

Diogo Miguel Martins Silva

DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE CATECOLAMINAS POR LC-MS/MS

Mestrado em Química

Departamento de Química

FCTUC

Setembro/2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Diogo Miguel Martins Silva

Desenvolvimento de um método analítico para quantificação de catecolaminas por LC-MS/MS

Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química, Área de especialização em
Controlo de Qualidade e Ambiente

Professor Doutor Jorge Luís Gabriel F. S. Costa Pereira

Doutor Bruno José Fernandes Oliveira Manadas

Setembro 2015

Universidade de Coimbra

Agradecimentos

Gostaria de começar por agradecer em primeiro lugar a quem me deu a oportunidade de desenvolver este projecto, nomeadamente ao Professor Doutor Jorge Luís Gabriel F. S. Costa Pereira por toda as sugestões e disponibilidade. Ao Doutor Bruno José Fernandes Oliveira Manadas por permitir o desenvolvimento do projecto no seu laboratório, no Centro de Neurociências e Biologia Celular, na orientação, transmissão de conhecimentos adquiridos ao longo do projecto.

À Vera Mendes, Joana Pinto e Margarida Coelho pelos seus conhecimentos, orientações, apoio, dedicação e paciência ao longo deste projecto, especialmente numa melhor compreensão ao nível do LC-MS/MS e na empregabilidade da validação dos métodos. Às restantes colegas e colega de laboratório (Cátia, Sandra, Mariana, Carolina e Nuno) um agradecimento também especial por toda a ajuda, disponibilidade e momentos de boa-disposição proporcionados ao longo projecto, fundamentais para uma maior motivação na sua continuação.

Não poderia deixar de agradecer aos meus amigos de faculdade e não só, nomeadamente ao Carvalho, Serrano, ao meu grande afilhado de curso Bernardo, ao Gonçalo e tantos outros que tive a felicidade de conhecer durante a minha vida académica, por todos os momentos de descontração, convívio, entre outros que me ajudaram a relaxar e meter as ideias em ordem.

Aos meus pais, tudo isto não seria possível sem eles (não só biologicamente falando), mas sim por todo o apoio, força e compreensão nos fins-de-semana não passados em casa e momentos importantes aos quais não pude estar presente. Obrigado por tudo, o que hoje sou vos devo a vocês e por isso um obrigado nunca será suficiente!

Por último, à Vanessa um obrigado também não chega nem nunca irá chegar! A tua importância na minha vida ao longo deste ano tornou-se ainda maior! Todo o teu apoio, compreensão e carinho foram fundamentais, mas também te peço desculpas por todos os momentos stressantes passados, mas que no fim me soubeste acalmar e ver as coisas de uma maneira positiva. Sou um sortudo por te ter a meu lado!

Resumo

Estudos recentes indicam que um défice da dopamina no cérebro é a principal causa da doença de Parkinson. A síntese do metabolismo da dopamina ocorre no cérebro e fora deste, nomeadamente no plasma sanguíneo e no tracto gastrointestinal.

O metabolismo da dopamina é constituído por L-tirosina, levodopa, dopamina, ácido 3,4-dihidróxifenilacético, 3-metoxitiramina e por último ácido homovanílico. A biossíntese da dopamina inicia-se na L-tirosina, e por meio de enzimas termina na formação da dopamina. A degradação da dopamina ocorre através de enzimas originando o ácido homovanílico.

O presente trabalho descreve algumas das fases mais relevantes no desenvolvimento e validação de métodos analíticos baseados em LC-MS/MS para a posterior quantificação das quatro catecolaminas (L-tirosina, levodopa, dopamina e 3-metoxitiramina). Para garantir a fiabilidade dos resultados vários parâmetros de validação foram definidos: identificação, selectividade, calibração, limiares analíticos, precisão, exactidão e carry-over.

Na análise dos espectros de fragmentação foi possível obter três fragmentos usados para quantificar cada analito. A selectividade foi comprovada para todos os compostos tendo um limite de quantificação de 0,87 0,92 0,48 0,46 nM para a L-tirosina, levodopa, dopamina e 3-metoxitiramina. Todos os fragmentos de cada analito, durante 3 dias diferentes, demonstraram boa linearidade nas gamas de trabalho da L-tirosina (0,05 a 0,250 μM), levodopa (0,1 a 0,5 μM), dopamina (0,025 a 0,125 μM) e 3-metoxitiramina (0,025 a 0,125 μM). Ao nível da precisão e exactidão demonstraram na L-DOPA e dopamina apenas um analito de ambos apresenta uma transição que possa ser usada para quantificação, nomeadamente 198,03/135,01 e 154,20/65,07. Quanto à 3-MT qualquer uma das 3 transições poderá ser usada para quantificar, enquanto na L-tirosina não se poderá usar nenhuma das 3 transições para quantificação sendo necessário mais testes relativos a este analito. Por último não ocorreu qualquer efeito de carry-over em qualquer fragmento dos analitos em questão.

Abstract

Recent studies indicate that a dopamine deficit in the brain is the primary cause of Parkinson's disease. The synthesis of dopamine metabolism occurs in the brain and outside thereof, in particular blood plasma. The dopamine metabolism comprises L-tyrosine, L-DOPA, dopamine, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, 3-methoxytyramine and homovanillic acid finally. The dopamine biosynthesis starts from the L-tyrosine and through ends in the formation of enzymes which dopamine from which their degradation by enzymes yields the homovanillic acid.

This project describes some of the most important stages in the development and validation of analytical methods based on HPLC-MS/MS for the quantification of the four catecholamines (L-tyrosine, levodopa, dopamine and 3-methoxytyramine). To ensure the reliability of the results of several validation parameters were defined: identification, selectivity, calibration, analytical thresholds, precision, accuracy and carry-over.

The analysis of the fragmentation spectra was possible to obtain three fragments used to quantify each analyte. Selectivity was demonstrated for all compounds having a limit of quantification of 0.87 0.92 0.48 0.46 nM for L-tyrosine, L-DOPA, dopamine and 3-methoxytyramine. All fragment of each analyte during 3 different days showed good linearity in the working ranges of L-tyrosine (0.05 to 0.250 μ M), L-DOPA (0.1 to 0.5 μ M), dopamine (0.025 0.125 μ M) and 3-methoxytyramine (0.025 to 0.125 μ M). At the level of precision and accuracy demonstrated in L-DOPA and dopamine only one of both analyte has a transition that can be used for quantification, particularly 198.03/135.01 and 154.20/65.07. As for the 3-MT any of the three transitions can be used to quantify while the L-tyrosine will not be able to use any of the three transitions being necessary to quantify most tests for this analyte. Finally there were no carry-over effect in any fragment of the analytes in question.

