

Sandra Cristina Simões Fernandes

# Determinação de Sertralina, Venlafaxina e seus Metabólitos Activos, em Sangue e Urina, por UPLC-MS/MS

Mestrado em Química Forense

Departamento de Química

FCTUC

Junho 2013



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Sandra Cristina Simões Fernandes

**DETERMINAÇÃO DE SERTRALINA,  
VENLAFAXINA E SEUS METABOLITOS  
ACTIVOS, EM SANGUE E URINA, POR  
UPLC-MS/MS**

**Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química, Área de  
especialização em Química Forense**

Mestre João Miguel Franco

Dra. Paula Proença e Cunha

Professora Doutora Teresa Pinho e Melo

**Junho 2013**

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



Em memória de meu pai,  
Jorge Manuel das Neves Fernandes



# Agradecimentos

Em todas as etapas da nossa vida encontramos-nos rodeados de indivíduos extraordinários que nos dão o seu apoio, carinho e dedicação.

Com esta dissertação termina mais uma escala nesta minha incerta viagem, e tal nunca teria sido possível sem aqueles que estiveram a meu lado. Após ter perdido algum tempo a pensar nesta questão, não encontro melhor maneira de agradecer a estas pessoas por tudo o que fizeram.

À Dra. Paula Proença, o meu mais sincero agradecimento pela orientação, pela transmissão de conhecimentos, pelo constante apoio, pela elevada exigência e incrível confiança, pelo contínuo empenho neste trabalho e pela sua inestimável paciência.

Ao Dr. Miguel Franco agradeço a oportunidade única que me foi concedida, a confiança e a disponibilidade.

À Professora Doutora Teresa Pinho e Melo, o meu sincero agradecimento e reconhecimento pela orientação, pela entrega a este trabalho, pela preciosa ajuda e pela constante disponibilidade.

À Dra. Carla Mostra agradeço pela sua incrível paciência, pelo conhecimento transmitido e por todo o apoio.

À Joana Costa, o meu mais profundo agradecimento pela simpatia, pelas conversas, pela amizade, por todas as importantes ajudas, e, mais ainda, por todas aquelas pequenas coisas.

A todos os elementos do Serviço de Química e Toxicologia Forenses da Delegação do Centro agradeço pela hospitalidade, contínuo apoio, carinho e boa disposição. Um especial agradecimento ao Fernando, à Alice e à Dona Helena pela amizade e pelo sorriso nos dias mais cinzentos.

Aos meus avós, José Maria e Adelaide, à minha mãe, Paula, e ao meu irmão, Gabriel, por toda a paciência, suporte e valiosos conselhos. Por serem o meu porto de abrigo, o meu local de tranquilidade, por perdoarem as minhas falhas de carácter e me apoiarem em todas

---

as minhas decisões. Em especial, ao Gabriel que, mesmo sendo irmão mais novo, tem sido o meu suporte nos últimos 12 meses. “Vamos andando, um dia de cada vez!”

Ao meu padrinho, José Augusto, um irmão mais velho que nunca tive, que, mesmo estando a mais de 1600 km de distância, está sempre presente, com as palavras certas no momento certo.

Ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra fico grata por me ter sido permitido frequentar o Mestrado em Química Forense.

Ao Instituto Nacional de Medicina Legal e de Ciências Forenses agradeço por me ter sido permitida a realização deste projecto.

A todos aqueles que, não estando aqui mencionados, de alguma forma me apoiaram e ajudaram a cumprir esta meta, um muito obrigada.

---

“Bad times have scientific value.  
These are occasions a good learner would not miss.”

*Ralph Waldo Emerson*





---

# R esumo

Os fármacos antidepressivos são hoje comercializados em grande número e variedade, o que culmina na frequente detecção destes em análises de triagem. A utilização de fármacos antidepressivos no tratamento de transtornos mentais apresenta consequências adversas para o indivíduo, tanto a nível físico como psicológico do paciente. Estas alterações culminam não raras vezes em comportamentos desviantes ou quadros clínicos graves. A possibilidade de ocorrerem tais alterações torna fundamental a implementação de métodos analíticos de determinação de antidepressivos em amostras biológicas, quer em contexto clínico quer no âmbito da toxicologia forense.

A sertralina e a venlafaxina são dois fármacos antidepressivos de nova geração, distintos entre si. Estes dois compostos estão entre os mais comercializados não apenas em Portugal, mas também a nível mundial. A necessidade do desenvolvimento e validação de um método analítico para a determinação destas duas substâncias surge devido à significativa prevalência de resultados com concentrações muito elevadas de sertralina ou venlafaxina. Possuindo ambos os compostos metabolitos activos, torna-se pertinente a determinação simultânea destes, pois poderão contribuir terapêuticamente com as suas actividades farmacológicas. O direccionamento deste trabalho para a determinação em sangue e urina assenta, essencialmente, no facto de cada uma destas matrizes ser a mais indicada para certo tipo de análises, e por se pretender criar um método que possa ser utilizado para efectuar análises toxicológicas de amostras reais, quer em contexto clínico quer forense.

O método proposto inclui como passo extractivo a extracção em fase sólida, com recurso a colunas Oasis HLB, tendo sido utilizada uma diluição diferente para cada um dos tipos de amostras. O padrão interno escolhido foi o zolpidem-d6. As análises foram efectuadas com recurso a um sistema UPLC-MS/MS, com ionização por electrospray e análise por triplo quadrupolo. A separação cromatográfica foi efectuada com recurso a uma coluna analítica Acquity UPLC HSS T3. A fase móvel utilizada consistiu numa mistura de acetoneitrilo e solução aquosa de ácido fórmico a 0,1%, num gradiente de concentração ao longo da separação cromatográfica e com um fluxo de 0,5 mL/min.

---

A validação do método incluiu o estudo de diversos parâmetros definidos pelo Serviço de Química e Toxicologia Forenses da Delegação do Centro (SQTF-DC) do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, Instituto Público (INMLCF, I.P.), nomeadamente a selectividade, eficiência de extracção, linearidade, precisão, efeito matriz, entre outros. O método demonstrou ser selectivo e específico para a determinação de sertralina e venlafaxina e seus metabolitos activos em sangue e urina. Foi ainda demonstrado que o método tem um desempenho linear na gama de trabalho compreendida entre 1 e 800 ng/mL, não apresentando fenómenos de arrastamento. A extracção evidenciou ser eficiente, tendo sido obtidas recuperações entre 60,9% e 108,0%. Os limites de detecção e quantificação determinados são adequados tendo em consideração o âmbito de utilização do método, e foram devidamente testados. Os efeitos de matriz foram devidamente estudados e quantificados, tendo-se constatado um significativo efeito de supressão iónica para ambas as matrizes.

A fim de testar a aplicabilidade do método proposto, foram analisados nove casos reais, com determinação em amostras de sangue e urina. As concentrações determinadas, não sendo relevantes do ponto de vista médico-legal, permitiram evidenciar a capacidade do método para identificar e quantificar este tipo de substâncias.

O método analítico apresentado demonstrou ser eficiente, designadamente ao nível do tempo de análise, e suficientemente sensível para a detecção, identificação e quantificação de sertralina, venlafaxina e os seus metabolitos activos em amostras de sangue e urina. De realçar, também, que a simplicidade da metodologia proposta torna-o facilmente integrável na rotina analítica de um laboratório de toxicologia.

**Palavras-chave:** Sertraline; Venlafaxine; Metabolito activo; Sangue; Urina; UPLC-MS/MS.

---

# A**bstract**

Sertraline and venlafaxine are two of the most sold antidepressants of the new generation. The development and validation of an analytical method for the determination of these compounds became necessary with the increased number of positive results in screening tests for these two compounds. The determination of sertraline and venlafaxine must be combined with the determination of their active metabolites, since these have pharmacological activity and therapeutic relevance. This study includes both blood and urine so this method may be integrated in both clinical and forensic toxicology laboratories.

The clean-up step of the developed method is by solid phase extraction, using Oasis HLB columns. The internal standard chosen was zolpidem-d6. The analyses were made by an ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, using an Acquity HSS T3 analytical column. The mobile phase contained acetonitrile and formic acid 0.1% in gradient, at a flow rate of 0.5 min/mL.

The validation of the proposed analytical method included the study of selectivity, extraction efficiency, linearity, limit of detection and limit of quantification precision and matrix effects. Linearity was achieved over the range of concentrations 1 – 800 ng/mL. Recoveries obtained were between 60.9% and 108.0%. High ionic suppression was determined in both blood and urine. The assay is selective and specific and there was no carry-over detected.

The proposed assay was tested with the study of nine report cases. The data was inconclusive, but the obtained results and chromatograms strengthen the credibility of this analytical method.

The validated method described in this work is rapid and sensitive in the detection, identification and quantification of sertraline, venlafaxine and their metabolites in both blood and urine. The simplicity of this assay makes it suitable for the analytical routine in a toxicology laboratory.

**Keywords:** Sertraline; Venlafaxine; Active metabolite; Blood; Urine; UPLC-MS/MS.

---



# Índice

Abreviaturas .....	v
Índice de Tabelas.....	vii
Índice de Figuras .....	xi
Índice de Gráficos.....	xiii

## Capítulo I. Introdução

I.1. Depressão.....	3
I.2. Antidepressivos – a evolução .....	3
I.3. Antidepressivos de Nova geração.....	5
I.3.1. Inibidores Selectivos da Recaptação de Serotonina .....	5
I.3.2. Inibidores da Recaptação de Serotonina e Noradrenalina .....	7
I.4. Importância Médico-Legal da determinação de antidepressivos.....	7
I.5. Amostras biológicas .....	8
I.5.1. Sangue .....	8
i. Redistribuição post-mortem .....	9
I.5.2. Urina .....	9
I.6. Substâncias em estudo.....	11
I.6.1. Sertralina .....	11
I.6.2. Venlafaxina.....	15

## Capítulo II. Metodologia Analítica

II.1. Cromatografia líquida .....	23
i. Extracção em fase sólida.....	24

---

II.1.1	Cromatografia líquida de alta performance.....	25
II.2.	Espectrometria de Massa.....	26
II.2.1.	Espectrometria de massa sequencial.....	29
<b>Capítulo III.</b>	<b>Especificações Experimentais</b>	
III.1.	Material, Reagentes e Equipamento.....	33
III.1.1.	Padrões e Reagentes.....	33
III.1.2.	Material e Equipamento.....	33
III.1.3.	Preparação de padrões, solventes e soluções.....	34
III.2.	Amostras Brancas.....	35
III.2.1.	Triagem das amostras brancas.....	35
III.3.	Procedimento de ensaio.....	36
III.3.1.	Preparação das amostras.....	36
III.3.2.	Extracção em fase sólida.....	37
III.3.3.	Secagem e reconstituição dos extractos.....	38
III.4.	Condições do equipamento.....	38
III.5.	Estudos preliminares.....	40
<b>Capítulo IV.</b>	<b>Validação do método</b>	
IV.1.	Especificidade e Seletividade.....	48
IV.1.1.	Critério de Tempo de Retenção Relativo.....	48
IV.1.2.	Critério das Relações Iónicas das Transições.....	50
IV.2.	Eficiência da extracção.....	56
IV.3.	Arrastamento (carryover).....	58
IV.4.	Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	60

---

IV.4.1.	Determinação dos limites de detecção e quantificação.....	61
i.	Razão Sinal/Ruído .....	61
ii.	Método de Adição de Padrão .....	63
IV.4.2.	Teste dos limites de detecção e quantificação.....	65
i.	Teste dos limites de quantificação .....	66
ii.	Teste dos limites de detecção .....	68
IV.5.	Linearidade/Gama de trabalho .....	72
IV.6.	Precisão.....	74
IV.6.1.	Repetibilidade.....	74
IV.6.2.	Precisão intermédia.....	76
IV.6.3.	Exactidão.....	80
IV.7.	Efeito matriz.....	82
IV.8.	Robustez.....	87
<b>Capítulo V.</b>	<b>Aplicação em Casos Reais .....</b>	<b>89</b>
<b>Conclusões</b>	<b>.....</b>	<b>105</b>
<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>.....</b>	<b>111</b>
<b>Anexos – Tratamento de dados e resultados obtido na validação do método</b>	<b>.....</b>	<b>115</b>
Eficiência de extracção .....		117
Limites de Detecção e de Quantificação .....		121
Linearidade .....		131
Repetibilidade.....		141
Precisão Intermédia .....		145
Exactidão .....		155
Efeito Matriz.....		165





# A breviaturas

APCI – do inglês *atmospheric pressure chemical ionization*

CV – coeficiente de variação

DC – do inglês *direct current*

DMV – desmetilvenlafaxina

ESI – do inglês *electrospray ionization*

HPLC – do inglês *high pressure liquid chromatography*

INMLCF, I.P. – Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, Instituto Público

IPS – Instituto Português do Sangue

LC – do inglês *liquid chromatography*

LC-MS – cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (do inglês *liquid chromatography – mass spectrometry*)

LD – limite de detecção

LQ – limite de quantificação

m/z – razão massa/carga

MS – do inglês *mass spectrometry*

MAOI – do inglês *monoamine oxidase inhibitor*

MRM – do inglês *multiple recording monitoring*

NSR – norsertalina

RF – do inglês *radio frequency*

SER – sertralina

SIM – do inglês *single ion monitoring*

SNRI – do inglês *serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor*

SPE – do inglês *solid phase extraction*

SSRI – do inglês *selective serotonin reuptake inhibitor*

SQTF-DC - Serviço de Química e Toxicologia Forenses, Delegação do Centro

TAG – transtorno de ansiedade generalizada

TCA – do inglês *tricyclic antidepressant*

TIC – do inglês *total ion chromatogram*

TOC – transtorno obsessivo-compulsivo

TRR – tempo de retenção relativo

TSPT – transtorno de stress pós-traumático

UPLC-MS/MS – do inglês *ultra performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry*

VEN – venlafaxina

# Índice de Tabelas

<b>Tabela I.1.</b> Resumo das propriedades físico-químicas da sertralina. <sup>[44]</sup> .....	11
<b>Tabela I.2.</b> Resumo das propriedades físico-químicas da venlafaxina. <sup>[44]</sup> .....	16
<b>Tabela III.1.</b> Resumo das condições de aquisição de dados do espectrómetro de massa, para as quatro substâncias em estudo e do padrão interno. (Quando pertinente, as condições dos iões produto são colocados por ordem de relevância do ião, separados por ponto-e-vírgula.)	41
<b>Tabela IV.1.</b> Tempos de retenção relativos (TRR) das substâncias em cada uma das amostras de sangue. ....	49
<b>Tabela IV.2.</b> Diferença relativa entre o TRR de uma dada substância na amostra e no controlo, em sangue. ....	49
<b>Tabela IV.3.</b> Tempos de retenção relativos (TRR) das substâncias em cada uma das amostras de urina. ....	50
<b>Tabela IV.4.</b> Diferença relativa entre o TRR de uma dada substância na amostra e no controlo, em urina.....	50
<b>Tabela IV.5.</b> Tolerância máxima para as áreas relativas das transições iónicas.....	51
<b>Tabela IV.6.</b> Transições iónicas seleccionadas para cada substância e respectivo intervalo de tolerância, no estudo em sangue.....	51
<b>Tabela IV.7.</b> Transições iónicas seleccionadas para cada substância e respectivo intervalo de tolerância, no estudo em urina. ....	51
<b>Tabela IV.8.</b> Áreas relativas das transições iónicas das respectivas substâncias, em sangue.	52
<b>Tabela IV.9.</b> Áreas relativas das transições iónicas das respectivas substâncias, em urina.	52
<b>Tabela IV.10.</b> Resultados obtidos no estudo da especificidade/selectividade, em sangue.	53
<b>Tabela IV.11.</b> Resultados obtidos no estudo da especificidade/selectividade, em urina. ....	54
<b>Tabela IV.12.</b> Resultados da determinação da recuperação em sangue. ....	57
<b>Tabela IV.13.</b> Resultados da determinação da recuperação em urina. ....	57
<b>Tabela IV.14.</b> Preparação das curvas de calibração do estudo LD e LQ. ....	63

<b>Tabela IV.15.</b> Apresentação dos resultados do estudo do limite de detecção e de quantificação, em sangue. ....	64
<b>Tabela IV.16.</b> Apresentação dos resultados do estudo do limite de detecção e de quantificação, em urina. ....	64
<b>Tabela IV.17.</b> Apresentação dos resultados do estudo do limite de detecção e de quantificação, em sangue. (Tratamento de dados alternativo.) ....	64
<b>Tabela IV.18.</b> Apresentação dos resultados do estudo do limite de detecção e de quantificação, em urina. (Tratamento de dados alternativo.) ....	64
<b>Tabela IV.19.</b> Apresentação dos limites de detecção e quantificação testados, para cada substância. ....	66
<b>Tabela IV.20.</b> Preparação dos replicados para o teste dos limites de quantificação e detecção. ....	66
<b>Tabela IV.21.</b> Preparação das curvas de calibração do teste do limite de quantificação. ....	66
<b>Tabela IV.22.</b> Resultados do teste do limite de quantificação para as substâncias em estudo, em sangue. ....	67
<b>Tabela IV.23.</b> Resultados do teste do limite de quantificação para as substâncias em estudo, em urina. ....	67
<b>Tabela IV.24.</b> Tempos de retenção relativos (TRR) das substâncias em cada um dos replicados, na verificação dos LD em sangue. ....	68
<b>Tabela IV.25.</b> Diferença relativa entre o TRR de uma dada substância na amostra e no controlo, na verificação dos LD em sangue. ....	68
<b>Tabela IV.26.</b> Tempos de retenção relativos (TRR) das substâncias em cada um dos replicados, na verificação dos LD em urina. ....	68
<b>Tabela IV.27.</b> Diferença relativa entre o TRR de uma dada substância na amostra e no controlo, na verificação dos LD em urina. ....	69
<b>Tabela IV.28.</b> Transições iónicas seleccionadas para cada substância e respectivo intervalo de tolerância, na verificação dos LD em sangue. ....	69
<b>Tabela IV.29.</b> Transições iónicas seleccionadas para cada substância e respectivo intervalo de tolerância, na verificação dos LD em urina. ....	69
<b>Tabela IV.30.</b> Áreas relativas das transições iónicas das respectivas substâncias, na verificação dos LD em sangue. ....	70
<b>Tabela IV.31.</b> Áreas relativas das transições iónicas das respectivas substâncias, na verificação dos LD em urina. ....	70

---

<b>Tabela IV.32.</b> Resultados obtidos no estudo da positividade no teste dos limites de detecção em sangue. ....	71
<b>Tabela IV.33.</b> Resultados obtidos no estudo da positividade no teste dos limites de detecção em urina.....	71
<b>Tabela IV.34.</b> Preparação da curva de calibração do estudo de linearidade e gama de trabalho.....	73
<b>Tabela IV.35.</b> Apresentação dos resultados do estudo da linearidade e gama de trabalho, em sangue. 73	
<b>Tabela IV.36.</b> Apresentação dos resultados do estudo da linearidade e gama de trabalho, em urina. 74	
<b>Tabela IV.37.</b> Resumo dos resultados obtidos no estudo da repetibilidade em sangue. ....	75
<b>Tabela IV.38.</b> Resumo dos resultados obtidos no estudo da repetibilidade em urina. ....	75
<b>Tabela IV.39.</b> Preparação da curva de calibração e controlos no estudo da precisão intermédia e exactidão.....	77
<b>Tabela IV.40.</b> Tabela ANOVA (factor único).....	77
<b>Tabela IV.41.</b> Cálculo das estimativas da precisão. ....	78
<b>Tabela IV.42.</b> Resumo dos resultados obtidos no estudo da precisão intermédia em sangue. ....	79
<b>Tabela IV.43.</b> Resumo dos resultados obtidos no estudo da precisão intermédia em urina. 79	
<b>Tabela IV.44.</b> Resumo dos resultados obtidos no estudo da exactidão em sangue.....	81
<b>Tabela IV.45.</b> Resumo dos resultados obtidos no estudo da exactidão em urina. ....	81
<b>Tabela IV.46.</b> Resumo do estudo do efeito matriz em sangue da cavidade cardíaca. ....	84
<b>Tabela IV.47.</b> Resumo do estudo do efeito matriz em urina. ....	84
<b>Tabela V.1.</b> Resumo dos casos reais estudados, com as concentrações dos analitos em estudo determinadas em sangue e urina.....	92



# I ndice de Figuras

<b>Figura I.1.</b> Representação esquemática do mecanismo de acção dos SSRI e SNRI. Ao bloquear a recaptação de serotonina (5-HT) e noradrenalina nos terminais nervosos, dá-se a acumulação destas na região pré-sináptica. ....	6
<b>Figura I.2.</b> Estrutura química da sertralina. <sup>[44]</sup> .....	11
<b>Figura I.3.</b> Estrutura química da N-desmetilsertralina. <sup>[14]</sup> .....	13
<b>Figura I.4.</b> Estrutura química da venlafaxina. <sup>[44]</sup> .....	15
<b>Figura I.5.</b> Estrutura química da O-desmetilvenlafaxina. <sup>[4]</sup> .....	17
<b>Figura II.1.</b> Representação esquemática dos principais elementos de um espectrómetro de massa. Adaptado. <sup>[1]</sup> .....	26
<b>Figura II.2.</b> Trajecto em Z do feixe de iões desde o capilar até ao analisador de massa, com passagem por vários elementos electromagnéticos de focagem. (1) capilar, (2) bomba rotativa, (3) bomba turbomolecular, (4) analisador de massa. ....	27
<b>Figura II.3.</b> Mecanismo de ionização em modo positivo e modo negativo. Adaptado. <sup>[1]</sup> ...	28
<b>Figura II.4.</b> Representação esquemática de um triplo quadrupolo. <sup>[36]</sup> .....	29
<b>Figura III.1.</b> Gradiente de fase móvel do UPLC-MS/MS.....	39
<b>Figura III.2.</b> Condições impostas no espectrómetro de massa. ....	39
<b>Figura III.3.</b> Cromatogramas obtidos pela aplicação das condições apresentadas na tabela III.1. ....	41
<b>Figura III.4.</b> Somatório dos espectros de fragmentação da sertralina $[M + H]^+$ , com representação dos fragmentos. O ião molecular, quantificador e qualificador, respectivamente, m/z 306, 159 e 275. ....	42
<b>Figura III.5.</b> Somatório dos espectros de fragmentação da norsestralina $[M + H]^+$ , com representação dos fragmentos. O ião molecular, quantificador e qualificador, respectivamente, m/z 292, 275 e 159. ....	42
<b>Figura III.6.</b> Somatório dos espectros de fragmentação da venlafaxina $[M + H]^+$ , com representação dos fragmentos. O ião molecular, quantificador e qualificador, respectivamente, m/z 278, 58 e 260. ....	43



- Figura III.7.** Somatório dos espectros de fragmentação da desmetilvenlafaxina  $[M + H]^+$ , com representação dos fragmentos. O íon molecular, quantificador e qualificador, respectivamente, m/z 264, 246 e 107. .... 43
- Figura IV.1.** Cromatogramas TIC obtidos da fortificação de amostras brancas com benzodiazepinas e medicamentos, em sangue (à esquerda) e urina (à direita). De cima para baixo: sertralina, norsestralina, venlafaxina, zolpidem-d6 e desmetilvenlafaxina. .... 55
- Figura IV.2.** Cromatogramas TIC obtidos no estudo do *carryover* em sangue (em cima) e urina (em baixo). Substâncias, de cima para baixo: sertralina, norsestralina, venlafaxina, zolpidem-d6 e desmetilvenlafaxina. .... 59
- Figura IV.3.** Cromatogramas com a determinação da razão sinal/ruído em sangue (de cima para baixo, 2 ng/mL, 1 ng/mL, 0,4 ng/mL e 0,1 ng/mL). .... 61
- Figura IV.4.** Cromatogramas com a determinação da razão sinal/ruído em urina (de cima para baixo, 0,4 ng/mL e 0,1 ng/mL). .... 62
- Figura V.1.** Cromatogramas obtidos na amostra de sangue, no caso 1: MRM da sertralina (dois de cima), da norsestralina (dois do centro) e do zolpidem-d6 (em baixo). .... 93
- Figura V.2.** Cromatogramas obtidos na amostra de sangue, no caso 2: MRM da venlafaxina (dois de cima), da desmetilvenlafaxina (dois do centro) e do zolpidem-d6 (em baixo). .... 94
- Figura V.3.** Cromatogramas obtidos na amostra de sangue, no caso 3: MRM da venlafaxina (dois de cima), da desmetilvenlafaxina (dois do centro) e do zolpidem-d6 (em baixo). .... 96
- Figura V.4.** Cromatogramas obtidos na amostra de sangue, no caso 4: MRM da venlafaxina (dois de cima), da desmetilvenlafaxina (dois do centro) e do zolpidem-d6 (em baixo). .... 97
- Figura V.5.** Cromatogramas obtidos na amostra de sangue, no caso 5: MRM da sertralina (dois de cima), da norsestralina (dois do centro) e do zolpidem-d6 (em baixo). .... 98
- Figura V.6.** Cromatogramas obtidos na amostra de sangue, no caso 6: MRM da sertralina (dois de cima) e do zolpidem-d6 (em baixo). .... 99
- Figura V.7.** Cromatogramas obtidos na amostra de sangue, no caso 7: MRM da sertralina (dois de cima), da norsestralina (dois do centro) e do zolpidem-d6 (em baixo). .... 100
- Figura V.8.** Cromatogramas obtidos na amostra de sangue, no caso 8: MRM da venlafaxina (dois de cima), da desmetilvenlafaxina (dois do centro) e do zolpidem-d6 (em baixo). .... 101
- Figura V.9.** Cromatogramas obtidos na amostra de sangue, no caso 9: MRM da venlafaxina (dois de cima), da desmetilvenlafaxina (dois do centro) e do zolpidem-d6 (em baixo). .... 102

---

# **I**ndice de Gráficos

**Gráfico IV.1.** Representação gráfica dos resultados obtidos do estudo do efeito matriz, à concentração de 50 ng/mL.....85

**Gráfico IV.2.** Representação gráfica dos resultados obtidos do estudo do efeito matriz, à concentração de 500 ng/mL. ....85



# Capítulo I

## Introdução



## I.1. Depressão

A depressão é um transtorno mental que afecta cerca de 121 milhões de pessoas a nível mundial. Trata-se de uma doença crónica ou recorrente que afecta o comportamento social e económico do doente. De acordo com a World Health Organization, este transtorno psiquiátrico será o segundo principal contribuinte para a taxa de doença global, calculada para todos os géneros e idades, no ano de 2020. Esta doença pode eventualmente levar a tendências suicidas. A depressão abrange 50% de todas as tentativas de suicídio no mundo ocidental, enquanto que 25% dos doentes com depressão severa tentam pelo menos uma vez o suicídio.<sup>[26,29]</sup> A tendência suicida pode ser observada desde o início da doença ou aparecer durante o seu tratamento, não havendo registos da potenciação deste tipo de comportamento com a toma de determinado antidepressivo.<sup>[11]</sup>

A farmacoterapia com recurso a antidepressivos complementa os tratamentos não-farmacológicos. Os neurotransmissores monoamínicos, tal como a dopamina, serotonina e noradrenalina, possuem um importante papel nos sintomas e tratamento da depressão. Os sintomas e a condição do doente podem ser melhorados com um aumento das concentrações sinápticas destes neurotransmissores.

## I.2. Antidepressivos – a evolução

Entre 1960 e 1980, a depressão era comumente tratada com recurso a antidepressivos tricíclicos (TCA, do inglês *tricyclic antidepressant*), inibidores de monoamina oxidase (MAOI, do inglês *monoamine oxidase inhibitor*) e lítio. Porém, no início dos anos 80, os efeitos secundários, interacções medicamentosas e toxicidade destas substâncias, associados a um grande avanço no conhecimento do sistema nervoso central, resultaram na grande revolução ao nível da síntese e formulação de fármacos antidepressivos. Estes fármacos

passaram a ser desenvolvidos de modo a focar um mecanismo de acção que era tomado como sendo crítico na resposta depressiva, evitando assim mecanismos de acção secundários e indesejáveis.<sup>[8,26,29]</sup>

Até então, os antidepressivos existentes haviam sido formulados para outras finalidades. Por exemplo, ao tentar aperfeiçoar a eficácia antipsicótica de fenotiazinas de baixo potencial, os investigadores sintetizaram os fármacos hoje conhecidos por TCA, tendo os seus efeitos antidepressivos sido descobertos *a posteriori*. De igual modo, os MAOI foram sintetizados quando o intuito era o desenvolvimento de fármacos para o tratamento da tuberculose.

Apesar do acaso que conduziu à síntese destes antidepressivos, o seu aparecimento teve um grande impacto na realidade que era então a depressão nervosa:

- os doentes passaram a poder ser tratados,
- tal como as restantes classes de doenças, o transtorno mental passou a ser encarado como tratável, levando ao desenvolvimento da terapia farmacológica por parte dos psiquiatras,
- o recurso a estes compostos permitiu uma maior compreensão do funcionamento do cérebro humano e o conseqüente surgimento de propostas de mecanismos de acção.

A formulação racional de antidepressivos, que culmina no desenvolvimento dos chamados antidepressivos de nova geração, apresenta-se como uma tentativa de superar os efeitos adversos associados ao uso de MAOI e TCA. Este novo método de desenvolvimento de fármacos tem como principal objectivo o aumento do índice terapêutico (razão entre as gamas terapêutica e tóxica), o que resulta na redução de intoxicações graves por *overdose*, ponto fulcral na realidade que é a tentativa de suicídio por via de intoxicação medicamentosa. Outro ponto tido em atenção são as interações medicamentosas de cada composto, visto que a 30-80% dos doentes medicados com antidepressivos são receitados múltiplos fármacos, factor que tende a aumentar com a idade do paciente.<sup>[8]</sup>

### I.3. Antidepressivos de Nova geração

Os antidepressivos de nova geração são classificados segundo a sua selectividade em relação a transportadores e receptores de neurotransmissores. As duas classes mais comercializadas são os inibidores selectivos da recaptação de serotonina (SSRI, do inglês *Selective Serotonin Reuptake Inhibitor*) e os inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina (SNRI, do inglês *Serotonin-Norepinephrine Reuptake Inhibitors*). Os fármacos pertencentes a estes dois grupos são comumente utilizados no tratamento de outros transtornos psiquiátricos, para além da depressão. Estas duas classes apresentam mecanismos de acção semelhantes ao dos TCA.<sup>[42]</sup>

Os transportadores e alguns receptores de neurotransmissores podem actuar como um mecanismo de segurança, prevenindo a estimulação excessiva dos receptores nas sinapses, quer através do transporte das monoaminas de novo para os neurónios quer pela diminuição do impulso nervoso que liberta mais neurotransmissores. Bloqueando estes transportadores e receptores, o mecanismo de *feed-back* negativo do neurónio é inibido, levando a uma acumulação de monoaminas nas sinapses.<sup>[26]</sup>

Tem sido provada a equipotência entre TCA e antidepressivos de nova geração, havendo porém uma significativa diferença nos perfis de efeitos secundários observados, nomeadamente no que toca à elevada cardiotoxicidade associada aos TCA. Os efeitos secundários mais comuns relacionados com a utilização de antidepressivos de nova geração são de natureza neurológica, psiquiátrica e gastrointestinal, resultando do mesmo mecanismo de acção que desencadeia os seus efeitos antidepressivos.<sup>[8]</sup>

Cumprindo um dos principais objectivos do seu desenvolvimento, estes compostos demonstram ser mais seguros em quadros de *overdose*. Os casos fatais de *overdose* de antidepressivos de nova geração encontram-se geralmente associados à co-ingestão de múltiplos fármacos. Este ponto é novamente reforçado devido à pré-disposição, já mencionada, para o suicídio por intoxicação medicamentosa voluntária por parte de doentes depressivos.<sup>[23]</sup>

#### I.3.1. Inibidores Selectivos da Recaptação de Serotonina

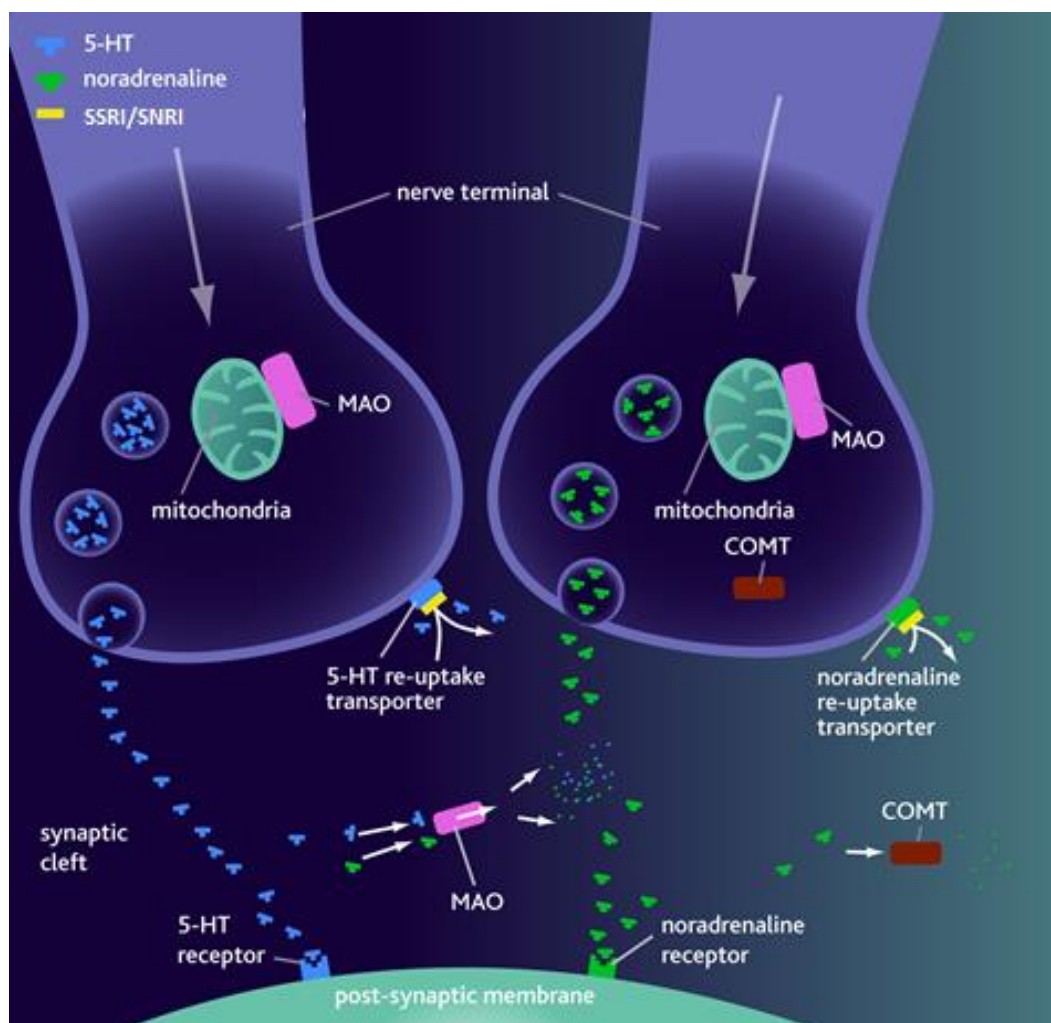
A fluoxetina, paroxetina, fluvoxamina, citalopram, escitalopram e sertralina (SER) são alguns dos compostos que integram a classe dos SSRI. Estes compostos podem ser tidos como derivados funcionais dos TCA, ainda que possuam estruturas totalmente distintas. O



seu mecanismo comum, tal como o nome o indica, é a inibição da recaptação de serotonina nos neurónios pré-sinápticos. Este mecanismo conduz ao aumento da concentração de serotonina nas fendas sinápticas, o que resulta no aumento da transmissão de aminase e a uma melhoria do quadro de depressão. Note-se que a selectividade destes compostos tem de ser tida como relativa, pois sendo mais selectivos que os TCA demonstram igualmente alguns efeitos sobre outros sistemas de neurotransmissores, ainda que modestamente.

Os SSRI são bastante utilizados no tratamento de quadros de transtorno obsessivo-compulsivo, pânico, fobia social e transtorno de déficite de atenção.<sup>[20]</sup> A coadministração de SSRI e TCA deve ser de todo evitada, pois pode traduzir-se em quadros de toxicidade tricíclica ou síndrome de serotonina, sendo que ambas as situações podem ser fatais.<sup>[11]</sup>

**Figura I.1.** Representação esquemática do mecanismo de acção dos SSRI e SNRI. Ao bloquear a recaptação de serotonina (5-HT) e noradrenalina nos terminais nervosos, dá-se a acumulação destas na região pré-sináptica.



### **I.3.2. Inibidores da Recaptação de Serotonina e Noradrenalina**

A classe dos SNRI inclui a venlafaxina (VEN), desmetilvenlafaxina (DMV), duloxetine e milnacipram. Embora tratando-se de um metabolito, a desmetilvenlafaxina é um inibidor de recaptação de noradrenalina mais potente que a própria venlafaxina, ocupando assim um lugar de relevo nesta classe de fármacos. Ao contrário dos SSRI, os SNRI apresentam uma potente inibição de serotonina, associada a uma média inibição de noradrenalina.

### **I.4. Importância Médico-Legal da determinação de antidepressivos**

A vasta e variada comercialização de fármacos antidepressivos, associada aos efeitos comportamentais e clínicos que estes potenciam nos doentes, torna necessária a implementação de métodos analíticos para a determinação desta classe de fármacos, em amostras biológicas, quer em contexto clínico quer forense.

À toxicologia forense compete avaliar uma vasta gama de substâncias, constituindo os medicamentos o grupo mais vasto. As análises efectuadas em contexto forense têm como objectivo auxiliar e complementar a investigação médico-legal ou criminal, realizadas por entidades competentes, podendo esta estar relacionada com a investigação da causa da morte da vítima ou com o comportamento de um indivíduo que tenha cometido um acto considerado ilegal.

Quando é desconhecida a causa de morte de um indivíduo, a presença e quantidade deste tipo de fármacos, assim como a presença simultânea de outras substâncias (interacções medicamentosas), pode fornecer importantes informações sobre a contribuição destas para a morte do sujeito. Para além disso, a triagem de fármacos antidepressivos assume relevância em contexto forense na investigação de casos de condução perigosa sob o efeito de substâncias psicoactivas, crimes violentos, crimes sexuais com recurso a substâncias administradas com o objectivo de diminuir a resistência ou incapacitar, entre outros.

## I.5. Amostras biológicas

As amostras biológicas com interesse toxicológico são variadas, podendo a sua maior ou menor adequabilidade depender da substância de interesse e do método analítico utilizado para deste. Na área da toxicologia clínica, esta variedade é bastante condicionada. Em contrapartida, na análise de amostras *post-mortem*, as amostras para análise serão tantas quantas as recolhidas em autópsia. No decorrer da mesma, o médico legista tem como responsabilidade decidir quais as amostras mais indicadas para enviar para análise toxicológica, sendo que amostras a menos tendem a condicionar o trabalho do toxicologista, e que amostras a mais têm como única desvantagem a gestão do espaço de armazenamento das mesmas. Das amostras disponíveis para recolha em autópsia, as que são mais frequentemente colhidas são sangue, urina, humor vítreo, estômago e conteúdo gástrico.

Tanto em cadáveres como *in vivo*, as amostras devem ser recolhidas o mais breve possível. No caso de sujeitos vivos, um maior período entre a exposição à substância e a recolha da amostra traduz-se numa maior metabolização da substância, sob pena da concentração determinada em sangue ser indetectável ou insignificante, em termos toxicológicos. No caso de cadáveres, logo após a morte do indivíduo iniciam-se processos de autólise e putrefactivos, assim como redistribuição *post-mortem*, processos estes que alteram a concentração das substâncias no organismo.<sup>[6]</sup>

Compete ao toxicologista eleger, de entre as disponíveis, a(s) amostra(s) mais adequada(s) para análise, sendo esta escolha baseada na informação sobre o caso, no tipo de análises solicitadas e, naturalmente, tendo igualmente em consideração os procedimentos analíticos e os meios disponíveis para análise.<sup>[21]</sup>

### I.5.1. Sangue

O sangue apresenta-se como uma das poucas amostras que podem ser colhidas em sujeitos vivos. Esta é a matriz biológica predilecta para detecção, identificação, quantificação e interpretação de resultados em toxicologia. A preferência por esta matriz advem do facto de ser um fluido biológico distribuído por todo o organismo, pelo que as substâncias presentes nesta matriz podem exercer a sua acção sobre um vasto conjunto de órgãos. Por outras palavras, os efeitos exercidos por uma substância no organismo dependem da concentração desta no sangue. Quando a recolha da amostra é feita no cadáver deve proceder-se à recolha em separado de sangue cardíaco, utilizado preferencialmente para

análises qualitativas, e de sangue periférico, recomendado para análises quantitativas devido ao facto de ser menos afectado pelos fenómenos de redistribuição *post-mortem*.

### **i. Redistribuição *post-mortem***

Logo após a morte, têm início os processos putrefactivos, que resultam na transformação e alteração das concentrações de substâncias presentes no organismo. A redistribuição *post-mortem* envolve a movimentação de compostos, de acordo com gradientes de concentração. Embora este fenómeno não esteja ainda totalmente compreendido, sabe-se que os tecidos que rodeiam os órgãos onde a concentração *ante-mortem* de substâncias é maior apresentarão uma concentração *post-mortem* mais elevada.

A redistribuição *post-mortem* resulta ainda num aumento da concentração no sangue cardíaco. Esta é provavelmente uma das matrizes biológicas menos homogêneas, podendo provir de diferentes câmaras cardíacas, da artéria e veias pulmonares, da veia cava inferior (ligada ao fígado) ou até da aorta. A colheita de sangue periférico deve ser feita na veia femoral, devido ao facto de permitir a obtenção de um volume aceitável do ponto de vista analítico (*e.g.* 10mL) e também por estar, anatomicamente, distante dos principais órgãos.

Apesar da redistribuição *post-mortem* originar dificuldades na interpretação de resultados, alguns aspectos podem permitir, na generalidade dos casos, a obtenção de conclusões válidas:

- concentrações que ultrapassem a gama terapêutica por 10 e 20 vezes são consistentes com intoxicação aguda ou morte,
- uma elevada razão substância/metabolito é mais consentânea com uma intoxicação aguda.<sup>[21]</sup>

### **I.5.2. Urina**

A urina é outra das poucas amostras que podem ser recolhidas em sujeitos vivos, sendo que a recolha *post-mortem* apenas é feita em 50% dos casos, pois tende a ocorrer um esvaziamento da bexiga após a morte do indivíduo.<sup>[20]</sup> Dir-se-ia que, em geral, é a segunda matriz preferida para análises toxicológicas, apresentando características que a tornam uma matriz adequada para a realização de análises de triagem (*e.g.* imuno enzimáticas).

Devido à filtração renal, esta matriz é muito menos complexa que o sangue e outras matrizes biológicas, sendo constituída em cerca de 99% por água e desprovida de soro, lípidos e outras macro-moléculas endógenas, o que facilita a preparação das amostras. Esta constituição reduz significativamente a presença de possíveis interferentes quando se utilizam técnicas cromatográficas ou imunoensaios. Uma vez que a via renal é uma das principais formas de eliminação do organismo, dá-se a acumulação de substâncias e metabolitos na urina, o que pode resultar na presença de concentrações mais elevadas, tornando-se assim a matriz ideal para a detecção de substâncias. A provável presença de metabolitos (ou mesmo da droga inalterada) na urina durante um intervalo de tempo significativamente maior do que aquele que ocorre no sangue, e em concentrações mais elevadas, torna esta matriz interessante e útil para orientar uma posterior pesquisa no sangue.

Porém, a urina não é uma matriz ideal em todas as situações. Quando a substância em estudo apresenta um tempo de semi-vida muito longo, e a morte do indivíduo, ou a colheita *in vivo*, ocorra pouco tempo após a ingestão, não tendo decorrido tempo suficiente para a metabolização e eliminação da substância, a substância de interesse, ou os seus metabolitos, pode não ser detectada. Por outro lado, se a metabolização da substância de interesse for demasiado extensa, a substância intacta pode não ser detectada na urina. Por fim, substâncias presentes em urina não exercem quaisquer efeitos no organismo, tornando a informação quantitativa em urina desprezável, quando confrontada com a informação obtida em sangue.

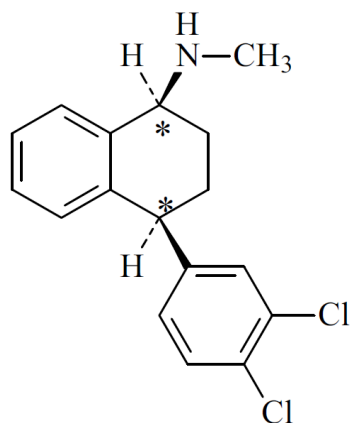
A identificação em urina demonstra uma exposição prévia à substância, mas não permite obter informação fidedigna sobre o intervalo decorrido desde a ingestão ou acerca da dose. Apesar disso, a urina é muito utilizada nas situações em que, para efeitos de tomada de decisão, se torne suficiente a confirmação da presença de uma substância cujo o uso não esteja autorizado ou em que, baseado em estudos de farmacocinética, estejam definidos limites máximos de concentração (*e.g.* análises de dopagem).

