed - Prontuário terapêutico online. *infarmed*. [Online] Ministério da Saúde. <http://www.infarmed.pt/prontuario/index.php>.
6. Martin J. Brodie. Antiepileptic drug therapy the story so far. *Seizure*. 2010, Vol. 19, pp. 650-655.
7. Brian S. Rogawski. *Journal of American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. Janeiro de 2007, Vol. 4, pp. 16-61.
8. Anthony S. Fauci, Eugene Braunwald, Dennis L. Kasper, Stephen L. Hauser, Dan L. Longo, J. Larry Jameson, Joseph Loscalzo. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. s.l. : McGraw-Hill Medical , 2008.
9. Terumitsu Yoshida, Koichi Imai, Sumiko Motohashi, Shin-ichiro Hamano, Masato Sato. Simultaneous determination of zonisamide, carbamazepine and carbamazepine-10,11-epoxide in infant serum by high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006, Vol. 41, pp. 1386-1390.
10. Gholamreza Bahrami, Shahla Mirzaeei, Bahareh Mohammadi, Amir Kiani. High performance liquid chromatographic determination of topiramate in human serum using UV detection. *Journal of Chromatography B*. 2005, Vol. 822, pp. 322-325.
11. Murali Subramanian, Angela Birnbaum, Rory Rimmel. High Speed simultaneous determination of nine antiepileptic drugs using liquid chromatography-mass spectrometry. *Therapeutic Drug Monitoring*. 2008, Vol. 30, pp. 347-356.
12. Hélène Breton, Marylène Cociglio, Françoise Bressolle, Hélène Peyriere, Jean Pierre Blayac , Dominique Hillaire-Buys. Liquid chromatography-electrospray mass spectrometry determination of carbamazepine, oxcarbazepine and eight of their metabolites in human plasma. *Journal of Chromatography B*. 2005, Vol. 828, pp. 80-90.
13. Yongxin Zhu, Hwa Chiang, M.Wulster-Radcliffe, Rita Hilt, Philip Wong, Candice B. Kissinger, Peter T. Kissinger. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the determination of carbamazepine and its main metabolite in rat plasma utilizing an automated blood sampling system. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2005, Vol. 38, pp. 119-125.

14. **Ryan J. Hansen, Bradley J. Samber, Daniel L. Gustafson.** Rapid and sensitive LC-MS/MS method for determination of felbamate in mouse plasma and tissues and human plasma. *Journal of Chromatography B.* 2010, Vol. 878, pp. 3432-3436.
15. **Demian R. Ifa, Marcio Falci, Maria E. Moraes, Fernando A. F. Bezerra, Manoel O. Moraes and Gilberto de Nucci.** Gabapentin quantification in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. Application to bioequivalence study. *Journal of Mass Spectrometry.* 2001, Vol. 36, pp. 188-194.
16. **Kanju Saka, Koichi Uemura, KAori Shianti-Ishida, Ken-ichi Yoshida.** Determination of amobarbital and phenobarbital in serum by gas chromatography - mass spectrometry with addition of formic acid to the solvent. *Journal of Chromatography B.* 2008, Vol. 869, pp. 9-15.
17. **Cristiana Gambelunghe, Giuseppina Mariucci, Micheala Tantucci, Maria Vittoria Ambrosini.** Gas Chromatography - Tandem Mass Spectrometry Analysis of Gabapentin in Serum. *Biomedical Chromatography.* 2005, Vol. 19, pp. 63-67.
18. **Michael A. Rogawski, Wolfgang Loscher.** The Neurobiology of Antiepileptic Drugs. *Nature Reviews - Neuroscience.* 2004, Vol. 5, pp. 553-564.
19. **Suzette M. LaRoche, Sandra L. Helmers.** The New Antiepileptic Drugs - Scientific Review. *Journal of the American Medical Association.* 2004, Vol. 291, pp. 605-614.
20. **Matthew D. Krasowski.** Therapeutic Drug Monitoring of the Newer Anti-Epilepsy. *Pharmaceuticals (Basel).* 2010, Vol. 3, pp. 1909-1935.
21. **K. C. Carlsson, J. L. E. Reubsaet.** Sample preparation and determination of gabapentin in venous and capillary blood using liquid chromatography- tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2004, Vol. 34, pp. 415-423.
22. **V. K. F. Kon, M. G. Irwin.** Gabapentin: a multimodal perioperative drug? *British Journal of Anaesthesia .* 6, 2007, Vol. 99, pp. 775-786.
23. **Ilo E. Leppik.** Zonisamide: chemistry, mechanism of action, and pharmacokinetics. *Seizure .* 2004, Vol. 13, pp. S5-9.
24. **TIAFT.** [Online] <http://www.tiaft.org/>.
25. **INML.** Aulas de Toxicologia Forense do Curso Superior de Medicina Legal. Coimbra : s.n., 2009. Toxicologia Forense.
26. **WATERS.** Waters . [Online] Waters. www.waters.com.
27. **Michael E. Swartz.** Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC): An Introduction. *Separation Science Redefined.* 2005, pp. 8-14.
28. **Aldo Plettni.** *Applications of LCMS in Toxicology.* s.l. : Pharmaceutical Press, 2006.
29. **SOFT/AAFS.** Forensic Toxicology Laboratory Guidelines. [Online] 2006. http://www.soft-tox.org/files/Guidelines_2006_Final.pdf.
30. **Tiedong Guo et al.** Determination of levetiracetam in human plasma/serum/saliva by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta.* 2007, Vol. 375, pp. 115-118.

31. **H. Levert et al.** Simultaneous determination of four antiepileptic drugs in serum by high-performance liquid chromatography. *Biomedical Chromatography*. 2002, Vol. 16, pp. 19-24.
32. **Chadi Abbara et al.** High-performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) method for the simultaneous determination of diazepam, atropine and pralidoxine in human plasma. *Journal of Chromatography B*. 2008, Vol. 874, pp. 42-50.
33. **H. Levert et al.** LC determination of oxcarbazepine and its active metabolite in human serum. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2002, Vol. 28, pp. 517-523.
34. **Wille et al.** Validation and application of an LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of 13 pharmaceuticals in seawater. *Anal Bioanal Chem*. 2010, Vol. 397, pp. 1797-1808.
35. **Mohammed E. Abdel-Hamid et al.** LC-MS/MS Determination of Carbamazepine, Pindolol, and Theophylline in Human Serum. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. 2003, Vol. 26, pp. 1937-1957.
36. **Lambert K. Sorensen.** Determination of acidic and neutral therapeutic drugs in human blood by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Forensic Science International*. 2011, Vol. 206, pp. 119-126.
37. **Mike S. Lee et al.** Rapid identification of drug metabolites with tandem mass spectrometry. *Biological Mass Spectrometry*. 1988, Vol. 15, pp. 193-204.
38. **S.M.N. ROY et al.** Determination and Quantification of Phenytoin in Human Plasma by Liquid Chromatography with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *E-Journal of Chemistry*. Janeiro de 2008, Vol. 5, pp. 169-176.
39. **Yi Zhang et al.** A tandem mass spectrometry assay for the simultaneous determination of acetaminophen, caffeine, phenytoin, ranitidine, and theophylline in small volume pediatric plasma specimens. *Clinica Chimica Acta*. 2008, Vol. 398, pp. 105-112.
40. **Robert J. Perchalski et al.** Structural Elucidation of Drug Metabolites by Triple-Quadrupole Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*. 1982, Vol. 54, pp. 1466-1471.
41. **N.V.S. Ramakrishna et al.** Rapid quantification of gabapentin in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006, Vol. 40, pp. 360-368.
42. **Kamal M. Matar, M. E. Abdel-Hamid.** Rapid Tandem Mass Spectrometric Method for Determination of Gabapentin in Human Plasma. *Chromatographia*. 2005, Vol. 61, pp. 499-504.
43. **Dan J. Carrier et al.** In-source fragmentation of an isobaric impurity of lamotrigine for its measurement by liquid chromatography tandem mass spectrometry after pre-concentration using solid phase extraction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2008, Vol. 47, pp. 731-737.
44. **Kamal M. Matar.** Quantification of Levetiracetam in human plasma by liquid Chromatography - tandem mass spectrometry: Application to therapeutic drug monitoring. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2008, Vol. 48, pp. 822-828.

45. **Deepak S. Jain, Gunta Subbala, Mallika Sanyal, Usha Pal, Pranav S. Shrivastav.** Determination of Levetiracetam in human plasma by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry and its application to bioequivalence studies. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2006, Vol. 20, pp. 2539-2547.
46. **Damodara Rao Mendu et al.** Simultaneous determination of Levetiracetam and its acid metabolite (ucb L057) in serum/plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Clinical Biochemistry*. 2010, Vol. 43, pp. 485-489.
47. **Mitesh Bhatt et al.** Rapid ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantification of oxcarbazepine and its metabolite in human plasma. *Biomedical Chromatography*. 2010. DOI 10.1002/bmc.1510.
48. **Gedela Srinubabu et al.** Development and Validation of LC-MS/MS Method for the Quantification of Oxcarbazepine in Human Plasma Using an Experimental Design. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 2008, Vol. 56, pp. 28–33.
49. **Hans H. Maurer et al.** Validated assay for quantification of oxcarbazepine and its active dihydro metabolite 10-hydroxycarbazepine in plasma by atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal Mass Spectrometry*. 2002, Vol. 37, pp. 687-692.
50. **Maria Bernadete de Sousa Maia et al.** Simultaneous quantitative analysis of oxcarbazepine and 10,11-dihydro-10-hydroxycarbazepine in human plasma by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2007, Vol. 45, pp. 304-311.
51. **Daniela Hummel et al.** Simultaneous Determination of Psychoactive Drugs and Their Metabolites in Aqueous Matrices by Liquid Chromatography Mass Spectrometry. *Environmental Science & Technology*. 2006, Vol. 40, pp. 7321-7328.
52. **Ulrike Hass et al.** Simultaneous determination of psychoactive substances and their metabolites in aqueous matrices by ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Methods*. 2011, Vol. 3, p. 902.
53. **Giancarlo la Marca et al.** Rapid assay of rufinamide in dried blood spots by a new liquid chromatography-tandem mass spectrometric method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2011, Vol. 54, pp. 192-197.
54. **Giancarlo la Marca et al.** Rapid assay of topiramate in dried blood spots by a new liquid chromatography-tandem mass spectrometric method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2008, Vol. 48, pp. 1392-1396.
55. **David J. Berry, Gareth W. Hammond, Lisa J. Calton, Donald P. Cooper.** Therapeutic Drug Management (TDM) of Antiepileptic Drugs - Multidrug Analysis using UPLC-MS/MS. *Waters*. [Online] 2007. <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720002302en.pdf>.
56. **Frank T. Peters, Olaf H. Drummer, Frank Musshoff.** Validation of new methods. *Forensic Science International*. 2007, Vol. 165, pp. 216-224.
57. **Z. Zhu, L. Neirinck.** High-performance liquid chromatographic method for the determination of gabapentin in human plasma. *Journal of Chromatography B*. 2002, Vol. 779, pp. 307-312.

58. **G. Paglia, O. D'Apollito, D. Garofalo, C. Scarano, G. Corso.** Development and validation of a LC/MS/MS method for simultaneous quantification of oxcarbazepine and its metabolites in human serum. *Journal of Chromatography B.* 2007, Vol. 860, pp. 153-159.
59. **Vincent Ferranti, Christine Chabenat, Sabine Ménager, Olivier Lafont.** Simultaneous determination of primidone and its three major metabolites in rat urine by high performance liquid Chromatography using solid phase extraction. *Journal of Chromatography B.* 1998, Vol. 718, pp. 199-204.
60. **INFARMED.** Estatística do Medicamento. [Online] 2009. http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/PUBLICACOES/TEMATICOS/ESTATISTICA_MEDICAMENTO/EstMed-2009.pdf.
61. **Manuela Contin, Susan Mohamed, Carmina Candela, Fiorenzo Albani, Roberto Riva, Agostino Baruzzi.** Simultaneous HPLC-UV analysis of rufinamide, zonisamide, lamotrigine, oxcarbazepine monohydroxy derivative and felbamate in deproteinized plasma of patients with epilepsy. *Journal of Chromatography B.* 2010, Vol. 878.
62. **JehudaYinon.** *Advances in Forensic Applications of Mass Spectrometry.* s.l. : CRC Press, 2004.
63. **Amitava Dasgupta.** *Advance in Chromatographic Techniques for Therapeutic Drug Monitoring.* s.l. : CRC Press, 2010.
64. **Ghulam A Shabir.** Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis - Understanding the differences and similarities between validation requirements of US FDA, the US Pharmacopeia and the International Conference Harmonization. *Journal of Chromatography A.* 2003, Vol. 987, pp. 57-66.
65. **Svein I. Johannessen, Dina Battino, David J. Berry, Meir Bialer, Gunter Kramer, Torbjorn Tomson, Philip N. Patsalos.** Therapeutic Drug Monitoring of Newer Antiepileptic Drugs. *Therapeutic Drug Monitoring.* 2003, Vol. 25, pp. 347-363.
66. **A. L. Jones, A. T. Proudfoot.** Features and management of poisoning with modern drugs used to treat epilepsy. *Quarterly Journal of Medicine.* 1998, Vol. 91, pp. 325-332. Review.
67. **Simon Shorvon.** Oxcarbazepine: a review. *Seizure.* 2000, Vol. 9, pp. 75-79.
68. **Vinod P. Shah et al.** Bioanalytical Method Validation - A Revisit with a Decade of Progress. *Pharmaceutical Research.* 2000, Vol. 17, pp. 1551-1557.
69. **Frank Musshoff, Ulrike M. Stamer, Burkhard Madea.** Pharmacogenetics and Forensic Toxicology. *Forensic Science International.* 2010, Vol. 203, pp. 53-62.
70. **Maren I. Blonk, Bart C. van der Nagel, Liesbeth S. Smith, Ron A. A. Mathot.** Quantification of Levetiracetam in plasma of neonates by ultra performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B.* 2010, Vol. 878, pp. 675-681.
71. **Jerome F. X. Naradzy, Jonathan S. Olshaker.** Antiepileptic drug therapy: Clinical laboratory significance. *The Journal of Emergency Medicine.* 1996, Vol. 14, pp. 473-481.

72. **Maria Filomena Gomes Ferreira Crujo Camões.** Quantificação da Incerteza nas Medições Analíticas. [Online] 2001. Tradução e Adaptação da 2ª edição. http://www.eurachem.fc.ul.pt/Guia_Eurachem_P.pdf.
73. **Yongxin Zhu et al.** Liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the determination of carbamazepine and its main metabolite in rat plasma utilizing an automated blood sampling system . *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2005, Vol. 38, pp. 119-12.
74. **Charles L. P. Deckers et al.** Selection of Antiepileptic Drug Polytherapy based on Mechanism of Action: The Evidence Reviewed. *Epilepsia*. 2000, Vol. 41, pp. 1364-1374.

7. ANEXOS - RESULTADOS DO PROCEDIMENTO DE VALIDAÇÃO

7.1. Linearidade

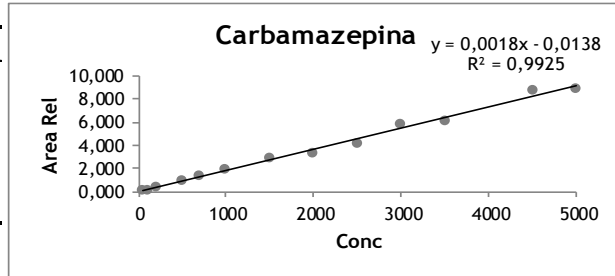
Estudo Linearidade da Carbamazepina

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel
50	13120	135182	0,097
100	26300	146760	0,179
200	45909	130828	0,351
500	96004	101829	0,942
700	131202	95084	1,380
1000	231344	122181	1,893
1500	300573	105502	2,849
2000	378335	116073	3,259
2500	478295	116740	4,097
2700	543867	138246	3,934
3000	556262	96918	5,740
3500	638278	103941	6,141
4000	733415	115524	6,349
4500	734776	84114	8,735
5000	686772	77525	8,859

Conc. (ng/mL)	Arel
50	0,097
100	0,179
200	0,351
500	0,942
700	1,380
1000	1,893
1500	2,849
2000	3,259
2500	4,097
3000	5,740
3500	6,141
4500	8,735
5000	8,859

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,995788959
Quadrado de R	0,991595651
Quadrado de R ajust	0,990755216
Erro-padrão	0,294257386
Observações	12



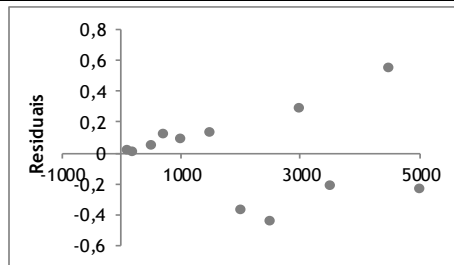
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	102,1610361	102,1610361	1179,86	1,03549E-11
Residual	10	0,86587409	0,086587409		
Total	11	103,0269102			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	-0,018125597	0,137644127	-0,131684494	0,897846	-0,324815825	0,28856463
50	0,001822153	5,30481E-05	34,34909287	1,04E-11	0,001703954	0,001840351

RESULTADO RESIDUAL

Observação	/isto 0,0970545329768:	Residuais
1	0,164089676	0,01511501
2	0,34630495	0,004609325
3	0,89295077	0,048925544
4	1,257381317	0,122468818
5	1,804027138	0,089429404
6	2,715103506	0,13387722
7	3,626179873	-0,366717199
8	4,537256241	-0,440177132
9	5,448332609	0,29172325
10	6,359408976	-0,21862649
11	8,181561712	0,553864898
12	9,092638079	-0,23394724