Nomenclatura

α	Selectividade da coluna
R_S	Resolução dos picos num cromatograma obtido por HPLC
t_0	Tempo morto
t_R	Tempo de retenção de um determinado componente
V_R	Volume de retenção
3-MT	3-metoxitiramina
AADC	Aminoácido aromático descarboxilase
APCI	Ionização química à pressão atmosférica
CE	Energia de colisão
CID	Dissociação induzida por colisão
COMT	Catecol-O-metil-transferase
CV	coeficiente de variação
DA	Dopamina
DOPAC	3,4-dihidroxifenilacético
DP	Doença de Parkinson
ESI	Ionização por electrospray
F	Fluxo do eluente
GC	Cromatografia gasosa
HPLC	Cromatografia líquida de alto desempenho
HPLC-NP	Cromatografia líquida de alto desempenho com fase estacionária normal (fase sólida polar)

HPLC-RP	Cromatografia líquida de alto desempenho com fase estacionária reversa (fase sólida apolar)
HVA	Ácido homovanílico
ICH	Conferência mundial de harmonização
IS	Padrão interno
IUPAC	União Internacional da Química Pura e Aplicada
k	Factor de retenção
L-DOPA	Levodopa
LC	Cromatografia líquida
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MAO	Monoamina oxidase
MRM	Monitorização de reacção múltipla
QqQ	Triplo quadrupolo
SCF	Cromatografia de fluido supercrítico
Snc	Substantia nigra pars compacta
TEFU	Tomografia por emissão de um fóton único
TEP-FDOPA	Tomografia por emissão de positrões flurodopa
TV	Valor de teste
VMAT	Transportador monoamina vesicular
WADA	Agência mundial antidopagem
WLS	Mínimos quadrados ponderados

Conteúdo

1	Introdução	8
1.1	Doença de Parkinson	9
1.2	Metabolismo da dopamina	10
1.2.1	Constituição do metabolismo da dopamina	10
1.2.2	Biossíntese da dopamina	13
1.2.3	Degradação da dopamina	13
1.2.4	Síntese periférica da dopamina	14
2	Metodologia analítica	16
2.1	Cromatografia	17
2.1.1	Cromatografia líquida de alto desempenho	18
2.1.2	Espectrometria de massa	24
2.1.3	Técnica HPLC-MS/MS	29
2.2	Validação do método	29
2.2.1	Identificação	30
2.2.2	Selectividade	30
2.2.3	Calibração	30
2.2.3.1	Gama de trabalho	30
2.2.3.2	Linearidade	30
2.2.3.3	Homogeneidade das variâncias	31
2.2.3.4	Mínimos quadrados ponderados	32
2.2.4	Limites analíticos	33
2.2.4.1	Limite de detecção	33
2.2.4.2	Limite de quantificação	34
2.2.5	Precisão	35
2.2.6	Exactidão	35
2.2.6.1	Carry-over	36
2.2.7	Recuperação	36
2.2.8	Efeito matriz	36
2.2.9	Estabilidade	37

3	Materiais e métodos	38
3.1	Materiais e equipamentos	39
3.1.1	Reagentes e solventes	39
3.1.2	Equipamentos	40
3.2	Procedimentos práticos	41
3.2.1	Preparação das soluções stock	41
3.2.2	Preparação da curva de calibração	41
3.2.3	Condições experimentais	42
3.2.3.1	Cromatografia líquida	42
3.2.3.2	Espectrometria de massa	42
4	Análise de Resultados	44
4.1	Validação do método analítico	45
4.1.1	Identificação e selectividade	45
4.1.2	Gama de trabalho	50
4.1.3	Calibração	50
4.1.3.1	Representatividade	50
4.1.3.2	Linearidade	55
4.1.3.3	Curva de calibração	55
4.1.3.4	Mínimos quadrados ponderados	59
4.1.4	Limiares analíticos	60
4.1.5	Precisão	62
4.1.6	Exactidão	63
4.1.7	Carry-over	63
5	Conclusão e perspectivas futuras	65
6	Anexo I - L-tirosina	72
7	Anexo II - L-DOPA	94
8	Anexo III - 3-MT	115
9	Anexo IV - Dopamina	135

Capítulo 1

Introdução

Actualmente, as doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson, matam por ano 6,9 milhões de pessoas, segundo a Organização Mundial de Saúde. Segunda a mesma na Europa, a avaliação dos custos com a doença de Parkinson foi avaliada em 139 mil milhões de euros em 2004. Os elevados custos não são para a cura do paciente mas para o máximo bem-estar possível do paciente, pois a doença de Parkinson ainda carece de uma cura.

Nesta secção a pretende-se expor a relação entre a doença de Parkinson e o metabolismo da dopamina para uma melhor compreensão desta doença neurodegenerativa.

1.1 Doença de Parkinson

A primeira referência à doença de Parkinson (DP), data de 1817, quando um cirurgião inglês, Doutor James Parkinson, publicou “An Essay on the Shaking Palsy”. A DP afecta tanto homens como mulheres (embora tenha maior incidência nos homens) e os primeiros sintomas tendem a surgir entre os sessenta e setenta anos de idade [1].

A doença de Parkinson é uma doença neurodegenerativa crónica caracterizada maioritariamente por sintomas motores (bradicinesia, tremores, rigidez e problemas de postura). Diversos sintomas não motores como dificuldades na fala, desequilíbrios ao andar, perturbações do sono, alterações sensoriais, entre outros, estão associados à DP [1, 2].

A degeneração das células nervosas ocorre numa parte do cérebro chamada *substantia nigra pars compacta* (SNc). Nestas células, a dopamina, sendo um neurotransmissor, é responsável por dar início a um circuito de mensagens que coordena o movimento. Na ausência ou redução dos níveis normais de dopamina, os neurónios alojados nos gânglios basais, mais concretamente no estriado, não são estimulados adequadamente originando os sintomas [3].

O diagnóstico da DP é exclusivamente baseado no historial clínico do paciente, não havendo qualquer tipo de exame que disponibilize ao médico a informação necessária para diagnosticar o paciente. Contudo, existem técnicas em desenvolvimento como tomografia por emissão de positrões fludopa (TEP-FDOPA) e a tomografia por emissão de um fotão único (TEFU) que podem confirmar degradação dopaminérgica no estriado, mas ainda são usadas apenas para investigação e não para diagnóstico da DP [1].

O tratamento da DP só foi possível graças à descoberta da deficiência dopaminérgica, originando assim um virar da página para o desenvolvimento de medicamentos para a DP [1]. É importante realçar, que o desenvolvimento de medicamentos como levodopa, carbidopa, inibidores de monoaminas, agonistas da dopamina (DA) e inibidores de catecol-o-metil-transferase (COMT) não são

uma cura para a DP, apenas reduzem e aliviam os sintomas causados.

