

**Determinação da Amitriptilina e do seu metabolito  
Nortriptilina em sangue por GC/MS**

Francisco Edgar do Nascimento

**Dissertação apresentada a provas de Mestrado em Química, área  
de especialização em Química Forense**

Tese orientada por

Mestre Cláudia Isabel Reis Margalho

Mestre João Miguel Gouveia Franco

Co-orientada pela

Prof. Dra. Maria Ermelinda da Silva Eusébio

**Setembro de 2011**

**Universidade de Coimbra**



*Trabalho experimental realizado no*  
*Serviço de Toxicologia Forense da*  
*Delegação de Coimbra do*  
*Instituto Nacional de Medicina Legal, IP*



## **AGRADECIMENTOS**

*Com esta, tese de mestrado, soma mais um dos sonhos concretizado na minha vida. Mas para que este se convertesse numa realidade integrou um leque de pessoas, na qual, com muito entusiasmo gostaria de expressar os meus mais sinceros agradecimentos:*

*Aos meus orientadores, Mestre Cláudia Isabel Reis Margalho e Mestre João Miguel Gouveia Franco Director do STF do INML, IP-DC, que me forneceram todas as informações solicitadas, tempo, apoio, compreensão, partilha do saber assim como as valiosas contribuições para o trabalho; pela discussão de ideias, assim como a boa vontade e valiosíssimos conselhos;*

*A Professora Doutora Maria Ermelinda da Silva Eusébio minha co-orientadora, o meu maior agradecimento por toda a disponibilidade e orientação prestada, pela sabedoria transmitida ao longo deste tempo, pelo apoio incondicional e compreensão que sempre manifestou;*

*Aos Professores Doutores Duarte Nuno Vieira e Francisco Côrte-Real por consentirem na realização deste trabalho no INML, IP-DC. Não esquecendo a toda direcção, e demais funcionários do INML, IP-DC.*

*Aos colegas do STF, Dra. Carla Monteiro, Sr. Fernando e D. Alice Castanheira, de modo geral a toda equipa do mesmo serviço.*

*Ao Ministério do Interior de Angola concomitantemente o Comando Geral da Polícia Nacional de Angola.*

*Aos meus pais, Rafael do J.M. do Nascimento e Julieta J.F. Milagre os meus mais profundos agradecimentos pelo amor, compreensão, alegria,*

*por suas sábias lições de esperança que me incutiram e a confiança necessária para realização dos meus sonhos;*

*Aos meus irmãos, tia e sobrinhos: Aníta, Carla Santa Marta, Edna Luzia, Cláudio João, Elizabeth Milagre, Patrício Milagre e Aires Osvaldo pela força, coragem e incentivo recebido deles ao longo destes anos;*

*À minha amiga Dra. Elizabeth Lousa, pela amizade, apoio moral e psicológico, a ajuda e boa disposição que sempre manifestou;*

*A Ilda Avelino que na minha ausência dedicou o seu precioso tempo ao lado dos nossos filhos;*

*E o especial agradecimento dedico -O aos meus queridos filhos Edna Doris, Edvaldo e Edson do Nascimento, que para seus pais nunca crescem, mesmo a quando adultos. São eles, o sentido da vida, o motivo das alegrias, como dizer o tamanho deste amor? Quando nem mesmo nós pais sabemos; Somente Deus é capaz de entender este amor sem interesse, sem medidas e sem fronteiras.*

***A todos***

***O meu eterno agradecimento!***

## RESUMO

A amitriptilina e a nortriptilina são antidepressores tricíclicos amplamente usados no controlo da depressão e transtornos de ansiedade, apresentando uma série de efeitos colaterais. Estas substâncias, por apresentarem uma elevada toxicidade, surgem com alguma frequência associadas a actos suicidas.

O objectivo deste trabalho foi o desenvolvimento de uma técnica rápida e sensível para detecção e quantificação de amitriptilina e nortriptilina em amostras de sangue post-mortem e também provenientes de situações de âmbito hospitalar, com vista à sua aplicação na rotina pericial do serviço de toxicologia forense da delegação do Centro (STF-C) do INML, I.P.. O método desenvolvido, utilizando a extracção em fase sólida e posterior análise por cromatografia de gás associada à espectrometria de massa (GC/MS), revelou ser selectivo e linear na gama de trabalho estudada, com coeficientes de correlação superiores a 0,99 para ambas as substâncias. Todos os restantes parâmetros de validação estudados (precisão intermédia, exactidão, recuperação, limites detecção e de quantificação) apresentaram resultados considerados adequadas segundo os critérios em vigor no STF-C. O método mostrou-se adequado para a determinação das substâncias estudadas em amostras de sangue, pretendendo-se ampliar o seu campo de aplicação a um maior número de antidepressores.





## **SUMMARY**

Amitriptyline and nortriptyline are tricyclic antidepressants, widely used in the management of depression and anxiety disorders, with a number of side effects. These substances, being highly toxic, are quite often associated with suicidal acts.

The objective of this work is to develop a rapid and sensitive technique for detection and quantification of amitriptyline and nortriptyline in post-mortem blood samples as well as in blood samples from hospital cases, with the aim of application in routine practice in the forensic toxicology service of the Coimbra delegation (STF-C) of the INML, I.P.. The analytical method, using solid phase extraction and subsequent analysis by gas chromatography - mass spectrometry (GC/ MS) proved to be selective and linear in the range of work studied, with correlation coefficients greater than 0.99 for both substances. The results for all the other validation parameters (intermediate precision, accuracy, recovery, detection and quantification limits) were within the criteria accepted in the STF-C.

The method was suitable for the determination of amitriptyline and nortriptyline in blood samples and, as future work, it is expected to expand its scope to a greater number of antidepressants.



# ÍNDICE

<b>SUMMARY</b> .....	VII
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	XIII
<b>CAPÍTULO I – JUSTIFICAÇÃO DO TEMA</b> .....	1
1.1 JUSTIFICAÇÃO DO TEMA .....	3
1.2 OBJECTIVO DO TRABALHO .....	4
<b>CAPÍTULO II – INTRODUÇÃO</b> .....	5
2.2 AMITRIPTILINA E NORTRIPTILINA.....	11
2.3 MATRIZES BIOLÓGICAS.....	15
2.4 TÉCNICAS DE EXTRACÇÃO.....	16
2.4.1 <i>EXTRACÇÃO LÍQUIDO – LÍQUIDO</i> .....	16
2.4.2 <i>EXTRACÇÃO EM FASE SÓLIDA</i> .....	17
2.5 CROMATOGRAFIA DE GÁS ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	18
2.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	19
2.6.1 PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO .....	20
2.6.1.1 <i>ESPECIFICIDADE/ SELECTIVIDADE</i> .....	20
2.6.1.2 <i>LINEARIDADE</i> .....	20
2.6.1.3 <i>GAMA DE TRABALHO</i> .....	21
2.6.1.4 <i>ARRASTAMENTO (CARRYOVER)</i> .....	21
2.6.1.5 <i>LIMITE DE DETECÇÃO (LOD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LOQ)</i> .....	21
2.6.1.6 <i>EFICIÊNCIA DA EXTRACÇÃO</i> .....	22
2.6.1.7 <i>PRECISÃO</i> .....	23

2.6.1.8	EXACTIDÃO .....	23
<b>CAPÍTULO III – MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>		<b>25</b>
3.1	AMOSTRAS BIOLÓGICAS .....	27
3.2	SOLVENTES.....	27
3.3	MATERIAL .....	27
3.4	INSTRUMENTAÇÃO UTILIZADA .....	27
3.4.1	APARELHOS DE USO COMUM.....	27
3.4.2	SISTEMA CROMATÓGRAFICO .....	29
3.5	PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES .....	31
3.5.1	METANOL / ÁGUA 5% (V/V).....	31
3.5.2	SOLUÇÕES DE PADRÕES DE ARMAZENAMENTO A 1 mg/mL .....	31
3.5.3	MISTURAS DE PADRÕES PRIMÁRIOS a 50 µg/mL .....	31
3.5.4	MISTURAS DE TRABALHO DE PADRÕES A 5 µg/mL.....	31
3.5.5	MISTURA DE TRABALHO DE PADRÕES 0,5 µg/mL .....	31
3.5.6	PADRÃO INTERNO (PI) a10 µg/mL.....	31
3.6	PROCEDIMENTO ANALÍTICO .....	32
3.6.1	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ENSAIO (AE) .....	32
3.6.2	PREPARAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO.....	32
3.6.3	PREPARAÇÃO DOS CONTROLOS PARA QUALIDADE INTERNA (CQI).....	33
3.6.4	EXTRACÇÃO EM FASE SÓLIDA .....	34
<b>CAPÍTULO IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>		<b>37</b>
4.1	IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS.....	39
4.2	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO .....	43

4.2.1	ESPECIFICIDADE/SELECTIVIDADE .....	43
4.2.1.1	<i>CRITÉRIOS PARA O TEMPO DE RETENÇÃO (TR) E O TEMPO DE RETENÇÃO RELATIVO (TRR).....</i>	<i>45</i>
4.2.1.2	<i>CRITÉRIO DAS RELAÇÕES IÓNICAS.....</i>	<i>45</i>
4.2.1.3	<i>CRITÉRIO DO SINAL/ RUÍDO .....</i>	<i>45</i>
4.2.2	LIMITE DE DETECÇÃO (LOD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LOQ).....	49
4.2.3	EFICIÊNCIA DA EXTRACÇÃO .....	52
4.2.4	LINEARIDADE/GAMA DE TRABALHO.....	54
4.2.5	ARRASTAMENTO (CARRYOVER) .....	56
4.2.6	REPETIBILIDADE .....	58
4.2.7	PRECISÃO INTERMÉDIA.....	59
4.2.8	EXACTIDÃO.....	62
4.2.9	APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO E VALIDADO A AMOSTRAS REAIS .....	63
<b>CAPÍTULO V – CONCLUSÕES .....</b>		<b>65</b>
<b>CONCLUSÕES .....</b>		<b>67</b>
<b>CAPÍTULO VI - REFERÊNCIAS.....</b>		<b>69</b>
<b>CAPÍTULO VII - APÊNDICE .....</b>		<b>81</b>
<b>APÊNDICE .....</b>		<b>83</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química dos antidepressores tricíclicos .....	12
Figura 2 - Principais produtos de biotransformação da Amitriptilin.....	14
Figura 3 - Principais produtos de biotransformação da Nortriptilina .....	14
Figura 4 - Etapas em SPE para o isolamento de um composto .....	17
Figura 5 - Diagrama de blocos de um cromatógrafo de gás acoplado a um espectrómetro de massa	19
Figura 6 - Sistema de SPE .....	28
Figura 7 - Evaporador.....	28
Figura 8 - Centrifuga (Sigma) .....	29
Figura 9 - Sistema de purificação de água (Milli-Q).....	29
Figura 10 - Cromatógrafo de Gás acoplado a detector de Espectrometria de Massa .....	30
Figura 11 - Fluxograma de extracção em fase sólida de amitriptilina e nortriptilina em sangue total ..	35
Figura 12 - Cromatograma e respectivo espectro de massas (modo SIM) da amitriptilina.....	40
Figura 13 - Cromatograma e respectivo espectro de massas (modo SIM) da Nortriptilina.....	41
Figura 14 - Cromatograma e respectivo espectro de massas (modo SIM) da Promazina.....	42
Figura 15 - Curva de calibração da amitriptilina.....	55
Figura 16 - Curva de calibração da nortriptilina .....	56
Figura 17 - Cromatogramas dos iões extraídos para cada uma das substâncias.....	57





## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Estrutura molecular de alguns antidepressores tricíclicos (aminas terciárias) .....	9
Tabela 2- Estrutura molecular de alguns antidepressores tricíclicos (aminas secundárias) .....	10
Tabela 3 - Algumas propriedades físicas da amitriptilina e nortriptilina .....	12
Tabela 4- Doses terapêuticas, dose tóxica e dose letal de AMI e NORT em sangue .....	15
Tabela 5 - Critérios de aceitação de um método analito no STF-DC .....	24
Tabela 6 -Preparação da curva de calibração. ....	32
Tabela 7 - Preparação dos CQI .....	33
Tabela 8 - Procedimento de extracção SPE .....	34
Tabela 9- Iões Seleccionados e tempos de retenção para amitriptilina, nortriptilina e a Promazina (PI) .....	39
Tabela 10 - Sangues usados para constituir as misturas (pools) .....	44
Tabela 11 - Tolerância máxima para as áreas relativas dos iões diagnósticos.....	45
Tabela 12 -Estudo da Especificidade/ Selectividade da Amitriptilina .....	46
Tabela 13 - Estudo da Especificidade/ Selectividade Nortriptilina .....	47
Tabela 14 - Resultados obtidos no estudo da especificidade/selectividade.....	48
Tabela 15 - Resultados obtidos no estudo da especificidade/selectividade (Continuação) .....	49
Tabela 16 - Preparação das curvas de calibração.....	50
Tabela 17- Resumo dos parâmetros das rectas de regressão linear da Área (AMI/PI) vs Concentração.....	50
Tabela 18 - LOD e LOQ teóricos da amitriptilina e nortriptilina calculados .....	50
Tabela 19 – LOD e LOQ da amitriptilina e nortriptilina calculados .....	51
Tabela 20 - Verificação do LOD e LOQ da amitriptilina .....	51
Tabela 21 - Verificação do LOD e LOQ da nortriptilina.....	51

Tabela 22 - Resultado da eficiência da extracção do método para a amitriptilina, ião 58.....	53
Tabela 23 - Resultado da eficiência da extracção do método para a nortriptilina, ião 202 .....	53
Tabela 24 - Estudo da linearidade para a amitriptilina e nortriptilina .....	55
Tabela 25 - Resumo dos resultados obtidos para o estudo da linearidade e gama de trabalho.....	56
Tabela 26 - Resultados da repetibilidade da amitriptilina .....	58
Tabela 27 - Resultados da repetibilidade da nortriptilina .....	59
Tabela 29 - Cálculo das estimativas da precisão.....	60
Tabela 28 - Tabela ANOVA (factor único).....	60
Tabela 30 - Resultados e Tratamento da precisão intermédia da Amitriptilina .....	61
Tabela 31 - Resultados e Tratamento da precisão intermédia da Nortriptilina .....	62
Tabela 32 - Resultados e Tratamento da exactidão da Amitriptilina.....	63
Tabela 33 - Resultados e Tratamento da exactidão da Nortriptilina .....	63
Tabela 34 - Concentração de amitriptilina e nortriptilina em sangue (casos Reais).....	64
Tabela 35 - Resultados de confirmação da amitriptilina .....	83
Tabela 36 - Tratamento estatístico dos limiares (LQ e LD) da Amitriptilina.....	83
Tabela 37 - Tratamento estatístico dos limiares (LD e LQ) da amitriptilina .....	84
Tabela 38 - Tratamento estatístico dos limiares (LQ e LD) da Nortriptilina .....	85
Tabela 39 - Estudos estatístico de Linearidade da amitriptilina.....	86
Tabela 40 - Estudos estatístico de Linearidade da nortriptilina .....	87
Tabela 41 - Resultados para o 1º dia da Precisão Intermédia da AMI a) e NORT b) .....	88
Tabela 42 - Resultados para 2º dia da precisão Intermédia da AMI a) e NORT b).....	89
Tabela 43 - Resultados para 3º dia da precisão Intermédia da AMI a) e NORT b).....	90
Tabela 44 - Resultados para 4º dia da precisão Intermédia da AMI a) e NORT b).....	91

Tabela 45 - Resultados para 5º dia da precisão Intermédia da AMI a) e NORT b)..... 92

Tabela 46 - Estudo da Anova Factor Único para a exactidão da Amitriptilina..... 93

Tabela 47 - Estudo da Anova Factor Único para a exactidão da Nortriptilina ..... 94



## ABREVIATURAS

<b>AE</b>	Amostra de ensaio: Alíquota obtida a partir de uma AP e da qual são obtidas as tomas de ensaio
<b>AP</b>	Amostra Primária: Amostra de sangue obtida <i>in vivo</i> ou <i>post mortem</i> , tal como recebida no STF
<b>AD</b>	Antidepressores
<b>AMI</b>	Amitriptilina
<b>CQI</b>	Controlo de Qualidade Interno
<b>CV</b>	Coefficiente de variação
<b>DA</b>	Dopamina
<b>DC</b>	Delegação do Centro
<b>DP</b>	Desvio Padrão
<b>DNP</b>	Detector de Nitrogénio e Fósforo (termiónico)
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>GC</b>	Cromatografia Gasosa
<b>GC/FID</b>	Cromatografia Gasosa acoplado ao Detector de ionização em Chama
<b>5-HT</b>	Serotonina
<b>HPLC</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>IUPAC</b>	União Internacional de Química Pura e Aplicada
<b>ICH</b>	Conferência Internacional em Harmonização
<b>IMAO</b>	Inibidores da Monoaminoxidase
<b>ISRS</b>	Inibidores Selectivos da Recaptação da Serotonina
<b>ISSO</b>	International Standard Organization
<b>LOD</b>	Limite de Detecção
<b>LOQ</b>	Limite de Quantificação
<b>MAO</b>	Monoamina-Oxidase

<b>MS</b>	Espectrometria de Massa
<b>NA</b>	Noradrenalina
<b>NE</b>	Norepenifrina
<b>NT</b>	Neurotransmissor
<b>Nort</b>	Nortriptilina
<b>PI</b>	Padrão Interno
<b>p.a.</b>	Para análise
<b>Prom</b>	Promazina
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>SPE</b>	Extracção em Fase Sólida
<b>S/R</b>	Razão sinal/ruído
<b>SA</b>	Sequência Analítica
<b>SIM</b>	Monitorização de iões seleccionados;
<b>INML</b>	Instituto Nacional de Medicina Legal
<b>TCA</b>	Antidepressores Tricíclico
<b>TCAs</b>	Antidepressores Tricíclicos
<b>TIAF</b>	Associação Internacional de Toxicologistas Forenses
<b>STF</b>	Serviços de Toxicologia Forense
<b>TIAF</b>	Associação Internacional de Toxicologistas Forenses
<b>UV</b>	Detector de Ultra Violeta

# **CAPÍTULO I – JUSTIFICAÇÃO DO TEM**





## JUSTIFICAÇÃO DO TEMA

O consumo de substâncias consideradas como antidepressores tem vindo a aumentar consideravelmente ao longo da última década. Existe uma série de situações em que estudos internacionais vêm apontando o aumento da incidência de intoxicação por antidepressores. Em Portugal, dados publicados pelo INFARMED referem que o subgrupo farmacoterapêutico de antidepressores e psicotrópicos estavam, em 2000, entre os 10 primeiros no que diz respeito aos encargos para o Serviço Nacional de Saúde. A depressão afecta pessoas de todas as idades sendo mais comum nas mulheres do que nos homens. O facto de serem bastante comercializados, não só através de farmácias mas também de forma ilegal, tem contribuído para o aumento dos casos de etiologia médico-legal suicida. Os antidepressores são considerados o segundo grupo de substâncias medicamentosas mais pesquisados na rotina laboratorial de toxicologia forense.

Apesar de cada vez mais se subscreverem antidepressores de nova geração, por serem mais seguros, ainda são vários os relatos de casos de intoxicação/ suicídio por amitriptilina e nortriptilina em doses elevadas, ou por interacções medicamentosas.

O aumento de intoxicação por antidepressores, assim como de acidentes de viação sob a influência dos mesmos, tornam necessário o desenvolvimento de métodos analíticos fiáveis, rápidos e sensíveis para a sua quantificação e monitorização em amostras forenses. Este é um dos desafios a que nos propomos, com o desenvolvimento deste trabalho.

## 1.1 OBJECTIVO DO TRABALHO

Tendo em conta o volume de amostras que entram no Serviço de Toxicologia Forense da Delegação do Centro (STF-C) do Instituto Nacional de Medicina Legal, I.P. (INML, I.P.) com pedidos de pesquisa de medicamentos, e a responsabilidade de que se revestem os resultados destas análises, é de grande importância o desenvolvimento de metodologias adaptadas à realidade das amostras forenses (quantidade e qualidade de sangue resultante de colheitas efectuadas em indivíduos vivos e no decorrer de autopsias médico-legais). Assim sendo, o presente trabalho tem como objectivo desenvolver e validar uma metodologia para a determinação e quantificação de Amitriptilina e Nortriptilina dois antidepressores tricíclicos (ATDs) em amostras de sangue total, empregando a extracção em fase sólida (SPE) com colunas Oásis® HLB, e efectuando a análise por cromatográfica de gases, acoplada à espectrometria de massa.

Para alcançar estes objectivos, foi elaborado o seguinte plano de trabalho:

- Definição das condições de extracção em fase sólida (SPE) e análise por Cromatografia de gás com detector de espectrometria de Massa;
- Validação analítica do método de quantificação de Amitriptilina e Nortriptilina em amostra de sangue total por SPE e GC/MS. Os parâmetros de validação foram: Selectividade/especificidade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, gama de trabalho, precisão intermédia, a exactidão, a recuperação do processo extractivo, e carryover;

## **CAPÍTULO II - INTRODUÇÃO**



## 2.1 DEPRESSÃO E ANTIDEPRESSORES

A depressão é um transtorno frequente distribuído em todo o mundo. Nos tempos que correm, calcula-se que pelo menos cerca de um terço dos europeus adultos sofre ou já sofreu algum tipo de doença mental<sup>1</sup> durante um determinado período ao longo da sua vida<sup>1-3</sup>. Em estudos realizados em Portugal estima-se que a depressão afecta um em cada cinco portugueses e pode ser responsável por 1200 mortes anualmente<sup>4</sup>. Esta doença manifesta-se essencialmente sob formas emocionais e Físico/biológicas<sup>2,3</sup>.

A depressão é uma doença mental, definida como um distúrbio afectivo, resultante da modificação da acção de neurotransmissores no cérebro, sendo diagnosticada clinicamente, porque actualmente não existem exames laboratoriais ou imagiológicos que possam substituir a observação efectuada por médicos<sup>5</sup>. É a segunda doença considerada como mais debilitadora, depois das doenças cardiovasculares, causando problemas tanto para o indivíduo como na sociedade, e se não for tratada pode levar ao aumento da morbilidade e mortalidade<sup>6,7</sup>.

Não existe um quadro padrão de sintomas, nem se manifesta da mesma forma em todas as pessoas, sendo evidenciados sintomas emocionais e físicos. Os primeiros traduzem-se em desânimo, ansiedade, perda do apetite, e do interesse ou prazer sexual, insónia e diminuição da actividade motora, sentimentos de culpa, comportamentos suicidas e transtornos cognitivos; os segundos por agitação, alterações de peso, dores musculares, perda de energia e alterações do sono<sup>7,8</sup>.

O problema de identificar e tratar atempadamente os casos de depressão é importante para a qualidade de vida e produtividade dos pacientes, uma vez que os pacientes não tratados correctamente representam grandes custos para a sociedade<sup>9</sup>.

O tratamento da depressão depende da gravidade e do estágio da doença. Em caso de depressão ligeira pode ser suficiente o aconselhamento psicológico, e para aqueles casos considerados como depressão severa a utilização de antidepressores pode ser necessária<sup>8</sup>.

Antidepressores são medicamentos cuja acção decorre no sistema nervoso central, normalizando o estado do humor<sup>5,7</sup>.

Uma das conquistas mais importantes no tratamento da depressão major foi o desenvolvimento dos antidepressores (AD)<sup>10</sup>.

Estudos relacionados com o desenvolvimento de fármacos para o tratamento da depressão surgiram na década de 1960<sup>2,11</sup>, tendo a Imipramina e a amitriptilina como os protótipos desta geração, antidepressores tricíclicos. O segundo grupo é representado pelos inibidores da monoaminoxidase (IMAO), cujo aparecimento ocorreu nos anos 1960, sendo a iproniazida o primeiro fármaco desta família.