## I.6. Substâncias em estudo

### I.6.1. Sertralina

A sertralina é um SSRI, sendo o segundo inibidor de recaptação de serotonina mais potente e o segundo mais selectivo em relação ao bloqueio similar em noradrenalina. É ainda o único SSRI que liga a transportadores de dopamina, ainda que de modo muito mais fraco.<sup>[16]</sup> Este composto possui dois centros quirais, mas o enantiómero (1S,4S) é o mais potente e o único comercializado em formulações farmacêuticas.<sup>[24,44]</sup>

**Figura I.2.** Estrutura química da sertralina.<sup>[44]</sup>



Embora a dose diária aconselhada de sertralina tenha gerado alguma controvérsia, parece estar definido um intervalo referente à dose usualmente prescrita pelos psiquiatras, e mencionado em literatura – 50-200 mg.<sup>[10,25,27,48]</sup> A gama terapêutica é tida como o intervalo de concentrações de 50-250 ng/mL. A presença deste fármaco começa a exercer efeitos tóxicos a partir de concentrações de 290 ng/mL, em sangue.<sup>[13,44]</sup>

**Tabela I.1.** Resumo das propriedades físico-químicas da sertralina.<sup>[44]</sup>

<i>Propriedades físico-químicas</i>	
Fórmula Estrutural	(1S-4S)-4-(3,4diclorofenil)-1,2,3,4-tetrahidro-N-metil-1-naftalenamina
Massa Molar [g/mol]	306,2
Constante de Dissociação (pKa)	9,48
Coefficiente de partição (log(P))	5,29

- **Aplicações clínicas**

Este antidepressivo tem como principal utilização o tratamento da depressão, sendo eficaz em episódios de depressão aguda e de recaídas na fase de manutenção. É ainda eficaz no tratamento de outros transtornos mentais, nomeadamente transtorno obsessivo-

compulsivo (TOC), pânico, transtorno de ansiedade generalizada (TAG) com ou sem agorafobia, transtorno disfórico pré-menstrual, transtorno de stress pós-traumático (TSPT).

- **Mecanismo de acção**

Tal como os restantes compostos pertencentes à classe SSRI, a sertralina inibe selectivamente a recaptação de serotonina nos terminais nervosos pré-sinápticos. O seu mecanismo passa pelo bloqueio do receptor de serotonina nos terminais nervosos, o que leva à desinibição do fluxo de impulsos neuronais e ao aumento da libertação de serotonina nos terminais axónicos. O passo final deste mecanismo de acção passa pela dessensibilização dos receptores serotoninérgicos pós-sinápticos, o que resulta numa maior acumulação de serotonina nesta região.<sup>[10]</sup>

A afinidade pelos receptores de dopamina por parte da sertralina não é significativa, uma vez que não revela efeitos clínicos.<sup>[44]</sup> A sertralina não apresenta uma afinidade significativa por receptores adrenérgicos, colinérgicos, dopaminérgicos, histaminérgicos e de benzodiazepinas; sendo que os efeitos sobre estes receptores encontram-se associados a efeitos anticolinérgicos, sedativos e cardiovasculares, efeitos secundários também demonstrados por outros fármacos.<sup>[7]</sup>

- **Farmacocinética**

Tem sido demonstrado que a sertralina apresenta uma farmacocinética linear, dentro da gama terapêutica.

- Absorção

Após administração oral, a absorção no tracto gastro-intestinal da sertralina é quase completa, embora muito lenta, resultando numa biodisponibilidade de cerca de 40%.<sup>[2,13,44]</sup> O pico de concentração plasmática é atingido decorridas 4-8 h após a ingestão.<sup>[10,44]</sup> Tem sido demonstrado que a co-ingestão de alimentos resulta num aumento do pico de concentração em cerca de 25%.<sup>[44]</sup>

- Distribuição

A sertralina apresenta uma enorme afinidade por ligações com proteínas plasmáticas (98%), o que resulta numa óptima distribuição do fármaco pelo organismo. O volume de distribuição da sertralina em humanos foi determinado como sendo superior a 20 L/kg, o que indica uma grande afinidade por ligações não-específicas com os tecidos.<sup>[10,13,16,24]</sup> É ainda

de notar que a sertralina é distribuída para o leite materno, podendo causar efeitos nocivos no lactente.<sup>[27,44]</sup>

o Metabolismo

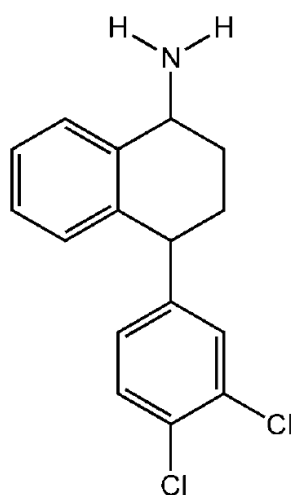
A sertralina sofre um extenso primeiro passo de metabolização, sendo N-desmetilada e originando a N-desmetilsertralina (ou norsertralina - NSR). Ambos são extensamente metabolizados no fígado, sofrendo desaminação oxidativa, redução, hidroxilação e conjugação glucurónica.

Sendo a via hepática a principal forma de metabolização deste composto, os doentes com patologia ao nível deste órgão terão de ter a sua dose diária de sertralina ajustada, uma vez que esta condição clínica resulta num maior tempo de interacção do fármaco com o organismo.<sup>[24]</sup>

▪ *Metabolito activo*

A norsertralina, é o único metabolito activo deste fármaco. Apresenta um tempo de semi-vida superior ao da sertralina, o que leva à sua acumulação no plasma. Porém, a actividade farmacológica da norsertralina representa cerca de 10-20% da actividade exercida pela sertralina, tornando-a pouco significativa do ponto de vista clínico.<sup>[16]</sup>

**Figura I.3.** Estrutura química da N-desmetilsertralina.<sup>[14]</sup>





o Excreção

Os tempos de semi-vida da sertralina e norsesertralina são de 26 h e 62-104 h, respectivamente.<sup>[10,39,44]</sup> Uma dose única de sertralina é eliminada do organismo sob a forma de urina e fezes, com uma contribuição aproximadamente idêntica por parte destas duas vias de eliminação.<sup>[10,24]</sup> É de notar que apenas 0,2% de uma dose de sertralina é detectada na urina sob forma inalterada.<sup>[2,10,27]</sup>

Não foram observadas alterações significativas nos tempos de semi-vida em doentes com insuficiência renal, decerto justificado pela forte contribuição da via fecal para eliminação desta substância do organismo.

• **Interações medicamentosas**

Vários estudos gerais de interação medicamentosa têm demonstrado que a farmacocinética da sertralina não é significativamente afectada pela co-ingestão com outros fármacos. Porém, é de notar que a presença no organismo de sertralina afecta a farmacocinética de alguns fármacos, nomeadamente aumentando o tempo de semi-vida da varfarina, e inibindo o metabolismo da clozapina.<sup>[24]</sup> Esta influência da presença de sertralina sobre o metabolismo de outros fármacos resulta da sua elevada afinidade por diversos subtipos de enzimas hepáticas.

Para além de ser necessário evitar a co-ingestão de TCA com qualquer SSRI, a co-administração de sertralina com MAOI deve ser igualmente evitada, podendo esta resultar em quadros de hipertermia, convulsões ou coma.<sup>[44]</sup>

• **Efeitos secundários**

Comparativamente com os restantes SSRI, a sertralina apresenta um quadro de efeitos secundários mais favorável. Os efeitos secundários mais comuns são: náuseas, insónias, tremores, diarreia, taquicardia, enxaquecas, diminuição da libido, sonolência, tonturas e secura da boca.

Em casos de sobredosagem, a sertralina exerce menos efeitos cardiovasculares que os TCA, sendo por isso bastante mais segura.<sup>[2]</sup>

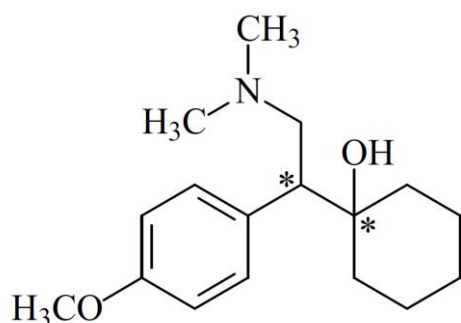
- **Comercialização**

A comercialização de sertralina é maioritariamente feita sob a marca Zoloft, distribuída pela Roerig (Pfizer, Inc.). É o fármaco mais comercializado a nível mundial como alternativa aos TCA. Este antidepressivo é comercializado sob forma de um sal hidrocloreídrico, em comprimidos (25, 50 ou 100 mg), e sob forma de solução oral concentrada (20 mg/mL), em frascos de 60 mL.<sup>[48]</sup> Em Portugal, foi a 43.<sup>a</sup> substância activa mais vendida no ano de 2011.<sup>[19]</sup>

### I.6.2. Venlafaxina

Derivado da feniletilamina, a venlafaxina é um SNRI. A dose diária recomendada de venlafaxina é de 75-225 mg.<sup>[2]</sup> Este composto químico apresenta dois centros quirais, sendo utilizada em formulações farmacêuticas sob a forma de uma mistura racémica dos dois enantiómeros activos (1S,4S) e (1S,4R).<sup>[44]</sup>

**Figura I.4.** Estrutura química da venlafaxina.<sup>[44]</sup>



Devido à importância clínica da desmetilvenlafaxina, a gama terapêutica deve ser controlada com bastante precaução. O intervalo de concentrações terapêuticas para de venlafaxina, no sangue é de 200-400 ng/mL; porém quando detectada a presença simultânea do seu metabolito activo, as concentrações conjuntas devem encontrar-se no intervalo de 250-750 ng/mL. A venlafaxina começa a exercer efeitos tóxicos, sem presença da desmetilvenlafaxina, entre 1000-1500 ng/mL em sangue.<sup>[44]</sup>

**Tabela I.2.** Resumo das propriedades físico-químicas da venlafaxina.<sup>[44]</sup>

<i>Propriedades físico-químicas</i>	
Fórmula Estrutural	(R/S)-1-(2-(Dimetilamino)-1-(4-metoxifenil)etil)cicloexan-1-ol
Massa Molar [g/mol]	277,4
Constante de Dissociação (pKa)	9,24
Coefficiente de partição (log(P))	0,43

- **Aplicações clínicas**

Este fármaco antidepressivo é comumente utilizado no tratamento da depressão, transtorno de ansiedade generalizada ou social e pânico. A sua eficácia tem ainda de ser comprovada no tratamento de distímia, TOC, TSPT e disforia pré-menstrual.<sup>[10,44]</sup>

- **Mecanismo de acção**

A venlafaxina e a desmetilvenlafaxina são responsáveis pelo aumento da neurotransmissão noradrenérgica e serotoninérgica, através da inibição da recaptação destes dois neurotransmissores. Os dois enantiómeros activos da venlafaxina exercem efeitos diferentes, sendo que o enantiómero (1S,4S) inibe a recaptação de serotonina e noradrenalina, enquanto que o enantiómero (1S,4R) inibe maioritariamente a recaptação de serotonina. Esta diferença de efeitos leva a que a inibição da recaptação de noradrenalina pela venlafaxina seja cerca de 2-3 vezes menos potente que a inibição concorrente.<sup>[10,44]</sup>

A venlafaxina e a desmetilvenlafaxina não apresentam afinidade significativa por receptores muscarínicos (colinérgicos), histaminérgicos e alfa-adrenérgicos, associados a efeitos sedativos, anticolinérgicos e cardiovasculares.<sup>[10,29]</sup>

- **Farmacocinética**

A venlafaxina apresenta uma farmacocinética linear, dentro da sua gama terapêutica.

- Absorção

No tracto gastrointestinal, a venlafaxina é rápida e quase totalmente absorvida (92%).<sup>[44,47]</sup> A biodisponibilidade oral deste fármaco é de cerca de 100%,<sup>[2]</sup> sendo o pico de concentração plasmática atingido 2-4 h após a ingestão do composto.<sup>[44]</sup>

- Distribuição

A venlafaxina e seu metabolito activo encontram-se ligados a proteínas plasmáticas num taxa de 27% e 30%, respectivamente.<sup>[29,47]</sup> Por ter relativamente pouca afinidade por ligações proteicas, o volume de distribuição da venlafaxina em humanos é de 4-12 L/kg.<sup>[44]</sup>

- Metabolismo

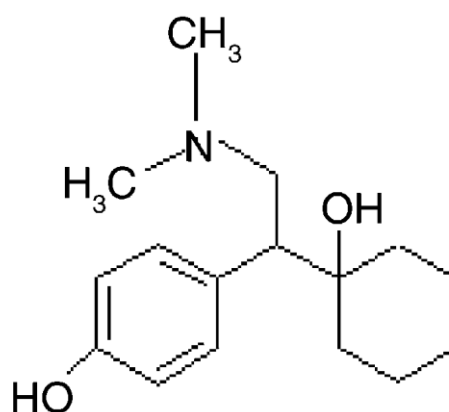
A venlafaxina sofre uma extensa metabolização pré-sistémica no fígado, originando a O-desmetilvenlafaxina. A venlafaxina é igualmente metabolizada em N-desmetilvenlafaxina, N,O-didesmetilvenlafaxina e outros metabolitos menores.

Sendo que o metabolismo deste composto é maioritariamente em ambiente hepático, a dose diária de venlafaxina de doentes com falha hepática deve ser ajustada.

- *Metabolito activo*

A O-desmetilvenlafaxina é o único metabolito activa da venlafaxina. A presença deste metabolito é muito relevante, uma vez que possui uma actividade farmacológica similar ao composto que lhe dá origem, apresentando um tempo de semi-vida superior ao da venlafaxina. Ao coexistirem no organismo, será de esperar uma sinergia ao nível dos efeitos clínicos, quer da intensidade quer da duração.

Figura I.5. Estrutura química da O-desmetilvenlafaxina.<sup>[4]</sup>



- Excreção

A principal via de eliminação da venlafaxina é a renal, sendo 87% da dose excretada na urina. Cerca de 5% da dose ingerida pode ser detectada na urina, sob a forma

inalterada.<sup>[2,29,44,47]</sup> O tempo de semi-vida para venlafaxina e desmetilvenlafaxina é de 4 h e 12 h, respectivamente.

Sendo a via renal a principal via de eliminação destas substâncias, a dose diária para doentes com insuficiência renal deverá ser ajustada.

- **Interações medicamentosas**

Devido à fraca afinidade por ligações proteicas, não apresenta interação com fármacos com elevada afinidade por este tipo de ligações. Sendo metabolizada por uma enzima – CYP2D6 – do sistema de citocromos P450 (principais enzimas envolvidas na metabolização de xenobióticos), pode ocorrer a inibição competitiva por fármacos metabolizados pela mesma enzima. Porém, a venlafaxina demonstra fraca afinidade para inibição desta enzima, não tendo efeitos significativos sobre o metabolismo de outros fármacos. Em contrapartida, outros compostos inibidores da enzima CYP2D6 poderão afectar o metabolismo da venlafaxina.

Deve ser evitada a co-administração de venlafaxina com MAOI, a qual pode resultar em quadros de hipertermia, convulsões e coma.<sup>[44]</sup>

- **Efeitos secundários**

Tal como os restantes antidepressivos de nova geração, a venlafaxina apresenta um quadro de efeitos secundários mais favorável que o dos TCA e MAOI. Os efeitos adversos mais reportados são náuseas, enxaquecas, sonolência, secura da boca, insónias, tonturas, tremores, disfunção sexual, sudorese e visão desfocada, havendo casos registados de aumento da pressão sanguínea. Estes efeitos dependem da dose ingerida, e tendem a estar associados a doses diárias iguais ou superiores a 300 mg.<sup>[10,44]</sup>

Em caso de sobredosagem, este composto evidencia ser bastante mais seguro que os antidepressivos mais antigos, podendo, contudo, provocar situações de hiper ou hipotensão, arritmia cardíaca, ataques cardíacos e coma.<sup>[2]</sup>

- **Comercialização**

A mistura racémica dos dois enantiómeros activos da venlafaxina é comercializada sob forma de sal hidrocloreídrico, em comprimidos de 25, 37,5, 50, 75 e 100 mg.<sup>[2]</sup> A marca sob a qual esta formulação farmacêutica é mais comercializada é a Effexor XR, distribuída pela Wyeth (Pfizer, Inc.).

Como foi já referido, o perfil farmacológico da desmetilvenlafaxina é muito similar ao da venlafaxina. Por esta razão, o metabolito activo da venlafaxina é igualmente comercializado em formulações farmacêuticas, sendo a marca mais conhecida a Pristiq, igualmente distribuída pela Pfizer, Inc.. No ano de 2011, a venlafaxina foi a 47.<sup>a</sup> substância activa mais vendida em Portugal.<sup>[19]</sup>



# Capítulo II

## Metodología Analítica





O recurso a técnicas hífenadas tornou-se na via mais directa para o aumento da eficiência na análise de uma amostra. Uma técnica hífenada junta técnicas de separação de compostos e de análise dos mesmos, sendo variadas as possíveis combinações. O uso destas técnicas permite simultâneas análises qualitativa e quantitativa. Neste trabalho, recorreu-se a uma variante de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS, do inglês *liquid chromatography – mass spectrometry*) – UPLC-MS/MS (do inglês *ultra performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry*). O método de UPLC-MS/MS junta a cromatografia líquida de alta performance à espectrometria de massa sequencial.

Neste capítulo é introduzida a teoria associada ao funcionamento da cromatografia líquida e da espectrometria de massa, sendo dada maior relevância a características relevantes da metodologia analítica utilizada neste trabalho.

## II.1. Cromatografia líquida

A cromatografia consiste numa técnica analítica de separação de moléculas ou iões. Qualquer técnica cromatográfica integra uma fase estacionária e uma fase móvel – que transporta os analitos ao longo da fase estacionária. No caso da cromatografia líquida (LC, do inglês *liquid chromatography*) a fase móvel é um líquido e a fase estacionária apresenta-se como preenchimento da coluna analítica de separação cromatográfica.

A cromatografia líquida apresenta duas fases com interacção selectiva, uma vez que fase móvel e estacionária competem pelos analitos, o que resulta numa melhor separação das substâncias. Ambas as fases interagem livremente com cada analito, sendo que diferenças de adsorção, troca iónica e tamanho levam a diferentes graus de interacção, resultando na separação dos compostos. Quanto maior for o grau de interacção do analito com a coluna, mais tempo demora a ser eluído, apresentando, por isso, um tempo de retenção superior.

Observa-se ainda que a utilização de um gradiente de concentrações durante a separação cromatográfica permite uma melhor separação dos analitos presentes na mistura. A análise ao eluato, através de um detector adequado, é regra geral contínua, sendo o resultado final de uma análise cromatográfica um cromatograma, que não é mais do que a representação gráfica da intensidade relativa dos picos eluídos em função do seu tempo de retenção (intensidade relativa *vs.* tempo).

Uma diminuição do tamanho das partículas constituintes da fase estacionária resulta no aumento da superfície de interacção, o que leva ao aumento do tempo de retenção, permitindo uma melhor separação cromatográfica. Porém, observou-se que nestas condições a pressão da fase móvel diminuía consideravelmente ao longo da coluna. Surgiu assim a necessidade de instaurar um sistema de cromatografia líquida a alta pressão (HPLC, do inglês *High Pressure Liquid Chromatography*), o qual permite a obtenção de pressões de fase móvel elevadas e, conseqüentemente, a utilização de partículas de diâmetro reduzido. Estas características permitem um significativo aumento da capacidade de resolução e a utilização de colunas cromatográficas mais curtas.<sup>[57]</sup>

A resolução de um sistema de cromatografia líquida (clássica ou de alta pressão) traduz a capacidade do mesmo para separar analitos. Este parâmetro é função da natureza de ambas as fases, do diâmetro das partículas constituintes da fase estacionária, da pressão (a qual depende do fluxo) da fase móvel e do comprimento da coluna, justificando o facto de sistemas de HPLC fornecerem resultados de forma mais rápida e com maior resolução que a clássica cromatografia líquida.

#### **i. Extracção em fase sólida**

A extracção das amostras é um passo fundamental na determinação analítica de qualquer substância. O passo extractivo permite separar os analitos de interesse de interferentes existentes na matriz. A extracção em fase sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*) é uma técnica de separação líquido-sólido que tem por base o funcionamento da cromatografia líquida clássica (de baixa pressão – pressão atmosférica). São usadas colunas de extracção, preenchidas com a fase estacionária, onde, após correcto acondicionamento da coluna e preparação da amostra, esta é aplicada ficando os constituintes da matriz e os analitos de interesse retidos na fase estacionária. Seguem-se um passo de lavagem, onde se dá

a eluição de interferentes, e um passo de eluição (*cf.* fase móvel) – utilizando-se um solvente adequado que interaja suficientemente com os analitos a fim de os eluir.

### II.1.1. Cromatografia líquida de alta performance

Uma vez que a eficiência da cromatografia líquida aumenta com a diminuição do tamanho das partículas que compõem a fase estacionária, o desenvolvimento da cromatografia líquida passa pela utilização de fases estacionárias com partículas de menores dimensões. Como foi já visto, o HPLC apresenta-se como um grande passo na aplicação desta linha teórica, usando fases estacionárias com partículas de 2-5  $\mu\text{m}$ . Passando a linha dos 2  $\mu\text{m}$ , a cromatografia líquida de alta performance (UPLC, do inglês *ultra performance liquid chromatography*) utiliza colunas analíticas preenchidas por partículas de 1,7  $\mu\text{m}$ . O UPLC pode ser tomado como o passo seguinte da cromatografia líquida, trabalhando com partículas de menores dimensões e fluxos mais elevados (e conseqüentemente maiores pressões), apresentando maior resolução, eficiência e rapidez que o seu antecessor HPLC.

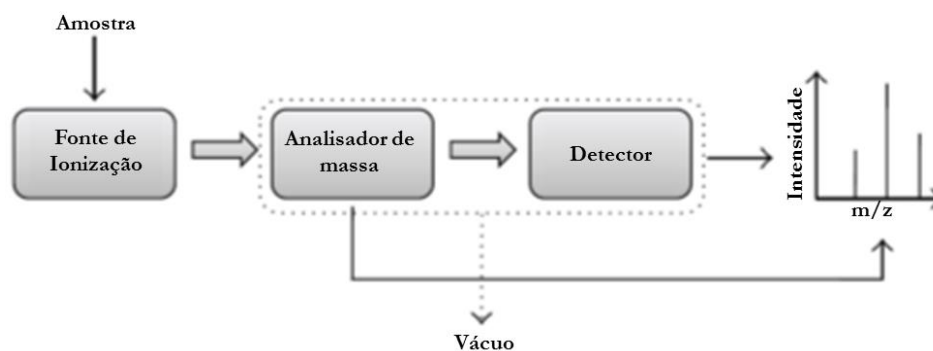
O sistema de UPLC é composto por dois módulos: *binary solvent manager* e *sample manager*. O primeiro módulo é composto por quatro bombas permitindo a inserção de quatro solventes diferentes no sistema, porém apenas permite a utilização de duas linhas em simultâneo, tornando o sistema binário, permitindo deste modo a criação de uma fase móvel em gradiente. A inserção de fase móvel no sistema é efectuada a elevadas pressões, podendo estas ir até 15000 psi. Este módulo é ainda responsável pela degaseificação dos solventes antes da entrada destes no sistema. O *sample manager* é responsável pela injeção das amostras na coluna, pelo controlo das temperaturas da coluna analítica (com limite de 65 °C) e do amostrador, e ainda pela lavagem da agulha de injeção de amostras. Após cada injeção de amostra na coluna cromatográfica, é efectuada a lavagem da agulha de injeção com dois solventes de lavagem (*weak needle wash* e *strong needle wash*), afim de evitar fenómenos de arrastamento (*carryover*) entre análises cromatográficas sucessivas. Este módulo controla ainda a pressão da injeção da amostra na coluna cromatográfica, mantendo valores elevados, a fim de evitar a sua dispersão. Cada ciclo de injeção, com lavagem dupla da agulha de injeção, demora cerca de 60 s.<sup>[40]</sup>

A disposição base dos módulos impõe uma maior proximidade do *sample manager* ao sistema de detector utilizado, diminuindo assim a tubagem requerida para esta ligação, levando a uma considerável diminuição da dispersão do eluato antes da entrada no detector.

## II.2. Espectrometria de Massa

Um espectrómetro de massa tem três componentes básicos: uma fonte de ionização, um (ou mais) analisador(es) de massa e um detector. No interior do espectrómetro de massa, desde a fonte até ao detector, a presença de um gradiente de pressão e de voltagem permite encaminhar os iões pelo correcto percurso. A fonte de ionização é responsável por ionizar as moléculas da amostra em estudo. Após adequada ionização, os iões são direccionados para o analisador de massa através de um série de elementos electromagnéticos, permitindo assim focar o feixe de iões e controlar a sua trajectória. No analisador de massa, os iões são filtrados e separados de acordo com a sua razão massa/carga ( $m/z$ ). Os iões já separados entram então no detector, o qual determina a concentração destes, sendo que os resultados são apresentados sob a forma de um espectro de massa. Os iões encontram-se em fase gasosa e, uma vez que nestas condições são muito reactivos, a sua manipulação e trajecto devem ser efectuados a alto vácuo. Afim de proporcionar o gradiente de pressão ao longo da trajectória dos iões no espectrómetro de massa, a fonte de ionização é mantida numa câmara à pressão ambiente, enquanto que os elementos electromagnéticos, analisador de massa e detector são mantidos a alto vácuo.

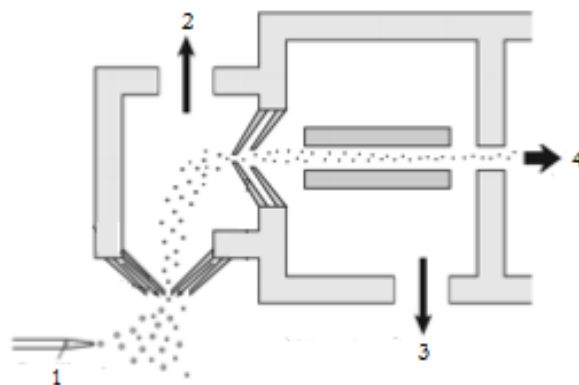
**Figura II.1.** Representação esquemática dos principais elementos de um espectrómetro de massa. Adaptado.<sup>[1]</sup>

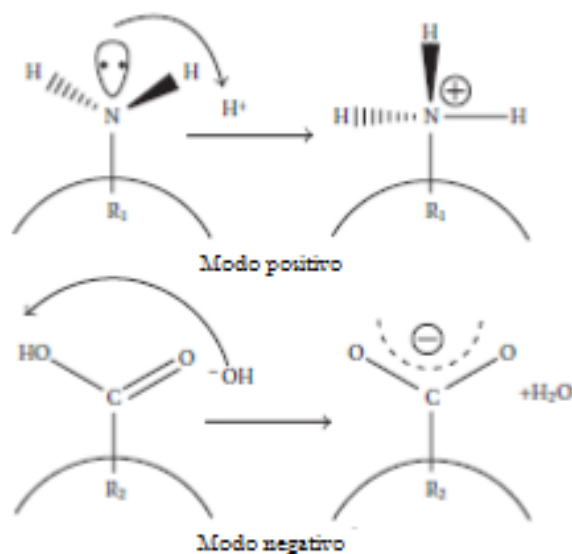


Os diferentes modos de ionização podem incluir a ionização por impacto electrónico, ionização química, ionização por laser, ionização e dessorção a laser assistida por matriz, ionização por bombardeamento de átomos rápidos (em inglês *Fast-Atom Bombardement*) ou ionização por electrospray (ESI, do inglês *ElectroSpray Ionization*). A ESI, método de ionização utilizado neste trabalho, é um método de ionização química à pressão atmosférica (APCI, do inglês *Atmospheric-Pressure Chemical Ionization*). A amostra a analisar passa por um capilar

aquecido (100-300 °C), sendo que a elevada temperatura permite a completa dessolvatação da amostra, levando a que a ionização seja feita em fase gasosa. Ao ambiente que rodeia o capilar é aplicado um forte campo eléctrico (2-6 kV), o qual resulta na acumulação de carga na superfície das gotas do líquido. Com a evaporação do solvente, a densidade de carga no interior das gotículas leva a que a repulsão de Coulomb atinja um valor crítico, ultrapassando a tensão superficial da gota, levando à formação de gotículas de menores dimensões. Realizando este processo em cadeia, dá-se a formação de um aerossol composto por partículas carregadas. Coaxialmente ao capilar, é mantido um fluxo de azoto ( $N_2$ ), o qual assiste a nebulização e direcciona o aerossol desde a saída do capilar até ao primeiro elemento electromagnético. Este modo de ionização resulta em iões com pouca energia interna, impedindo assim posteriores fragmentações.<sup>[51]</sup> Neste trabalho utilizou-se uma fonte de ionização de ESI em modo positivo, com disposição em Z.

**Figura II.2.** Trajecto em Z do feixe de iões desde o capilar até ao analisador de massa, com passagem por vários elementos electromagnéticos de focagem. (1) capilar, (2) bomba rotativa, (3) bomba turbomolecular, (4) analisador de massa.



**Figura II.3.** Mecanismo de ionização em modo positivo e modo negativo. Adaptado.<sup>[1]</sup>

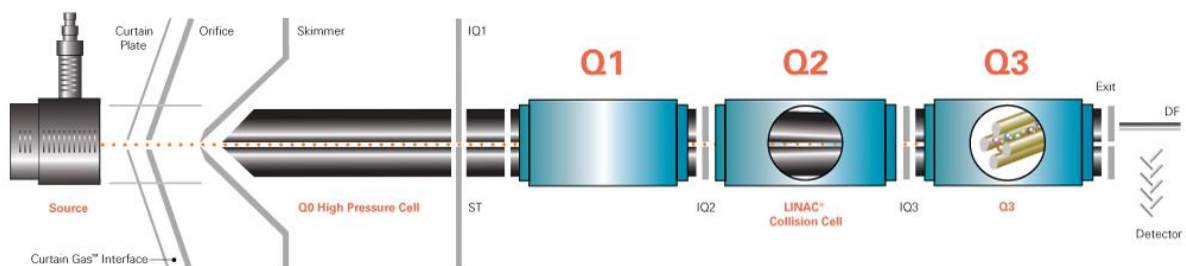
Os analisadores de massa são igualmente variados, podendo ser do tipo *Ion-Trap*, tempo de voo, sector magnético ou quadrupolo. O analisador de massa usado no decorrer deste estudo foi um quadrupolo. Este analisador acelera e controla a trajetória dos íons do aerossol, segundo a sua razão massa/carga ( $m/z$ ), através da aplicação de campos magnéticos. Um quadrupolo é constituído por quatro cilindros metálicos que funcionam como pólos magnéticos, distribuídos em torno de um eixo central, igualmente espaçados, em que pólos adjacentes possuem polaridades opostas. Aos cilindros do analisador são aplicadas duas correntes eléctricas – corrente contínua (DC, do inglês *direct current*) e corrente alternada (RF, do inglês *radio frequency*). Para uma dada combinação de DC/RF, apenas íons com determinada  $m/z$  percorrem o quadrupolo até ao detector, sendo os restantes íons desviados da trajetória inicial. Pelo seu funcionamento, o quadrupolo é também conhecido por filtro de massa. Uma variação contínua de DC e RF permite o varrimento de uma vasta gama de  $m/z$ . O modo de aquisição mais utilizado neste tipo de analisador é o modo SIM (do inglês *single ion monitoring*), no qual, fixando os valores de DC e RF, apenas um valor de  $m/z$  (e respectivos íons) é analisado.

### II.2.1. Espectrometria de massa sequencial

Os sistemas MS/MS são constituídos por vários analisadores de massa, permitindo sucessivas análises numa só amostra, resultando no aumento da selectividade, precisão, exactidão e sensibilidade. A selectividade destes sistemas é muito elevada, uma vez que a probabilidade de dois compostos distintos originarem o mesmo ião precursor e iões produto é ínfima. Por outro lado, a sensibilidade é aumentada pela redução considerável de sinais interferentes, obtendo-se uma significativa redução ao nível do ruído analítico.<sup>[30,31]</sup>

Neste trabalho foi utilizado um sistema MS/MS constituído por um triplo quadrupolo. Os três quadrupolos apresentam diferentes funções, sendo que os dois das pontas funcionam como filtros de massa, enquanto que o quadrupolo central assume o papel de uma célula de colisão. O primeiro quadrupolo permite a selecção de massa dos iões que entram na câmara do analisador de massa (precursores). Os iões que apresentam o valor de  $m/z$  adequado para a sua passagem pelo primeiro quadrupolo entram então na célula de colisão. Este segundo quadrupolo tem como única função acelerar os iões, os quais colidem com as moléculas do gás inerte ( $N_2$ ) existente nesta região do analisador de massa, levando assim à sua fragmentação. A fragmentação pode ser aumentada pelo aumento da energia de colisão ou da pressão do gás inerte. Os iões produto entram então no terceiro quadrupolo, responsável pela sua selecção por  $m/z$ . Para a devida identificação de compostos, são necessárias pelo menos duas transições de MRM (do inglês *multiple recording monitoring*), onde a mais intensa advem do ião denominado por “quantificador”, e as restantes de iões conhecidos por “qualificadores”.<sup>[36]</sup>

Figura II.4. Representação esquemática de um triplo quadrupolo.<sup>[36]</sup>







# Capítulo III

## Especificações Experimentais



### III.1. Material, Reagentes e Equipamento

#### III.1.1. Padrões e Reagentes

Todos os padrões das substâncias utilizados neste estudo foram adquiridos a Cerilliant (Round Rock, TX, EUA): sertralina HCl (99,7% pureza, 1 mg/mL, em metanol), venlafaxina HCl (99,8% pureza, 1 mg/mL, em metanol), norsesertralina HCl (98,7% pureza, 100 µg/mL, em metanol), ( $\pm$ )-O-desmetilvenlafaxina (100% pureza, 100 µg/mL, em metanol) e zolpidem-d6 (99,7% pureza, 100 µg/mL, em metanol).

O acetonitrilo Lichrosolv, *Hypergrade for LC-MS*, foi adquirido a Merck (Darmstadt, Alemanha). A água LC-MS, *for chromatography*, o ácido fórmico, *extra pure 98-100%*, e o dihidrogenofosfato de potássio, *for analysis*, foram igualmente adquirido a Merck (Darmstadt, Alemanha). O metanol, *Analytical Reagent Grade*, foi adquirido a Fisher Scientific (Leicestershire, Inglaterra).

O azoto necessário para o funcionamento do evaporador e do espectrómetro de massa foi obtido a partir de um gerador de azoto N2MID 600, da Domnick Hunter (Gateshead, Inglaterra). A água ultrapura MilliQ foi obtida através de um sistema Millipore, da Interface (Amadora, Portugal).

#### III.1.2. Material e Equipamento

O extractor utilizado é um Vac Elut EPS24, da Varian (Palo Alto, CA, EUA). O evaporador é um Turbo Vap LV Evaporator, da Caliper LifeSciences (Hopkinton, MA, EUA). O agitador de vórtex é um Zx3, da Velp Scientifica (Usmate Velate, Itália). O agitador mecânico é do modelo 3015, da GFL (Burgwedel, Alemanha). A centrifugadora utilizada é do modelo 5400 da Kubota (Tóquio, Japão). O equipamento de ultra-sons Sonorex Super RK 510H, da Bandelin (Berlim, Alemanha). As bombas de vácuo utilizadas são da KNF

(Munzingen, Alemanha). O sistema de UPLC-MS/MS utilizado é da Waters (Milford, MA, EUA).

Todas as pipetas móveis (e pontas adequadas) utilizadas, são da Gilson (Middleton, WI, EUA). As várias pipetas fixas que foram utilizadas ao longo do projecto, assim como as pontas adequadas, são da Eppendorf (Hamburg, Alemanha). Doseadores e *combitips* são igualmente da Eppendorf (Hamburg, Alemanha).

As colunas Oasis HLB Cartridge 3cc (60 mg) usadas na extracção em fase sólida e os vials de 300 µL, com tampa de rosca pré-rasgada, são da Waters (Milford, MA, EUA). A coluna cromatográfica usada é uma Acquity UPLC HSS T3 1,8 µm (2,1×100 mm), igualmente da Waters (Milford, MA, EUA). Os tubos de polipropileno de 10 mL, com tampas de rosca, foram fornecidos pela Statedt (Newton, NC, EUA). Os tubos de vidro, com tampa de rosca, de 12 mL (16×100 mm) utilizados são da Schott (Elmsford, NY, EUA).

### III.1.3. Preparação de padrões, solventes e soluções

Foi preparada uma mistura padrão de armazenamento a 10 µg/mL, incluindo as quatro substâncias em estudo. A partir desta mistura padrão, foram efectuadas várias diluições, obtendo-se assim misturas-padrão de trabalho a 1 µg/mL, 0,1 µg/mL e 0,01 µg/mL. A mistura de padrão interno de zolpidem-d6 foi preparada a 1 µg/mL. Todas as soluções foram preparadas em metanol.

Foram preparados dois tipos de solução aquosa de ácido fórmico a 0,1%, uma com água LC-MS (para a fase móvel do equipamento) e outra com água MilliQ para a preparação de soluções designadas por *Weak Needle Wash* e *Strong Needle Wash*. A partir de acetonitrilo Lichrosolv e da solução aquosa de ácido fórmico a 0,1%, com MilliQ, prepararam-se as soluções *Weak Needle Wash* (30:70) e *Strong Needle Wash* (90:10). A solução *Seal Wash In* foi preparada a partir de acetonitrilo Lichrosolv e água MilliQ, numa proporção de 10:90 (v/v).

A solução aquosa de metanol a 5% foi preparada a partir de metanol e água LC-MS. A solução de reconstituição foi preparada com acetonitrilo Lichrosolv e solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% em água LC-MS, numa proporção de 25:75 (v/v). Da solução de tampão fosfato a 0,1 M foi sempre preparado um volume de 2 L. Para tal, pesou-se 27,21 g de dihidrogenofostato de potássio e perfez-se o volume final com água MilliQ.

### III.2. Amostras Brancas

As amostras brancas utilizadas foram identificadas segundo a normas impostas pelo SQTf-DC. Os códigos internos atribuídos a cada amostra branca são compostos por duas letras, representativas do tipo de amostra, e três algarismos. A natureza das amostras brancas utilizadas é assim definida do seguinte modo:

- SC – Sangue da cavidade cardíaca (*post-mortem*)
- SV – Sangue recolhido *in vivo*
- BU – Urina

A fim de aumentar a representabilidade do método, foram construídas onze misturas (*pools*) de sangue, uma constituída por três sangues periféricos (obtidos através do IPS – Instituto Português do Sangue) e as restantes constituídas por quatro sangues da cavidade cardíaca (*post-mortem*). Todas as amostras utilizadas foram previamente analisadas por ensaio imuno-enzimático (CODA, Bio-Rad).

As amostras brancas de urina foram recolhidas em voluntários do SQTf-DC.

#### III.2.1. Triagem das amostras brancas

A fim de assegurar a ausência de substâncias em todas as amostras brancas, efectuou-se uma análise de triagem de medicamentos e benzodiazepinas. Para tal, preparou-se uma alíquota de cada amostra branca adicionando 50 µL de zolpidem-d6 e 50 µL de diazepam-d5 (padrão interno utilizado na determinação de benzodiazepinas), ambos a 1 µg/mL. Juntamente com as amostras em estudo, preparou-se uma curva de calibração e controlos segundo o procedimento descrito no ponto seguinte. Note-se que este estudo foi efectuado em ambas as matrizes, tendo sido preparados controlos e curva de calibração em sangue e urina.

As amostras foram analisadas por UPLC-MS/MS, de acordo com o método desenvolvido, e consideradas negativas para medicamentos e benzodiazepinas, de acordo com os critérios em vigor no SQTf-DC.

### III.3. Procedimento de ensaio

#### III.3.1. Preparação das amostras

Antes de iniciar o procedimento analítico, as amostras foram descongeladas, à temperatura ambiente, através de movimentos de rotação e inversão suaves, com recurso a um agitador mecânico.

A quantidade desejada de amostra foi medida com recurso a pipetas automáticas, fixas ou variáveis, para tubos de polipropileno de 10 mL. Na medição das amostras foram utilizadas pontas com filtro, a fim de evitar avarias e contaminações nos equipamentos de medição.

Antes de medir as misturas-padrão e o padrão interno, os respectivos frascos foram agitados com o auxílio de um vórtex. Ao volume de amostra contido em cada tubo de PP, foram adicionados 50 µL do padrão interno, zolpidem-d6 a 1 µg/mL. A fortificação de amostras brancas para a preparação de curvas de calibração e controlos foi efectuada neste passo. Após fortificação, e antes da diluição, é recomendável a agitação dos tubos, com recurso a um vórtex. Na diluição das amostras, foram adicionados 3 mL de água LC-MS (a amostras de sangue) ou 3 mL de uma solução tampão fosfato a 0,1 M (a amostras de urina), com auxílio de um doseador e *combitip* adequados. A diferença na diluição das duas matrizes em estudo será explicada no Capítulo IV – Validação do método. As amostras foram devidamente agitadas num vórtex e colocadas a centrifugar a 3000 rpm durante 5 min, com aceleração e desaceleração lentas. Após a centrifugação, os tubos foram removidos e transportados sem serem agitados, afim do precipitado permanecer no fundo do tubo.

#### III.3.2. Extração em fase sólida

Na extração em fase sólida foram utilizadas colunas Oasis HLB 3 cc (60 mg). O enchimento destas colunas tem características hidrofílicas e lipofílicas, tornando a extração teoricamente ideal para a extração de analitos e seus metabolitos.

Antes de iniciar o procedimento extractivo, as colunas de extração foram devidamente acondicionadas. Antes do acondicionamento, o extractor é colocado na posição de Waste, para que todas as substâncias sejam encaminhadas para o esgoto. Durante todo o processo extractivo, os reagentes foram medidos com recurso a um doseador e *combitips* adequados, tendo sido utilizados *combitips* diferentes para diferentes reagentes.

O acondicionamento das colunas de extracção foi iniciado com a eluição de possíveis resíduos e contaminantes presentes nas colunas, com 2 mL de metanol, seguida pela adição de 2 mL de água LC-MS. A rapidez deste passo é fundamental, uma vez que a coluna de extracção com metanol seca muito rápido, sendo que se secar em demasia deixará de ser permeável. Depois da passagem da água, foi adicionada a amostra. Este passo foi feito com bastante cuidado, a fim de não verter amostra para fora da coluna, nem deixar cair precipitado dentro desta. Seguiu-se o passo da lavagem das colunas, feita com adição de 2 mL de metanol a 5%.

Depois de lavadas, as colunas foram mantidas em vácuo, a fim de secarem. Consequência das suas propriedades hidrofílicas, as colunas usadas retêm muita água, pelo que o passo de secagem tende a ser bastante longo. O tempo necessário para uma secagem adequada das colunas de extracção é função da pressão de vácuo a que se encontram sujeitas as colunas. O tempo médio de secagem neste trabalho rondou uma hora. Note-se que quanto mais secas estiverem as colunas, maior será a limpeza das amostras, porém tende-se a perder mais analito pelo que, no decorrer dos estudos de validação, deve ser adoptado um critério de compromisso.

Quando devidamente secas as colunas, o extractor foi colocado na posição *Collect* e os tubos de vidro colocados dentro deste nas posições devidas. Para eluir os analitos, foram adicionados 2 mL de metanol às colunas de extracção. O eluato foi recolhido nos tubos de vidro.

### **III.3.3. Secagem e reconstituição dos extractos**

Eluídas as amostras, seguiu-se para a evaporação dos extractos. A evaporação foi conseguida colocando os tubos num banho de água destilada, a uma temperatura estável de 40 °C, sob corrente de azoto. A pressão de azoto não deve ser demasiado elevada, sob pena do extracto se depositar nas zonas altas das paredes do tudo de vidro.

Após os tubos se encontrarem devidamente secos, procedeu-se à reconstituição dos extractos. A reconstituição foi efectuada com fase móvel, num volume de 100 µL e com recurso a pipeta e pontas adequadas. A fase móvel foi colocada dentro dos tubos de ensaio. Seguidamente, estes foram agitados com recurso a um vórtex, a fim de dissolver o resíduo da evaporação. O volume reconstituído foi passado para os vials de 300 µL usados no sistema de injeção automática do UPLC-MS/MS.



Aconselha-se a que, antes de serem colocados dentro do sistema, os vials sejam observados no sentido de verificar, e se necessário eliminar, a existência de bolhas de ar no interior dos mesmos.

### **III.4. Condições do equipamento**

Como um dos principais objectivos deste estudo é o desenvolvimento e validação de um método que seja facilmente integrado na rotina de um laboratório, as condições de utilização definidas foram as que já eram utilizadas pelo laboratório na determinação de medicamentos por UPLC-MS/MS. Isto permite que as substâncias em estudo sejam integradas no vasto leque de medicamentos já determinados pelo SQTf-DC, sem necessidade de alteração do método proposto e validado.