1.2 Metabolismo da dopamina

As doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson e neurológicas como a esquizofrenia estão associadas ao metabolismo da dopamina [4], sendo a desregulação existente no metabolismo a principal causa do seu aparecimento. A relação entre o metabolismo da dopamina e as doenças neurodegenerativas foi descoberta por Arvid Carlsson, Eric Kandel e Paul Greengard graças ao trabalho por eles desenvolvido na neurotransmissão catecolaminérgica. O trabalho desenvolvido proporcionou novos métodos para a quantificação de dopamina e uma melhor compreensão da dopamina como neurotransmissor [5].

1.2.1 Constituição do metabolismo da dopamina

O metabolismo da dopamina é constituído em grande parte por catecolaminas que derivam da L-tirosina. No caso da dopamina, o grupo assinalado com (R) corresponde ao grupo amina ligado através de uma ponte de etil (-R = $-CH_2CH_2CH_2$) (figura 1.1) [6].

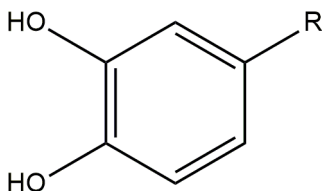


Figura 1.1: Estrutura molecular da catecolamina. O grupo assinalado com (R) corresponde ao grupo amina ligado por uma ponte de etil.

L-tirosina

L-tirosina (figura 1.2) é um aminoácido que resulta da síntese da fenilalanina, pela enzima fenilalanina hidroxilase [7]. A L-tirosina é um dos aminoácidos mais abundantes no organismo dos seres vivos, sendo também um precursor da síntese da tiroxina, melanina, e dos neurotransmissores dopamina e norepinefrina. As fontes de L-tirosina provêm de vários alimentos como peixe, ovos, bananas entre outros. Embora a L-tirosina esteja presente em vários mecanismos, o mais significativo é o seu papel como precursor da norepinefrina e na síntese da dopamina.

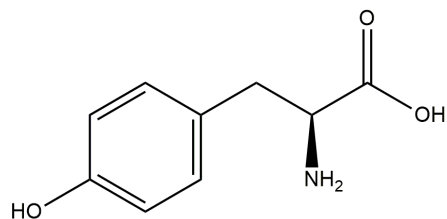


Figura 1.2: Estrutura molecular da L-tirosina.

Levodopa

Levodopa (L-DOPA), figura 1.3, presente no corpo humano é proveniente da biossíntese da L-tirosina, sendo também um precursor da dopamina.

A produção da L-DOPA também é realizada em laboratório, pois é um dos fármacos para o tratamento da doença de Parkinson.

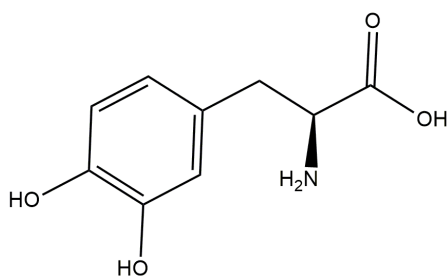


Figura 1.3: Estrutura molecular da levodopa.

Dopamina

A dopamina (3,4-dihidroxifeniletilamina) é um neurotransmissor no sistema nervoso central, onde intervém em vários mecanismos fisiológicos e na origem de várias doenças psiquiátricas e neurológicas, como Parkinson.

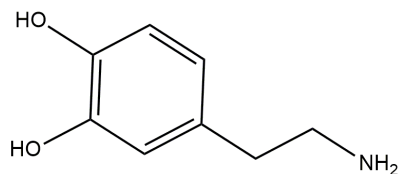


Figura 1.4: Estrutura molecular da dopamina.

Ácido 3,4-dihidróxifenilacético e 3-metoxitiramina

A degradação da dopamina origina dois metabolitos ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC)¹ (figura 1.5) e 3-metoxitiramina (3-MT), figura 1.6. A metabolização de ambos os metabolitos dará origem ao ácido homovanílico.

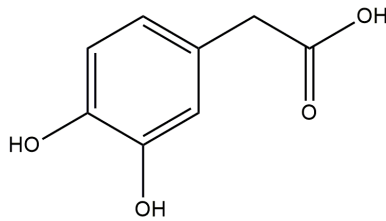


Figura 1.5: Estrutura molecular do 3,4-dihidroxifenilacético.

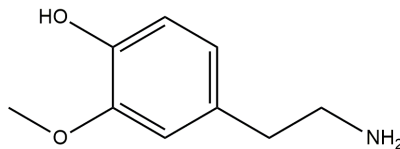


Figura 1.6: Estrutura molecular da 3-metoxitiramina.

Ácido homovanílico

O ácido homovanílico (HVA)² (figura 1.7) é o produto final do metabolismo da dopamina. Sendo produzido no corpo humano, é possível encontrá-lo no plasma sanguíneo, no líquido cefalorraquidiano e na urina, por onde é excretado. De salientar, que a concentração de HVA é superior nos homens do que nas mulheres [8].

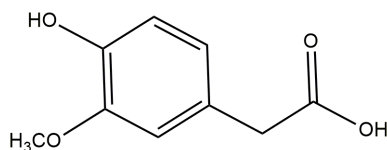


Figura 1.7: Estrutura molecular do ácido homovanílico.

¹Do Inglês, dihydroxyphenylacetic acid

²Do Inglês, homovanillic acid

1.2.2 Biossíntese da dopamina

A biossíntese da dopamina ocorre no citosol, começando com a hidroxilação da tirosina que dá origem à L-DOPA. A última etapa na síntese incide na conversão da L-DOPA em DA pela enzima aminoácido aromático descarboxilase (AADC). Esta enzima AADC é muitas vezes designada como L-DOPA descarboxilase [6, 9, 10].

De salientar, que a tirosina é o passo limite na biossíntese da dopamina e do controlo da concentração da dopamina, pois a tirosina hidroxilase opera na sua actividade catalítica máxima, não originando uma grande concentração de L-DOPA [9, 10].