Desde a introdução no mercado do primeiro antidepressores tricíclico (TCA), a Imipramina, em 1957, foram adicionados ao arsenal farmacêutico muitos tipos de antidepressores (ADs). O desenvolvimento de novos medicamentos antidepressores tem ocorrido no sentido da obtenção de fármacos com maior eficácia terapêutica, com maior especificidade no seu mecanismo de acção, menores efeitos adversos e menores riscos de utilização para os doentes<sup>11</sup>. Estes são, de facto, fármacos que apresentam diversos efeitos colaterais, sendo fatais na sobredosagem apresentando interações medicamentosas<sup>12-16</sup>.

Os medicamentos antidepressores tricíclicos compreendem, na sua estrutura química três anéis, no qual ao anel central está ligada uma cadeia lateral e em geral de três átomos de carbono com um grupo amina terminal.

Os TCAs, podem ser classificados de acordo com a estrutura química ou com as propriedades farmacológicas<sup>17</sup>. Estes agrupam-se em dois grandes grupos: Aminas terciárias: Amitriptilina, Imipramina, Trimipramina, e Doxepina. Aminas secundárias: Nortriptilina, Desmetilimipramina, e Protriptilina. Tabelas 1 e 2.

**Tabela 1** – Estrutura molecular de alguns antidepressores tricíclicos (aminas terciárias)

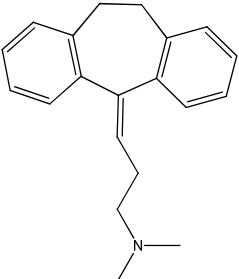
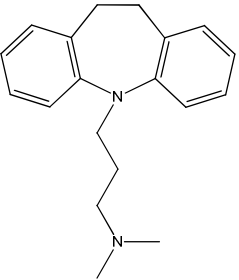
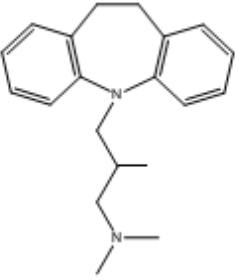
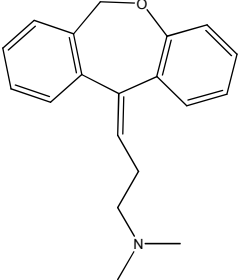
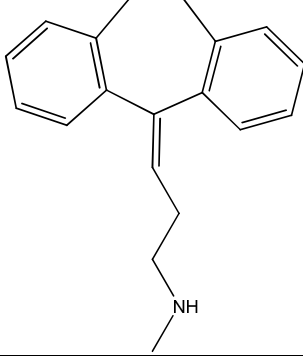
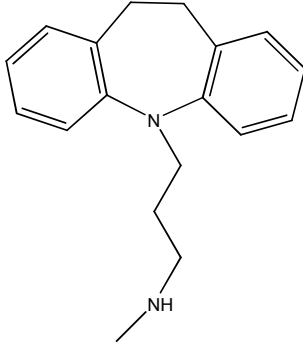
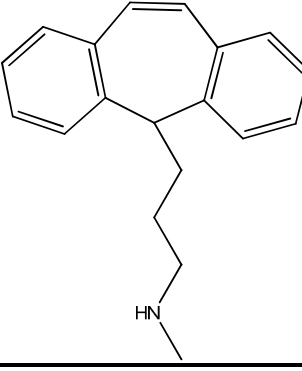
Nome do composto	Estrutura Molecular
Amitriptilina	
Imipramina	
Trimipramina	
Doxepina	

Tabela 2- Estrutura molecular de alguns antidepressores tricíclicos (aminas secundárias)

Nome do composto	Estrutura Molecular
Nortriptilina	
Doxepina	
Protriptilina	

A acção farmacológica é comum para todos os TCAs e ocorre principalmente no sistema nervoso central (SNC) actuando ao nível da recaptação da serotonina (5-HT), noradrenalina e dopamina (DA)<sup>11,17</sup>. Os TCAs amina terciárias inibem preferencialmente a recaptura de serotonina (5-HT), em menor proporção dopamina (DA); e os TCAs aminas secundárias inibem a recaptura de norepenifrina (NE). Como consequência da acção inibitória dos processos de recaptação aumenta a concentração das monoaminas biogénicas na fenda sináptica, facilitando a acção ao nível dos seus receptores<sup>11</sup>. A outra grande família de



antidepressores engloba, como se referiu os inibidores de monoaminaoxidase, os quais inibem a degradação oxidativa da serotonina e da noradrenalina<sup>17-20</sup>.

Cerca de 5 % dos indivíduos em terapia com antidepressores sofre efeitos secundários e o uso abusivo de antidepressores, potenciado pelo acesso relativamente fácil, pode acarretar algumas sintomatologias ou mesmo risco de vida.<sup>5,21</sup>

Os antidepressores tricíclicos são conhecidos por causar vários efeitos adversos aliados a overdose, sendo vários os relatos de casos de intoxicação por antidepressores. O abuso de drogas como antidepressores também é um dos métodos mais comuns para tentativa de suicídio<sup>16,22,23</sup>.

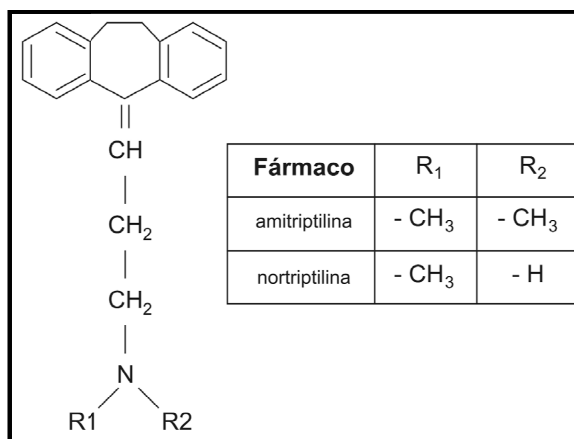
As manifestações clínicas dependem da dose ingerida, porém o número de comprimidos ingerido não é indicador de gravidade na intoxicação. A intoxicação tem início em 30 a 40 minutos após a ingestão e pode ser uma síndrome bastante complexa, observando-se manifestações anticolinérgicas evidentes. As manifestações constata-se em três fases para a intoxicação aguda: Numa primeira fase, que aparece no primeiro dia de intoxicação, observam-se manifestações anticolinérgicas como mucosas secas, hipertermia, hiperemia, visão turva, taquicardia, excitação, delírios, alucinações, etc., além de midríase. A segunda fase surge no segundo dia podendo persistir até o terceiro dia, com um quadro de depressão dos estímulos neuroquímicos, manifestando com diminuição do nível de consciência podendo chegar até ao coma, depressão respiratória com conseqüente hipóxia, hipotensão e hipotermia. A terceira fase, que aparece após o terceiro dia, manifestando com retorno do quadro de agitação e delírios. Podem surgir manifestações cardiovasculares nas primeiras horas de intoxicação, mas com manifestações clínicas mais importantes nas fases subsequentes. Geralmente para aqueles casos mais graves incluem arritmias como taquicardia sinusal que é um achado frequente em autópsias, taquicardia ou fibrilação ventricular<sup>11,17,24</sup>.

## 2.2 AMITRIPTILINA E NORTRIPTILINA

Os antidepressores, tal como foi anteriormente referido, podem ser classificados pela estrutura química, pelo mecanismo de acção ou por ambos. Amitriptilina (AMI) e nortriptilina (NORT) são ambos fármacos pertencentes ao grupo de antidepressores tricíclicos, nome este que provém da sua estrutura molecular. Apresentam os três anéis característicos interligados, e do anel central, sai uma cadeia lateral de três átomos de carbono com um grupo amina terminal,

figura . As diferenças entre elas decorrem da substituição no átomo de nitrogénio, tendo a amitriptilina um grupo amino terciário e a nortriptilina um grupo secundário

Esta diferença da sua estrutura química produz efeitos sobre a selectividade e potência da acção, isto é a inibição da recaptação da noradrenalina (NA)<sup>11,25</sup>.



Estrutura química dos antidepressores tricíclicos  
A) Amitriptilina, Nortriptilina e B) Promazina<sup>25</sup>

Na tabela 3 são apresentados algumas propriedades físicas destes três antidepressores.

**Tabela 3** - Algumas propriedades físicas da amitriptilina e nortriptilina<sup>26-28</sup>

Nome	Amitriptilina	Nortriptilina
Peso molecular (g/mol)	277,4	263,4
Formula Molecular	C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> N	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> N
Coefficiente de Partição Log P (octanol/ água)	4,94	1,7
Constante de dissociação pKa (25°C)	9,4	9,4
Coloração	Pó de cor amarelo pálido ou acastanhada;	Pó de cor branco
Solubilidade em água	(Praticamente insolúvel em água)	Solúvel 1 em 50 de água, 1em 10 de etanol Praticamente insolúvel em eter

A amitriptilina (AMI), pertence ao grupo de medicamentos antidepressores tricíclicos lipofílico<sup>11,26-29</sup>. A sua elevada lipossolubilidade, possibilita que atravesse a barreira

placentária e passe para o leite materno onde pode alcançar elevados valores de concentração. Foi sintetizada pela primeira vez em 1960 e introduzida em prática clínica em 1961. Mesmo 40 anos após a sua introdução no mercado ainda é uma droga muito utilizada, principalmente no tratamento de depressão<sup>11</sup>, especialmente em países desenvolvidos<sup>24</sup>.

A amitriptilina é rapidamente absorvida pela via oral e também é rapidamente absorvida pelos tecidos, na ordem dos 30 a 60%, atingindo a concentração plasmática o seu valor máximo entre 1 a 4 horas após a sua administração oral<sup>26,27</sup>. Entretanto, as vias intramusculares e intravenosas podem ser escolha nos casos de depressão grave e em pacientes que sofrem de anorexia<sup>5</sup>. É extensivamente metabolizada no fígado, mediante reacções de oxidação e posteriormente conjugado com ácido glucurónico<sup>24</sup> numa série de compostos mais polares. A biotransformação da amitriptilina, é catalisada principalmente pelas enzimas do citocromo P450<sup>24,30</sup>. A desmetilação é levada a cabo principalmente pela CYP2C19 convertendo-se no seu principal metabolito activo, a nortriptilina, e a hidroxilação é feita pela CYP2D6<sup>31-33</sup>, figura 2. Os dois compostos, distribuem-se largamente pelo organismo e ligam-se extensivamente às proteínas<sup>11</sup>. A amitriptilina é eliminada pela via renal, 35% pela urina, principalmente na forma dos seus metabólitos activos livres ou na forma conjugada e 8% é excretada pelas fezes. Tem uma semi-vida de eliminação de 9 a 50 horas<sup>11,26</sup>.

A nortriptilina, também pertence aos ATDs, possui farmacocinética semelhante a AMI. É o principal metabolito activo da AMI, responsável pelos efeitos farmacológicos da sua precursora, mas também se comercializa como fármaco. É extensamente hidroxilada (figura 3) e libertada na sua forma conjugada. Somente uma pequena percentagem é desmetilada em dinortriptilina. Atinge o pico máximo de concentração plasmática de 4 a 8 após a administração oral. Os compostos hidroxilados são excretados, pela urina, na maior parte na forma de conjugado, enquanto cerca de 8% dos metabólitos são eliminados nas fezes de forma inalterada<sup>26,27,33,34</sup>.

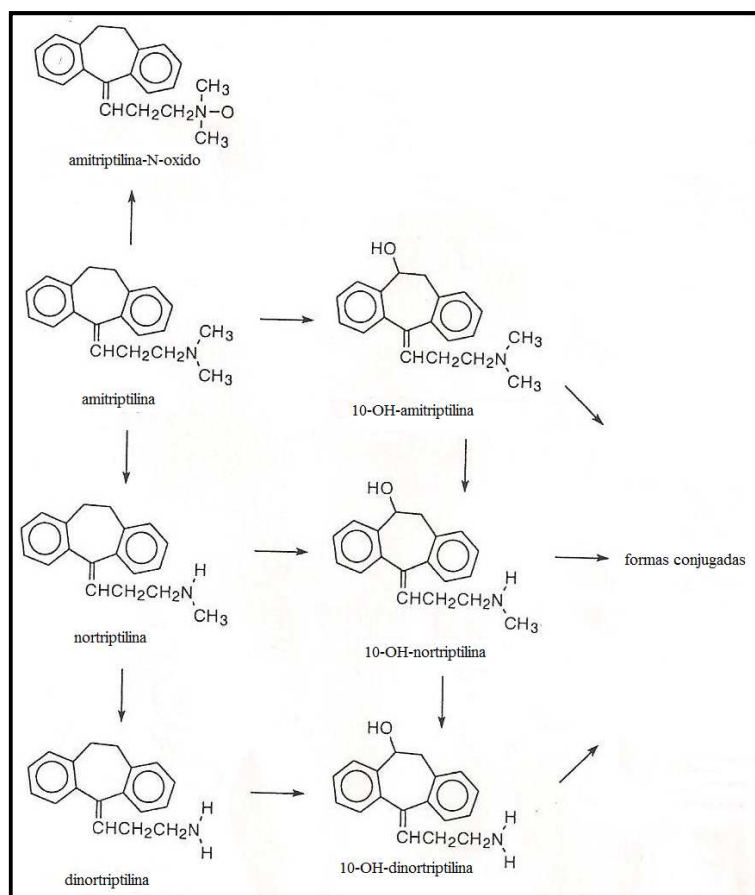


Figura 2 - Principais produtos de biotransformação da Amitriptilina<sup>26,27</sup>

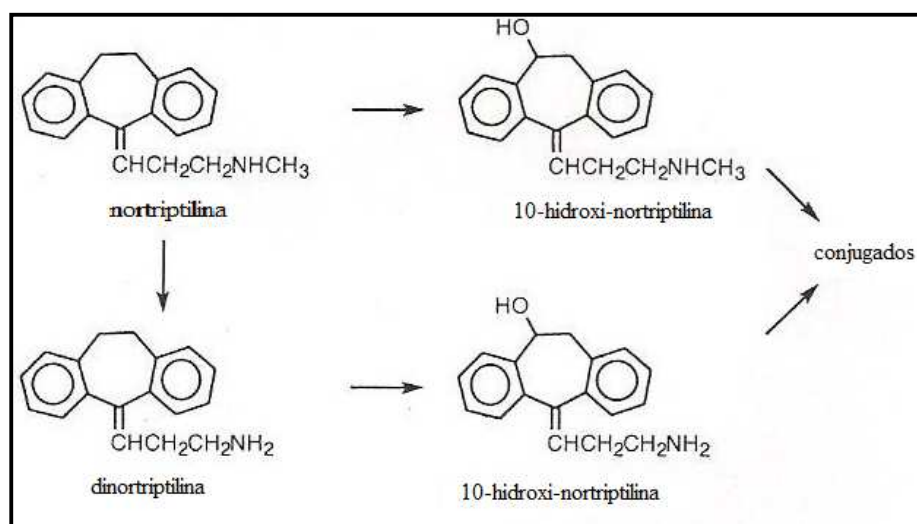


Figura 3 - Principais produtos de biotransformação da Nortriptilina<sup>26,27</sup>

Dos efeitos adversos da amitriptilina e nortriptilina há que realçar os efeitos antimuscarínicos que incluem boca seca, retenção urinária, visão turva, pressão ocular elevada e hipertermia.

Existem outros efeitos colaterais que também são muitos frequentes: gastrointestinais (náuseas, vômitos, dor abdominal, diarreia), psíquicos (agitação, ansiedade, insónia, nervosismo, alterações do sono, fadiga), efeitos neurológicos (tremores, efeitos extra-piramidais)<sup>7,11,34,35</sup>.

Na tabela 4 são representados os valores de dose terapêutica, tóxica e letal para amitriptilina e nortriptilina.

**Tabela 4-** Doses terapêuticas, dose tóxica e dose letal de AMI e NORT em sangue<sup>26-28</sup>.

Antidepressores	Dose terapêutica (µg/mL)	Dose tóxica (µg/mL)	Dose letal (µg/mL)
Amitriptilina	0,05-0,25	0,3 – 0,5	2
Nortriptilina	(0,05) 0,07-0,25	>0.25	1 – 3

## 2.3 MATRIZES BIOLÓGICAS

Actualmente são várias as amostras biológicas utilizadas em toxicologia forense e clínica, com o objectivo de detectar e quantificar analitos. Existem vários trabalhos publicados sobre a determinação e quantificação da amitriptilina e do seu metabolito nortriptilina, em diversas matrizes, com diferentes técnicas de extracção e análise por diversas técnicas cromatográficas.

A *urina* é a amostra geralmente usada para procedimentos de screening, dada a sua facilidade de colheita, volume disponível e elevadas quantidades de substâncias usualmente encontradas nesta matriz<sup>36-38</sup>. É também sem dúvida um importante instrumento na análise toxicológica para verificar a exposição recente de drogas de abuso e/ou medicamentos<sup>39</sup>. O *Sangue* é a matriz de eleição para a quantificação de substâncias detectadas<sup>39,40</sup>, havendo também outras matrizes alternativas como o *cabelo*<sup>41,42</sup>, a *saliva*<sup>43,44</sup> e o *plasma*<sup>45-47</sup> usadas em toxicologia forense na análise de diversas substâncias. A *saliva* é uma matriz que tem despertado maior interesse, nos últimos anos, devido às vantagens que demonstra em relação as outras matrizes, nomeadamente a nível da facilidade e rapidez de recolha e pelo facto de reflectir melhor a concentração dos medicamentos na sua forma livre<sup>44</sup>. Relativamente ao *plasma* e ao *soro* são amostras muito utilizadas para procedimentos de screening e de quantificação<sup>45-48</sup>.

Em toxicologia forense o sangue total, matriz de grande complexidade, é o mais usado para a pesquisa de substâncias desconhecidas. O sangue periférico e o femoral são as matrizes de eleição para quantificação das substâncias confirmadas. O fígado é uma matriz alternativa importante, pois pode ser usada para determinações quando o sangue não está disponível ou como seu complemento.

## 2.4 TÉCNICAS DE EXTRACÇÃO

Para análise cromatográfica em amostras biológicas é necessário proceder a um pré-tratamento com o propósito de separar, reter as substâncias relevantes e remover todas aquelas que possam causar interferência. Para este efeito existem diversas técnicas de extracção de amostras biológicas que abrangem etapas de extracção, pré-concentração e purificação no sentido de eliminar os interferentes (compostos endógenos ou outros fármacos administrados concomitantemente com os analitos) e aumentar a sensibilidade e selectividade analítica. Na pesquisa efectuada no âmbito da determinação de amitriptilina e nortriptilina em amostras biológicas foi encontrada referência a métodos de Extracção Líquido - Líquido (LLE)<sup>47,49</sup>, ou Extracção em Fase Sólida (SPE) utilizando cartuchos específicos<sup>50</sup>. A selecção de um ou outro dependerá do tipo de amostra a analisar, do método cromatográfico empregue e a necessidade de obter resultados em pouco tempo. Foi também encontrada referência à utilização de Microextracção Líquido - Líquido Dispersivo (DMLLE)<sup>48</sup> e a Microextracção em Fase Sólida (SPME)<sup>51-54</sup>.

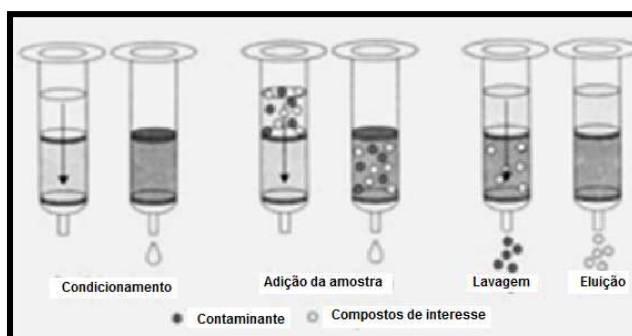
### 2.4.1 EXTRACÇÃO LÍQUIDO – LÍQUIDO

Nesta técnica de extracção de antidepressores deve-se ter em conta as propriedades físico-químicas das substâncias para a melhor selecção dos solventes de extracção. O solvente deve como é óbvio, extrair a maior quantidade possível de substâncias de interesse da matriz em que se encontra, e minimizar a extracção de substâncias indesejadas. Devido ao carácter básico dos antidepressores, as amostras devem inicialmente ser alcalinizadas com NaOH, ou tampões básicos para obter um pH geralmente superior a 9,5. Os solventes referidos para a extracção de ATDs, das matrizes biológicas incluem n-hexano, n-heptano, éter dietílico, clorobutano, acetato de etilo, pentanol, metanol e etanol<sup>36,40,44,49,55,56</sup>.

Acredita-se que a extracção líquido-líquido (LLE) não é o procedimento mais adequado para a extracção de fármacos assim como outros analitos a partir de fluidos biológicos, porque a mesma apresenta desvantagens, tais como, consumo de solventes orgânicos de alta pureza, exposição do analista a compostos tóxicos, várias etapas de execução e formação de emulsão entre as fases, o que resulta na perda do analito<sup>57,58</sup>

#### 2.4.2 EXTRACÇÃO EM FASE SÓLIDA

A extracção em fase sólida (SPE), técnica que foi utilizado no presente trabalho, está muito difundida entre os diversos laboratórios, em especial os de toxicologia, pelo simples facto de ser uma técnica que permite não só a extracção dos analitos, mas também possibilita a sua concentração e pré-purificação. Muito relevante é o facto de que não é necessário que o solvente seja insolúvel no fluido que contém a amostra, logo esta é uma vantagem sobre aqueles que utilizam extracção com solventes (como por exemplo a LLE). Um processo de extracção em fase sólida abrange varias etapas: activação do sorvente (condicionamento do cartucho), remoção dos interferentes, etapa da lavagem e eluição dos analitos. Como desvantagem da técnica podemos apontar o bloqueio dos poros da fase extractora pelos componentes da matriz<sup>59,60</sup>. A figura 4 resume as várias fases da SPE<sup>61</sup>.



**Figura 4** - Etapas em SPE para o isolamento de um composto

Na determinação de antidepressores tricíclicos em amostras biológicas foram utilizadas mais frequentemente como fase adsortiva: Colunas HLB (copolímero macroporoso de N-Vinilpirrolidona e Divinilbenzeno)<sup>61,62</sup>, C18<sup>47,59,60-65</sup>, e outros menos utilizados foram polímeros de estireno dibenzeno<sup>66</sup> e C<sub>8</sub><sup>67,68</sup>.

## 2.5 CROMATOGRAFIA DE GÁS ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA

A cromatografia de gás (GC) e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com diferentes detectores (GC/MS<sup>36,41,47,60,68,69</sup>, GC/DNP<sup>37,70,71</sup>, GC/FID<sup>52,72</sup>, HPLC/MS<sup>47,73-75</sup>, HPLC/MS/MS<sup>76,77</sup>, HPLC/UV<sup>44,47,78</sup> a 254 nm e LC/UV-DAD<sup>79</sup>), têm sido utilizadas na quantificação de antidepressores em extractos de fluidos biológicos.

As técnicas de GC/MS e HPLC/MS são as mais utilizadas na determinação dos antidepressores em especial os ATDs Amitriptilina e a Nortriptilina, em diferentes fluidos biológicos.

A cromatografia, técnica que foi inventada pelo botânico Russo Mikhail Tswett no início do século 20,<sup>80</sup> é um poderoso método de separação que tem aplicação em vários ramos da ciência. As aplicações cromatográficas cresceram de modo significativo nos últimos 50 anos<sup>81</sup>. Este facto deve-se não só ao desenvolvimento de técnicas cromatográficas, mas também à necessidade crescente de melhores métodos para separar misturas complexas. A cromatografia é definida como um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição destes componentes entre duas fases, que estão em contacto íntimo. Uma das fases permanece estacionária enquanto a outra se move através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos, de tal forma que cada um dos componentes é selectivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais destes componentes<sup>80,82-84</sup>.