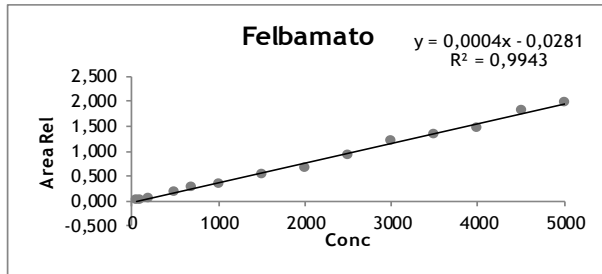
Estudo Linearidade do Felbamato

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel
50	1483	135182	0,011
100	3581	146760	0,024
200	7749	130828	0,059
500	19245	101929	0,189
700	27726	95084	0,292
1000	44114	122181	0,361
1500	57500	105502	0,545
2000	75823	116073	0,653
2500	109038	116740	0,934
2700	118405	138246	0,856
3000	118118	96918	1,219
3500	140252	103941	1,349
4000	170000	115524	1,472
4500	154313	84114	1,835
5000	153848	77525	1,984

Conc. (ng/mL)	Arel
50	0,011
100	0,024
200	0,059
500	0,189
700	0,292
1000	0,361
1500	0,545
2000	0,653
2500	0,934
3000	1,219
3500	1,349
4000	1,472
4500	1,835
5000	1,984

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,996880015
Quadrado de R	0,993769764
Quadrado de R ajust	0,993203379
Erro-padrão	0,055612365
Observações	13



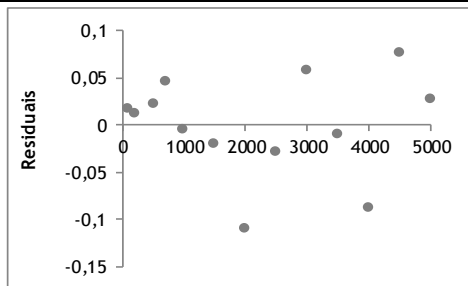
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	5,426460897	5,426460897	1754,583	1,74707E-13
Residual	11	0,034020087	0,003092735		
Total	12	5,460480984			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	-0,032179938	0,025906542	-1,242154915	0,24001	-0,089199852	0,024839976
50	0,000397697	9,49436E-06	41,8877442	1,75E-13	0,000376801	0,000418594

RESULTADO RESIDUAL

Observação	visto 0,0109728955670:	Residuais
1	0,007589811	0,016810752
2	0,047359559	0,011867976
3	0,166668806	0,022141056
4	0,246208304	0,045381536
5	0,36551755	-0,004463622
6	0,564366295	-0,019357179
7	0,763215039	-0,109982058
8	0,962063783	-0,028040711
9	1,160912527	0,057829404
10	1,359761272	-0,010411813
11	1,558610016	-0,087054587
12	1,75745876	0,077103482
13	1,956307504	0,028175764



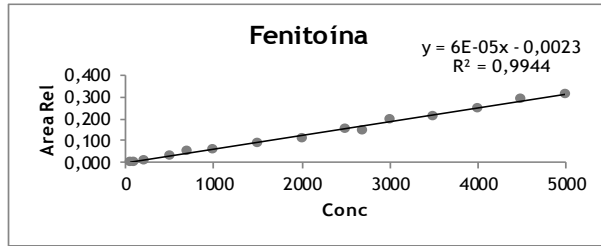
Estudo Linearidade da Fenitoína

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel
50	345	135132	0,003
100	783	146760	0,005
200	1058	130828	0,008
500	3400	101929	0,033
700	4749	95084	0,050
1000	7634	122131	0,062
1500	9467	105502	0,090
2000	12451	116073	0,107
2500	17749	116740	0,152
2700	20512	138246	0,148
3000	13763	96913	0,194
3500	21978	103941	0,211
4000	28526	115524	0,247
4500	24232	84114	0,288
5000	24048	77525	0,310

Conc. (ng/mL)	Arel
50	0,003
100	0,005
200	0,008
500	0,033
700	0,050
1000	0,062
1500	0,090
2000	0,107
2500	0,152
2700	0,148
3000	0,194
3500	0,211
4000	0,247
4500	0,288
5000	0,310

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,996866263
Quadrado de R	0,993742347
Quadrado de R ajust	0,993220876
Erro-padrão	0,008388749
Observações	14



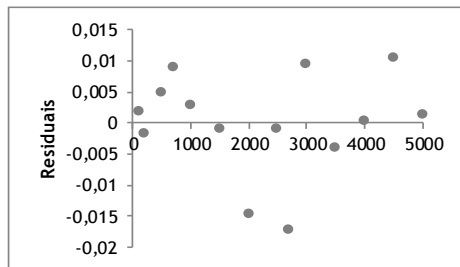
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	0,134102835	0,134102835	1905,652	1,35815E-14
Residual	12	0,000844453	7,03711E-05		
Total	13	0,134947288			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	-0,002639807	0,003891363	-0,678375755	0,510404	-0,011118359	0,005838746
50	6,23023E-05	1,42719E-06	43,65377172	1,36E-14	5,91927E-05	6,54119E-05

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Residuais
1	0,003590421
2	0,009820649
3	0,028511333
4	0,040971789
5	0,059662472
6	0,090813612
7	0,121964751
8	0,15315891
9	0,165576346
10	0,18426703
11	0,215413169
12	0,246569309
13	0,277720448
14	0,308871588

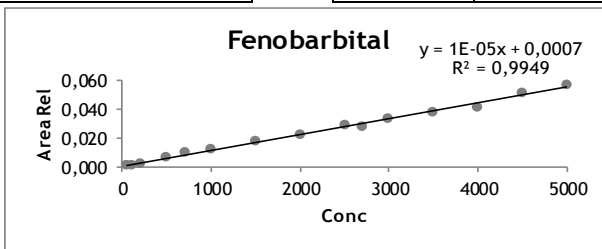


Estudo Linearidade da Fenobarbital

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel	Conc. (ng/mL)	Arel
50	120	135182	0,001	50	0,001
100	197	146760	0,001	100	0,001
200	342	130828	0,003	200	0,003
500	668	101929	0,007	500	0,007
700	895	95084	0,009	700	0,009
1000	1457	122181	0,012	1000	0,012
1500	1893	105502	0,018	1500	0,018
2000	2585	116073	0,022	2000	0,022
2500	3325	116740	0,028	2500	0,028
2700	3767	138246	0,027	2700	0,027
3000	3215	96918	0,033	3000	0,033
3500	3956	103941	0,038	3500	0,038
4000	4774	115524	0,041	4000	0,041
4500	4314	84114	0,051	4500	0,051
5000	4347	77525	0,056	5000	0,056

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

<i>Estadística de regressão</i>	
R múltiplo	0,997151748
Quadrado de R	0,994311609
Quadrado de R ajust	0,993837576
Erro-padrão	0,001385474
Observações	14



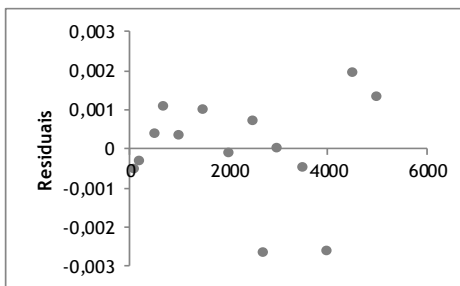
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	0,004026345	0,004026345	2097,56	7,66144E-15
Residual	12	2,30345E-05	1,91954E-06		
Total	13	0,004049379			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	0,000777	0,000642692	1,208976859	0,249954	-0,000623306	0,002177305
50	1,07954E-05	2,35713E-07	45,7991216	7,66E-15	1,02819E-05	1,1309E-05

RESULTADO RESIDUAL

Observação	isto 0,00088929677328	Residuais
1	0,001856544	-0,000515873
2	0,002936088	-0,000324893
3	0,006174721	0,000377489
4	0,008333809	0,001074195
5	0,011572442	0,000353338
6	0,016970163	0,000976282
7	0,022367884	-0,000100139
8	0,027765605	0,000718316
9	0,029924694	-0,002676174
10	0,033163326	7,24785E-06
11	0,038561047	-0,000499104
12	0,043958768	-0,002629974
13	0,04935649	0,0019263
14	0,054754211	0,00131299



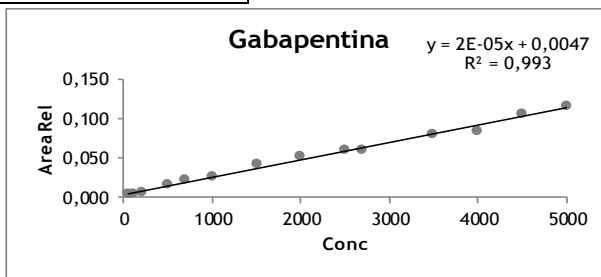
Estudo Linearidade da Gabapentina

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel
50	675	135182	0,005
100	783	146760	0,005
200	779	130828	0,006
500	1716	101929	0,017
700	2069	95084	0,022
1000	3325	122181	0,027
1500	4391	105502	0,042
2000	5971	116073	0,051
2500	7018	116740	0,060
2700	8318	138246	0,060
3000	5841	96918	0,060
3500	8274	103941	0,080
4000	9805	115524	0,085
4500	8927	84114	0,106
5000	9050	77525	0,117

Conc. (ng/mL)	Arel
50	0,005
100	0,005
200	0,006
500	0,017
700	0,022
1000	0,027
1500	0,042
2000	0,051
2500	0,060
2700	0,060
3000	0,060
3500	0,080
4000	0,085
4500	0,106
5000	0,117

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,996042018
Quadrado de R	0,992099702
Quadrado de R ajust	0,991381493
Erro-padrão	0,003418051
Observações	13



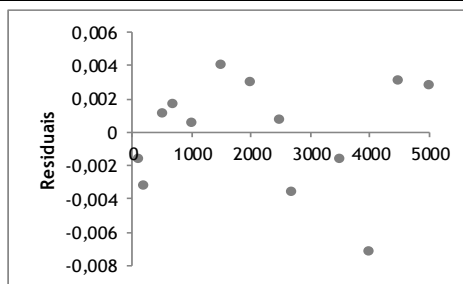
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	0,016138438	0,016138438	1381,353	6,4548E-13
Residual	11	0,000128514	1,16831E-05		
Total	12	0,016266952			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	0,004812	0,001587458	3,031261209	0,011424	0,001318028	0,008305972
50	2,18163E-05	5,86988E-07	37,16655213	6,45E-13	2,05244E-05	2,31083E-05

RESULTADO RESIDUAL

Observação	isto 0,00499423392568	Residuais
1	0,006993633	-0,001655065
2	0,009175266	-0,003220907
3	0,015720164	0,001117274
4	0,020083429	0,001671265
5	0,026628327	0,000582853
6	0,037536491	0,004079226
7	0,048444654	0,002996715
8	0,059352818	0,000759504
9	0,063716083	-0,003549817
10	0,081169145	-0,001565932
11	0,092077309	-0,007198748
12	0,102985472	0,003141243
13	0,113893636	0,00284239



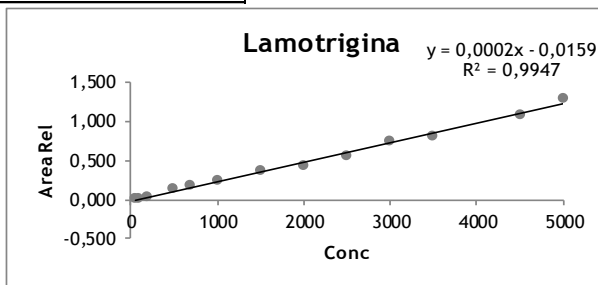
Estudo Linearidade da Lamotrigina

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel
50	1110	135182	0,008
100	2183	146760	0,015
200	5072	130828	0,039
500	12950	101929	0,127
700	15996	95084	0,168
1000	29155	122181	0,239
1500	37559	105502	0,356
2000	48918	116073	0,421
2500	65157	116740	0,558
2700	72790	138246	0,527
3000	71922	96918	0,742
3500	84312	103941	0,811
4000	95905	11524	0,830
4500	90984	84114	1,082
5000	98981	77525	1,277

Conc. (ng/mL)	Arel
50	0,008
100	0,015
200	0,039
500	0,127
700	0,168
1000	0,239
1500	0,356
2000	0,421
2500	0,558
3000	0,742
3500	0,811
4500	1,082
5000	1,277

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,99718596
Quadrado de R	0,994245494
Quadrado de R ajust	0,993670043
Erro-padrão	0,032984953
Observações	12



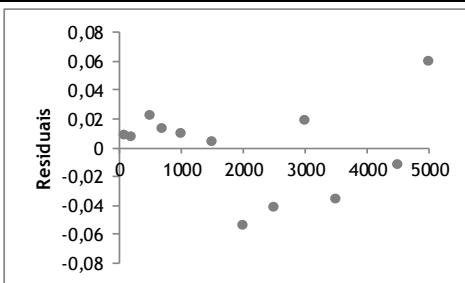
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	1,879824569	1,879824569	1727,769	1,55663E-12
Residual	10	0,010880071	0,001088007		
Total	11	1,89070464			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	-0,018412227	0,015429299	-1,193328846	0,260283	-0,052790847	0,015966393
50	0,000247173	5,94645E-06	41,56643595	1,56E-12	0,000233923	0,000260422

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Resíduo	Residuais
1	0,006305059	0,008571071
2	0,031022346	0,007747368
3	0,105174206	0,021871576
4	0,154608779	0,013615894
5	0,228760639	0,009861079
6	0,352347072	0,003655891
7	0,475933505	-0,054494398
8	0,599519938	-0,041386185
9	0,723106371	0,018979423
10	0,846692804	-0,035539783
11	1,093865671	-0,012192997
12	1,217452104	0,059311062



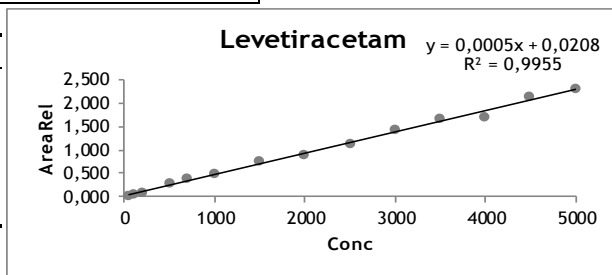
Estudo Linearidade da Levetiracetam

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel
50	3500	135182	0,026
100	6257	146760	0,043
200	10224	130828	0,078
500	28722	101929	0,282
700	34975	95084	0,368
1000	60643	122181	0,496
1500	77414	105502	0,734
2000	103452	116073	0,891
2500	130506	116740	1,118
2700	151296	138246	1,094
3000	137314	96918	1,417
3500	172127	103941	1,656
4000	195214	115524	1,690
4500	177887	84114	2,115
5000	177656	77525	2,292

Conc. (ng/mL)	Arel
50	0,026
100	0,043
200	0,078
500	0,282
700	0,368
1000	0,496
1500	0,734
2000	0,891
2500	1,118
2700	1,094
3000	1,417
3500	1,656
4000	1,690
4500	2,115
5000	2,292

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,99749169
Quadrado de R	0,994989672
Quadrado de R ajust	0,994534187
Erro-padrão	0,05654882
Observações	13



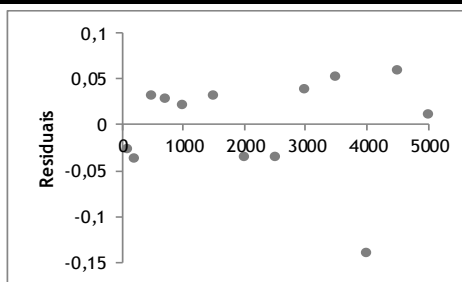
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	6,985414524	6,985414524	2184,465	5,26712E-14
Residual	11	0,03517546	0,003197769		
Total	12	7,020589984			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	0,02452901	0,026342781	0,931147297	0,371763	-0,033451061	0,082509081
50	0,000451222	9,65424E-06	46,73826016	5,27E-14	0,000429974	0,000472471

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Conc	Área Rel	Residuais
1	50	0,026	-0,027017891
2	100	0,043	-0,036624466
3	200	0,078	0,031645671
4	500	0,282	0,027445198
5	700	0,368	0,020583062
6	1000	0,496	0,032408002
7	1500	0,734	-0,035706623
8	2000	0,891	-0,034672441
9	2500	1,118	0,038607562
10	2700	1,094	0,052199949
11	3000	1,417	-0,139602143
12	3500	1,656	0,059786089
13	4000	1,690	0,010948031



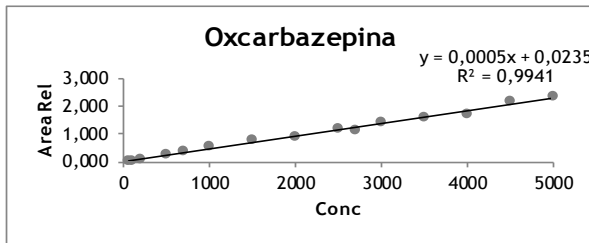
Estudo Linearidade da Oxcarbazepina

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel
50	3804	135182	0,028
100	7517	146760	0,051
200	12991	130828	0,099
500	28380	101929	0,278
700	34809	95084	0,366
1000	65339	122181	0,535
1500	80706	105502	0,765
2000	103843	116073	0,895
2500	137232	116740	1,176
2700	160379	138246	1,160
3000	135975	96918	1,403
3500	166155	103941	1,599
4000	198267	115524	1,716
4500	182299	84114	2,167
5000	182732	77525	2,357

Conc. (ng/mL)	Arel
50	0,028
100	0,051
200	0,099
500	0,278
700	0,366
1000	0,535
1500	0,765
2000	0,895
2500	1,176
2700	1,160
3000	1,403
3500	1,599
4000	1,716
4500	2,167
5000	2,357

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,996657786
Quadrado de R	0,993326742
Quadrado de R ajust	0,992770637
Erro-padrão	0,063224161
Observações	14