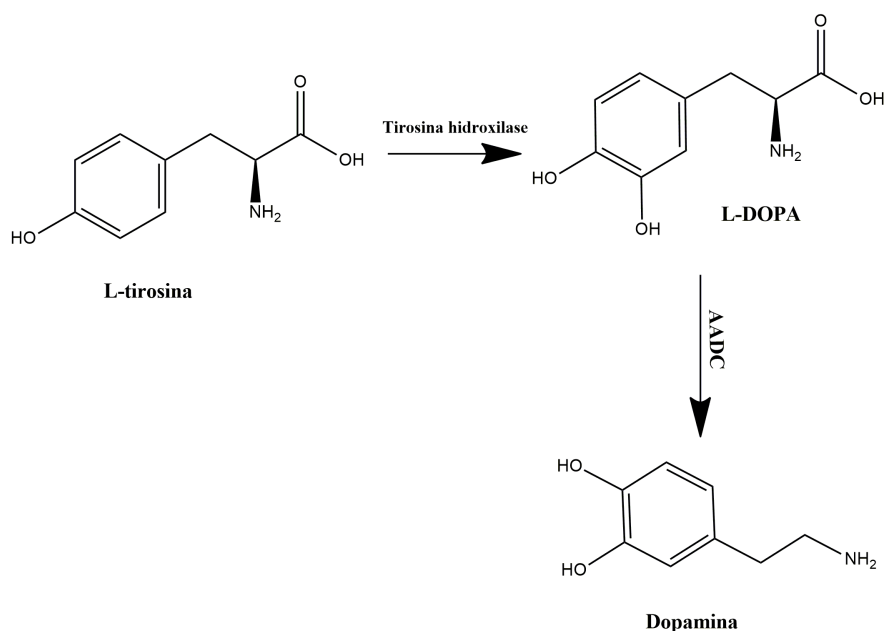


Figura 1.8: Esquema da biossíntese da dopamina. No início ocorre a conversão da L-tirosina em L-DOPA, que sofre descarboxilação para originar dopamina.

1.2.3 Degradação da dopamina

Depois de sintetizada no citosol, a DA é transportada para a fenda sináptica através de um gradiente criado, permitindo a sua passagem. Esta é facilitada por um transportador monoamina vesicular (VMAT)³ que permite não só a passagem da dopamina como de prótons em simultâneo.

A degradação da DA acontece logo na entrada da fenda sináptica onde é captada pela enzima monoamina oxidase (MAO) ou catecol-o-metil transferase (COMT) (figura 1.9). Em relação à MAO existem duas isoformas a MAO-A

³Do Inglês, vesicular monoamine transporter

e a MAO-B, encontradas no sistema nervoso central, ambas podem degradar a dopamina, sendo a MAO-B a grande responsável por grande parte da sua degradação. A DA que não seja degradada na fenda sináptica difunde-se para fora onde é degradada por acção da COMT. A degradação da DA tanto pela MAO-B como pela COMT dá origem a um metabolito estável, o ácido homovanílico, sendo excretado posteriormente pela urina [6].

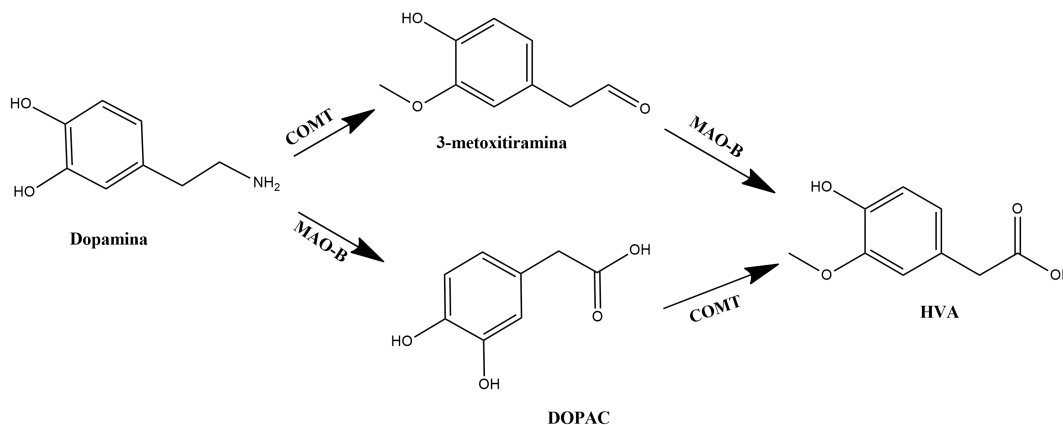


Figura 1.9: Mecanismo da degradação da dopamina. A dopamina é oxidada, pela MAO-B, convertendo-se ao ácido dihidroxifenilacético (DOPAC), sendo novamente oxidado a HVA pela COMT. Noutra etapa alternativa, a dopamina é metilada a 3-metoxitiramina pela COMT e oxidada a HVA pela MAO-B.

1.2.4 Síntese periférica da dopamina

A dopamina não é sintetizada apenas no cérebro mas também nos rins e no tracto gastrintestinal (figura 1.10) [11–16].

Nos rins a produção da dopamina depende apenas da L-DOPA presente na corrente sanguínea que depois é convertida em dopamina, pelo aminoácido aromático descarboxilase [11].

No tracto gastrintestinal, a fonte de L-DOPA para posterior conversão em dopamina não provém da L-DOPA circulante mas sim da comida ingerida, uma vez que vários alimentos contêm tirosina, sendo convertida em L-DOPA e posteriormente em dopamina [12, 14, 15].

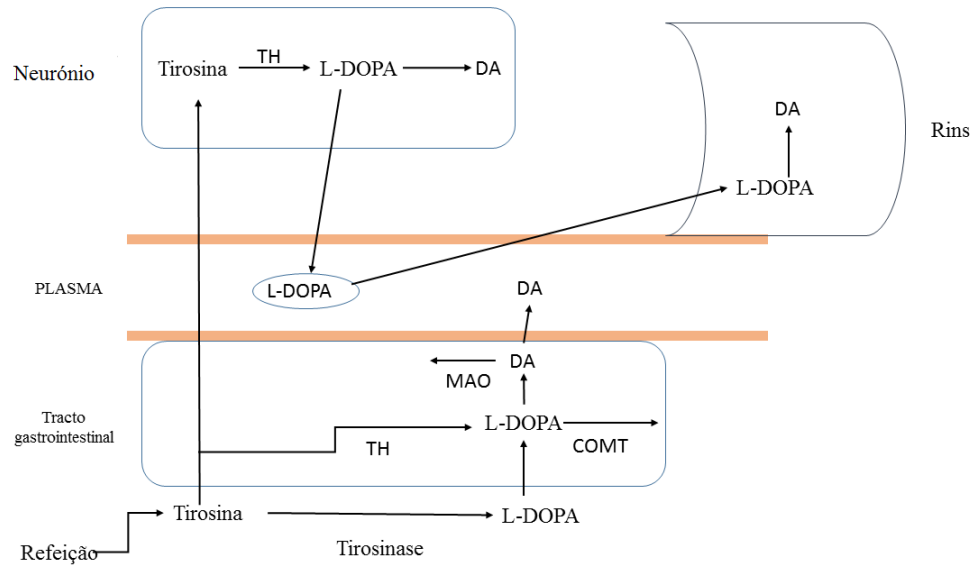


Figura 1.10: Síntese periférica da dopamina. Para além da síntese da dopamina na fenda sináptica, esta também pode ser sintetizada tanto nos rins como no tracto gastrointestinal. No tracto gastrointestinal a fonte de L-DOPA para conversão em DA, provém da tirosina contida nos alimentos ingeridos. Os rins convertem a L-DOPA que circula no plasma pra a conversão através do aminoácido aromático descarboxilase.