No trabalho que realizámos foi utilizada a cromatografia de gás acoplado a espectrometria de massa. Na figura 5 é apresentado em esquema um GC/MS com indicação dos componentes básicos.



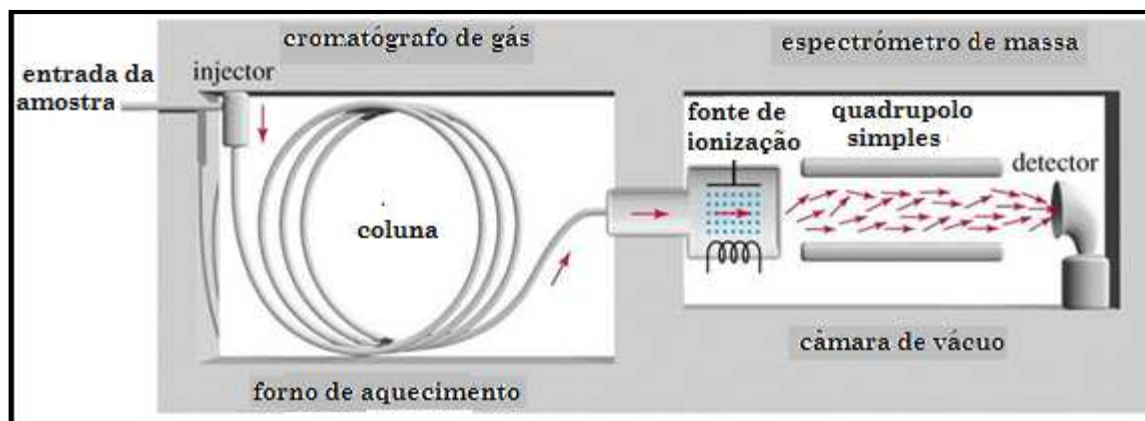


Figura 5 - Diagrama de blocos de um cromatógrafo de gás acoplado a um espectrômetro de massa

## 2.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

A interpretação dos resultados toxicológicos obtidos através de uma determinada metodologia analítica depende da fiabilidade do mesmo. Para tal, é fundamental que os métodos analíticos, sigam um processo de validação. A validação de um procedimento analítico visa demonstrar que um determinado método usado é adequado para o fim a que foi inicialmente proposto.

No sentido de primar com o rigor do trabalho laboratorial esse tem de obedecer a limites de controlo, limites esses que são estabelecidos no processo de validação.

Face ao crescimento dos procedimentos de certificação e acreditação da qualidade que vem surgindo nos últimos anos, é de suma importância a validação dos métodos de análise, usados num laboratório de toxicologia forense. Por outro lado dá-nos um suporte de confiança na hora de justificar/defender um determinado resultado perante as instâncias judiciais.

O principal objectivo de validação de um método é a identificação das influências significativas que afectam a precisão e exactidão do método de análise, visto que existem incertezas inerentes ao procedimento analítico que não podem ser eliminadas.

São várias as publicações onde se encontram procedimentos que se deve seguir na validação de novos procedimentos analíticos, assim como os critérios mínimos que devem satisfazer<sup>84-90</sup>.

Os parâmetros de validação analítica adoptados no desenvolvimento desta metodologia foram de acordo com as normas ISO<sup>91-94</sup>, ICH<sup>95</sup>, IUPAC<sup>96</sup>, SOFT/ AAS<sup>97</sup>.

## 2.6.1 PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO

Os parâmetros de validação de um método analítico mais significativos que devem ter em conta para determinações quantitativas de um ou vários analitos numa determinada matriz biológica, são: Especificidade/selectividade, linearidade/gama de trabalho, arrastamento (*carryover*), limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), eficiência da extração, repetibilidade, precisão intermédia e exactidão. A continuação se definido os parâmetros de validação<sup>90-101</sup>.

### 2.6.1.1 ESPECIFICIDADE/ SELECTIVIDADE

É a capacidade que o método analítico tem para diferenciar e determinar inequivocamente um composto específico que possa estar presente numa amostra na presença de componentes da matriz, impurezas, produtos de degradação, metabolitos.

Para análise qualitativa é necessário demonstrar a capacidade que possui um método de seleccionar um composto entre os vários com estruturas relacionadas e que podem estar presentes na amostra. Isto confirma-se pela obtenção de resultados positivos em amostras contendo o analito, comparativamente com resultados negativos obtidos com amostras que não contém o analito (brancos). A especificidade e a selectividade estão relacionadas ao evento da detecção. A especificidade refere-se a um método específico para um único analito e a selectividade refere-se a um método utilizado para vários analitos com capacidade de distinção entre eles. Para o estudo deste parâmetro deve ter pelo menos seis amostras de origens diferentes.

### 2.6.1.2 LINEARIDADE

É a capacidade de uma metodologia analítica demonstrar que os resultados obtidos são directamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Para cada analito na mesma matriz é construída uma recta de calibração, devendo ser preparada por adição de concentrações conhecidas do mesmo. Este não é um método quantificável e pode ser estudada com padrão interno ou externo, e é observada graficamente ou então efectuando testes de significância para não linearidade. O coeficiente

de correlação linear ( $r$ ) é frequentemente usado para indicar a adequabilidade da curva como modelo matemático. Um valor maior que 0,90 é, usualmente, requerido.

#### 2.6.1.3 GAMA DE TRABALHO

É o intervalo de concentração do analito, entre o valor baixo e o valor alto, na matriz na qual foi demonstrado que o procedimento analítico tem um nível adequado de precisão, exactidão, e linearidade. Para o estudo deste parâmetro deve-se utilizar pelo menos seis níveis de concentração, dispostos de forma equidistante. Cada controlo deve ser estudado em triplicado. Após a determinação deste parâmetro no processo de validação, as curvas de calibração a efectuar durante o processo de rotina poderá ser efectuada com menos níveis de concentração e um menor número de réplicas.

#### 2.6.1.4 ARRASTAMENTO (CARRYOVER)

Carryover é um fenómeno que em ensaios cromatográficos pode ser associado ao amostrador automático ou à coluna. No que diz respeito ao amostrador automático resulta de resíduos de amostras previamente injectadas, absorvidas e / ou presos na agulha do amostrador automático, porta de injeção, tubo de transferência, loop de amostra, ou a válvula injectora. Introduce um erro positivo e conseqüentemente tem um impacto importante sobre a precisão, exactidão e a quantificação, mais significativamente em concentrações mais baixas do analito. Quanto ao carryover com origem na coluna, pode ser causada pelo resíduo de uma amostra previamente injectada na coluna, tanto na forma original e, ocasionalmente, em diferentes formas do analito que pode decompor-se.

#### 2.6.1.5 LIMITE DE DETECÇÃO (LOD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LOQ)

Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente na amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob condições experimentais estabelecidas. Este pode ser calculado de três maneiras diferentes: pela relação *signal-ruído*, *método visual* e *pelo método baseado em parâmetros da curva analítica*.

a) Método da relação sinal-ruído: Este método pode ser aplicado somente em procedimentos analíticos que mostram o ruído da linha de base. Para determinar a relação sinal-ruído, é feita a comparação entre a medição dos sinais de amostras em baixas concentrações conhecidas do

composto de interesse na matriz e um branco destas amostras. Assim, é estabelecida uma concentração mínima na qual a substância pode ser facilmente detectada. A relação sinal-ruído tem de ser igual ou superior a relação 3:1.

b) Método visual: determina-se o LOD utilizando a matriz com adição sucessiva de concentrações conhecidas da substância de interesse, de tal modo que se possa discriminar entre ruído e sinal analítico pela visualização da menor concentração visível (detectável).

c) Método baseado em parâmetros da curva analítica: O limite de detecção (LOD) pode ser calculado mediante a expressão:  $LOD = 3,3x \frac{S}{b}$ .

Onde  $S$  é o erro padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação e  $b$  é a inclinação da curva analítica (declive).

O limite de quantificação representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, com precisão e exactidão. Especificando o LOQ pode ser determinado pela metodologia seguida pelo LOD, mas já a relação sinal-ruído deve ser igual ou superior 10:1.

Também LQ pode ser calculado utilizando o método visual ou pela expressão matemática seguinte  $LOQ = 10x \frac{S}{b}$

O método mais utilizado é o da relação sinal-ruído para técnicas analíticas em geral, mas em técnicas analíticas de separação, como as cromatográficas entre outras, a medição do ruído não é trivial e às vezes é subjectiva (já que a curva analítica é construída com a área e não somente o sinal do detector). Picos maiores aumentam a relação sinal-ruído, resultando em LOD e LOQ mais baixos. Além disso, a determinação cromatográfica desses parâmetros deve considerar tanto o tipo quanto o tempo de uso da coluna.

O melhor caminho para resolver este problema do cálculo do LOD e LOQ é utilizar o método baseado nos parâmetros da curva analítica, que é estatisticamente mais confiável. A curva analítica deve conter a concentração correspondente ao LOQ.

#### 2.6.1.6 EFICIÊNCIA DA EXTRACÇÃO

Também conhecida como rendimento da extracção ou recuperação do analito, é a relação percentual entre a resposta obtida do detector a partir de uma quantidade de analito adicionado com uma posterior extracção e a resposta do mesmo detector para a quantidade de

analito teoricamente não extraído. A recuperação mede, eficiência do procedimento de extracção de um método analítico dentro de um limite de variação. A percentagem de aceitação para a de recuperação de um procedimento analítico deve estar o mais próximo possível de 100%. Porém, admitem-se valores menores, por exemplo, de 50 a 60%, desde que a recuperação seja precisa e exacta. Este teste deve ser realizado comparando-se os resultados analíticos de amostras extraídas a partir de três concentrações (baixa, média e alta) com os resultados obtidos com soluções padrão não extraídas, que representam 100% de recuperação.

#### 2.6.1.7 PRECISÃO

A precisão estuda a dispersão dos resultados obtidos em torno do valor desejado, numa experiência de várias medições duma mesma amostra. Este é um parâmetro que pode ser medido pela repetibilidade, precisão intermédia e a reprodutibilidade. O primeiro é efectuado dentro do mesmo laboratório, e pelo mesmo analista, sem variar a instrumentação e num curto periodo de espaço de tempo. A precisão intermédia estuda a variação que pode ocorrer no mesmo laboratório (já aqui varia-se o dia, o analista, a instrumentação e os equipamentos, se possível) determinações consecutivas (cinco).

A *reprodutibilidade* estuda e compara o grau de concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes, como em estudos colaborativos, tendo em conta factores como, o do próprio laboratório, os equipamentos usados, os analistas, o período de tempo em que é processada amostra. Este é um parâmetro de relevante importância, mas não é uns dos objectivos estudados neste trabalho.

Existem três termos muito usados para expressar a precisão de um método: o desvio padrão (DesvP), a variância e o coeficiente de variação (CV). As três grandezas são uma medida do afastamento dum determinado resultado em relação à média

#### 2.6.1.8 EXACTIDÃO

A exactidão descreve a proximidade da média dos resultados obtidos em um teste, numa determinada concentração em relação ao valor real, ou seja, é a relação entre o resultado encontrado pelo método e o valor aceite como verdadeiro. Ela é determinada por intermédio da precisão do método, deve-se elaborar no mínimo, cinco análises de utilizando três gamas diferentes de concentrações para os controlos, sendo uma em baixa, uma em média e outra em

alta. A exactidão de um método é afectada pelos componentes do erro sistemático (bias) e do erro aleatório, mas geralmente ela é usada apenas para avaliar o erro sistemático. Os processos normalmente utilizados para avaliar a exactidão de um método são, dentre outros: uso de materiais de referência, participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação.

Na tabela 5 apresentam-se os critérios de aceitação de um método de calibração no serviço de Toxicologia Forense do INML, IP-DC<sup>101,102</sup>.

**Tabela 5** - Critérios de aceitação de um método analito no STF-DC.

<b>Parâmetros</b>	<b>Âmbito da validação</b>	<b>Critérios</b>
<b>Selectividade/ Especificidade</b>	Método triagem	20% de falsos positivos e falsos negativos
	Método qualitativo	0% de falsos positivos e 10% de falsos negativos
<b>Exactidão ou Recuperação</b>	Métodos quantitativos	Recuperação média não deve ser significativamente diferente de 100%
<b>Repetibilidade</b>	Método resultado	CV <10% (gama medeia e alta)
		CV <20% (gama baixa)
<b>Gama de Trabalho</b>	Repetibilidade do método nos extremos (Áreas relativas) Limite mínimo = Limite de quantificação	CV < 10%
<b>Limite de detecção</b>	Métodos qualitativos e quantitativos	Adequado ao método
<b>Linearidade</b>	_____	Teste de linearidade de acordo com ISO 8466-1 (1990) ou análise de residuais + intercepção deve incluir o valor zero (intervalo de 95% de confiança) + $r > 0,99$
<b>Limite de quantificação</b>	Métodos quantitativos	CV <20%
	Erro	CV <20%

## **CAPÍTULO III – MATERIAIS E MÉTODOS**





### 3.1 AMOSTRAS BIOLÓGICAS

As amostras biológicas necessárias à realização do trabalho foram obtidas junto do Instituto Português do Sangue, I.P. por vias institucionais. Tratou-se de sangue humano proveniente de bolsas de doadores cujo prazo de validade já tinha terminado.

As amostras foram armazenadas à temperatura de  $-20(\pm 5)^{\circ}\text{C}$  até sua utilização. Antes do procedimento extractivo as amostras foram retiradas do congelador e deixadas atingir a temperatura ambiente. As amostras reais foram provenientes de autópsias realizadas no Serviço de Patologia Forense e em Gabinetes Médico-Legais pertencentes ao INML.

### 3.2 SOLVENTES

Em seguida apresentam-se os solventes usados na preparação de padrões, amostras e na extracção por fase sólida:

Metanol, LiChrosolv®: 99.9% de pureza (Merck), (Darmstadt – Germany);

Água ultra pura Milli-Q (Still);

Acetato de etilo LiChrosolv® 99.9% de pureza, para o GC (Merck KGaA), (Darmstadt – Germany).

### 3.3 MATERIAL

Foi utilizado material de uso corrente em laboratório como: balões volumétricos, copos e frascos de vidro ambos de 10 mL, tubos de plástico, tubo de vidro com tampas de rosca, vials de 300  $\mu\text{l}$ . Empregaram-se pipetas automáticas de 20, 25, 50, 100, 200 e 1000  $\mu\text{l}$  e doseadores.

### 3.4 INSTRUMENTAÇÃO UTILIZADA

#### 3.4.1 APARELHOS DE USO COMUM

Sistema de Vacuo Elut SPE 24, acoplado a uma bomba de vácuo AKNF com diafragma da Varian (Harbour City, CA, USA); Kitasato 1000 mL (Duran) figura 6; evaporador de solventes (com azoto), turbo Vap® LV (Caliper Life Science) figura 7; centrífuga (Sigma®)

figura 8; homogeneizador de amostras; agitador autovortex SA6 (Made IN UK); sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore) figura 9; câmaras frigoríficas.



**Figura 6** - Sistema de SPE



**Figura 7** - Evaporador



**Figura 8** - Centrifuga (Sigma)



**Figura 9** - Sistema de purificação de água (Milli-Q).

### 3.4.2 SISTEMA CROMATÓGRAFICO

Foi utilizado o sistema cromatográfico GC-MS-EI (figura 10). É um equipamento de Cromatografia Gasosa (GC), Hewlett-Packard, Agilent Technologies (Waldbronn, Germany) 6890N Series, equipado com injetor Split/ Splitless automático modelo HP 6890 Series, e

com um amostrador automático. Foi usada uma coluna analítica: HP-5MS 30 m x 0,32 mm x 0,25  $\mu$ m (Agilent 19091S-413) (J & W Scientific, Folsom, CA, USA).

Condições cromatográficas: Rampa de temperaturas - Temperatura inicial 130° C (2 minutos); 20° C/ minuto até atingir 270° C (onde permanecerá durante 8 Minutos); Injecção modo Split; temperatura de injecção = 200 °C; gás de arraste, 1.2 mL/ min.

O GC está acoplado a um detector de espectrometria de massas modelo HP Hewlett 5973 Packard (Waldbronn, Germany). Foram utilizados as seguintes condições: Temperatura do detector 250 °C, Voltagem de ionização 70 eV (por impacto electrónico, (EI)) e com uma corrente de filamento de 300  $\mu$ A; cromatograma obtido em modo SIM.



**Figura 10** - Cromatógrafo de Gás acoplado a detector de Espectrometria de Massa

## 3.5 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES

### 3.5.1 METANOL / ÁGUA 5% (V/V)

Num frasco de volume apropriado juntar 95 mL de água com 5mL de Metanol, agitar até homogeneizar. Manter esta solução refrigerada (2-8°C).

### 3.5.2 SOLUÇÕES DE PADRÕES DE ARMAZENAMENTO A 1 mg/mL

Os padrões foram adquiridos a firmas comerciais, em solução metanólica e armazenados a – 20 ( $\pm$ 5) °C. As referidas soluções são: Promazina (Riedell) usado como padrão interno, amitriptilina (Lipomed), nortriptilina (Sigma-Aldrich).

### 3.5.3 MISTURAS DE PADRÕES PRIMÁRIOS a 50 $\mu$ g/mL

Diluir em metanol 250  $\mu$ L das soluções a 1mg/mL, descritas em 3.5.2, até perfazer um volume de 5 mL.

### 3.5.4 MISTURAS DE TRABALHO DE PADRÕES A 5 $\mu$ g/mL

Diluir em metanol 500  $\mu$ L das soluções descritas em 3.5.3 até perfazer um volume de 5 mL.

### 3.5.5 MISTURA DE TRABALHO DE PADRÕES 0,5 $\mu$ g/mL

Diluir em metanol 500  $\mu$ L das soluções descritas em 3.5.4, até perfazer um volume de 5 mL.

### 3.5.6 PADRÃO INTERNO (PI) a10 $\mu$ g/mL

Diluir em metanol 100  $\mu$ L da solução de Promazina a 1 mg/ mL descritas em 3.5.2 até perfazer um volume de 10 mL.

Todas as soluções foram armazenadas a – 20 ( $\pm$ 5) °C.

### 3.6 PROCEDIMENTO ANALÍTICO

#### 3.6.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ENSAIO (AE)

As AP, para o nosso caso também consideradas como amostras de ensaio (AE), devem ser homogeneizadas por agitação suave, até atingirem uma temperatura próxima da ambiente. Durante a realização dos ensaios todas as amostras de ensaio (AE) devem estar claramente identificadas e com o código interno da amostra.

A diluição das AE e adição de Padrão Interno (PI) foi efectuada da seguinte maneira: Para tubos de 10 mL adicionar 500  $\mu\text{L}$  de amostra AE, 2 mL de água, 25  $\mu\text{L}$  de PI (solução descrita em 3.5.6) em seguida efectuou-se a homogeneização através de movimentos de rotação/inversão durante cerca de 10 segundos e centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos.

#### 3.6.2 PREPARAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO

A curva de calibração permite calcular a concentração das substâncias cuja presença nas amostras foi confirmada através da aplicação de um método de ensaio de confirmação qualitativo. Os calibradores são preparados tal como descrito no ponto 3.6.1 (utilizando amostras brancas) mas a fortificação é de acordo com a tabela 6.

**Tabela 6** -Preparação da curva de calibração.

<b>Calibradores</b>	<b>Mistura de trabalho<sup>a</sup> 0,5 <math>\mu\text{g/mL}</math></b>	<b>Mistura de trabalho<sup>b</sup> 5 <math>\mu\text{g/mL}</math></b>	<b>Solução de PI<sup>c</sup> 10 <math>\mu\text{g/mL}</math></b>
Calibrador 1 (25 ng/mL)	25 $\mu\text{L}$	—	25 $\mu\text{L}$
Calibrador 2 (50 ng/mL)	50 $\mu\text{L}$	—	25 $\mu\text{L}$
Calibrador 3 (100 ng/mL)	100 $\mu\text{L}$	—	25 $\mu\text{L}$
Calibrador 4 (300 ng/mL)	—	30 $\mu\text{L}$	25 $\mu\text{L}$
Calibrador 5 (500 ng/mL)	—	50 $\mu\text{L}$	25 $\mu\text{L}$
Calibrador 5 (750 ng/mL)	—	75 $\mu\text{L}$	25 $\mu\text{L}$
Calibrador 6 (1000 ng/mL)	—	100 $\mu\text{L}$	25 $\mu\text{L}$

*\*De cada uma das soluções preparadas como descrito em 3.5*

### 3.6.3 PREPARAÇÃO DOS CONTROLOS PARA QUALIDADE INTERNA (CQI)

A análise de amostras controlo positivas permite avaliar, em cada série analítica, a exactidão do método de ensaio. Os seus resultados também possibilitam a elaboração de carta de controlo, utilizadas para suportar critérios de aceitação/rejeição de análises. As amostras controlos negativas permitem avaliar, em cada sequência analítica, o efeito da matriz. Estas amostras devem ser preparadas e analisadas em simultâneo com as amostras de rotina. Para a sua análise mediu-se alíquotas de 500 µL de amostra branca e diluiu-se com 2mL de água, e num outro tubo preparou-se o branco de reagente que é a matriz substituída por uma porção equivalente de água desionizada. Os CQI devem ser preparados utilizando as soluções dos padrões de referência, de acordo com a tabela 7.

**Tabela 7** - Preparação dos CQI

<b>Controlos</b>	<b>Mistura de trabalho* 0,5 µg/mL</b>	<b>Mistura de trabalho* 5 µg/mL</b>	<b>Solução de PI* 10 µg/mL</b>
Controlo positivo (25 ng/mL)	25 µL	—	25 µL
Controlo positivo (500 ng/mL)	—	50 µL	25 µL
Controlo positivo (1000 ng/mL)	—	100 µL	25 µL
Amostra branca	—	—	25 µL
Branco de reagentes	—	—	25 µL

*\*Mistura preparada como 3.5.4 e 3.5.5*

## 3.6.4 EXTRACÇÃO EM FASE SÓLIDA

Este procedimento é efectuado seguindo os passos apresentados na tabela 8.

Através das colunas de extracção Waters Oasis HLB<sup>®</sup>, passar as seguintes soluções:

**Tabela 8** - Procedimento de extracção SPE

2 mL de metanol	<b>Acondicionamento</b>
2 mL de água desionizada	
O sobrenadante obtido em 3.6.1; 3.6.2; e em 3.6.3	<b>Aplicação da amostra</b>
2 mL de metanol/água 5%	<b>Lavagem</b>
Secar as colunas sob vácuo (cerca de 15 min) <sup>1</sup>	<b>Secagem das colunas</b>
2 mL de metanol	<b>Eluição</b>
Recolher o eluído obtido para um tubo de vidro e secar sob corrente de azoto a temperatura de 40°C	<b>Secagem dos extractos</b>
Adicionar ao extracto seco 50 µL de metanol e agitar cerca de 20 segundos e injectar 1µL no GC/MS-EI.	<b>Reconstituição das Amostras e injeção</b>

<sup>1</sup> Se necessário este tempo deve ser alterado até a secagem completa das colunas.



A figura 11 mostra o diagrama de fluxo do procedimento de extracção SPE.