A fase móvel utilizada foi constituída por acetonitrilo Lichrosolv e solução aquosa de ácido fórmico a 0,1%, em água LC-MS. Durante cada corrida (8 minutos), foi utilizado o gradiente de fase móvel apresentado na figura III.1, o que permitiu uma adequada separação cromatográfica dos compostos. O fluxo de fase móvel definido foi de 0,5 mL/min, sendo que este resulta numa boa separação cromatográfica dentro do tempo de corrida estabelecido. A coluna analítica utilizada para a separação cromatográfica foi uma Acquity UPLC HSS T3 1,8  $\mu\text{m}$  (2,1 $\times$ 100 mm).

Figura III.1. Gradiente de fase móvel do UPLC-MS/MS.

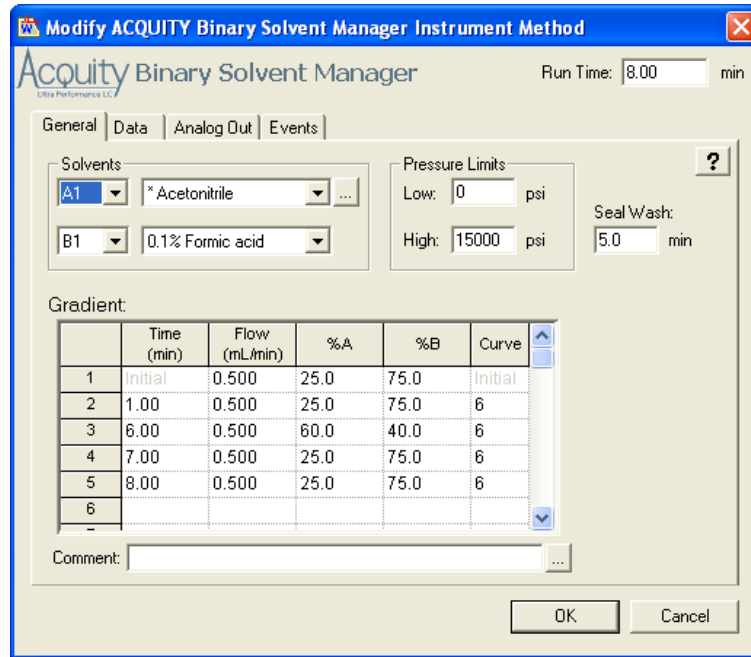
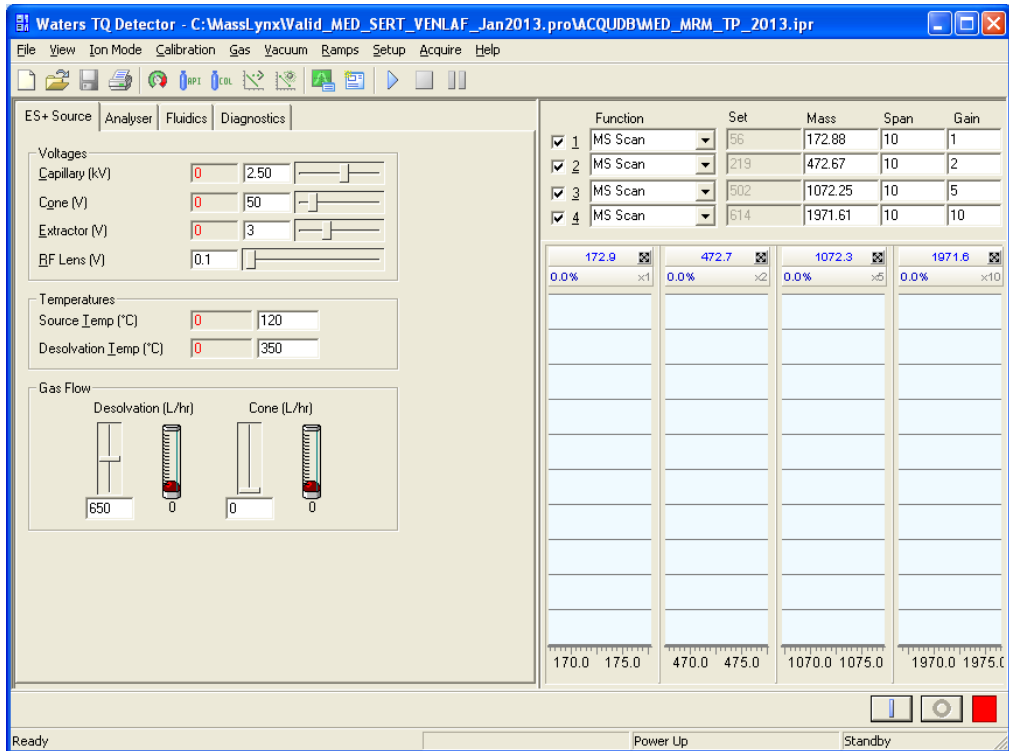


Figura III.2. Condições impostas no espectrômetro de massa.



As temperaturas da coluna cromatográfica e do amostrador foram igualmente estabelecidas, sendo de 35 °C e 15 °C, respectivamente. No espectrómetro de massa, foram definidas uma temperatura da fonte de 120 °C e, para a dessolvatação, uma temperatura de 350 °C. O fluxo de gás de dessolvatação foi fixado a 650 L/h e do cone a 0 L/h. Ao definir o fluxo de gases no cone como nulo, reduziu-se a dispersão da amostra junto a este, obtendo-se uma maior sensibilidade do equipamento.

### III.5. Estudos preliminares

As diferenças de potencial de colisão e do cone têm de ser devidamente estabelecidos, a fim de se obterem sinais com maior intensidade e menor ruído analítico. Com base em valores encontrados numa extensa pesquisa bibliográfica, foi efectuado o estudo destes parâmetros, variando no método de aquisição voltagens e valores de  $m/z$ , utilizando uma mistura das quatro substâncias a 500 ng/mL.

A fim de definir as condições adequadas do espectrómetro de massa para este estudo, foram efectuados diversos testes, utilizando vários modos de aquisição:

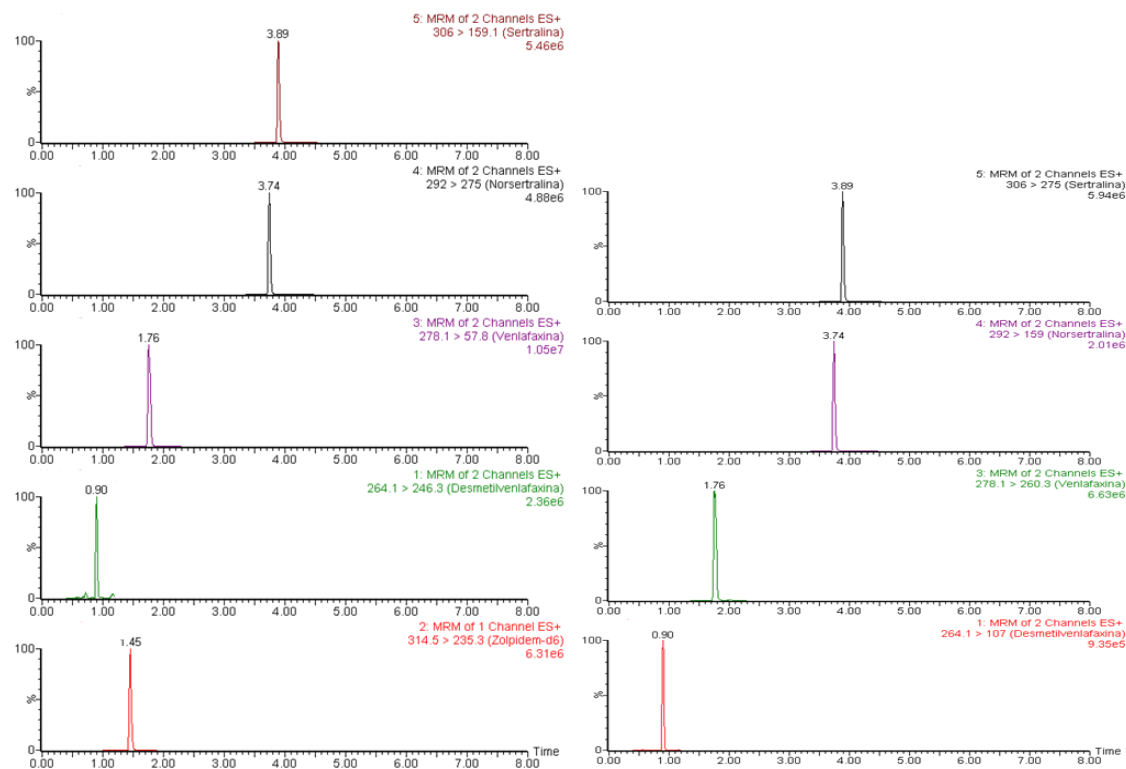
- SCAN – permite determinar a voltagem do cone mais adequada para a análise do ião precursor (principal);
- SIR (do inglês *selected ion recording*) – permite definir os parâmetros que resultam na passagem de determinado ião precursor até ao detector;
- DaughterScan – permite definir as melhores condições para a obtenção dos iões-produto. Através da análise da informação recolhida por este modo de aquisição, definem-se os iões quantificador e qualificador(es).
- MRM (do inglês *multiple recording monitoring*) – permite definir as condições dos três quadrupolos, a fim de ser detectado um único ião-produto de um dado ião precursor.

Pela combinação dos resultados obtidos através destas análises, foram escolhidas as condições que resultaram em picos com melhor definição e mais intensidade. As condições de aquisição implementadas no método analítico proposto e validado são a seguir apresentadas.

**Tabela III.1.** Resumo das condições de aquisição de dados do espectrómetro de massa, para as quatro substâncias em estudo e do padrão interno. (Quando pertinente, as condições dos íões produto são colocados por ordem de relevância do íão, separados por ponto-e-vírgula.)

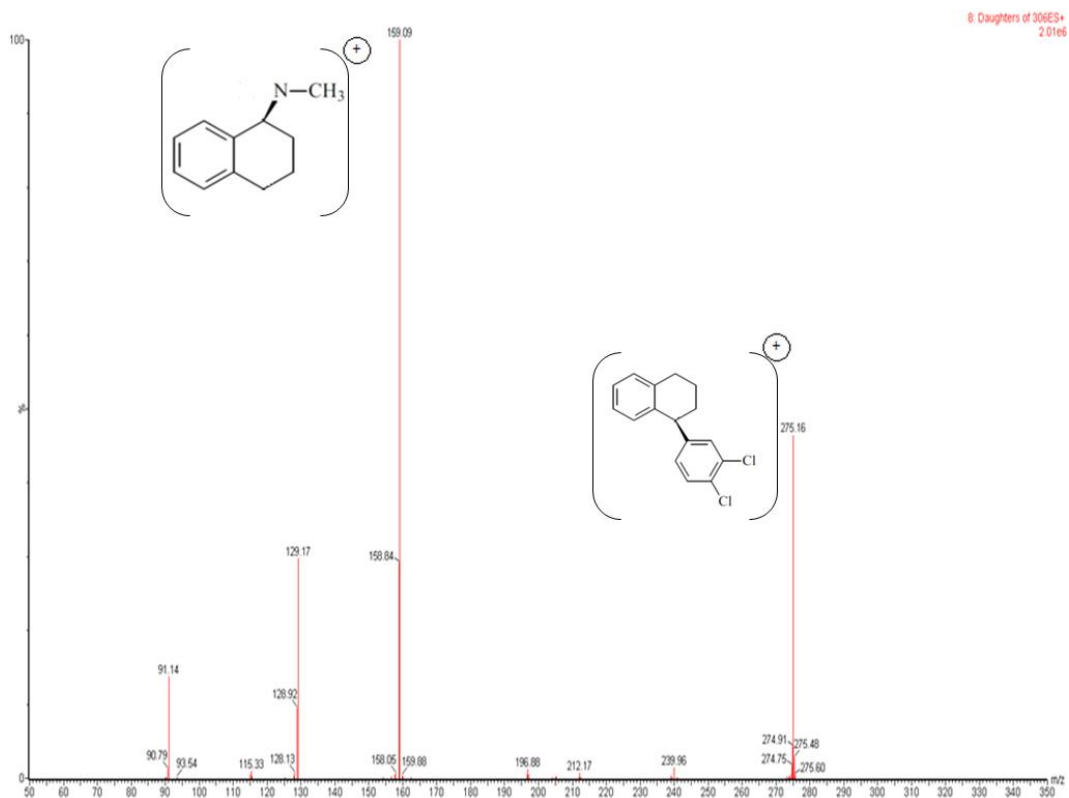
	Janela de tempo de aquisição [min]	Razão $m/z$ do íão precursor	Razão $m/z$ do íão produto	Voltagem do cone [V]	Energia de colisão [eV]
Sertralina	3,5 – 4,55	306,0	159,1; 275,0	20	26; 15
Norsertalina	3,35 – 4,5	292,0	275,0; 159,0	10	40; 12
Venlafaxina	1,35 – 2,3	278,1	57,8; 260,3	25	18; 12
Desmetilvenlafaxina	0,4 – 1,2	264,1	246,3; 107,0	20	40; 10
Zolpidem-d6	1,0 – 1,9	314,5	235,3	56	38

**Figura III.3.** Cromatogramas obtidos pela aplicação das condições apresentadas na tabela III.1.

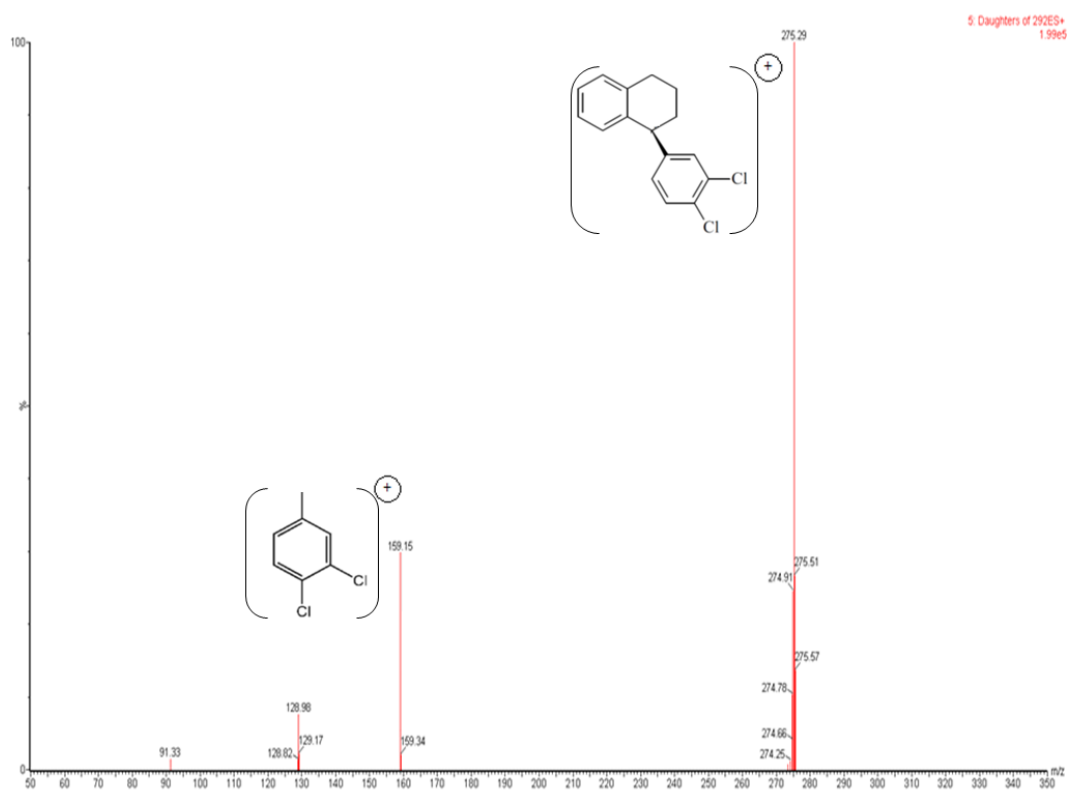


Das análises em modo *DaughterScan*, obtiveram-se os espectros de fragmentação das quatro substâncias em estudo. Dos espectros obtidos, tomou-se o íão com maior abundância relativa como quantificador, e o segundo com maior abundância relativa como qualificador.

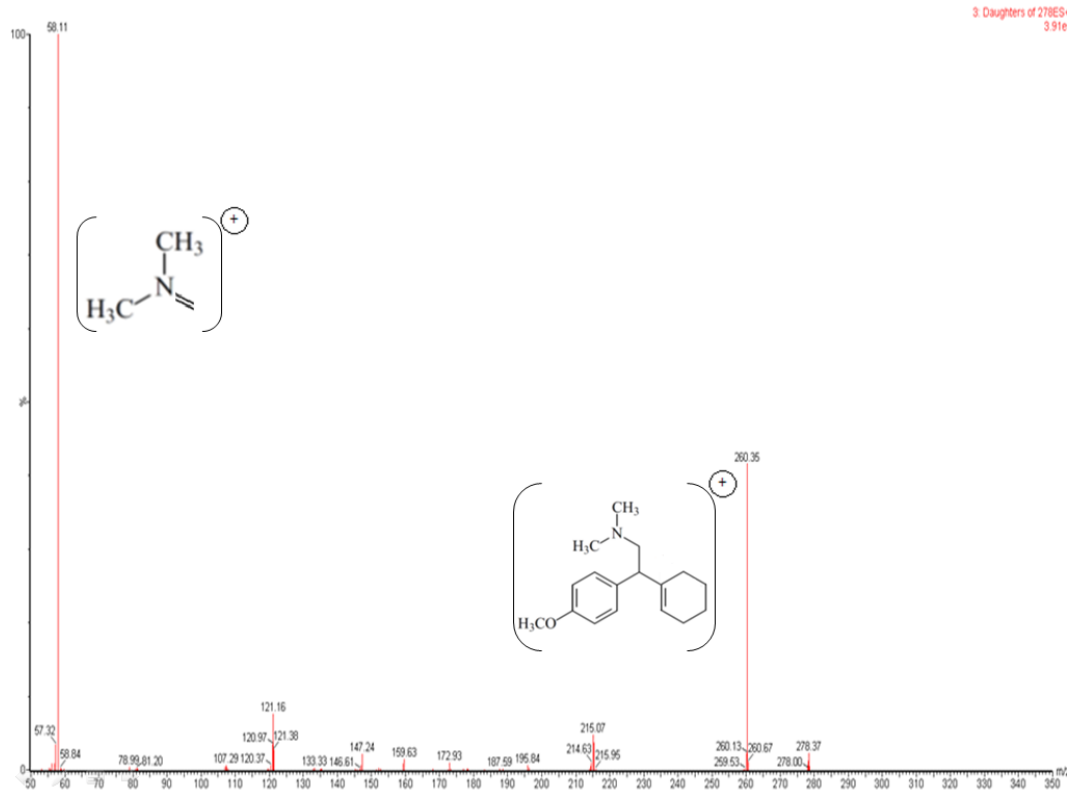
**Figura III.4.** Somatório dos espectros de fragmentação da sertralina  $[M + H]^+$ , com representação dos fragmentos. O íon molecular, quantificador e qualificador, respectivamente,  $m/z$  306, 159 e 275.



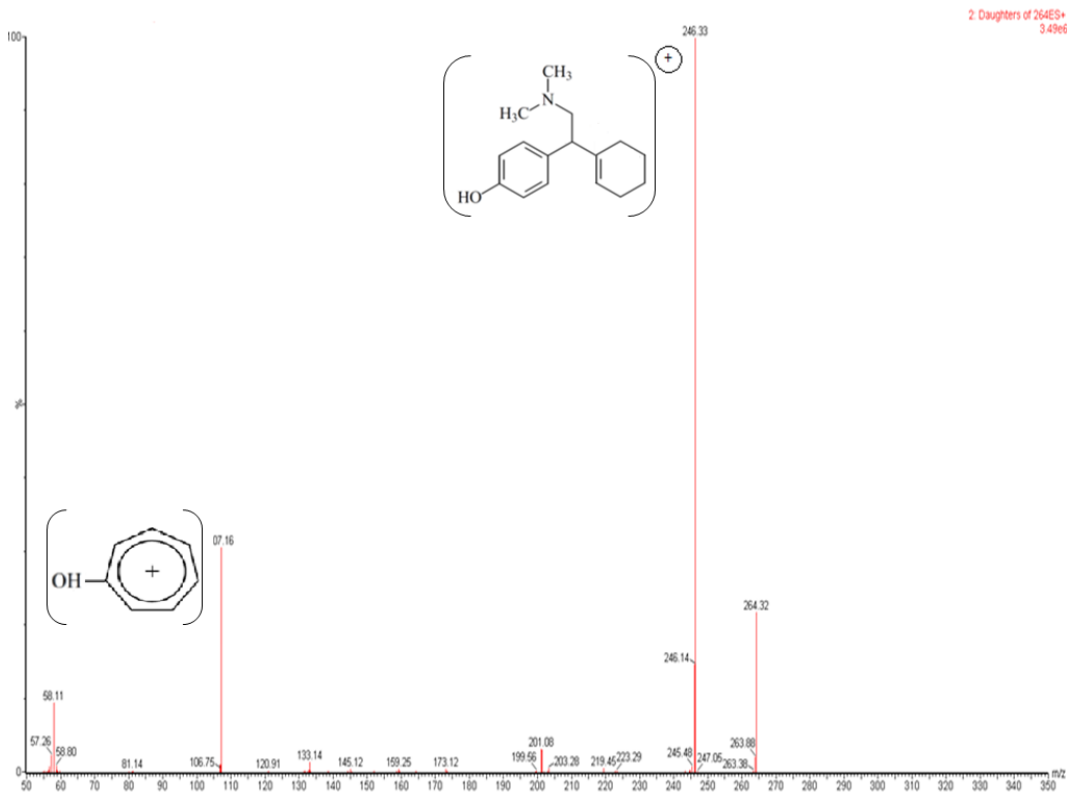
**Figura III.5.** Somatório dos espectros de fragmentação da nortsertralina  $[M + H]^+$ , com representação dos fragmentos. O íon molecular, quantificador e qualificador, respectivamente,  $m/z$  292, 275 e 159.



**Figura III.6.** Somatório dos espectros de fragmentação da venlafaxina  $[M + H]^+$ , com representação dos fragmentos. O íon molecular, quantificador e qualificador, respectivamente,  $m/z$  278, 58 e 260.



**Figura III.7.** Somatório dos espectros de fragmentação da desmetilvenlafaxina  $[M + H]^+$ , com representação dos fragmentos. O íon molecular, quantificador e qualificador, respectivamente,  $m/z$  264, 246 e 107.



Note-se que o padrão interno usado neste trabalho, zolpidem-d6, foi escolhido por ser já utilizado na determinação de medicamentos por UPLC-MS/MS no SQTf-DC. Tendo-se provado ser eficaz durante este estudo, não houve a necessidade de efectuar um estudo direccionado para a escolha do padrão interno.

De igual modo, a coluna cromatográfica utilizada neste projecto foi idêntica à utilizada na rotina da análise de medicamentos no laboratório, tendo sido de igual modo demonstrada a adequabilidade neste passo, evitando assim o ensaio com outras colunas analíticas.

# **C**apítulo IV

## **Validação do Método**





A validação de um método analítico apresenta-se de importância fundamental para laboratórios que pretendam implementar e cumprir rigorosos critérios de qualidade. A avaliação de diversos parâmetros permite comprovar que o método é adequado para as análises estudadas, nas condições avaliadas. Este processo garante a qualidade e idoneidade do método, tomando como correctas as suas especificações e dando credibilidade aos resultados obtidos.<sup>[31]</sup> A validação abrange todo o procedimento de ensaio, desde a manipulação inicial das amostras até ao tratamento de dados, abarcando toda a sequência analítica.

Os parâmetros a estudar dependem grandemente das características do ensaio (e.g. ensaio qualitativo, ensaio quantitativo) e do tipo e complexidade da amostra. Apesar deste ser um tópico bastante controverso, os parâmetros a estudar foram seleccionados de acordo com o procedimento operacional para validação de procedimentos de ensaio em vigor no SQTF-DC do INMLCF. Tendo em consideração este referencial, deve-se, para métodos de confirmação quantitativa, avaliar: especificidade/selectividade, eficiência de extracção, limites de detecção e quantificação, *carryover*, linearidade, precisão intermédia, repetibilidade, reprodutibilidade, exactidão e robustez. Para além destes, a avaliação do efeito matriz é aconselhado para métodos que integrem a tecnologia LC-MS/MS.<sup>[39]</sup> Note-se que a reprodutibilidade não foi estudada, uma vez que pressupõe o envolvimento de vários laboratórios (ensaios inter-laboratoriais).

## IV.1. Especificidade e Seletividade

A selectividade de um método traduz a sua capacidade para separar, fisicamente, as substâncias de uma mistura, recorrendo a técnicas cromatográficas, por exemplo. A especificidade é comumente tida como termo sobreponível à selectividade, ainda que erradamente. A especificidade pode ser descrita como a capacidade de um método para determinar individualmente um analito, na presença de outras substâncias (*e.g.* componentes de matriz, metabolitos, impurezas, produtos de degradação), sem a interferência significativa destas.<sup>[39]</sup> A fim de provar que o método é selectivo, a ausência de sinais interferentes tem de ser demonstrada. A especificidade do método é provada quando este diferencia e determina inequivocamente cada analito de interesse, numa mistura de substâncias.

Para avaliar estes parâmetros, foram utilizadas duas alíquotas de 0,5 mL de cada amostra branca. Uma das alíquotas foi fortificada com 25 µL de uma mistura padrão a 1 ng/mL, enquanto à outra foi aplicado directamente o procedimento de ensaio. Adicionaram-se a ambas as alíquotas 50 µL de padrão interno a 1 µg/mL.

Para avaliar a positividade/negatividade das amostras foram utilizados dois critérios para a identificação e confirmação de substâncias – critério de tempo de retenção relativo (TRR) e critério das relações iónicas das transições estudadas. Para que a presença de uma determinada substância seja confirmada numa amostra, ambos os critérios têm de ser cumpridos. Foram consideradas como controlos positivos as amostras fortificadas a partir das amostras SC061-01 e BU010-01.

A fim de efectuar um estudo da especificidade do método mais completo, fortificou-se uma terceira alíquota do sangue branco SV057 e do branco de urina BU048 com 100 µL de uma mistura de benzodiazepinas e outra de medicamentos, ambas a 1 µg/mL, com adição de 50 µL de padrão interno.

### IV.1.1. Critério de Tempo de Retenção Relativo

Este critério define que a diferença entre o tempo de retenção (TR) de uma dada substância na amostra e no controlo deve ser inferior a 2% ou a 0,1 min, e que a diferença entre o TRR de uma dada substância na amostra e no controlo deve ser inferior a 2%, em

termos de diferença de tempos de retenção absolutos. A diferença relativa de TRR é determinada a partir da seguinte relação:

$$\Delta TRR = \frac{TRR_{Suspeito} - TRR_{Controlo}}{TRR_{Controlo}}$$

onde:

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

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

$\Delta TRR$  - Diferença relativa de TRR

Os resultados obtidos no estudo do critério de tempos de retenção relativos apresentam-se de seguida, sob forma de tabelas. Os valores que não obedecem a ambos os critérios acima apresentados encontram-se a vermelho.

**Tabela IV.1.** Tempos de retenção relativos (TRR) das substâncias em cada uma das amostras de sangue.

Substância	Código das amostras de sangue										
	SC007	SC039	SC061	SC062	SC063	SC065	SC066	SC067	SC069	SC070	SV057
Sertralina	2,801	2,801	2,782	2,794	2,801	2,782	2,782	2,801	2,782	2,842	2,782
Norsertalina	2,695	2,702	2,676	2,695	2,695	2,676	2,676	2,695	2,676	2,734	2,676
Venlafaxina	1,248	1,248	1,246	1,248	1,248	1,246	1,246	1,234	1,239	1,252	1,246
Desmetilvenlafaxina	0,546	0,553	0,549	0,553	0,546	0,549	0,549	0,539	0,549	0,547	0,549

**Tabela IV.2.** Diferença relativa entre o TRR de uma dada substância na amostra e no controlo, em sangue.

Substância	Código das amostras de sangue										
	SC007	SC039	SC062	SC063	SC065	SC066	SC067	SC069	SC070	SV057	
Sertralina	0,709	0,709	0,454	0,709	0,000	0,000	0,709	0,000	2,158	0,000	
Norsertalina	0,709	0,974	0,709	0,709	0,000	0,000	0,709	0,000	2,158	0,000	
Venlafaxina	0,140	0,140	0,140	0,140	0,000	0,000	-0,998	-0,565	0,427	0,000	
Desmetilvenlafaxina	-0,582	0,709	0,709	-0,582	0,000	0,000	-1,873	0,000	-0,461	0,000	

**Tabela IV.3.** Tempos de retenção relativos (TRR) das substâncias em cada uma das amostras de urina.

<i>Substância</i>	<i>Código das amostras de urina</i>								
	BU01	BU02	BU04	BU05	BU06	BU07	BU08	BU10	BU048
Sertralina	2,701	2,658	2,642	2,701	2,625	2,714	2,653	2,664	2,696
Norsertalina	2,599	2,550	2,530	2,599	2,520	2,605	2,547	2,564	2,588
Venlafaxina	1,224	1,215	1,205	1,231	1,230	1,231	1,213	1,221	1,230
Desmetilvenlafaxina	0,612	0,611	0,596	0,619	0,592	0,599	0,593	0,604	0,608

**Tabela IV.4.** Diferença relativa entre o TRR de uma dada substância na amostra e no controle, em urina.

<i>Substância</i>	<i>Código das amostras de urina</i>								
	BU01	BU02	BU04	BU05	BU06	BU07	BU08	BU048	
Sertralina	0,176	-0,252	-0,827	1,361	-1,480	1,871	-0,416	1,183	
Norsertalina	0,417	-0,524	-1,325	1,361	-1,717	1,626	-0,667	0,939	
Venlafaxina	-0,426	-0,549	-1,325	0,804	0,719	0,804	-0,667	0,676	
Desmetilvenlafaxina	0,680	1,111	-1,325	2,487	-1,974	-0,892	-1,770	0,676	

O critério de tempo de retenção relativo foi cumprido para as quatro substâncias e nas diferentes amostras de sangue, com exceção da amostra SV070 para a sertralina e norsertalina. Nas amostras de urina, o critério de tempo de retenção relativo foi sempre cumprido, com exceção da amostra BU05 para a desmetilvenlafaxina.

#### IV.1.2. Critério das Relações Iônicas das Transições

Para que este critério seja cumprido, a diferença entre as áreas relativas das transições de uma dada substância na amostra e no controle não deve diferir do valor correspondente apresentado na Tabela IV.5.

**Tabela IV.5.** Tolerância máxima para as áreas relativas das transições iónicas.

<i>Áreas relativas (% do pico base)</i>	<i>Tolerância</i>
> 50	10
> 25 e < 50	20%
5 < 25	5
< 5	50%

Com base na Tabela IV.5 e nas áreas relativas obtidas nos controlos positivos, definiram-se os seguintes intervalos de tolerância para cada substância, com apresentação das transições iónicas escolhidas por substância.

**Tabela IV.6.** Transições iónicas seleccionadas para cada substância e respectivo intervalo de tolerância, no estudo em sangue.

<i>Substância</i>	<i>Transições iónicas</i>		<i>Tolerância</i>	
	<b>1ª Transição</b>	<b>2ª Transição</b>	<b>Mínima</b>	<b>Máxima</b>
Sertralina	306 > 159,1	306 > 275	73,93	93,93
Norsertalina	292 > 275	292 > 159	34,78	52,17
Venlafaxina	278,1 > 57,8	278,1 > 260,3	68,34	88,34
Desmetilvenlafaxina	264,1 > 246,3	264,1 > 107	33,43	50,14

**Tabela IV.7.** Transições iónicas seleccionadas para cada substância e respectivo intervalo de tolerância, no estudo em urina.

<i>Substância</i>	<i>Transições iónicas</i>		<i>Tolerância</i>	
	<b>1ª Transição</b>	<b>2ª Transição</b>	<b>Mínima</b>	<b>Máxima</b>
Sertralina	306 > 159,1	306 > 275	65,44	85,44
Norsertalina	292 > 275	292 > 159	41,05	61,05
Venlafaxina	278,1 > 57,8	278,1 > 260,3	58,20	78,20
Desmetilvenlafaxina	264,1 > 246,3	264,1 > 107	39,46	59,19

Nas tabelas seguintes encontram-se as áreas relativas das transições iónicas obtidas para cada substância.

**Tabela IV.8.** Áreas relativas das transições iônicas das respectivas substâncias, em sangue.

<i>Transições</i>	<i>Sertralina</i>	<i>Norsertalina</i>	<i>Venlafaxina</i>	<i>Desmetilvenlafaxina</i>
	306,0 > 275,0	292,0 > 159,0	278,1 > 260,3	264,1 > 107,0
SC007	80,2	42,6	76,3	41,6
SC039	88,1	47,2	82,9	41,8
SC061	83,9	43,5	78,3	41,8
SC062	91,2	44,3	82,5	42,6
SC063	90,3	45,7	73,2	42
SC065	82,1	48,3	77,8	46,2
SC066	84,7	46,6	78,0	46,7
SC067	77,2	50,9	71,5	44,8
SC069	81,4	44,2	73,7	39,9
SC070	83,9	49,3	76,8	44,5
SV057	86,3	45,7	78,7	36,8

**Tabela IV.9.** Áreas relativas das transições iônicas das respectivas substâncias, em urina.

<i>Transições</i>	<i>Sertralina</i>	<i>Norsertalina</i>	<i>Venlafaxina</i>	<i>Desmetilvenlafaxina</i>
	306,0 > 275,0	292,0 > 159,0	278,1 > 260,3	264,1 > 107,0
BU01	75,3	49,2	66,4	43,0
BU02	79,0	45,8	70,0	43,4
BU03	80,8	44,8	76,7	46,8
BU04	81,3	48,9	71,8	49,4
BU05	78,0	47,7	74,6	52,2
BU06	78,9	48,4	69,7	54,2
BU07	78,7	48,5	70,6	48,4
BU08	75,4	51,1	68,2	49,3
BU09	82,1	49,5	67,6	49,7
BU010	75,3	49,2	66,4	43,0
BU048	79,0	45,8	70,0	43,4

As Tabelas IV.10 e IV.11 reúnem os resultados obtidos no estudo da especificidade/selectividade em sangue e urina, respectivamente.

Tabela IV.10. Resultados obtidos no estudo da especificidade/selectividade, em sangue.

<i>Análise das Amostras negativas</i>		
<i>Código da amostra</i>	<i>Resultado</i>	<i>Observações</i>
SC007-01	Negativo	_____
SC039-01	Negativo	_____
SC061-01	Negativo	_____
SC062-01	Negativo	_____
SC063-01	Negativo	_____
SC065-01	Negativo	_____
SC066-01	Negativo	_____
SC067-01	Negativo	_____
SC069-01	Negativo	_____
SC070-01	Negativo	_____
SV057-07	Negativo	_____
<b><u>Percentagem de Falsos Positivos</u></b>		0%
<i>Análise das Amostras positivas</i>		
<i>Código da amostra</i>	<i>Resultado</i>	<i>Observações</i>
SC007-01	Positivo	_____
SC039-01	Positivo	_____
SC061-01	Positivo	_____
SC062-01	Positivo	_____
SC063-01	Positivo	_____
SC065-01	Positivo	_____
SC066-01	Positivo	_____
SC067-01	Positivo	_____
SC069-01	Positivo	_____
SC070-01	Positivo/Negativo	A sertralina e norsesertralina não cumprem o critério dos tempos de retenção.
SV057-07	Positivo	_____
<b><u>Percentagem de Falsos Negativos</u></b>		4,55%



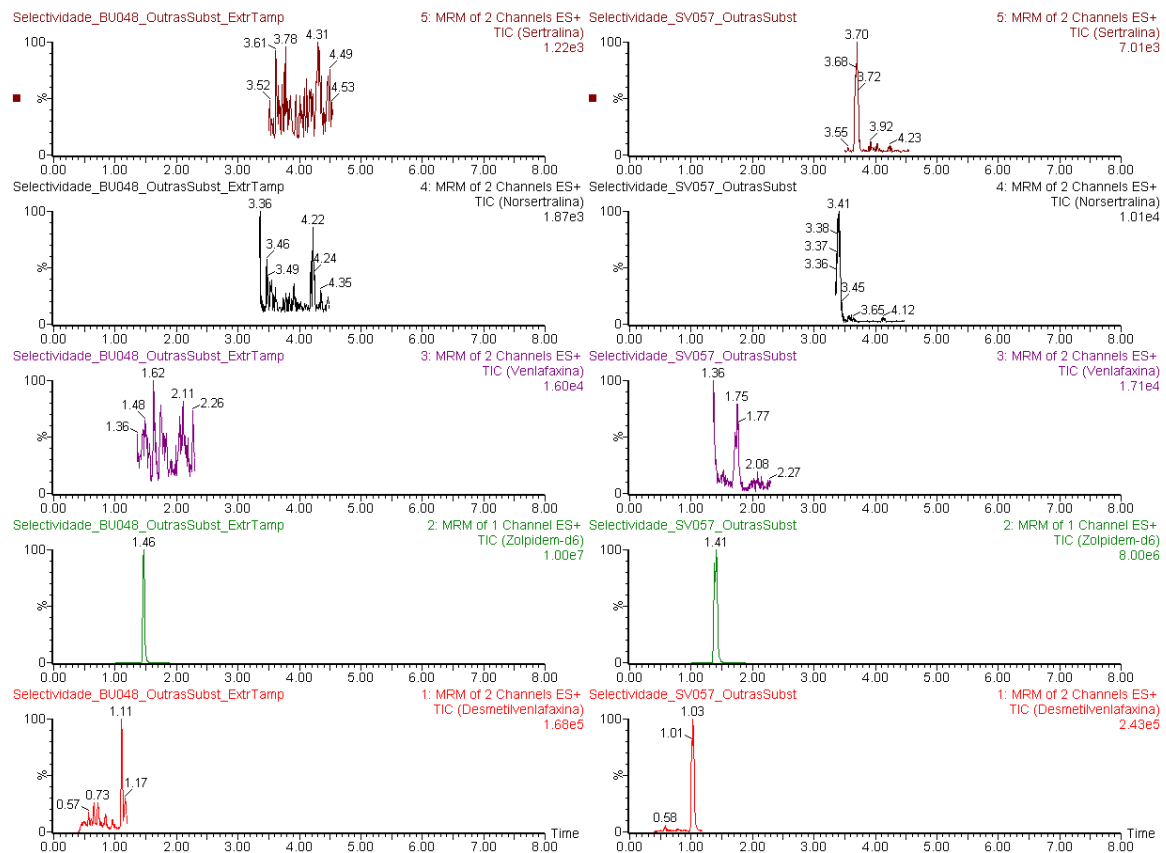
Tabela IV.11. Resultados obtidos no estudo da especificidade/selectividade, em urina.

<i>Análise das Amostras negativas</i>		
<i>Código da amostra</i>	<i>Resultado</i>	<i>Observações</i>
BU01	Negativo	_____
BU02	Negativo	_____
BU04	Negativo	_____
BU05	Negativo	_____
BU06	Negativo	_____
BU07	Negativo	_____
BU08	Negativo	_____
BU10	Negativo	_____
BU048	Negativo	_____
<b><u>Percentagem de Falsos Positivos</u></b>		0%
<i>Análise das Amostras positivas</i>		
<i>Código da amostra</i>	<i>Resultado</i>	<i>Observações</i>
BU01	Positivo	_____
BU02	Positivo	_____
BU04	Positivo	_____
BU05	Positivo/Negativo	A desmetilvenlafaxina não cumpre o critério dos tempos de retenção.
BU06	Positivo	_____
BU07	Positivo	_____
BU08	Positivo	_____
BU10	Positivo	_____
BU048	Positivo	_____
<b><u>Percentagem de Falsos Negativos</u></b>		2,78%

De modo a que especificidade e selectividade sejam validadas, as percentagens calculadas têm de ser 0% e inferiores a 10% para falsos positivos e falsos negativos, respectivamente. As percentagens obtidas foram de 0% de falsos positivos e de 4,55% e 2,78% de falsos negativos para sangue e urina, respectivamente.

Durante o estudo destes dois parâmetros, houve a necessidade de alterar a preparação das amostras de urina. Devido à sua natureza, o pH das amostras de urina varia bastante, sendo esta uma variação inter e intra-indivíduo. Esta mudança de pH afecta a separação cromatográfica dos compostos, levando a grandes variações dos tempos de retenção. Como resultado, tornou-se impossível confirmar a presença das quatro substâncias em amostras de urina, uma vez que não era respeitado o critério de tempo de retenção relativo. A fim de contrariar esta característica intrínseca deste tipo de amostra biológica, optou-se por alterar a diluição das amostras de urina, passando a usar-se uma solução tampão de fosfato a 0,1 M. Apesar do pH desta solução tampão (~4) não ser o ideal para as substâncias em estudo (pKa ronda os 9), esta alteração da diluição permitiu uma estabilização e uniformização dos valores de pH entre diferentes amostras de urina. Os resultados já apresentados foram obtidos após esta alteração na preparação das amostras.

**Figura IV.1.** Cromatogramas TIC (do inglês *total ion chromatogram*) obtidos da fortificação de amostras brancas com benzodiazepinas e medicamentos, em sangue (à esquerda) e urina (à direita). De cima para baixo: sertralina, norsertralina, venlafaxina, zolpidem-d6 e desmetilvenlafaxina.



Ao analisar os cromatogramas TIC obtidos das amostras fortificadas com misturas-padrão de benzodiazepinas e medicamentos, não se verifica nenhuma contribuição por parte desses compostos nos picos de eluição das quatro substâncias em estudo, permitindo concluir pela especificidade e selectividade do método proposto.

#### IV.2. Eficiência da extracção

A integração de um passo extractivo num procedimento de ensaio acarreta uma inevitável perda de analito. Apesar da utilização de padrão interno servir para compensar esta perda, é aconselhável o estudo desta realidade laboratorial. A eficiência da extracção é expressa em termos de recuperação, e determinada através da seguinte relação:

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{Arel_{Ensaio}}{Arel_{Sem \text{ Extracção}}} \times 100$$

onde:

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

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

A avaliação deste parâmetro, em cada uma das duas matrizes, foi efectuada em três níveis de concentração: baixa (20 ng/mL), média (150 ng/mL) e alta (500 ng/mL). Foram preparados dois conjuntos de amostras brancas em triplicado para cada gama de concentração. A fortificação de cada um dos conjuntos foi desfasada no tempo, sendo um conjunto fortificado no início do procedimento de preparação de amostras e o outro fortificado imediatamente após a eluição do extracto. As fortificações foram feitas a partir de misturas-padrão preparadas em metanol a 0,1 µg/mL, 1 µg/mL e 10 µg/mL. O padrão interno, zolpidem-d6 a 1 µg/mL só foi adicionado, num volume de 50 µL, a todas as amostras, imediatamente antes do passo de evaporação do eluato.

As tabelas seguintes apresentam em resumo os resultados obtidos para a recuperação, em sangue e urina, para as quatro substâncias.

**Tabela IV.12.** Resultados da determinação da recuperação em sangue.

	<i>Recuperação (%)</i>		
	Controlo Baixo	Controlo Médio	Controlo Alto
Sertralina	61,4	70,6	78,9
Norsertalina	60,9	61,1	72,2
Venlafaxina	108,0	96,3	91,1
Desmetilvenlafaxina	105,4	92,1	86,6

**Tabela IV.13.** Resultados da determinação da recuperação em urina.

	<i>Recuperação (%)</i>		
	Controlo Baixo	Controlo Médio	Controlo Alto
Sertralina	84,1	87,1	81,9
Norsertalina	83,3	84,9	81,1
Venlafaxina	91,0	95,0	90,5
Desmetilvenlafaxina	86,5	93,5	98,3

Os valores obtidos para a recuperação da extracção variam num intervalo de 60,9% - 108,0%, não havendo perdas significativas de analito no passo extractivo, pelo que se pode considerar a extracção adequada para este método de ensaio.

A análise dos resultados obtidos apresenta três padrões de comportamento distintos:

- Em sangue, a sertralina apresenta recuperações muito mais baixas que a venlafaxina, havendo a mesma relação entre os seus metabolitos activos.
- Salvo excepções pontuais, os metabolitos demonstram menor recuperação que os compostos que percursores.
- Os valores de recuperação obtidos nas amostras de urina são menos dispersos que nas amostras de sangue.

A última conclusão encontra-se certamente associada à complexidade das duas matrizes biológicas, pois, sendo a urina menos complexa que o sangue, deverá haver um comportamento mais estável durante o passo extractivo. Porém, esta relação não pode ser tomada linearmente, pois as condições de diluição das amostras não são idênticas.

Os metabolitos são geralmente mais polares do que os compostos que os originam, o que é verificado nas substâncias em estudo. Tendo em conta as propriedades hidrofílicas das colunas de extracção utilizadas, torna-se trivial a compreensão deste comportamento.