Capítulo 2

Metodología analítica

Neste capítulo pretende-se fazer uma fundamentação físico-química das técnicas analíticas utilizadas, nomeadamente cromatografia e espectrometria de massa e numa segunda parte, o tratamento dos resultados obtidos e os parâmetros usados para o mesmo.

2.1 Cromatografia

A União Internacional da Química Pura e Aplicada (IUPAC) define cromatografia como “*método físico de separação de componentes que para serem separados são distribuídos em duas fases, uma que é estacionária (fase estacionária), enquanto a outra fase, a fase móvel que flui numa direcção definida*” [17].

A cromatografia é uma técnica de separação e identificação de componentes numa mistura. Os tipos de cromatografia (tabela 2.1) são classificados consoante o tipo de suporte, o modo de separação, a natureza da fase móvel, assim como a composição da mesma e o seu modo de operação [18].

Tabela 2.1: Classificação dos tipos de cromatografia, dependendo do seu tipo de suporte, modo de separação natureza da fase móvel, composição da fase móvel e modo de operação.

Tipo de suporte
Coluna
Planar (papel/camada fina)
Modo de separação
Adsorção
Partição
Permuta iónica
Exclusão molecular
Afinidade
Natureza da fase móvel
Cromatografia gasosa (GC) ¹
Cromatografia líquida (LC) ²
Cromatografia de fluido supercrítico (SCF) ³
Modo de operação
Análise frontal
Análise por deslocamento
Eluição

De destacar, os dois tipos de cromatografia, mais aplicados para análise de amostras, a cromatografia gasosa e líquida.

A **cromatografia gasosa** permite a separação de substâncias voláteis, que são arrastadas por um gás através de uma fase estacionária (sólido ou um líquido). Na fase estacionária a distribuição dos componentes da mistura entre as duas fases ocorre através de processos físicos e químicos, tais como a adsorção, diferenças de solubilidade ou volatilidade. Na fase móvel é utilizado um gás, denominado gás de arraste, que transporta a amostra através da coluna cromatográfica até ao detector onde os componentes separados são detectados. Os gases mais utilizados são o hidrogénio, azoto, hélio e árgon [19–21].

A **cromatografia líquida** é uma técnica adequada para a separação dos componentes (por exemplo, espécies iónicas, macromoléculas) de soluções líquidas e utiliza-se quer para fins analíticos quer para fins preparativos e em escala comercial. A amostra é injectada na coluna usando uma micro-seringa ou uma válvula de injeção e é homogeneamente distribuída no topo da coluna. A fase móvel transportando a amostra é forçada a percolar⁴ através da coluna por uma acção externa que pode ser a simples força da gravidade – cromatografia de baixa pressão – ou uma força mais intensa gerada por uma bomba – cromatografia de alta pressão também chamada cromatografia de alta eficiência (HPLC)⁵ de modo a superar a resistência da coluna ao escoamento da fase móvel.

2.1.1 Cromatografia líquida de alto desempenho

A HPLC teve uma enorme relevância no avanço das ciências biológicas e biomédicas. O sucesso da HPLC pode ser atribuído às suas propriedades inerentes, como reprodutibilidade, grande selectividade e manipulação.

A HPLC é constituída por reservatório da fase móvel, bomba, injector, coluna e detector (figura 2.1).

A fase móvel é introduzida a grande pressão pela bomba na coluna mantendo o fluxo contante. A principal característica da fase móvel, como exemplos a água, o etanol e acetonitrilo, é que dissolve a amostra sem qualquer interacção química entre ambas. Grande parte das separações ocorridas na HPLC são conseguidas através de fase reversa e podem ser conseguidas por eluição isocrática (fase móvel constante) ou eluição gradiente (fase móvel alterada).

A introdução da amostra é feita por uma seringa convencional, enquanto o fluxo da fase móvel é mantido constante na coluna. As separações que ocorrem na coluna têm como princípio a interacção entre os componentes da amostra e a

⁴Fazer passar lentamente um líquido através de materiais sólidos para o filtrar (coar) ou para extrair substâncias desses materiais

⁵Este termo surgiu inicialmente do Inglês, “high pressure liquid chromatography” mas evoluiu para “high performance liquid chromatography”.

fase móvel e estacionária. Esta interação permite distinguir os analitos, através do tempo de retenção, por exemplo. Os analitos movem-se através da coluna de uma posição inicial, quando são introduzidas, para uma posição final, diferente para cada analito, para que possam ser detectados. De realçar, as interações entre a fase estacionária e a fase móvel podem ser de adsorção, partição, permuta iónica, exclusão molecular e afinidade cromatográfica [22, 23]

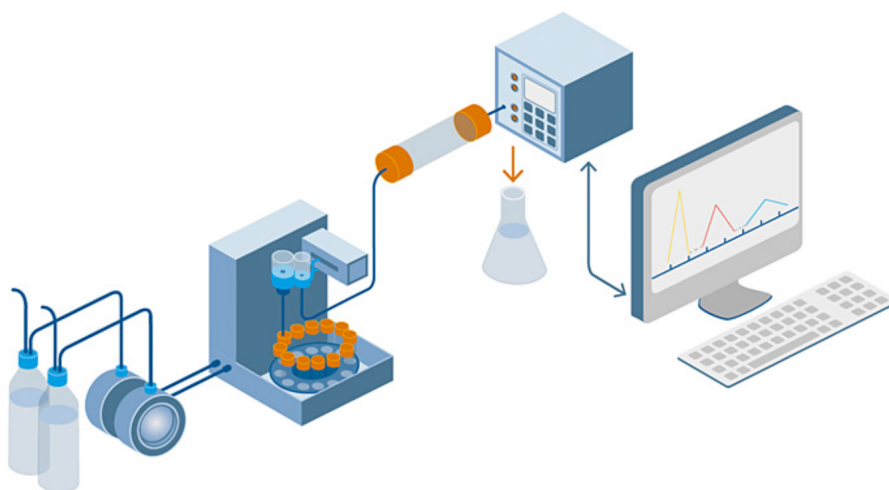


Figura 2.1: Sistema de HPLC. A fase móvel é conduzida para a coluna, através da pressão gerada pela bomba. O injetor é usado para colocar a amostra na coluna sem parar o fluxo da bomba. Na coluna ocorre a separação, e a resposta do detector é gerada.