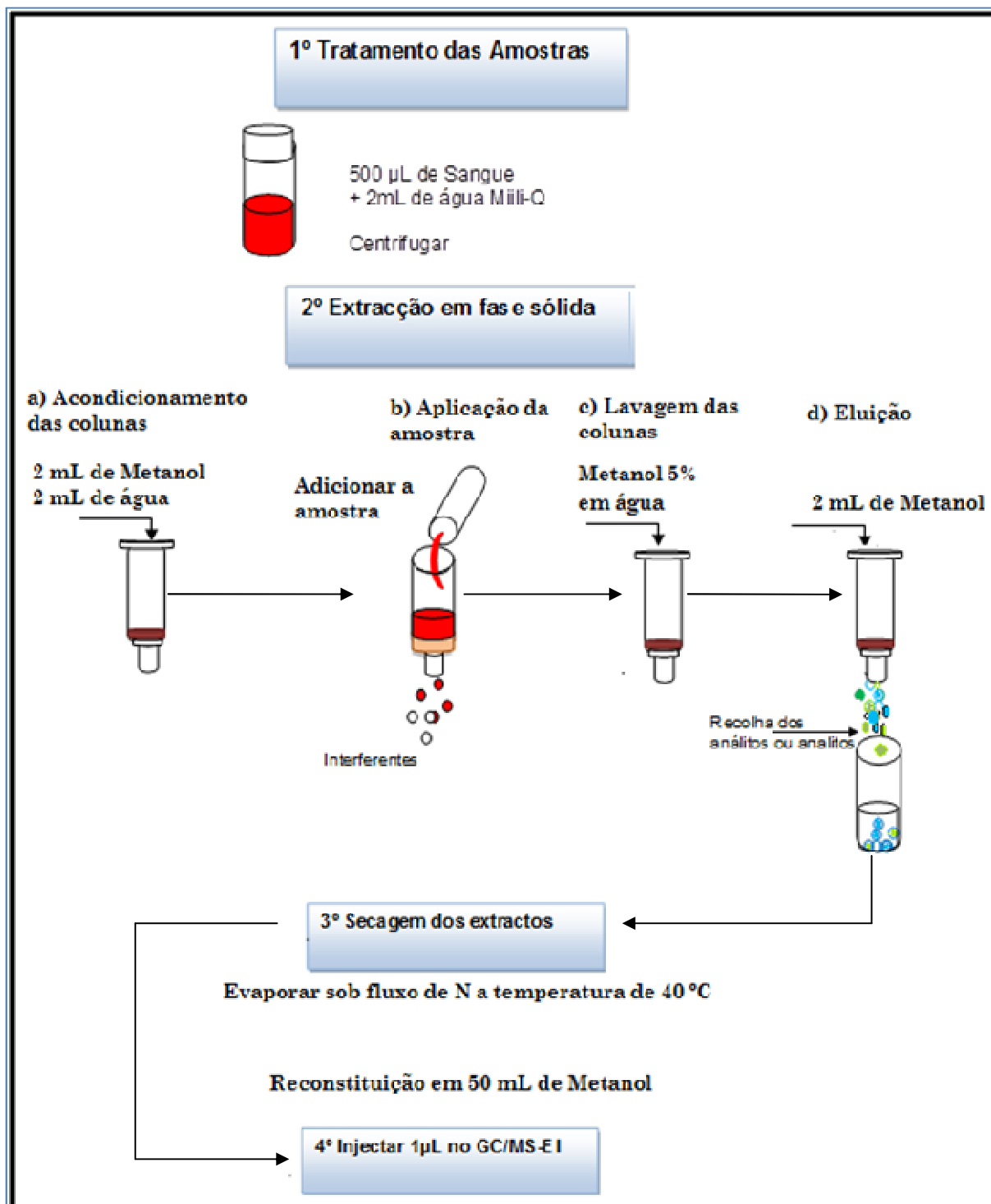


Figura 11 - Fluxograma de extracção em fase sólida de amitriptilina e nortriptilina em sangue total



# **CAPÍTULO IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO**



## 4.1 IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS

A selectividade foi definida através da avaliação da pureza na zona dos picos cromatográfico obtidos. No estudo para a identificação das substâncias teve-se em consideração o tempo de retenção de cada uma delas, determinado por injeção de soluções de padrões individuais de cada um dos analitos. A partir dos espectros de massa e dos respectivos tempos de retenção procedeu-se a identificação de cada uma das substâncias. Seleccionaram-se três iões para AMI e NORT, e um ião para a Promazina na monitorização, com base na relação de abundância existente entre cada um deles. Na tabela 9 estão resumidos os resultados do estudo dos dois analitos e do padrão. Nas figuras 12, 13 e 14 mostram-se os cromatogramas obtidos e os respectivos espectros de massa de cada uma das substâncias.

**Tabela 9-** Iões Seleccionados e tempos de retenção para amitriptilina, nortriptilina e a Promazina (PI)

<b>Substâncias</b>	<b>Tempo de Retenção (minutos)</b>	<b>Valores m/z dos Iões Seleccionados</b>
Amitriptilina	8,85	58; 202; 215
Nortriptilina	8,94	202; 215; 220
Promazina (PI)	9,50	284

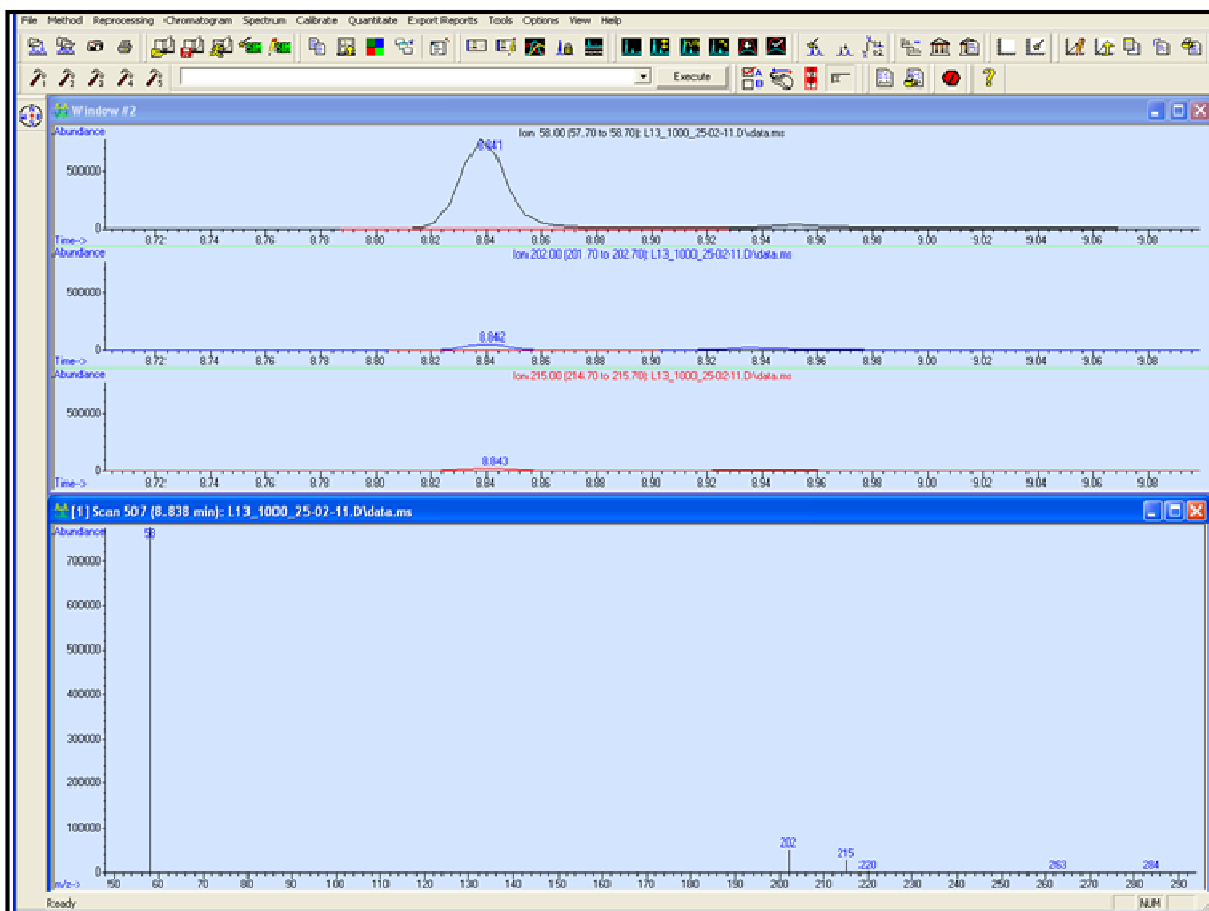


Figura 12 - Cromatograma e respectivo espectro de massas (modo SIM) da amitriptilina

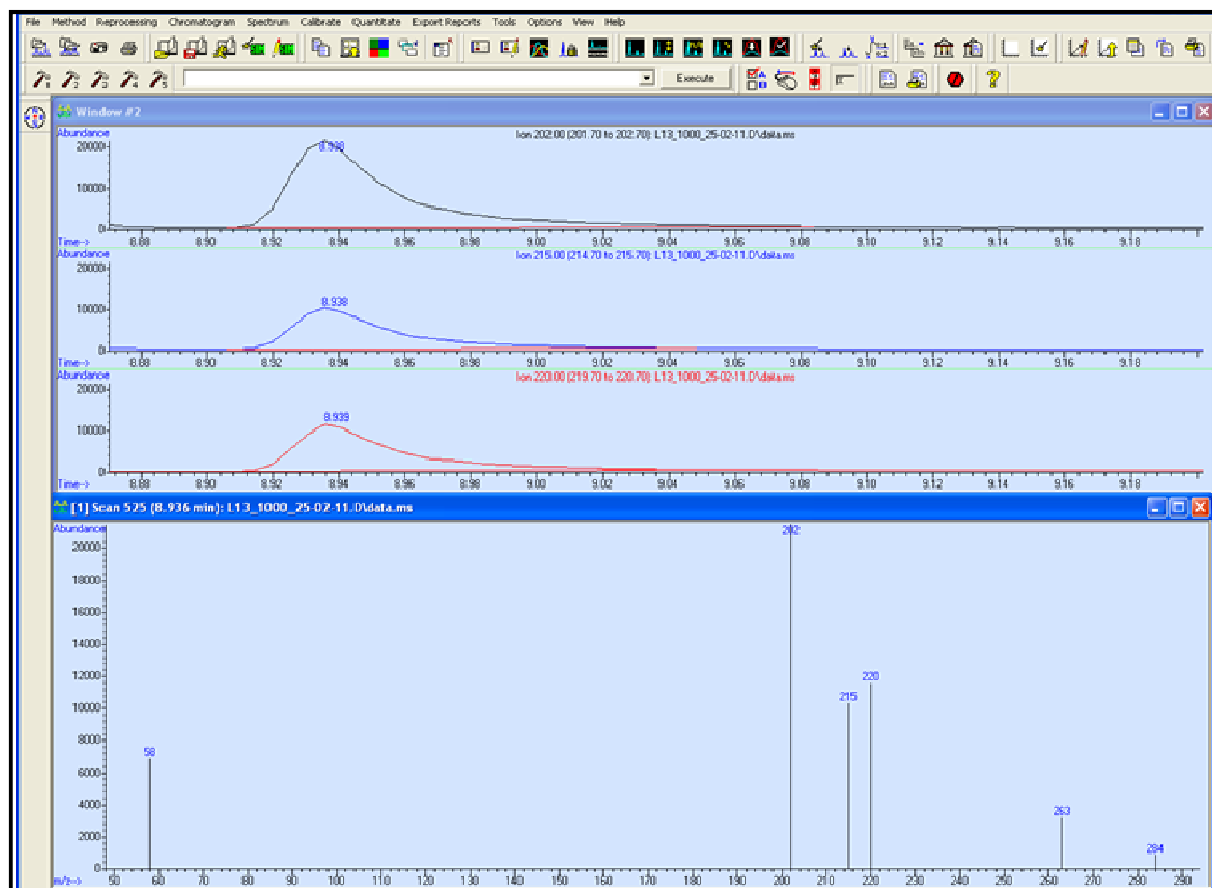


Figura 13 - Cromatograma e respectivo espectro de massas (modo SIM) da Nortriptilina

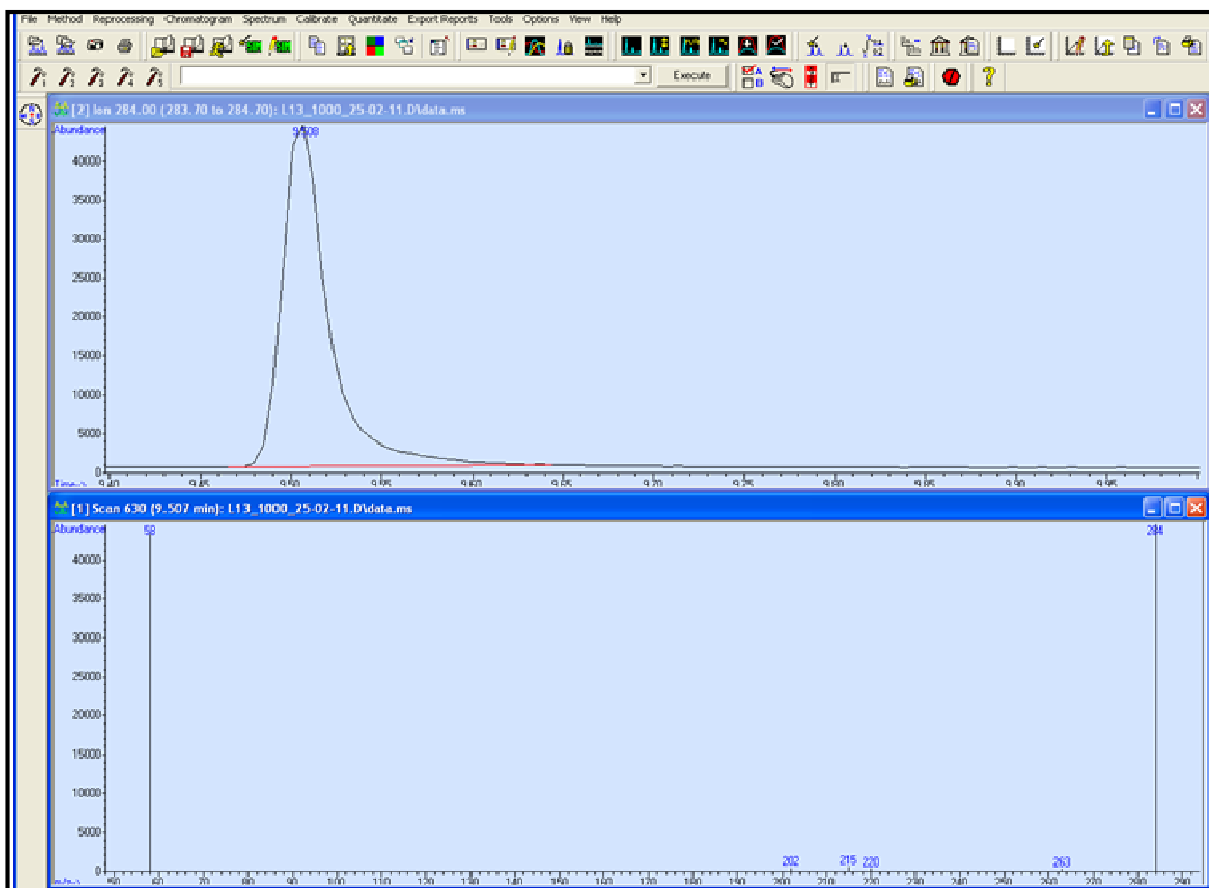


Figura 14 - Cromatograma e respectivo espectro de massas (modo SIM) da Promazina



## 4.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

### 4.2.1 ESPECIFICIDADE/SELECTIVIDADE

Na avaliação deste parâmetro foram usadas 75 amostras de sangue (relativas aos anos de 2007/2008), negativas para AMI, NORT e Promazina após efectuado análise de rotina (identificação e confirmação) por GC/MS. Estas amostras resultaram de colheitas efectuadas em indivíduos vivos (obtidas no âmbito do Código da Estrada e do Serviço da Clínica Forense) e no decorrer de autópsias (realizadas no Serviço de Patologia Forense da Delegação de Centro e nos Gabinetes Médico-Legais sob a sua dependência).

Utilizaram-se 40 amostras escolhidas aleatoriamente do universo das 75 já referidas. Das 40 amostras escolhidas misturaram-se, também de forma aleatória, quatro a quatro (2 mL de cada uma delas) constituindo-se assim 10 misturas ou pools. Foram medidas 2 alíquotas de 500  $\mu$ L de cada uma das misturas (pools) constituídas conforme indicado na tabela 10. A um dos dois grupos de 10 alíquotas foram adicionados: 25 $\mu$ L solução de padrão Interno Promazina a uma concentração de 10  $\mu$ g/mL e os padrões das substâncias em estudo (a partir das misturas de trabalho de AMI e NORT nas concentrações de 0,5 e 5  $\mu$ g/mL) obtendo-se uma alíquota fortificada com concentração final de 100 ng /mL; ao outro grupo de 10 alíquotas nada foi adicionado. Foi aplicado o procedimento de ensaio a todas as amostras (dos dois grupos).

A *positividade/negatividade* das amostras foi avaliada com base nos critérios de identificação de substâncias, como tempo de retenção relativo (TRR), relações iónicas dos iões estudados e razão sinal/ruído<sup>102</sup>.

Tabela 10 - Sangues usados para constituir as misturas (pools)

Amostra	Causa de morte/Indivíduo vivo	Tipo de sangue	Resultados para ADs	Misturas (Pools)
1	Desconhecida	Sangue	Neg	
2	Desconhecida	Sangue	Neg	1
3	Desconhecida	Sangue	Neg	
4	Enforcamento	Periférico	Neg	
5	Desconhecida	Cardíaco	Neg	
6	Acidente de viação	Sangue	Neg	2
7	Morte Súbita	Sangue	Neg	
8	Desconhecida	Periférico	Neg	
9	Desconhecida	Sangue	Neg	
10	Desconhecida	Sangue	Neg	
11	Desconhecida	Sangue	Neg	3
12	Desconhecida	Cardíaco	Neg	
13	Acidente de trabalho	Sangue	Neg	
14	Vivo	Sangue	Neg	
15	Acidente de viação	Sangue	Neg	4
16	Morte Súbita	Sangue	Neg	
17	Acidente de viação	Sangue	Neg	
18	Acidente de viação	Sangue	Neg	
19	Suspeita de intoxicação	Sangue	Neg	5
20	Acidente de viação	Femoral	Neg	
21	Desconhecida	Sangue	Neg	
22	Desconhecida	Sangue	Neg	6
23	Enforcamento	Sangue	Neg	
24	Morte Súbita	Sangue	Neg	
25	Afogamento	Torácico	Neg	
26	Desconhecida	Sangue	Neg	
27	Morte Súbita	Sangue	Neg	7
28	Acidente de trabalho	Periférico	Neg	
29	Acidente de trabalho	Periférico	Neg	
30	Acidente de viação	Torácico	Neg	8
31	Acidente de viação	Sangue	Neg	
32	Morte Súbita	Femoral	Neg	
33	Vivo	Periférico	Neg	
34	Vivo	Periférico	Neg	9
35	Vivo	Periférico	Neg	
36	Vivo	Periférico	Neg	
37	Vivo	Periférico	Neg	
38	Vivo	Periférico	Neg	
39	Vivo	Periférico	Neg	10
40	Vivo	Periférico	Neg	

4.2.1.1 Critérios para o Tempo de retenção (TR) e o Tempo de retenção relativo (TRR)

No que diz respeito ao Tempo de retenção os critérios estabelecidos são: de <2% ou 0,1.

O TRR da substância a examinar na amostra não deve diferir mais de 1% do TRR da mesma substância na amostra controle analisada e nas mesmas condições T.R.R.<sup>102</sup>

$$\Delta TRR = \frac{TRR_{Subst.Pesquisada} - TRR_{Subst.Controlo}}{TRR_{Subst.Controlo}}$$

$TRR_{Subst.Pesquisada}$  - Tempo de retenção relativo da substância pesquisada na amostra;

$TRR_{Subst.Controlo}$  - Tempo de retenção relativo da substância na amostra controle;

$\Delta TRR$  - Diferença relativa de TRR.

4.2.1.2 Critério das relações iônicas

As áreas relativas dos íons diagnóstico da substância pesquisada na amostra devem cumprir os critérios definidos na tabela 11<sup>102</sup>.

**Tabela 11** - Tolerância máxima para as áreas relativas dos íons diagnósticos

Abundância relativa (% do pico base)	Tolerância (%)
>50	±10 (absoluto)
25 - 50	±20(Relativas)
5 - 25	±5 (absoluto)
<5	±50% (Relativas)

4.2.1.3 Critério do Sinal/ Ruído

Por fim a aplicação do critério do Sinal/ Ruído (S/N) implica que o valor da razão sinal/ruído para os três íons diagnóstico da substância pesquisada na amostra deve ser superior a 3.

Nas tabelas 12 e 13, apresentam-se os resultados obtidos na avaliação dos critérios anteriormente descritos na selectividade/ especificidade, para as amostras positiva. Todos os resultados foram obtidos de forma automática utilizando software, através das respectivas áreas de cada composto e do PI para confirmação dos resultados. Nas tabelas 35 e 36 em anexo estão exemplificas com uma tabela para as confirmações da amitriptilina e nortriptilina.