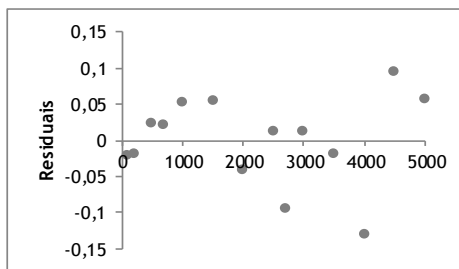
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	7,140055601	7,140055601	1786,222	199795E-14
Residual	12	0,047967534	0,003997294		
Total	13	7,188023134			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	0,027388519	0,029328351	0,933858132	0,368788	-0,036512469	0,091289507
50	0,000454607	1,07564E-05	42,26372042	2E-14	0,00043117	0,000478043

RESULTADO RESIDUAL

Observação	visto 0,0281374025764	Residuais
1	0,072849181	-0,021629054
2	0,118309842	-0,019008218
3	0,254691826	0,023734841
4	0,345613149	0,020469779
5	0,481995133	0,052781562
6	0,70929844	0,055673492
7	0,936601747	-0,041963932
8	1,163905054	0,01162256
9	1,254826377	-0,09473031
10	1,391208361	0,011780426
11	1,618511668	-0,019960425
12	1,845814975	-0,12957302
13	2,073118282	0,094158839
14	2,300421589	0,056643459



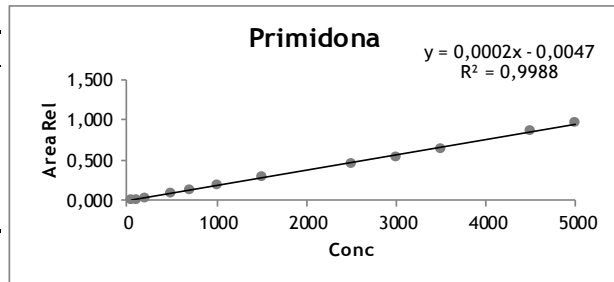
Estudo Linearidade da Primidona

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel
50	1284	135182	0,009
100	2248	146760	0,015
200	4693	130828	0,036
500	8347	101929	0,082
700	13065	95084	0,137
1000	23763	122181	0,194
1500	30188	105502	0,286
2000	34048	116073	0,293
2500	52692	116740	0,451
2700	61329	138246	0,444
3000	53029	96918	0,547
3500	67445	103941	0,649
4000	68542	115524	0,593
4500	72861	84114	0,866
5000	74223	77525	0,957

Conc. (ng/mL)	Arel
50	0,009
100	0,015
200	0,036
500	0,082
700	0,137
1000	0,194
1500	0,286
2500	0,451
3000	0,547
3500	0,649
4500	0,866
5000	0,957

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,999332181
Quadrado de R	0,998664808
Quadrado de R ajust	0,998516453
Erro-padrão	0,012874888
Observações	11



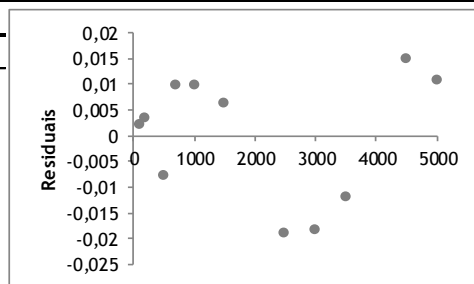
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	1,1584916	1,1584916	6731,604	3,00582E-14
Residual	9	0,001491865	0,000165763		
Total	10	1,17341025			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	-0,005707912	0,006132746	-0,930726997	0,376285	-0,019581146	0,008165322
50	0,00019044	2,3213E-06	82,04635446	3,01E-14	0,000185189	0,000195691

RESULTADO RESIDUAL

Observação	isto 0,00949934242030	Residuais
1	0,013336091	0,001979
2	0,032380094	0,00348987
3	0,089512104	-0,007625343
4	0,12760011	0,009802477
5	0,18473212	0,009757827
6	0,279952136	0,006179985
7	0,470392167	-0,019028719
8	0,565612183	-0,018458933
9	0,660832199	-0,011953031
10	0,85127223	0,014945743
11	0,946492246	0,01091125

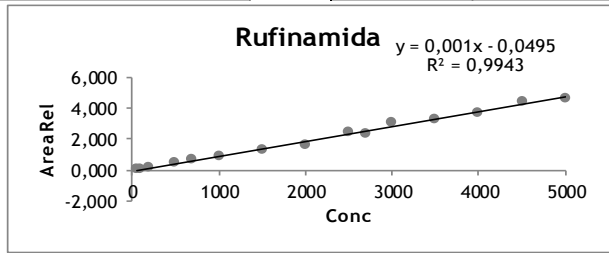


Estudo Linearidade da Rufinamida

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel	Conc. (ng/mL)	Arel
50	2356	135182	0,017	50	0,017
100	8431	146760	0,057	100	0,057
200	16225	130828	0,124	200	0,124
500	48654	101929	0,477	500	0,477
700	69432	95084	0,730	700	0,730
1000	110939	122181	0,908	1000	0,908
1500	135205	105502	1,282	1500	1,282
2000	192292	116073	1,657	2000	1,657
2500	280461	116740	2,402	2500	2,402
2700	320630	138246	2,319	2700	2,319
3000	293046	96918	3,024	3000	3,024
3500	338794	103941	3,259	3500	3,259
4000	422752	115524	3,659	4000	3,659
4500	371519	84114	4,417	4500	4,417
5000	361659	77525	4,665	5000	4,665

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,996780872
Quadrado de R	0,993572106
Quadrado de R ajust	0,993036448
Erro-padrão	0,130055136
Observações	14



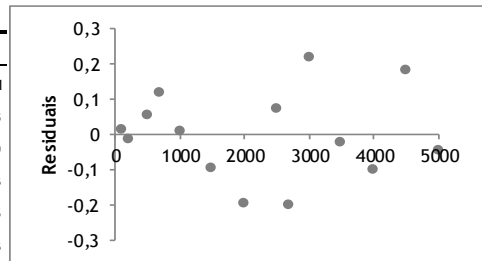
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	31,37378728	31,37378728	1854,863	1,5956E-14
Residual	12	0,202972061	0,016914338		
Total	13	31,57675934			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	-0,053612333	0,060329828	-0,888653841	0,391655	-0,185059736	0,077835069
50	0,000952946	2,21265E-05	43,06812509	1,6E-14	0,000904737	0,001001156

RESULTADO DO RESIDUAL

Observação	visto 0,0174293423802	Residuais
1	0,041682297	0,015768261
2	0,136976926	-0,012957306
3	0,422860815	0,054473329
4	0,613450075	0,116767343
5	0,899333964	0,008653875
6	1,375807112	-0,0942713
7	1,852280261	-0,195630179
8	2,328753409	0,073679665
9	2,519342668	-0,200071442
10	2,805226557	0,21424313
11	3,281699706	-0,022206536
12	3,758172854	-0,098737531
13	4,234646003	0,182178966
14	4,71119151	-0,046071459



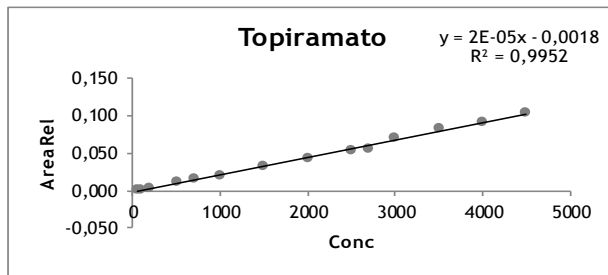
Estudo Linearidade da Topiramato

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel
50	101	135182	0,001
100	253	146760	0,002
200	522	130828	0,004
500	1081	101929	0,011
700	1506	95084	0,016
1000	2317	122181	0,019
1500	3341	105502	0,032
2000	4934	116073	0,043
2500	6143	116740	0,053
2700	7671	138246	0,055
3000	6742	96918	0,070
3500	8582	103941	0,083
4000	10436	115524	0,090
4500	8775	84114	0,104
5000	10106	77525	0,130

Conc. (ng/mL)	Arel
50	0,001
100	0,002
200	0,004
500	0,011
700	0,016
1000	0,019
1500	0,032
2000	0,043
2500	0,053
2700	0,055
3000	0,070
3500	0,083
4000	0,090
4500	0,104

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,997390203
Quadrado de R	0,994787217
Quadrado de R ajust	0,994313328
Erro-padrão	0,002594504
Observações	13



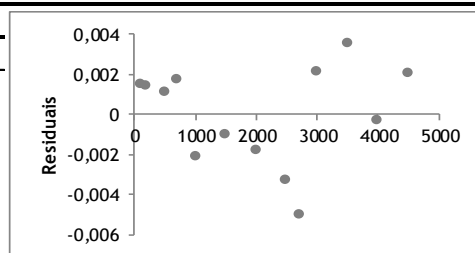
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	0,014130639	0,014130639	2099,197	6,54983E-14
Residual	11	7,40459E-05	6,73145E-06		
Total	12	0,014204685			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	-0,002106995	0,001248328	-1,687853616	0,119554	-0,004854546	0,000640556
50	2,31896E-05	5,06136E-07	45,81699619	6,55E-14	2,20756E-05	2,43036E-05

RESULTADO RESIDUAL

Observação	isto 0,000746400629061	Residuais
1	0,000211967	0,001509536
2	0,002530929	0,001457171
3	0,009487815	0,00114213
4	0,01425739	0,001715195
5	0,021082626	-0,00218766
6	0,032677436	-0,001008387
7	0,044272246	-0,00176452
8	0,055867056	-0,003248741
9	0,06050498	-0,005017288
10	0,067461866	0,00209926
11	0,079056677	0,003508751
12	0,090651487	-0,000318568
13	0,102246297	0,002072144



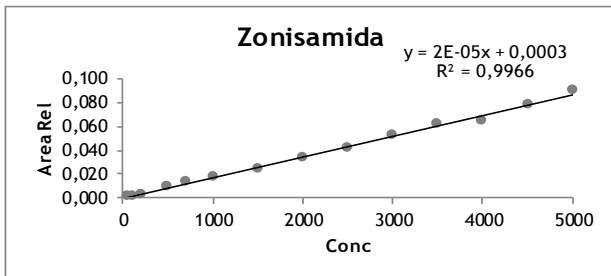
Estudo Linearidade da Zonisamida

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel
50	177	135182	0,001
100	281	146760	0,002
200	504	130828	0,004
500	961	101929	0,009
700	1269	95084	0,013
1000	2214	122181	0,018
1500	2636	105502	0,025
2000	4021	116073	0,035
2500	4952	116740	0,042
2700	5324	138246	0,039
3000	5064	96918	0,052
3500	6437	103941	0,062
4000	7441	115524	0,064
4500	6599	84114	0,078
5000	6953	77525	0,090

Conc. (ng/mL)	Arel
50	0,001
100	0,002
200	0,004
500	0,009
700	0,013
1000	0,018
1500	0,025
2000	0,035
2500	0,042
3000	0,052
3500	0,062
4000	0,064
4500	0,078
5000	0,090

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,998068246
Quadrado de R	0,996140223
Quadrado de R ajust	0,995789334
Erro-padrão	0,001898195
Observações	13



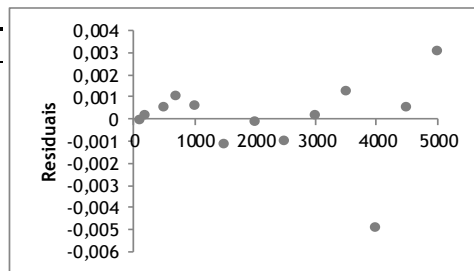
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	0,010228991	0,010228991	2838,905	125369E-14
Residual	11	3,96346E-05	3,60315E-06		
Total	12	0,010268626			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	0,000256232	0,000884258	0,289770065	0,777381	-0,001690007	0,00220247
50	1,72668E-05	3,24067E-07	53,28138029	125E-14	165535E-05	1,798E-05

RESULTADO DO RESIDUAL

Observação	Resíduo	Residuais
1	0,001982908	-6,77828E-05
2	0,003709584	0,00014045
3	0,008889613	0,000540526
4	0,012342965	0,000999735
5	0,017522994	0,000599874
6	0,026156375	-0,001169897
7	0,034789756	-0,000145422
8	0,043423137	-0,001003803
9	0,052056519	0,000188843
10	0,0606899	0,001238002
11	0,069323281	-0,004913045
12	0,077956662	0,000492046
13	0,086590043	0,003100474



7.2. Limites de Detecção e Quantificação

Estudo dos Limites de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) da Carbamazepina

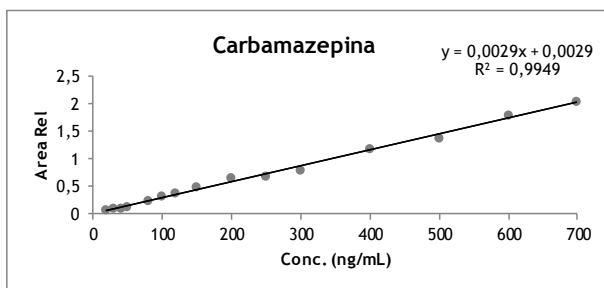
Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel
20	4280,323	66538,758	0,064328267
30	7058,825	78001375	0,090496161
40	7201081	79620,594	0,090442443
50	10569,861	81728,039	0,129329678
80	20280,57	85581336	0,236974216
100	2117,729	68508,164	0,318469037
120	29303,926	80244,633	0,365182379
150	35930,746	76658,977	0,468708916
200	39257,387	59296,145	0,662056311
250	55315,762	81638,25	0,677571628
300	50187,762	63426,594	0,791273168
400	68269,563	58329,703	1,170408205
500	90900,93	66671719	1,363410624
600	139491281	77857,383	1,791625606
700	130553,891	63915,434	2,042603528

Conc. (ng/mL)	Arel
20	0,064328267
30	0,090496161
40	0,090442443
50	0,129329678
80	0,236974216
100	0,318469037
120	0,365182379
150	0,468708916
200	0,662056311
250	0,677571628
300	0,791273168
400	1,170408205
500	1,363410624
600	1,791625606
700	2,042603528

LD = 53,72
LQ = 162,79

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,997460667
Quadrado de R	0,994927782
Quadrado de R ajustado	0,994537611
Erro-padrão	0,046995365
Observações	15



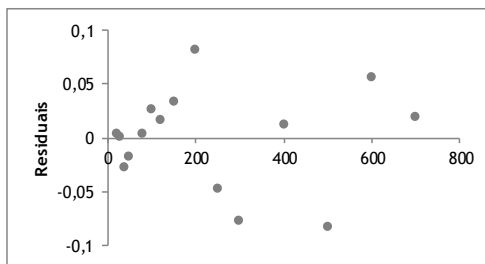
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	5,631797727	5,631797727	2549,981307	2,63857E-16
Residual	13	0,028711336	0,002208564		
Total	14	5,660509063			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	0,002890603	0,018145717	0,159299478	0,875881238	-0,036310835	0,042092041
Variável X 1	0,00288687	5,71688E-05	50,49733961	2,63857E-16	0,002763365	0,003010376

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,060628011	0,003700256
2	0,089496714	0,000999447
3	0,118365418	-0,027922976
4	0,147234122	-0,017904443
5	0,233840233	0,003133983
6	0,29157764	0,026891396
7	0,349315048	0,016867331
8	0,435921159	0,032787757
9	0,580264678	0,081791633
10	0,724608186	-0,047036568
11	0,868951715	-0,077678547
12	1,157638752	0,012769453
13	1,44632579	-0,082915166
14	1,735012827	0,056612779
15	2,023699864	0,01903664



Estudo dos Limites de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) da Felbamato

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel
20	181983	66538,758	0,002734992
30	124,152	78001375	0,001591664
40	156,027	79620,594	0,001959631
50	193,886	81728,039	0,002372331
80	615,343	85581336	0,007190154
100	705,851	68508,164	0,010303166
120	930,381	80244,633	0,011594308
150	1193,987	76658,977	0,015575306
200	1250,373	59296,145	0,021086919
250	1492,823	81638,25	0,018285828
300	1835,639	63426,594	0,028941157
400	2221,031	58329,703	0,038077187
500	3178,176	66671,719	0,047669027
600	4544,889	77857,383	0,058374541
700	4909,458	63915,434	0,076811776

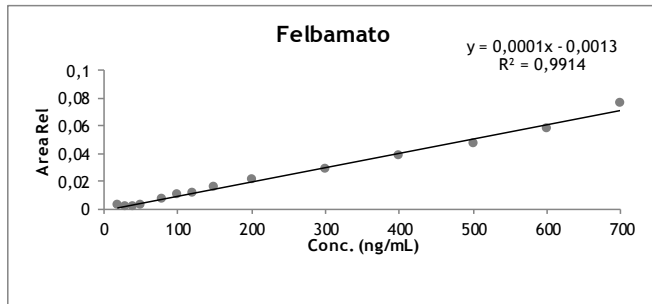
Conc. (ng/mL)	Arel
20	0,002734992
30	0,001591664
40	0,001959631
50	0,002372331
80	0,007190154
100	0,010303166
120	0,011594308
150	0,015575306
200	0,021086919
250	0,018285828
300	0,028941157
400	0,038077187
500	0,047669027
600	0,058374541
700	0,076811776

Nota: Sem o calibrador a 250 ng/mL

LD =	73,06
LQ =	221,39

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,995674836
Quadrado de R	0,991368378
Quadrado de R ajustado	0,990649077
Erro-padrão	0,002300116
Observações	14



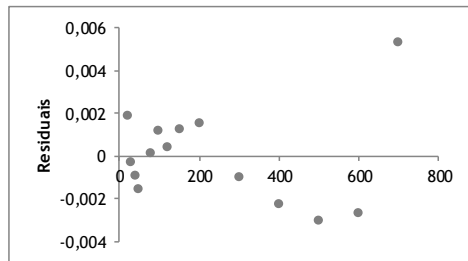
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	0,007291609	0,007291609	1378,23704	9,36438E-14
Residual	12	6,34864E-05	5,29053E-06		
Total	13	0,007355095			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	-0,001251655	0,000900215	-1,390395291	0,189658063	-0,003213054	0,000709745
Variável X 1	0,000103892	2,79847E-06	37,12461501	9,36438E-14	9,77948E-05	0,00010999