Sabendo que a sertralina apresenta grande afinidade por ligações proteicas, é fácil compreender a baixa recuperação que demonstra em sangue, em comparação com a venlafaxina (que possui fraca afinidade por este tipo de ligações).

Afim de testar a contribuição da diluição das amostras com solução tampão de fosfato a 0,1 M, e esperando obter melhores resultados para a recuperação de sertralina e do seu metabolito activo em sangue, decidiu-se testar a eficiência de extracção em amostras de sangue diluídas nestas condições. Os resultados obtidos demonstraram uma melhoria não significativa nas recuperações da sertralina e norsestralina, com a diminuição da recuperação de venlafaxina e desmetilvenlafaxina. Não sendo obtidos resultados com a melhoria desejada, decidiu-se não alterar o procedimento de preparação das amostras de sangue.

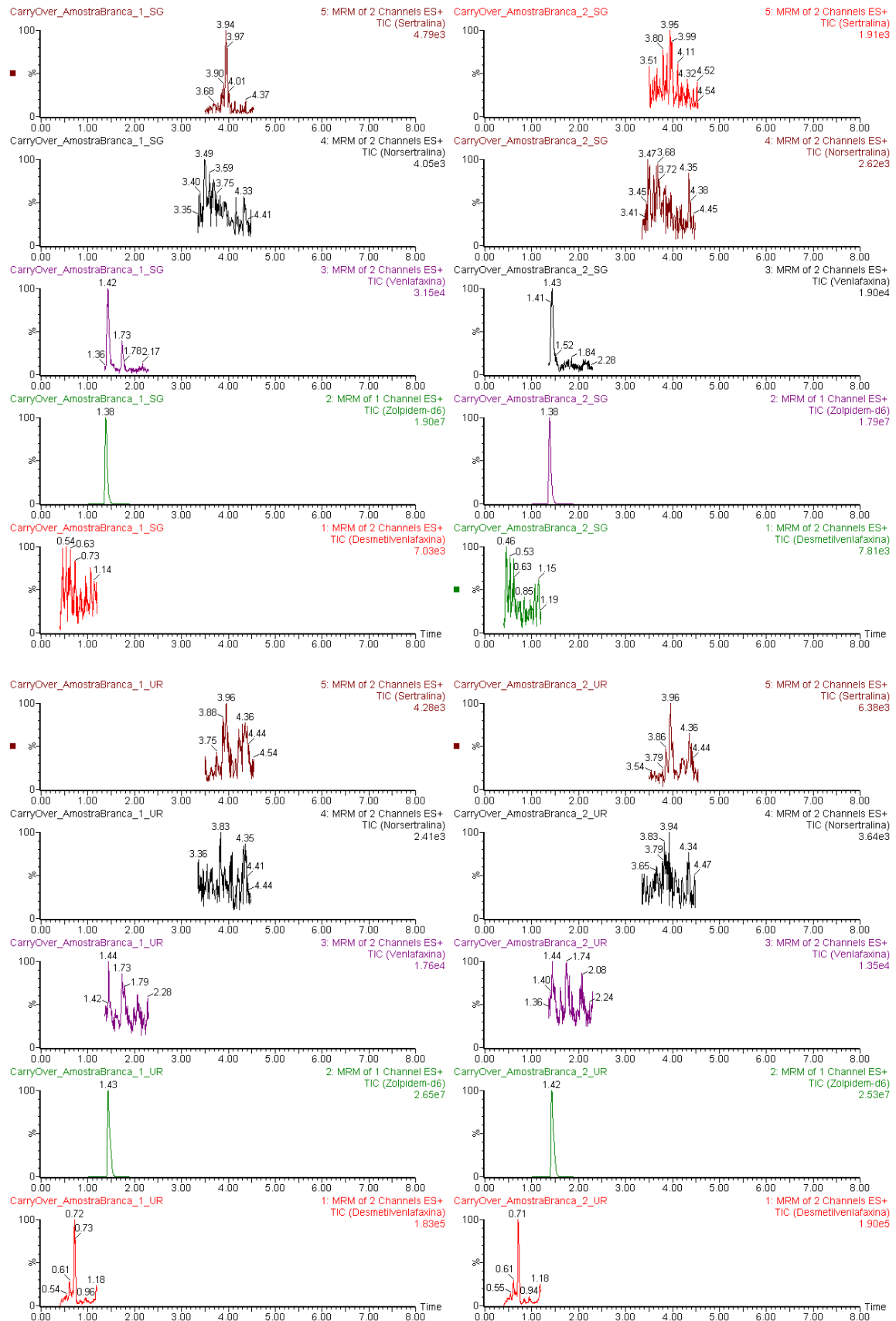
### **IV.3. Arrastamento (*carryover*)**

Na rotina de um laboratório de toxicologia, não são raras as amostras que chegam para análise com quantidades muito elevadas de compostos de interesse. A análise destas amostras pode gerar efeitos de arrastamento (*carryover*), que se podem traduzir na contaminação de análises sucessivas, durante o passo de análise. Quanto mais sensíveis os equipamentos utilizados, maior importância se deve dar aos fenómenos de arrastamento, pois estes podem afectar os resultados por contaminação de injeções sucessivas.<sup>[39]</sup>

O estudo da existência de fenómenos de arrastamento foi efectuado em conjunto com o estudo da eficiência da extracção. Foram preparadas duas amostras brancas de cada matriz, as quais foram injectadas entre os controlos altos (500 ng/mL), a fim de detectar possíveis contaminações.

A análise dos cromatogramas obtidos permite a avaliação deste parâmetro, sendo que neste caso evidencia a ausência de qualquer contaminação. É possível então concluir que o procedimento de ensaio de confirmação e quantificação das substâncias em estudo, em amostras de sangue e urina, por UPLC-MS/MS, não é afectado por fenómenos de arrastamento.

**Figura IV.2.** Cromatogramas TIC obtidos no estudo do *carryover* em sangue (em cima) e urina (em baixo). Substâncias, de cima para baixo: sertralina, norsertalina, venlafaxina, zolpidem-d6 e desmetilvenlafaxina.



#### IV.4. Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração de analito, numa amostra, que pode ser determinada quantitativamente, com valores de precisão e exactidão aceitáveis. Concentrações abaixo deste valor não podem ser devidamente quantificadas, porém o método fornece ainda dados qualitativos, até um limiar mais baixo conhecido como limite de detecção (LD). Este é tido como a menor concentração de analito, numa amostra, que pode ser detectado inequivocamente, sendo facilmente distinguido do ruído.<sup>[31,39]</sup> Ambos os limites dependem do analito, da matriz da amostra, do método escolhido para análise, das condições laboratoriais e do equipamento e de toda a sequência analítica. Existem dois métodos para a determinação dos limites de detecção e quantificação.

A primeira metodologia baseia-se na razão sinal-ruído (s/r) dos cromatogramas obtidos, em diferentes níveis de concentração. Será tida como limite de detecção a concentração mais baixa em que se obtenha uma razão sinal/ruído não inferior a 3. Já o limite de quantificação é assim definido como a menor concentração em que se observe uma razão sinal/ruído não inferior a 10. Apesar deste método fornecer, em geral, valores mais baixos para ambos os métodos, torna-se mais trabalhoso e não linear, não fornecendo valores verdadeiros, mas valores próximos.

O segundo método, denominado método de calibração, é sem dúvida mais lógico e linear, sendo teoricamente obtidos os valores verdadeiros dos limites. Esta segunda hipótese traduz-se laboratorialmente na construção de uma curva de calibração, baseando-se a determinação dos limites na aplicação de duas funções matemáticas:

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

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

onde: -  $S_{y/x}$  é o desvio padrão residual da curva de calibração

-  $b$  é o declive da recta

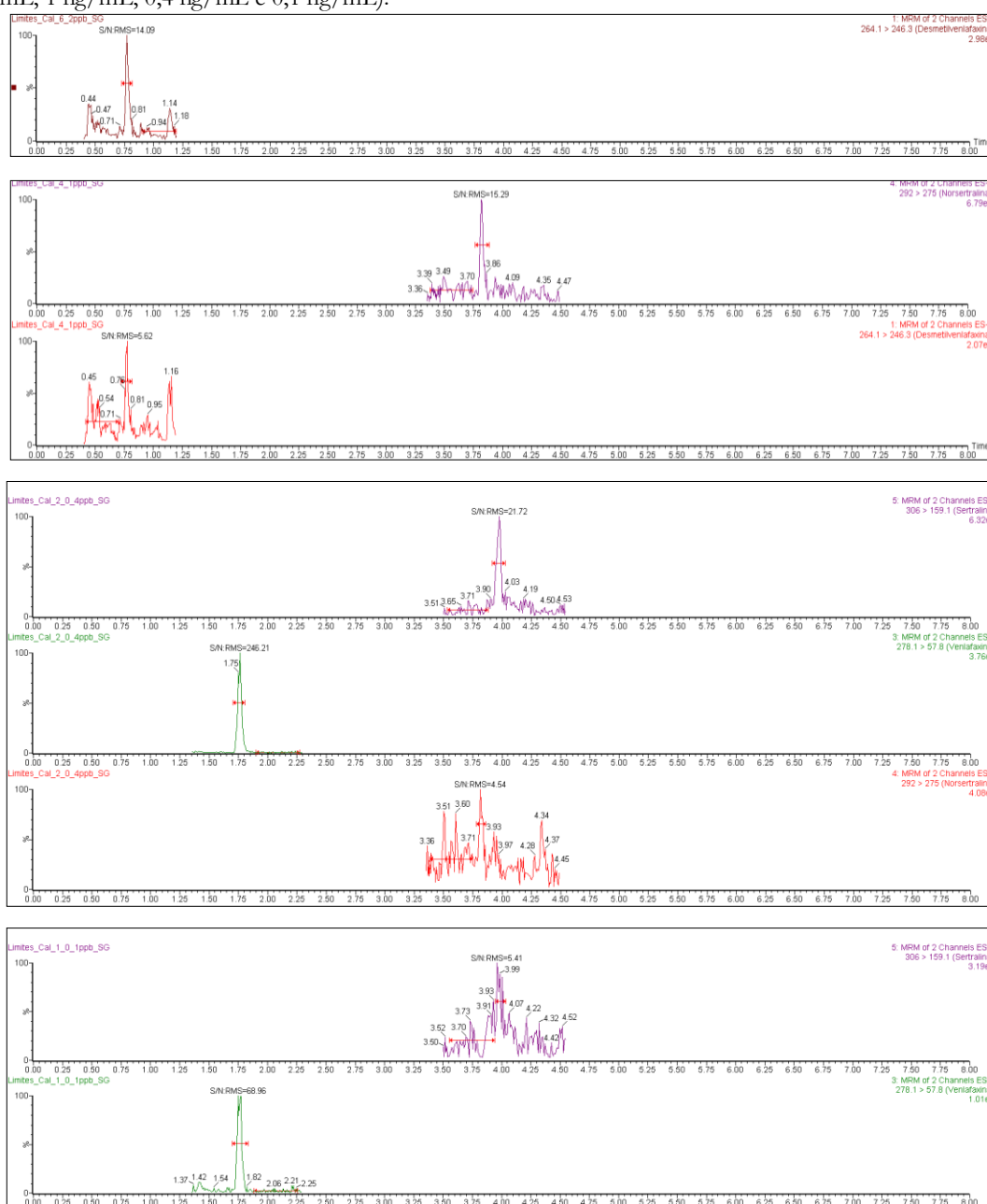
Os valores que se obtêm para os limites de detecção e quantificação dependem da metodologia utilizada e do tratamento de dados efectuado, dependendo das escolhas feitas pelo analista. A fim de demonstrar esta diferença nos valores obtidos, optei por efectuar este estudo utilizando as duas metodologias de determinação dos limites.

## IV.4.1. Determinação dos limites de detecção e quantificação

### i. Razão Sinal/Ruído

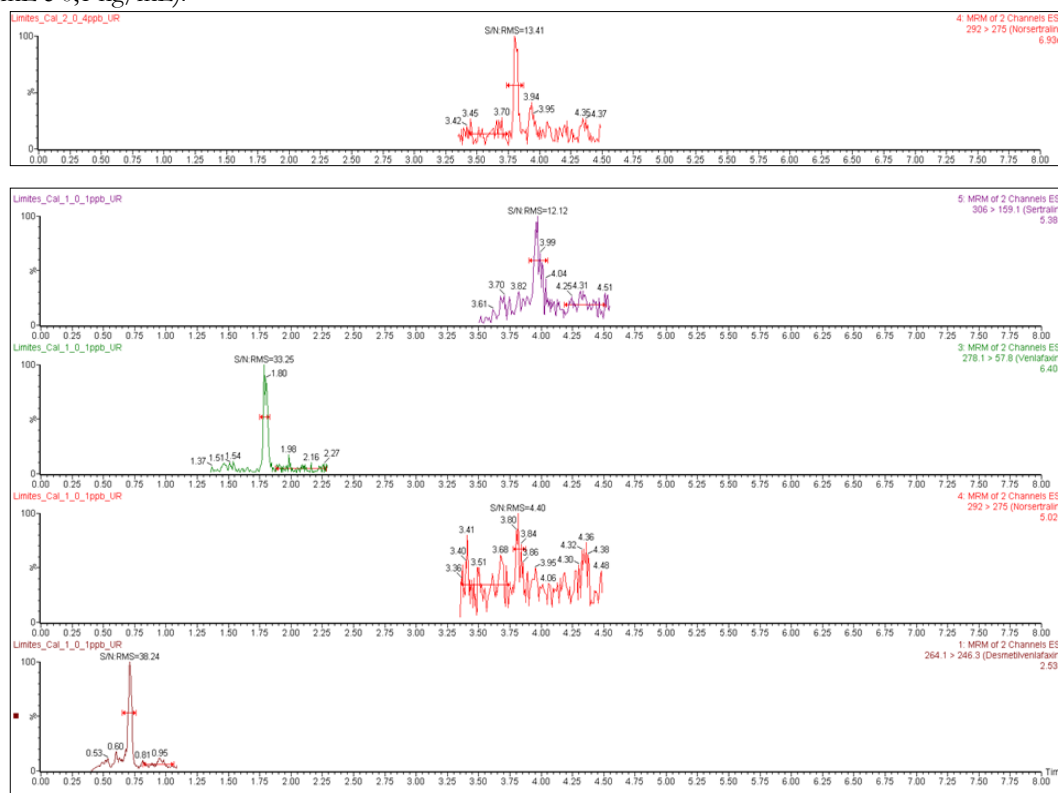
Através dos cromatogramas obtidos para os diversos pontos da curva de calibração construída no método de adição (*cf.* Tabela IV.14), é possível determinar a razão sinal/ruído em cada concentração. Como se pretendem determinar limites inferiores, tomaram-se os cinco pontos de concentrações mais baixas, apresentando-se apenas os cromatogramas com relevância para a avaliação dos limiares inferiores do método.

**Figura IV.3.** Cromatogramas com a determinação da razão sinal/ruído em sangue (de cima para baixo, 2 ng/mL, 1 ng/mL, 0,4 ng/mL e 0,1 ng/mL).





**Figura IV.4.** Cromatogramas com a determinação da razão sinal/ruído em urina (de cima para baixo, 0,4 ng/mL e 0,1 ng/mL).



Em sangue, 0,1 ng/mL apresenta-se como concentração aceitável para LD de sertralina e venlafaxina, assim como LQ aceitável para a venlafaxina. A concentração de 0,4 ng/mL pode ser tomada como valor seguro para LQ da sertralina e LD da norsertalina. O valor de 1 ng/mL surge como um valor adequado para LQ da norsertalina e LD da desmetilvenlafaxina. A desmetilvenlafaxina apenas tem uma razão sinal/ruído superior a 10 à concentração de 2 ng/mL.

Em urina, a concentração de 0,1 ng/mL apresenta-se como um valor adequado para LD das quatro substâncias, e como bom LQ para a sertralina, venlafaxina e desmetilvenlafaxina. Para LQ de norsertalina em urina, 0,4 ng/mL possui uma razão sinal/ruído superior a 10, tornando-o um LQ adequado.

Os valores obtidos por este método são bastante baixos, porém não serão muito seguros. Isto porque o método atribui razões sinal/ruído elevados a picos mal definidos, retirando confiança aos resultados obtidos.

## ii. Método de Calibração

A fim de determinar LD e LQ das substâncias em estudo, foi preparada uma curva de calibração com quinze níveis de concentração, em ambas as matrizes, distribuídos uniformemente e perto do limite de detecção esperado, por fortificação de amostras brancas de sangue e urina, a partir de misturas-padrão preparadas em metanol a 0,01 µg/mL, 0,1 µg/mL e a 1 µg/mL.

As concentrações escolhidas para a construção da curva de calibração e os respectivos volumes utilizados das misturas-padrão encontram-se na Tabela IV.14. O volume de amostra branca utilizado foi de 0,5 mL. Utilizou-se como padrão interno uma solução metanólica de zolpidem-d6 a 1 µg/mL, tendo-se utilizado um volume de 50 µL.

**Tabela IV.14.** Preparação das curvas de calibração do estudo LD e LQ.

<i>Pontos da Curva de Calibração</i>	<i>Concentração (ng/mL)</i>	<i>Volume (µL)</i>	<i>Concentração Mistura-Padrão (µg/mL)</i>
1	0,1	5	0,01
2	0,4	20	
3	0,5	25	
4	1	50	
5	1,5	75	
6	2	100	
7	5	25	0,1
8	7	35	
9	10	50	
10	15	75	
11	20	100	
12	30	15	1
13	50	25	
14	80	40	
15	100	50	

Nas tabelas seguintes apresentam-se os resultados obtidos para LD e LQ, em sangue e urina, respectivamente.

**Tabela IV.15.** Apresentação dos resultados do estudo do limite de detecção e de quantificação, em sangue.

<i>Substância</i>	<i>Equação</i>	$R^2$	<i>Erro padrão (<math>S_{y/x}</math>)</i>	<i>LD (ng/mL)</i>	<i>LQ (ng/mL)</i>
Sertralina	$y = 0,0015x + 0,0006$	0,9992	0,0005	1,03	3,11
Venlafaxina	$y = 0,0089x + 0,0018$	0,9996	0,0029	1,10	3,32
Norsertalina	$y = 0,0007x - 0,0021$	0,9989	0,0006	2,99	9,05
Desmetilvenlafaxina	$y = 0,0146x + 0,0003$	0,9986	0,0152	3,44	10,42

**Tabela IV.16.** Apresentação dos resultados do estudo do limite de detecção e de quantificação, em urina.

<i>Substância</i>	<i>Equação</i>	$R^2$	<i>Erro padrão (<math>S_{y/x}</math>)</i>	<i>LD (ng/mL)</i>	<i>LQ (ng/mL)</i>
Sertralina	$y = 0,0033x + 0,0001$	0,9989	0,0012	1,16	3,52
Venlafaxina	$y = 0,0065x + 0,0009$	0,9992	0,0020	1,00	3,04
Norsertalina	$y = 0,0021x - 0,0005$	0,9991	0,0018	2,75	8,35
Desmetilvenlafaxina	$y = 0,0015x + 0,0054$	0,9990	0,0017	3,77	11,42

Uma vez que o tratamento dos dados depende em grande parte das decisões tomadas pelo analista, decidiu-se ainda estudar a diferença de resultados obtidos por um tratamento de dados diferente. Uma vez que se pretendem determinar limites inferiores de detecção e quantificação, tomou-se a região de concentrações entre 0,1 e 15 ng/mL da curva de calibração. Nas Tabelas IV.17 e IV.18 apresentam-se os resultados obtidos nestas condições.

**Tabela IV.17.** Apresentação dos resultados do estudo do limite de detecção e de quantificação, em sangue. (Tratamento de dados alternativo.)

<i>Substância</i>	<i>Equação</i>	$R^2$	<i>Erro padrão (<math>S_{y/x}</math>)</i>	<i>LD (ng/mL)</i>	<i>LQ (ng/mL)</i>
Sertralina	$y = 0,0014x + 0,0008$	0,9927	0,0007	1,50	4,55
Venlafaxina	$y = 0,0091x + 0,0007$	0,9969	0,0027	0,98	2,98
Norsertalina	$y = 0,0007x + 0,0000$	0,9908	0,0004	1,80	5,46
Desmetilvenlafaxina	$y = 0,0143x - 0,0021$	0,9948	0,0055	1,27	3,86

**Tabela IV.18.** Apresentação dos resultados do estudo do limite de detecção e de quantificação, em urina. (Tratamento de dados alternativo.)

<i>Substância</i>	<i>Equação</i>	$R^2$	<i>Erro padrão (<math>S_{y/x}</math>)</i>	<i>LD (ng/mL)</i>	<i>LQ (ng/mL)</i>
Sertralina	$y = 0,0033x - 0,0001$	0,9909	0,0017	1,68	5,08
Venlafaxina	$y = 0,0069x - 0,0001$	0,9958	0,0024	1,14	3,45
Norsertalina	$y = 0,0019x + 0,0003$	0,9962	0,0004	0,76	2,31
Desmetilvenlafaxina	$y = 0,0017x + 0,0039$	0,9908	0,0010	1,89	5,72

Observa-se uma melhoria geral nos valores obtidos para LD e LQ, com maior ênfase nos metabolitos, havendo a exceção da sertralina que apresenta valores mais altos em ambas as matrizes nestas condições.

Verifica-se ainda que as diferenças dos declives nos dois tratamentos de dados efectuados não são relevantes, o que evidencia um comportamento linear nas zonas de concentração abordadas.

Como se pode observar pelos três conjuntos de resultados apresentados, o resultado obtido é função do método definido para a sua determinação. Embora se pudesse, naturalmente, testar os três conjuntos de resultados, optou-se por avaliar os resultados apresentados nas Tabelas IV.15 e IV.16, pois parecem evidenciar uma coerência de valores por tipo de composto (composto-pai e metabolito), e para ambas as matrizes.

Em anexo, encontram-se tabelas e gráficos detalhados, com valores áreas, curvas de calibração e respectivos tratamentos estatísticos, para cada substância e em cada uma das duas matrizes.

#### **IV.4.2. Teste dos limites de detecção e quantificação**

A validação de um método analítico tem como finalidade transmitir confiança a quem o aplica e a quem analisa os resultados obtidos. Deste modo, não basta determinar os limites de detecção e quantificação, é necessário ter confiança nos valores que foram obtidos, sendo então necessário testá-los. Foram testados os limites obtidos pelo método de calibração, tendo sido efectuados dois testes distintos, ainda que a parte experimental tenha sido em comunhão, uma vez que o teste dos limites de quantificação tinha de ser quantitativo e o dos limites de detecção só podia ser qualitativo, resultado das suas naturezas.

O teste quantitativo baseou-se na construção de uma curva de calibração e em replicados a diferentes concentrações, enquanto que o teste qualitativo teve por fundamento a análise dos replicados.

Tendo em conta a gama de valores obtidos para os limites de detecção e de quantificação das substâncias em estudo (ver Tabelas IV.15 e IV.16) decidiu-se testar os limites a quatro concentrações: 1 ng/mL, 3 ng/mL, 5 ng/mL e 10 ng/mL. Para tal, prepararam-se, para cada matriz, quatro conjuntos de cinco replicados independentes para

cada concentração, num volume de 0,5 mL cada, utilizando 50 µL de padrão interno zolpidem-d6 a 1 µg/mL. Em paralelo, preparam-se uma curva de calibração com 6 pontos e os replicados por fortificação de amostras brancas a partir de duas misturas-padrão preparadas em metanol a 0,01 µg/mL e 0,1 µg/mL. As concentrações escolhidas para curva e replicados e respectivos volumes utilizados das misturas-padrão encontram-se nas Tabelas IV.20 e IV.21.

**Tabela IV.19.** Apresentação dos limites de detecção e quantificação testados, para cada substância.

<i>Substância</i>	<i>LOD (ng/mL)</i>	<i>LOQ (ng/mL)</i>
Sertralina	1	3 e 5
Venlafaxina	1	3 e 5
Norsertalina	3	5 e 10
Desmetilvenlafaxina	3	5 e 10

**Tabela IV.20.** Preparação dos replicados para o teste dos limites de quantificação e detecção.

<i>Concentração (ng/mL)</i>	<i>1</i>	<i>3</i>	<i>5</i>	<i>10</i>
Volume (µL)	50	15	25	50
Conc. Sol. (µg/mL)	0,01		0,1	

**Tabela IV.21.** Preparação das curvas de calibração do teste do limite de quantificação.

<i>Pontos da curva de calibração</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
Concentração (ng/mL)	0,5	2	5	7	10	15
Volume (µL)	25	100	25	35	50	75
Conc. Sol. (µg/mL)	0,01				0,1	

#### i. Teste dos limites de quantificação

Para a verificação dos limites de quantificação, uma vez aplicado o procedimento de ensaio determinou-se o coeficiente de variação (CV%) e o erro em relação ao valor teórico dos replicados. De seguida, apresentam-se sob a forma de tabelas os resultados obtidos para cada uma das substâncias individualmente.

**Tabela IV.22.** Resultados do teste do limite de quantificação para as substâncias em estudo, em sangue.

LQ Teste			LQ Teste		
<b>Sertralina - SG</b>	3 ng/mL	5 ng/mL	<b>Norsertalina - SG</b>	5 ng/mL	10 ng/mL
LQ= 3,11 ng/mL	3,23	4,21	LQ= 9,05 ng/mL	3,96	9,02
	3,35	4,71		4,43	8,03
	3,05	4,72		4,27	7,37
	2,66	4,62		4,01	8,60
	3,08	4,55		4,71	11,37
Média (ng/mL)	3,07	4,56	Média (ng/mL)	4,28	8,88
Desvio Padrão (s)	0,26	0,21	Desvio Padrão (s)	0,31	1,53
CV (%)	8,52	4,55	CV (%)	7,18	17,20
Erro (%)	2,49	8,75	Erro (%)	14,46	11,23

LQ Teste			LQ Teste		
<b>Venlafaxina - SG</b>	3 ng/mL	5 ng/mL	<b>Desmetilvenlafaxina - SG</b>	5 ng/mL	10 ng/mL
LQ= 3,32 ng/mL	2,33	3,90	LQ= 10,42 ng/mL	4,92	7,36
	2,59	4,15		4,90	7,54
	2,50	4,06		4,76	8,96
	2,32	3,86		4,82	9,03
	2,42	4,10		3,31	8,81
Média (ng/mL)	2,43	4,01	Média (ng/mL)	4,54	8,34
Desvio Padrão (s)	0,11	0,12	Desvio Padrão (s)	0,69	0,82
CV (%)	4,73	3,11	CV (%)	15,21	9,81
Erro (%)	18,97	19,70	Erro (%)	9,13	16,59

**Tabela IV.23.** Resultados do teste do limite de quantificação para as substâncias em estudo, em urina.

LQ Teste			LQ Teste		
<b>Sertralina - UR</b>	3 ng/mL	5 ng/mL	<b>Norsertalina - UR</b>	5 ng/mL	10 ng/mL
LQ= 3,52 ng/mL	2,69	4,77	LQ= 8,35 ng/mL	5,25	9,79
	2,36	4,48		4,45	10,19
	2,73	5,02		5,44	9,03
	2,82	4,57		4,38	9,35
	2,85	4,74		5,12	10,12
Média (ng/mL)	2,69	4,72	Média (ng/mL)	4,93	9,70
Desvio Padrão (s)	0,19	0,21	Desvio Padrão (s)	0,48	0,50
CV (%)	7,21	4,41	CV (%)	9,77	5,12
Erro (%)	10,29	5,67	Erro (%)	1,46	3,03

LQ Teste			LQ Teste		
<b>Venlafaxina - UR</b>	3 ng/mL	5 ng/mL	<b>Desmetilvenlafaxina - UR</b>	5 ng/mL	10 ng/mL
LQ= 3,04 ng/mL	3,07	5,28	LQ= 11,42 ng/mL	5,67	11,05
	3,11	5,43		3,69	11,76
	3,36	5,54		5,71	11,75
	2,98	5,28		5,63	12,34
	3,17	5,64		5,42	12,06
Média (ng/mL)	3,14	5,44	Média (ng/mL)	5,23	11,79
Desvio Padrão (s)	0,14	0,16	Desvio Padrão (s)	0,86	0,48
CV (%)	4,57	2,94	CV (%)	16,54	4,07
Erro (%)	4,59	8,72	Erro (%)	4,52	17,91

Os limites de quantificação testados são válidos, uma vez que todas as substâncias apresentam valores para o coeficiente de variação (CV%) e para o erro em relação ao valor teórico inferiores a 20%.

## ii. Teste dos limites de detecção

Para a verificação dos limites de detecção, foram aplicados os critérios de positividade tomados e descritos no estudo da especificidade e selectividade, usando o ponto da curva de calibração a 5 ng/mL como controlo. Os resultados do estudo da positividade dos replicados relativos ao critério de tempo de retenção relativo encontram-se nas Tabelas IV.24, IV.25, IV.26 e IV.27

**Tabela IV.24.** Tempos de retenção relativos (TRR) das substâncias em cada um dos replicados, na verificação dos LD em sangue.

	<i>1A</i>	<i>1B</i>	<i>1C</i>	<i>1D</i>	<i>1E</i>
Sertralina	2,836	2,856	2,856	2,856	2,856
Venlafaxina	1,243	1,252	1,252	1,252	1,252
	<b>3A</b>	<b>3B</b>	<b>3C</b>	<b>3D</b>	<b>3E</b>
Norsertalina	2,763	2,763	2,770	2,743	2,777
Desmetilvenlafaxina	0,547	0,554	0,547	0,543	0,547

**Tabela IV.25.** Diferença relativa entre o TRR de uma dada substância na amostra e no controlo, na verificação dos LD em sangue.

	<i>1A</i>	<i>1B</i>	<i>1C</i>	<i>1D</i>	<i>1E</i>
Sertralina	1,180	0,469	0,469	0,469	0,469
Venlafaxina	1,429	0,719	0,719	0,719	0,719
	<b>3A</b>	<b>3B</b>	<b>3C</b>	<b>3D</b>	<b>3E</b>
Norsertalina	0,719	0,719	0,461	1,429	0,202
Desmetilvenlafaxina	0,719	0,587	0,719	1,429	0,719

**Tabela IV.26.** Tempos de retenção relativos (TRR) das substâncias em cada um dos replicados, na verificação dos LD em urina.

	<i>1A</i>	<i>1B</i>	<i>1C</i>	<i>1D</i>	<i>1E</i>
Sertralina	2,771	2,771	2,771	2,771	2,771
Venlafaxina	1,236	1,243	1,236	1,236	1,236
	<b>3A</b>	<b>3B</b>	<b>3C</b>	<b>3D</b>	<b>3E</b>
Norsertalina	2,681	2,681	2,681	2,681	2,681
Desmetilvenlafaxina	0,576	0,576	0,576	0,576	0,576

**Tabela IV.27.** Diferença relativa entre o TRR de uma dada substância na amostra e no controlo, na verificação dos LD em urina.

	<b>1A</b>	<b>1B</b>	<b>1C</b>	<b>1D</b>	<b>1E</b>
Sertralina	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Venlafaxina	0,00	0,56	0,00	0,00	0,00
	<b>3A</b>	<b>3B</b>	<b>3C</b>	<b>3D</b>	<b>3E</b>
Norsertalina	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Desmetilvenlafaxina	1,22	1,22	1,22	1,22	1,22

O critério de tempo de retenção relativo foi sempre cumprido para as quatro substâncias e nos vários replicados, para ambas as matrizes.

Nas tabelas seguinte encontram-se as transições iónicas seleccionadas para cada substância e o respectivo intervalo de tolerância tendo por base a Tabela IV.5 e as áreas relativas obtidas no controlo escolhido.

**Tabela IV.28.** Transições iónicas seleccionadas para cada substância e respectivo intervalo de tolerância, na verificação dos LD em sangue.

<i>Substância</i>	<i>Transições iónicas</i>		<i>Tolerância</i>	
	<b>1ª Transição</b>	<b>2ª Transição</b>	<b>Mínima</b>	<b>Máxima</b>
Sertralina	306 > 159,1	306 > 275	56,86	76,86
Norsertalina	292 > 275	292 > 159	30,79	46,19
Venlafaxina	278,1 > 57,8	278,1 > 260,3	49,18	69,18
Desmetilvenlafaxina	264,1 > 246,3	264,1 > 107	33,72	50,58

**Tabela IV.29.** Transições iónicas seleccionadas para cada substância e respectivo intervalo de tolerância, na verificação dos LD em urina.

<i>Substância</i>	<i>Transições iónicas</i>		<i>Tolerância</i>	
	<b>1ª Transição</b>	<b>2ª Transição</b>	<b>Mínima</b>	<b>Máxima</b>
Sertralina	306 > 159,1	306 > 275	57,77	77,77
Norsertalina	292 > 275	292 > 159	46,80	66,80
Venlafaxina	278,1 > 57,8	278,1 > 260,3	60,57	80,57
Desmetilvenlafaxina	264,1 > 246,3	264,1 > 107	43,05	63,05



Os resultados do estudo da positividade dos replicados relativos ao critério das áreas relativas das transições iónicas encontram-se nas Tabelas IV.30 e IV.31.

**Tabela IV.30.** Áreas relativas das transições iónicas das respectivas substâncias, na verificação dos LD em sangue.

		<i>1A</i>	<i>1B</i>	<i>1C</i>	<i>1D</i>	<i>1E</i>
	<b>Transição</b>					
<b>Sertralina</b>	306 > 159,1	58,50	73,04	59,60	56,92	73,48
<b>Venlafaxina</b>	278,1 > 57,8	63,70	67,84	64,99	67,06	58,68
		<b>3A</b>	<b>3B</b>	<b>3C</b>	<b>3D</b>	<b>3E</b>
	<b>Transição</b>					
<b>Norsertalina</b>	292 > 275	49,09	46,10	37,08	33,13	44,71
<b>Desmetilvenlafaxina</b>	264,1 > 246,3	37,64	49,39	49,65	43,89	48,06

**Tabela IV.31.** Áreas relativas das transições iónicas das respectivas substâncias, na verificação dos LD em urina.

		<i>1A</i>	<i>1B</i>	<i>1C</i>	<i>1D</i>	<i>1E</i>
	<b>Transição</b>					
<b>Sertralina</b>	306 > 159,1	66,60	71,25	75,76	73,59	71,87
<b>Venlafaxina</b>	278,1 > 57,8	77,85	78,58	75,69	79,70	75,25
		<b>3A</b>	<b>3B</b>	<b>3C</b>	<b>3D</b>	<b>3E</b>
	<b>Transição</b>					
<b>Norsertalina</b>	292 > 275	55,03	56,46	56,04	49,69	57,49
<b>Desmetilvenlafaxina</b>	264,1 > 246,3	56,26	58,90	56,88	61,44	59,73

As Tabelas IV.32 e IV.33 reúnem os resultados obtidos no estudo da positividade na verificação dos limites de detecção em sangue e urina, respectivamente.

Tabela IV.32. Resultados obtidos no estudo da positividade no teste dos limites de detecção em sangue.

<i>Análise dos Replicados</i>		
<b>Código da amostra</b>	<b>Resultado</b>	<b>Observações</b>
1A	Positivo	Limite de detecção estudado para a Sertralina e Venlafaxina.
1B	Positivo	
1C	Positivo	
1D	Positivo	
1E	Positivo	
3 <sup>a</sup>	Positivo	Limite de detecção estudado para a Norsertalina e Desmetilvenlafaxina.
3B	Positivo	
3C	Positivo	
3D	Positivo	
3E	Positivo	
<b><u>Percentagem de Falsos Negativos</u></b>		0%

Tabela IV.33. Resultados obtidos no estudo da positividade no teste dos limites de detecção em urina.

<i>Análise dos Replicados</i>		
<b>Código da amostra</b>	<b>Resultado</b>	<b>Observações</b>
1 <sup>a</sup>	Positivo	Limite de detecção estudado para a Sertralina e Venlafaxina.
1B	Positivo	
1C	Positivo	
1D	Positivo	
1E	Positivo	
3 <sup>a</sup>	Positivo	Limite de detecção estudado para a Norsertalina e Desmetilvenlafaxina.
3B	Positivo	
3C	Positivo	
3D	Positivo	
3E	Positivo	
<b><u>Percentagem de Falsos Negativos</u></b>		0%

Os limites de detecção estudados são tidos como válidos quando a positividade das amostras for constatada em pelo menos 90% dos casos. A percentagem de falsos negativos é de 0% para ambas as matrizes, pelo que os limites de detecção verificados podem ser aceites com confiança.

#### **IV.5. Linearidade/Gama de trabalho**

A linearidade da gama de trabalho deve ser testada, o que não é mais do que assegurar que a resposta analítica obtida é directamente proporcional à concentração do analito. O tratamento dos dados obtidos é geralmente efectuado através de uma ferramenta estatística de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. A comprovação da linearidade é feita com a concordância simultânea de vários critérios: o coeficiente de correlação quadrado deve ser superior a 0,99; a ordenada na origem deve ser estatisticamente igual a zero, tendo em consideração um intervalo de confiança de 95%; devem ser eliminados pontos aberrantes cujo desvio residual seja superior ao dobro do erro padrão estimado no estudo da regressão para as curvas de calibração, através da análise dos gráficos dos valores residuais.<sup>[39]</sup>

Para efectuar este estudo foi construída uma curva de calibração com quinze níveis de concentração, distribuídos entre 1 e 1000 ng/mL, por fortificação de alíquotas de 0,5 mL de sangue branco e branco de urina, a partir de quatro misturas-padrão preparadas em metanol a 0,01 µg/mL, 0,1 µg/mL, 1 µg/mL e 10 µg/mL. As concentrações escolhidas para os pontos da curva de calibração e os respectivos volumes utilizados das misturas-padrão encontram-se na Tabela IV.34. Utilizou-se uma solução metanólica de zolpidem-d6 1 µg/mL como padrão interno, com um volume utilizado de 50 µL (concentração final nas amostras: 100 ng/mL).

**Tabela IV.34.** Preparação da curva de calibração do estudo de linearidade e gama de trabalho.

<i>Pontos da Curva de Calibração</i>	<i>Concentração (ng/mL)</i>	<i>Volume (<math>\mu</math>L)</i>	<i>Concentração Mistura-Padrão (<math>\mu</math>g/mL)</i>
1	1	50	0,01
2	5	25	0,1
3	10	50	
4	50	25	1
5	100	50	
6	150	75	
7	200	100	
8	250	125	
9	300	15	10
10	400	20	
11	500	25	
12	600	30	
13	700	35	
14	800	40	
15	1000	50	

Após a aplicação do procedimento de ensaio, as curvas obtidas foram analisadas, pelos critérios indicados.

Nas tabelas IV.35 e IV.36 apresentam-se, sob forma de tabelas, resumos dos resultados obtidos para o estudo da linearidade das substâncias em estudo, em sangue e urina.

**Tabela IV.35.** Apresentação dos resultados do estudo da linearidade e gama de trabalho, em sangue.

<i>Substância</i>	<i>Equação</i>	<i>R<sup>2</sup></i>	<i>Erro padrão (S<sub>y/x</sub>)</i>	<i>Int. de intercepção da ordenada na origem</i>		<i>Gama Linear</i>
				<i>95% inf.</i>	<i>95% sup.</i>	
Sertralina	$y = 0,0011x - 0,0015$	0,9998	0,0044	-0,00455	0,00425	1 - 800
Venlafaxina	$y = 0,0055x + 0,0591$	0,9995	0,0328	-0,01522	0,0529	1 - 800
Norsertalina	$y = 0,0006x - 0,0049$	0,9992	0,0057	-0,00979	0,00182	1 - 800
Desmetilvenlafaxina	$y = 0,0023x + 0,0273$	0,9987	0,0268	-0,00052	0,05503	1 - 800

**Tabela IV.36.** Apresentação dos resultados do estudo da linearidade e gama de trabalho, em urina.

<i>Substância</i>	<i>Equação</i>	<i>R</i> <sup>2</sup>	<i>Erro padrão</i> ( <i>S<sub>y/x</sub></i> )	<i>Int. de intercepção da ordenada na origem</i>		<i>Gama Linear</i>
				<b>95% inf.</b>	<b>95% sup.</b>	
Sertralina	$y = 0,0022x + 0,0181$	0,9982	0,0289	-0,01063	0,04679	1 - 800
Venlafaxina	$y = 0,0050x + 0,0266$	0,9997	0,0276	-0,00754	0,06562	1 - 800
Norsertalina	$y = 0,0017x + 0,0100$	0,9983	0,0222	-0,01222	0,03225	1 - 800
Desmetilvenlafaxina	$y = 0,0007x - 0,0052$	0,9991	0,0061	-0,00150	0,01187	1 - 800

A análise das substâncias em estudo provou que o método é linear no intervalo de concentrações 1 – 800 ng/mL, tanto em sangue como em urina. Esta gama linear adequa-se à determinação destas quatro substâncias, uma vez que abrange as gamas terapêuticas e se prolonga para concentrações mais elevadas, permitindo a determinação de uma vasta gama de concentrações tóxicas.

Em anexo, encontram-se tabelas e gráficos detalhados, com valores de áreas, curvas de calibração e respectivos tratamentos estatísticos, para cada substância e em cada uma das duas matrizes analisadas.

## IV.6. Precisão

A precisão exprime o grau de variação entre uma série de medições obtidas de múltiplas amostragens da mesma amostra, sob as mesmas condições. A precisão pode ser considerada a três níveis: repetibilidade, precisão intermédia e exactidão. Estes três níveis de precisão foram estudados e considerados para a validação do método.<sup>[31]</sup>

### IV.6.1. Repetibilidade

A repetibilidade de um método traduz a precisão obtida sob iguais condições operativas, ao longo de um curto intervalo de tempo. Tem igualmente vindo a ser denominada por precisão intra-ensaio.<sup>[39]</sup>

Este parâmetro foi avaliado em simultâneo com o primeiro dia do estudo da precisão intermédia (ver parâmetro de validação seguinte). Foram então analisadas a curva de calibração do estudo paralelo e cinco replicados independentes, preparados por fortificação de amostras brancas a três gamas de concentração (50 ng/mL, 200 ng/mL e 500 ng/mL), com misturas-padrão a 1 µg/mL e 10 µg/mL. Uma solução metanólica de zolpidem-d6 a 1 µg/mL foi utilizada como padrão interno, num volume utilizado de 50 µL (concentração final nas amostras de 100 ng/mL).

Uma vez aplicado o método obtiveram-se as áreas relativas (AR) e os TRR para cada substância, em cada replicado, e calculou-se a média, o desvio padrão (s) e o coeficiente de variação (CV%). De seguida apresentam-se, sob a forma de tabelas, resumos dos resultados obtidos para cada uma das substâncias.

**Tabela IV.37.** Resumo dos resultados obtidos no estudo da repetibilidade em sangue.

de	<i>Sertralina</i>		<i>Norsertalina</i>		<i>Venlafaxina</i>		<i>Desmetilvenlafaxina</i>		
	TRR	AR	TRR	AR	TRR	AR	TRR	AR	
Coeficiente de Variação (%CV)	50 ng/mL	0,5	4,5	0,5	10,1	0,4	8,3	0,4	6,9
	200 ng/mL	0,4	8,3	0,3	6,4	0,5	5,1	0,9	3,7
	500 ng/mL	0,5	3,2	0,5	3,4	0,4	2,8	1,0	2,5

**Tabela IV.38.** Resumo dos resultados obtidos no estudo da repetibilidade em urina.

de	<i>Sertralina</i>		<i>Norsertalina</i>		<i>Venlafaxina</i>		<i>Desmetilvenlafaxina</i>		
	TRR	AR	TRR	AR	TRR	AR	TRR	AR	
Coeficiente de Variação (%CV)	50 ng/mL	0,4	4,4	0,4	10,1	0,4	8,2	1,2	12,6
	200 ng/mL	0,8	4,0	0,8	9,9	0,5	8,3	1,7	7,3
	500 ng/mL	0,6	5,0	0,6	5,5	0,6	3,2	1,5	9,9

Do estudo das áreas relativas, verifica-se que se obtiveram CV (%) inferiores a 10% para as gamas alta e média e a 20% para a gama baixa. Quanto aos tempos de retenção relativos, os valores obtidos para o CV (%) foram sempre inferiores a 1%, com excepção da desmetilvenlafaxina em urina.

Em anexo, encontram-se tabelas e gráficos detalhados, com valores de áreas, curvas de calibração e respectivos tratamentos estatísticos, para cada substância em cada uma das duas matrizes individualmente.

#### **IV.6.2. Precisão intermédia**

A precisão intermédia expressa as variações intra-laboratoriais, podendo-se resumir à precisão total, sob variadas condições.<sup>[31]</sup> O estudo deste parâmetro deve ser feito alterando o máximo de variáveis possíveis. Neste caso, o estudo foi efectuado em cinco dias não-consecutivos (com preparação de cinco curvas de calibração), com condições climatéricas distintas, onde se variaram as soluções preparadas, lotes de reagentes, tipo de pipetas (variáveis ou fixas), extractor, misturas-padrão preparadas e amostras brancas. Para além destas alterações intencionais, têm de ser tidas em conta pequenas variações intrínsecas à rotina de um laboratório, como por exemplo o tempo de secagem das colunas, pureza do azoto no passo de evaporação, as condições do material de vidro usado ou as alterações associadas ao funcionamento do equipamento de UPLC-MS/MS, entre muitas outras. Vários autores recomendam ainda a alteração de equipamentos usados e de analistas, o que, pela natureza deste projecto não foi realizado.