Tabela 12 -Estudo da Especificidade/ Selectividade da Amitriptilina

A AMITRIPTILINA		CONTROLO										Critérios		
m/z	ÁREA ABSOL	ÁREA RELAT	S/N	TRA	TRR	ÁREA ABSOL	ÁREA RELAT	S/N	TRA	TRR	Rel iónicas	S/N	TRR	
58	578453	100	92.8	8,86	0,931	673559	100,0	185	8,85	0,930	2,4/12,4 0,8/9,2	>3	≤1	
202	43454	7,5	67	8,86	0,931	49853	7,4	39	8,85	0,930		>3	≤1	
215	16279	2,8	36.6	8,86	0,931	28078	4,2	37,1	8,85	0,930		>3	≤1	
B AMITRIPTILINA		CONTROLO										2,4/12,4 0,8/9,2 <td>&gt;3</td> <td>≤1</td>	>3	≤1
m/z	ÁREA ABSOL	ÁREA RELAT	S/N	TRA	TRR	ÁREA ABSOL	ÁREA RELAT	S/N	TRA	TRR	>3		≤1	
58	673559	100,0	85.7	8,86	0,931	673559	100,0	185	8,85	0,930	>3		≤1	
202	49853	7,4	62.2	8,86	0,931	49853	7,4	39	8,85	0,930	>3	≤1		
215	28078	4,2	40.3	8,86	0,931	28078	4,2	37,1	8,85	0,930	>3	≤1		
C AMITRIPTILINA		CONTROLO										2,4/12,4 0,8/9,2 <td>&gt;3</td> <td>≤1</td>	>3	≤1
m/z	ÁREA ABSOL	ÁREA RELAT	S/N	TRA	TRR	ÁREA ABSOL	ÁREA RELAT	S/N	TRA	TRR	>3		≤1	
58	601157	100,0	63.3	8,86	0,931	673559	100,0	185	8,85	0,930	>3		≤1	
202	45737	7,6	28.2	8,86	0,931	49853	7,4	39	8,85	0,930	>3	≤1		
215	14513	2,4	38.3	8,86	0,931	28078	4,2	37,1	8,85	0,930	>3	≤1		
D AMITRIPTILINA		CONTROLO										2,4/12,4 0,8/9,2 <td>&gt;3</td> <td>≤1</td>	>3	≤1
m/z	ÁREA ABSOL	ÁREA RELAT	S/N	TRA	TRR	ÁREA ABSOL	ÁREA RELAT	S/N	TRA	TRR	>3		≤1	
58	581180	100,0	35.4	8,86	0,931	673559	100,0	185	8,85	0,930	>3		≤1	
202	42584	7,3	38.4	8,86	0,931	49853	7,4	39	8,85	0,930	>3	≤1		
215	13980	2,4	45.5	8,86	0,931	28078	4,2	37,1	8,85	0,930	>3	≤1		
E AMITRIPTILINA		CONTROLO										2,4/12,4 0,8/9,2 <td>&gt;3</td> <td>≤1</td>	>3	≤1
m/z	ÁREA ABSOL	ÁREA RELAT	S/N	TRA	TRR	ÁREA ABSOL	ÁREA RELAT	S/N	TRA	TRR	>3		≤1	
58	521604	100,0	58.1	8,86	0,931	673559	100,0	185	8,85	0,930	>3		≤1	
202	40604	7,8	48	8,86	0,931	49853	7,4	39	8,85	0,930	>3	≤1		
215	7344	1,4	55.2	8,86	0,931	28078	4,2	37,1	8,85	0,930	>3	≤1		
F AMITRIPTILINA		CONTROLO										2,4/12,4 0,8/9,2 <td>&gt;3</td> <td>≤1</td>	>3	≤1
m/z	ÁREA ABSOL	ÁREA RELAT	S/N	TRA	TRR	ÁREA ABSOL	ÁREA RELAT	S/N	TRA	TRR	>3		≤1	
58	655970	100,0	65.2	8,86	0,931	673559	100,0	185	8,85	0,930	>3		≤1	
202	47777	7,3	67	8,86	0,931	49853	7,4	39	8,85	0,930	>3	≤1		
215	13618	2,1	59.6	8,86	0,931	28078	4,2	37,1	8,85	0,930	>3	≤1		
G AMITRIPTILINA		CONTROLO										2,4/12,4 0,8/9,2 <td>&gt;3</td> <td>≤1</td>	>3	≤1
m/z	ÁREA ABSOL	ÁREA RELAT	S/N	TRA	TRR	ÁREA ABSOL	ÁREA RELAT	S/N	TRA	TRR	>3		≤1	
58	636724	100,0	114.1	8,86	0,931	673559	100,0	185	8,85	0,930	>3		≤1	
202	46333	7,3	93	8,86	0,931	49853	7,4	39	8,85	0,930	>3	≤1		
215	14066	2,2	33.7	8,86	0,931	28078	4,2	37,1	8,85	0,930	>3	≤1		
H AMITRIPTILINA		CONTROLO										2,4/12,4 0,8/9,2 <td>&gt;3</td> <td>≤1</td>	>3	≤1
m/z	ÁREA ABSOL	ÁREA RELAT	S/N	TRA	TRR	ÁREA ABSOL	ÁREA RELAT	S/N	TRA	TRR	>3		≤1	
58	631617	100,0	99.3	8,86	0,931	673559	100,0	185	8,85	0,930	>3		≤1	
202	47675	7,5	63.8	8,86	0,931	49853	7,4	39	8,85	0,930	>3	≤1		
215	15198	2,4	30.9	8,86	0,931	28078	4,2	37,1	8,85	0,930	>3	≤1		
I AMITRIPTILINA		CONTROLO										2,4/12,4 0,8/9,2 <td>&gt;3</td> <td>≤1</td>	>3	≤1
m/z	ÁREA ABSOL	ÁREA RELAT	S/N	TRA	TRR	ÁREA ABSOL	ÁREA RELAT	S/N	TRA	TRR	>3		≤1	
58	774659	100,0	60.4	8,86	0,931	673559	100,0	185	8,85	0,930	>3		≤1	
202	57387	7,1	88	8,86	0,931	49853	7,4	39	8,85	0,930	>3	≤1		
215	19644	2,5	38.5	8,86	0,931	28078	4,2	37,1	8,85	0,930	>3	≤1		
J AMITRIPTILINA		CONTROLO										2,4/12,4 0,8/9,2 <td>&gt;3</td> <td>≤1</td>	>3	≤1
m/z	ÁREA ABSOL	ÁREA RELAT	S/N	TRA	TRR	ÁREA ABSOL	ÁREA RELAT	S/N	TRA	TRR	>3		≤1	
58	646657	100,0	78	8,86	0,931	673559	100,0	185	8,85	0,930	>3		≤1	
202	46162	7,1	70.5	8,86	0,931	49853	7,4	39	8,85	0,930	>3	≤1		
215	12436	1,9	46.5	8,86	0,931	28078	4,2	37,1	8,85	0,930	>3	≤1		

Tabela 13 - Estudo da Especificidade/ Selectividade Nortriptilina

A NORTRIPTILINA		CONTROLO					Critérios						
m/z	ÁREA ABSOL	ÁREA RELAT	S/N	TRA	TRR	ÁREA ABSOL	ÁREA RELAT	S/N	TRA	TRR	Rel iónicas	S/N	TRR
202	41712	100,0	4.7	8,96	0,941	41234	100,0	20.4	8,95	0,94	35,5/53,3	>3	≤1
215	19256	46,2	15.2	8,96	0,941	19256	44,8	10.8	8,95	0,94		>3	≤1
220	20181	48,4	3.0	8,96	0,941	22674	55,0	10.7	8,95	0,94		>3	≤1
B NORTRIPTILINA		CONTROLO											
m/z	ÁREA ABSOL	ÁREA RELAT	S/N	TRA	TRR	ÁREA ABSOL	ÁREA RELAT	S/N	TRA	TRR			
202	42136	100,0	5.0	8,96	0,941	41234	100,0	20.4	8,95	0,94	35,5/53,3	>3	≤1
215	19246	45,7	16.4	8,96	0,941	19256	44,8	10.8	8,95	0,94		>3	≤1
220	23439	55,6	6.9	8,96	0,941	22674	55,0	10.7	8,95	0,94		>3	≤1
C NORTRIPTILINA		CONTROLO											
m/z	ÁREA ABSOL	ÁREA RELAT	S/N	TRA	TRR	ÁREA ABSOL	ÁREA RELAT	S/N	TRA	TRR			
202	46597	100,0	28.6	8,96	0,941	41234	100,0	20.4	8,95	0,94	35,5/53,3	>3	≤1
215	20587	44,2	4.1	8,96	0,941	19256	44,8	10.8	8,95	0,94		>3	≤1
220	23977	51,5	9.4	8,96	0,941	22674	55,0	10.7	8,95	0,94		>3	≤1
D NORTRIPTILINA		CONTROLO											
m/z	ÁREA ABSOL	ÁREA RELAT	S/N	TRA	TRR	ÁREA ABSOL	ÁREA RELAT	S/N	TRA	TRR			
202	38839	100,0	35.2	8,96	0,941	41234	100,0	20.4	8,95	0,94	35,5/53,3	>3	≤1
215	17019	43,8	8.8	8,96	0,941	19256	44,8	10.8	8,95	0,94		>3	≤1
220	19424	50,0	9.0	8,96	0,941	22674	55,0	10.7	8,95	0,94		>3	≤1
E NORTRIPTILINA		CONTROLO											
m/z	ÁREA ABSOL	ÁREA RELAT	S/N	TRA	TRR	ÁREA ABSOL	ÁREA RELAT	S/N	TRA	TRR			
202	29918	100,0	23.6	8,96	0,941	41234	100,0	20.4	8,95	0,94	35,5/53,3	>3	≤1
215	13762	46,0	7.8	8,96	0,941	19256	44,8	10.8	8,95	0,94		>3	≤1
220	14856	49,7	4.4	8,96	0,941	22674	55,0	10.7	8,95	0,94		>3	≤1
F NORTRIPTILINA		CONTROLO											
m/z	ÁREA ABSOL	ÁREA RELAT	S/N	TRA	TRR	ÁREA ABSOL	ÁREA RELAT	S/N	TRA	TRR			
202	41913	100,0	4.5	8,96	0,941	41234	100,0	20.4	8,95	0,94	35,5/53,3	>3	≤1
215	18611	44,4	10.9	8,96	0,941	19256	44,8	10.8	8,95	0,94		>3	≤1
220	21800	52,0	7.5	8,96	0,941	22674	55,0	10.7	8,95	0,94		>3	≤1
G NORTRIPTILINA		CONTROLO											
m/z	ÁREA ABSOL	ÁREA RELAT	S/N	TRA	TRR	ÁREA ABSOL	ÁREA RELAT	S/N	TRA	TRR			
202	41126	100,0	16.8	8,96	0,941	41234	100,0	20.4	8,95	0,94	35,5/53,3	>3	≤1
215	18906	46,0	9.0	8,96	0,941	19256	44,8	10.8	8,95	0,94		>3	≤1
220	21095	51,3	8.0	8,96	0,941	22674	55,0	10.7	8,95	0,94		>3	≤1
H NORTRIPTILINA		CONTROLO											
m/z	ÁREA ABSOL	ÁREA RELAT	S/N	TRA	TRR	ÁREA ABSOL	ÁREA RELAT	S/N	TRA	TRR			
202	41804	100	50.2	8,96	0,941	41234	100,0	20.4	8,95	0,94	35,5/53,3	>3	≤1
215	18168	43,5	7.3	8,96	0,941	19256	44,8	10.8	8,95	0,94		>3	≤1
220	20195	48,3	5.9	8,96	0,941	22674	55,0	10.7	8,95	0,94		>3	≤1
I NORTRIPTILINA		CONTROLO											
m/z	ÁREA ABSOL	ÁREA RELAT	S/N	TRA	TRR	ÁREA ABSOL	ÁREA RELAT	S/N	TRA	TRR			
202	48201	100,0	24.2	8,96	0,941	41234	100,0	20.4	8,95	0,94	35,5/53,3	>3	≤1
215	22575	46,8	6.8	8,96	0,941	19256	44,8	10.8	8,95	0,94		>3	≤1
220	29953	62,1	8.0	8,96	0,941	22674	55,0	10.7	8,95	0,94		>3	≤1
J NORTRIPTILINA		CONTROLO											
m/z	ÁREA ABSOL	ÁREA RELAT	S/N	TRA	TRR	ÁREA ABSOL	ÁREA RELAT	S/N	TRA	TRR			
202	43783	100,0	24.3	8,96	0,941	41234	100,0	20.4	8,95	0,94	35,5/53,3	>3	≤1
215	17259	39,4	6.8	8,96	0,941	19256	44,8	10.8	8,95	0,94		>3	≤1
220	23640	54,0	7.1	8,96	0,941	22674	55,0	10.7	8,95	0,94		>3	≤1

A análise dos resultados confirmou que todas as amostras de sangue às quais não foram adicionadas as substâncias em estudo evidenciaram resultados negativos. Nas amostras às quais foram adicionados os analitos em estudo, todas resultados positivas. A percentagem de falsos negativos e de falsos positivos é de 0%, o que está de acordo com os critérios de confirmação definidos no STF. Nas tabelas 14 e 15 apresentam-se os resultados obtidos no estudo da especificidade/selectividade.

**Tabela 14** - Resultados obtidos no estudo da especificidade/selectividade

<b>Análise das amostras negativas</b>	
<b>Amostra</b>	<b>Resultado</b>
Pool 1 – A1	Negativo
Pool 2 – B1	Negativo
Pool 3 – C1	Negativo
Pool 4 – D1	Negativo
Pool 5 – E1	Negativo
Pool 6 – F1	Negativo
Pool 7 – G1	Negativo
Pool 8 – H1	Negativo
Pool 9 – I1	Negativo
Pool 10 – J1	Negativo
<b>Falsos Positivos: 0%</b>	

**Tabela 15** - Resultados obtidos no estudo da especificidade/selectividade (Continuação)

<b>Análise das amostras positivas</b>	
<b>Amostra</b>	<b>Resultado</b>
Pool 1 – A2	Positivo
Pool 2 – B2	Positivo
Pool 3 – C2	Positivo
Pool 4 – D2	Positivo
Pool 5 – E2	Positivo
Pool 6 – F2	Positivo
Pool 7 – G2	Positivo
Pool 8 – H2	Positivo
Pool 9 – I2	Positivo
Pool 10 – J2	Positivo
<b>Falsos Negativos: 0%</b>	

#### 4.2.2 LIMITE DE DETECÇÃO (LOD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LOQ)

Para o estudo deste parâmetro preparou-se uma curva de calibração com 12 pontos equidistantes, perto do valor do limite de detecção esperado [excluindo o(s) outliers]. A curva de calibração foi construída por fortificação de volumes de 500 µL de amostras de sangue branco, com volumes crescentes de uma mistura de trabalho (das substâncias em estudo) e o respectivo PI, de acordo com a tabela 16.

Uma vez construídas as curvas de calibração para cada uma das substâncias em estudo, foi aplicado o teste de ANOVA factor único (tabelas 37 e 38 Anexo) obtendo-se valores satisfatórios ver tabela 17, visto que os mesmos encontram-se dentro dos parâmetros recomendados. Para o cálculo dos LOD e LOQ foram efectuados estudos de duas formas diferentes. Para a primeira foram determinados utilizando o método baseado nos parâmetros da curva analítica, utilizando-se como desvio padrão da resposta obtida por análise das amostras e no declive da curva de calibração, utilizando as equações:  $LOD \frac{3,3*S}{b}$  e  $LOQ \frac{10*S}{b}$ .

Tabela 16 - Preparação das curvas de calibração

Calibradores (ng/mL)	Sangue Branco (µL)	Mistura de Padrões (0,5 µg/mL) (µL)	PI (10 µg/mL) (µL)
5	500	5	25
10		10	
15		15	
20		20	
25		25	
30		30	
35		35	
40		40	
45		45	
50		50	
55		55	
60		60	

Para efeitos de quantificação das amostras consideram o LOQ como sendo o valor mais baixo de concentração das substâncias estudada que pode ser quantificado com CV e erro relativo <20%. Assim os valores dos LOD e LOQ, teóricos, calculados através da primeira forma, encontram-se na tabela 18.

Tabela 17- Resumo dos parâmetros das rectas de regressão linear da Área (AMI/PI) vs Concentração.

Substância	Equação	r <sup>2</sup>	Erro padrão (S <sub>y/x</sub> )
Amitriptilina	y = 0,1142x - 0,0225	0,9997	0,03129
Nortriptilina	y = 0,0027x + 0,0003	0,9996	0,00088

Tabela 18 - LOD e LOQ teóricos da amitriptilina e nortriptilina calculados

Substância	LOD (ng /mL)	LOQ (ng /mL)
Amitriptilina	0,90	1
Nortriptilina	1	3

Os LOD e LOQ determinados por diminuição sucessiva das concentrações dos anélitos encontram-se na tabela 19.



Tabela 19 – LOD e LOQ da amitriptilina e nortriptilina calculados

Substância	LOD (ng /mL)	LOQ (ng /mL)
Amitriptilina	10	15
Nortriptilina	15	20

Optámos por utilizar o segundo método (diminuição das concentrações dos analitos) uma vez que traduzem as concentrações reais que se conseguem determinar para o LOD e LOQ das substâncias estudadas.

Deste modo procedeu-se a verificação dos LOQ determinados, por aplicação do procedimento de ensaio desenvolvido, a cinco (5) réplicas independentes (tabelas 20 e 21) mediante a fortificação de aliquotas de amostras branca e nas concentrações prevista para ditos limites. Os resultados obtidos apresentam um CV <20%.

Tabela 20 - Verificação do LOD e LOQ da amitriptilina

Conc.[ng/mL]	Área AMI	PI área	Actr/PI área	$y = 0,1142x - 0,0225$	Média	DP	C.V(%)
10	53694	50848	1,06	9,44	9	0,25	3
10	50253	49870	1,01	9,02			
10	64981	60154	1,08	9,66			
10	58765	57473	1,02	9,15			
10	61681	58451	1,06	9,44			
15	98257	66704	1,47	13,10	15	0,86	6
15	120808	71204	1,70	15,05			
15	103730	60237	1,72	15,28			
15	127154	76300	1,67	14,79			
15	127412	76813	1,66	14,72			

Tabela 21 - Verificação do LOD e LOQ da nortriptilina

Conc.[ng/mL]	Área NORT	PI área	Actr/PI área	$y = 0,0108x + 0,0155$	Média	DP	C.V(%)
15	2665	66704	0,04	14,91	15	0,36	2
15	3022	71204	0,04	15,83			
15	2455	60237	0,04	15,21			
15	3081	76300	0,04	15,07			
15	3108	76813	0,04	15,10			
20	4250	78031	0,05	20,28	20	0,22	1
20	4629	83081	0,06	20,75			
20	4505	83025	0,05	20,21			
20	6421	116191	0,06	20,58			
20	7655	138877	0,06	20,53			

Foram cumpridos os requisitos previstos para os limites de detecção e quantificação das substâncias estudadas, na gama de trabalho do método.

#### 4.2.3 EFICIÊNCIA DA EXTRACÇÃO

A eficiência da extracção ou recuperação de um analito é a relação percentual entre a resposta do detector a partir de uma quantidade de analito adicionado e posteriormente extraído da matriz biológica e a resposta do respectivo detector para a mesma quantidade de analito teoricamente presente sem ser extraído.

O estudo deste parâmetro foi realizado em duas gamas de concentração (100 e 1000 ng/mL) para cada uma das substâncias estudadas. Foram preparados dois conjuntos de amostras de sangue branco em quadruplicado, para cada uma das concentrações referidas. Um dos conjuntos foi fortificado no início do procedimento de preparação das amostras (antes da extracção) e o outro imediatamente antes da secagem do extracto recolhido (após a eluição). Usaram-se duas misturas padrão a 0,5 e a 5 µg/mL preparadas em metanol. O padrão interno foi adicionado aos dois conjuntos de amostras, após a extracção e imediatamente antes da fase de secagem. A eficiência da extracção calcula-se através da seguinte expressão:

$$\% R = \frac{A \text{ rel método extractivo}}{A \text{ rel sem extracção}} * 100$$

De onde:

A rel método extractivo – razão das áreas (substância/padrão interno) após aplicação do método extractivo.

A rel sem extracção – razão das áreas (substância/padrão interno) sem aplicação do método extractivo.

Analisando as Tabela 22 e 23, podemos verificar que os valores obtidos encontram-se em conformidade com os critérios estabelecido STF – C. Os valores têm percentagens de recuperação das substâncias estudadas situando-se entre 80 e 100 %.

**Tabela 22** - Resultado da eficiência da extracção do método para a amitriptilina, ião 58

AMI extraído	PI	Áreas relativas	Média		AMI extraído	PI	Áreas relativas	Média	
992936	1269844	0,78			10490866	1350711	7,77		
1043597	1313689	0,79			8960873	1348320	6,65		
1064038	1370691	0,78			8786476	1229706	7,15		
1001397	1431220	0,70	1		11627257	1458872	7,97	7	
<b>Gama baixa (100 ng/mL)</b>					<b>Gama alta (1000ng/mL)</b>				
AMI não extraído	PI	Áreas relativas	Média	Recuperação (%)	AMI não extraído	PI	Áreas relativas	Média	Recuperação (%)
1309157	1435197	0,91			12983967	1366127	9,50		
1251780	1406012	0,89			17697952	2083271	8,50		
1249813	1325048	0,94			15523261	1778925	8,73		
1385432	1452345	0,95	1	83	15459134	1756390	8,80	9	83

**Tabela 23** - Resultado da eficiência da extracção do método para a nortriptilina, ião 202

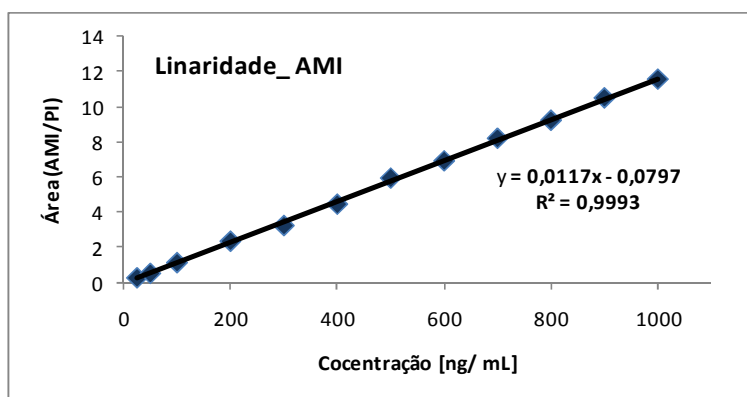
Gama baixa (100 ng/mL)					Gama alta (1000ng/mL)				
NORT extraído	PI	Áreas relativas	Média	Recuperação (%)	NOR extraído	PI	Áreas relativas	Média	Recuperação (%)
75467	1221749	0,06			841588	1360529	0,62		
79263	1237520	0,06			696274	1362309	0,51		
84683	1343227	0,06			680769	1201790	0,57		
75499	1391145	0,05	0		929796	1407770	0,66	1	
<b>Gama baixa (100 ng/mL)</b>					<b>Gama alta (1000ng/mL)</b>				
NORT não extraído	PI	Áreas relativas	Média	Recuperação (%)	NOR não extraído	PI	Áreas relativas	Média	Recuperação (%)
88541	1436405	0,06			1055980	1476287	0,72		
84339	1411566	0,06			1469239	2098171	0,70		
90702	1341469	0,07			1252200	1770042	0,71		
91617	1458790	0,06	0	97	1257418	1767769	0,71	1	83

#### 4.2.4 LINEARIDADE/GAMA DE TRABALHO

Com o estudo da linearidade/gama de trabalho procura-se avaliar se, para um determinado intervalo de concentrações, as áreas do pico são directamente proporcionais às concentrações usadas. Foi preparada uma curva de calibração, por fortificação de alíquotas de 500  $\mu\text{L}$  de sangue branco com soluções de trabalho a 0,5 e 5  $\mu\text{g/mL}$ , entre 25 e 1000  $\text{ng/mL}$  para as 2 substâncias estudadas. A todas as amostras foi adicionado 25  $\mu\text{L}$  da mistura de padrão interno a 10  $\mu\text{g/mL}$ . Para as soluções da recta de calibração foram escolhidas concentrações equidistantes e distribuídas uniformemente entre o valor mais baixo e o mais elevado do intervalo de concentrações de cada substância estudada (Tabela 24) e contemporaneamente foi preparado CQI, como se verifica na tabela 7, em triplicado cada nas concentrações de 25, 500 e 1000  $\text{ng/mL}$ . Para avaliação do parâmetro da linearidade procedeu-se à análise das curvas de calibração (figuras 15 e 16) obtidas por meio da análise da ANOVA factor único, com os resultados obtidos após injeção dos extractos. Os critérios de aceitação das curvas de calibração são os seguintes: inclusão do valor zero na intercepção da curva com o eixo das ordenadas, tendo em consideração um intervalo de confiança de 95%; coeficiente de correlação ( $r^2$ ) superior a 0,99%; na análise dos gráficos dos valores residuais são considerados como pontos aberrantes aqueles cujo desvio residual seja superior ao dobro do erro padrão estimado no estudo da regressão para as curvas de calibração.

**Tabela 24** - Estudo da linearidade para a amitriptilina e nortriptilina

Concentração calibradores (ng/mL)	Mistura de padrões 0,5 µg/mL (µL)	Mistura de padrões 5 µg/mL (µL)	Solução de PI 2 µg/mL (µL)
25	25	—	25
50	50	—	
100	—	10	
200	—	20	
300	—	30	
400	—	40	
500	—	50	
600	—	60	
700	—	70	
800	—	80	
900	—	90	
1000	—	100	



**Figura 15** - Curva de calibração da amitriptilina

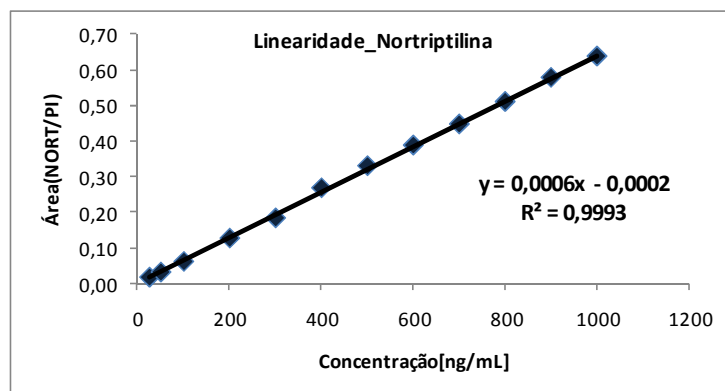


Figura 16 - Curva de calibração da nortriptilina

A tabela 25 resume os resultados obtidos no estudo da linearidade. Os estudos estatísticos de regressão resumem-se nas tabelas 37 e 38 em anexo. O estudo da linearidade e gamas de trabalho permite concluir que o procedimento de ensaio realizado é linear na gama de trabalho (25 - 1000 ng/mL para as substâncias estudadas) figuras 15 e 16. As duas curvas de calibração apresentam valores de  $r^2$  superiores a 0,99 e a ordenada na origem não é estatisticamente diferente do ponto zero.