Na análise de amostras através de HPLC é importante ter em conta as interações entre o soluto e a fase estacionária que podem ser de natureza diferente [21, 24, 25]:

- **Adsorção**, as separações ocorrem através de interações electrostáticas e forças de van der Waals entre a fase estacionária e os componentes a separar da fase móvel. A fase estacionária pode ser sílica, gel, alumina ou celulose.
- **Partição**, baseada nas diferenças de solubilidade dos componentes na fase estacionária (líquido) e na fase móvel (líquido).
- **Permuta iónica**, as separações ocorrem devido a diferentes tendências dos componentes iónicos ou ionizados permutarem com os iões da fase estacionária, sendo deslocados para a fase móvel.
- **Exclusão molecular**, os componentes são separados segundo a dimensão das moléculas, isto é, moléculas grandes não penetram no interior do suporte (partículas porosas de gel) e movem-se mais rapidamente ao longo da

coluna de onde emergem primeiro, enquanto nas moléculas pequenas a sua velocidade de deslocamento é retardada pois penetram no gel, emergindo da coluna mais tardiamente.

- **Afinidade**, ocorre uma ligação molecular específica e reversível entre o soluto e um ligante imobilizado na fase estacionária. Esta técnica utiliza-se especificamente para separar produtos biológicos, como ligações entre enzimas e substratos, anticorpos e substratos e receptores de hormonas.

A cromatografia líquida de alto desempenho pode ser dividida em dois grupos principais: em fase normal (HPLC-NP)⁶ e em fase reversa (HPLC-RP)⁷. A separação por adsorção e por partição podem ser realizadas por HPLC-NP, onde a fase estacionária é mais polar que a fase móvel, assim como por HPLC-RP, onde a fase estacionária apresenta menor polaridade que o solvente. Contudo, a HPLC-RP é mais usado que a HPLC-NP, devido ao seu maior campo de aplicações pois os compostos orgânicos são mais solúveis em meios menos polares, ou seja, apresentam maior afinidade para a fase estacionária (HPLC-RP) e como tal conseguem assim serem separados [22].

Existem vários parâmetros que caracterizam e influenciam a separação dos analitos na cromatografia em geral. Na figura 2.2 apresenta-se um exemplo simplificado de registo cromatográfico onde estão assinaladas algumas grandezas que permitem caracterizar este tipo de registos.

⁶Do Inglês high pressure liquid chromatography – normal phase

⁷Do Inglês high pressure liquid chromatography – reverse phase

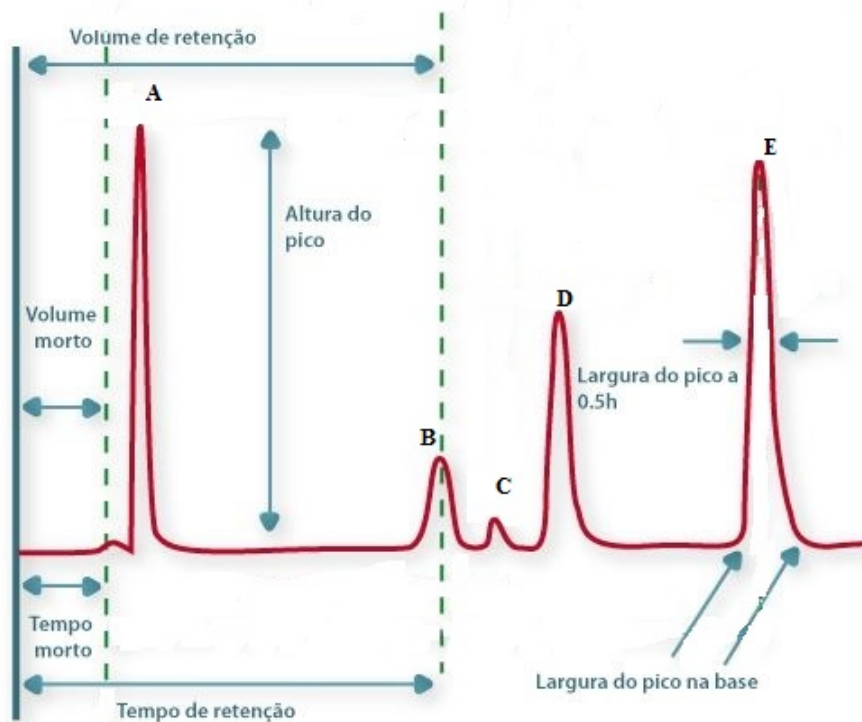


Figura 2.2: Exemplificação simplificada de um sinal cromatográfico. A eluição de um determinado componente num determinado instante pode ser caracterizada atendendo a diversos parâmetros assinalados na figura, adaptado de [18].

O **Tempo de retenção** (t_R) avalia o tempo decorrido entre a aplicação da amostra (injecção) e a eluição de determinado componente; pode ser avaliada através da diferença temporal do registo cromatográfico, entre a injecção da amostra e o instante em que o sinal cromatográfico atinge o seu máximo. Utilizado como identificador de um dado analito num dado sistema complexo. O tempo de retenção é inversamente proporcional ao fluxo da fase móvel, pois quanto maior o fluxo, menor será o tempo de retenção [22, 26].

Designa-se de **Tempo morto** (t_0) ao período de tempo que demora um soluto que não foi retido na coluna para ser eluído, isto é, um composto que é insolúvel ou não é adsorvido na fase estacionária.

O **Volume de retenção** (V_R) corresponde ao volume da fase móvel necessário para eluir o analito, num determinado fluxo. O volume de retenção (cm^3/ml) é o produto do tempo de retenção e fluxo do eluente (F), como descrito na equação 2.1:

$$V_R = t_R \times F \quad (2.1)$$

onde t_R representa o tempo de retenção e F o fluxo do eluente.