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,000826189	0,001908803
2	0,001865111	-0,000273447
3	0,002904033	-0,000944402
4	0,003942955	-0,001570624
5	0,007059721	0,000130433
6	0,009137565	0,001165601
7	0,01215409	0,000378899
8	0,014332175	0,001243131
9	0,019526785	0,001560134
10	0,029916004	-0,000974847
11	0,040305224	-0,002228037
12	0,050694443	-0,003025416
13	0,061083663	-0,002709122
14	0,071472882	0,005338894



Estudo dos Limites de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) da Fenitoína

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel
20	137,872	66538,758	0,002072056
30	138,112	78001,375	0,001770635
40	288,313	79620,594	0,003621086
50	302,627	81728,039	0,003702854
80	485,414	85581,336	0,005671961
100	546,774	68508,164	0,007981151
120	738,469	80244,633	0,009202721
150	900,667	76658,977	0,011749009
200	956,628	59296,145	0,016133056
250	1403,722	81638,25	0,017194416
300	1457,038	63426,594	0,022972036
400	1770,368	58329,703	0,030351055
500	2473,346	66671,719	0,037097379
600	2947,941	77857,383	0,037863346
700	3176,099	63915,434	0,049692207

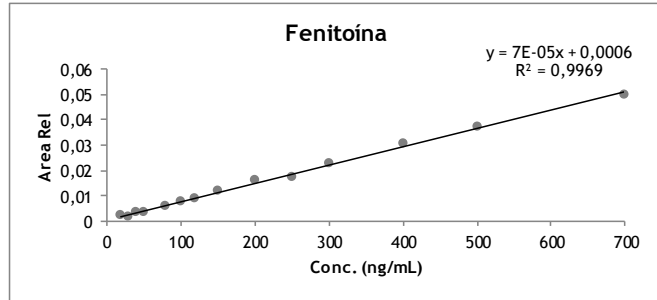
Conc. (ng/mL)	Arel
20	0,002072056
30	0,001770635
40	0,003621086
50	0,003702854
80	0,005671961
100	0,007981151
120	0,009202721
150	0,011749009
200	0,016133056
250	0,017194416
300	0,022972036
400	0,030351055
500	0,037097379
700	0,049692207

Nota: sem calibrador a 600 ng/mL

LD =	38,70
LQ =	117,26

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,998458102
Quadrado de R	0,996916581
Quadrado de R ajustado	0,996661796
Erro-padrão	0,000843504
Observações	14



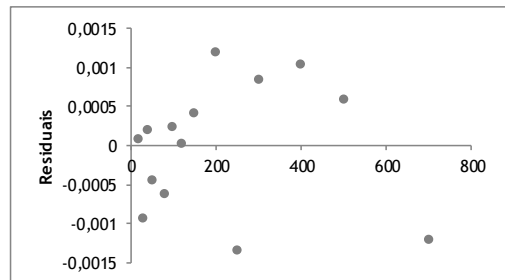
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	0,002762259	0,002762259	3882,310195	1,93371E-16
Residual	12	8,53799E-06	7,11499E-07		
Total	13	0,002770797			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	0,00055153	0,000331062	1,66594385	0,121593185	-0,000169791	0,001272852
Variável X 1	7,19354E-05	1,5451E-06	62,30818722	1,93371E-16	6,942E-05	7,44509E-05

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,001990239	8,18162E-05
2	0,002709594	-0,000938958
3	0,003428948	0,000182138
4	0,004148302	-0,000445448
5	0,006306366	-0,000634405
6	0,007745074	0,000236076
7	0,009183783	1,89381E-05
8	0,011341846	0,000407162
9	0,014938619	0,001194437
10	0,018535391	-0,001340975
11	0,022132163	0,000839873
12	0,029325707	0,001025348
13	0,036519251	0,000578128
14	0,050906339	-0,001214131



Estudo dos Limites de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) do Fenobarbital

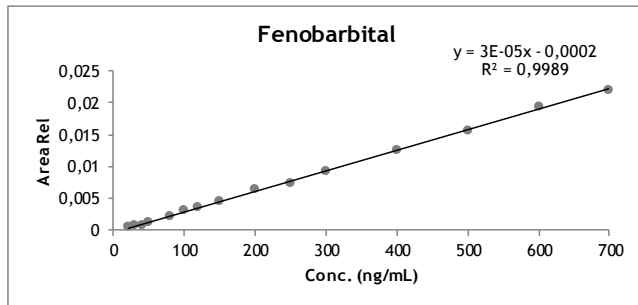
Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel
20	43,664	66538,758	0,000656219
30	55,417	78001375	0,000710462
40	68,484	79620,594	0,000860129
50	101,97	81728,039	0,001247675
80	183,661	85581336	0,00214604
100	216,192	68508,164	0,003155711
120	292,803	80244,633	0,00364888
150	355,603	76658,977	0,004638765
200	387,301	59296,145	0,006531639
250	606,001	81638,25	0,007423003
300	592,636	63426,594	0,009343652
400	739,158	58329,703	0,012672069
500	1044,246	66671,719	0,015662503
600	1513,718	77857,383	0,01944219
700	1402,205	63915,434	0,021938441

Conc. (ng/mL)	Arel
20	0,000656219
30	0,000710462
40	0,000860129
50	0,001247675
80	0,00214604
100	0,003155711
120	0,00364888
150	0,004638765
200	0,006531639
250	0,007423003
300	0,009343652
400	0,012672069
500	0,015662503
600	0,01944219
700	0,021938441

LD =	24,41
LQ =	73,97

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,999474084
Quadrado de R	0,998948445
Quadrado de R ajustado	0,998867556
Erro-padrão	0,000237117
Observações	15



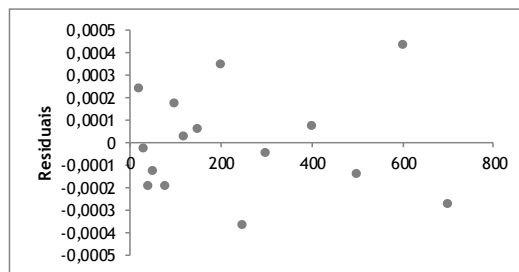
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	0,000694352	0,000694352	12349,64142	9,52207E-21
Residual	13	7,30918E-07	5,62245E-08		
Total	14	0,000695083			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	-0,00022645	9,15549E-05	-2,473374316	0,027956596	-0,000424242	-2,86572E-05
Variável X 1	3,20548E-05	2,88447E-07	111,1289405	9,52207E-21	3,14317E-05	3,2678E-05

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,000414647	0,000241572
2	0,000735195	-2,47337E-05
3	0,001055744	-0,000195615
4	0,001376292	-0,000128618
5	0,002337937	-0,000191897
6	0,002979034	0,000176677
7	0,003620131	2,87488E-05
8	0,004581776	5,69894E-05
9	0,006184518	0,000347121
10	0,00778726	-0,000364256
11	0,009390001	-4,63497E-05
12	0,012595485	7,65836E-05
13	0,015800969	-0,000138466
14	0,019006452	0,000435737
15	0,02221936	-0,000273495



Estudo dos Limites de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) da Gabapentina

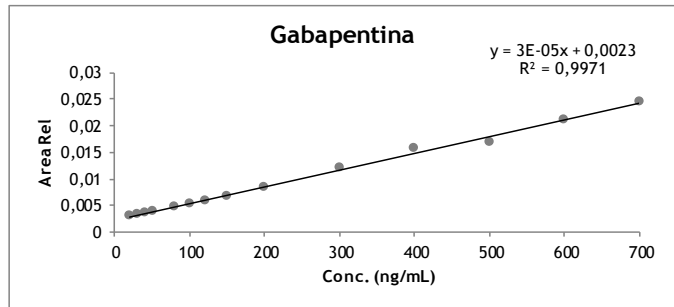
Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel
20	197,662	66538,758	0,00297063
30	2616,15	78001,375	0,003353979
40	292,04	79620,594	0,003667895
50	312,604	81728,039	0,00382493
80	399,345	85581,336	0,004666263
100	365,586	68508,164	0,005336386
120	482,136	80244,633	0,006008327
150	517,292	76658,977	0,006747964
200	504,872	59296,145	0,008514415
250	638,766	81638,25	0,007824347
300	765,189	63426,594	0,012064167
400	915,69	58329,703	0,01569852
500	1185,555	66671,719	0,017032034
600	1651,989	77857,383	0,021218142
700	1563,09	63915,434	0,024455595

Conc. (ng/mL)	Arel
20	0,00297063
30	0,003353979
40	0,003667895
50	0,00382493
80	0,004666263
100	0,005336386
120	0,006008327
150	0,006747964
200	0,008514415
300	0,012064167
400	0,01569852
500	0,017032034
600	0,021218142
700	0,024455595

LD = 42,08
LQ = 127,52

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,998558829
Quadrado de R	0,99719735
Quadrado de R ajustado	0,996879713
Erro-padrão	0,00040111
Observações	14



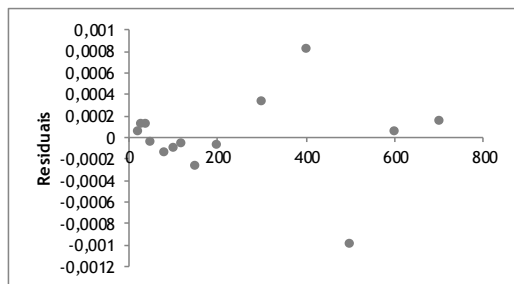
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	0,000668378	0,000668378	4154,28401	128956E-16
Residual	12	1,93067E-06	1,60889E-07		
Total	13	0,000670309			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	0,002291004	0,000156985	14,59373146	5,3179E-09	0,001948962	0,002633046
Variável X 1	3,14545E-05	4,88016E-07	64,45373543	128956E-16	3,03912E-05	3,25178E-05

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,002920093	5,05365E-05
2	0,003234638	0,000119342
3	0,003549182	0,000118713
4	0,003863727	-3,87974E-05
5	0,004807361	-0,000141098
6	0,00543645	-0,000100064
7	0,00606554	-5,72126E-05
8	0,007009174	-0,00026121
9	0,008581897	-6,74818E-05
10	0,011727344	0,000336823
11	0,01487279	0,00082573
12	0,018018237	-0,000986203
13	0,021163684	5,44583E-05
14	0,02430913	0,000146465



Estudo dos Limites de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) da Lamotrigina

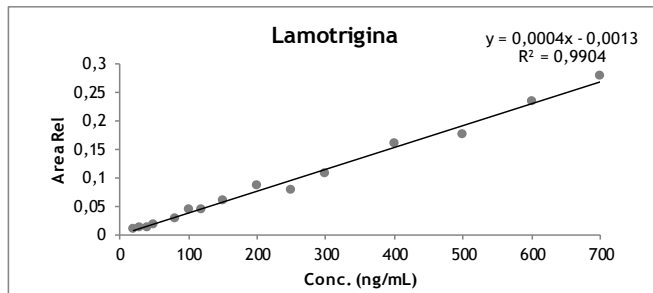
Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel
20	562,321	66538,758	0,008451029
30	853,713	78001375	0,010944846
40	1064,452	79620,594	0,013369054
50	1374,651	81728,039	0,016819821
80	2497,04	85581,336	0,02917739
100	2955,071	68508,164	0,043134582
120	3607,772	80244,633	0,044959667
150	4594,447	76658,977	0,059933581
200	5154,862	59296,145	0,086934184
250	6339,506	81638,25	0,077653624
300	6801,111	63426,594	0,107228066
400	9343,411	58329,703	0,160182729
500	11653,678	66671,719	0,174791923
600	18090,793	77857,383	0,232358092
700	17818,838	63915,434	0,278787718

Conc. (ng/mL)	Arel
20	0,008451029
30	0,010944846
40	0,013369054
50	0,016819821
80	0,02917739
100	0,043134582
120	0,044959667
150	0,059933581
200	0,086934184
250	0,077653624
300	0,107228066
400	0,160182729
500	0,174791923
600	0,232358092
700	0,278787718

LD =	74,01
LQ =	224,26

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,995197278
Quadrado de R	0,990417622
Quadrado de R ajustado	0,989680516
Erro-padrão	0,008646855
Observações	15



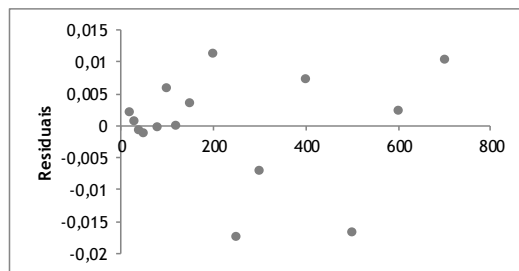
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	0,100462685	0,100462685	1343,656994	1,65201E-14
Residual	13	0,000971985	7,47681E-05		
Total	14	0,10143467			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	-0,00134671	0,003338699	-0,403363714	0,693236517	-0,008559531	0,005866111
Variável X 1	0,000385573	1,05187E-05	36,65592713	1,65201E-14	0,000362848	0,000408297

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,006364742	0,002086288
2	0,010220468	0,000724378
3	0,014076193	-0,00070714
4	0,017931919	-0,00112098
5	0,029499097	-0,000321707
6	0,037210549	0,005924033
7	0,044922	3,76669E-05
8	0,056489178	0,003444403
9	0,075767807	0,011166377
10	0,095046437	-0,017392812
11	0,114325066	-0,007097
12	0,152882325	0,007300404
13	0,191439583	-0,01664766
14	0,229996842	0,00236125
15	0,268554101	0,010233617



Estudo dos Limites de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) do Levetiracetam

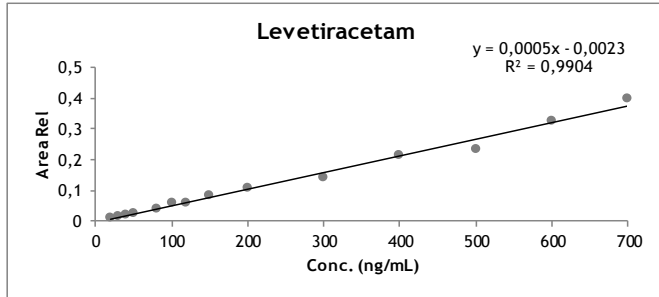
Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel
20	897,386	66538,758	0,013486666
30	1190,489	78001,375	0,01526241
40	1610,499	79620,594	0,020227166
50	1968,362	81728,039	0,024084293
80	3517,782	85581,336	0,041104546
100	3978,222	68508,164	0,058069313
120	4963,768	80244,633	0,061857944
150	6329,415	76658,977	0,082565868
200	6517,396	59296,145	0,109912643
250	8685,07	81638,25	0,106384813
300	9046,16	63426,594	0,142624086
400	12680,276	58329,703	0,217389689
500	15777,648	66671,719	0,236646786
600	25394,127	77857,383	0,326162093
700	25471,111	63915,434	0,398512682

Conc. (ng/mL)	Arel
20	0,013486666
30	0,01526241
40	0,020227166
50	0,024084293
80	0,041104546
100	0,058069313
120	0,061857944
150	0,082565868
200	0,109912643
250	0,106384813
300	0,142624086
400	0,217389689
500	0,236646786
600	0,326162093
700	0,398512682

LD = 76,92
LQ = 233,11

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,995208519
Quadrado de R	0,990439996
Quadrado de R ajustado	0,989643329
Erro-padrão	0,012615119
Observações	14



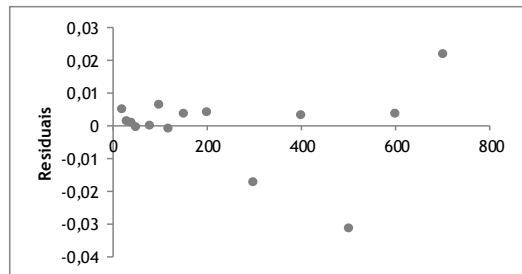
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	0,197849091	0,197849091	1243,229558	1,72921E-13
Residual	12	0,001909695	0,000159141		
Total	13	0,199758785			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	-0,002325846	0,004937281	-0,471078234	0,64603318	-0,013083256	0,008431565
Variável X 1	0,000541176	1,53484E-05	35,25946054	1,72921E-13	0,000507734	0,000574617

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,008497668	0,004988998
2	0,013909425	0,001352985
3	0,019321182	0,000905984
4	0,024732939	-0,000648646
5	0,04096821	0,000136337
6	0,051791724	0,006277589
7	0,062615237	-0,000757294
8	0,078850508	0,00371536
9	0,105909293	0,00400335
10	0,160026862	-0,017402776
11	0,214144431	0,003245258
12	0,268262	-0,031615214
13	0,322379569	0,003782524
14	0,37649138	0,022015544



Estudo dos Limites de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) da Oxcarbazepina

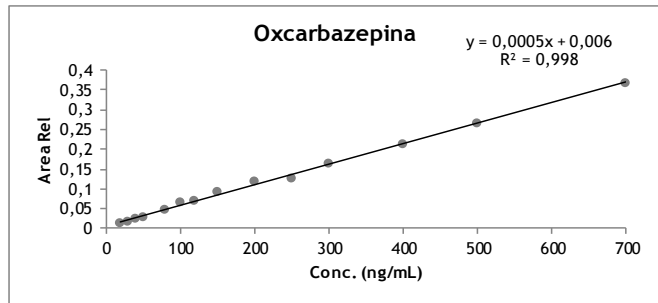
Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel
20	964,843	66538,758	0,014500466
30	1328,133	78001,375	0,017027046
40	1867,043	79620,594	0,023449247
50	2378,858	81728,039	0,029107
80	4072,184	85581,336	0,047582618
100	4391,39	68508,164	0,064100244
120	5506,128	80244,633	0,068616776
150	6915,147	76658,977	0,090206617
200	7086,314	59296,145	0,119507162
250	10379,244	81638,25	0,127137022
300	10271,471	63426,594	0,161942655
400	12353,479	58329,703	0,211787106
500	17672,838	66671,719	0,265072481
600	20165,383	77857,383	0,25900412
700	23546,096	63915,434	0,368394526