Tabela 25 - Resumo dos resultados obtidos para o estudo da linearidade e gama de trabalho

Substancias	Equações	$r^2$	Intervalo de 95% de confiança da ordenada na origem	
			Limite Inferior	Limite superior
Amitriptilina	$y = 0,0117x - 0,0797$	0,9993	-0,1993	0,0398
Nortriptilina	$y = 0,0006x - 0,0002$	0,9993	-0,00679	0,0063

#### 4.2.5 ARRASTAMENTO (CARRYOVER)

O estudo da existência de fenómenos de arrastamento foi efectuado preparando brancos de sangue que foram injectados após as amostras fortificadas com a concentração 1000 ng/mL, que é o valor mais elevado da curva de calibração, de cada uma das substâncias estudadas, com o intuito de detectar uma possível contaminação.

A análise dos cromatogramas das amostras brancas evidencia a ausência de qualquer contaminação para AMI, NORT e o PI. Na figura 17, apresenta-se os cromatogramas de iões

extraídos para cada uma das substâncias evidenciando ausência de fenômenos de arrastamento dos respectivos tempos de retenção. Podemos concluir que os procedimentos de ensaio de confirmação qualitativa e quantitativa de AMI e NORT, em amostras de sangue por GC/MS, não são afectados por fenômenos de contaminação por arrastamento em concentrações iguais ou inferiores a 1000 ng/mL.

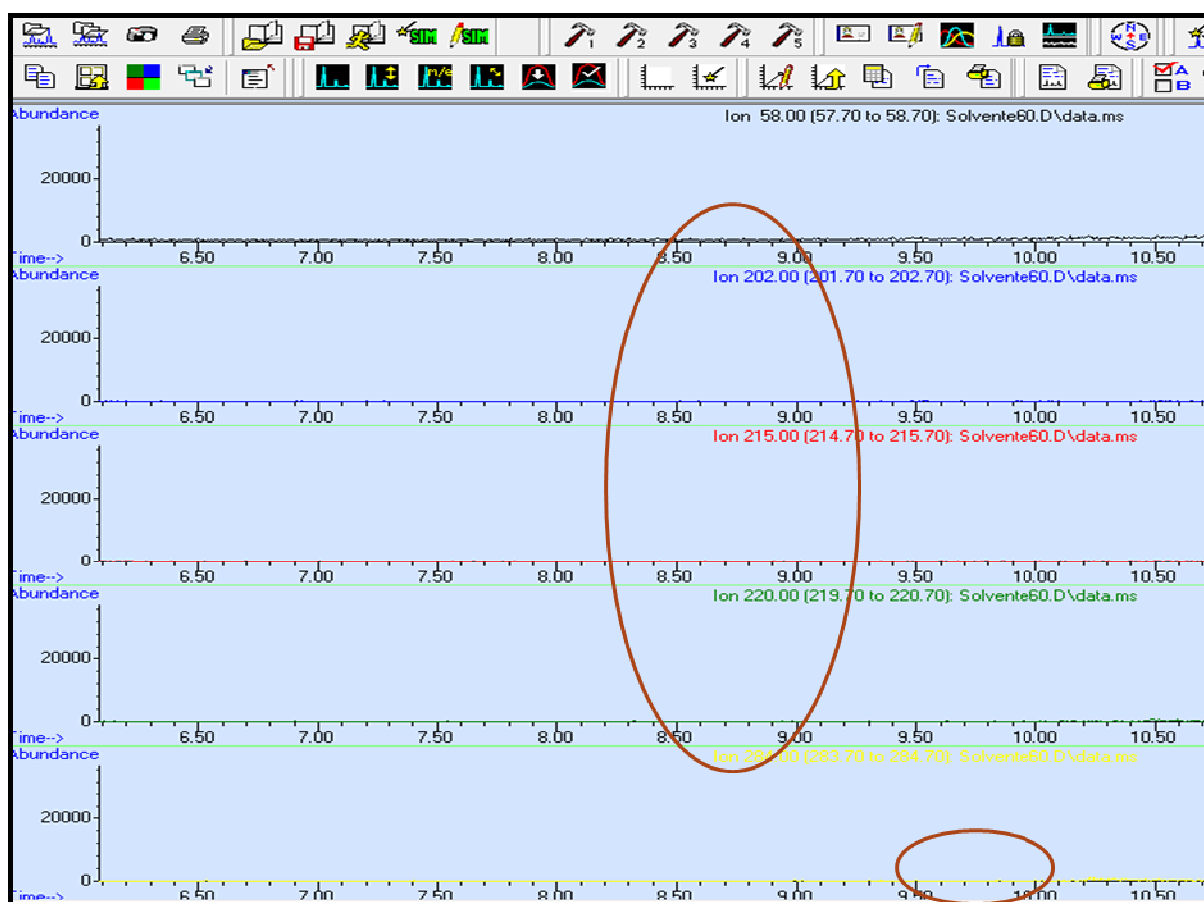


Figura 17 - Cromatogramas dos iões extraídos para cada uma das substâncias.

## 4.2.6 REPETIBILIDADE

Este parâmetro foi estudado através da análise de 8 replicados independentes, preparados por fortificação de amostras de sangue branco nas gamas de concentração baixa (25 ng/mL) e alta (1000 ng/mL) as duas substâncias em estudo. Foi adicionado padrão interno, a todas as amostras.

Após aplicação do método foram obtidas as áreas relativas para cada substância em cada replicado e calculou-se a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação (CV %) como se apresenta nas tabelas 26 e 27.

Através das áreas relativas das substâncias em estudo verificou-se que os CV foram <10% para as concentrações estudadas cumprindo com os critérios em vigor STF – C.

Tabela 26 - Resultados da repetibilidade da amitriptilina

Conc.[ng/mL]		Área AMI 58	PI	AMI/PI	Média	DP	CV
25	1	164404	588820	0,28	0	0,02	9
	2	214782	767688	0,28			
	3	214522	925001	0,23			
	4	193195	801024	0,24			
	5	205936	801575	0,26			
	6	192929	823991	0,23			
	7	205730	859902	0,24			
	8	182349	855934	0,21			
1000	1	6541514	758532	8,62	9	0,50	6
	2	7484494	842821	8,88			
	3	7843867	936293	8,38			
	4	7653738	848063	9,02			
	5	7123219	853178	8,35			
	6	8291431	986364	8,41			
	7	7559281	772209	9,79			
	8	7056100	764628	9,23			



Tabela 27 - Resultados da repetibilidade da nortriptilina

Conc.[ng/mL]		Área NORT 202	PI	NORT/PI	MÉDIA	DP	CV
25	1	11086	584333	0,02	0	0,00	9
	2	13846	761862	0,02			
	3	13422	936562	0,01			
	4	13266	801024	0,02			
	5	13308	771575	0,02			
	6	14954	823991	0,02			
	7	14123	856361	0,02			
	8	12977	855934	0,02			
1000	1	559505	788799	0,71	1	0,04	6
	2	547141	772975	0,71			
	3	601025	936293	0,64			
	4	590250	848063	0,70			
	5	616609	853178	0,72			
	6	563335	887749	0,63			
	7	632264	1007056	0,63			
	8	585161	797255	0,73			

#### 4.2.7 PRECISÃO INTERMÉDIA

Para este parâmetro foram avaliadas as fontes de variabilidade que simulam o normal funcionamento do laboratório (tempo, reagentes, curva de calibração, temperatura e operacionalidade do equipamento). A precisão intermédia foi estudada através da preparação de curvas de calibração em dias distintos (tabela 6). Simultaneamente a cada curva de calibração foram preparadas amostras controlos em 3 (três) níveis de concentração distintas e em triplicado (tabela 7).

Uma vez aplicado o procedimento de ensaio, os resultados deste estudo foram tratados por aplicação da ANOVA factor único (Tabelas 41 a 45 Anexo) foram obtidos valores de CV dentro dos limites aceitáveis, portanto concluímos que o método é preciso. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados. As expressões usadas encontram-se nas Tabelas 28 e 29, e os resultados obtidos são apresentados nas tabelas 30 e 31.

Tabela 28 - Tabela ANOVA (factor único)

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

Tabela 29 - Cálculo das estimativas da precisão

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

Onde:

- $p$  - É o número de sequências de análises para cada nível de concentração (uma sequência por 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;
- $\bar{x}$  - É a média das médias de  $p$  sequências.

Tabela 30 - Resultados e Tratamento da precisão intermédia da Amitriptilina

Data	1º Dia	2º Dia	3º Dia	4º Dia	5º Dia
R2	0,9991	0,9999	0,9999	0,9985	0,9999
Declive	0,0143	0,0143	0,0159	0,0261	0,0367
Y0	-0,0438	-0,1101	-0,0752	-0,1833	-0,373
<b>Gama Baixa 25 ng</b>					
Replicado 1	26,5	26,3	24,0	25,0	26,0
Replicado 2	26,2	27,1	24,4	25,0	25,0
Replicado 3	25,0	27,0	26,6	25,0	26,0
Media	25,9	26,8	25,0	25,0	25,7
Recuperação	103,6	107,2	100,0	100,0	102,7
Conc. Média	25,7				
Recuperação média	102,7				
Repetibilidade	0,8				
Between Run	0,6				
Precisão Intermedia	1,0				
C.V	3,1%				
<b>Gama Média 500 ng</b>					
Replicado 1	501,0	515,6	507,2	483,0	507,0
Replicado 2	500,0	503,3	502,8	504,0	499,0
Replicado 3	506,2	499,0	507,5	493,0	482,0
Media	502,4	506,0	505,8	493,3	496,0
Recuperação	100,5	101,2	101,2	98,7	99,2
Conc. Média	500,7				
Recuperação média	100,1				
Repetibilidade	8,6				
Between Run	3,0				
Precisão Intermedia	9,1				
C.V	1,7%				
<b>Gama Alta 1000 ng</b>					
Replicado 1	1000,3	991,0	1009,7	1002,0	1001,0
Replicado 2	1000,5	1000,8	1009,5	1009,0	1018,0
Replicado 3	999,6	1002,5	1094,5	1001,0	989,0
Media	1000,1	998,1	1037,9	1004,0	1002,7
Recuperação	100,0	99,8	103,8	100,4	100,3
Conc. Média	1008,6				
Recuperação média	100,9				
Repetibilidade	6,6				
Between Run	3,0				
Precisão Intermedia	7,3				
C.V	0,7%				

Tabela 31 - Resultados e Tratamento da precisão intermédia da Notriptilina

Data	1º Dia	2º Dia	3º Dia	4º Dia	5º Dia
R2	0,9999	0,9998	0,9996	0,9992	0,9999
Declive	0,0007	0,001	0,0009	0,0017	0,0367
Y0	-0,0163	-0,0199	-0,0175	-0,0129	-0,373
<b>Gama Baixa 25 ng/ mL</b>					
Replicado 1	28,6	27,0	27,6	26,0	25,0
Replicado 2	28,8	28,3	22,3	25,3	26,0
Replicado 3	28,6	26,1	25,4	25,1	25,0
Media	28,7	27,1	25,1	25,5	25,3
Recuperação	114,7	108,5	100,4	101,9	101,3
Conc. Média	26,3				
Recuperação média	105,4				
Repetibilidade	1,3				
Between Run	1,3				
Precisão Intermedia	1,9				
C.V	5,1%				
<b>Gama Média 500 ng/ mL</b>					
Replicado 1	497,6	501,4	501,9	496,2	500,0
Replicado 2	493,5	501,6	479,5	491,1	505,0
Replicado 3	514,0	504,6	495,6	496,1	492,0
Media	501,7	502,5	492,3	494,5	499,0
Recuperação	100,3	100,5	98,5	98,9	99,8
Conc. Média	498,0				
Recuperação média	99,6				
Repetibilidade	7,8				
Between Run	0,7				
Precisão Intermedia	7,8				
C.V	1,6%				
<b>Gama Alta 1000 ng/ mL</b>					
Replicado 1	946,2	1003,1	1001,0	989,0	1001,0
Replicado 2	1000,9	968,2	1002,7	1003,0	1014,0
Replicado 3	999,8	1008,0	1002,0	996,0	950,0
Media	982,3	993,1	1001,9	996,0	988,3
Recuperação	98,2	99,3	100,2	99,6	98,8
Conc. Média	992,3				
Recuperação média	99,2				
Repetibilidade	24,3				
Between Run	11,8				
Precisão Intermedia	27,0				
C.V	2,4%				

#### 4.2.8 EXACTIDÃO

Os resultados foram obtidos através do modelo ANOVA factor único utilizando os controlos (nas gamas alto, médio e baixo) dos cinco dias de precisão intermédia. O Tcritico (Tcrit) foi sempre superior ao Texperimental (Texp) para um intervalo de confiança de 95% e os CV tendo sido inferiores a 10% considerados aceitáveis. Logo o método revelou não haver evidência de erros sistemáticos comprovando assim que o método é exacto.

Os resultados obtidos através deste parâmetro estão representados nas tabelas 32 e 33.

**Tabela 32** - Resultados e Tratamento da exactidão da Amitriptilina

Dias	Gama Baixa 25	Bias %Rec.	Gama Média 500	Bias %Rec.	Gama Alta 1000	Bias %Rec.
1º	25,9	103,6	502,4	100,5	1000,1	100,0
2º	26,8	107,2	506,0	101,2	998,1	99,8
3º	25,0	100,0	505,8	101,2	1037,9	103,8
4º	25,0	100,0	493,3	98,7	1004,0	100,4
5º	25,7	102,7	496,0	99,2	1002,7	100,3
Média		102,7		100,1		100,9
Desvio padrão		2,98		1,15		1,66
CV(%)		3%		1%		2%
N (nº de dias)		5		5		5
Texp		-2,02		-0,27		-1,16
Tcrit		2,57		2,57		2,57
Incerteza de R%		1,33		0,52		0,74
Incerteza padrão rel.		0,013		0,005		0,007

**Tabela 33** - Resultados e Tratamento da exactidão da Nortriptilina

Dias	Gama Baixa 25	Bias %Rec.	Gama Média 500	Bias %Rec.	Gama Alta 1000	Bias %Rec.
1º	28,7	114,7	501,7	100,3	982,3	98,2
2º	27,1	108,5	502,5	100,5	993,1	99,3
3º	25,1	100,4	492,3	98,5	1001,9	100,2
4º	25,5	101,9	494,5	98,9	996,0	99,6
5º	25,3	101,3	499,0	99,8	988,3	98,8
Média		105,4		99,6		99,2
Desvio padrão		6,12		0,89		0,75
CV(%)		6%		1%		1%
N (nº de dias)		5		5		5
Texp		-1,96		1,00		2,30
Tcrit		2,57		2,57		2,57
Incerteza de R%		2,74		0,40		0,33
Incerteza padrão rel.		0,026		0,004		0,003

#### 4.2.9 APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO E VALIDADO A AMOSTRAS REAIS

Uma vez validada a metodologia analítica desenvolvida para a determinação da amitriptilina e nortriptilina em sangue o método foi aplicado a análises de rotina do STF – C.

Os resultados foram calculados por interpolação em curvas de calibração construídas para quantificar as amostras de (tabela 34).

**Tabela 34** - Concentração de amitriptilina e nortriptilina em sangue (casos Reais)

<b>Casos STF – C (2008 – 2011)</b>			
<b>Casos</b>	<b>Sexo</b>	<b>Amitriptilina</b>	<b>Nortriptilina</b>
		<b>Concentrações [ng/mL]</b>	
<b>1</b>	M	2139	602
<b>2</b>	F	407	54
<b>3</b>	F	976	222
<b>4</b>	F	2882	77
<b>5</b>	F	517	154
<b>6</b>	F	445	472
<b>7</b>	F	629	100
<b>8</b>	M	1762	910
<b>9</b>	M	8498	2069
<b>10</b>	M	28	2278
<b>11</b>	F	1420	1234
<b>12</b>	M	711	177
(40 -80 anos de idade)			

## **CAPÍTULO V – CONCLUSÕES**





## CONCLUSÕES

O método de validação usado para a determinação da amitriptilina e nortriptilina em sangue total, demonstrou ser adequado, uma vez que foram obtidos valores considerados aceitáveis para todos os parâmetros estudados.

No sentido de dar resposta às necessidades do STF – C o método desenvolvido demonstrou ser adequado para a determinação de amitriptilina e de nortriptilina em amostras de rotina do STF-C, pretendendo-se ampliar o seu campo de aplicação a um maior número de substâncias antidepressoras analisadas por GC/MS-EI.



## **CAPÍTULO VI - REFERÊNCIAS**



## REFERÊNCIAS

1. Saúde mental da população rumo a uma estratégia de saúde mental para união europeia. COM (2005) 484, Comissão das Comunidades Europeias, Bruxelas, 2005
2. UNINGÁ Review. Ficha Técnica 04. 3 (2010) 6 - 9
3. Pereira ACM. Análise de depressão e ansiedade nos alunos do ensino superior: comparação com um estudo do curso de radiologia. Castelo Branco. (2009) 7 - 18
4. Depressão é responsável por mais de 1200 mortes por ano em Portugal. [http://rr.sapo.pt/informacao\\_detalhe.aspx?fid=97&did=122418](http://rr.sapo.pt/informacao_detalhe.aspx?fid=97&did=122418). Inserido em 01-10-2010 08:53. (consultado em 15.10.2010)
5. Tratamiento farmacológico de la depresión mayor en atención primaria. Boletín Terapêutico Andaluz, 16 (1999) 9 - 44
6. Dutta AK, Ghosh B, Biswas S, Reith MEA. D-161, a novel pyran-based triple monoamine transporter blocker: Behavioral pharmacological evidence for antidepressant-like action. *Europ J. Pharmac.* 589 (2008) 73 – 79
7. Guia Clínico. Tratamiento de Personas con depresión. Serie guias clínicas MINSAL N°XX, 1ª Ed. Santiago: Minsal, (2006) 5-6
8. Sudupe JA, Dono OCC, Ventosos V. Depresión. Guías Clínicas 6 (2006) 11;
9. Sobocki P, Jonsson B, Angst J, Rehnberg C. Cost of depression in Europe, *J Ment Health Policy Econ* 9 (2006) 87–98
10. Moncrieff J. The creation of the concept of an antidepressant: An historical Analysis. *Soc. Scien. & Medicine* 66 (2008) 2346 – 2355
11. Muñoz FL and Alamo C. Monoaminergic Neurotransmission: The History of the Discovery of Antidepressants from 1950s Until Today. *Cur Pharmac Desig*, 15 (2009); 1563-1586.
12. Campigotto KF, Teixeira JJV, Cano FG, Sanches ACC, Cano MFF, Guimarães DSL. Detecção de risco de interações entre fármacos antidepressores e associados prescritos a pacientes adultos. *Rev. Psiq. Clín* 35 (2008) 1-5

13. Álvarez, FJ, Ríó CM. Medicinal drugs and driving: from research to clinical Practice. *Pharmac. Scienc.* 23 (2002) 441-443
14. Fujitani N, Koda Y, Okamura T, Hattori H, Kimura H. A fatal case of hyperthermia due to tricyclic antidepressant intoxication. *Legal Med.* 2 (2000) 152-155
15. Moffat AC, Osselton MD, Widdop B. *Clark's Analises of Drugs and Poisons* Pharmaceutical Press. 2003
16. Frey R, Schreinzer D, Stimpfl T, Vycudilik W, Berzlanovich A, Kasper S. Suicide by antidepressant intoxication identified at autopsy in Vienna from 1991- 1997: the favourable consequences of the increasing use of SSRIs. *Eur Neuropsychoph.* 10 (2000) 133– 142
17. Moreno RA, Moreno DH, Soares MBM. Psicofarmacologia de antidepressores. *Depressã, Rev Bras Psiquiatr,* 21 (1999) 24 – 40
18. Hamon and S. Bourgoïn. Pharmacological profile of antidepressants: a likely basis for their efficacy and side effects?. *Eur. Neuropsychoph.* 16 (2006) S625 - S632
19. Fujishiro J, Imanishi T, Onozawa K, Tsushima M. Comparison of the anticholinergic effects of the serotonergic antidepressants, paroxetine, fluvoxamine and clomipramine. *Eur. J. Pharmacol.* 454 (2002) 183 – 188
20. Tatsumi M, Groshan K, Blakely RD, Richelson E. Pharmacological profile of antidepressants and related compounds at human monoamine transporters. *Eur J. Pharmacol.* 340 (1997) 249 – 258
21. Izumi T, Iwamoto N, Kitaichi Y, Kato A, Inoue T, Koyama T. Effects of co-administration of antidepressants and monoamine oxidase inhibitors on 5-HT-related behavior in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 565 (2007) 105 – 112
22. The international Association of Forensic Toxicologists. Therapeutic and toxic drug concentrations list (2009)
23. United States Pharmacopeial. Dispensing Information (USP-DI). Drug Information for the Health Care Professional. Massachusetts: World Color Book Services (1999)
24. Linden R. Analises toxicologicas sistemática e fenotipagem de CYP2C19: contribuição ao monitoramento terapêutico da amitriptilina. Dissertação de Doutorado, Faculdade de Biociências, Universidade Católica do Rio Grande do Sul, (2006) 8-143

25. Freitas MB, Costa PR, J O Brito, Vieira EP, Maia PP, Elisa M, Siqueira PB. Amitriptilina e Nortriptilina em Plasma: Extração em Fase Sólida por Polímeros de Impressão Molecular e Sílica Octadecila para Análise Cromatográfica em Fase Líquida de Alta Resolução. *Lat. Am. J. Pharm.* 28 (2009) 70-9
26. Clark's Analysis of Drugs and Poisons, In pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. Third edition. (1986) 55-58, 810-827
27. Baselt RC Disposition of Toxic Drugs and Chemical in Man. 7<sup>a</sup> Ed. Biomedical Publications, Foster City, California (2004) 347, 627, 629, 1358-1359
28. TIAFT - reference blood level list of therapeutic and toxic substances. [http://www.gtfc.org/cms/images/stories/Updated\\_TIAFT\\_list\\_202005.pdf](http://www.gtfc.org/cms/images/stories/Updated_TIAFT_list_202005.pdf) (consultado 21.03.2011)
29. Kornhuber J, Henkel AW, Groemer TW, Dtlter SS, Welzel O, Tripal P, Rotter A, Bleich S, and Trapp S. Lipophilic Cationic Drugs Increase the Permeability of Lysosomal Membranes in a Cell Culture System. *J. Cell. Physiol.* 224 (2010) 152–164
30. Quintas A, Freire AP, Halpern MJ. Bioquímica, Organização Molecular da Vida. ed. LIDEL. Lisboa (2008) 293 – 295
31. Rafael L. Análise toxicológica sistemática e fenotipagem de CYP2C19: contribuição ao monitoramento terapêutico da amitriptilina. Dissertação para obtenção de doutoramento. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Biociências. (2006) 14 – 18
32. Sistonen AKi, Johanna, Ojanpera I, Gergov Me, Vuori E, Sajantila An. CYP2D6 and CYP2C19 genotypes and amitriptyline metabolite ratios in a series of medicolegal autopsies. *Foren Scienc Internat.* 158 (2006) 177 - 183
33. Wen B, Ma L, Zhu M. Bioactivation of the tricyclic antidepressant amitriptyline and its metabolite nortriptyline to arene oxide intermediates in human liver microsomes and recombinant P450s. *Chemico-Biological Interactions* 173 (2008) 59 –67
34. Linden R. Análise toxicológica sistemática e fenotipagem de CYP2C19: contribuição ao monitoramento terapêutico da Amitriptilina. Dissertação de mestrado, universidade de Porto Alegre Novembro (2006) 11-48
35. Guía de Práctica Clínica sobre el Manejo de la Depresión Mayor en el Adulto. Madrid: Plan Nacional para el SNS del MSC. Edición: año 2008