- **Factor de retenção (k)** fornece uma medida relativa do tempo que o analito se encontra na fase estacionária e na fase móvel, sendo específico para cada substância e depende de vários factores como fase estacionária, fase móvel, temperatura, entre outros. O seu cálculo é demonstrado na equação 2.2, onde o volume de retenção (V_R) (ou eluição) do pico do soluto correspondendo a um tempo de retenção (t_R), característico de cada analito e função da sua dimensão, V_0 é equivalente ao volume morto medido pelo tempo de retenção, t_0 de um componente excluído. [26, 27].

$$k = \frac{V_R - V_0}{V_0} = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (2.2)$$

- **Selectividade da coluna (α)** avalia o grau de separação dos cromatogramas de dois analitos diferentes, ou seja, quando estão presentes dois compostos na amostra a selectividade da cromatografia está relacionada com a capacidade em distinguir os dois picos (um para o composto 1, outro para o composto 2). A selectividade da coluna corresponde à distância entre os máximos de dois sinais cromatográficos e pode-se exprimir pela equação 2.3, sendo k o factor de retenção [26].

$$\alpha = \frac{k_1}{k_2} \quad (2.3)$$

- **Eficiência da coluna** mede o grau de dispersão do sinal cromatográfico numa coluna e é expressa pela altura equivalente a um prato teórico ou pelo número de pratos teóricos, como demonstrado pela equação 2.4, onde w_h é a largura do sinal cromatográfico e t_R o tempo de retenção [22, 26, 27].

$$N = 16 \times \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2 \quad (2.4)$$

- **Resolução (R_S)** Para o cálculo da resolução (equação 2.5), considera-se as larguras dos sinais cromatográficos (w_h), na linha de base, bem como os tempos de retenção (t_{Rn}) e a largura máxima do meio dos sinais cromatográfico ($w_{0.5h}$), ver figura 2.3.

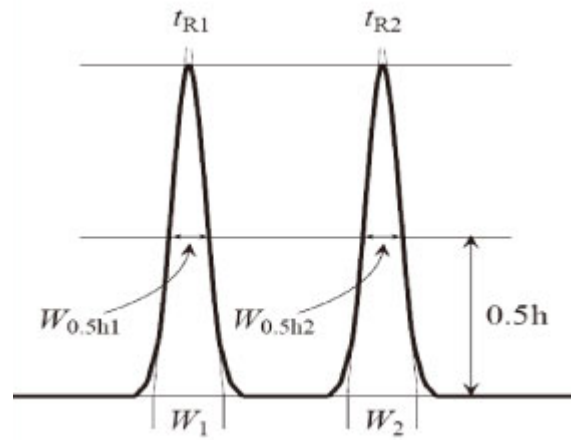


Figura 2.3: Resolução de dois sinais cromatográficos. Resolução de dois sinais cromatográficos pode ser avaliada através da comparação dos tempos de retenção relativamente à largura dos respectivos sinais cromatográficos adjacentes.

O valor deste parâmetro reflecte o grau de perfeição com que dois sinais cromatográficos são separados, tendo em conta a contribuição da eficiência e da selectividade. Para $R_S = 1,5$, a separação é praticamente completa, caso $R_S=2$ a separação do sinais cromatográfico de interesse e o sinais cromatográfico vizinho é ideal, para o método ser robusto.

$$R_S = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\frac{1}{2}(w_2 + w_1)} = 1.18 \times \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{0.5_1} + w_{0.5_2}} \quad (2.5)$$

2.1.2 Espectrometria de massa

A espectrometria de massa é uma técnica analítica que permite a identificação de substâncias químicas através da separação de íons gasosos produzidos através de campos elétricos e magnéticos classificando-os segundo a razão massa/carga [28]. O aparelho usado na espectrometria de massa chama-se espectrômetro de massa sendo também usado como detector do HPLC pois fornece uma identificação eficaz dos analitos de interesse.

O espectrômetro de massa (figura 2.4) consiste numa fonte de íons, num analisador de massas e num detector, que opera em vácuo permitindo aos íons movimentarem-se livremente sem colidir ou interagir com outras espécies [29].

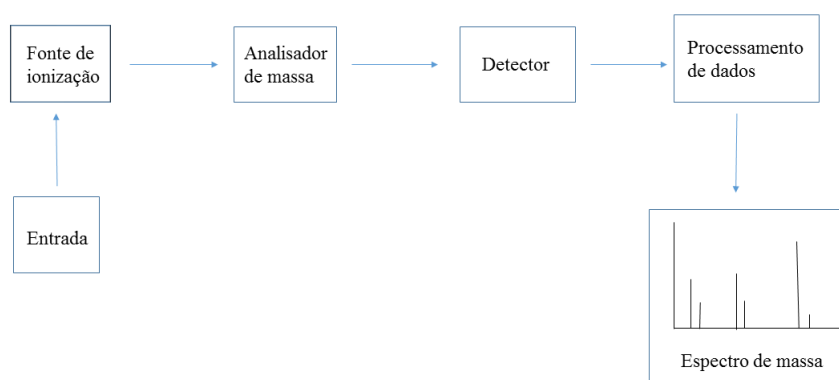


Figura 2.4: Esquema geral dos componentes de um espectrômetro de massa. A entrada do espectrômetro de massa transfere as amostras para a fonte de íons, onde as amostras são convertidas numa fase gasosa iónica. O analisador de massas separa e analisa as espécies iónicas, sendo que depois o detector analisa e amplifica a corrente de íons. Por último o processamento de dados é realizado num computador que grava, processa e origina o espectro de massas.

Métodos de ionização

As fontes de ionização em MS são vitais para a ionização das moléculas e devem apresentar como características uma fácil transferência da amostra ao sair da coluna para a fase gasosa e a ionização da amostra [30]. Muitos dos avanços registados no LC-MS⁸ estão relacionados com a fonte de ionização e com as técnicas que permitem ionizar e separar as moléculas da fase móvel [31].

⁸Do Inglês, liquid chromatography-mass spectrometry

O aparecimento da ionização à pressão atmosférica permitiu obter iões de uma maneira mais confiável, pois permite que as amostras ionizadas removam os solventes fora da zona de vácuo. Isto permitiu o aparecimento de duas fontes de ionização a ionização química à pressão atmosférica (APCI)⁹ e electrospray (ESI)¹⁰ [32]. A APCI e a ESI são bastante usadas em LC-MS, pois ambas diferem nos compostos a analisar permitindo ao LC-MS analisar uma gama variada de compostos. A APCI possui mais afinidade com amostras de pequenas moléculas polares e não polares, como ácidos gordos e esteróides. Enquanto que amostras que possuem cargas múltiplas em solução como proteínas, peptídeos e oligonucleótidos, ou amostras que são iões em solução como catecolaminas, conjugados de sulfatos e aminas quaternárias possuem maior sensibilidade com o ESI. Comparando ao nível da sensibilidade, o ESI é mais sensível que o APCI, por exemplo, ao nível do efeito matriz [33].