Conc. (ng/mL)	Arel
20	0,014500466
30	0,017027046
40	0,023449247
50	0,029107
80	0,047582618
100	0,064100244
120	0,068616776
150	0,090206617
200	0,119507162
250	0,127137022
300	0,161942655
400	0,211787106
500	0,265072481
700	0,368394526

LD =	31,54
LQ =	95,57

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,99897504
Quadrado de R	0,997951132
Quadrado de R ajustado	0,997780392
Erro-padrão	0,004955531
Observações	14



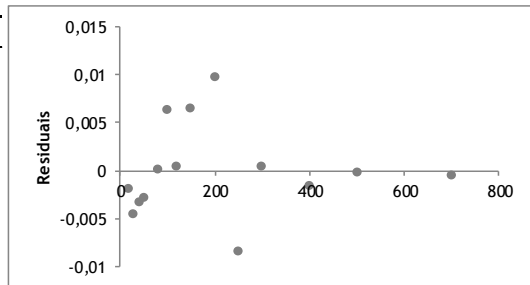
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	0,143534658	0,143534658	5844,89106	1,67024E-17
Residual	12	0,000294687	2,45573E-05		
Total	13	0,143829346			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	0,005992811	0,001944967	3,08188646	0,009516872	0,001755091	0,01023053
Variável X 1	0,000518548	6,78267E-06	76,45188883	1,67024E-17	0,00050377	0,000533326

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,016363774	-0,001863308
2	0,021549256	-0,00452221
3	0,026734737	-0,00328549
4	0,031920219	-0,002813219
5	0,047476664	0,000105954
6	0,057847627	0,006252616
7	0,068218591	0,000398185
8	0,083775036	0,006431581
9	0,109702444	0,009804717
10	0,135629853	-0,008492831
11	0,161557261	0,000385393
12	0,213412078	-0,001624972
13	0,265266895	-0,000194414
14	0,368976529	-0,000582003



Estudo dos Limites de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) da Primidona

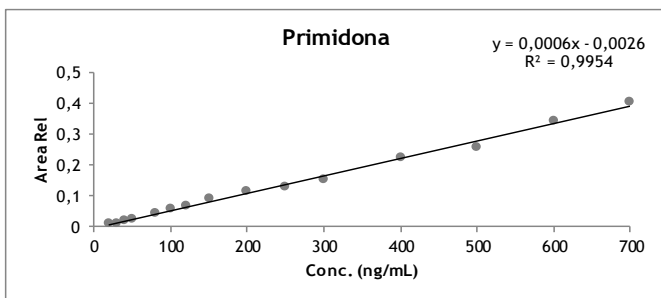
Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel
20	870,542	66538,758	0,013083232
30	1024,981	78001,375	0,01314055
40	1635,534	79620,594	0,020541595
50	2068,636	81728,039	0,02531215
80	3630,337	85581,336	0,042419728
100	4084,985	68508,164	0,059627711
120	5343,179	80244,633	0,066586123
150	6895,55	76658,977	0,089950979
200	6835,219	59296,145	0,11527257
250	10440,887	81638,25	0,127892097
300	9895,238	63426,594	0,156010868
400	13196,83	58329,703	0,226245452
500	17363,584	66671,719	0,260434023
600	26691,859	77857,383	0,342830159
700	26035,908	63915,434	0,407349311

Conc. (ng/mL)	Arel
20	0,013083232
30	0,01314055
40	0,020541595
50	0,02531215
80	0,042419728
100	0,059627711
120	0,066586123
150	0,089950979
200	0,11527257
250	0,127892097
300	0,156010868
400	0,226245452
500	0,260434023
600	0,342830159
700	0,407349311

LD = 51,30
LQ = 155,45

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,99768364
Quadrado de R	0,995372645
Quadrado de R ajustado	0,995016695
Erro-padrão	0,008806688
Observações	15



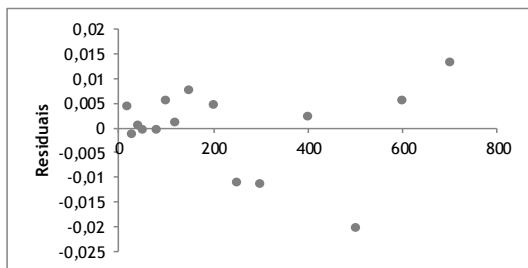
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	0,216880963	0,216880963	2796,38029	1,45265E-16
Residual	13	0,01008251	7,75577E-05		
Total	14	0,217889214			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	-0,002585442	0,003400413	-0,760331669	0,460624544	-0,009931588	0,004760704
Variável X 1	0,000566519	1,0713E-05	52,88081211	1,45265E-16	0,000543375	0,000589663

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,008744938	0,004338294
2	0,014410128	-0,001269578
3	0,020075318	0,000466277
4	0,025740508	-0,000429292
5	0,042736078	-0,00031635
6	0,054066458	0,005561253
7	0,065396837	0,001189285
8	0,082392407	0,007558571
9	0,110718357	0,004554213
10	0,139044307	-0,01115221
11	0,167370257	-0,01359388
12	0,224022156	0,002223296
13	0,280674055	-0,020240032
14	0,337325955	0,005504204
15	0,393977854	0,013371457



Estudo dos Limites de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) da Rufinamida

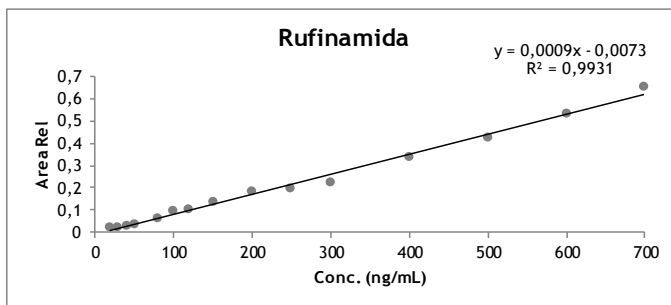
Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel
20	1297,501	66538,758	0,019499928
30	1922,667	78001,375	0,024649142
40	2153,09	79620,594	0,027041873
50	3022,413	81728,039	0,036981347
80	5596,925	85581,336	0,065398897
100	6538,516	68508,164	0,095441413
120	8104,557	80244,633	0,100998119
150	10531,389	76658,977	0,137379723
200	10875,82	59296,145	0,183415296
250	16117,898	81638,25	0,197430714
300	14083,609	63426,594	0,222045803
400	19611,461	58329,703	0,336217399
500	28257,545	66671,719	0,423831055
600	41251,395	77857,383	0,529832797
700	41431,473	63915,434	0,648223291

Conc. (ng/mL)	Arel
20	0,019499928
30	0,024649142
40	0,027041873
50	0,036981347
80	0,065398897
100	0,095441413
120	0,100998119
150	0,137379723
200	0,183415296
250	0,197430714
300	0,222045803
400	0,336217399
500	0,423831055
600	0,529832797
700	0,648223291

LD =	62,68
LQ =	189,95

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,996547528
Quadrado de R	0,993106976
Quadrado de R ajustado	0,992576743
Erro-padrão	0,016945447
Observações	15



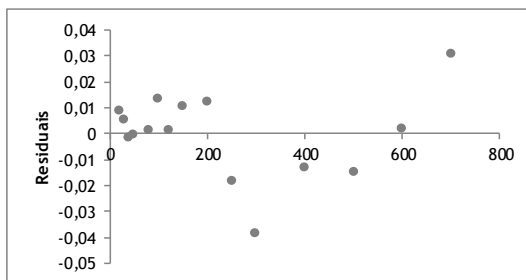
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	0,537818393	0,537818393	1872,964696	1,93905E-15
Residual	13	0,003732926	0,000287148		
Total	14	0,54155132			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95%inferior	95%superior
Interceptar	-0,007313714	0,006542928	-1,117804432	0,283882582	-0,02144885	0,006821423
Variável X 1	0,000892117	2,06137E-05	43,27776214	1,93905E-15	0,000847583	0,00093665

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,010528617	0,008971311
2	0,019449782	0,00519936
3	0,028370947	-0,001329074
4	0,037292113	-0,000310765
5	0,064055608	0,001343289
6	0,081897939	0,013543474
7	0,099740269	0,00125785
8	0,126503765	0,010875957
9	0,171109592	0,012305705
10	0,215715418	-0,018284704
11	0,260321244	-0,038275441
12	0,349532897	-0,013315498
13	0,43874455	-0,014913495
14	0,527956202	0,001876595
15	0,617167855	0,031055436



Estudo dos Limites de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) do Topiramato

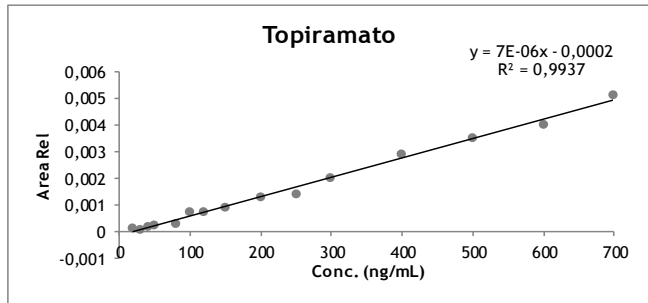
Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	AreI
20	7,228	66538,758	0,000108628
30	4,967	78001,375	6,36784E-05
40	13,188	79620,594	0,000165636
50	19,666	81728,039	0,000240627
80	21,683	85581,336	0,000253361
100	47,527	68508,164	0,000693742
120	58,751	80244,633	0,000732149
150	67,848	76658,977	0,000885063
200	76,394	59296,145	0,001288347
250	110,053	81638,25	0,001360306
300	127,321	63426,594	0,002007376
400	167,072	58329,703	0,00286427
500	231,03	66671,719	0,003465187
600	312,592	77857,383	0,00404931
700	325,115	63915,434	0,005086643

Conc. (ng/mL)	AreI
20	0,000108628
30	6,36784E-05
40	0,000165636
50	0,000240627
80	0,000253361
100	0,000693742
120	0,000732149
150	0,000885063
200	0,001288347
250	0,001360306
300	0,002007376
400	0,00286427
500	0,003465187
600	0,00404931
700	0,005086643

LD = 59,97
LQ = 181,72

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,996838642
Quadrado de R	0,993687278
Quadrado de R ajustado	0,993201684
Erro-padrão	0,000131731
Observações	15



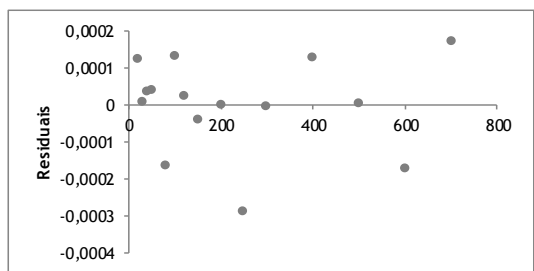
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	3,5510E-05	3,5510E-05	2046,333553	1,09452E-15
Residual	13	2,25589E-07	1,7353E-08		
Total	14	3,57357E-05			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	-0,000162107	5,08636E-05	-3,187100577	0,007142787	-0,000271991	-5,22232E-05
Variável X 1	7,24903E-06	1,60248E-07	45,23641843	1,09452E-15	6,90283E-06	7,59522E-06

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
1	-1,71268E-05	0,000125755
2	5,53635E-05	8,31488E-06
3	0,000127854	3,77818E-05
4	0,000200344	4,02833E-05
5	0,000417815	-0,000164453
6	0,000562795	0,000130947
7	0,000707776	2,43728E-05
8	0,000925247	-4,0184E-05
9	0,001287698	6,48853E-07
10	0,001650149	-0,000289843
11	0,002012601	-5,22496E-06
12	0,002737503	0,000126766
13	0,003462406	2,78151E-06
14	0,004187309	-0,000172378
15	0,004912211	0,000174432



Estudo dos Limites de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) da Zonisamida

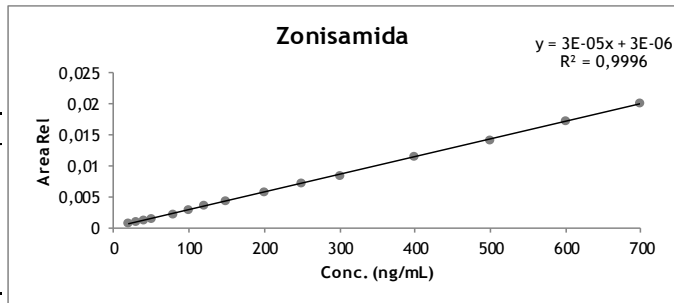
Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel
20	42,139	66538,758	0,0006333
30	74,262	78001,375	0,00095206
40	87,146	79620,594	0,001094516
50	113,569	81728,039	0,001389597
80	188,156	85581,336	0,002198563
100	195,193	68508,164	0,002849193
120	276,254	80244,633	0,003442648
150	330,805	76658,977	0,004315281
200	342,253	59296,145	0,005771927
250	584,699	81638,25	0,007162072
300	520,611	63426,594	0,008208087
400	664,824	58329,703	0,011397692
500	932,35	66671,719	0,01398419
600	1340,018	77857,383	0,017211187
700	1273,37	63915,434	0,019922731

Conc. (ng/mL)	Arel
20	0,0006333
30	0,00095206
40	0,001094516
50	0,001389597
80	0,002198563
100	0,002849193
120	0,003442648
150	0,004315281
200	0,005771927
250	0,007162072
300	0,008208087
400	0,011397692
500	0,01398419
600	0,017211187
700	0,019922731

LD = 14,96
LQ = 45,33

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,999802417
Quadrado de R	0,999604873
Quadrado de R ajustado	0,999574479
Erro-padrão	0,000128664
Observações	15



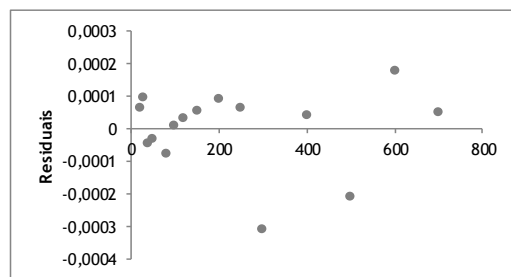
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	0,000544442	0,000544442	32887,82002	1,64243E-23
Residual	13	2,15209E-07	1,65545E-08		
Total	14	0,000544657			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	3,4889E-06	4,96795E-05	0,07022807	0,945080966	-0,000103837	0,000110815
Variável X 1	2,83844E-05	1,56517E-07	181,3499932	1,64243E-23	2,80462E-05	2,87225E-05

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,000571177	6,21235E-05
2	0,00085502	9,70398E-05
3	0,001138864	-4,43483E-05
4	0,001422708	-3,31114E-05
5	0,002274239	-7,56759E-05
6	0,002841927	7,26623E-06
7	0,003409615	3,3033E-05
8	0,004261146	5,41345E-05
9	0,005680365	9,15615E-05
10	0,007099584	6,24874E-05
11	0,008518803	-0,000310716
12	0,011357241	4,04507E-05
13	0,01419568	-0,000211489
14	0,017034118	0,00017707
15	0,019872556	5,01751E-05



7.3. Repetibilidade

Carbamazepina

Controlo baixo a 100 ng/mL

	Area	TR	Area (PI)	TR (PI)	TRR	Area relativa	Conc (ng/mL)
Controlo 1	16828,94	3,29	80709,539	3,24	1,02	0,2085	124,01
Controlo 2	18109,21	3,29	88583	3,24	1,02	0,2044	121,46
Controlo 3	15905,25	3,29	94329,547	3,23	1,02	0,1686	99,07
Controlo 4	17605,14	3,29	93463,047	3,24	1,02	0,1884	111,42
Controlo 5	19405,08	3,29	94647,563	3,24	1,02	0,2050	121,83

TRR médio 1,02

Média 115,56
 Desvio Padrão 10,42
 CV 9,02

Carbamazepina

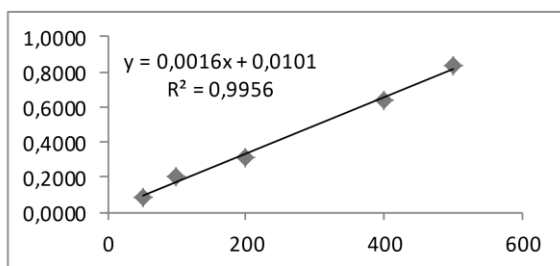
Controlo alto a 500 ng/mL

	Area	TR	Area (PI)	TR (PI)	TRR	Area relativa	Conc (ng/mL)
Controlo 1	62648,99	3,29	79833,992	3,24	1,02	0,7847	484,15
Controlo 2	68255,08	3,29	83846,656	3,24	1,02	0,8140	502,47
Controlo 3	60311,80	3,29	78252,711	3,23	1,02	0,7707	475,39
Controlo 4	76660,63	3,29	81517,18	3,24	1,02	0,9404	581,45
Controlo 5	73427,77	3,29	82166,188	3,23	1,02	0,8936	552,22

TRR médio 1,02

Média 519,14
 Desvio Padrão 45,81
 CV 8,82

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel
50	7928,932	96730,445	0,0820
100	16687,172	78634,594	0,1995
200	25558,711	81781,484	0,3125
400	49494,488	77377,156	0,6397
500	57692,391	69445,648	0,8308