36. Kudo K, Imamura T, Jitsufuchi N, Zhang XX, Tokunaga H, Nagata. Death attributed to the toxic interaction of triazolam, amitriptyline and other psychotropic drugs. *Foren Scienc Internt.* 86 (1997) 35–41
37. Adamowicz, P, Kata M. Simultaneous Screening and determination of 128 date-rape drugs urine by gas chromatography-electron ionization mass spectrometry. *Forens. Scienc. Internt.* 198 (2010) 39-45
38. Dekker M. *Handbook of Pharmaceutical Analysis*. Marcel Dekker, Inc. Basel New York (2002) 100-116
39. Tanaka E, Terada M, Nakamura T, Misawa S, Wakasugi C. forensic analysis of eleven cyclic antidepressants in human biological samples using a new reversed-phase chromatographic column of 2 µm porous microspherical silica gel. *J. Chrom. B.* 692 (1997) 405 – 412
40. Stiakakis I, Belivanis SD, Tzatzarakis MN, Fragoulis M, Tsatsakis AM. Disputed case of homicide by smothering due to severe amitriptyline intoxication of the victim. *J Foren. Leg. Medc.* 16 (2009) 280-283
41. Yegles M, Mersch F, Wennig R. Detection of benzodiazepines and other psychotropic drugs in human hair by GC/MS. *Foren Scienc Intern.* 84 (1997) 211-218
42. Nielsen MKK, Johansen SS, Dalsgaard PW, Linnet K. Simultaneous screening and quantification of 52 common pharmaceuticals and drugs of abuse in hair using UPLC–TOF-MS. *Foren Scienc Intern.* 196 (2010) 85 –92
43. Hunter KD and Wilson WS. The effects of antidepressant drugs on salivary flow and content of sodium and potassium ions in human parotid saliva. *Archs oral bid.* 11 (1995) 983-989
44. Almeida FPPCP. Determinação de tramadol e amitriptilina em saliva por LC-MS. Sua aplicação amostras de condutores no âmbito de um projecto de investigação Europeu. Universidade de Coimbra, Faculdade de Medicina. 2009
45. Margalho C, Barroso M, Gallardo E, Monsano P and Vierira DN. Massive intoxication involving unusual high concentration of amitriptiline. *Hum Exp Toxicol.* *Hum Exp Toxicol* 26 (2007) 70-667



46. Shen Y, Zhu RH, Li HD, Liu YW, Xu P. Validated LC–MS (ESI) assay for the simultaneous determination of amitriptyline and its metabolite nortriptyline in rat plasma: Application to a pharmacokinetic comparison. *J Pharm. Biom. Anal.* 53 (2010) 735– 739
47. Freitas MB, Costa PR, J O Brito, Vieira EP, Maia PP, Elisa M, Siqueira PB. Amitriptilina e Nortriptilina em Plasma: Extração em Fase Sólida por Polímeros de Impressão Molecular e Sílica Octadecila para Análise Cromatografia em Fase Líquida de Alta Resolução. *Lat. Am. J. Pharm.* 28 (2009) 70-9
48. Yazdi AS, Razavi N, Yazdinejad SR. Separation and determination of amitriptyline and nortriptyline by dispersive liquid–liquid microextraction combined with gas chromatography flame ionization detection. *Talanta* 75 (2008) 1293 – 1299
49. Hendriks G, Ugesb DRA, Franke JP. Reconsideration of sample pH adjustment in bioanalytical liquid–liquid extraction of ionisable compounds. *J Chrom B*, 853 (2007) 234 – 241
50. Zheng MM, Wang ST, Hu WK, Feng YQ. In-tube solid-phase microextraction based on hybrid silica monolith coupled to liquid chromatography–mass spectrometry for automated analysis of tem antidepressants in human urine and plasma. *J Chrom. A*, 1217 (2010) 7493 – 7501
51. Ulrich S. Solid-phase microextraction in biomedical analysis. *J Chrom A*, 902 (2000) 167-194
52. Kataoka H, Saito K. Recent advances in SPME techniques in biomedical analysis. *J Pharm. Biom. Anal.* 54(2010) 926-950
53. Alves C, Santos-Neto AJ, Fernandes C, Rodrigues JC, Lanças FM. Analysis of tricyclic antidepressant drugs in plasma by means of solid-phase microextraction-liquid chromatography-mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 42 (2007) 7-1342
54. Ulrich S, Martins J. Solid-phase microextraction with capillary gas-liquid chromatography and nitrogen-phosphorus selective detection for the assay of antidepressant drugs in human plasma. *J Chromatogr.B.*696 (1997) 217-234
55. Howell B, Chauhan A. Uptake of amitriptyline and nortriptyline with liposomes, proteins, and serum: Implications for drug detoxification. *J.Coll. and Inter Scienc.* 319 (2008) 81–93

56. Bose D, Durgbanshi A, Domínguez AM, Capella-Peiro ME, Carda-Broch S, Romero JE, Agustí MG. Amitriptyline and nortriptyline serum determination by micellar liquid chromatography. *J Pharmac. and Toxicol. Methods* 52 (2005) 323 – 329
57. Jemal H. High-throughput quantitative bioanalysis by LC/MS/MS. *Biomed Chromatogr.* (2000) 14:422-29.
58. McDowall RD, Sample preparation of biomedical analysis. *J Chromatography.* (1989) 49:3-58.
59. Wille SMR, Maudens KE, Peteghem CHV, Lambert WEE. Development of a solid phase extraction for 13 'new' generation antidepressants and their active metabolites for gas chromatographic–mass spectrometric analysis. *J Chrom. A*, 1098 (2005) 19 – 29
60. Gaillard Y, Breuil R, Doche C, Romeuf S, Lemeur LC. Detection of amitriptyline, nortriptyline and bromazepam in liver, CSF and hair in the homicidal poisoning of a one-month-old girl autopsied 8 months after death. *Forens. Sci. Intern.* XXX (2011) 1-3
61. Lanças, F. M. *Extracção em Fase sólida (SPE) – São Carlos, RiMa, 2004.*
62. - Waters corporation family of column.  
<http://www.cienytech.com/tablas/Cartuchos%20Oasis.pdf>. (consultado em 06.10.2010)
63. Jasinska A, Starczewska B. The use of the new SPE methods for isolation of some tricyclic antidepressant drugs from human serum. *J. Pharmaceutic Biomed. Analys.* 31 (2003) 795-799
64. Fridrich P, Colvin HP, Zizza A, Wasan AD, Lukanich J, Lirk P, Saria A, Zernig G, Hamp T and Gerner P. Phase 1A Safety Assessment of Intravenous Amitriptyline. *J Pain*, 8 (2007) 549-555
65. Ballesteros O, Zafra A, Navalón A, Vílchez JL. Sensitive gas chromatographic–mass spectrometric method for the determination of phthalate esters, alkylphenols, bisphenol A and their chlorinated derivatives in wastewater samples. *J. Chromatogr. A* 1121 (2006) 154 - 162
66. Shen Y, Zhu RH, Li HD, Liu YW, Xu P. Validated LC–MS (ESI) assay for the simultaneous determination of amitriptyline and its metabolite nortriptyline in rat

- plasma: Application to a pharmacokinetic comparison. *J Pharm. Biom.l Anal.* 53 (2010) 735 – 739
67. Guillardme D, Nguyen DTT, Rudaz S, Veuthey JL. Recent developments in liquid chromatography - Impact on qualitative and quantitative performance. *J Chrom.* 1149 (2007) 20– 29
68. Garland WA. Quantitative determination of amitriptyline and its principal metabolite, nortriptyline, by GLC-chemical ionization mass spectrometry. *J. Pharm Sci.* 66 (2006) 8 -77
69. Lee XP, Hasegawa C, Takeshi Kumazawa, Natsuko Shinmen, Yukiko Shoji, Hiroshi Seno, Keizo Sato. Determination of tricyclic antidepressants in human plasma using pipette tip solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *J. Sep. Sci.*, 31 ( 2008) 2265 – 2271
70. Martinez MA, Torre CS, Almarza E. A comparative solid-phase extraction study for the simultaneous determination of fluoxetine, Amitriptyline, Nortriptyline, Trimipramine, Maprotiline, Clomipramine, and Trazodone in Whole Blood by capillary Gas-Liquid Chromatography with Nitrogen-Phosphorus Detection. *J of Anal Toxic* 27 (2003)
71. Paula DML. Análise toxicológica de antidepressores em sangue total por cromatografia em fase gasosa com detector de nitrogénio e fósforo. [Dissertação] 2007 6-12, 42-44. (Tese de dissertação)
72. Steven, BK. MD. *Drug Abuse Handbook.* (1998) 905-9960
73. Shen Y, Zhu RH, Li HD, Liu YW, Xu P. Validated LC–MS (ESI) assay for the simultaneous determination of amitriptyline and its metabolite nortriptyline in rat plasma: Application to a pharmacokinetic comparison. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 53 (2010) 735 – 739
74. Ríos AC. Aplicación de la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas en tandem a la determinación de antidepresivos en plasma y Fluido oral. Dissertação de Doutoramento. Facultad de medicina y Odontología, Universidade de Santiago Compostela. (2006) 3 – 52
75. Trocewicz J. Urine sample preparation of tricyclic antidepressants by means of a supported liquid membrane technique for high-performance liquid chromatographic analysis. *J. Chromatogr B*, 801 (2004) 213-220

76. Breaud AR, Harlan R, Kozak M, Clarke W. A rapid and reliable method for the quantitation of tricyclic antidepressants in serum using HPLC-MS/MS. *Clinical Biochemistry* 42 (2009) 1300–1307
77. Kollroser M, Schober C. Simultaneous determination of seven tricyclic antidepressant drugs in human plasma by direct-injection HPLC-APCIMS- MS with an ion trap detector. *Ther Drug Monit* (2002) 24:537 – 44.
78. Kudo K, Jitsufuchi N, Imamura T. Selective determination of amitriptyline and Nortriptyline in human plasma by HPLC with ultraviolet and particle beam mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 21 (1997) 185 – 9
79. Brasseur C, Brose F, Pirlot A, Douny C, Eppe G, Maghuin-Rogister G, Scippo ML, Validation of the analytical procedure for the determination of polyaromatic hydrocarbons in smoke flavourings using high performance liquid chromatography coupled to an ultraviolet, diode array or fluorescence detector, *Accred. Qual. Assur.* 12 (2007) 535– 542
80. Neto FRA, Nunes DSS. *Cromatografia princípios básicos e técnicas afins*. Editora Interciência. Rio de Janeiro (2003) 23-25
81. Paces VHP, Olivares IRB, Lanças FM. Projeto, construção e avaliação de um cromatografo a gás miniaturizado. *Rev. Anal.* 24 (2006) 60-61
82. Collins CH, Braga GL, Bonato PS. *Introdução a métodos cromatográficos*, 7a. Edição, São Paulo Unicamp, (1997)
83. Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. *Princípios de análise instrumental*, 5ª ed, Porto Alegre: Bookman (2002) 110 - 200
84. Neto FRA, Silva D, Nunes S. *Cromatografia princípios básicos e técnicas afins*. Interciência. Rio de Janeiro (2003) 3- 174
85. Brito NM, Amarante Jr OP, Polese L, Ribeiro ML. Validação de métodos analíticos: Estratégia e Discussão. *R. Excicootol. Moio Ambiente Curitiba* 13 (2003) 129 – 146
86. Ermer J, Ploss HJ. Validation in pharmaceutical analysis Part II: central importance of precision to establish acceptance criteria and for verifying and improving the quality of analytical data. *J. Pharm. Biom. Anal.* 37 (2005) 859–870;

87. Stöckl D, D'Hondt H, Thienpont LM. Method validation across the disciplines - Critical investigation of major validation criteria and associated experimental protocols. *J. Chrom B*, 877 (2009) 2180 – 2190
88. Whitaker R. Validation examples of the analytic hierarchy process and analytic network process. *Sci Dir.*46 (2007) 840-859
89. Hubert, JJ, Nguyen-Huu, Boulanger B, Chapuzet E, Cohe N, Compagnon PA Dewe W, Feinberg M, Laurentie M, Mercier N, Muzard G, Valat L, E. Rozet. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures A SFSTP proposal–Part III. *Jour. Pharmac. and Biomed. Anal* 45 (2007) 82 - 96
90. Trullols E, Sánchez IR, Rius FX. Validation of qualitative analytical. *Anal. Chem.* 23, (2006) 56 - 77
91. International Organization for Standardization. ISO– Walter quality – Calibration of analytical methods and estimation of performance characteristics. Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function (1990) 8466-1
92. ISO/ IEC 17025:1999. General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories.. International Organization for Standardization. ISO, Geneva. Switzerland (1999)
93. Instituto Português de Acreditação. GUIA PARA A APLICAÇÃO DA NP EN ISO/IEC 17025. OGC001 (2010) 2 – 21
94. Ventura CJR and Segura J. Validation of qualitative chromatographic methods: strategy in antidoping control laboratories. *J Chrom. B. Sci.* 767 (202) 341-351
95. International Conference on Harmonization (ICH). Definitions and terminology ICH Q2A [Documento na internet]. ICH; 1994. <http://www.ich.org> (consultado 03.02.2011)
96. Guidelines for single laboratory validation of analytical methods for trace-level concentration of organic chemicals AOAC/FAO/IAEA/IUPAC, 1999
97. Society of Forensic Toxicologists/ American Academy of Forensic Sciences (SOFT / AAFS). Forensic Toxicology laboratory guidelines; 2006;
98. Nogueira JMF. Curso de Validação de Métodos Cromatográficos em Harmonização com os Guias Oficiais

- (USP/FDA/ICH/EURACHEM/USEPA/IUPAC/ISSO). (DQB/ FCUL) (2010) 1 – 75
99. Brito NM, Amarante Jr. OP, Polese L e Ribeiro. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. *Scien. Intern* 13 (2003) 129- 146
100. Peters FT, Drummer OH, Musshoff F. Validation of new methods. *Foren Scien. Intern.* 165 (2007) 216 – 224
101. Procedimento Operacional de Validação de Procedimentos de ensaio. PO-STF-C-006 (Ensaio e validação). INML, IP. Centro. 01 (2010) 3 – 7
102. PE-STF-C-219. Procedimento de ensaio de confirmação de medicamentos em vigor no STF-C. 01 (2010) 2 – 10.


## **CAPÍTULO VII - APÊNDICE**





# APÊNDICE

**Tabela 35 - Resultados de confirmação da amitriptilina**

 INML, IP • CENTRO TOXICOLOGIA FORENSE		REGISTO				Pág. 1/1	
		Confirmação Qualitativa					
Amostra:	A	Padrão Interno:	PI	Tecnologia:	GC/MS		
Substância:	Amitriptilina	Controlo:	1	Operador:	id		
Observações:				Data:	15-02-2011		
Controlo	lão	Área	Área relativa	Tolerância	limite inferior	limite superior	
1º lã	58	673559	100,0%				
2º lã	202	49853	7,4%	5 abs.	2,4%	12,4%	
3º lã	215	28078	4,2%	5 abs.	-0,8%	9,2%	
4º lã							
Amitriptilina (t.r.) =	8,85			0,2 abs.	8,650	9,050	
PI (t.r.) =	9,52	t.r.r. =	0,930	1% rel.	0,920	0,939	
Amostra	lão	Área	Área relativa	Conformidade			
1º lã	58	578453	100,0%	conforme			
2º lã	202	43454	7,5%	conforme			
3º lã	215	16279	2,8%	conforme			
4º lã							
Amitriptilina (t.r.) =	8,86			conforme			
PI (t.r.) =	9,52	t.r.r. =	0,931	conforme			

**Tabela 36 - Tratamento estatístico dos limiares (LQ e LD) da Amitriptilina**

 INML, IP • CENTRO TOXICOLOGIA FORENSE		REGISTO				Pág. 1/1	
		Confirmação Qualitativa					
Amostra:	A	Padrão Interno:	PI	Tecnologia:	GC/MS		
Substância:	Nortriptilina	Controlo:	1	Operador:	id		
Observações:				Data:	15-02-2011		
Controlo	lão	Área	Área relativa	Tolerância	limite inferior	limite superior	
1º lã	202	41234	100,0%				
2º lã	215	18461	44,8%	20% rel.	35,8%	53,7%	
3º lã	220	22674	55,0%	10 abs.	45,0%	65,0%	
4º lã							
Nortriptilina (t.r.) =	8,95			0,2 abs.	8,750	9,150	
PI (t.r.) =	9,52	t.r.r. =	0,940	1% rel.	0,931	0,950	
Amostra	lão	Área	Área relativa	Conformidade			
1º lã	202	41712	100,0%	conforme			
2º lã	215	19256	46,2%	conforme			
3º lã	220	20181	48,4%	conforme			
4º lã							
Nortriptilina (t.r.) =	8,96			conforme			
PI (t.r.) =	9,52	t.r.r. =	0,941	conforme			

Tabela 37 - Tratamento estatístico dos limiares (LD e LQ) da amitriptilina

Conc[ng/mL]	Áera_Amitrip	PI	A(AMI)/PI	$y = 0,1142x - 0,0225$	BIAS
5	18863	34115	0,55	5,04	0,77
10	36162	32366	1,12	9,98	-0,19
15	53501	31760	1,68	14,95	-0,35
20	130061	57382	2,27	20,04	0,22
25	166961	60046	2,78	24,55	-1,82
30	148439	43327	3,43	30,20	0,66
35	174378	44006	3,96	34,90	-0,30
40	202643	44058	4,60	40,47	1,18
45	214565	41825	5,13	45,12	0,26
50	235171	41297	5,69	50,06	0,12
60	342710	50445	6,79	59,69	-0,52

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

---

*Estatística de regressão*

R múltiplo	0,999870173
Quadrado de R	0,999740363
Quadrado de R ajustado	0,999707908
<b>Erro-padrão</b>	<b>0,03128616</b>
Observações	10

ANOVA					
	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	30,15187671	30,15187671	30804,19173	1,24272E-15
Residual	8	0,007830591	0,000978824		
Total	9	30,1597073			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	-0,024660636	0,023650114	-1,042727999	0,32755718	-0,079197897	0,029876625
<b>b</b>	<b>0,114248678</b>	0,000650948	175,5112296	1,24272E-15	0,11274759	0,115749767

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Previsto 0,552923933753481	Residuais	Residuais-padrão
1	1,117826146	-0,000542577	-0,018394389
2	1,689069537	-0,004529235	-0,15354966
3	2,260312929	0,006268926	0,212528494
4	2,83155632	-0,051004743	-1,729157514
5	3,402799711	0,023216399	0,787079964
6	3,974043102	-0,011447092	-0,388078147
7	4,545286493	0,05417331	1,836577947
8	5,116529885	0,013535866	0,458891519
9	5,687773276	0,006853453	0,232345043
10	6,830260058	-0,036524306	-1,238243257

LD= 0,90  
LQ= 2,74

Tabela 38 - Tratamento estatístico dos limiares (LQ e LD) da Nortriptilina

Conc[ng/mL]	Áera_NORT	PI	A(NORT)/PI	$y = 0,0027x + 0,003$	BIAS
15	1199	30115	0,039814	14,8571	-0,953
20	2885	52413	0,055044	20,4976	2,488
25	3781	55167	0,068537	25,4953	1,981
30	3881	47981	0,080886	30,0690	0,230
35	4212	43647	0,096501	35,8524	2,435
40	5302	48248	0,109891	40,8113	2,028
45	5747	47324	0,121439	45,0887	0,197
50	6724	49586	0,135603	50,3344	0,669
55	7708	51587	0,149417	55,4509	0,820
60	8730	53645	0,162737	60,3839	0,640

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,999793762
Quadrado de R	0,999587566
Quadrado de R ajustado	0,999536012
Erro-padrão	0,00088448
Observações	10

ANOVA					
	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	0,015168155	0,015168155	19389,03892	7,9131233109E-15
Residual	8	6,25845E-06	7,82306E-07		
Total	9	0,015174413			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	0,000291696	0,000782062	0,372983519	0,71884947	-0,001511742	0,002095134
b	0,002711873	1,94756E-05	139,2445292	7,91312E-15	0,002666962	0,002756784

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais	
1	0,040969796	-0,001155749	
2	0,054529162	0,000514434	
3	0,068088529	0,000448822	
4	0,081647895	-0,000761711	
5	0,095207261	0,001294216	
6	0,108766628	0,001123937	
7	0,122325994	-0,000886556	
8	0,135885361	-0,00028257	LD= 2,94
9	0,149444727	-2,72384E-05	
10	0,163004094	-0,000267585	LQ= 3,26

Tabela 39 - Estudos estatístico de Linearidade da amitriptilina

Conc[ng/mL]	Áera_Amitrip	PI	A(AMI)/PI	$y = 0,0117x - 0,0797$	BIAS
25	185735	739051	0,25	28,29	13,17
50	348485	689674	0,51	50,00	0,00
100	870529	781758	1,11	101,99	1,99
200	1972633	845611	2,33	206,20	3,10
300	2449730	760304	3,22	282,20	-5,93
400	3529086	795653	4,44	385,91	-3,52
500	4213916	712178	5,92	512,53	2,51
600	5643440	818157	6,90	596,36	-0,61
700	8672702	1060985	8,17	705,46	0,78
800	8690462	944449	9,20	793,28	-0,84
900	10695720	1021582	10,47	901,66	0,18
1000	9051477	784689	11,54	992,72	-0,73

Estadística de regressão	
R múltiplo	0,99967033
Quadrado de R	0,99934077
Quadrado de R ajustado	0,999274847
Erro-padrão	0,106445643
Observações	12

ANOVA					
	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	171,7640226	171,7640226	15159,2048	3,06483E-17
Residual	10	0,11330675	0,011330675		
Total	11	171,8773294			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	-0,079721071	0,053669754	-1,485400344	0,168265381	-0,199304735	0,039862593
Variável X 1	0,011661432	9,47139E-05	123,1227225	3,06483E-17	0,011450396	0,011872468

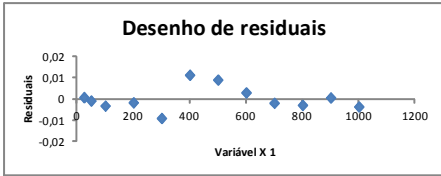
RESULTADO RESIDUAL			
Observação	Y previsto	Residuais	Residuais-padrão
1	0,211814733	0,039500806	0,389201413
2	0,503350536	0,001938919	0,019104171
3	1,086422144	0,027130899	0,267320733
4	2,252565359	0,080224778	0,790454676
5	3,418708574	-0,196668443	-1,937774025
6	4,584851789	-0,149393115	-1,47197026
7	5,750995004	0,165947109	1,635076745
8	6,917138219	-0,01939121	-0,191061575
9	8,083281434	0,09091707	0,895805827
10	9,249424649	-0,047803386	-0,471006732
11	10,41556786	0,054193741	0,53397089
12	11,58171108	-0,046597168	-0,459121862