Como foi já referido, a precisão intermédia foi estudada através da preparação de curvas de calibração em 5 dias diferentes. Paralelamente a cada curva, foram preparados três controlos a níveis diferentes de concentração e em triplicado (50 ng/mL, 200 ng/mL e 500 ng/mL). Curvas e controlos foram preparados por fortificação de amostras brancas (0,5 mL) com misturas-padrão a 0,1 µg/mL, 1 µg/mL e 10 µg/mL, em metanol. Utilizou-se como padrão interno uma solução metanólica de zolpidem-d6 a 1 µg/mL, tendo sido utilizado um volume de 50 µL.

As concentrações escolhidas para os pontos das curvas de calibração e os respectivos volumes utilizados das misturas-padrão encontram-se na tabela IV.39.

**Tabela IV.39.** Preparação da curva de calibração e controlos no estudo da precisão intermédia e exactidão.

<b>Pontos da curva de calibração</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>
Concentração (ng/mL)	10	20	50	100	200	500	800
Volume (µL)	50	100	25	50	100	25	40
Conc. Mistura Padrão (µg/mL)	0,1		1			10	
<b>Concentração Controlos (ng/mL)</b>	<b>50</b>			<b>200</b>		<b>500</b>	
Volume (µL)	25			100		25	
Conc. Mistura Padrão (µg/mL)	1					10	

Uma vez 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 da repetibilidade e da precisão intermédia. As expressões utilizadas são as seguintes:

**Tabela IV.40.** Tabela ANOVA (factor único).

<b>Fonte</b>	<b>Média Quadrática (MQ)</b>	<b>Graus de liberdade</b>
Entre grupos	$MS_{run} = \frac{n \sum_{i=1}^p (\bar{x}_i - \bar{\bar{x}})^2}{p - 1}$	$p - 1$
Dentro de grupos	$MS_r = \frac{\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (x_{ij} - \bar{x}_i)^2}{p(n - 1)}$	$p(n - 1)$
Total		$pn - 1$

onde:

- $p$  é o número de sequências de cada nível de concentração (uma sequência para cada dia),
- $n$  é o número 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  $i$ ,
- $\bar{\bar{x}}$  é a média das médias de  $p$  sequências.

Tabela IV.41. Cálculo das estimativas da precisão.

Precisão	Expressão
Repetibilidade	$S_r = \sqrt{MS_r}$
Precisão entre corridas	$S_{run} = \sqrt{\frac{MS_{run} - MS_r}{n}}$
Precisão intermédia	$S_1 = \sqrt{(S_r^2) + (S_{run}^2)}$

O comportamento do desvio padrão e do coeficiente de variação foram estudados ao longo da gama de trabalho:

- Se o desvio padrão for aproximadamente constante ao longo 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 de variâncias.
- Se o coeficiente de variação for aproximadamente constante ao longo da gama de trabalho, é aplicada a equação seguinte para calcular um coeficiente de variação ponderado.

$$CV_{pool} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^p ((n_i - 1) \times CV_i^2)}{\sum_{i=1}^p (n_i - 1)}}$$

onde:

- $p$  é o número de níveis de concentração estudados,
- $n$  é o número de replicados em cada nível de concentração.
- 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 sob a forma de tabelas resumos dos resultados obtidos no estudo da precisão intermédia.

**Tabela IV.42.** Resumo dos resultados obtidos no estudo da precisão intermédia em sangue.

	Concentração (ng/mL)		Recuperação (%)	Repetibilidade ( $S_p$ )	Precisão entre Sequências ( $S_{mn}$ )	Precisão Intermédia	CV (%)
	Valor Verdadeiro	Valor Obtido					
Sertralina	50	50,3	100,6	0,8	0,2	0,8	1,0
	200	200,2	100,1	4,8	2,9	5,6	2,0
	500	499,5	99,9	3,8	8,8	9,6	1,8
Norsertalina	50	49,9	99,7	0,9	2,6	2,8	5,4
	200	196,4	98,2	6,0	8,0	9,9	4,4
	500	505,6	101,1	6,7	6,0	9,0	1,4
Venlafaxina	50	49,0	98,0	2,1	0,4	2,1	2,6
	200	205,4	102,7	4,9	4,9	6,9	2,8
	500	499,2	99,8	9,4	4,7	10,5	1,4
Desmetilvenlafaxina	50	48,2	96,4	2,2	0,8	2,4	3,2
	200	204,0	102,0	5,9	1,2	6,0	1,8
	500	502,5	100,5	8,3	4,9	9,7	1,4

**Tabela IV.43.** Resumo dos resultados obtidos no estudo da precisão intermédia em urina.

	Concentração (ng/mL)		Recuperação (%)	Repetibilidade ( $S_p$ )	Precisão entre Sequências ( $S_{mn}$ )	Precisão Intermédia	CV (%)
	Valor Verdadeiro	Valor Obtido					
Sertralina	50	49,8	99,7	1,0	2,8	3,0	5,8
	200	196,5	98,2	8,7	4,9	10,0	3,6
	500	499,0	99,8	6,8	12,9	14,5	2,7
Norsertalina	50	49,5	99,1	1,2	2,7	3,0	5,7
	200	197,7	98,9	10,1	5,1	11,3	3,9
	500	494,6	98,9	8,7	3,0	9,2	1,2
Venlafaxina	50	48,7	97,4	1,4	3,1	3,4	6,6
	200	205,9	102,9	7,6	9,9	12,5	5,3
	500	501,5	100,3	7,7	8,7	11,6	1,9
Desmetilvenlafaxina	50	48,9	97,9	1,7	0,4	1,7	2,2
	200	201,5	100,7	8,8	13,4	16,1	7,1
	500	489,4	97,9	6,9	10,4	12,4	2,3

A avaliação deste parâmetro requer o cálculo do coeficiente de variação, tendo este de apresentar valores inferiores a 20%. Esta condição foi cumprida, sendo que os coeficientes de variação obtidos nunca ultrapassaram os 7,1%.

Em anexo, encontram-se tabelas e gráficos detalhados, com valores áreas, curvas de calibração e respectivos tratamentos estatísticos, para cada substância em cada uma das duas matrizes individualmente.

### IV.6.3. Exactidão

A exactidão exprime a proximidade entre um valor aceite como sendo verdadeiro e o resultado obtido na medição, sendo por vezes denominado por veracidade. A exactidão de um método é calculada como percentagem de recuperação da concentração conhecida do analito adicionada à amostra. Este parâmetro é afectado por erros aleatórios (precisão) e erros sistemáticas (*Bias*), porém a exactidão é comumente associada apenas com erros sistemáticos.

Este parâmetro pode ser avaliado com recurso a materiais de referência certificados (MRC), com a participação em ensaios inter-laboratoriais ou com a realização de ensaios de recuperação.<sup>[59]</sup>

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.

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

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

sendo que:

- $S_{Obs}$  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  $R$  não é significativamente diferente de 100% e  $U_{\bar{R}}$  é calculado com base na primeira equação.
- Se  $t_{Exp} > t_{Crit}$ , então  $R$  é significativamente diferente de 100%. Quando não são introduzidos factores de correcção,  $U_{\bar{R}}$  é calculado de acordo com a segunda equação. Neste caso, a incerteza é aumentada de forma a contemplar este factor adicional de incerteza.

Nas tabelas seguintes apresentam-se resumos dos resultados obtidos relativos ao estudo da exactidão.

**Tabela IV.44.** Resumo dos resultados obtidos no estudo da exactidão em sangue.

	50 ng/mL	200 ng/mL	500 ng/mL
Sertralina	100,6	100,1	99,9
Norsertalina	99,7	98,2	101,1
Venlafaxina	98,0	102,7	99,8
Desmetilvanlafaxina	96,4	102,0	100,5

**Tabela IV.45.** Resumo dos resultados obtidos no estudo da exactidão em urina.

	50 ng/mL	200 ng/mL	500 ng/mL
Sertralina	99,7	98,2	99,8
Norsertalina	99,1	98,9	98,9
Venlafaxina	97,4	102,9	100,3
Desmetilvanlafaxina	97,9	100,7	97,9

Os valores obtidos para as taxas de recuperação encontram-se no intervalo de valores, definido por uma margem de erro de 20%, que varia entre 80% e 120%. Mais, a relação  $t_{Exp} < t_{crit}$  foi sempre verificada, pelo que em caso algum a exactidão é estatisticamente diferente de 100%. Conclui-se, assim, a ausência de erros sistemáticos.

Em anexo, encontram-se tabelas e gráficos detalhados, com valores áreas, curvas de calibração e respectivos tratamentos estatísticos, para cada substância em cada uma das duas matrizes individualmente.

#### **IV.7. Efeito matriz**

O efeito matriz é das principais causas de erros em análises bioanalíticas. Com o aumento da sensibilidade do equipamentos laboratoriais, este problema tem vindo a aumentar de importância.<sup>[1]</sup> A tecnologia de LC-MS/MS (e tecnologias variantes) é susceptível ao chamado efeito matriz, o qual afecta a precisão, exactidão e robustez do método. Este efeito é comumente tido como a diferença entre a resposta obtida pelo espectrómetro de massa para um dado analito numa solução-padrão e a resposta dada pelo mesmo num extracto resultante da matriz biológica, nas mesmas condições analíticas.<sup>[39]</sup> O efeito matriz advém da co-eluição de componentes da matriz com os analitos de interesse, sendo que a presença destes resulta na supressão ou intensificação iónica.

A matriz traduz-se em todos os componentes presentes numa amostra, para além das substâncias de interesse. Na maioria das vezes, as componentes de matriz são removidas através de processos de limpeza inseridos na metodologia analítica. Os processos de limpeza de amostras mais comuns são a precipitação de proteínas, extracção líquido-líquido e extracção em fase sólida.

As fontes de efeitos matriz mais comuns são<sup>[1]</sup>:

- Componentes endógenos da matriz (*e.g.* lípidos, proteínas),
- Componentes exógenos da matriz, introduzidos durante a análise (*e.g.* excipientes, anti-coagulantes),
- Produtos de degradação dos analitos (*e.g.* resultantes da termolabilidade, pH),
- Impurezas,

- Ligações matriciais dos analitos (*e.g.* sertralina apresenta forte afinidade por ligações proteicas),
- Solventes e aditivos usados em LC,
- Outros compostos e metabolitos.

O efeito matriz depende das características físico-químicas do analito (*e.g.* compostos mais polares tendem a apresentar maior efeito matriz). O mecanismo exacto dos efeitos matriz não é ainda conhecido, tornando-o difícil de controlar/prever, pelo que o analista pode apenas tentar diminuir os efeitos de forma empírica. Melhorias podem ser atingidas com a alteração do passo de limpeza das amostras (*e.g.* alteração dos solventes usados, variação do tempo e condições de secagem das colunas), condições de preparação das amostras (*e.g.* variação do pH) e da análise cromatográfica.

São conhecidos dois métodos de avaliação do efeito matriz: o método de infusão em coluna e o método de fortificação pós-extracção. Estas duas metodologias diferem nos resultados obtidos, uma vez que o primeiro nos fornece apenas uma avaliação qualitativa do efeito matriz, enquanto o segundo estabelece um estudo quantitativo do mesmo. O método de fortificação pós-extracção baseia-se na definição já apresentada do efeito matriz, comparando assim respostas obtidas de amostras biológicas fortificadas e soluções-padrão. Esta definição pode ser traduzida pela seguinte relação matemática:

$$\%EM = \left[ \left( \frac{A_{C/Matriz}}{A_{S/Matriz}} \right) - 1 \right] \times 100$$

onde:

- $A_{C/Matriz}$  – média das áreas absolutas obtidas para o ião pico base das amostras fortificadas após a aplicação do procedimento extractivo,
- $A_{S/Matriz}$  – média das áreas absolutas obtidas para o ião pico base das amostras preparadas a partir da fortificação de solvente de eluição.

O estudo deste parâmetro torna-se interessante neste trabalho por ser efectuado com recurso a uma tecnologia tão sensível como é o UPLC-MS/MS, e por se tratar de um estudo comparativo entre duas matrizes. Torna-se assim pertinente avaliar quantitativamente o efeito matriz intrínseco a estas duas matrizes biológicas.

A fim de determinar o efeito matriz associado a sangue e urina neste método, foram preparados dois conjuntos de cinco amostras brancas (0,5 mL), aos quais foi aplicado o procedimento extractivo. Após a eluição, cada conjunto foi fortificado com uma de duas gamas de concentração: 50 ng/mL e 500 ng/mL. Em paralelo, fortificaram-se dois conjuntos de cinco tubos com as concentrações já indicadas, onde se tinham previamente colocado 2 mL do solvente de eluição. A adição de padrão interno foi feita posteriormente a todas as fortificações, sendo adicionado um volume de 50 µL de zolpidem-d6 a 1 µg/mL.

Uma vez aplicado o método, determinou-se quantitativamente o efeito matriz, encontrando-se seguidamente, sob forma de tabelas, resumos dos resultados obtidos.

**Tabela IV.46.** Resumo do estudo do efeito matriz em sangue da cavidade cardíaca.

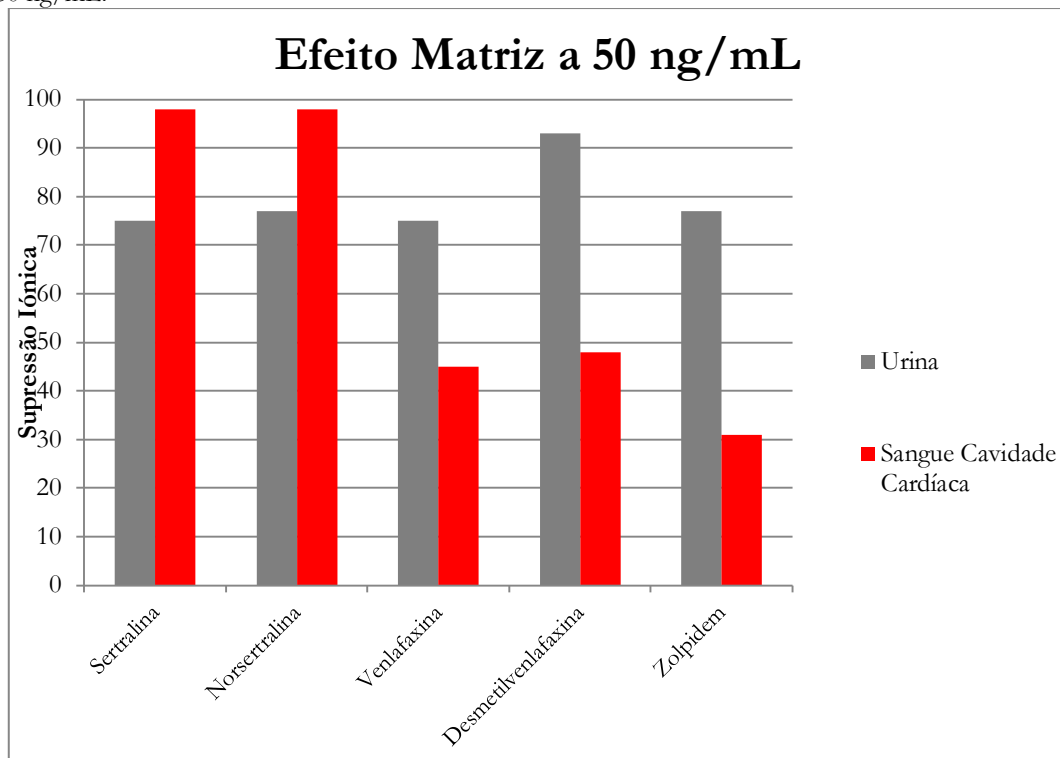
	<i>Efeito Matriz (%EM)</i>	
	50 ng/mL	500 ng/mL
Sertralina	-98	-99
Norsertalina	-98	-99
Venlafaxina	-45	-80
Desmetilvenlafaxina	-48	-74
Zolpidem-d6	-31	-70

**Tabela IV.47.** Resumo do estudo do efeito matriz em urina.

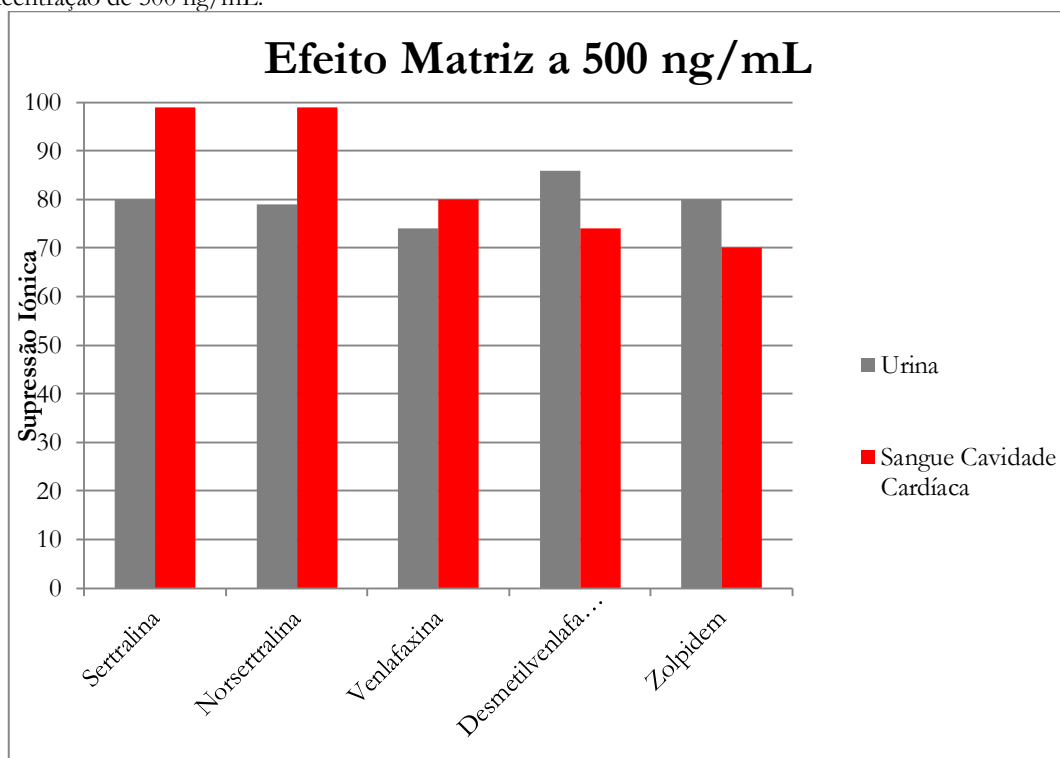
	<i>Efeito Matriz (%EM)</i>	
	50 ng/mL	500 ng/mL
Sertralina	-75	-80
Norsertalina	-77	-79
Venlafaxina	-75	-74
Desmetilvenlafaxina	-93	-86
Zolpidem-d6	-77	-80

Os valores negativos obtidos no estudo do efeito matriz são indicativos de que, nas condições deste estudo, o efeito matriz resulta em efeitos de supressão iónica. Nos gráficos a seguir postos, tomam-se os valores absolutos.

**Gráfico IV.1.** Representação gráfica dos resultados obtidos do estudo do efeito matriz, à concentração de 50 ng/mL.



**Gráfico IV.2.** Representação gráfica dos resultados obtidos do estudo do efeito matriz, à concentração de 500 ng/mL.





Tendo em conta as propriedades físico-químicas das substâncias em estudo, e as características das matrizes biológicas utilizadas para o estudo deste parâmetro, alguns dos resultados obtidos eram sem dúvida esperados.

Um dos aspectos que mais sobressai é o destaque que a sertralina e norsesertalina assumem em sangue da cavidade cardíaca, em ambas as gamas de concentração. Este já era esperado, uma vez que a sertralina apresenta uma afinidade muito forte por ligações proteicas no plasma (98%), o que leva a uma maior co-eluição de componentes da matriz, muito provavelmente proteínas a que a sertralina e norsesertalina se encontram ligadas. Em contrapartida, não eram esperados valores de supressão iónica tão elevados para a venlafaxina e seu metabolito em sangue da cavidade cardíaca a concentrações da gama alta, uma vez que este composto apresenta pouca afinidade por ligações proteicas (27%).

Por serem mais polares, eram já esperados valores mais elevados para a supressão iónica dos metabolitos, em comparação com os compostos que lhes dão origem. A desmetilvenlafaxina apresenta um comportamento dentro do esperado, pela sua natureza polar e por ter pouca afinidade por ligações proteicas.

Tal como também era esperado, a urina apresenta comportamento médio estável. É de notar ainda o aumento da supressão iónica em sangue cardíaco em concentrações mais elevadas, podendo indicar que este factor dependa da concentração.

As interações da matriz podem variar significativamente entre amostras biológicas do mesmo tipo, colocando-se a hipótese de poder haver diferença do efeito matriz entre amostras de sangue da cavidade cardíaca e de sangue periférico, por exemplo. Sendo estes dois tipos de amostras utilizadas na rotina de análises de um laboratório de toxicologia forense, teria sido indicado o estudo deste parâmetro de validação em sangue periférico, a fim de enriquecer a comparação já efectuada.

Deste estudo conclui-se que é da maior importância a preparação de curvas de calibração e preparação de controlos em matriz biológica semelhante à das amostras a analisar.

#### **IV.8. Robustez**

A robustez de um método traduz a sensibilidade deste face a pequenas variações provenientes da rotina diária laboratorial. Um método é tido como robusto quando não apresenta variações significativas dos resultados, resultantes destas alterações. A robustez de um método analítico atribui-lhe credibilidade e confiança nos seus resultados.

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. Nomeadamente, pequenas alterações de pH, temperatura ambiental, composição da fase móvel, lote de reagentes, desgaste de colunas analíticas, manutenção do equipamento, entre outros. Para além destas alterações comuns, são ainda de notar as seguintes variações efectuadas no decorrer do processo de validação:

- Alteração do fluxo do cone de fragmentação
- Alteração das temperaturas dessolvatação e da fonte
- Mudança da coluna analítica utilizada
- Manutenção externa do equipamento
- Mudança de filtros e linhas de solventes do equipamento
- Alteração do volume de reconstituição

Algumas destas alterações foram feitas a meio do estudo da precisão, onde não se notaram mudanças significativas nas respostas dos analitos. As restantes também não demonstraram efeitos significativos que afectassem os parâmetros de precisão e exactidão e a capacidade de identificação do método, pelo que o método apresentado e validado pode ser tido como robusto.



# Capítulo V

## Aplicações em Casos Reais



Após o desenvolvimento e validação do método analítico apresentado, este trabalho nunca poderia ficar completo sem a aplicação do mesmo a amostras de casos reais. Assim, foram estudados nove casos reais afim de demonstrar a utilidade em toxicologia forense do método validado. Os casos escolhidos destacaram-se pela historial da vítima ou pelas elevadas concentrações dos analitos de interesse, previamente determinadas pelo SQTf-DC. Apenas foram escolhidos casos com amostras de sangue periférico e urina disponíveis. A metodologia de análise aplicada a estas amostras foi a descrita no Capítulo III, secção 3. Todas as condições apresentadas nesse ponto foram mantidas e reproduzidas a fim de este ser um teste ao ensaio validado.

O grande obstáculo encontrado nesta fase do projecto foi a escassa informação que acompanha cada caso. Esta é uma grande dificuldade sentida na rotina de um laboratório de toxicologia forense, pois muitas vezes esta informação justifica ou complementa resultados menos comuns.

Note-se que, tal como foi anteriormente explicado, as conclusões que se podem tecer a partir das concentrações determinadas em amostras de urina não são tão lineares ou directas como a interpretação de resultados em amostras de sangue.

Para além disso, os resultados e a discussão apresentados não deverão ser tomados com carácter vinculativo ou conclusivo, mas apenas como um exercício especulativo guiado por conclusões lógicas e o conhecimento científico apresentado ao longo deste trabalho.

Para a determinação dos compostos em estudo nas amostras em questão, analisaram-se amostras diluídas e não-diluídas. O factor de diluição associado a cada caso foi escolhido tendo em conta a concentração previamente determinada pelo SQTf-DC e a gama de trabalho linear validada (1 – 800 ng/mL).

**Tabela V.1.** Resumo dos casos reais estudados, com as concentrações dos analitos em estudo determinadas em sangue e urina.

<i>Caso</i>	<i>Sexo</i>	<i>Idade</i>	<i>Etiologia médico-legal presumida</i>	<i>Substância</i>	<i>Conc. Sangue (ng/mL)</i>	<i>Conc. Urina (ng/mL)</i>
1	M	44	Suicídio (intoxicação)	SER/NSR	1248/717	-/-
2	F	77	Suicídio (lesão traumática)	VEN/DMV	1205/1272	5185/-
3	M	47	Suicídio (afogamento)	VEN/DMV	899/198	10165/5764
4	M	77	Suicídio (asfixia mecânica)	VEN/DMV	528/951	4616/18780
5	F	60	(Afogamento)	SER/NSR	4616/18780	518/633
6	M	54	Suicídio (lesão traumática)	SER/NSR	310/18	1272/1529
7	F	62	-	SER/NSR	1126/2946	146/670
8	F	74	-	VEN/DMV	767/-	585/14
9	M	40	-	VEN/DMV	2095/3355	-/95924

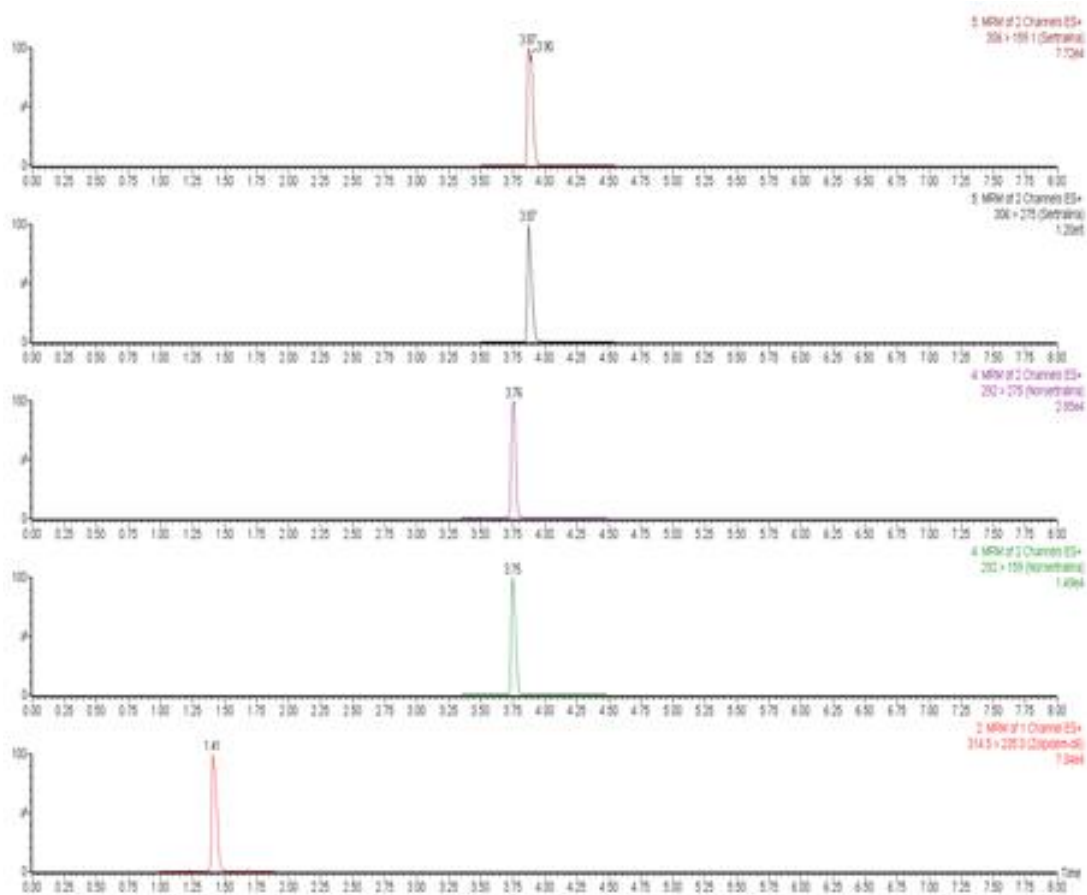
- **Caso 1**

Um homem de 44 anos foi encontrado morto em sua casa, suspeitando-se de suicídio por intoxicação severa. Era-lhe conhecida a medicação de nimesulide e estazolam. Junto ao cadáver foram encontradas nove embalagens de medicamentos, para além da medicação conhecida, incluindo uma embalagem de sertralina. Foi encontrado o diário da vítima, onde acusava o seu irmão de o envenenar com remédio para as pulgas e carraças. Foram enviados para análise dois líquidos não identificados encontrados em garrações.

A triagem de pesticidas feita aos dois líquidos não identificados foi negativa. Das análises às matrizes biológicas disponíveis, não foi confirmada a presença de álcool, mas foram identificados THC-COOH (8 ng/mL), estazolam (1571 ng/mL), diazinão e sulfotep (pesticidas), e sertralina.

Foram determinadas no sangue as concentrações de 1248 ng/mL e 717 ng/mL para a sertralina e norsesertralina, respectivamente. Na urina não foi confirmada a presença de nenhum dos dois compostos.

**Figura V.1.** Cromatograma obtidos na amostra de sangue, no caso 1: MRM da sertralina (dois de cima), da norsesertralina (dois do centro) e do zolpidem-d6 (em baixo).



Em primeira instância, a ausência de sertralina e do seu metabolito activo em urina são indicativos de que a morte do sujeito terá ocorrido menos de 26 h após a exposição a sertralina, tempo de semi-vida do composto. Por outro lado, a concentração de sertralina determinada ultrapassa a gama terapêutica do composto em cerca de seis vezes, o que, juntamente com a razão entre a concentração da sertralina e do seu metabolito activo, indica que o indivíduo sofreu uma intoxicação aguda por sertralina.



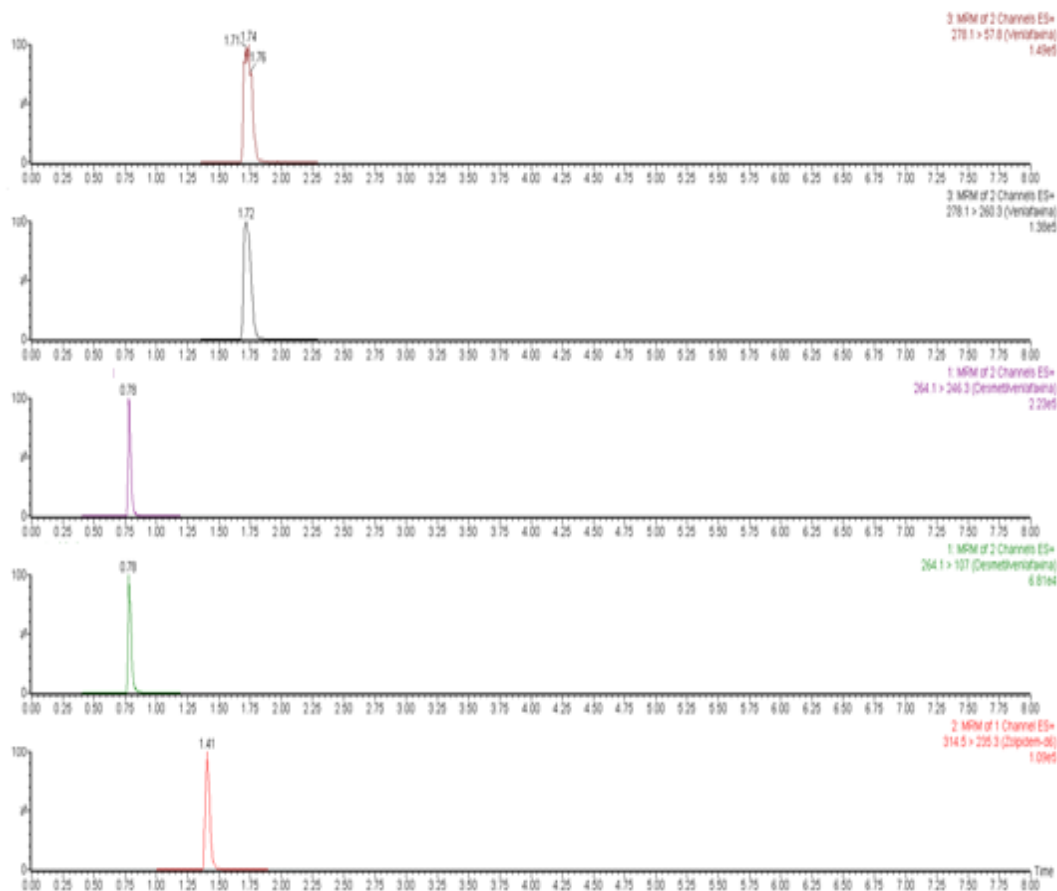
• **Caso 2**

Uma mulher de 77 anos foi encontrada já cadáver junto a uma linha férrea. Supõe-se que terá cometido suicídio, atirando-se para a frente de um comboio em movimento, acabando por ser colhida e sofrendo graves lesões traumáticas. Não lhe era conhecida nenhuma medicação. Foram pedidas análises de álcool, medicamentos e pesticidas.

A triagem a pesticidas e etanol teve resultado negativo, tendo sido identificados e quantificados alprazolam (12 ng/mL), lamotrigina (1185 ng/mL), olanzapina (229 ng/mL) e venlafaxina.

As concentrações de venlafaxina e do seu metabolito activo determinadas no sangue foram de 1205 ng/mL e 1272 ng/mL, respectivamente. Na urina, apenas foi detectada a venlafaxina, presente numa concentração de 5186 ng/mL.

**Figura V.2.** Cromatogramas obtidos na amostra de sangue, no caso 2: MRM da venlafaxina (dois de cima), da desmetilvenlafaxina (dois do centro) e do zolpidem-d6 (em baixo).



Sabendo que cerca 5% da dose de venlafaxina é recuperada em urina sob forma inalterada, o valor obtido nesta matriz poderá indicar exposição aguda ao composto. As concentrações no sangue são muito superiores às gamas terapêuticas para a presença simultânea das duas substâncias. Combinando estas informações, pode-se afirmar que o sujeito sofreu um intoxicação aguda por venlafaxina.

- **Caso 3**

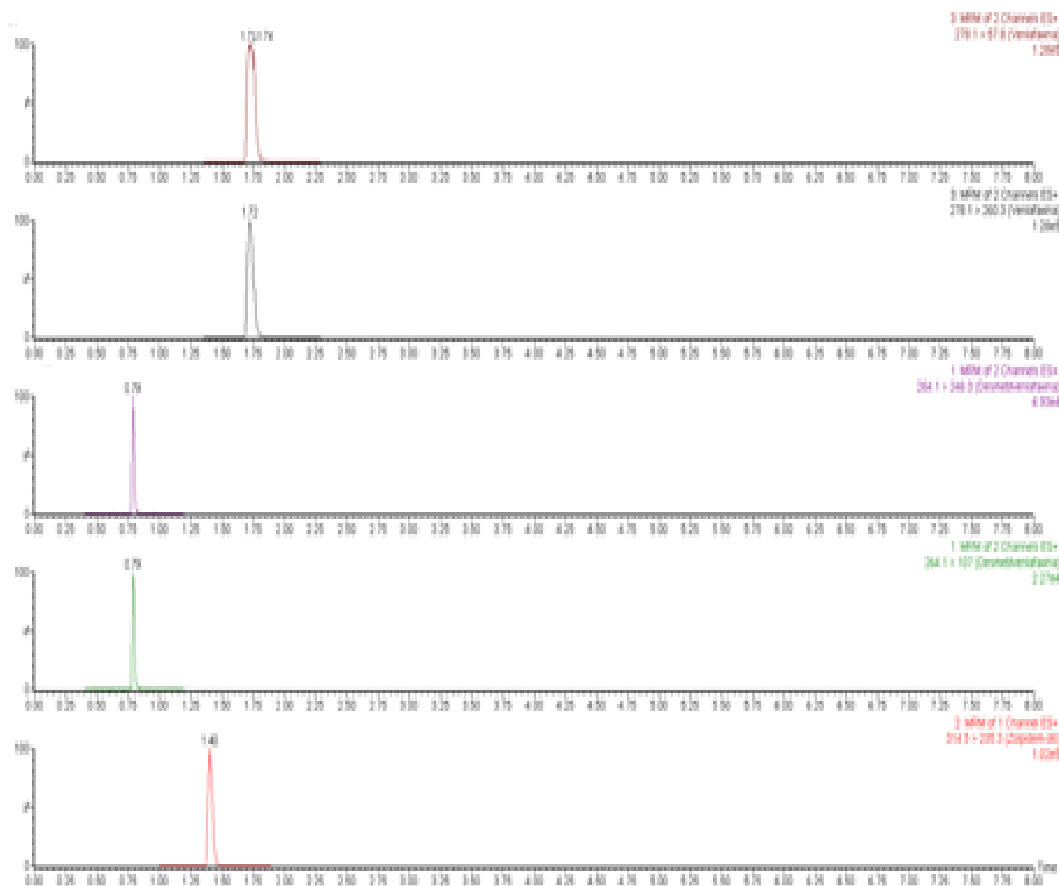
Um homem de 47 anos foi encontrado já cadáver no interior de um poço, sendo a morte atribuída a afogamento. O indivíduo era seguido psiquiatricamente, havendo registo de uma tentativa anterior de suicídio. A medicação conhecida era vasta, estando incluída venlafaxina.

Para além de venlafaxina, foram determinadas várias benzodiazepinas, nomeadamente diazepam (78 ng/mL), nordazepam (126 ng/mL), oxazepam (5 ng /mL) e temazepam (4 ng/mL).

As concentrações determinadas para a venlafaxina e desmetilvenlafaxina foram, respectivamente, 899 ng/mL e 198 ng/mL no sangue e 10165 ng/mL e 5764 ng/mL na urina.

As concentrações no sangue ultrapassam a gama terapêutica para a presença dos dois compostos em sangue. Por outro lado, a razão entre as concentrações de venlafaxina e desmetilvenlafaxina é muito elevada, o que pode indicar uma exposição aguda à substância, tendo decorrido pouco tempo entre esta e a morte do sujeito. Tendo em conta o historial clínico do sujeito e as outras substâncias detectadas (benzodiazepinas), tudo leva a crer que o sujeito terá ingerido grandes quantidades dos fármacos referidos a fim de conseguir cometer o suicídio, atirando-se a um poço.

**Figura V.3.** Cromatogramas obtidos na amostra de sangue, no caso 3: MRM da venlafaxina (dois de cima), da desmetilvenlafaxina (dois do centro) e do zolpidem-d6 (em baixo).



- **Caso 4**

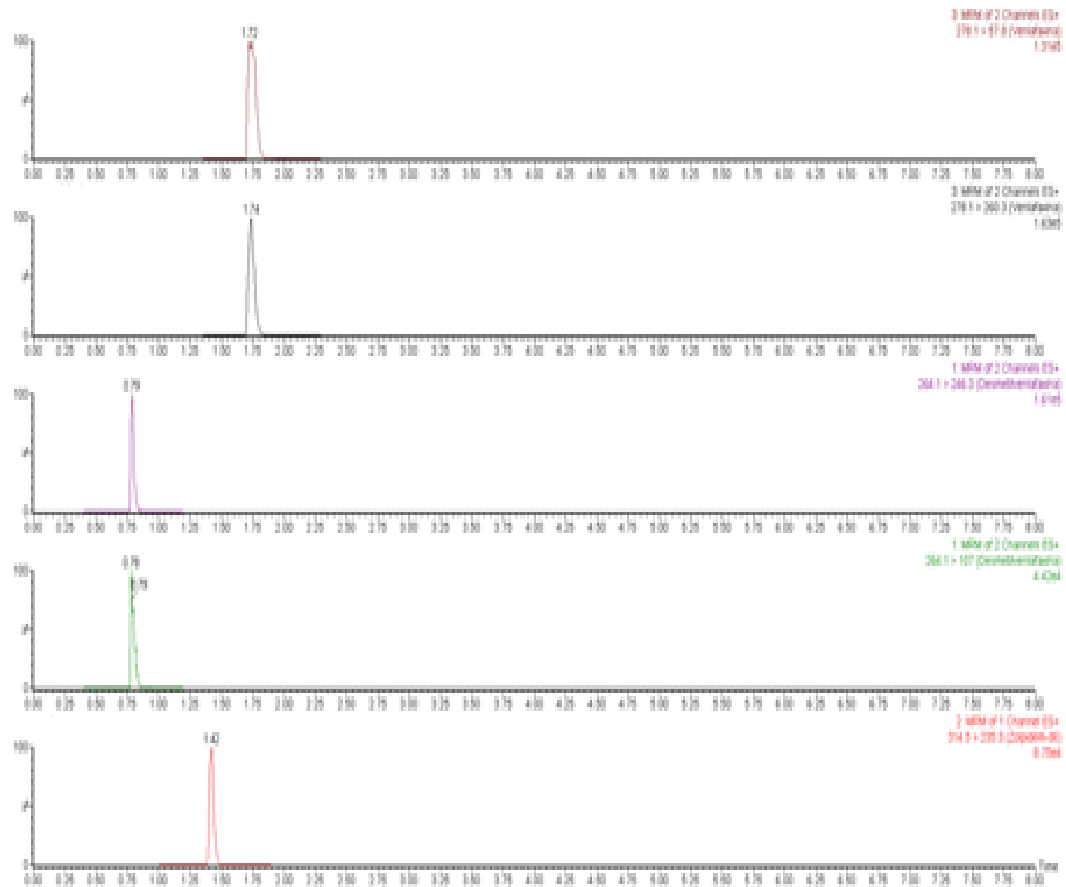
Uma mulher de 77 anos foi encontrada já cadáver, após se ter enforcado. Não era conhecida qualquer medicação.

O único composto identificado foi venlafaxina. As concentrações de venlafaxina e desmetilvenlafaxina determinadas no sangue foram de 528 ng/mL e 951 ng/mL, e na urina 4616 ng/mL e 18780 ng/mL, respectivamente.

A soma das concentrações em sangue é superior à respectiva gama terapêutica, mas a razão entre as concentrações é inferior a 1. A vítima terá ingerido quantidades de venlafaxina superiores à dose diária recomendada (mesmo não havendo prescrição desta substância), quantidade que terá causado alguns efeitos tóxicos, não sendo, porém, suficientes para causar a morte. Do mesmo modo, pelas concentrações na urina, conclui-se que terão decorrido pelo menos 4 h entre a ingestão da venlafaxina e a morte. Novamente, a informação colhida

indica que a vítima terá ingerido este composto a fim de não vacilar perante a sua intenção de suicídio.

**Figura V.4.** Cromatogramas obtidos na amostra de sangue, no caso 4: MRM da venlafaxina (dois de cima), da desmetilvenlafaxina (dois do centro) e do zolpidem-dó (em baixo).



### • Caso 5

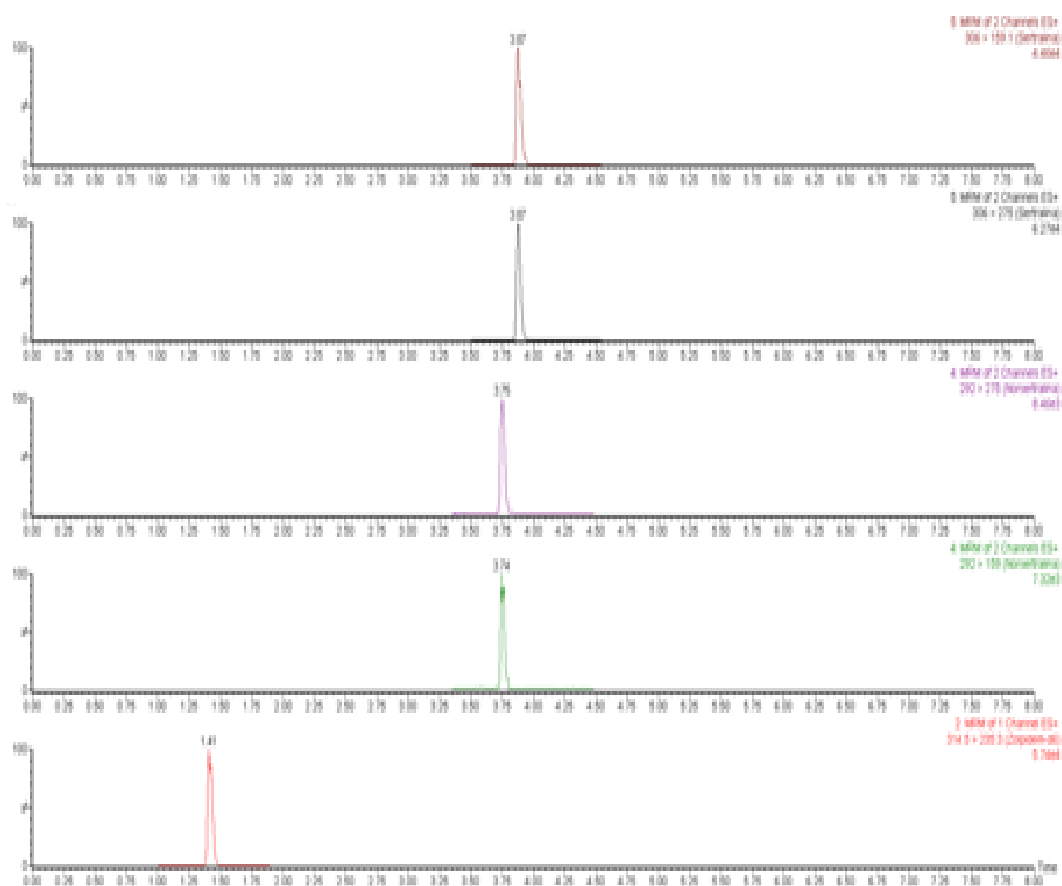
Uma mulher de 60 anos foi encontrada morta, não havendo especificações sobre as condições em que o corpo foi encontrado. A etiologia médico-legal presumida foi morte por afogamento.