Felbamato

Controlo baixo a 100 ng/mL

	Area	TR	Area (PI)	TR (PI)	TRR	Area relativa	Conc (ng/mL)
Controlo 1	1636,89	1,31	80709,539	3,24	0,404	0,0203	113,91
Controlo 2	1602,72	1,30	88583	3,24	0,401	0,0181	102,96
Controlo 3	1411,72	1,30	94329,547	3,23	0,402	0,0150	87,33
Controlo 4	1405,56	1,30	93463,047	3,24	0,401	0,0150	87,69
Controlo 5	1749,54	1,30	94647,563	3,24	0,401	0,0185	104,92

0,402

Média 99,36
Desvio Padrão 11,58
CV 11,65

Felbamato

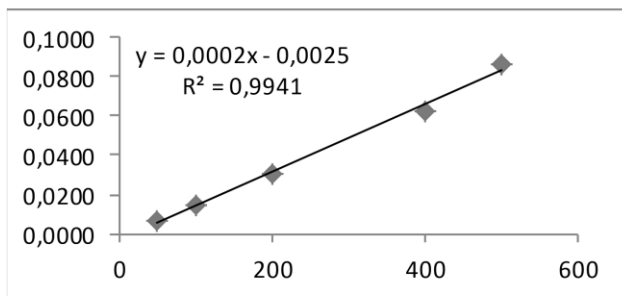
Controlo alto a 500 ng/mL

	Area	TR	Area (PI)	TR (PI)	TRR	Area relativa	Conc (ng/mL)
Controlo 1	7030,94	1,31	79833,992	3,24	0,40	0,0881	452,85
Controlo 2	7067,01	1,31	83846,656	3,24	0,40	0,0843	433,92
Controlo 3	6084,33	1,31	78252,711	3,23	0,41	0,0778	401,26
Controlo 4	7617,73	1,31	81517,18	3,24	0,40	0,0934	479,75
Controlo 5	6920,70	1,3	82166,188	3,23	0,40	0,0842	433,64

TRR médio 0,40

Média 440,28
Desvio Padrão 28,82
CV 6,55

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel
50	721038	96730,445	0,0070
100	1189,779	78634,594	0,0150
200	2506,964	81781484	0,0310
400	4788,538	77377,156	0,0620
500	5983,935	69445,648	0,0860



Fenitoína

Controlo baixo a 100 ng/mL

	Area	TR	Area (PI)	TR (PI)	TRR	Area relativa	Conc (ng/mL)
Controlo 1	325,30	2,53	80709,539	3,24	0,781	0,0040	103,84
Controlo 2	338,99	2,53	88583	3,24	0,781	0,0038	100,45
Controlo 3	356,46	2,52	94329,547	3,23	0,780	0,0038	99,65
Controlo 4	376,28	2,53	93463,047	3,24	0,781	0,0040	103,77
Controlo 5	320,04	2,53	94647,563	3,24	0,781	0,0034	93,02

0,781

Média 100,14

Desvio Padrão 4,41

CV 4,40

Fenitoína

Controlo alto a 500 ng/mL

	Area	TR	Area (PI)	TR (PI)	TRR	Area relativa	Conc (ng/mL)
Controlo 1	2045,19	2,53	79833,992	3,24	0,78	0,0256	463,63
Controlo 2	2086,78	2,53	83846,656	3,24	0,78	0,0249	451,47
Controlo 3	1718,51	2,53	78252,711	3,23	0,78	0,0220	402,68
Controlo 4	2290,46	2,52	81517,18	3,24	0,78	0,0281	504,96
Controlo 5	2055,09	2,52	82166,188	3,23	0,78	0,0250	453,52

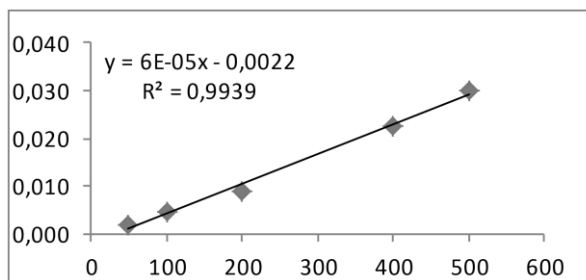
TRR médio 0,78

Média 455,25

Desvio Padrão 36,48

CV 8,01

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel
50	173,641	96730,445	0,002
100	348,92	78634,594	0,004
200	733,334	81781,484	0,009
400	1755,976	77377,156	0,023
500	2093,953	69445,648	0,030



Fenobarbital

Controlo baixo a 100 ng/mL

	Area	TR	Area (PI)	TR (PI)	TRR	Area relativa	Conc (ng/mL)
Controlo 1	84,22	2,15	80709,539	3,24	0,664	0,0010	114,34
Controlo 2	83,03	2,14	88583	3,24	0,660	0,0009	103,73
Controlo 3	83,08	2,14	94329,547	3,23	0,663	0,0009	98,07
Controlo 4	75,36	2,14	93463,047	3,24	0,660	0,0008	90,63
Controlo 5	72,10	2,13	94647,563	3,24	0,657	0,0008	86,17

0,661

Média 98,59
Desvio Padrão 11,10
CV 11,25

Fenobarbital

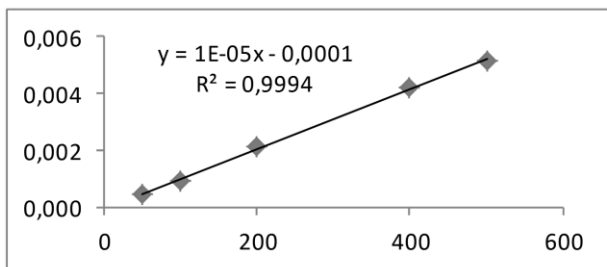
Controlo alto a 500 ng/mL

	Area	TR	Area (PI)	TR (PI)	TRR	Area relativa	Conc (ng/mL)
Controlo 1	400,32	2,13	79833,992	3,24	0,66	0,0050	511,44
Controlo 2	460,27	2,14	83846,656	3,24	0,66	0,0055	558,95
Controlo 3	381,96	2,13	78252,711	3,23	0,66	0,0049	498,11
Controlo 4	418,32	2,13	81517,18	3,24	0,66	0,0051	523,16
Controlo 5	419,82	2,13	82166,188	3,23	0,66	0,0051	520,93

TRR médio 0,66

Média 522,52
Desvio Padrão 22,63
CV 4,33

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel
50	39,671	96730,445	0,000
100	72,502	78634,594	0,001
200	171,988	81781,484	0,002
400	324,383	77377,156	0,004
500	359,638	69445,648	0,005



Gabapentina

Controlo baixo a 100 ng/mL

	Area	TR	Area (PI)	TR (PI)	TRR	Area relativa	Conc (ng/mL)
Controlo 1	812,37	0,56	80709,539	3,24	0,173	0,0101	135,22
Controlo 2	693,25	0,56	88583	3,24	0,173	0,0078	103,23
Controlo 3	587,39	0,56	94329,547	3,23	0,173	0,0062	80,39
Controlo 4	592,28	0,56	93463,047	3,24	0,173	0,0063	81,96
Controlo 5	727,21	0,56	94647,563	3,24	0,173	0,0077	101,19

0,173

Média 100,40
Desvio Padrão 22,15
CV 22,06

Gabapentina

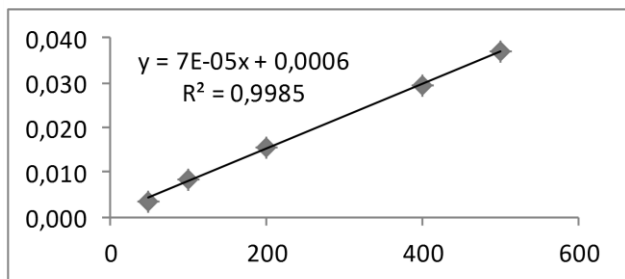
Controlo alto a 500 ng/mL

	Area	TR	Area (PI)	TR (PI)	TRR	Area relativa	Conc (ng/mL)
Controlo 1	3249,17	0,56	79833,992	3,24	0,17	0,0407	572,84
Controlo 2	2609,68	0,56	83846,656	3,24	0,17	0,0311	436,06
Controlo 3	3341,14	0,56	78252,711	3,23	0,17	0,0427	601,38
Controlo 4	2449,04	0,56	81517,18	3,24	0,17	0,0300	420,62
Controlo 5	2908,22	0,56	82166,188	3,23	0,17	0,0354	497,06

TRR médio 0,17

Média 505,59
Desvio Padrão 80,35
CV 15,89

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel
50	338,322	96730,445	0,003
100	662,698	78634,594	0,008
200	1279,06	81781484	0,016
400	2271912	77377,156	0,029
500	2568,23	69445,648	0,037



Lamotrigina

Controlo baixo a 100 ng/mL

	Area	TR	Area (PI)	TR (PI)	TRR	Area relativa	Conc (ng/mL)
Controlo 1	1416,29	0,92	80709,539	3,24	0,284	0,0175	170,48
Controlo 2	1270,20	0,92	88583	3,24	0,284	0,0143	138,39
Controlo 3	897,66	0,91	94329,547	3,23	0,282	0,0095	90,16
Controlo 4	865,79	0,91	93463,047	3,24	0,281	0,0093	87,63
Controlo 5	1454,74	0,91	94647,563	3,24	0,281	0,0154	148,70

0,148

Média 127,07
Desvio Padrão 36,74
CV 28,91

Lamotrigina

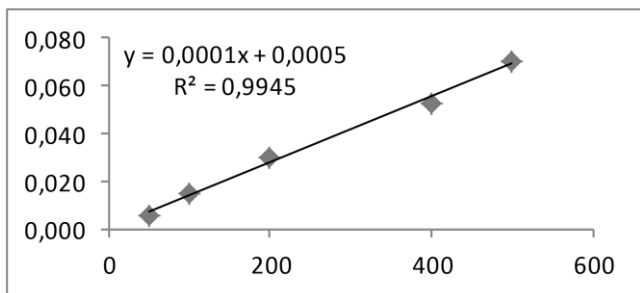
Controlo alto a 500 ng/mL

	Area	TR	Area (PI)	TR (PI)	TRR	Area relativa	Conc (ng/mL)
Controlo 1	5856,76	0,92	79833,992	3,24	0,28	0,0734	728,62
Controlo 2	6474,59	0,92	83846,656	3,24	0,28	0,0772	767,19
Controlo 3	6309,92	0,92	78252,711	3,23	0,28	0,0806	801,35
Controlo 4	4838,56	0,91	81517,18	3,24	0,28	0,0594	588,56
Controlo 5	6422,13	0,91	82166,188	3,23	0,28	0,0782	776,60

TRR médio 0,28

Média 732,47
Desvio Padrão 84,59
CV 11,55

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel
50	565,387	96730,445	0,006
100	1182,923	78634,594	0,015
200	2464,164	81781484	0,030
400	4093,46	77377,156	0,053
500	4894,548	69445,648	0,070



Levetiracetam

Controlo baixo a 100 ng/mL

	Area	TR	Area (PI)	TR (PI)	TRR	Area relativa	Conc (ng/mL)
Controlo 1	5174,36	0,59	80709,539	3,24	0,182	0,0641	130,35
Controlo 2	4810,88	0,59	88583	3,24	0,182	0,0543	114,02
Controlo 3	4694,69	0,59	94329,547	3,23	0,183	0,0498	106,45
Controlo 4	4870,99	0,59	93463,047	3,24	0,182	0,0521	110,36
Controlo 5	5409,80	0,59	94647,563	3,24	0,182	0,0572	118,76

0,182

Média 115,99
Desvio Padrão 9,23
CV 7,96

Levetiracetam

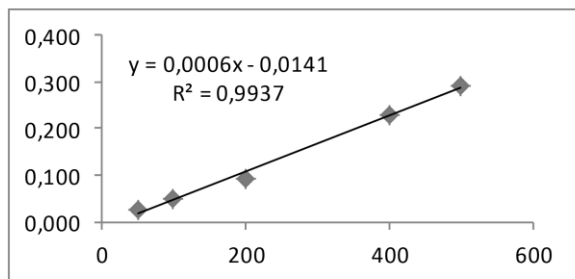
Controlo alto a 500 ng/mL

	Area	TR	Area (PI)	TR (PI)	TRR	Area relativa	Conc (ng/mL)
Controlo 1	22893,55	0,60	79833,992	3,24	0,19	0,2868	501,44
Controlo 2	24016,21	0,60	83846,656	3,24	0,19	0,2864	500,88
Controlo 3	21773,95	0,60	78252,711	3,23	0,19	0,2783	487,25
Controlo 4	23880,35	0,59	81517,18	3,24	0,18	0,2929	511,75
Controlo 5	25877,64	0,60	82166,188	3,23	0,19	0,3149	548,40

TRR médio 0,18

Média 509,95
Desvio Padrão 23,19
CV 4,55

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel
50	2370,535	96730,445	0,025
100	3828,281	78634,594	0,049
200	7445,688	81781,484	0,091
400	17617,77	77377,156	0,228
500	20350,512	69445,648	0,293



Oxcarbazepina

Controlo baixo a 100 ng/mL

	Area	TR	Area (PI)	TR (PI)	TRR	Area relativa	Conc (ng/mL)
Controlo 1	4638,44	2,53	80709,539	3,24	0,781	0,0575	135,54
Controlo 2	4559,90	2,53	88583	3,24	0,781	0,0515	123,55
Controlo 3	4246,95	2,52	94329,547	3,23	0,780	0,0450	110,64
Controlo 4	4196,81	2,52	93463,047	3,24	0,778	0,0449	110,41
Controlo 5	4880,94	2,52	94647,563	3,24	0,778	0,0516	123,74

0,779

Média 120,78
 Desvio Padrão 10,54
 CV 8,73

Oxcarbazepina

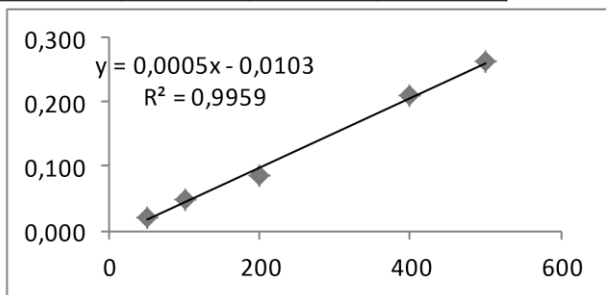
Controlo alto a 500 ng/mL

	Area	TR	Area (PI)	TR (PI)	TRR	Area relativa	Conc (ng/mL)
Controlo 1	19779,40	2,53	79833,992	3,24	0,78	0,2478	516,11
Controlo 2	20584,84	2,52	83846,656	3,24	0,78	0,2455	511,61
Controlo 3	20465,93	2,52	78252,711	3,23	0,78	0,2615	543,67
Controlo 4	22810,88	2,52	81517,18	3,24	0,78	0,2798	580,26
Controlo 5	21230,78	2,52	82166,188	3,23	0,78	0,2584	537,38

TRR médio 0,78

Média 537,81
 Desvio Padrão 27,36
 CV 5,09

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel
50	181568	96730,445	0,019
100	3872,447	78634,594	0,049
200	7105,903	81781484	0,087
400	16343,986	77377,156	0,211
500	18222,119	69445,648	0,262



Primidona

Controlo baixo a 100 ng/mL

	Area	TR	Area (PI)	TR (PI)	TRR	Area relativa	Conc (ng/mL)
Controlo 1	3280,20	1,06	80709,539	3,24	0,327	0,0406	123,11
Controlo 2	3233,62	1,07	88583	3,24	0,330	0,0365	112,76
Controlo 3	3193,08	1,06	94329,547	3,23	0,328	0,0339	106,13
Controlo 4	3104,07	1,07	93463,047	3,24	0,330	0,0332	104,53
Controlo 5	2194,04	1,06	94647,563	3,24	0,327	0,0232	79,45

0,329

Média 105,19
Desvio Padrão 16,14
CV 15,34

Primidona

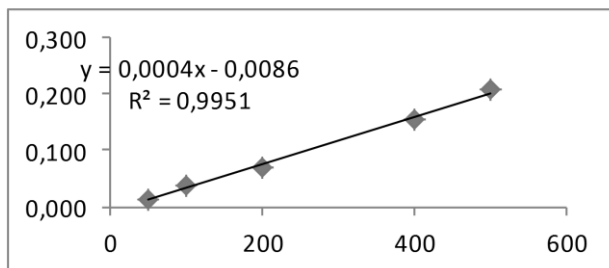
Controlo alto a 500 ng/mL

	Area	TR	Area (PI)	TR (PI)	TRR	Area relativa	Conc (ng/mL)
Controlo 1	11322,40	1,07	79833,992	3,24	0,33	0,1418	376,06
Controlo 2	15305,48	1,07	83846,656	3,24	0,33	0,1825	477,85
Controlo 3	15031,40	1,07	78252,711	3,23	0,33	0,1921	501,72
Controlo 4	15779,47	1,07	81517,18	3,24	0,33	0,1936	505,43
Controlo 5	15701,98	1,07	82166,188	3,23	0,33	0,1911	499,25

TRR médio 0,33

Média 472,06
Desvio Padrão 54,73
CV 11,59

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel
50	1152,162	96730,445	0,012
100	3083,306	78634,594	0,039
200	5771,086	81781484	0,071
400	11870,989	77377,156	0,153
500	14406,434	69445,648	0,207



Rufinamida

Controlo baixo a 100 ng/mL

	Area	TR	Area (PI)	TR (PI)	TRR	Area relativa	Conc (ng/mL)
Controlo 1	4146,72	1,50	80709,539	3,24	0,463	0,0514	122,36
Controlo 2	3914,98	1,50	88583	3,24	0,463	0,0442	107,99
Controlo 3	3447,36	1,50	94329,547	3,23	0,464	0,0365	92,69
Controlo 4	3743,04	1,50	93463,047	3,24	0,463	0,0400	99,70
Controlo 5	4507,25	1,50	94647,563	3,24	0,463	0,0476	114,84