Tabela 40 - Estudos estatístico de Linearidade da nortriptilina

Conc[ng/mL]	Área_Nort	Área PI	Área(NORT/PI)	$y = 0,0006x - 0,0328$	BIAS
25	9780	594614	0,02	27,08	8,32
50	17992	583805	0,03	51,03	2,06
100	36700	607078	0,06	100,42	0,42
200	87547	694517	0,13	209,76	4,88
300	120309	658115	0,18	304,35	1,45
400	209845	785373	0,27	444,99	11,25
500	267948	814479	0,33	547,97	9,59
600	419679	1084547	0,39	644,60	7,43
700	424905	952300	0,45	743,31	6,19
800	469192	921397	0,51	848,36	6,05
900	593123	1028268	0,58	961,03	6,78
1000	498043	782306	0,64	1060,72	6,07

UMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,999672603
Quadrado de R	0,999345314
Quadrado de R ajustado	0,999279845
Erro-padrão	0,005827536
Observações	12



ANOVA					
	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	0,518384805	0,518384805	15264,49155	2,96064E-17
Residual	10	0,000339602	3,39602E-05		
Total	11	0,518724407			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	-0,00024789	0,002938236	-0,084366992	0,934429749	-0,006794688	0,006298908
Variável X 1	0,000640637	5,18526E-06	123,549551	2,96064E-17	0,000629083	0,00065219

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais	Residuais-padrão
1	0,015768031	0,000679614	0,122313261
2	0,031783953	-0,000965443	-0,173755295
3	0,063815795	-0,003362279	-0,605125009
4	0,127879481	-0,001824971	-0,328448592
5	0,191943167	-0,009134691	-1,644012972
6	0,256006852	0,011184661	2,012955581
7	0,320070538	0,00891032	1,603631865
8	0,384134223	0,00282826	0,509015071
9	0,448197909	-0,002009733	-0,361701036
10	0,512261595	-0,003043527	-0,547757733
11	0,57632528	0,000492242	0,088591103
12	0,640388966	-0,003754452	-0,675706244

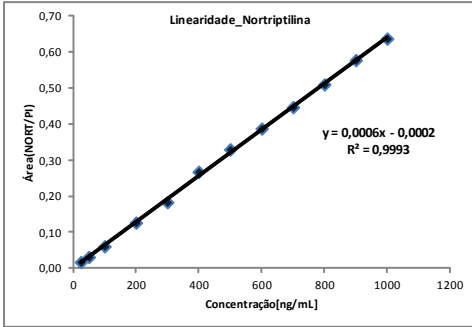


Tabela 41 - Resultados para o 1º dia da Precisão Intermédia da AMI a) e NORT b)

a) AMI						
Valores	ng/mL	Área AMI	PI	Área (AMI/PI)	$y = 0,0143x - 0,0438$	BIAS
PI_1	25	158054	607889	0,26	21,25	-15,02
PI_2	50	489986	784527	0,62	46,74	-6,52
PI_3	100	1088074	829983	1,31	94,74	-5,26
PI_4	300	3005376	702306	4,28	302,31	0,77
PI_5	500	4937469	694362	7,11	500,32	0,06
PI_6	750	8023011	746464	10,75	754,67	0,62
PI_7	1000	11685670	815619	14,33	1004,98	0,50

Prec.Int\_1º dia Amitriptilina

$y = 0,0143x - 0,0438$   
 $R^2 = 0,9991$

Controlos	ng/mL	Área AMI	PI	Área (AMI/PI)	$y = 0,0143x - 0,0438$	Média	DP	CV
A	25	391668	1166976	0,34	26,53	26	0,79	3,03
B	25	262836	793164	0,33	26,24			
C	25	405361	1289393	0,31	25,05			
A	500	5324809	747852	7,12	500,97	503	3,08	0,61
B	500	4811145	676025	7,12	500,74			
C	500	6389389	888063	7,19	506,19			
A	1000	2007254	140758	14,26	1000,29	1000	0,45	0,05
B	1000	11980980	839974	14,26	1000,51			
C	1000	10863496	762293	14,25	999,64			

b) NORT						
Valores	ng/mL	Área NORT	PI	Área (NORT/PI)	$y = 0,0007x - 0,0163$	BIAS
PI_1	25	1543	607889	0,00	26,91	7,65
PI_2	50	14988	739580	0,02	52,24	4,47
PI_3	100	40771	771476	0,05	98,78	-1,22
PI_4	300	155761	765536	0,20	313,95	4,65
PI_5	500	239789	695587	0,34	515,76	3,15
PI_6	750	438362	838222	0,52	770,38	2,72
PI_7	1000	576809	815619	0,71	1033,58	3,36

Prec.Int\_1º dia Nortriptilina

$y = 0,0007x - 0,0163$   
 $R^2 = 0,9999$

Controlos	ng/mL	Área NORT	PI	Área (NORT/PI)	$y = 0,0007x - 0,0163$	Média	DP	CV
A	25	5126	1372749	0,00	28,62	29	0,09	0,33
B	25	3352	870094	0,00	28,79			
C	25	4799	1282454	0,00	28,63			
A	500	226123	681064	0,33	497,59	502	10,87	2,17
B	500	221494	672920	0,33	493,51			
C	500	293012	852943	0,34	514,04			
A	1000	64765	100247	0,65	946,22	982	0,02	0,00
B	1000	503950	736383	0,68	1000,94			
C	1000	499416	730633	0,68	999,77			

Tabela 42 - Resultados para 2º dia da precisão Intermédia da AMI a) e NORT b)

a) AMI						
Valores	ng/mL	Área AMI	PI	Área (AMI/PI)	$y = 0,0143x - 0,1101$	BIAS
PI_1	25	204871	805317	0,25	25,33	1,33
PI_2	50	270485	478817	0,56	47,35	-5,29
PI_3	100	723676	544719	1,33	101,51	1,51
PI_4	300	2081855	501554	4,15	301,67	0,56
PI_5	500	6946340	973430	7,14	513,39	2,68
PI_6	750	9789643	932605	10,50	751,77	0,24
PI_7	1000	14099736	994318	14,18	1012,99	1,30

Prec.Int\_2ºdia\_Amitriptilina

$y = 0,0143x - 0,1101$   
 $R^2 = 0,9999$

Controlos	ng/mL	Área AMI	PI	Área (AMI/PI)	$y = 0,0143x - 0,1101$	Média	DP	CV
Ctr_A	25	348799	1299280	0,27	26,33	27	0,42	1,58
Ctr_B	25	249543	892478	0,28	27,12			
Ctr_C	25	355344	1279231	0,28	26,99			
Ctr_A	500	5653172	788731	7,17	515,62	506	8,62	1,70
Ctr_B	500	6304528	901478	6,99	503,29			
Ctr_C	500	7463071	1076418	6,93	499,01			
Ctr_A	1000	17969713	1295534	13,87	991,01	998	6,20	0,62
Ctr_B	1000	15771080	1125844	14,01	1000,78			
Ctr_C	1000	13013332	927369	14,03	1002,51			

b) NORT						
Valores	ng/mL	Área NORT	PI	Área (NORT/PI)	$y = 0,001x - 0,0199$	BIAS
PI_1	25	5061	815317	0,01	26,11	4,43
PI_2	50	17224	561843	0,03	50,56	1,11
PI_3	100	44512	567621	0,08	98,32	-1,68
PI_4	300	141176	520791	0,27	290,98	-3,01
PI_5	500	469636	994114	0,47	492,32	-1,54
PI_6	750	680436	963149	0,71	726,37	-3,15
PI_7	1000	957291	990155	0,97	986,71	-1,33

Prec.Int\_2ºdia\_Nortriptilina

$y = 0,001x - 0,0199$   
 $R^2 = 0,9998$

Controlos	ng/mL	Área NORT	PI	Área (NORT/PI)	$y = 0,001x - 0,0199$	Média	DP	CV
A	25	9226	1302819	0,01	26,98	27	1,10	4,06
B	25	7554	899094	0,01	28,30			
C	25	7905	1272059	0,01	26,11			
A	500	284419	590726	0,48	501,37	503	1,77	0,35
B	500	363235	754014	0,48	501,64			
C	500	418787	864085	0,48	504,56			
A	1000	1168089	1188047	0,98	1003,10	993	22,00	2,21
B	1000	1004471	1059253	0,95	968,18			
C	1000	801018	809988	0,99	1008,83			

Tabela 43 - Resultados para 3º dia da precisão Intermédia da AMI a) e NORT b)

a) AMI						
Valores	ng/mL	Área AMI	PI	Área (AMI/PI)	$y = 0,0159x - 0,0752$	BIAS
PI_1	25	178577	541779	0,33	25,46	1,84
PI_2	50	598793	778278	0,77	53,12	6,24
PI_3	100	609896	410437	1,49	98,19	-1,81
PI_4	300	2539622	539474	4,71	300,80	0,27
PI_5	500	3918879	504450	7,77	493,32	-1,34
PI_6	750	6451120	544241	11,85	750,23	0,03
PI_7	1000	8503798	536977	15,84	1000,73	0,07

Gráfico de dispersão para AMI: Área (AMI/PI) vs Concentração [ng/mL]. Título: PI\_3º dia\_Amitriptilina. Equação:  $y = 0,0159x - 0,0752$ .  $R^2 = 0,9999$ .

Controlos	ng/mL	Área AMI	PI	Área (AMI/PI)	$y = 0,0159x - 0,0752$	Média	DP	CV
A	25	150958	491422	0,3072	24,05	25	1,40	5,61
B	25	176477	564621	0,3126	24,39			
C	25	187131	537302	0,3483	26,63			
A	500	3607919	401221	8,9923	507,19	506	2,64	0,52
B	500	4369219	490181	8,9135	502,78			
C	500	5487510	609868	8,9979	507,50			
A	1000	8687009	543658	15,9788	1009,69	1038	49,03	4,72
B	1000	9432712	590411	15,9765	1009,54			
C	1000	9375163	541041	17,3280	1094,54			

b)NORT						
Valores	ng/mL	Área NORT	PI	Área (NORT/ PI)	$y = 0,0009x - 0,0175$	BIAS
PI_1	25	4734	541779	0,01	29,15	16,61
PI_2	50	22037	778278	0,03	50,91	1,81
PI_3	100	26766	410437	0,07	91,90	-8,10
PI_4	300	141081	539474	0,26	310,02	3,34
PI_5	500	217787	504450	0,43	499,15	-0,17
PI_6	750	366535	544241	0,67	767,75	2,37
PI_7	1000	476468	536977	0,89	1005,35	0,54

Gráfico de dispersão para NORT: Área (NORT/PI) vs Concentração (ng/mL). Título: Prec.Int\_3º dia\_Nortriptilina. Equação:  $y = 0,0009x - 0,0175$ .  $R^2 = 0,9996$ .

Controlos	ng/mL	Área NORT	PI	Área (NORT/ PI)	$y = 0,0009x - 0,0175$	Média	DP	CV
A	25	4003	548598	0,01	27,55	25	2,17	8,64
B	25	8174	545352	0,01	22,35			
C	25	9179	476049	0,02	25,42			
A	500	174222	401221	0,43	501,92	498	3,24	0,65
B	500	273156	401576	0,68	497,51			
C	500	320622	473220	0,68	495,59			
A	1000	415708	470562	0,88	1001,03	1002	0,83	0,08
B	1000	431334	487432	0,88	1002,68			
C	1000	478437	541041	0,88	1001,99			



Tabela 44 - Resultados para 4º dia da precisão Intermédia da AMI a) e NORT b)

a) AMI						
Valores	ng/mL	Área NORT	PI	Área (AMI/PI)	$y = 0,0261x - 0,1833$	BIAS
PI_1	25	113996	220066	0,52	26,87	7,48
PI_2	50	178608	172412	1,04	46,71	-6,57
PI_3	100	521406	267052	1,95	81,83	-18,17
PI_4	300	988929	122862	8,05	315,42	5,14
PI_5	500	2005446	153539	13,06	507,46	1,49
PI_6	750	2859196	143865	19,87	768,49	2,46
PI_7	1000	5266728	206705	25,48	983,25	-1,68

Prec.Int\_4ºdia\_Aminriptilina  
 $y = 0,0261x - 0,1833$   
 $R^2 = 0,9985$

Controlos	ng/mL	Área NORT	PI	Área (AMI/PI)	$y = 0,0261x - 0,1833$	Média	DP	CV
Ctr_A	25	132433	276518	0,48	25,37	24,85	0,46	1,83
Ctr_B	25	106521	231993	0,46	24,62			
Ctr_C	25	89333	195209	0,46	24,56			
Ctr_A	500	2293903	184741	12,42	482,76	493,20	10,45	2,12
Ctr_B	500	2221561	171389	12,96	503,66			
Ctr_C	500	1827016	143991	12,69	493,17			
Ctr_A	1000	4038771	155524	25,97	1002,00	1003,84	4,28	0,43
Ctr_B	1000	5163804	197509	26,14	1008,73			
Ctr_C	1000	4275511	164842	25,94	1000,78			

b) NORT						
Valores	ng/mL	Área NORT	PI	Área (NORT/PI)	$y = 0,0017x - 0,0129$	BIAS
PI_1	25	6836	215293	0,03	26,27	5,06
PI_2	50	12140	172618	0,07	48,96	-2,08
PI_3	100	32470	251615	0,13	83,50	-16,50
PI_4	300	64456	123644	0,52	314,24	4,75
PI_5	500	125197	152442	0,82	490,69	-1,86
PI_6	750	110206	87793	1,26	746,00	-0,53
PI_7	1000	351638	212537	1,65	980,81	-1,92

Prec.Int\_4ºdia\_Nortriptilina  
 $y = 0,0017x - 0,0129$   
 $R^2 = 0,9992$

Controlos	ng/mL	Área NORT	PI	Área (NORT/PI)	$y = 0,0017x - 0,0129$	Média	DP	CV
A	25	8583	270462	0,03	26,26	25,47	0,68	2,66
B	25	7171	241107	0,03	25,08			
C	25	6106	205377	0,03	25,08			
A	500	166209	200191	0,83	495,97	494,49	2,80	0,57
B	500	138262	168153	0,82	491,26			
C	500	129783	156232	0,83	496,24			
A	1000	245120	146859	1,67	989,40	1,66	0,03	1,91
B	1000	324342	191603	1,69	1003,34			
C	1000	292731	179589	1,63	966,41			

Tabela 45 - Resultados para 5º dia da precisão Intermédia da AMI a) e NORT b)

a) AMITRIPTILINA						
Valores	ng/mL	Área AMI	PI	Área (AMI/PI)	$y = 0,0367x - 0,373$	BIAS
PI_1	25	263277	445881	0,59	26,25	5,01
PI_2	50	628944	447678	1,40	48,44	-3,11
PI_3	100	3140998	1010318	3,11	94,88	-5,12
PI_4	300	4753346	439569	10,81	304,81	1,60
PI_5	500	5661439	311660	18,17	505,13	1,03
PI_6	750	10929976	402709	27,14	749,70	-0,04
PI_7	1000	15929534	438893	36,29	999,12	-0,09

Prec. Int. 5º dia Amitriptilina

$y = 0,0367x - 0,373$   
 $R^2 = 0,9999$

Controlos	ng/mL	Área AMI	PI	Área (AMI/PI)	$y = 0,0367x - 0,373$	Média	DP	CV
A	25	296409	511992	0,58	25,94	26	0,28	1,08
B	25	282586	505516	0,56	25,40			
C	25	287636	502253	0,57	25,77			
A	500	6590992	361790	18,22	506,56	496	12,74	2,57
B	500	5929930	330477	17,94	499,09			
C	500	4098175	236800	17,31	481,73			
A	1000	9715874	267161	36,37	1001,09	1003	14,40	1,44
B	1000	14090236	380929	36,99	1018,04			
C	1000	12396545	344941	35,94	989,40			

b) NORTRIPTILINA						
Valores	ng/mL	Área NORT	PI	Área (NORT/PI)	$y = 0,0019x - 0,0085$	BIAS
PI_1	25	12915	352908	0,04	23,73	-5,06
PI_2	50	30634	369485	0,08	48,11	-3,78
PI_3	100	141879	806233	0,18	97,09	-2,91
PI_4	300	241977	430848	0,56	300,07	0,02
PI_5	500	277108	298777	0,93	492,62	-1,48
PI_6	750	551358	402069	1,37	726,21	-3,17
PI_7	1000	879571	471703	1,86	985,88	-1,41

Prec. Int. 5º dia Nortriptilina

$y = 0,0019x - 0,0085$   
 $R^2 = 0,9998$

Controlos	ng/mL	Área NORT	PI	Área (NORT/PI)	$y = 0,0019x - 0,0085$	Média	DP	CV
A	25	18188	455978	0,04	25,47	26	0,61	2,37
B	25	17915	430063	0,04	26,40			
C	25	13983	354228	0,04	25,25			
A	500	321644	341496	0,94	500,19	499	7,03	1,41
B	500	279885	294055	0,95	505,43			
C	500	231696	250380	0,93	491,51			
A	1000	494001	260878	1,89	1001,11	2	0,09	4,55
B	1000	754858	383807	1,97	1039,61			
C	1000	550829	306763	1,80	949,54			

Tabela 46 - Estudo da Anova Factor Único para a exactidão da Amitriptilina

<b>25 ng</b>						Anova: factor único									
	<b>Dia 1</b>	<b>Dia 2</b>	<b>Dia 3</b>	<b>Dia 4</b>	<b>Dia 5</b>	<b>SUMÁRIO</b>									
<b>Rep. 1</b>	26,5	26,3	24,0	25,0	26,0	<b>Grupos</b>	<b>Contagem</b>	<b>Soma</b>	<b>Média</b>	<b>Variância</b>					
<b>Rep. 2</b>	26,2	27,1	24,4	25,0	25,0	Dia 1	3	77,7	25,9	0,63					
<b>Rep. 3</b>	25,0	27,0	26,6	25,0	26,0	Dia 2	3	80,4	26,8	0,19					
						Dia 3	3	75	25	1,96					
						Dia 4	3	75	25	0					
						Dia 5	3	77	25,6667	0,333333					
<b>Rept</b>	<b>0,79</b>														
<b>Between run</b>	<b>0,59</b>														
<b>P.Intermedia</b>	<b>0,99</b>														
<b>C.V</b>	<b>3,8%</b>														
<b>250 ng</b>						Anova: factor único									
	<b>Dia 1</b>	<b>Dia 2</b>	<b>Dia 3</b>	<b>Dia 4</b>	<b>Dia 5</b>	<b>SUMÁRIO</b>									
<b>Rep. 1</b>	501,0	515,6	507,2	483,0	507,0	<b>Grupos</b>	<b>Contagem</b>	<b>Soma</b>	<b>Média</b>	<b>Variância</b>					
<b>Rep. 2</b>	500,0	503,3	502,8	504,0	499,0	Dia 1	3	1507,2	502,4	11,08					
<b>Rep. 3</b>	506,2	499,0	507,5	493,0	482,0	Dia 2	3	1517,9	505,967	74,22333					
						Dia 3	3	1517,5	505,833	6,923333					
						Dia 4	3	1480	493,333	110,3333					
						Dia 5	3	1488	496	163					
<b>Rept</b>	<b>8,55</b>														
<b>Between run</b>	<b>2,99</b>														
<b>P.Intermedia</b>	<b>9,06</b>														
<b>C.V</b>	<b>1,8%</b>														
<b>1000 ng</b>						Anova: factor único									
	<b>Dia 1</b>	<b>Dia 2</b>	<b>Dia 3</b>	<b>Dia 4</b>	<b>Dia 5</b>	<b>SUMÁRIO</b>									
<b>Rep. 1</b>	1000,3	991,0	1009,7	1002,0	1001,0	<b>Grupos</b>	<b>Contagem</b>	<b>Soma</b>	<b>Média</b>	<b>Variância</b>					
<b>Rep. 2</b>	1000,5	1000,8	1009,5	1009,0	1018,0	Dia 1	2	2000,8	1000,4	0,02					
<b>Rep. 3</b>	999,6	1002,5	1094,5	1001,0	989,0	Dia 2	2	1991,8	995,9	48,02					
						Dia 3	2	2019,2	1009,6	0,02					
						Dia 4	2	2011	1005,5	24,5					
						Dia 5	2	2019	1009,5	144,5					
<b>Rept</b>	<b>6,59</b>														
<b>Between run</b>	<b>3,04</b>														
<b>P.Intermedia</b>	<b>7,26</b>														
<b>C.V</b>	<b>0,7%</b>														
						Anova: factor único									
						<b>SUMÁRIO</b>									
						<b>Grupos</b>	<b>Contagem</b>	<b>Soma</b>	<b>Média</b>	<b>Variância</b>					
						Entre grupos	4	100,002	1,367796	0,3123	3,47805				
						Dentro de grupo	10	73,112							
						<b>Total</b>	<b>14</b>								
						<b>ANOVA</b>									
						<b>Fonte de variaçã</b>	<b>SQ</b>	<b>gl</b>	<b>MQ</b>	<b>F</b>	<b>valor P</b>	<b>F crítico</b>			
						Entre grupos	400,0093	4	100,002	1,367796	0,3123	3,47805			
						Dentro de grupo	731,12	10	73,112						
						<b>Total</b>	<b>1131,129</b>	<b>14</b>							
						<b>SUMÁRIO</b>									
						<b>Grupos</b>	<b>Contagem</b>	<b>Soma</b>	<b>Média</b>	<b>Variância</b>					
						Entre grupos	4	71,134	1,638579	0,29788	5,19217				
						Dentro de grupo	5	43,412							
						<b>Total</b>	<b>9</b>								

Tabela 47 - Estudo da Anova Factor Único para a exactidão da Nortriptilina

<u>25 ng</u>					
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
Rep. 1	28,60	27,00	27,60	26,00	25,00
Rep. 2	28,80	28,30	22,30	25,30	26,00
Rep. 3	28,60	26,10	25,40	25,10	25,00
Rept	1,33				
Between run	1,32				
P.Intermedia	1,88				
C.V	7,1%				

<u>250 ng</u>					
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
Rep. 1	497,6	501,4	501,9	496,2	500,0
Rep. 2	493,5	501,6	479,5	491,1	505,0
Rep. 3	514,0	504,6	495,6	496,1	492,0
Rept	7,82				
Between run	0,66				
P.Intermedia	7,85				
C.V	1,6%				

<u>1000 ng</u>					
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
Rep. 1	946,2	1003,1	1001,0	989,0	1001,0
Rep. 2	1000,9	968,2	1002,7	1003,0	1014,0
Rep. 3	999,8	1008,0	1002,0	966,0	950,0
Rept	24,26				
Between run	11,79				
P.Intermedia	26,97				
C.V	2,7%				

Anova: factor único						
SUMÁRIO						
Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância		
Dia 1	3	86	28,66667	0,013333		
Dia 2	3	81,4	27,13333	1,223333		
Dia 3	3	75,3	25,1	7,09		
Dia 4	3	76,4	25,46667	0,223333		
Dia 5	3	76	25,33333	0,333333		

ANOVA						
Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	28,069333	4	7,017333	3,949719	0,035541	3,4780497
Dentro de grupos	17,766667	10	1,776667			
Total	45,836	14				

Anova: factor único						
SUMÁRIO						
Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância		
Dia 1	3	1505,1	501,7	117,67		
Dia 2	3	1507,6	502,5333	3,213333		
Dia 3	3	1477	492,3333	133,4433		
Dia 4	3	1483,4	494,4667	8,503333		
Dia 5	3	1497	499	43		

ANOVA						
Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	239,50933	4	59,87733	0,978932	0,46125	3,4780497
Dentro de grupos	611,66	10	61,166			
Total	851,16933	14				

Anova: factor único						
SUMÁRIO						
Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância		
Dia 1	3	2946,9	982,3	977,71		
Dia 2	3	2979,3	993,1	471,01		
Dia 3	3	3005,7	1001,9	0,73		
Dia 4	3	2958	986	349		
Dia 5	3	2965	988,3333	1144,333		

ANOVA						
Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	686,26267	4	171,5657	0,291502	0,87692	3,4780497
Dentro de grupos	5885,5667	10	588,5567			
Total	6571,8293	14				