Foram identificados diazepam (397 ng/mL), nordazepam (162 ng/mL), oxazepam (8 ng/mL), temazepam (26 ng/mL) e sertralina.

A sertralina foi determinada em concentrações de 867 ng/mL no sangue e 518 ng/mL na urina. De igual modo, determinaram-se concentrações de 384 ng/mL e 633 ng/mL para a norsertralina no sangue e urina, respectivamente.

A concentração de sertralina é superior à sua gama terapêutica, apresentando um valor cerca de duas vezes superior à concentração de norsertralina. A vítima terá ingerido quantidades anormais de sertralina, mas esta não terá sido a causa directa da sua morte. Não havendo informação sobre as condições do afogamento, as conclusões não são lineares, podendo tratar-se de uma tentativa de suicídio ou de um simples afogamento, consequência dos efeitos conjugados dos vários fármacos detectados em sangue.

**Figura V.5.** Cromatogramas obtidos na amostra de sangue, no caso 5: MRM da sertralina (dois de cima), da norsertralina (dois do centro) e do zolpidem-d6 (em baixo).



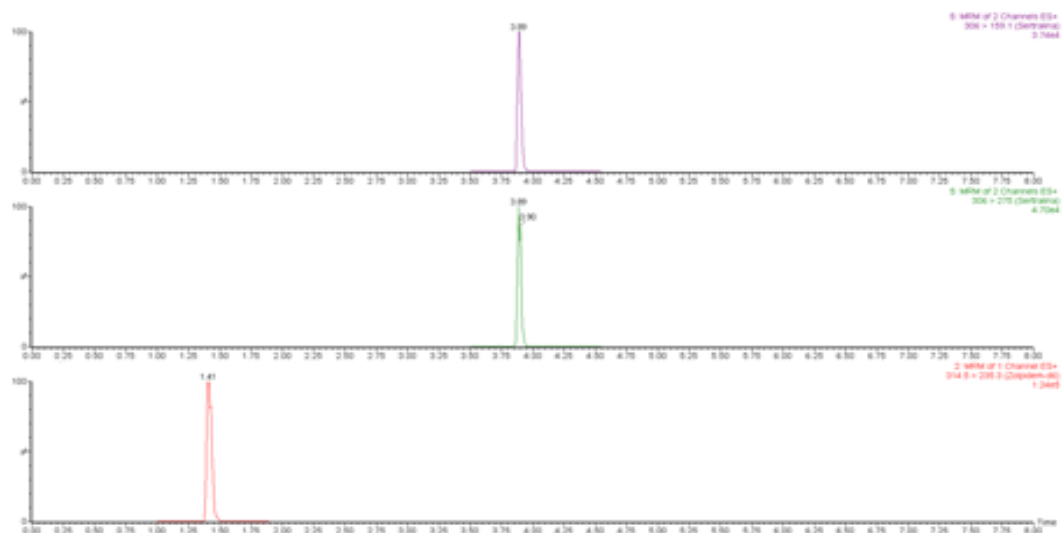
- **Caso 6**

Um homem de 54 anos cometeu suicídio, sendo a sua morte atribuída a lesão traumática. Foi pedida a determinação de álcool, drogas e medicamentos, com especial atenção para as benzodiazepinas e barbitúricos. Não era conhecida nenhuma medicação.

Foram determinados etanol (1,74 g/L), alprazolam (11 ng/mL), lorazepam (64 ng/mL), trazodona (117 ng/mL) e sertralina.

As concentrações determinadas no sangue foram de 310 ng/mL e 18 ng/mL para sertralina e norsesertalina, respectivamente, e de 1272 ng/mL e 1529 ng/mL na urina. A concentração de sertralina no sangue, apesar de superior à gama terapêutica, não fornece nenhuma informação clara. As concentrações na urina apenas indicam que se passaram mais de 26 h entre a ingestão da sertralina e a morte do sujeito. Uma vez que a vítima foi vítima de enforcamento, pode colocar-se a possibilidade de tratar-se de mais um caso de ingestão excessiva e voluntária de medicação com o objectivo de não vacilar perante a sua intenção de suicídio.

**Figura V.6.** Cromatogramas obtidos na amostra de sangue, no caso 6: MRM da sertralina (dois de cima) e do zolpidem-dó (em baixo).



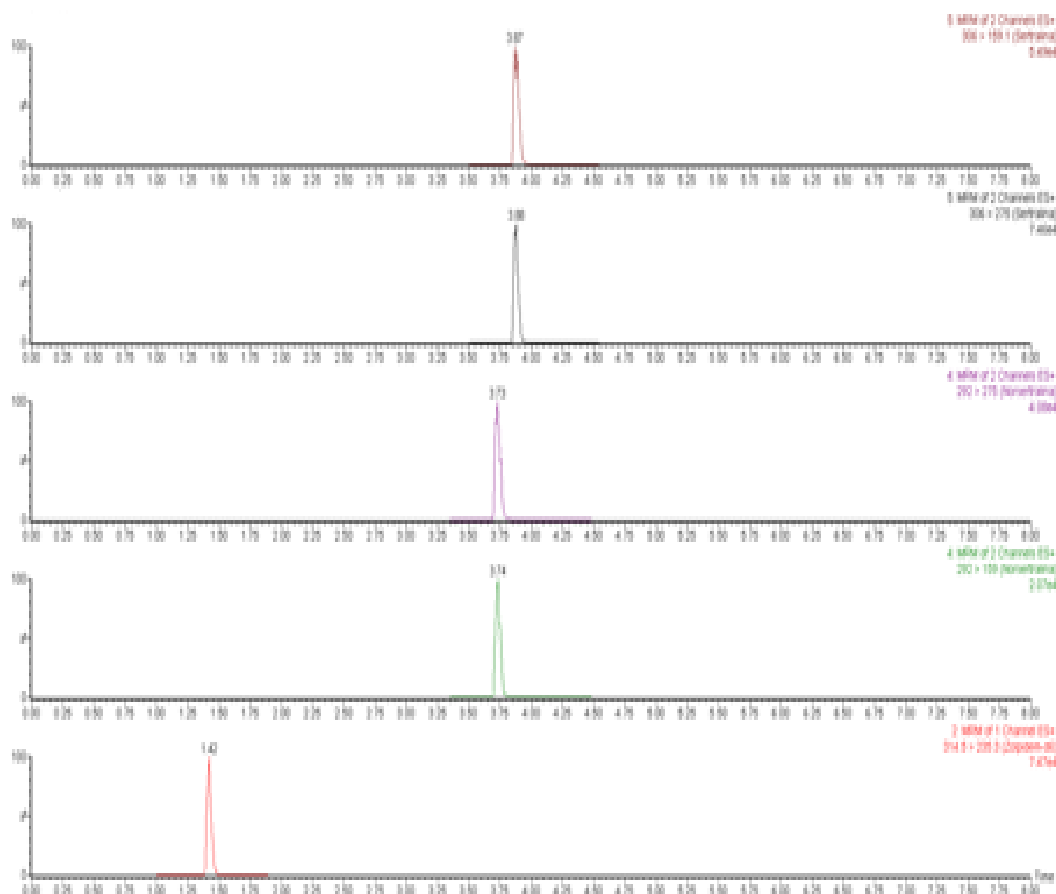
• **Caso 7**

Uma mulher de 62 anos foi encontrada morta, em condições desconhecidas, e sem registo de medicação ou etiologia médico-legal atribuída.

Foram determinada a presença de clomipramina (66 ng/mL), alprazolam (4 ng/mL) e sertralina.

As concentrações determinadas para a sertralina e norsesertralina foram, respectivamente: 1126 ng/mL e 2946 ng/mL no sangue, e 146 ng/mL e 670 ng/mL na urina.

**Figura V.7.** Cromatogramas obtidos na amostra de sangue, no caso 7: MRM da sertralina (dois de cima), da norsesertralina (dois do centro) e do zolpidem-d6 (em baixo).



A concentração de sertralina no sangue ultrapassa significativamente a sua gama terapêutica, porém a razão entre concentrações de sertralina e norsesertralina é muito inferior a

1. Devido à falta de informação associada a este caso, apenas se pode concluir que o sujeito ingeriu quantidades anormais de sertralina e que entre a ingestão e a morte do sujeito se terão decorrido pelo menos 26 h.

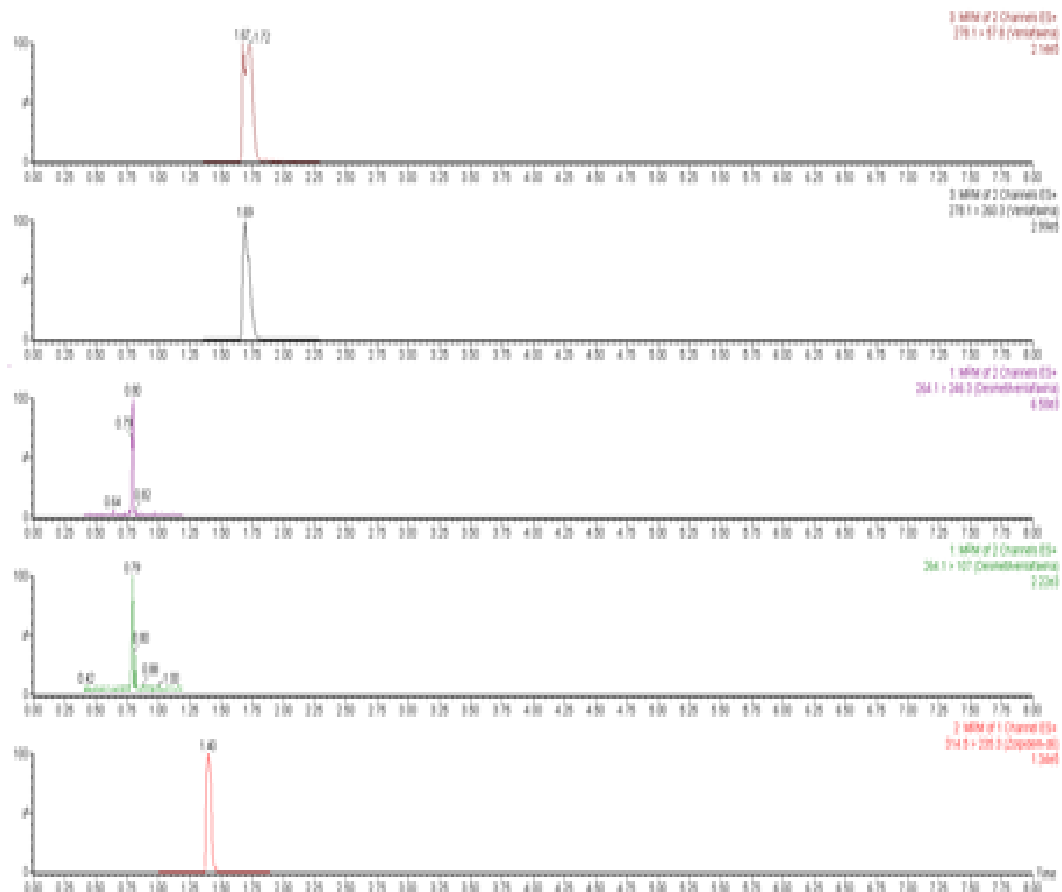
- **Caso 8**

Uma mulher de 74 anos foi encontrada morta, não havendo registo das condições em que foi encontrada, medicação ou causa de morte atribuída.

Foram determinados oxazepam (1318 ng/mL), fluoxetina (740 ng/mL) e venlafaxina.

No sangue, foi determinada uma concentração de venlafaxina de 767 ng/mL, não tendo sido detectada desmetilvenlafaxina. Na urina, determinaram-se concentrações de 585 ng/mL e 14 ng/mL para a venlafaxina e o seu metabolito activo.

**Figura V.8.** Cromatogramas obtidos na amostra de sangue, no caso 8: MRM da venlafaxina (dois de cima), da desmetilvenlafaxina (dois do centro) e do zolpidem-d6 (em baixo).





A concentração de venlafaxina no sangue é superior à sua gama terapêutica, porém não fornece informação relevante. Novamente, devido à falta de informação sobre este caso, as análises efectuadas são inconclusivas no que à causa de morte do indivíduo diz respeito.

- **Caso 9**

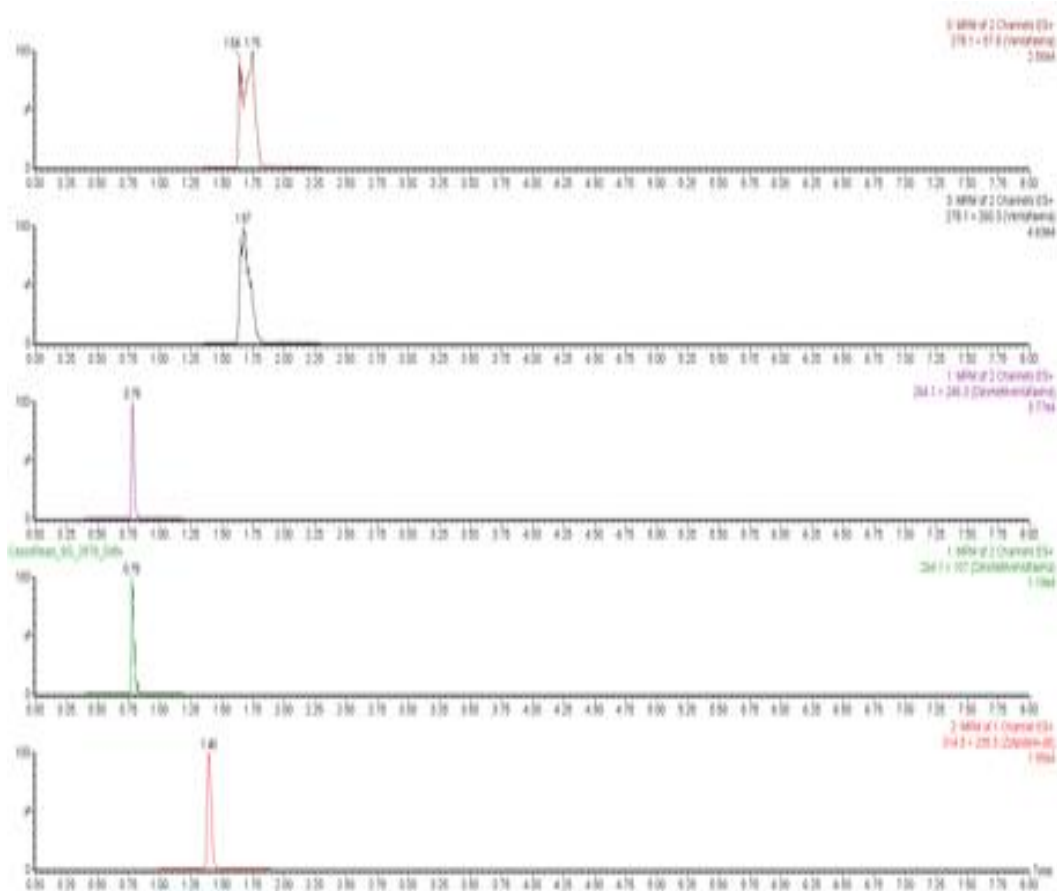
Um homem de 40 anos foi encontrado já cadáver, não sendo especificadas as condições em que o corpo foi encontrado. Há registo da possibilidade de ser toxicopendente.

Não tendo sido detectadas quaisquer drogas, foram identificados lamotrigina (20309 ng/mL) e venlafaxina.

As concentrações determinadas no sangue para venlafaxina e desmetilvenlafaxina foram de, respectivamente: 2095 ng/mL e 3355 ng/mL. Na urina apenas foi detectada a presença de desmetilvenlafaxina, apresentando uma concentração de 95924 ng/mL (este valor ultrapassa significativamente o limite superior da curva de calibração, podendo por isso ter associada uma incerteza significativa).

As concentrações no sangue são muito mais elevadas que a gama terapêutica correspondente, e a presença do metabolito na urina indica que terão decorrido pelo menos 4 h entre a ingestão do fármaco e a morte do sujeito. Tomando a elevada quantidade de lamotrigina que foi determinada no sangue (ainda que dentro da respectiva gama terapêutica), diria que o sujeito poderá ter morrido pela conjugação dos efeitos tóxicos destas substâncias.

**Figura V.9.** Cromatogramas obtidos na amostra de sangue, no caso 9: MRM da venlafaxina (dois de cima), da desmetilvenlafaxina (dois do centro) e do zolpidem-d6 (em baixo).



É interessante observar que os casos apresentados representam a realidade que é a tendência suicida com recurso a fármacos antidepressivos, sendo que pelo menos 5 dos 9 casos aparentam tratar-se de intoxicações voluntárias. Dos nove casos apresentados, todos apresentam concentrações acima das respectivas gamas terapêuticas. É ainda pertinente verificar que a razão de casos que apresentam a presença de outras substâncias é muito elevada (8 em 9), havendo maior tendência para a co-ingestão com benzodiazepinas (em 7 dos 9 casos).

Pelos resultados obtidos, pode observar-se o sucesso da aplicação do método analítico proposto e validado.



# Capítulo VI

## Conclusões



No decorrer deste projecto foi desenvolvida uma metodologia analítica para a detecção, identificação e quantificação de sertralina, venlafaxina e os seus metabolitos activos em duas amostras biológicas – sangue e urina. O procedimento de ensaio apresentado e validado inclui a preparação das amostras, com extracção em fase sólida, e a análise das mesmas por um sistema de UPLC-MS/MS. Deste modo, propõe-se a determinação destes compostos em sangue e urina por cromatografia líquida de ultra-performance acoplada a espectrometria de massa em modo sequencial, com ionização por *electrospray* e detecção através de um triplo quadrupolo.

A existência em laboratórios de toxicologia de métodos de determinação de fármacos antidepressivos em matrizes biológicas surge cada vez mais como uma necessidade, sendo este tipo de fármacos dos mais vendidos a nível mundial, e com um significativo crescimento de vendas nos últimos anos. Este projecto surge como resposta ao aumento de casos positivos para ambas as substâncias em ensaios de triagem, não raras vezes associados a valores de concentração muito elevados. A validação nestas duas matrizes biológicas surge como uma tentativa de uniformizar a metodologia a utilizar nas análises toxicológicas clínicas e forenses, sendo estas das poucas matrizes biológicas que podem ser colhidas em sujeitos vivos. O estudo dos metabolitos activos advem da potencial actividade farmacológica que estes podem exercer, contribuindo assim para os efeitos gerados pelas substâncias que lhes dão origem.

O ensaio descrito e validado apresenta uma grande simplicidade, no que à preparação das amostras diz respeito. Foi proposta uma alteração na preparação de amostras de urina, por diluição com uma solução tampão, apresentando melhores resultados quando confrontada com uma diluição em água. Os laboratórios de toxicologia tendem a uniformizar as metodologias analíticas, afim de criar análises de rotina rápidas e abrangendo uma vasta gama de substâncias. Nesta condição, o método desenvolvido pode facilmente ser integrado numa rotina de análise de compostos similares pré-existente.

A validação do método apresentado foi efectuada em termos da avaliação de diversos parâmetros analíticos, nomeadamente: selectividade e especificidade, eficiência da extracção, fenómenos de arrastamento, limiares analíticos inferiores, linearidade, efeitos de matriz, robustez e precisão. O método demonstrou ser rápido, selectivo, sensível e linear na gama de concentrações de 1 ng/mL a 800 ng/mL, abrangendo concentrações terapêuticas e tóxicas para ambas sertralina e venlafaxina. Os limites de detecção e quantificação são adequados, tendo em conta as gamas terapêuticas dos compostos, e provaram ser válidos e fiáveis. Não

foram detectados quaisquer efeitos de *carryover*. O ensaio validado provou ainda ser preciso, exacto, repetível e robusto, mesmo atendendo às variações das condições experimentais verificadas. A determinação dos efeitos de matriz resultou em elevados valores de supressão iónica para ambas as matrizes, ainda que em graus diferentes, recomendando fortemente a utilização de curvas de calibração e controlos de qualidade interna preparados em matriz similar à das amostras em análise.

Através do estudo dos nove casos reais apresentados, demonstrou-se a aplicabilidade da metodologia analítica descrita neste trabalho. Mais, estimula a conjugação de análises em diversas matrizes biológicas, e o cruzamento dos resultados obtidos em cada análise. Quanto ao tipo de conclusões que se teceram, estas devem ser tidas como um mero exercício académico. Porém, a falta de informação de alguns casos tornou-se num verdadeiro obstáculo à interpretação dos resultados, retratando a realidade diária de um laboratório de toxicologia forense.

O método analítico apresentado pode em algumas vertentes ser melhorado. A optimização das condições experimentais foi feita de modo a não modificar em demasia o procedimento que lhe serviu de base. A validação poderia ter integrado a avaliação de outros parâmetros analíticos, não menos importantes, nomeadamente a estabilidade das substâncias estudadas em ciclos de congelação/descongelação, o que é uma realidade num laboratório de toxicologia. Por outro lado, a preparação das amostras pode ser optimizada com a finalidade de diminuir os efeitos de matriz determinados. No que aos efeitos de matriz diz respeito, poder-se-ia ter avaliado este parâmetro em sangue periférico, abrangendo assim os dois tipos de sangue *post-mortem* que podem colhidos.

O trabalho desenvolvido pode ser continuado, havendo a possibilidade de validar esta metodologia analítica para a determinação de mais substâncias, nomeadamente os restantes compostos que integram as classes de fármacos antidepressivos SSRI e SNRI, ou até outros tipos de fármacos, se o ensaio assim o permitir. Outra proposta de estudo igualmente interessante será a validação o método para outras matrizes biológicas, entre as quais tecidos e órgãos, com a proposta de métodos de extracção de amostras mais adequados e eficazes para estas.

Tal como se encontra descrito e validado, o método analítico apresentado neste trabalho é adequado para a determinação de sertralina, venlafaxina e seus metabolitos activos, em sangue e urina, reunindo todas as condições necessárias para ser integrado na análises de rotina do SQTF-DC.





# R

## Referências Bibliográficas

- [1] Banerjee, Shidas; Mazumdar, Shyamalava (2011) “Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte” *International Journal of Analytical Chemistry*. Vol. 2012.
- [2] Baselt, Randall C. (2004) *Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man*. Foster City: Biomedical Publications.
- [3] Bell, Suzanne (2009) *Drugs, Poisons, and Chemistry*. New York: Facts On File, Inc..
- [4] Bhatt, Jignesh; Jangid, Arvind; Venkatesh, Gantala; Subbaiah, Gunta; Singh, Sadhana (2005) “Liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS–MS) method for simultaneous determination of venlafaxine and its active metabolite O-desmethyl venlafaxine in human plasma” *Journal of Chromatography B*. Vol. 829, pp. 75-81.
- [5] Bosse, George M.; Spiller, Henry A.; Collins, Aaron M. (2008) “A Fatal Case of Venlafaxine Overdose” *Journal of Medical Toxicology*. Vol. 4, pp. 18-20.
- [6] Brito, Natilene M.; de Amarante Jr., Ozelito P.; Polese, Luciana; Ribeiro, Maria L. (2003) “Validação de Métodos Analíticos: Estratégia e Discussão” *Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente*. Vol. 13, pp. 129-146.
- [7] Brittain, Harry G. (1996) *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients* New Jersey: Academic Press.
- [8] Bruno, Thomas J.; Svoronos, Paris D. (2003) *Handbook of Basic Tables for Chemical Analysis*. Boca Raton: CRC Press.
- [9] Castaing, Nadège; Titier, Karine; Receveur-Daurel, Mathilde; Le-Déodic, Maité; Le-bars, Delphine; Moore, Nicholas; Molimard, Mathieu (2007) “Quantification of Eight New Antidepressants and Five of their Active Metabolites in Whole Blood by High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry” *Journal of Analytical Toxicology*. Vol. 31, pp. 334-341.
- [10] Cordioli, Aristides V. (2011) *Psicofármacos: Consulta Rápida*. Porto Alegre: Artmed.
- [11] Dasgupta, Amitava (2010) *Advances in Chromatographic Techniques for Therapeutic Drug Monitoring*. Boca Raton: CRC Press.
- [12] De Castro, A.; Concheiro, M.; Quintela, O.; Cruz, A.; López-Rivadulla, M. (2008) “LC–MS/MS method for the determination of nine antidepressants and some of their main metabolites in oral fluid and plasma. Study of correlation between venlafaxine concentrations in both matrices” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Vol. 48, pp. 183-193.

- [13] Ellenhorn, Matthew J. (1997) *Ellenborn's Medical Toxicology – Diagnosis and Treatment of Human Poisoning*. Baltimore: Williams & Wilkins.
- [14] Fried, Karen M.; Nolan Jr., Paul E.; Anthony, Marietta; Woosley, Raymond L.; Freeman, Marlene P. (2011) “LC–MS Analysis of Sertraline and Its Active Metabolite in Human Serum Using a Silica Column with a Non-Aqueous Polar Mobile Phase” *Chromatographia*. Vol. 73, pp. 749-754.
- [15] Gergov, M.; Ojanpera, I.; Vuori, E. (2003) “Simultaneous screening for 238 drugs in blood by liquid chromatography–ionspray tandem mass spectrometry with multiple-reaction monitoring” *Journal of Chromatography B*. Vol. 795, pp. 41-53.
- [16] He, Lijuan; Feng, Fang; Wu Jie (2005) “Determination of Sertraline en Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Method Validation” *Journal of Chromatographic Science*. Vol. 43.
- [17] Hiemke, Christoph; Härtter, Sebastian (2000) “Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors” *Pharmacology & Therapeutics*. Vol. 85, pp. 11-28.
- [18] Ho, C. S.; Lam, C. W. K.; Chan, M. H. M.; Cheung, L. K.; Lit, L. C. W.; Ng, K. F.; Suen, M. W. M.; Tai, H. L. (2003) “Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications” *The Clinical Biochemist Reviews*. Vol. 4, pp. 3-12.
- [19] Infarmed, I. P. (2011) *Estatística do medicamento 2011*. Lisboa.
- [20] Jickells, Sue; Negrusz, Adam (2008) *Clarke's Analytical Forensic Toxicology*. London: Pharmaceutical Press (PhP).
- [21] Karch, Steven B. (2008) *Postmortem Toxicology of Abused Drugs*. Boca Raton: CRC Press.
- [22] Labbate, Lawrence A. (2010) *Handbook of Psychiatric Drug Therapy*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- [23] Lajeunesse, A.; Gagnon, C.; Sauve, S. (2008) “Determination of Basic Antidepressants and Their N-Desmethyl Metabolites in Raw Sewage and Wastewater Using Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry” *Analytical Chemistry*. Vol. 80 (14), pp. 5325-5333.
- [24] Lewis, Russel J.; Angier, Mike K.; Williamson, Kelly S. (2012) “Analysis of Sertraline in Postmortem Fluids and Tissues in 11 Aviation Accident Victims” *Federal Aviation Administration*.
- [25] Mandrioli, Roberto; Saracino, Maria A.; Ferrari, Silvia; Berardi, Domenico; Kenndler, Ernst; Raggi, Maria A. (2006) “HPLC analysis of the second-generation antidepressant sertraline and its main metabolite N-desmethylsertraline in human plasma” *Journal of Chromatography B*. Vol. 836, pp. 116-119.
- [26] Mazur, Joseph E.; Doty, John D.; Krygiel, Ashley S. (2003) “Fatality Related to a 30g Venlafaxine Overdose” *Pharmacotherapy*. Vol. 23(12).

- [27]Moffat, Anthony C.; Oselton, M. D.; Widdop, Brian (2004) *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. London: Pharmaceutical Press (PhP).
- [28]Norman, Trevor R. (1999) "The new antidepressants – mechanisms of action" *Australian Prescriber*. Vol. 22, pp. 106-108.
- [29]Parsons, Ann T.; Anthony, Robert M.; Meeker, James E. (1996) "Two Fatal Cases of Venlafaxine Poisoning" *Journal of Analytical Toxicology*. Vol. 20, pp. 266-268.
- [30]Patel, Jignasha; Spencer, E. P.; Flanagan, R. J. (1996) "HPLC of Sertraline and Norsertaline in Plasma or Serum" *Biomedical Chromatography*. Vol. 10, pp. 351-354.
- [31]Polettini, Aldo (2006) *Applications of LC-MS in Toxicology* London: Pharmaceutical Press (PhP).
- [32]Preskorn, S. (1997) "Pharmacotherapeutic profile of venlafaxine" *European Psychiatry*. Vol. 12 (4), pp. 285s-294s.
- [33]Rangel, Rui (2003) "Toxicologia Forense" in *Noções Gerais Sobre Outras Ciências Forenses*. Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, pp. 2-18.
- [34]Saint-Marcoux, Franck; Sauvage, François-Ludovic; Marquet, Pierre (2007) "Current role of LC-MS in therapeutic drug monitoring" *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Vol. 388, pp. 1327-1349.
- [35]Schatzberg, Alan F.; Cole, Jonathan O.; DeBattista, Charles (2010) *Manual of Clinical Psychopharmacology*. Arlington: American Psychiatric Publishing Inc..
- [36]Schreiber, André (2010) "Advantages of Using Triple Quadrupole over Single Quadrupole Mass Spectrometry to Quantify and Identify the Presence of Pesticides in Water and Soil Samples" ABSciex, Old Connecticut Path Framingham.  
<http://www.absciex.com/Documents/Downloads/Literature/mass-spectrometry-TripleQuad-Pesticides-Testing-0701310.pdf> [13 de Abril de 2012].
- [37]Schultz, Melissa M.; Furlong, Edward T. (2008) "Trace Analysis of Antidepressant Pharmaceuticals and Their Select Degradates in Aquatic Matrixes by LC/ESI/MS/MS" *Analytical Chemistry*. Vol. 80, pp. 1756-1762.
- [38]Silva, Andréia P.; Alves, Miriam C. C. (2006) "Como Iniciar a validação de métodos analíticos" in *ENQUALAB*. São Paulo, Brasil 30 de Maio-1 de Junho.
- [39]SQTF-DC, INMLCF, I.P. (2012) "Procedimento operacional: validação de procedimentos de ensaio". Coimbra.
- [40]Swartz, Michael E. (2005) "Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC): An Introduction",  
<http://www.chromatographyonline.com/lcgc/data/articlestandard/lcgc/242005/164646/article.pdf> [13 de Abril de 2013].

- [41] TIAFT (1999) “Systematic Toxicological Analysis: Recommendations on Sample Collection” *Bulletin of the International Association of Forensic Toxicologists*. Vol. XXXIX (1), pp. 10-11.
- [42] Tiller, J.W.G. (1995) “The new antidepressants” *Australian Prescriber*. Vol. 18, pp. 92-96.
- [43] Udhaya, R.; Naidu, Petla. Y.; Reddy, A. R.; Sagar, T. V. (2012) “Validation of an UPLC-MS/MS method for simultaneous Quantification of two Selective Serotonin and nor Epinephrine Reuptake Inhibitors and one Selective Serotonin Reuptake Inhibitor in human plasma” *Der Pharma Chemica*. Vol. 4, pp. 1164-1173.
- [44] Wille, Sarah (2008) *Quantitative analysis of new generation antidepressants using gas chromatography-mass spectrometry. Applications in clinical and forensic toxicology*. Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas. Ghent University Faculty of Pharmaceutical Sciences.
- [45] Wille, Sarah M.R.; Maudens, Kristof E.; Van Peteghem, Carlos H.; Lambert, Willy E.E. (2005) “Development of a solid phase extraction for 13 ‘new’ generation antidepressants and their active metabolites for gas chromatographic-mass spectrometric analysis” *Journal of Chromatography A*. Vol. 1098, pp. 19-29.
- [46] Zhang, Mengliang; Gao, Feng; Cui, Xiangyong; Zhang, Yunhui; Sun, Yantong; Gu, Jingka (2011) “Development and Validation of an Improved Method for the Quantification of Sertraline in Human Plasma using LC-MS-MS and Its Application to Bioequivalence Studies” *Journal of Chromatographic Science*. Vol. 49, pp. 89-93.
- [47] “Effexor XR” *Wyeth Pharmaceuticals Inc.* Philadelphia. Rev 04/2004.
- [48] “Zoloft” *Pfizer Inc.* New York. Rev 12/2002.

# **A** nexos

**Tratamento de dados e resultados obtido na  
validação do método**



## **Eficiência de Extracção**





Estudo em sangue

<u>Sertralina - SG</u>		C/ ext.			S/ ext.			% RECUPERAÇÃO
Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel	Área (s)	Área (pi)	Arel		
20	6132	723929	0,0085	6259	473545	0,0132		
20	2905	333102	0,0087	2910	197364	0,0147		
20	1902	211073	0,0090	2126	144412	0,0147		
		<b>Média</b>	<b>0,0087</b>		<b>Média</b>	<b>0,0142</b>	<b>61,4 %</b>	
150	13450	168977	0,0796	15795	128336	0,1231		
150	14056	159298	0,0882	13133	122401	0,1073		
150	13208	159601	0,0828	13986	112165	0,1247		
		<b>Média</b>	<b>0,0835</b>		<b>Média</b>	<b>0,1184</b>	<b>70,6 %</b>	
500	37812	152992	0,2471	35367	93663	0,3776		
500	24387	104915	0,2324	30906	99996	0,3091		
500	53523	184117	0,2907	26078	90202	0,2891		
		<b>Média</b>	<b>0,2568</b>		<b>Média</b>	<b>0,3253</b>	<b>78,9 %</b>	
<u>Venlafaxina - SG</u>		C/ ext.			S/ ext.			% RECUPERAÇÃO
Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel	Área (s)	Área (pi)	Arel		
20	155122	823753	0,1883	137856	908416	0,1518		
20	145583	824631	0,1765	110996	702205	0,1581		
20	135855	945613	0,1437	103218	640713	0,1611		
		<b>Média</b>	<b>0,1695</b>		<b>Média</b>	<b>0,1570</b>	<b>108,0 %</b>	
150	598389	620994	0,9636	549487	1042663	1,0540		
150	585170	602383	0,9714	554021	586524	0,9446		
150	587378	622295	0,9439	559454	565254	0,9897		
		<b>Média</b>	<b>0,9596</b>		<b>Média</b>	<b>0,9961</b>	<b>96,3 %</b>	
500	1642052	682563	2,4057	1582866,5	567343,31	2,7900		
500	1349568	512882	2,6313	1421248,6	545520,81	2,6053		
500	1559955	661398	2,3586	1482499,5	543791	2,7262		
		<b>Média</b>	<b>2,4652</b>		<b>Média</b>	<b>2,7072</b>	<b>91,1 %</b>	
<u>Norsertalina - SG</u>		C/ ext.			S/ ext.			% RECUPERAÇÃO
Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel	Área (s)	Área (pi)	Arel		
20	3347	723929	0,0046	3641	473545	0,0077		
20	1587	333102	0,0048	1529	197364	0,0077		
20	982	211073	0,0047	1101	144412	0,0076		
		<b>Média</b>	<b>0,0047</b>		<b>Média</b>	<b>0,0077</b>	<b>60,9 %</b>	
150	7236	168977	0,0428	9426	128336	0,0735		
150	7696	159298	0,0483	8225	122401	0,0672		
150	6934	159601	0,0434	8913	112165	0,0795		
		<b>Média</b>	<b>0,0449</b>		<b>Média</b>	<b>0,0734</b>	<b>61,1 %</b>	
500	22463	152992	0,1468	26123	93663	0,2789		
500	12827	104915	0,1223	21871	99996	0,2187		
500	37874	184117	0,2057	14449	90202	0,1602		
		<b>Média</b>	<b>0,1583</b>		<b>Média</b>	<b>0,2193</b>	<b>72,2 %</b>	
<u>Desmetilvenlafaxina - SG</u>		C/ ext.			S/ ext.			% RECUPERAÇÃO
Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel	Área (s)	Área (pi)	Arel		
20	30178	823753	0,0366	27469	908416	0,0302		
20	27817	824631	0,0337	21736	702205	0,0310		
20	25241	945613	0,0267	19815	640713	0,0309		
		<b>Média</b>	<b>0,0324</b>		<b>Média</b>	<b>0,0307</b>	<b>105,4 %</b>	
150	118393	620994	0,1907	120809	1042663	0,2317		
150	119264	602383	0,1980	115694	586524	0,1973		
150	125465	622295	0,2016	119970	565254	0,2122		
		<b>Média</b>	<b>0,1968</b>		<b>Média</b>	<b>0,2137</b>	<b>92,1 %</b>	
500	320394	682563	0,4694	311951	567343	0,5498		
500	253091	512882	0,4935	280233	545521	0,5137		
500	302012	661398	0,4566	313039	543791	0,5757		
		<b>Média</b>	<b>0,4732</b>		<b>Média</b>	<b>0,5464</b>	<b>86,6 %</b>	

Estudo em urina.

<u>Sertralina - UR</u>		<u>C/ ext.</u>			<u>S/ ext.</u>			<u>% RECUPERAÇÃO</u>
Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel	Área (s)	Área (pi)	Arel		
20	54637	1018697	0,0536	58656	949249	0,0618		
20	51150	974736	0,0525	56738	908862	0,0624		
20	52390	1003408	0,0522	56795	887290	0,0640		
		<b>Média</b>	0,0528		<b>Média</b>	0,0627	<b>84,1 %</b>	
150	356249	958447	0,3717	416990	925126	0,4507		
150	354937	922990	0,3846	408195	892114	0,4576		
150	373575	909040	0,4110	405623	940751	0,4312		
		<b>Média</b>	0,3891		<b>Média</b>	0,4465	<b>87,1 %</b>	
500	1029227	1021095	1,0080	1214058	900918	1,3476		
500	988471	899639	1,0987	1147841	900641	1,2745		
500	1010457	897614	1,1257	1230495	929288	1,3241		
		<b>Média</b>	1,0775		<b>Média</b>	1,3154	<b>81,9 %</b>	
<u>Venlafaxina - UR</u>		<u>C/ ext.</u>			<u>S/ ext.</u>			<u>% RECUPERAÇÃO</u>
Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel	Área (s)	Área (pi)	Arel		
20	146361	1018697	0,1437	144786	949249	0,1525		
20	137738	974736	0,1413	136972	908862	0,1507		
20	130482	1003408	0,1300	135686	887290	0,1529		
		<b>Média</b>	0,1383		<b>Média</b>	0,1521	<b>91,0 %</b>	
150	824299	958447	0,8600	857535	925126	0,9269		
150	807532	922990	0,8749	829354	892114	0,9297		
150	825623	909040	0,9082	872198	940751	0,9271		
		<b>Média</b>	0,8811		<b>Média</b>	0,9279	<b>95,0 %</b>	
500	2261079	1021095	2,2144	2373488	900918	2,6345		
500	2168553	899639	2,4105	2356277	900641	2,6162		
500	2234156	897614	2,4890	2426459	929288	2,6111		
		<b>Média</b>	2,3713		<b>Média</b>	2,6206	<b>90,5 %</b>	
<u>Norsertalina - UR</u>		<u>C/ ext.</u>			<u>S/ ext.</u>			<u>% RECUPERAÇÃO</u>
Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel	Área (s)	Área (pi)	Arel		
20	30384	1018697	0,0298	33362	949249	0,0351		
20	29117	974736	0,0299	32599	908862	0,0359		
20	28961	1003408	0,0289	31287	887290	0,0353		
		<b>Média</b>	0,0295		<b>Média</b>	0,0354	<b>83,3 %</b>	
150	212042	958447	0,2212	247642	925126	0,2677		
150	206152	922990	0,2234	249585	892114	0,2798		
150	225781	909040	0,2484	253157	940751	0,2691		
		<b>Média</b>	0,2310		<b>Média</b>	0,2722	<b>84,9 %</b>	
500	633119	1021095	0,6200	760527	900918	0,8442		
500	637034	899639	0,7081	716018	900641	0,7950		
500	632075	897614	0,7042	804072	929288	0,8653		
		<b>Média</b>	0,6774		<b>Média</b>	0,8348	<b>81,1 %</b>	
<u>Desmetilvenlafaxina - UR</u>		<u>C/ ext.</u>			<u>S/ ext.</u>			<u>% RECUPERAÇÃO</u>
Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel	Área (s)	Área (pi)	Arel		
20	26408	1018697	0,0259	26606	949249	0,0280		
20	21696	974736	0,0223	24347	908862	0,0268		
20	21852	1003408	0,0218	23141	887290	0,0261		
		<b>Média</b>	0,0233		<b>Média</b>	0,0270	<b>86,5 %</b>	
150	105127	958447	0,1097	106991	925126	0,1157		
150	112897	922990	0,1223	114649	892114	0,1285		
150	110738	909040	0,1218	126136	940751	0,1341		
		<b>Média</b>	0,1179		<b>Média</b>	0,1261	<b>93,5 %</b>	
500	322477	1021095	0,3158	315603	900918	0,3503		
500	329780	899639	0,3666	302718	900641	0,3361		
500	302795	897614	0,3373	325751	929288	0,3505		
		<b>Média</b>	0,3399		<b>Média</b>	0,3457	<b>98,3 %</b>	

## **Limites de Detecção e de Quantificação**



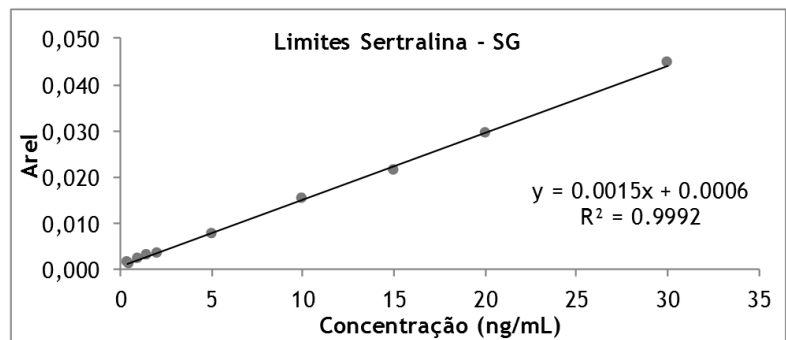
Estudo da sertralina, em sangue.

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel
0.4	473	351310	0.001
0.5	388	344922	0.001
1	636	286996	0.002
1.5	700	231582	0.003
2	679	195738	0.003
5	1492	191979	0.008
10	2235	144837	0.015
15	2930	137050	0.021
20	3792	128827	0.029
30	5264	117642	0.045

LD=	1,03
LQ=	3,11

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,999583029
Quadrado de R	0,999166232
Quadrado de R ajustado	0,999062011
Erro-padrão	0,000452531
Observações	10



ANOVA

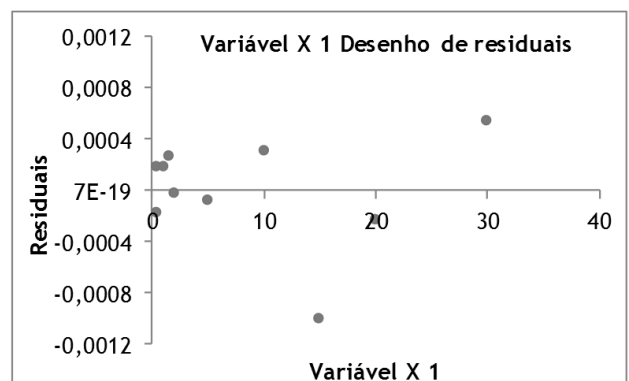
	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	0,001963265	0,001963265	9586,992463	1,32186E-13
Residual	8	1,63827E-06	2,04784E-07		
Total	9	0,001964903			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	0,000575233	0,000191224	3,00817016	0,016860476	0,000134271	0,001016196
Variável X 1	0,001454236	1,48523E-05	97,9131884	1,32186E-13	0,001419987	0,001488486

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Previsto Arel	Residuais
1	0,001156928	0,000189147
2	0,001302351	-0,000177588
3	0,002029469	0,000187132
4	0,002756588	0,000266561
5	0,003483706	-1,69967E-05
6	0,007846414	-7,22389E-05
7	0,015117596	0,000313241
8	0,022388777	-0,001007284
9	0,029659958	-0,000225739
10	0,044202321	0,000543766



Estudo da venlafaxina, em sangue.