0,463

Média 107,52
Desvio Padrão 11,78
CV 10,96

Rufinamida

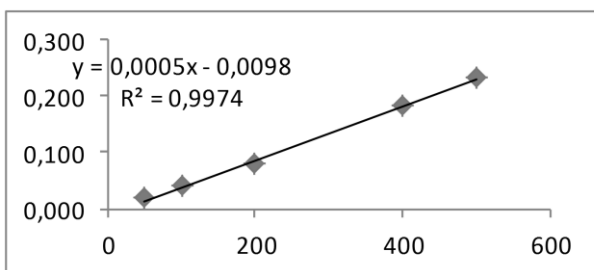
Controlo alto a 500 ng/mL

	Area	TR	Area (PI)	TR (PI)	TRR	Area relativa	Conc (ng/mL)
Controlo 1	19731,63	1,51	79833,992	3,24	0,47	0,2472	513,92
Controlo 2	20467,95	1,50	83846,656	3,24	0,46	0,2441	507,82
Controlo 3	20836,61	1,50	78252,711	3,23	0,46	0,2663	552,15
Controlo 4	20551,17	1,50	81517,18	3,24	0,46	0,2521	523,82
Controlo 5	21523,63	1,50	82166,188	3,23	0,46	0,2620	543,50

TRR médio 0,46

Média 528,24
Desvio Padrão 19,01
CV 3,60

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel
50	1756,722	96730,445	0,018
100	3159,917	78634,594	0,040
200	6441,711	81781,484	0,079
400	14074,674	77377,156	0,182
500	16287,486	69445,648	0,235



Topiramato

Controlo baixo a 100 ng/mL

	Area	TR	Area (PI)	TR (PI)	TRR	Area relativa	Conc (ng/mL)
Controlo 1	131,52	2,75	80709,539	3,24	0,849	0,0016	106,48
Controlo 2	138,24	2,75	88583	3,24	0,849	0,0016	103,03
Controlo 3	121,03	2,74	94329,547	3,23	0,848	0,0013	89,15
Controlo 4	92,13	2,76	93463,047	3,24	0,852	0,0010	74,29
Controlo 5	139,13	2,75	94647,563	3,24	0,849	0,0015	98,50

0,849

Média 94,29

Desvio Padrão 12,93

CV 13,72

Topiramato

Controlo alto a 500 ng/mL

	Area	TR	Area (PI)	TR (PI)	TRR	Area relativa	Conc (ng/mL)
Controlo 1	576,56	2,75	79833,992	3,24	0,85	0,0072	386,10
Controlo 2	668,61	2,75	83846,656	3,24	0,85	0,0080	423,71
Controlo 3	560,46	2,74	78252,711	3,23	0,85	0,0072	383,11
Controlo 4	677,97	2,75	81517,18	3,24	0,85	0,0083	440,84
Controlo 5	660,62	2,74	82166,188	3,23	0,85	0,0080	427,00

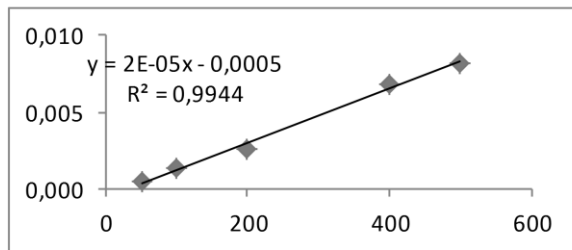
TRR médio 0,85

Média 412,15

Desvio Padrão 25,98

CV 6,30

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel
50	50,997	96730,445	0,001
100	109,694	78634,594	0,001
200	216,471	81781,484	0,003
400	525,973	77377,156	0,007
500	567,864	69445,648	0,008



Zonisamida

Controlo baixo a 100 ng/mL

	Area	TR	Area (PI)	TR (PI)	TRR	Area relativa	Conc (ng/mL)
Controlo 1	162,76	1,50	80709,539	3,24	0,463	0,0020	115,83
Controlo 2	133,40	1,50	88583	3,24	0,463	0,0015	90,29
Controlo 3	124,02	1,50	94329,547	3,23	0,464	0,0013	80,74
Controlo 4	162,33	1,49	93463,047	3,24	0,460	0,0017	101,84
Controlo 5	135,12	1,50	94647,563	3,24	0,463	0,0014	86,38

0,463

Média 95,02
Desvio Padrão 13,97
CV 14,70

Zonisamida

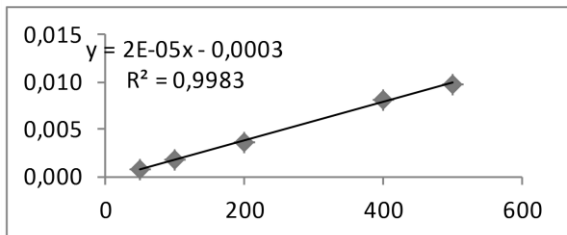
Controlo alto a 500 ng/mL

	Area	TR	Area (PI)	TR (PI)	TRR	Area relativa	Conc (ng/mL)
Controlo 1	748,61	1,50	79833,992	3,24	0,46	0,0094	483,85
Controlo 2	785,15	1,50	83846,656	3,24	0,46	0,0094	483,20
Controlo 3	758,09	1,50	78252,711	3,23	0,46	0,0097	499,38
Controlo 4	766,54	1,50	81517,18	3,24	0,46	0,0094	485,17
Controlo 5	836,08	1,49	82166,188	3,23	0,46	0,0102	523,77

TRR médio 0,46

Média 495,08
Desvio Padrão 17,37
CV 3,51

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel
50	73,566	96730,445	0,001
100	135,884	78634,594	0,002
200	302,536	81781,484	0,004
400	634,378	77377,156	0,008
500	683,272	69445,648	0,010



7.4. Precisão Intermédia

CARBAMAZEPINA

Data	1º DIA	2º DIA	3º DIA	4º DIA	5º DIA
R ²	0,9956	0,9969	0,9933	0,999	0,9942
Declive	0,0016	0,0013	0,0010	0,0010	0,0010
Y0	0,0101	0,0301	0,0268	0,0395	0,0376
Gama Baixa 100 ng/mL					
Replicado 1	124,0	120,2	134,2	99,2	113,4
Replicado 2	121,5	142,3	114,9	103,2	125,3
Replicado 3	121,8	123,9	119,7	94,5	104,5
Média	122,4	128,8	123,0	99,0	114,4
Recuperação	122,4	128,8	123,0	99,0	114,4
Concenc. Média	117,5				
Recuperação Média	117,5				
Repetibilidade (S _r)	8,6				
Between Run (S _{run})	10,5				
Precisão intermédia	13,5				
C.V (%)	9,8				
Gama Média/Alta 500 ng/mL					
Replicado 1	484,2	528,0	510,3	509,8	535,3
Replicado 2	502,5	428,1	508,9	477,4	544,1
Replicado 3	475,4	534,4	512,8	477,9	622,5
Média	487,3	496,8	510,7	488,4	567,3
Recuperação	97,5	99,4	102,1	97,7	113,5
Concenc. Média	510,1				
Recuperação Média	102,0				
Repetibilidade (S _r)	35,8				
Between Run (S _{run})	26,1				
Precisão intermédia	44,3				
C.V (%)	6,5				
C.Vpool	10,4				

FELBAMATO

Data	1º DIA	2º DIA	3º DIA	4º DIA	5º DIA
R ²	0,9933	0,9990	0,9965	0,9969	0,9969
Declive	0,0002	0,0001	6,00E-05	5,00E-05	2,00E-05
Y0	-0,0023	0,0024	0,0039	0,0041	0,0082
Gama Baixa 100 ng/mL					
Replicado 1	112,9	104,9	102,4	90,4	116,1
Replicado 2	102,0	95,0	120,2	98,8	93,0
Replicado 3	103,9	109,1	97,9	100,1	107,0
Média	106,3	103,0	106,8	96,4	105,4
Recuperação	106,3	103,0	106,8	96,4	105,4
Concenc. Média	103,6				
Recuperação Média	103,6				
Repetibilidade (S _r)	8,8				
Between Run (S _{run})	2,8				
Precisão intermédia	9,2				
C.V (%)	4,1				
Gama Média/A Ita 500 ng/mL					
Replicado 1	451,8	489,9	528,6	416,7	616,0
Replicado 2	478,7	374,5	531,2	515,6	584,3
Replicado 3	432,6	534,2	602,3	431,6	576,8
Média	454,4	466,2	554,0	454,6	592,3
Recuperação	90,9	93,2	110,8	90,9	118,5
Concenc. Média	504,3				
Recuperação Média	100,9				
Repetibilidade (S _r)	49,7				
Between Run (S _{run})	57,7				
Precisão intermédia	76,2				
C.V (%)	12,8				
C.Vpool	11,5				

FENITOÍNA

Data	1º DIA	2º DIA	3º DIA	4º DIA	5º DIA
R ²	0,9939	0,9990	0,9922	0,9984	0,9990
Declive	6,00E-05	5,00E-05	3,00E-05	3,00E-05	2,00E-05
Y0	-0,0022	0,0004	0,0009	0,0013	0,0009
Gama Baixa 100 ng/mL					
Replicado 1	103,8	95,3	112,4	89,9	134,7
Replicado 2	100,4	136,9	93,3	73,1	135,7
Replicado 3	103,8	97,8	111,5	97,0	151,9
Média	102,7	110,0	105,7	86,7	140,8
Recuperação	102,7	110,0	105,7	86,7	140,8
Concenc. Média	109,2				
Recuperação Média	109,2				
Repetibilidade (S _r)	13,5				
Between Run (S _{run})	18,2				
Precisão intermédia	22,6				
C.V (%)	18,1				
Gama Média/Alta 500 ng/mL					
Replicado 1	463,6	494,7	534,9	496,0	619,8
Replicado 2	505,0	557,6	531,3	522,1	638,8
Replicado 3	453,5	563,0	533,9	585,0	628,9
Média	474,0	538,4	533,4	534,3	629,2
Recuperação	94,8	107,7	106,7	106,9	125,8
Concenc. Média	541,9				
Recuperação Média	108,4				
Repetibilidade (S _r)	29,6				
Between Run (S _{run})	52,9				
Precisão intermédia	60,6				
C.V (%)	10,3				
C.Vpool	16,7				

FENOBARBITAL

Data	1° DIA	2° DIA	3° DIA	4° DIA	5° DIA
R ²	0,9994	0,9960	0,9982	0,9951	0,9996
Declive	1,00E-05	6,00E-06	5,00E-06	6,00E-06	9,00E-06
Y0	-0,00010	0,00020	0,00008	0,0002	0,0010
Gama Baixa 100 ng/mL					
Replicado 1	114,3	103,3	95,6	94,0	97,4
Replicado 2	103,7	110,3	124,8	103,1	91,8
Replicado 3	98,1	109,4	112,3	90,9	98,2
Média	105,4	107,6	110,9	96,0	95,8
Recuperação	105,4	107,6	110,9	96,0	95,8
Concenc. Média	103,1				
Recuperação Média	103,1				
Repetibilidade (S _r)	8,4				
Between Run (S _{run})	4,9				
Precisão intermédia	9,7				
C.V (%)	6,7				
Gama Média/Alta 500 ng/mL					
Replicado 1	558,9	590,0	508,6	540,7	485,2
Replicado 2	523,2	552,7	459,0	491,6	504,0
Replicado 3	520,9	608,7	522,9	580,8	496,0
Média	534,3	583,8	496,8	537,7	495,1
Recuperação	106,9	116,8	99,4	107,5	99,0
Concenc. Média	529,6				
Recuperação Média	105,9				
Repetibilidade (S _r)	29,9				
Between Run (S _{run})	32,0				
Precisão intermédia	43,8				
C.V (%)	6,9				
C.V pool	8,8				

GABAPENTINA

Data	1º DIA	2º DIA	3º DIA	4º DIA	5º DIA
R ²	0,9985	0,9975	0,9987	0,9923	0,9967
Declive	7,00E-05	2,00E-05	3,00E-06	3,00E-05	6,00E-06
Y0	0,0006	0,0024	0,0019	0,0012	0,0005
Gama Baixa 100 ng/mL					
Replicado 1	135,2	137,9	141,8	96,9	81,0
Replicado 2	103,2	122,0	150,9	73,4	90,7
Replicado 3	101,2	160,8	154,4	127,9	77,5
Média	113,2	140,2	149,0	99,4	83,1
Recuperação	113,2	140,2	149,0	99,4	83,1
Concenc. Média	117,0				
Recuperação Média	117,0				
Repetibilidade (S _r)	17,8				
Between Run (S _{run})	25,6				
Precisão intermédia	31,2				
C.V (%)	23,6				
Gama Média/Alta 500 ng/mL					
Replicado 1	572,8	449,4	591,8	465,9	478,5
Replicado 2	436,1	526,8	522,9	404,7	524,5
Replicado 3	497,1	642,9	645,7	435,5	481,1
Média	502,0	539,7	586,8	435,4	494,7
Recuperação	100,4	107,9	117,4	87,1	98,9
Concenc. Média	511,7				
Recuperação Média	102,3				
Repetibilidade (S _r)	62,6				
Between Run (S _{run})	43,0				
Precisão intermédia	76,0				
C.V (%)	11,0				
C.Vpool	20,4				

LAMOTRIGINA

Data	1º DIA	2º DIA	3º DIA	4º DIA	5º DIA
R ²	0,9945	0,9919	0,9933	0,9928	0,9959
Declive	0,0001	0,0002	1,00E-04	1,00E-04	0,0001
Y0	0,0005	-0,0015	0,0028	0,0031	0,0024
Gama Baixa 100 ng/mL					
Replicado 1	138,4	95,9	102,6	129,1	106,9
Replicado 2	90,2	101,6	120,2	127,5	119,4
Replicado 3	87,6	104,6	104,7	94,4	96,2
Média	105,4	100,7	109,1	117,0	107,5
Recuperação	105,4	100,7	109,1	117,0	107,5
Concenc. Média	107,9				
Recuperação Média	107,9				
Repetibilidade (S _r)	17,0				
Between Run (S _{run})	7,8				
Precisão intermédia	18,7				
C.V (%)	5,5				
Gama Média/Alta 500 ng/mL					
Replicado 1	728,6	464,2	560,9	647,9	554,0
Replicado 2	767,2	355,0	541,3	627,4	613,5
Replicado 3	588,6	444,4	499,0	774,0	537,7
Média	694,8	421,2	533,7	683,1	568,4
Recuperação	139,0	84,2	106,7	136,6	113,7
Concenc. Média	580,3				
Recuperação Média	116,1				
Repetibilidade (S _r)	65,0				
Between Run (S _{run})	0,2				
Precisão intermédia	65,0				
C.V (%)	19,5				
C.V.pool	16,3				

LEVETIRACETAM

Data	1º DIA	2º DIA	3º DIA	4º DIA	5º DIA
R ²	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Declive	0,0006	0,0003	0,0002	0,0002	0,0001
Y0	-0,0141	-0,0002	0,0033	0,0072	0,0043
Gama Baixa 100 ng/mL					
Replicado 1	114,0	106,8	113,8	78,8	141,5
Replicado 2	106,4	102,6	90,0	69,4	136,9
Replicado 3	110,4	104,4	122,2	93,4	129,2
Média	110,3	104,6	108,7	80,5	135,9
Recuperação	110,3	104,6	108,7	80,5	135,9
Concenc. Média	108,0				
Recuperação Média	108,0				
Repetibilidade (S _r)	3,2				
Between Run (S _{run})	1,4				
Precisão intermédia	3,5				
C.V (%)	18,2				
Gama Média/Alta 500 ng/mL					
Replicado 1	501,4	555,3	395,7	493,2	745,9
Replicado 2	500,9	513,2	374,5	431,9	752,8
Replicado 3	511,7	452,7	444,7	530,7	725,8
Média	504,7	507,1	405,0	485,3	741,5
Recuperação	100,9	101,4	81,0	97,1	148,3
Concenc. Média	528,7				
Recuperação Média	105,7				
Repetibilidade (S _r)	36,5				
Between Run (S _{run})	124,2				
Precisão intermédia	129,5				
C.V (%)	23,8				
C.Vpool	23,2				

OXCARBAZEPINA

Data	1º DIA	2º DIA	3º DIA	4º DIA	5º DIA
R ²	0,9959	0,9994	0,9930	0,9952	0,9976
Declive	0,0005	0,0004	0,0002	0,0002	0,0002
Y0	-0,0103	-0,0006	0,0052	0,0060	0,0051
Gama Baixa 100 ng/mL					
Replicado 1	110,6	99,4	124,5	100,4	96,5
Replicado 2	110,4	113,3	110,9	130,7	91,8
Replicado 3	123,7	100,0	119,5	104,9	120,6
Média	114,9	104,2	118,3	112,0	102,9
Recuperação	114,9	104,2	118,3	112,0	102,9
Concenc. Média	110,5				
Recuperação Média	110,5				
Repetibilidade (S _r)	11,6				
Between Run (S _{run})	0,6				
Precisão intermédia	11,6				
C.V (%)	6,1				
Gama Média/Alta 500 ng/mL					
Replicado 1	516,1	503,1	595,3	567,2	431,0
Replicado 2	511,6	490,1	548,6	551,3	447,4
Replicado 3	537,4	387,6	613,8	636,4	444,7
Média	521,7	460,2	585,9	585,0	441,0
Recuperação	104,3	92,0	117,2	117,0	88,2
Concenc. Média	518,8				
Recuperação Média	103,8				
Repetibilidade (S _r)	38,6				
Between Run (S _{run})	0,2				
Precisão intermédia	38,6				
C.V (%)	13,1				
C.V pool	12,2				

PRIMIDONA

Data	1º DIA	2º DIA	3º DIA	4º DIA	5º DIA
R ²	0,9951	0,9977	0,9989	0,9925	1,0000
Declive	0,0004	0,0002	0,0001	2,00E-04	0,0002
Y0	-0,0086	-0,0072	0,0068	0,0070	0,0106
Gama Baixa 100 ng/mL					
Replicado 1	112,8	119,9	88,4	72,4	103,3
Replicado 2	106,1	136,2	99,2	85,1	97,1
Replicado 3	104,5	118,7	145,2	80,2	123,1
Média	107,8	124,9	110,9	79,2	107,8
Recuperação	107,8	124,9	110,9	79,2	107,8
Concenc. Média	106,1				
Recuperação Média	106,1				
Repetibilidade (S _r)	15,8				
Between Run (S _{run})	13,9				
Precisão intermédia	21,0				
C.V (%)	15,7				
Gama Média/Alta 500 ng/mL					
Replicado 1	501,7	598,0	541,4	550,0494463	602,3
Replicado 2	505,4	564,4	587,9	365,462144	574,0
Replicado 3	499,3	449,7	508,3	454,330377	557,3
Média	502,1	537,4	545,9	456,6	577,9
Recuperação	100,4	107,5	109,2	91,3	115,6
Concenc. Média	524,0				
Recuperação Média	104,8				
Repetibilidade (S _r)	57,8				
Between Run (S _{run})	32,1				
Precisão intermédia	66,1				
C.V (%)	8,8				
C.Vpool	14,7				

RUFINAMIDA

Data	1º DIA	2º DIA	3º DIA	4º DIA	5º DIA
R ²	0,9974	0,9967	0,9899	0,99	0,9974
Declive	0,0005	0,0005	0,0003	0,0003	0,0003
Y0	-0,0098	-0,0009	0,0047	0,0105	0,0081
Gama Baixa 100 ng/mL					
Replicado 1	108,0	106,1	136,3	104,9	96,2
Replicado 2	99,7	105,1	114,4	93,5	90,9
Replicado 3	114,8	103,9	119,7	113,6	93,4
Média	107,5	105,0	123,5	104,0	93,5
Recuperação	107,5	105,0	123,5	104,0	93,5
Concenc. Média	106,7				
Recuperação Média	106,7				
Repetibilidade (S _r)	7,7				
Between Run (S _{run})	9,8				
Precisão intermédia	12,5				
C.V (%)	10,1				
Gama Média/Alta 500 ng/mL					
Replicado 1	513,9	529,8	563,5	545,7	444,7
Replicado 2	507,8	552,7	555,7	476,3	515,0
Replicado 3	523,8	503,7	536,5	588,5	526,3
Média	515,2	528,7	551,9	536,8	495,3
Recuperação	103,0	105,7	110,4	107,4	99,1
Concenc. Média	525,6				
Recuperação Média	105,1				
Repetibilidade (S _r)	34,7				
Between Run (S _{run})	7,8				
Precisão intermédia	35,6				
C.V (%)	4,1				
C.Vpool	9,7				

TOPIRAMATO

Data	1º DIA	2º DIA	3º DIA	4º DIA	5º DIA
R ²	0,9944	0,9963	0,9996	0,997	0,9986
Declive	2,00E-05	8,00E-06	7,00E-06	3,00E-06	4,00E-06
Y0	-0,0005	-0,00009	0,0000	2,00E-04	-0,0001
Gama Baixa 100 ng/mL					
Replicado 1	106,5	103,6	89,8	28,4	94,7
Replicado 2	103,0	113,3	105,9	89,2	96,6
Replicado 3	98,5	114,4	108,2	80,3	94,0
Média	102,7	110,4	101,3	65,9	95,1
Recuperação	102,7	110,4	101,3	65,9	95,1
Concenc. Média	95,1				
Recuperação Média	95,1				
Repetibilidade (S _r)	15,7				
Between Run (S _{run})	14,6				
Precisão intermédia	21,4				
C.V (%)	18,1				
Gama Média/Alta 500 ng/mL					
Replicado 1	423,7	561,6	474,1	695,0	443,1
Replicado 2	440,8	449,1	431,9	475,6	454,9
Replicado 3	427,0	545,0	457,7	718,7	437,5
Média	430,5	518,6	454,5	629,8	445,2
Recuperação	86,1	103,7	90,9	126,0	89,0
Concenc. Média	495,7				
Recuperação Média	99,1				
Repetibilidade (S _r)	66,7				
Between Run (S _{run})	72,5				
Precisão intermédia	98,6				
C.V (%)	16,6				
C.Vpool	19,3				

ZONISAMIDA

Data	1º DIA	2º DIA	3º DIA	4º DIA	5º DIA
R ²	0,9983	1,0	1,0	1,0	1,0
Declive	2,00E-05	9,00E-06	6,00E-06	6,00E-06	1,00E-05
Y0	-0,0003	0,0001	-0,0001	0,0003	0,0008
Gama Baixa 100 ng/mL					
Replicado 1	115,8	102,7	116,9	77,7	100,7
Replicado 2	90,3	114,1	118,8	74,7	105,5
Replicado 3	101,8	118,1	121,1	90,9	111,4
Média	102,7	111,6	118,9	81,1	105,9
Recuperação	102,7	111,6	118,9	81,1	105,9
Concenc. Média	104,0				
Recuperação Média	104,0				
Repetibilidade (S _r)	8,2				
Between Run (S _{run})	13,4				
Precisão intermédia	15,7				
C.V (%)	13,7				
Gama Média/Alta 500 ng/mL					
Replicado 1	499,4	488,7	447,3	492,8	566,5
Replicado 2	485,2	475,4	515,1	434,4	534,5
Replicado 3	523,8	508,9	517,0	590,8	532,9
Média	502,8	491,0	493,1	506,0	544,6
Recuperação	100,6	98,2	98,6	101,2	108,9
Concenc. Média	507,5				
Recuperação Média	101,5				
Repetibilidade (S _r)	42,1				
Between Run (S _{run})	10,9				
Precisão intermédia	43,5				
C.V (%)	4,3				
C.Vpool	12,1				

7.5. Exactidão

CARBAMAZEPINA

Data	1° DIA	2° DIA	3° DIA	4° DIA	5° DIA
Equação	$y = 0,0016x + 0,0101$	$y = 0,0013x + 0,0301$	$y = 0,001x + 0,0268$	$y = 0,001x + 0,0395$	$y = 0,001x + 0,0376$
Gama Baixa 100 ng					
Média	122,4	128,8	123,0	99,0	114,4
Recuperação	122,4	128,8	123,0	99,0	114,4
Recup. média	117,5				
Desvio padrão	11,57				
C.V (%)	9,8				
N	5				
Texp	3,38				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	5,2				
Incerteza padrão rel.	0,044				
Gama Média/Alta 500 ng					
Média	487,3	496,8	510,7	488,4	567,3
Recuperação	97,5	99,4	102,1	97,7	113,5
Concenc. Média	102,0				
Desvio padrão	6,66				
C.V (%)	6,5				
N	5				
Texp	0,68				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	3,0				
Incerteza padrão rel.	0,030				

FELBAMATO

Data	1° DIA	2° DIA	3° DIA	4° DIA	5° DIA
Equação	$y = 0,0002x - 0,0023$	$y = 0,0001x + 0,0024$	$y = 6E-05x + 0,0039$	$y = 5E-05x + 0,0041$	$y = 2E-05x + 0,0082$
Gama Baixa 100 ng					
Média	106,3	103,0	106,8	96,4	105,4
Recuperação	106,3	103,0	106,8	96,4	105,4
Recup. média	103,6				
Desvio padrão	4,26				
C.V (%)	4,1				
N	5				
Texp	1,88				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	1,9				
Incerteza padrão rel.	0,018				
Gama Média/Alta 500 ng					
Média	454,4	466,2	554,0	454,6	592,3
Recuperação	90,9	93,2	110,8	90,9	118,5
Concenc. Média	100,9				
Desvio padrão	12,90				
C.V (%)	12,8				
N	5				
Texp	0,15				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	5,8				
Incerteza padrão rel.	0,058				

FENITOÍNA

Data	1° DIA	2° DIA	3° DIA	4° DIA	5° DIA
Equação	$y = 6E-05x - 0,0022$	$y = 5E-05x + 0,0004$	$y = 3E-05x + 0,0009$	$y = 3E-05x + 0,0013$	$y = 2E-05x + 0,0009$
Gama Baixa 100 ng					
Média	102,7	110,0	105,7	86,7	140,8
Recuperação	102,7	110,0	105,7	86,7	140,8
Recup. média	109,2				
Desvio padrão	19,75				
C.V (%)	18,1				
N	5				
Texp	1,04				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	8,8				
Incerteza padrão rel.	0,081				
Gama Média/Alta 500 ng					
Média	474,0	538,4	533,4	534,3	629,2
Recuperação	94,8	107,7	106,7	106,9	125,8
Concenc. Média	108,4				
Desvio padrão	11,12				
C.V (%)	10,3				
N	5				
Texp	1,68				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	5,0				
Incerteza padrão rel.	0,050				

FENOBARBITAL

Data	1° DIA	2° DIA	3° DIA	4° DIA	5° DIA
Equação	$y = 1E-05x - 0,0001$	$y = 6E-06x + 0,0002$	$y = 5E-06x + 8E-05$	$y = 6E-06x + 0,0002$	$y = 9E-06x + 0,001$
Gama Baixa 100 ng					
Média	105,4	107,6	110,9	96,0	95,8
Recuperação	105,4	107,6	110,9	96,0	95,8
Recup. média	103,1				
Desvio padrão	6,91				
C.V (%)	6,7				
N	5				
Texp	1,02				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	3,1				
Incerteza padrão rel.	0,030				
Gama Média/Alta 500 ng					
Média	534,3	583,8	496,8	537,7	495,1
Recuperação	106,9	116,8	99,4	107,5	99,0
Concenc. Média	105,9				
Desvio padrão	7,28				
C.V (%)	6,9				
N	5				
Texp	1,82				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	3,3				
Incerteza padrão rel.	0,033				

GABAPENTINA

Data	1º DIA	2º DIA	3º DIA	4º DIA	5º DIA
Equação	$y = 7E-05x + 0,0006$	$y = 2E-05x + 0,0024$	$y = 3E-06x + 0,0019$	$y = 3E-05x + 0,0012$	$y = 6E-06x + 0,0005$
Gama Baixa 100 ng					
Média	113,2	140,2	149,0	99,4	83,1
Recuperação	113,2	140,2	149,0	99,4	83,1
Recup. média	117,0				
Desvio padrão	27,57				
C.V (%)	23,6				
N	5				
Texp	1,38				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	12,3				
Incerteza padrão rel.	0,105				
Gama Média/Alta 500 ng					
Média	502,0	539,7	586,8	435,4	494,7
Recuperação	100,4	107,9	117,4	87,1	98,9
Concenc. Média	102,3				
Desvio padrão	11,24				
C.V (%)	11,0				
N	5				
Texp	0,47				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	5,0				
Incerteza padrão rel.	0,050				

LAMOTRIGINA

Data	1º DIA	2º DIA	3º DIA	4º DIA	5º DIA
Equação	$y = 0,0001x + 0,0005$	$y = 0,0002x - 0,0015$	$y = 1E-04x + 0,0028$	$y = 0,0001x + 0,0031$	$y = 0,0001x + 0,0024$
Gama Baixa 100 ng					
Média	105,4	100,7	109,1	117,0	107,5
Recuperação	105,4	100,7	109,1	117,0	107,5
Recup. média	107,9				
Desvio padrão	5,98				
C.V (%)	5,5				
N	5				
Texp	2,97				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	2,7				
Incerteza padrão rel.	0,025				
Gama Média/Alta 500 ng					
Média	694,8	421,2	533,7	683,1	568,4
Recuperação	139,0	84,2	106,7	136,6	113,7
Concenc. Média	116,1				
Desvio padrão	22,65				
C.V (%)	19,5				
N	5				
Texp	1,58				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	10,1				
Incerteza padrão rel.	0,101				

Determinação de Medicamentos Antiepilépticos e Anticonvulsivantes por UPLC-MS/MS

LEVETIRACETAM

Data	1° DIA	2° DIA	3° DIA	4° DIA	5° DIA
Equação	$y = 0,0006x - 0,0141$	$y = 0,0003x - 0,0002$	$y = 0,0002x + 0,0033$	$y = 0,0002x + 0,0072$	$y = 0,0001x + 0,0043$
Gama Baixa 100 ng					
Média	110,3	104,6	108,7	80,5	135,9
Recuperação	110,3	104,6	108,7	80,5	135,9
Recup. média	108,0				
Desvio padrão	19,68				
C.V (%)	18,2				
N	5				
Texp	0,91				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	8,8				
Incerteza padrão rel.	0,081				
Gama Média/Alta 500 ng					
Média	504,7	507,1	405,0	485,3	741,5
Recuperação	100,9	101,4	81,0	97,1	148,3
Concenc. Média	105,7				
Desvio padrão	25,20				
C.V (%)	23,8				
N	5				
Texp	0,51				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	11,3				
Incerteza padrão rel.	0,113				

OXCARBAZEPINA

Data	1° DIA	2° DIA	3° DIA	4° DIA	5° DIA
Equação	$y = 0,0005x - 0,0103$	$y = 0,0004x - 0,0006$	$y = 0,0002x + 0,0052$	$y = 0,0002x + 0,006$	$y = 0,0002x + 0,0051$
Gama Baixa 100 ng					
Média	114,9	104,2	118,3	112,0	102,9
Recuperação	114,9	104,2	118,3	112,0	102,9
Recup. média	110,5				
Desvio padrão	6,69				
C.V (%)	6,1				
N	5				
Texp	3,50				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	3,0				
Incerteza padrão rel.	0,027				
Gama Média/Alta 500 ng					
Média	521,7	460,2	585,9	585,0	441,0
Recuperação	104,3	92,0	117,2	117,0	88,2
Concenc. Média	103,8				
Desvio padrão	13,55				
C.V (%)	13,1				
N	5				
Texp	0,62				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	6,1				
Incerteza padrão rel.	0,061				

PRIMIDONA

Data	1° DIA	2° DIA	3° DIA	4° DIA	5° DIA
Equação	$y = 0,0004x - 0,0086$	$y = 0,0002x - 0,0072$	$y = 0,0001x + 0,0068$	$y = 0,0002x + 0,007$	$y = 0,0002x + 0,0106$
Gama Baixa 100 ng					
Média	107,8	124,9	110,9	79,2	107,8
Recuperação	107,8	124,9	110,9	79,2	107,8
Recup. média	106,1				
Desvio padrão	16,62				
C.V (%)	15,7				
N	5				
Texp	0,83				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	7,4				
Incerteza padrão rel.	0,070				
Gama Média/Alta 500 ng					
Média	502,1	537,4	545,9	456,6	577,9
Recuperação	100,4	107,5	109,2	91,3	115,6
Concenc. Média	104,8				
Desvio padrão	9,26				
C.V (%)	8,8				
N	5				
Texp	1,16				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	4,1				
Incerteza padrão rel.	0,041				

RUFINAMIDA

Data	1° DIA	2° DIA	3° DIA	4° DIA	5° DIA
Equação	$y = 0,0005x - 0,0098$	$y = 0,0005x - 0,0009$	$y = 0,0003x + 0,0047$	$y = 0,0003x + 0,0105$	$y = 0,0003x + 0,0081$
Gama Baixa 100 ng					
Média	107,5	105,0	123,5	104,0	93,5
Recuperação	107,5	105,0	123,5	104,0	93,5
Recup. média	106,7				
Desvio padrão	10,81				
C.V (%)	10,1				
N	5				
Texp	1,39				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	4,8				
Incerteza padrão rel.	0,045				
Gama Média/Alta 500 ng					
Média	515,2	528,7	551,9	536,8	495,3
Recuperação	103,0	105,7	110,4	107,4	99,1
Concenc. Média	105,1				
Desvio padrão	4,30				
C.V (%)	4,1				
N	5				
Texp	2,66				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	1,9				
Incerteza padrão rel.	0,019				

Determinação de Medicamentos Antiepiléticos e Anticonvulsivantes por UPLC-MS/MS

TOPIRAMATO

Data	1º DIA	2º DIA	3º DIA	4º DIA	5º DIA
Equação	$y = 2E-05x - 0,0005$	$y = 8E-06x - 9E-05$	$y = 7E-06x - 2E-05$	$y = 3E-06x + 0,0002$	$y = 4E-06x - 5E-05$
Gama Baixa 100 ng					
Média	102,7	110,4	101,3	65,9	95,1
Recuperação	102,7	110,4	101,3	65,9	95,1
Recup. média	95,1				
Desvio padrão	17,19				
C.V (%)	18,1				
N	5				
Texp	0,64				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	7,7				
Incerteza padrão rel.	0,081				
Gama Média/Alta 500 ng					
Média	430,5	518,6	454,5	629,8	445,2
Recuperação	86,1	103,7	90,9	126,0	89,0
Concenc. Média	99,1				
Desvio padrão	16,43				
C.V (%)	16,6				
N	5				
Texp	0,12				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	7,3				
Incerteza padrão rel.	0,073				

ZONISAMIDA

Data	1º DIA	2º DIA	3º DIA	4º DIA	5º DIA
Equação	$y = 2E-05x - 0,0003$	$y = 9E-06x + 0,0001$	$y = 6E-06x - 7E-05$	$y = 6E-06x + 0,0003$	$y = 1E-05x + 0,0008$
Gama Baixa 100 ng					
Média	102,7	111,6	118,9	81,1	105,9
Recuperação	102,7	111,6	118,9	81,1	105,9
Recup. média	104,0				
Desvio padrão	14,25				
C.V (%)	13,7				
N	5				
Texp	0,63				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	6,4				
Incerteza padrão rel.	0,061				
Gama Média/Alta 500 ng					
Média	502,8	491,0	493,1	506,0	544,6
Recuperação	100,6	98,2	98,6	101,2	108,9
Concenc. Média	101,5				
Desvio padrão	4,34				
C.V (%)	4,3				
N	5				
Texp	0,77				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	1,9				
Incerteza padrão rel.	0,019				

Nota: Como se está a usar resultados em percentagem o cálculo foi feito, tal que:

$$T_{exp} = 100 - \text{Recuperação} \text{ I} / \text{Incerteza R}$$