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel
0.4	1458	351310	0.004
0.5	1414	344922	0.004
1	2814	286996	0.010
1.5	3526	231582	0.015
2	3515	195738	0.018
5	8450	191979	0.044
7	10692	158412	0.067
10	13979	144837	0.097
15	18222	137050	0.133
50	52261	117849	0.443

LD=	1,10
LQ=	3,32

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,999785516
Quadrado de R	0,999571078
Quadrado de R ajustado	0,999517463
Erro-padrão	0,002937957
Observações	10

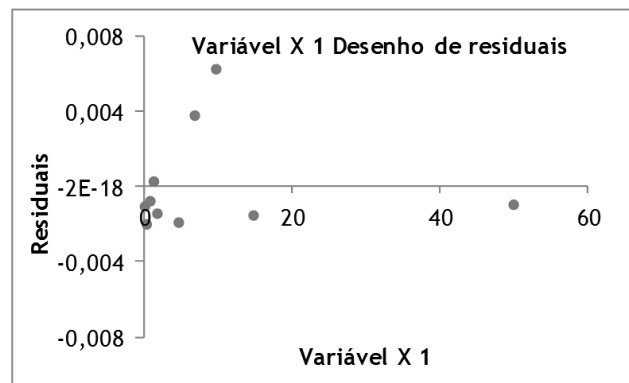
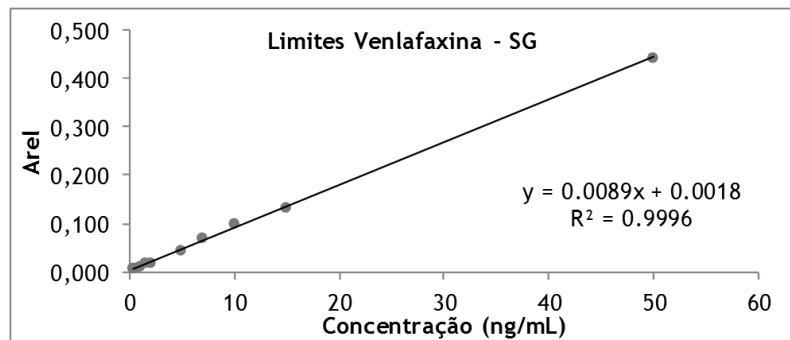
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	0,160922335	0,160922335	18643,41011	9,25648E-15
Residual	8	6,90527E-05	8,63159E-06		
Total	9	0,160991387			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	0,001759306	0,001105504	1,591406398	0,150182742	-0,000789991	0,004308604
Variável X 1	0,008853724	6,4843E-05	136,5408734	9,25648E-15	0,008704195	0,009003252

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Previsto Arel	Residuais
1	0,005300796	-0,001149761
2	0,006186168	-0,002087213
3	0,01061303	-0,00080854
4	0,015039892	0,00018636
5	0,019466754	-0,001509094
6	0,046027924	-0,002015092
7	0,063735371	0,003756923
8	0,090296542	0,006219182
9	0,13456516	-0,001607832
10	0,444445484	-0,000984933



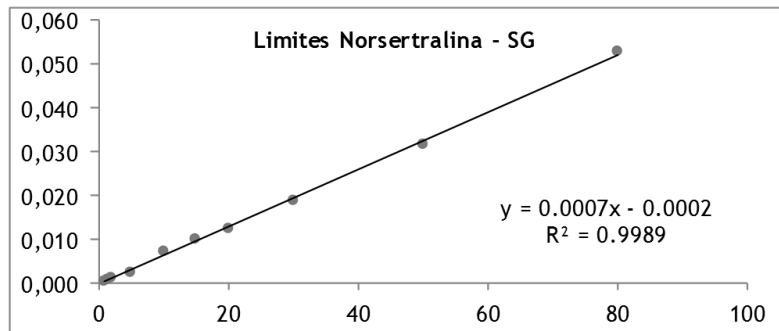
Estudo da norsertralina, em sangue.

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel
1	201	286996	0.001
1.5	181	231582	0.001
2	251	195738	0.001
5	506	191979	0.003
10	1051	144837	0.007
15	1392	137050	0.010
20	1591	128827	0.012
30	2212	117642	0.019
50	3759	117849	0.032
80	5418	102779	0.053

LD=	2,99
LQ=	9,05

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,999450159
Quadrado de R	0,998900621
Quadrado de R ajustado	0,998763199
Erro-padrão	0,000591657
Observações	10



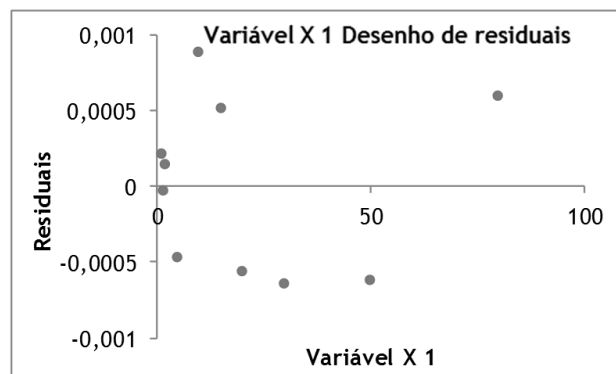
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	0,002544514	0,002544514	7268,836674	3,99612E-13
Residual	8	2,80046E-06	3,50058E-07		
Total	9	0,002547314			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	-0,000162351	0,000249092	-0,651769205	0,532823475	-0,000736758	0,000412057
Variável X 1	0,000653607	7,66628E-06	85,25747283	3,99612E-13	0,000635929	0,000671286

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Previsto Arel	Residuais
1	0,000491257	0,000210468
2	0,00081806	-3,45228E-05
3	0,001144864	0,00013692
4	0,003105686	-0,000471585
5	0,006373722	0,000884469
6	0,009641759	0,000514452
7	0,012909795	-0,000560485
8	0,019445868	-0,000643968
9	0,032518013	-0,000625087
10	0,052126231	0,000589337





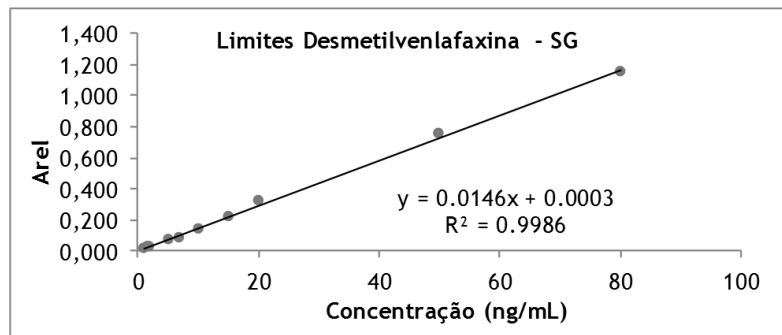
Estudo da desmetilvenlafaxina, em sangue.

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel
1	689	55613	0.012
1.5	929	41561	0.022
2	866	30332	0.029
5	2101	29859	0.070
7	2621	29940	0.088
10	3624	26916	0.135
15	5067	22989	0.220
20	6625	20863	0.318
50	14421	19194	0.751
80	20884	18186	1.148

LD=	3,44
LQ=	10,42

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,999281302
Quadrado de R	0,998563121
Quadrado de R ajustado	0,998383511
Erro-padrão	0,015189134
Observações	10



ANOVA

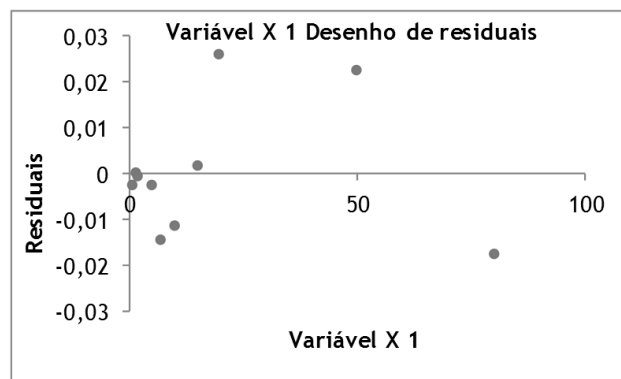
	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	1,282659309	1,282659309	5559,622202	1,16624E-12
Residual	8	0,001845678	0,00023071		
Total	9	1,284504987			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	0,000265027	0,006089412	0,04352253	0,96635171	-0,013777182	0,014307235
Variável X 1	0,014573781	0,000195456	74,56287415	1,16624E-12	0,014123058	0,015024504

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Previsto Arel	Residuais
1	0,014838808	-0,002455695
2	0,022125698	0,00023638
3	0,029412589	-0,000861239
4	0,073133933	-0,002776847
5	0,102281495	-0,014724653
6	0,146002839	-0,011346322
7	0,218871745	0,001549638
8	0,291740651	0,025799155
9	0,728954086	0,022378357
10	1,166167522	-0,017798774



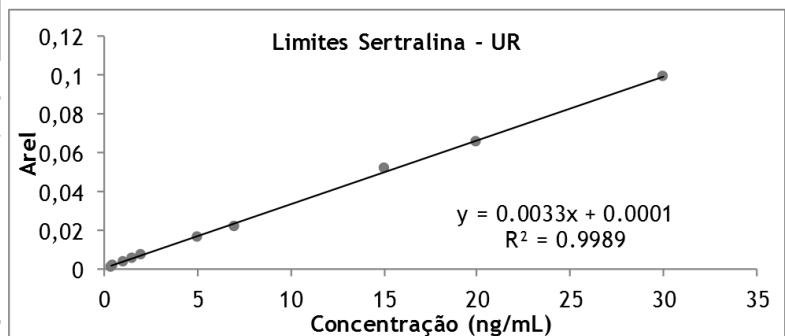
Estudo da sertralina, em urina.

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel
0.4	569	470349	0.001
0.5	726	409769	0.002
1	1251	384444	0.003
1.5	2084	360184	0.006
2	2298	320347	0.007
5	5115	312024	0.016
7	7113	330790	0.022
15	16273	311110	0.052
20	22132	336785	0.066
30	32667	329447	0.099

LD=	1,16
LQ=	3,52

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,999466329
Quadrado de R	0,998932942
Quadrado de R ajustado	0,99879956
Erro-padrão	0,001166142
Observações	10



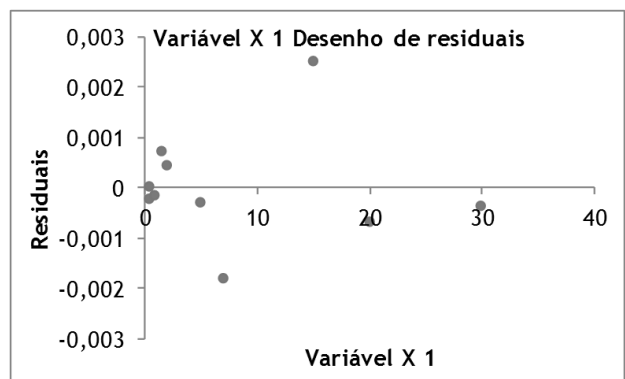
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	0,010184541	0,010184541	7489,249095	3,54647E-13
Residual	8	1,08791E-05	1,35989E-06		
Total	9	0,010195421			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	0,000124551	0,000485304	0,25664541	0,803929408	-0,000994561	0,001243663
Variável X 1	0,003313376	3,8287E-05	86,54044774	3,54647E-13	0,003225086	0,003401666

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Previsto Arel	Residuais
1	0,001449901	-0,000239799
2	0,001781239	-1,05101E-05
3	0,003437927	-0,000183592
4	0,005094615	0,000690916
5	0,006751303	0,00042289
6	0,01669143	-0,000297612
7	0,023318182	-0,001816537
8	0,049825189	0,002479688
9	0,066392069	-0,000677442
10	0,099525828	-0,000368001



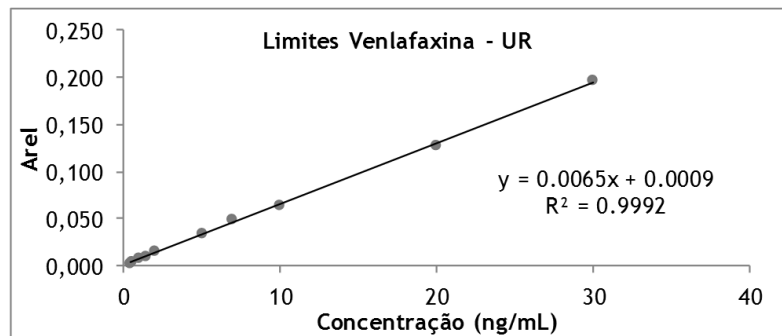
Estudo da venlafaxina, em urina.

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel
0.4	1173	470349	0.002
0.5	1561	409769	0.004
1	2811	384444	0.007
1.5	3800	360184	0.011
2	4706	320347	0.015
5	10749	312024	0.034
7	16373	330790	0.049
10	20861	328073	0.064
15	33384	311110	0.107
20	42940	336785	0.127
30	65002	329447	0.197

LD=	1,00
LQ=	3,04

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,999581831
Quadrado de R	0,999163837
Quadrado de R ajustado	0,999059316
Erro-padrão	0,001970132
Observações	10



ANOVA

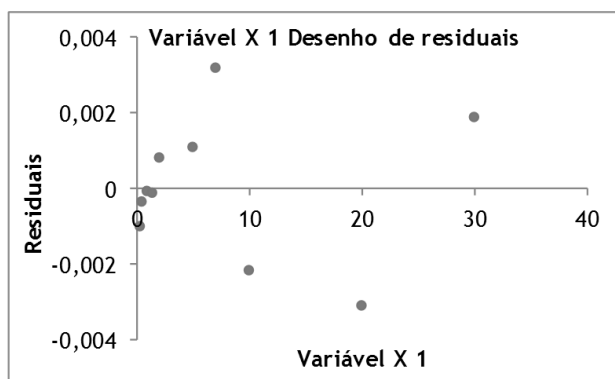
	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	0,03710448	0,03710448	9559,508462	1,33711E-13
Residual	8	3,10514E-05	3,88142E-06		
Total	9	0,037135532			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	0,000934068	0,00080722	1,157142585	0,280594367	-0,000927383	0,00279552
Variável X 1	0,006483883	6,63159E-05	97,77273885	1,33711E-13	0,006330958	0,006636807

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Previsto Arel	Residuais
1	0,003527621	-0,001033653
2	0,004176009	-0,000367679
3	0,007417951	-0,000107331
4	0,010659892	-0,000109025
5	0,013901834	0,000787748
6	0,033353482	0,001097361
7	0,046321247	0,003175022
8	0,065772896	-0,002186111
9	0,130611723	-0,003113177
10	0,19545055	0,001856845



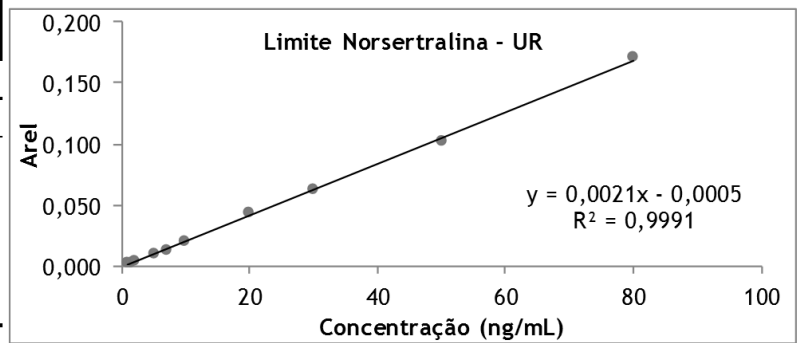
Estudo da norsertralina, em urina.

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel
1	1004	384444	0.003
1.5	1203	360184	0.003
2	1463	320347	0.005
5	3196	312024	0.010
7	4319	330790	0.013
10	6460	328073	0.020
20	14643	336785	0.043
30	20503	329447	0.062
50	35541	348975	0.102
80	59656	348822	0.171

LD=	2,75
LQ=	8,35

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,999544715
Quadrado de R	0,999089637
Quadrado de R ajustado	0,998975842
Erro-padrão	0,00176631
Observações	10



ANOVA

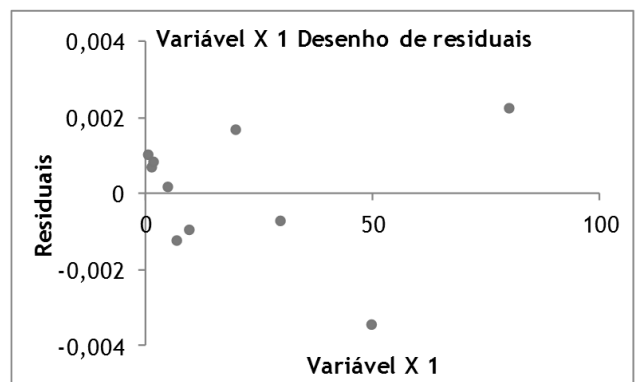
	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	0,027391385	0,027391385	8779,70791	1,87877E-13
Residual	8	2,49588E-05	3,11985E-06		
Total	9	0,027416344			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	-0,000489036	0,000727649	-0,672077186	0,520467969	-0,002166997	0,001188925
Variável X 1	0,002116103	2,25838E-05	93,70009557	1,87877E-13	0,002064025	0,002168182

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Previsto Arel	Residuais
1	0,001627067	0,000985403
2	0,002685119	0,000654103
3	0,003743171	0,000823074
4	0,010091481	0,000149945
5	0,014323687	-0,001267176
6	0,020671997	-0,000981766
7	0,04183303	0,001646672
8	0,062994064	-0,000760734
9	0,10531613	-0,003472524
10	0,16879923	0,002223003



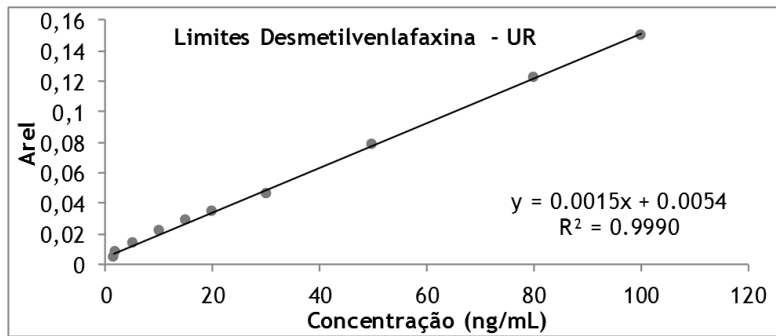
Estudo da desmetilvenlafaxina, em urina.

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel
1.5	1690	360184	0.005
2	2476	320347	0.008
5	4398	312024	0.014
10	7113	328073	0.022
15	8867	311110	0.029
20	11719	336785	0.035
30	15364	329447	0.047
50	27542	348975	0.079
80	42467	348822	0.122
100	50971	339029	0.150

LD=	3,77
LQ=	11,42

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,999514342
Quadrado de R	0,99902892
Quadrado de R ajustado	0,998907535
Erro-padrão	0,001659191
Observações	10



ANOVA

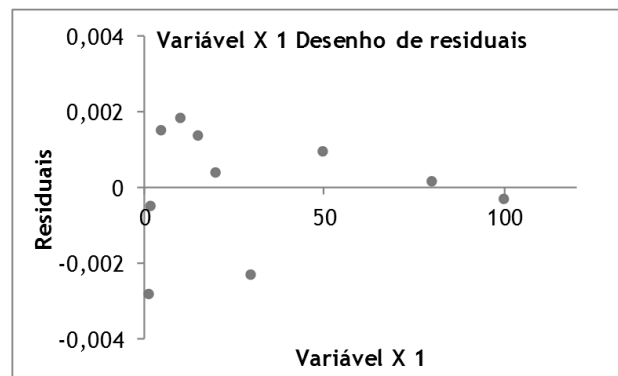
	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	0,022657159	0,022657159	8230,247204	2,43247E-13
Residual	8	2,20233E-05	2,75291E-06		
Total	9	0,022679182			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	0,005354434	0,000726287	7,372338357	7,82418E-05	0,003679613	0,007029255
VariávelX 1	0,001453258	1,6019E-05	90,72070989	2,43247E-13	0,001416318	0,001490198

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Previsto Arel	Residuais
1	0,007534322	-0,00284232
2	0,008260951	-0,000530346
3	0,012620726	0,001474442
4	0,019887018	0,001794513
5	0,02715331	0,00134695
6	0,034419602	0,000377635
7	0,048952186	-0,002316002
8	0,078017354	0,000904665
9	0,121615105	0,000127483
10	0,150680273	-0,000337019



# Linearidade

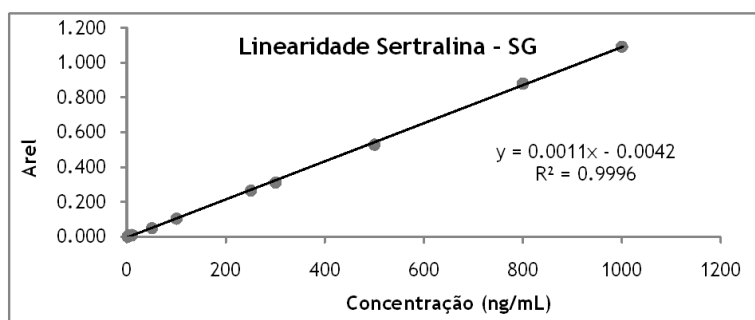


Estudo da sertralina, em sangue.

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel
1	141	76903	0.002
5	620	70127	0.009
10	681	77047	0.009
50	2843	55613	0.051
100	4376	41561	0.105
250	7972	29940	0.266
300	8420	26916	0.313
500	11056	20863	0.530
800	16003	18186	0.880
1000	18989	17361	1.094

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0.999824017
Quadrado de R	0.999648064
Quadrado de R ajustado	0.999604072
Erro-padrão	0.00776982
Observações	10



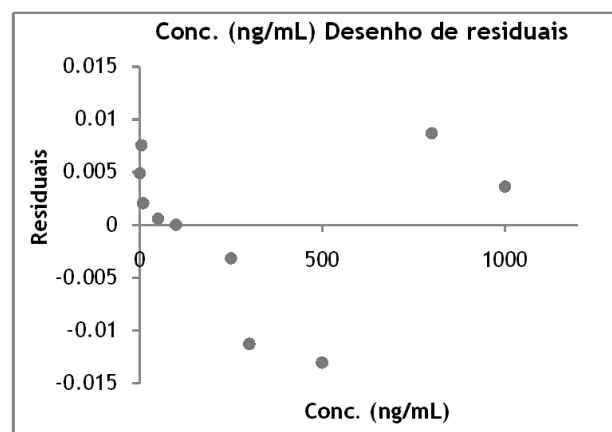
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	1.371815035	1.371815035	22723.41795	4.1954E-15
Residual	8	0.000482961	6.03701E-05		
Total	9	1.372297995			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	-0.004177104	0.003291035	-1.269237013	0.240034861	-0.011766245	0.003412037
Conc. (ng/mL)	0.001094335	7.25961E-06	150.7428869	4.1954E-15	0.001077594	0.001111075

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Previsto Arel	Residuais
1	-0.003082769	0.004914047
2	0.001294569	0.007540546
3	0.006766243	0.00207496
4	0.050539629	0.000579694
5	0.105256363	3.93121E-05
6	0.269406562	-0.003138571
7	0.324123296	-0.011294266
8	0.542990229	-0.013068247
9	0.871290628	0.0087088
10	1.090157561	0.003643724



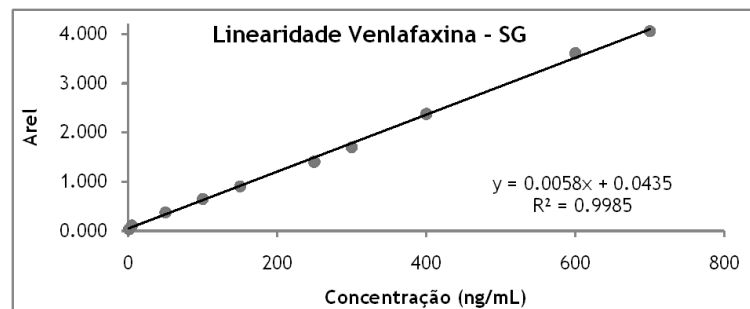


Estudo da venlafaxina, em sangue.

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel
1	2224	64980	0.034
5	6954	63680	0.109
50	21352	56801	0.376
100	34815	53531	0.650
150	42070	46556	0.904
250	59312	42354	1.400
300	76067	44729	1.701
400	104701	44121	2.373
600	134601	37333	3.605
700	160171	39444	4.061

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0.999231997
Quadrado de R	0.998464585
Quadrado de R ajustado	0.998272658
Erro-padrão	0.059137595
Observações	10



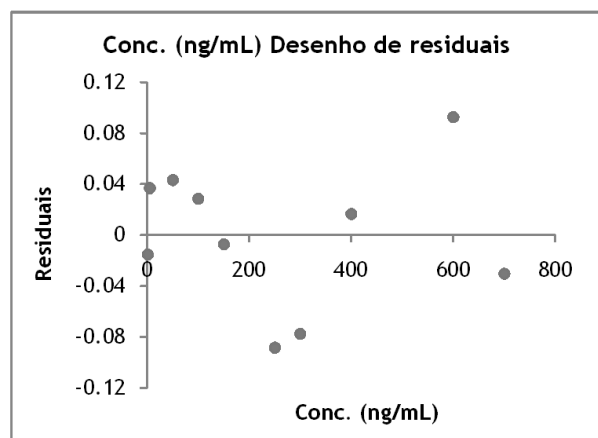
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	18.19382957	18.19382957	5202.316828	1.52065E-12
Residual	8	0.027978042	0.003497255		
Total	9	18.22180761			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	0.043473963	0.027740988	1.56713826	0.155717589	-0.020496869	0.107444796
Conc. (ng/mL)	0.005781997	8.0164E-05	72.12708803	1.52065E-12	0.005597138	0.005966855

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Previsto Arel	Residuais
1	0.04925596	-0.015035172
2	0.072383947	0.036823343
3	0.332573802	0.043325543
4	0.62167364	0.028699056
5	0.910773478	-0.007141976
6	1.488973155	-0.088581742
7	1.778072993	-0.077450537
8	2.35627267	0.016762812
9	3.512672024	0.092775677
10	4.0908717	-0.030177004



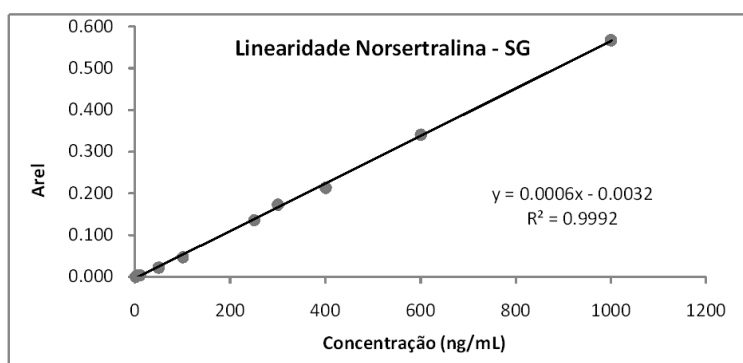
Estudo da norsertalina, em sangue.

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel
1	64	76903	0.001
5	282	70127	0.004
10	337	77047	0.004
50	1287	55613	0.023
100	2001	41561	0.048
250	4090	29940	0.137
300	4661	26916	0.173
400	4912	22989	0.214
600	7159	21005	0.341
1000	9852	17361	0.567

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

*Estatística de regressão*

R múltiplo	0.99962022
Quadrado de R	0.999240585
Quadrado de R ajustado	0.999145658
Erro-padrão	0.005395719
Observações	10



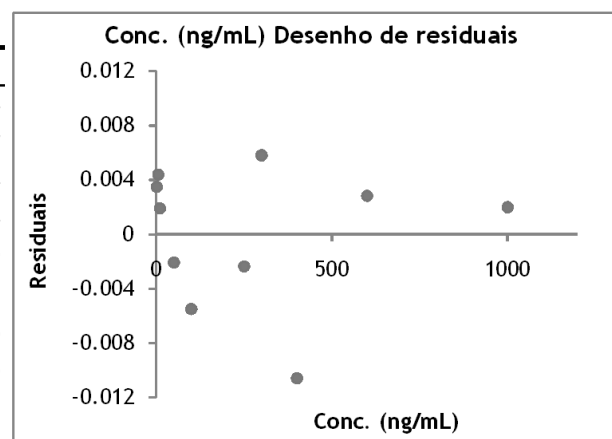
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	0.306464002	0.306464002	10526.42416	9.09718E-14
Residual	8	0.00023291	2.91138E-05		
Total	9	0.306696913			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	-0.003242557	0.002275543	-1.42495977	0.191991457	-0.008489967	0.002004854
Conc. (ng/mL)	0.000568734	5.5433E-06	102.5983634	9.09718E-14	0.000555951	0.000581517

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Previsto Arel	Residuais
1	-0.002673823	0.003501734
2	-0.000398887	0.004416927
3	0.002444784	0.001928814
4	0.025194144	-0.002053794
5	0.053630845	-0.005480959
6	0.138940946	-0.002340731
7	0.167377647	0.005792508
8	0.224251048	-0.010588946
9	0.33799785	0.002838815
10	0.565491455	0.00198563

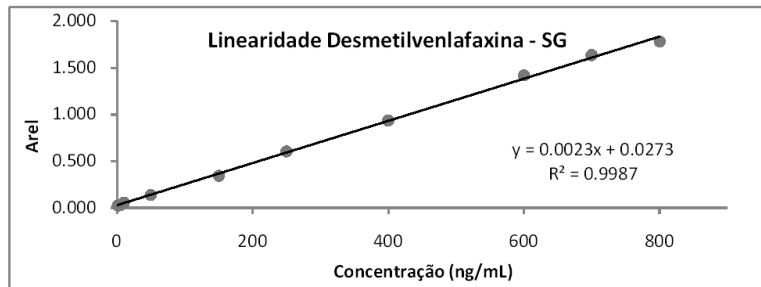


Estudo da desmetilvenlafaxina, em sangue.

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel
1	1561	64980	0.024
5	2054	63680	0.032
10	3212	58599	0.055
50	7928	56801	0.140
150	16055	46556	0.345
250	25705	42354	0.607
400	41216	44121	0.934
600	53035	37333	1.421
700	64459	39444	1.634
800	60256	33832	1.781

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0.999346115
Quadrado de R	0.998692658
Quadrado de R ajustado	0.998529241
Erro-padrão	0.026763729
Observações	10



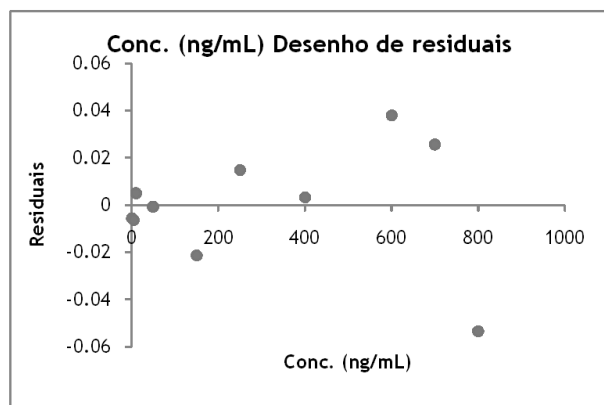
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	4.377498358	4.377498358	6111.28811	7.99175E-13
Residual	8	0.005730377	0.000716297		
Total	9	4.383228735			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	0.027257581	0.012044917	2.262994549	0.053471882	-0.000518047	0.055033209
Conc. (ng/mL)	0.002258874	2.88952E-05	78.17472808	7.99175E-13	0.002192242	0.002325507

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Previsto Arel	Residuais
1	0.029516455	-0.005487582
2	0.038551952	-0.00629292
3	0.049846322	0.004968954
4	0.140201287	-0.000619107
5	0.366088699	-0.021233781
6	0.591976111	0.014931153
7	0.930807229	0.003359626
8	1.382582053	0.038009751
9	1.608469465	0.025703284
10	1.834356877	-0.053339379

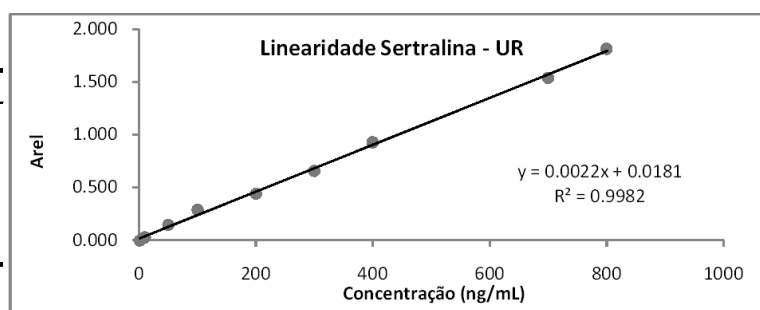


Estudo da sertralina, em urina.

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel
1	509	284956	0.002
5	4114	290939	0.014
10	7943	284606	0.028
50	43532	289519	0.150
100	82532	281386	0.293
200	117163	264137	0.444
300	159414	241086	0.661
400	230474	248305	0.928
700	418403	271351	1.542
800	505503	278538	1.815

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0.9991229
Quadrado de R	0.99824657
Quadrado de R ajustado	0.998027392
Erro-padrão	0.028943463
Observações	10



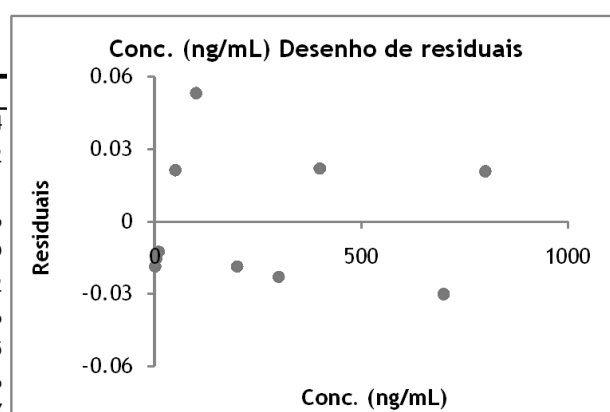
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	3.815402998	3.815402998	4554.486721	2.58652E-12
Residual	8	0.006701792	0.000837724		
Total	9	3.822104791			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	0.018082553	0.012450678	1.452334783	0.184473461	-0.010628762	0.046793869
Conc. (ng/mL)	0.002219966	3.28948E-05	67.48693741	2.58652E-12	0.002144111	0.002295821

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Previsto Arel	Residuais
1	0.020302519	-0.01851624
2	0.029182383	-0.015043642
3	0.040282213	-0.012373001
4	0.129080852	0.021278846
5	0.24007915	0.053227069
6	0.462075747	-0.018507332
7	0.684072345	-0.022839256
8	0.906068942	0.022120465
9	1.572058733	-0.030133996
10	1.79405533	0.020787087

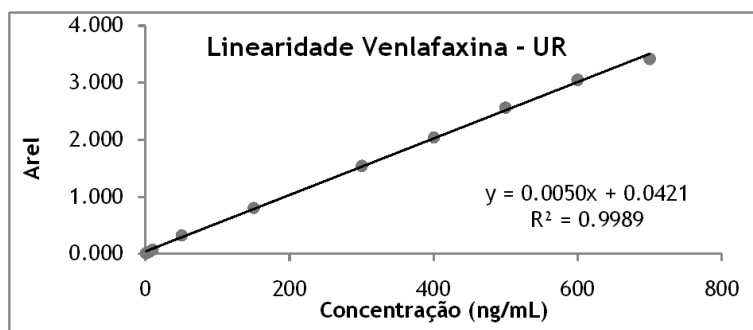


Estudo da venlafaxina, em urina.

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel
1	2549	284956	0.009
5	11191	290939	0.038
10	20052	284606	0.070
50	94433	289519	0.326
150	221299	274385	0.807
300	371329	241086	1.540
400	507925	248305	2.046
500	630778	245790	2.566
600	753705	247154	3.050
700	927126	271351	3.417

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0.999448861
Quadrado de R	0.998898025
Quadrado de R ajustado	0.998760278
Erro-padrão	0.046422393
Observações	10



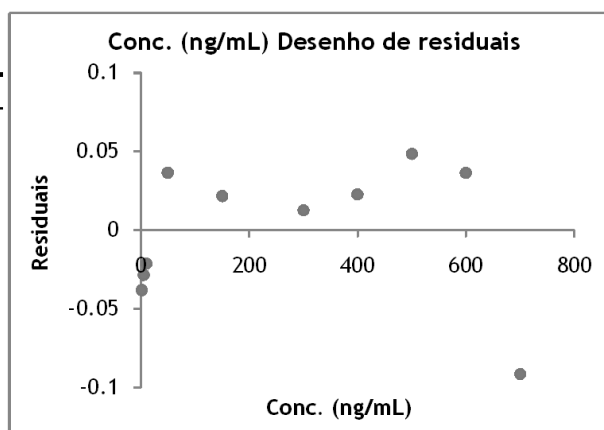
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	15.62767901	15.62767901	7251.693524	4.034E-13
Residual	8	0.017240308	0.002155039		
Total	9	15.64491932			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	0.042116631	0.021561162	1.953356291	0.086542195	-0.007603497	0.09183676
Conc. (ng/mL)	0.004951316	5.81435E-05	85.15687596	4.034E-13	0.004817237	0.005085395

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Previsto Arel	Residuais
1	0.047067947	-0.038121509
2	0.066873211	-0.028407421
3	0.09162979	-0.021176196
4	0.289682426	0.036488838
5	0.784814016	0.021714501
6	1.527511401	0.012725749
7	2.022642991	0.022921251
8	2.517774581	0.04855452
9	3.012906171	0.036633691
10	3.508037761	-0.091333422

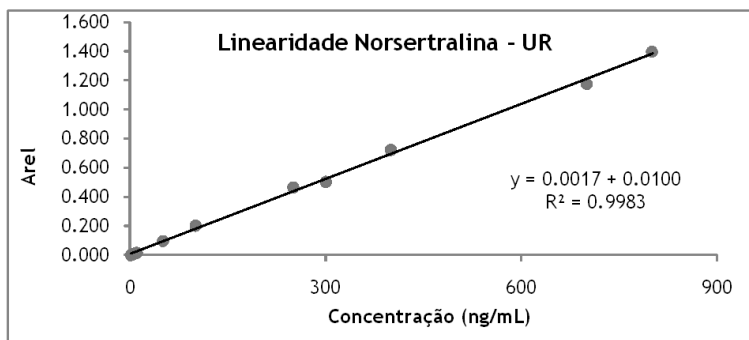


Estudo da norsesralina, em urina.

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel
1	230	284956	0.001
5	2356	290939	0.008
10	4963	284606	0.017
50	28293	289519	0.098
100	56780	281386	0.202
250	116791	251496	0.464
300	121159	241086	0.503
400	179359	248305	0.722
700	319535	271351	1.178
800	389681	278538	1.399

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0.999134349
Quadrado de R	0.998269447
Quadrado de R ajustado	0.998053128
Erro-padrão	0.022189585
Observações	10



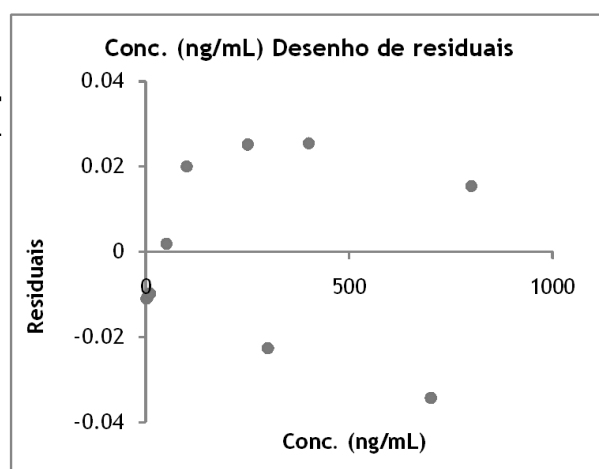
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	2.272224313	2.272224313	4614.799588	2.45414E-12
Residual	8	0.003939021	0.000492378		
Total	9	2.276163334			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	0.010014812	0.009641268	1.038744299	0.329297121	-0.012217991	0.032247615
Conc. (ng/mL)	0.00171696	2.52746E-05	67.93231623	2.45414E-12	0.001658677	0.001775244

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Previsto Arel	Residuais
1	0.011731772	-0.01092576
2	0.018599614	-0.010500622
3	0.027184416	-0.00974608
4	0.09586283	0.001860059
5	0.181710849	0.020075939
6	0.439254903	0.025130157
7	0.525102922	-0.022548492
8	0.696798958	0.025533069
9	1.211887068	-0.03431689
10	1.383583104	0.015438621

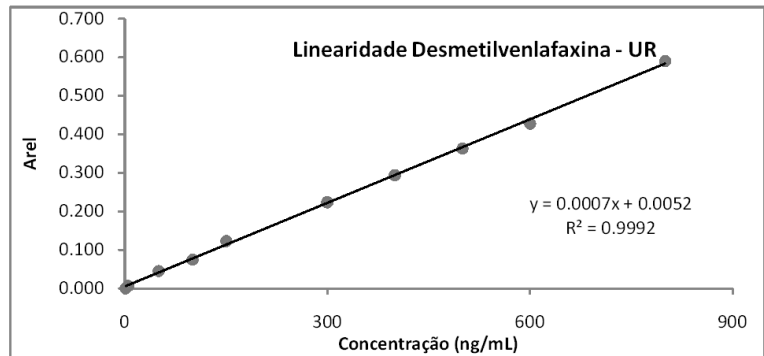


Estudo da desmetilvenlafaxina, em urina.

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (pi)	Arel
1	273	284956	0.001
5	2028	290939	0.007
50	13171	289519	0.045
100	21205	281386	0.075
150	33631	274385	0.123
300	53946	241086	0.224
400	73173	248305	0.295
500	89443	245790	0.364
600	105915	247154	0.429
800	164579	278538	0.591

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0.999581742
Quadrado de R	0.999163658
Quadrado de R ajustado	0.999059115
Erro-padrão	0.006146153
Observações	10



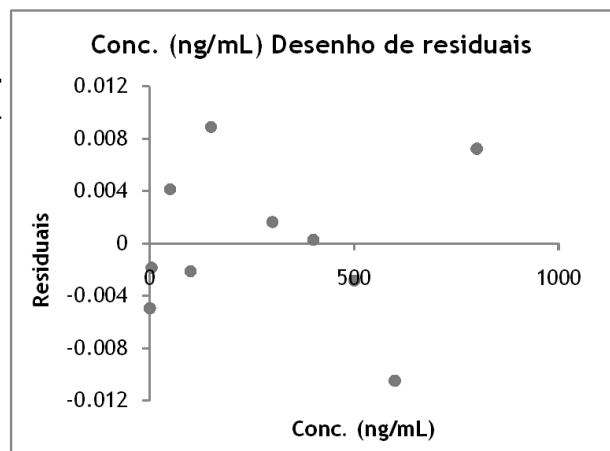
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	0.361035188	0.361035188	9557.46538	1.33826E-13
Residual	8	0.000302202	3.77752E-05		
Total	9	0.36133739			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	0.005186958	0.002897785	1.789973499	0.111244026	-0.001495346	0.011869261
Conc. (ng/mL)	0.000723069	7.39619E-06	97.76229018	1.33826E-13	0.000706013	0.000740124

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Previsto Arel	Residuais
1	0.005910026	-0.004952184
2	0.008802301	-0.00183156
3	0.041340395	0.004154028
4	0.077493832	-0.002134598
5	0.11364727	0.008920305
6	0.222107582	0.001654098
7	0.294414457	0.000275374
8	0.366721332	-0.002820808
9	0.439028206	-0.010487856
10	0.583641956	0.007223202



## **Repetibilidade**





Estudo em sangue.

SERTRALINA							VENLAFAXINA						
	Repetib_TRR			Repetib_Áreas				Repetib_TRR			Repetib_Áreas		
	TR (min)	TR pi (min)	TRR	Área	Área pi	A/Api		TR (min)	TR pi (min)	TRR	Área	Área pi	A/Api
50 ng/mL	3,89	1,38	2,819	39269	992796	0,079	50 ng/mL	1,71	1,38	1,239	474371	992796	0,956
	3,88	1,38	2,812	30455	773536	0,079		1,7	1,38	1,232	361069	773536	0,934
	3,89	1,39	2,799	27863	719718	0,077		1,72	1,39	1,237	337438	719718	0,938
	3,89	1,39	2,799	11960	301754	0,079		1,73	1,39	1,245	120291	301754	0,797
	3,88	1,37	2,832	23345	656507	0,071		1,7	1,37	1,241	329295	656507	1,003
	Média	2,812		Média	0,077			Média	1,239		Média	0,925	
	Desv. pad. (s)	0,014	Desv. pad. (s)	0,003			Desv. pad. (s)	0,005	Desv. pad. (s)	0,077			
	CV (%)	0,5	CV (%)	4,5			CV (%)	0,4	CV (%)	8,3			
200 ng/mL	3,88	1,38	2,812	75611	960958	0,079	200 ng/mL	1,7	1,38	1,232	951651	960958	0,990
	3,88	1,38	2,812	64804	857239	0,076		1,71	1,38	1,239	742175	857239	0,866
	3,88	1,37	2,832	50064	681338	0,073		1,71	1,37	1,248	647693	681338	0,951
	3,88	1,37	2,832	55356	667964	0,083		1,69	1,37	1,234	649238	667964	0,972
	3,88	1,38	2,812	64710	717639	0,090		1,71	1,38	1,239	669120	717639	0,932
	Média	2,820		Média	0,080			Média	1,238		Média	0,942	
	Desv. pad. (s)	0,011	Desv. pad. (s)	0,007			Desv. pad. (s)	0,006	Desv. pad. (s)	0,048			
	CV (%)	0,4	CV (%)	8,3			CV (%)	0,5	CV (%)	5,1			
500 ng/mL	3,87	1,37	2,825	160856	948487	0,170	500 ng/mL	1,69	1,37	1,234	2247548	948487	2,370
	3,88	1,38	2,812	129484	752000	0,172		1,7	1,38	1,232	1666050	752000	2,215
	3,88	1,39	2,791	130321	721497	0,181		1,7	1,39	1,223	1602313	721497	2,221
	3,85	1,37	2,810	105416	628821	0,168		1,69	1,37	1,234	1448940	628821	2,304
	3,87	1,37	2,825	122637	689359	0,178		1,69	1,37	1,234	1556771	689359	2,258
	Média	2,813		Média	0,174			Média	1,231		Média	2,274	
	Desv. pad. (s)	0,014	Desv. pad. (s)	0,006			Desv. pad. (s)	0,005	Desv. pad. (s)	0,064			
	CV (%)	0,5	CV (%)	3,2			CV (%)	0,4	CV (%)	2,8			
NORSERTRALINA							DESMETILVENLAFAXINA						
	Repetib_TRR			Repetib_Áreas				Repetib_TRR			Repetib_Áreas		
	TR (min)	TR pi (min)	TRR	Área	Área pi	A/Api		TR (min)	TR pi (min)	TRR	Área	Área pi	A/Api
50 ng/mL	3,76	1,38	2,725	16979	992796	0,034	50 ng/mL	0,78	1,38	0,565	82743	992796	0,167
	3,76	1,38	2,725	11998	773536	0,031		0,78	1,38	0,565	65835	773536	0,170
	3,77	1,39	2,712	11198	719718	0,031		0,78	1,39	0,561	60997	719718	0,170
	3,76	1,39	2,705	5493	301754	0,036		0,78	1,39	0,561	21654	301754	0,144
	3,75	1,37	2,737	9172	656507	0,028		0,77	1,37	0,562	54847	656507	0,167
	Média	2,721		Média	0,032			Média	0,563		Média	0,163	
	Desv. pad. (s)	0,012	Desv. pad. (s)	0,003			Desv. pad. (s)	0,002	Desv. pad. (s)	0,011			
	CV (%)	0,5	CV (%)	10,1			CV (%)	0,4	CV (%)	6,9			
200 ng/mL	3,76	1,35	2,785	30248	960958	0,031	200 ng/mL	0,77	1,38	0,558	164118	960958	0,171
	3,76	1,35	2,785	24843	857239	0,029		0,77	1,38	0,558	141761	857239	0,165
	3,76	1,35	2,785	22276	681338	0,033		0,77	1,37	0,562	120473	681338	0,177
	3,75	1,34	2,799	18901	667964	0,028		0,78	1,37	0,569	115034	667964	0,172
	3,76	1,34	2,806	20624	717639	0,029		0,77	1,38	0,558	130955	717639	0,182
	Média	2,792		Média	0,030			Média	0,561		Média	0,174	
	Desv. pad. (s)	0,010	Desv. pad. (s)	0,002			Desv. pad. (s)	0,005	Desv. pad. (s)	0,006			
	CV (%)	0,3	CV (%)	6,4			CV (%)	0,9	CV (%)	3,7			
500 ng/mL	3,74	1,37	2,730	65390	948487	0,069	500 ng/mL	0,77	1,37	0,562	401250	948487	0,423
	3,75	1,38	2,717	49610	752000	0,066		0,78	1,38	0,565	324628	752000	0,432
	3,75	1,39	2,698	50030	721497	0,069		0,77	1,39	0,554	299037	721497	0,414
	3,73	1,37	2,723	40199	628821	0,064		0,78	1,37	0,569	263553	628821	0,419
	3,74	1,37	2,730	46939	689359	0,068		0,77	1,37	0,562	277745	689359	0,403
	Média	2,720		Média	0,067			Média	0,563		Média	0,418	
	Desv. pad. (s)	0,013	Desv. pad. (s)	0,002			Desv. pad. (s)	0,006	Desv. pad. (s)	0,011			
	CV (%)	0,5	CV (%)	3,4			CV (%)	1,0	CV (%)	2,5			

Estudo em urina.

SERTRALINA - UR							VENLAFAXINA - UR						
	Repetib_TRR			Repetib_Áreas				Repetib_TRR			Repetib_Áreas		
	TR (min)	TR pi (min)	TRR	Área	Área pi	A/Api		TR (min)	TR pi (min)	TRR	Área	Área pi	A/Api
50 ng/mL	3,92	1,42	2,761	51871	303021	0,171	50 ng/mL	1,75	1,42	1,232	85422	303021	0,282
	3,93	1,42	2,768	45945	255708	0,180		1,75	1,42	1,232	77759	255708	0,304
	3,92	1,41	2,780	43434	240610	0,181		1,75	1,41	1,241	73164	240610	0,304
	3,92	1,42	2,761	36833	224490	0,164		1,75	1,42	1,232	56494	224490	0,252
	3,92	1,41	2,780	32655	196379	0,166		1,75	1,41	1,241	52216	196379	0,266
		Média	2,770		Média	0,172			Média	1,236		Média	0,282
	Desv. pad. (s)	0,010		Desv. pad. (s)	0,008		Desv. pad. (s)	0,005		Desv. pad. (s)	0,023		
	CV (%)	0,4		CV (%)	4,4		CV (%)	0,4		CV (%)	8,2		
200 ng/mL	3,9	1,43	2,727	171871	308155	0,558	200 ng/mL	1,76	1,43	1,231	302972	308155	0,983
	3,91	1,43	2,734	164888	283677	0,581		1,76	1,43	1,231	294164	283677	1,037
	3,91	1,41	2,773	161723	269523	0,600		1,75	1,41	1,241	286103	269523	1,062
	3,91	1,41	2,773	141469	240295	0,589		1,75	1,41	1,241	215129	240295	0,895
	3,91	1,41	2,773	135867	250036	0,543		1,75	1,41	1,241	221201	250036	0,885
		Média	2,756		Média	0,574			Média	1,237		Média	0,972
	Desv. pad. (s)	0,023		Desv. pad. (s)	0,023		Desv. pad. (s)	0,006		Desv. pad. (s)	0,080		
	CV (%)	0,8		CV (%)	4,0		CV (%)	0,5		CV (%)	8,3		
500 ng/mL	3,9	1,41	2,766	351324	337795	1,040	500 ng/mL	1,74	1,41	1,234	632952	337795	1,874
	3,9	1,41	2,766	341267	314691	1,084		1,74	1,41	1,234	614726	314691	1,953
	3,9	1,43	2,727	352673	322508	1,094		1,74	1,43	1,217	604063	322508	1,873
	3,9	1,41	2,766	329332	290192	1,135		1,73	1,41	1,227	552063	290192	1,902
	3,9	1,41	2,766	334920	282256	1,187		1,74	1,41	1,234	570061	282256	2,020
		Média	2,758		Média	1,108			Média	1,229		Média	1,924
	Desv. pad. (s)	0,017		Desv. pad. (s)	0,055		Desv. pad. (s)	0,008		Desv. pad. (s)	0,062		
	CV (%)	0,6		CV (%)	5,0		CV (%)	0,6		CV (%)	3,2		
NORSERTRALINA - UR							DESMETILVENLAFAXINA - UR						
	Repetib_TRR			Repetib_Áreas				Repetib_TRR			Repetib_Áreas		
	TR (min)	TR pi (min)	TRR	Área	Área pi	A/Api		TR (min)	TR pi (min)	TRR	Área	Área pi	A/Api
50 ng/mL	3,79	1,42	2,669	27814	303021	0,092	50 ng/mL	0,88	1,42	0,620	20810	303021	0,069
	3,8	1,42	2,676	23663	255708	0,093		0,88	1,42	0,620	16683	255708	0,065
	3,79	1,41	2,688	22774	240610	0,095		0,87	1,41	0,617	15448	240610	0,064
	3,78	1,42	2,662	17769	224490	0,079		0,88	1,42	0,620	12546	224490	0,056
	3,78	1,41	2,681	14808	196379	0,075		0,85	1,41	0,603	9806	196379	0,050
		Média	2,675		Média	0,087			Média	0,616		Média	0,061
	Desv. pad. (s)	0,010		Desv. pad. (s)	0,009		Desv. pad. (s)	0,007		Desv. pad. (s)	0,008		
	CV (%)	0,4		CV (%)	10,1		CV (%)	1,2		CV (%)	12,6		
200 ng/mL	3,77	1,43	2,636	104128	308155	0,338	200 ng/mL	0,86	1,43	0,601	58978	308155	0,191
	3,78	1,43	2,643	101684	283677	0,358		0,89	1,43	0,622	58870	283677	0,208
	3,77	1,41	2,674	100820	269523	0,374		0,86	1,41	0,610	55577	269523	0,206
	3,78	1,41	2,681	76290	240295	0,317		0,85	1,41	0,603	41897	240295	0,174
	3,78	1,41	2,681	72623	250036	0,290		0,88	1,41	0,624	46299	250036	0,185
		Média	2,663		Média	0,336			Média	0,612		Média	0,193
	Desv. pad. (s)	0,021		Desv. pad. (s)	0,033		Desv. pad. (s)	0,011		Desv. pad. (s)	0,014		
	CV (%)	0,8		CV (%)	9,9		CV (%)	1,7		CV (%)	7,3		
500 ng/mL	3,77	1,41	2,674	203932	337795	0,604	500 ng/mL	0,86	1,41	0,610	119332	337795	0,353
	3,77	1,41	2,674	208727	314691	0,663		0,87	1,41	0,617	129066	314691	0,410
	3,77	1,43	2,636	208068	322508	0,645		0,9	1,43	0,629	145163	322508	0,450
	3,77	1,41	2,674	193637	290192	0,667		0,87	1,41	0,617	114151	290192	0,393
	3,77	1,41	2,674	198080	282256	0,702		0,89	1,41	0,631	126849	282256	0,449
		Média	2,666		Média	0,656			Média	0,621		Média	0,411
	Desv. pad. (s)	0,017		Desv. pad. (s)	0,036		Desv. pad. (s)	0,009		Desv. pad. (s)	0,041		
	CV (%)	0,6		CV (%)	5,5		CV (%)	1,5		CV (%)	9,9		

## **Precisão Intermédia**



Estudo para a sertralina, em sangue.

Data	1º DIA (06.03.13)	2º DIA (07.03.13)	3º DIA (08.03.13)	4º DIA (13.03.13)	5º DIA (15.03.13)
R <sup>2</sup>	0,9921	0,9935	0,9962	0,9914	0,9993
Declive	0,0016	0,0013	0,0004	0,0005	0,0002
Y0	-0,0301	-0,0312	0,0036	-0,0040	0,0117
<b>Gama Baixa 50 ng/mL</b>					
Replicado 1	50,9	48,8	50,7	50,7	50,4
Replicado 2	51,1	51,5	49,8	49,7	50,4
Replicado 3	50,7	48,7	49,9	49,9	51,1
Média	50,9	49,7	50,1	50,1	50,6
Recuperação	101,8	99,3	100,3	100,2	101,3
Concenc. Média	50,3				
Recuperação Média	100,6				
Repetibilidade (S <sub>r</sub> )	0,8				
Between Run (S <sub>run</sub> )	0,2				
Precisão intermédia	0,8				
C.V (%)	1,0				
<b>Gama Média 200 ng/mL</b>					
Replicado 1	196,3	193,8	204,0	204,2	204,4
Replicado 2	203,5	187,4	202,2	193,0	202,9
Replicado 3	200,9	202,9	208,4	197,3	202,2
Média	200,2	194,7	204,9	198,2	203,2
Recuperação	100,1	97,3	102,4	99,1	101,6
Concenc. Média	200,2				
Recuperação Média	100,1				
Repetibilidade (S <sub>r</sub> )	4,8				
Between Run (S <sub>run</sub> )	2,9				
Precisão intermédia	5,6				
C.V (%)	2,0				
<b>Gama Alta 500 ng/mL</b>					
Replicado 1	496,1	516,0	481,0	499,4	500,9
Replicado 2	499,1	514,6	486,9	497,6	502,2
Replicado 3	498,4	507,9	493,8	501,2	497,9
Média	497,9	512,9	487,2	499,4	500,3
Recuperação	99,6	102,6	97,4	99,9	100,1
Concenc. Média	499,5				
Recuperação Média	99,9				
Repetibilidade (S <sub>r</sub> )	3,8				
Between Run (S <sub>run</sub> )	8,8				
Precisão intermédia	9,6				
C.V (%)	1,8				
C.Vpool	1,7				

## Estudo para a venlafaxina, em sangue.

Data	1º DIA (06.03.13)	2º DIA (07.03.13)	3º DIA (08.03.13)	4º DIA (13.03.13)	5º DIA (15.03.13)
R <sup>2</sup>	0,9976	0,9969	0,9958	0,9929	0,9905
Declive	0,0044	0,0051	0,0045	0,0053	0,0053
Y0	0,1788	0,1338	0,0444	0,0618	-0,0165
<b>Gama Baixa 50 ng/mL</b>					
Replicado 1	51,2	50,4	48,1	48,9	50,3
Replicado 2	48,8	51,6	46,8	47,2	50,0
Replicado 3	50,7	43,7	47,1	49,7	50,7
Média	50,3	48,6	47,3	48,6	50,3
Recuperação	100,5	97,2	94,6	97,2	100,7
Concenc. Média	49,0				
Recuperação Média	98,0				
Repetibilidade (S <sub>r</sub> )	2,1				
Between Run (S <sub>run</sub> )	0,4				
Precisão intermediária	2,1				
C.V (%)	2,6				
<b>Gama Média 200 ng/mL</b>					
Replicado 1	201,5	203,2	209,7	200,1	216,4
Replicado 2	199,5	199,8	200,9	198,8	216,1
Replicado 3	202,8	217,0	205,7	199,6	209,6
Média	201,3	206,7	205,4	199,5	214,0
Recuperação	100,6	103,3	102,7	99,7	107,0
Concenc. Média	205,4				
Recuperação Média	102,7				
Repetibilidade (S <sub>r</sub> )	4,9				
Between Run (S <sub>run</sub> )	4,9				
Precisão intermediária	6,9				
C.V (%)	2,8				
<b>Gama Alta 500 ng/mL</b>					
Replicado 1	479,2	496,4	481,4	504,7	500,1
Replicado 2	506,7	515,3	482,6	502,3	502,1
Replicado 3	503,3	508,1	501,1	505,5	498,7
Média	496,4	506,6	488,3	504,2	500,3
Recuperação	99,3	101,3	97,7	100,8	100,1
Concenc. Média	499,2				
Recuperação Média	99,8				
Repetibilidade (S <sub>r</sub> )	9,4				
Between Run (S <sub>run</sub> )	4,7				
Precisão intermediária	10,5				
C.V (%)	1,4				
C.V pool	2,3				

## Estudo para a norsertalina, em sangue.

Data	1º DIA (06.03.13)	2º DIA (07.03.13)	3º DIA (08.03.13)	4º DIA (13.03.13)	5º DIA (15.03.13)
R <sup>2</sup>	0,9985	0,9964	0,9924	0,9922	0,9982
Declive	0,0004	0,0005	0,0001	0,0002	0,0001
Y0	-0,0069	-0,0103	0,0019	-0,0018	0,0030
<b>Gama Baixa 50 ng/mL</b>					
Replicado 1	48,0	46,4	52,4	52,3	51,4
Replicado 2	48,7	44,4	52,6	51,8	50,2
Replicado 3	49,9	46,3	50,5	52,9	50,3
Média	48,9	45,7	51,8	52,3	50,6
Recuperação	97,7	91,4	103,6	104,7	101,2
Concenc. Média	49,9				
Recuperação Média	99,7				
Repetibilidade (S <sub>r</sub> )	0,9				
Between Run (S <sub>run</sub> )	2,6				
Precisão intermédia	2,8				
C.V (%)	5,4				
<b>Gama Média 200 ng/mL</b>					
Replicado 1	205,5	193,0	208,4	179,1	193,1
Replicado 2	199,9	194,1	203,1	175,6	194,4
Replicado 3	198,5	205,8	206,5	194,8	193,8
Média	201,3	197,6	206,0	183,1	193,8
Recuperação	100,6	98,8	103,0	91,6	96,9
Concenc. Média	196,4				
Recuperação Média	98,2				
Repetibilidade (S <sub>r</sub> )	6,0				
Between Run (S <sub>run</sub> )	8,0				
Precisão intermédia	9,9				
C.V (%)	4,4				
<b>Gama Alta 500 ng/mL</b>					
Replicado 1	504,7	500,6	505,4	501,9	495,2
Replicado 2	506,2	527,0	499,9	503,8	496,7
Replicado 3	506,8	522,4	509,0	505,5	498,5
Média	505,9	516,7	504,8	503,7	496,8
Recuperação	101,2	103,3	101,0	100,7	99,4
Concenc. Média	505,6				
Recuperação Média	101,1				
Repetibilidade (S <sub>r</sub> )	6,7				
Between Run (S <sub>run</sub> )	6,0				
Precisão intermédia	9,0				
C.V (%)	1,4				
C.V pool	4,1				



**Estudo** para a desmetilvenlafaxina, em sangue.

Data	1º DIA (06.03.13)	2º DIA (07.03.13)	3º DIA (08.03.13)	4º DIA (13.03.13)	5º DIA (15.03.13)
R <sup>2</sup>	0,9985	0,9933	0,9977	0,9927	0,9912
Declive	0,0010	0,0011	0,0008	0,0009	0,0015
Y0	0,0332	0,0520	0,0059	0,0111	-0,0205
<b>Gama Baixa 50 ng/mL</b>					
Replicado 1	46,3	45,1	47,1	47,9	50,8
Replicado 2	46,0	49,2	48,1	44,3	50,7
Replicado 3	51,0	46,1	47,9	51,3	50,9
Média	47,8	46,8	47,7	47,9	50,8
Recuperação	95,5	93,6	95,4	95,7	101,6
Concenc. Média	48,2				
Recuperação Média	96,4				
Repetibilidade (S <sub>r</sub> )	2,2				
Between Run (S <sub>r,un</sub> )	0,8				
Precisão intermédia	2,4				
C.V (%)	3,2				
<b>Gama Média 200 ng/mL</b>					
Replicado 1	206,1	205,1	200,4	213,7	204,1
Replicado 2	200,7	203,0	207,7	202,8	200,1
Replicado 3	194,0	219,0	202,1	202,1	199,3
Média	200,3	209,0	203,4	206,2	201,2
Recuperação	100,1	104,5	101,7	103,1	100,6
Concenc. Média	204,0				
Recuperação Média	102,0				
Repetibilidade (S <sub>r</sub> )	5,9				
Between Run (S <sub>r,un</sub> )	1,2				
Precisão intermédia	6,0				
C.V (%)	1,8				
<b>Gama Alta 500 ng/mL</b>					
Replicado 1	500,4	525,2	496,4	502,1	500,0
Replicado 2	493,8	499,7	502,1	503,9	499,3
Replicado 3	508,9	511,6	482,4	511,0	501,0
Média	501,0	512,1	493,6	505,7	500,1
Recuperação	100,2	102,4	98,7	101,1	100,0
Concenc. Média	502,5				
Recuperação Média	100,5				
Repetibilidade (S <sub>r</sub> )	8,3				
Between Run (S <sub>r,un</sub> )	4,9				
Precisão intermédia	9,7				
C.V (%)	1,4				
C.Vpool	2,2				

Estudo para a sertralina, em urina.

Data	1º DIA (06.03.13)	2º DIA (07.03.13)	3º DIA (08.03.13)	4º DIA (13.03.13)	5º DIA (15.03.13)
R <sup>2</sup>	0,9963	0,9993	0,9992	0,996	0,9996
Declive	0,0028	0,0037	0,0035	0,0042	0,0030
Y0	0,0468	0,0080	-0,0249	0,0282	-0,0244
<b>Gama Baixa 50 ng/mL</b>					
Replicado 1	51,2	45,2	50,9	48,3	51,6
Replicado 2	51,2	46,2	50,8	48,6	53,5
Replicado 3	53,0	44,2	49,8	50,6	52,3
Média	51,8	45,2	50,5	49,2	52,5
Recuperação	103,7	90,4	101,0	98,3	104,9
Concenc. Média	49,8				
Recuperação Média	99,7				
Repetibilidade (S <sub>r</sub> )	1,0				
Between Run (S <sub>run</sub> )	2,8				
Precisão intermédia	3,0				
C.V (%)	5,8				
<b>Gama Média 200 ng/mL</b>					
Replicado 1	194,4	185,6	223,4	209,5	182,8
Replicado 2	190,9	190,6	192,8	199,0	195,7
Replicado 3	197,6	192,5	202,2	195,1	195,2
Média	194,3	189,5	206,1	201,2	191,2
Recuperação	97,1	94,8	103,1	100,6	95,6
Concenc. Média	196,5				
Recuperação Média	98,2				
Repetibilidade (S <sub>r</sub> )	8,7				
Between Run (S <sub>run</sub> )	4,9				
Precisão intermédia	10,0				
C.V (%)	3,6				
<b>Gama Alta 500 ng/mL</b>					
Replicado 1	509,4	516,6	483,1	501,6	479,0
Replicado 2	511,8	504,9	483,6	497,4	490,8
Replicado 3	498,4	524,8	483,7	508,1	491,4
Média	506,5	515,4	483,5	502,4	487,1
Recuperação	101,3	103,1	96,7	100,5	97,4
Concenc. Média	499,0				
Recuperação Média	99,8				
Repetibilidade (S <sub>r</sub> )	6,8				
Between Run (S <sub>run</sub> )	12,9				
Precisão intermédia	14,5				
C.V (%)	2,7				
C.Vpool	4,2				

## Estudo para a venlafaxina, em urina.

Data	1º DIA (06.03.13)	2º DIA (07.03.13)	3º DIA (08.03.13)	4º DIA (13.03.13)	5º DIA (15.03.13)
R <sup>2</sup>	0,9949	0,9951	0,9987	0,9914	0,9986
Declive	0,0040	0,0042	0,0049	0,0061	0,0056
Y0	0,1118	0,0693	0,0311	0,1224	-0,0361
<b>Gama Baixa 50 ng/mL</b>					
Replicado 1	47,5	51,9	43,5	46,7	53,5
Replicado 2	47,9	48,6	45,5	48,0	53,8
Replicado 3	47,0	49,3	44,2	51,1	52,1
Média	47,4	49,9	44,4	48,6	53,2
Recuperação	94,9	99,9	88,8	97,2	106,3
Concenc. Média	48,7				
Recuperação Média	97,4				
Repetibilidade (S <sub>r</sub> )	1,4				
Between Run (S <sub>r,un</sub> )	3,1				
Precisão intermédia	3,4				
C.V (%)	6,6				
<b>Gama Média 200 ng/mL</b>					
Replicado 1	202,2	209,8	220,6	212,9	181,1
Replicado 2	210,0	203,5	200,1	219,8	189,4
Replicado 3	221,4	212,3	208,0	207,0	189,8
Média	211,2	208,5	209,5	213,3	186,8
Recuperação	105,6	104,3	104,8	106,6	93,4
Concenc. Média	205,9				
Recuperação Média	102,9				
Repetibilidade (S <sub>r</sub> )	7,6				
Between Run (S <sub>r,un</sub> )	9,9				
Precisão intermédia	12,5				
C.V (%)	5,3				
<b>Gama Alta 500 ng/mL</b>					
Replicado 1	499,8	498,4	493,9	496,7	488,9
Replicado 2	507,5	518,0	488,6	511,9	489,0
Replicado 3	511,8	520,6	502,0	508,9	486,6
Média	506,4	512,3	494,8	505,8	488,2
Recuperação	101,3	102,5	99,0	101,2	97,6
Concenc. Média	501,5				
Recuperação Média	100,3				
Repetibilidade (S <sub>r</sub> )	7,7				
Between Run (S <sub>r,un</sub> )	8,7				
Precisão intermédia	11,6				
C.V (%)	1,9				
C.Vpool	5,0				

Estudo para a norsertalina, em urina.

Data	1º DIA (06.03.13)	2º DIA (07.03.13)	3º DIA (08.03.13)	4º DIA (13.03.13)	5º DIA (15.03.13)
R <sup>2</sup>	0,9963	0,9971	0,9994	0,9994	0,9988
Declive	0,0018	0,0021	0,0014	0,0019	0,0019
Y0	0,0301	-0,0123	-0,0064	-0,0040	-0,0234
<b>Gama Baixa 50 ng/mL</b>					
Replicado 1	45,4	53,6	47,7	50,8	51,5
Replicado 2	43,9	50,0	48,3	52,0	52,5
Replicado 3	46,4	49,9	48,3	51,6	51,0
Média	45,2	51,2	48,1	51,5	51,7
Recuperação	90,5	102,3	96,2	102,9	103,4
Concenc. Média	49,5				
Recuperação Média	99,1				
Repetibilidade (S <sub>r</sub> )	1,2				
Between Run (S <sub>run</sub> )	2,7				
Precisão intermédia	3,0				
C.V (%)	5,7				
<b>Gama Média 200 ng/mL</b>					
Replicado 1	185,1	196,1	224,8	219,2	197,2
Replicado 2	185,3	196,2	194,5	196,9	185,8
Replicado 3	194,1	202,8	200,1	195,5	192,5
Média	188,2	198,3	206,5	203,9	191,8
Recuperação	94,1	99,2	103,2	101,9	95,9
Concenc. Média	197,7				
Recuperação Média	98,9				
Repetibilidade (S <sub>r</sub> )	10,1				
Between Run (S <sub>run</sub> )	5,1				
Precisão intermédia	11,3				
C.V (%)	3,9				
<b>Gama Alta 500 ng/mL</b>					
Replicado 1	465,6	493,7	489,8	494,6	498,0
Replicado 2	493,8	498,7	504,8	503,9	491,6
Replicado 3	495,0	497,8	494,5	503,0	493,9
Média	484,8	496,8	496,4	500,5	494,5
Recuperação	97,0	99,4	99,3	100,1	98,9
Concenc. Média	494,6				
Recuperação Média	98,9				
Repetibilidade (S <sub>r</sub> )	8,7				
Between Run (S <sub>run</sub> )	3,0				
Precisão intermédia	9,2				
C.V (%)	1,2				
C.Vpool	4,0				

Estudo para a desmetilvenlafaxina, em urina.

Data	1º DIA (06.03.13)	2º DIA (07.03.13)	3º DIA (08.03.13)	4º DIA (13.03.13)	5º DIA (15.03.13)
R <sup>2</sup>	0,9917	0,9994	0,999	0,9939	0,9976
Declive	0,0008	0,0006	0,0004	0,0005	0,0010
Y0	0,0244	0,0170	-0,0019	0,0025	-0,0143
<b>Gama Baixa 50 ng/mL</b>					
Replicado 1	46,4	47,9	49,9	49,4	50,4
Replicado 2	48,9	53,0	49,6	46,4	49,0
Replicado 3	49,3	48,2	49,6	46,4	49,8
Média	48,2	49,7	49,7	47,4	49,7
Recuperação	96,3	99,4	99,4	94,9	99,4
Concenc. Média	48,9				
Recuperação Média	97,9				
Repetibilidade (S <sub>r</sub> )	1,7				
Between Run (S <sub>run</sub> )	0,4				
Precisão intermédia	1,7				
C.V (%)	2,2				
<b>Gama Média 200 ng/mL</b>					
Replicado 1	223,1	176,4	224,1	211,8	187,1
Replicado 2	210,9	186,6	192,7	205,0	189,5
Replicado 3	210,1	189,8	213,9	215,5	186,1
Média	214,7	184,3	210,2	210,7	187,6
Recuperação	107,4	92,1	105,1	105,4	93,8
Concenc. Média	201,5				
Recuperação Média	100,7				
Repetibilidade (S <sub>r</sub> )	8,8				
Between Run (S <sub>run</sub> )	13,4				
Precisão intermédia	16,1				
C.V (%)	7,1				
<b>Gama Alta 500 ng/mL</b>					
Replicado 1	497,8	476,7	486,2	510,5	484,8
Replicado 2	503,3	482,7	478,3	508,6	488,6
Replicado 3	477,6	482,0	479,1	502,6	483,0
Média	492,9	480,5	481,2	507,2	485,5
Recuperação	98,6	96,1	96,2	101,4	97,1
Concenc. Média	489,4				
Recuperação Média	97,9				
Repetibilidade (S <sub>r</sub> )	6,9				
Between Run (S <sub>run</sub> )	10,4				
Precisão intermédia	12,4				
C.V (%)	2,3				
C.Vpool	4,5				

**Exactidão**



Estudo para a sertralina, em sangue.

Data Equação	1º DIA (06.03.13) $y = 0.0016x - 0.0301$	2º DIA (07.03.13) $y = 0.0013x - 0.0312$	3º DIA (08.03.13) $y = 0.0004x + 0.0036$	4º DIA (13.03.13) $y = 0.0005x - 0.0040$	5º DIA (15.03.13) $y = 0.0002x + 0.0117$
<b>Gama Baixa 50 ng</b>					
Média	50,9	49,7	50,1	50,1	50,6
Recuperação	101,8	99,3	100,3	100,2	101,3
Média	100,6				
Desvio padrão	0,98				
C.V (%)	1,0				
N	5				
Texp	1,28				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	0,4				
Incerteza padrão rel.	0,004				
<b>Gama Média/Alta 200 ng</b>					
Média	200,2	194,7	204,9	198,2	203,2
Recuperação	100,1	97,3	102,4	99,1	101,6
Concenc. Média	100,1				
Desvio padrão	2,02				
C.V (%)	2,0				
N	5				
Texp	0,12				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	0,9				
Incerteza padrão rel.	0,009				
<b>Gama Média/Alta 500 ng</b>					
Média	497,9	512,9	487,2	499,4	500,3
Recuperação	99,6	102,6	97,4	99,9	100,1
Concenc. Média	99,9				
Desvio padrão	1,82				
C.V (%)	1,8				
N	5				
Texp	0,11				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	0,8				
Incerteza padrão rel.	0,008				



Estudo para a venlafaxina, em sangue.

Data Equação	1º DIA (06.03.13) $y = 0.0044x + 0.1788$	2º DIA (07.03.13) $y = 0.0051x + 0.1338$	3º DIA (08.03.13) $y = 0.0045x + 0.0444$	4º DIA (13.03.13) $y = 0.0053x + 0.0618$	5º DIA (15.03.13) $y = 0.0053x - 0.0165$
<b>Gama Baixa 50 ng</b>					
Média	50,3	48,6	47,3	48,6	50,3
Recuperação	100,5	97,2	94,6	97,2	100,7
Média	<b>98,0</b>				
Desvio padrão	<b>2,55</b>				
C.V (%)	<b>2,6</b>				
N	<b>5</b>				
Texp	<b>1,72</b>				
Tcrit	<b>2,78</b>				
Incerteza de R%	<b>1,1</b>				
Incerteza padrão rel.	<b>0,012</b>				
<b>Gama Média/Alta 200 ng</b>					
Média	201,3	206,7	205,4	199,5	214,0
Recuperação	100,6	103,3	102,7	99,7	107,0
Concenc. Média	<b>102,7</b>				
Desvio padrão	<b>2,83</b>				
C.V (%)	<b>2,8</b>				
N	<b>5</b>				
Texp	<b>2,13</b>				
Tcrit	<b>2,78</b>				
Incerteza de R%	<b>1,3</b>				
Incerteza padrão rel.	<b>0,013</b>				
<b>Gama Média/Alta 500 ng</b>					
Média	496,4	506,6	488,3	504,2	500,3
Recuperação	99,3	101,3	97,7	100,8	100,1
Concenc. Média	<b>99,8</b>				
Desvio padrão	<b>1,44</b>				
C.V (%)	<b>1,4</b>				
N	<b>5</b>				
Texp	<b>0,26</b>				
Tcrit	<b>2,78</b>				
Incerteza de R%	<b>0,6</b>				
Incerteza padrão rel.	<b>0,006</b>				

Estudo para a norsertralina, em sangue.

Data	1º DIA (06.03.13)	2º DIA (07.03.13)	3º DIA (08.03.13)	4º DIA (13.03.13)	5º DIA (15.03.13)
Equação	$y = 0.0004x - 0.0069$	$y = 0.0005x - 0.0103$	$y = 0.0001x + 0.0019$	$y = 0.0002x - 0.0018$	$y = 0.0001x + 0.0030$
<b>Gama Baixa 50 ng</b>					
Média	48,9	45,7	51,8	52,3	50,6
Recuperação	97,7	91,4	103,6	104,7	101,2
Média	99,7				
Desvio padrão	5,36				
C.V (%)	5,4				
N	5				
Texp	0,11				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	2,4				
Incerteza padrão rel.	0,024				
<b>Gama Média/Alta 200 ng</b>					
Média	201,3	197,6	206,0	183,1	193,8
Recuperação	100,6	98,8	103,0	91,6	96,9
Concenc. Média	98,2				
Desvio padrão	4,33				
C.V (%)	4,4				
N	5				
Texp	0,94				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	1,9				
Incerteza padrão rel.	0,019				
<b>Gama Média/Alta 500 ng</b>					
Média	505,9	516,7	504,8	503,7	496,8
Recuperação	101,2	103,3	101,0	100,7	99,4
Concenc. Média	101,1				
Desvio padrão	1,43				
C.V (%)	1,4				
N	5				
Texp	1,75				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	0,6				
Incerteza padrão rel.	0,006				

Estudo para a desmetilvenlafaxina, em sangue.

Data Equação	1º DIA (06.03.13) $y = 0.0010x + 0.0332$	2º DIA (07.03.13) $y = 0.0011x + 0.0520$	3º DIA (08.03.13) $y = 0.0008x + 0.0059$	4º DIA (13.03.13) $y = 0.0009x + 0.0111$	5º DIA (15.03.13) $y = 0.0015x - 0.0205$
<b>Gama Baixa 50 ng</b>					
Média	47,8	46,8	47,7	47,9	50,8
Recuperação	95,5	93,6	95,4	95,7	101,6
Média	96,4				
Desvio padrão	3,05				
C.V (%)	3,2				
N	5				
Texp	2,65				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	1,4				
Incerteza padrão rel.	0,014				
<b>Gama Média/Alta 200 ng</b>					
Média	200,3	209,0	203,4	206,2	201,2
Recuperação	100,1	104,5	101,7	103,1	100,6
Concenc. Média	102,0				
Desvio padrão	1,81				
C.V (%)	1,8				
N	5				
Texp	2,49				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	0,8				
Incerteza padrão rel.	0,008				
<b>Gama Média/Alta 500 ng</b>					
Média	501,0	512,1	493,6	505,7	500,1
Recuperação	100,2	102,4	98,7	101,1	100,0
Concenc. Média	100,5				
Desvio padrão	1,38				
C.V (%)	1,4				
N	5				
Texp	0,82				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	0,6				
Incerteza padrão rel.	0,006				

Estudo para a sertralina, em urina.

Data	1º DIA (06.03.13)	2º DIA (07.03.13)	3º DIA (08.03.13)	4º DIA (13.03.13)	5º DIA (15.03.13)
Equação	$y = 0.0028x + 0.0468$	$y = 0.0037x + 0.0080$	$y = 0.0035x - 0.0249$	$y = 0.0042x + 0.0282$	$y = 0.0030x - 0.0244$
<b>Gama Baixa 50 ng</b>					
Média	51,8	45,2	50,5	49,2	52,5
Recuperação	103,7	90,4	101,0	98,3	104,9
Média	99,7				
Desvio padrão	5,77				
C.V (%)	5,8				
N	5				
Texp	0,13				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	2,6				
Incerteza padrão rel.	0,026				
<b>Gama Média/Alta 200 ng</b>					
Média	194,3	189,5	206,1	201,2	191,2
Recuperação	97,1	94,8	103,1	100,6	95,6
Concenc. Média	98,2				
Desvio padrão	3,50				
C.V (%)	3,6				
N	5				
Texp	1,13				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	1,6				
Incerteza padrão rel.	0,016				
<b>Gama Média/Alta 500 ng</b>					
Média	506,5	515,4	483,5	502,4	487,1
Recuperação	101,3	103,1	96,7	100,5	97,4
Concenc. Média	99,8				
Desvio padrão	2,69				
C.V (%)	2,7				
N	5				
Texp	0,17				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	1,2				
Incerteza padrão rel.	0,012				

Estudo para a venlafaxina, em urina.

Data	1º DIA (06.03.13)	2º DIA (07.03.13)	3º DIA (08.03.13)	4º DIA (13.03.13)	5º DIA (15.03.13)
Equação	$y = 0.0040x + 0.1118$	$y = 0.0042x + 0.0693$	$y = 0.0049x - 0.0311$	$y = 0.0061x + 0.1224$	$y = 0.0056x - 0.0361$
<b>Gama Baixa 50 ng</b>					
Média	47,4	49,9	44,4	48,6	53,2
Recuperação	94,9	99,9	88,8	97,2	106,3
Média	97,4				
Desvio padrão	6,44				
C.V (%)	6,6				
N	5				
Texp	0,90				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	2,9				
Incerteza padrão rel.	0,030				
<b>Gama Média/Alta 200 ng</b>					
Média	211,2	208,5	209,5	213,3	186,8
Recuperação	105,6	104,3	104,8	106,6	93,4
Concenc. Média	102,9				
Desvio padrão	5,41				
C.V (%)	5,3				
N	5				
Texp	1,21				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	2,4				
Incerteza padrão rel.	0,024				
<b>Gama Média/Alta 500 ng</b>					
Média	506,4	512,3	494,8	505,8	488,2
Recuperação	101,3	102,5	99,0	101,2	97,6
Concenc. Média	100,3				
Desvio padrão	1,96				
C.V (%)	1,9				
N	5				
Texp	0,35				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	0,9				
Incerteza padrão rel.	0,009				

Estudo para a norsertralina, em urina.

Data	1º DIA (06.03.13)	2º DIA (07.03.13)	3º DIA (08.03.13)	4º DIA (13.03.13)	5º DIA (15.03.13)
<b>Equação</b>	$y = 0.0018x + 0.0301$	$y = 0.0021x - 0.0123$	$y = 0.0014x - 0.0064$	$y = 0.0019x - 0.0040$	$y = 0.0019x - 0.0234$
<b>Gama Baixa 50 ng</b>					
<b>Média</b>	45,2	51,2	48,1	51,5	51,7
<b>Recuperação</b>	90,5	102,3	96,2	102,9	103,4
<b>Média</b>	99,1				
<b>Desvio padrão</b>	5,61				
<b>C.V (%)</b>	5,7				
<b>N</b>	5				
<b>Texp</b>	0,37				
<b>Tcrit</b>	2,78				
<b>Incerteza de R%</b>	2,5				
<b>Incerteza padrão rel.</b>	0,025				
<b>Gama Média/Alta 200 ng</b>					
<b>Média</b>	188,2	198,3	206,5	203,9	191,8
<b>Recuperação</b>	94,1	99,2	103,2	101,9	95,9
<b>Concenc. Média</b>	98,9				
<b>Desvio padrão</b>	3,88				
<b>C.V (%)</b>	3,9				
<b>N</b>	5				
<b>Texp</b>	0,65				
<b>Tcrit</b>	2,78				
<b>Incerteza de R%</b>	1,7				
<b>Incerteza padrão rel.</b>	0,017				
<b>Gama Média/Alta 500 ng</b>					
<b>Média</b>	484,8	496,8	496,4	500,5	494,5
<b>Recuperação</b>	97,0	99,4	99,3	100,1	98,9
<b>Concenc. Média</b>	98,9				
<b>Desvio padrão</b>	1,18				
<b>C.V (%)</b>	1,2				
<b>N</b>	5				
<b>Texp</b>	2,06				
<b>Tcrit</b>	2,78				
<b>Incerteza de R%</b>	0,5				
<b>Incerteza padrão rel.</b>	0,005				

Estudo para a desmetilvenlafaxina, em urina.

Data	1º DIA (06.03.13)	2º DIA (07.03.13)	3º DIA (08.03.13)	4º DIA (13.03.13)	5º DIA (15.03.13)
Equação	$y = 0.0008x + 0.0244$	$y = 0.0006x + 0.0170$	$y = 0.0004x - 0.0019$	$y = 0.0005x + 0.0025$	$y = 0.0010x - 0.0143$
<b>Gama Baixa 50 ng</b>					
Média	48,2	49,7	49,7	47,4	49,7
Recuperação	96,3	99,4	99,4	94,9	99,4
Média	97,9				
Desvio padrão	2,15				
C.V (%)	2,2				
N	5				
Texp	2,21				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	1,0				
Incerteza padrão rel.	0,010				
<b>Gama Média/Alta 200 ng</b>					
Média	214,7	184,3	210,2	210,7	187,6
Recuperação	107,4	92,1	105,1	105,4	93,8
Concenc. Média	100,7				
Desvio padrão	7,19				
C.V (%)	7,1				
N	5				
Texp	0,23				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	3,2				
Incerteza padrão rel.	0,032				
<b>Gama Média/Alta 500 ng</b>					
Média	492,9	480,5	481,2	507,2	485,5
Recuperação	98,6	96,1	96,2	101,4	97,1
Concenc. Média	97,9				
Desvio padrão	2,22				
C.V (%)	2,3				
N	5				
Texp	2,13				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	1,0				
Incerteza padrão rel.	0,010				

## **Efeito Matriz**





## Estudo em sangue.

	Sertralina		Venlafaxina		Norsertalina		Desmetilvenlafaxina		Zolpidem-d6		
	A <sub>Abs</sub>	Média Area	A <sub>Abs</sub>	Média Area	A <sub>Abs</sub>	Média Area	A <sub>Abs</sub>	Média Area	A <sub>Abs</sub>	Média Area	
C/Matriz	50 ng/mL	1320	607	65812	29446	630	277	12718	7388	307068	152499
		432		27374		216		7304		138882	
		390		17476		151		6221		97951	
		480		16578		196		5340		97681	
		411		19988		191		5355		120913	
	3954	121095	2066	39092	114913						
	500 ng/mL	4011	4446	120852	121203	2086	2248	39436	45093	100835	108815
		4829		126904		2241		59574		124317	
		4789		100579		2421		44035		86826	
		4649		136585		2428		43329		117182	
S/Matriz	50 ng/mL	16398	30855	24411	53797	8438	14592	7082	14248	106175	221923
		29414		49987		13123		12754		187485	
		37949		69609		16969		16589		245398	
		31233		57760		16834		16305		278307	
		39282		67216		17598		18508		292250	
	386003	568633	217379	165872	325431						
	500 ng/mL	392170	422491	564868	606972	225510	238955	163877	176833	338578	365245
		457109		694992		254709		183309		379066	
		450812		688323		244086		192617		383484	
		426363		518046		253092		178488		399665	

	50 ng/mL	500 ng/mL
Sertralina	-98	-99
Venlafaxina	-45	-80
Norsertalina	-98	-99
Desmetilvenlafaxina	-48	-74
Zolpidem-d6	-31	-70

## Estudo em urina.

	Sertralina		Venlafaxina		Norsertalina		Desmetilvenlafaxina		Zolpidem-d6		
	A <sub>Abs</sub>	Média Area	A <sub>Abs</sub>	Média Area	A <sub>Abs</sub>	Média Area	A <sub>Abs</sub>	Média Area	A <sub>Abs</sub>	Média Area	
C/Matriz	50 ng/mL	4066	7778	6057	13348	1740	3383	352	931	19912	50101
		6621		10839		2777		939		39748	
		8539		15171		3639		958		56220	
		9508		16635		4266		1150		63010	
		10157		18037		4492		1255		71616	
	86455	157744	52503	27103	75105						
	500 ng/mL	83668	84021	149673	155694	48383	50147	20984	25284	67775	71611
		82756		154582		51172		21356		71526	
		83862		157074		50062		24609		72746	
		83366		159397		48613		32366		70902	
S/Matriz	50 ng/mL	16398	30855	24411	53797	8438	14592	7082	14248	106175	221923
		29414		49987		13123		12754		187485	
		37949		69609		16969		16589		245398	
		31233		57760		16834		16305		278307	
		39282		67216		17598		18508		292250	
	386003	568633	217379	165872	325431						
	500 ng/mL	392170	422491	564868	606972	225510	238955	163877	176833	338578	365245
		457109		694992		254709		183309		379066	
		450812		688323		244086		192617		383484	
		426363		518046		253092		178488		399665	

	50 ng/mL	500 ng/mL
Sertralina	-75	-80
Venlafaxina	-75	-74
Norsertalina	-77	-79
Desmetilvenlafaxina	-93	-86
Zolpidem-d6	-77	-80