Em ESI (figura 2.5) a produção de iões é realizada em vácuo em vez da pressão atmosférica. O processo de ESI é iniciado com a dissolução da amostra num solvente e pressurizada num tubo capilar feito de aço inox, aplicando um campo eléctrico com potencial de 3000 a 5000 volts. Este potencial originado, polarizará a solução emergente por forças colombicas de uma determinada maneira que o líquido emergente na ponta conterá um excesso de iões de polaridade igual assim como o potencial aplicado na agulha (repulsão Colombica). De realçar que a solução deve conter uma concentração significativa de espécies iónicas para permitir a separação das cargas na ponta da agulha. Estas espécies iónicas, pode ser o analito, ao qual foi adicionado electrólitos voláteis, como ácido acético ou fórmico [34]. O líquido emergente na ponta da agulha a um elevado potencial adopta uma forma cónica, resultante do balanço entre repulsão colombica na superfície e a tensão superficial do líquido, tal fenómeno é conhecido como cone de Taylor. A determinada ponto a energia potencial da repulsão coulombica começa a exceder a tensão superficial, conhecido como o limite de Rayleigh, quebrando o cone em gotículas mais pequenas carregando excesso de cargas (positivas ou negativas), fenómeno denominado como explosão de Coulomb. Estas gotículas formadas perdem o solvente e os iões fluem para o espectrómetro de massa induzidos pela atracção electrostática e o vácuo (apenas o processo de ionização ocorre a pressão atmosférica, a partir deste ponto o espectrómetro de massa encontra-se sob vácuo).

⁹Do Inglês, atmospheric pressure chemical ionization

¹⁰Do Inglês, electrospray ionization

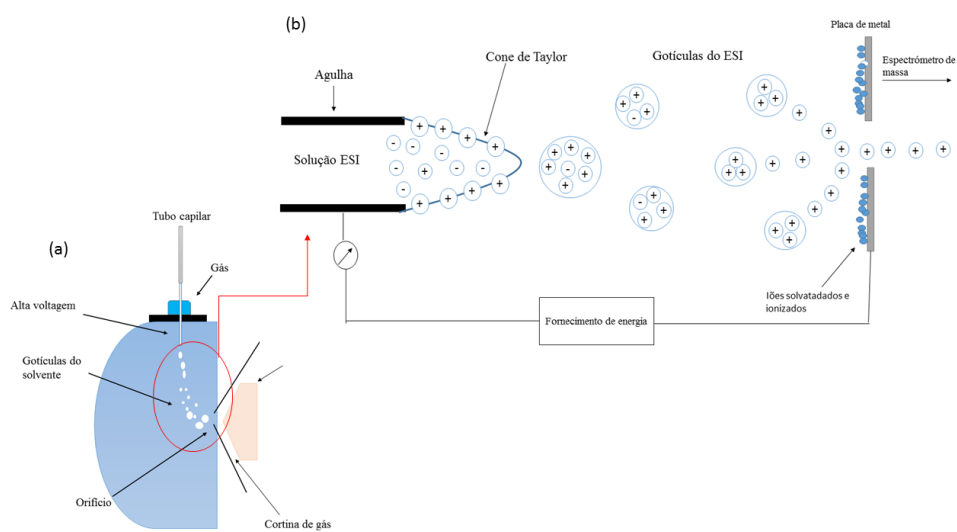


Figura 2.5: Interface de ionização por electrospray usada no acoplamento cromatografia líquida com espectrometria de massa. Em (a) a amostra ao ser introduzida no tubo capilar é pressurizada e sujeita a um potencial que origina o cone de Taylor, em (b) ao atingir o limite de Rayleigh, ocorre explosão de Coulomb, transformando o líquido num aerossol e de seguida em pequenas gotículas devido à perda de solvente, fluindo para o espectrómetro de massa induzidos pela atracção electrostática.

Triplo quadrupolo

Existem vários tipos de analisadores de massa como o quadrupolo (Q) e o tempo de voo (TOF¹¹), sendo o quadrupolo o mais usado [29]. O quadrupolo é composto por quatro eléctrodos dispostos em dois pares opostos (figura 2.6). Um par de barras é mantido num potencial positivo, enquanto que o outro no negativo, sendo aplicado nos cilindros uma combinação de corrente contínua (DC) e uma radiofrequência (RF). O par positivo dos cilindros funciona como filtro para massas mais elevadas e o par negativo para massas pequenas. Dentro do quadrupolo, o fluxo de iões apresenta uma trajectória instável e colide com as paredes do quadrupolo. O espectro de massa pode ser obtido através da variação RF e voltagens DC de uma forma sistemática para fazer com que os iões aumentem ou diminuam os índices de m/z para o detector.

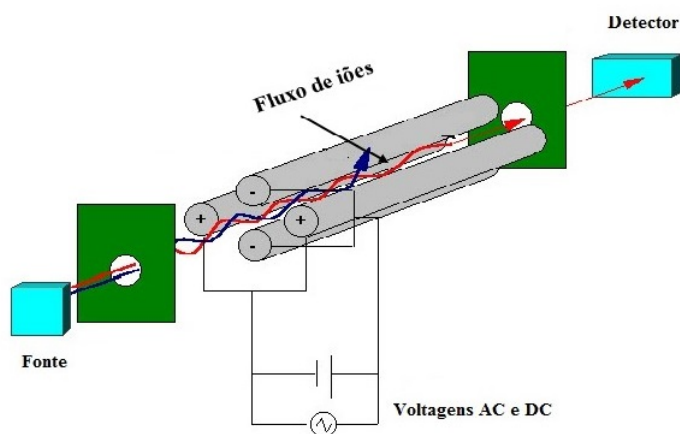


Figura 2.6: Esquema de um analisador de massa do tipo quadrupolo.

Contudo o mais frequente é os espectrómetros de massa usarem triplo quadrupolo (QqQ), em comparação com um quadrupolo único (Q), proporciona uma maior selectividade, resultando numa menor interferência dos compostos e melhor sinal/ruído (S/N)¹². Estas vantagens permitem a quantificação com baixos limites de detecção e uma maior confiança na identificação e detecção dos analitos usando monitorização de reacção múltipla (MRM)¹³.

O MRM é um modo de aquisição de espectrometria de massa que pode ser usado para detectar e quantificar analitos específicos. Este utiliza o espectrómetro de massa de triplo quadrupolo para quantificar o analito, sendo possível a

¹¹Do Inglês, time of flight

¹²Do Inglês, signal to noise

¹³Do Inglês, multiple reaction monitoring

quantificação de vários analitos em simultâneo sem o acompanhamento de uma quantidade excessiva de optimização [35].

No método MRM (figura 2.7) os analisadores de massas Q1 e Q3, seleccionam os iões precursor e produto, respectivamente, definindo uma transição de m/z ¹⁴ específica. O segundo quadrupolo (q2) funciona como uma célula de colisão, onde os iões precursor são seleccionados em Q1, de acordo com as razões m/z , são fragmentados por dissociação induzida por colisão (CID)¹⁵, após colisões com um gás inerte sob uma energia específica. A aplicação deste método permite reunir informações referentes à retenção do composto na coluna, às transições monitorizadas e à proporcionalidade entre o sinal e a concentração do analito, permitindo atingir níveis de confiabilidade e sensibilidade.

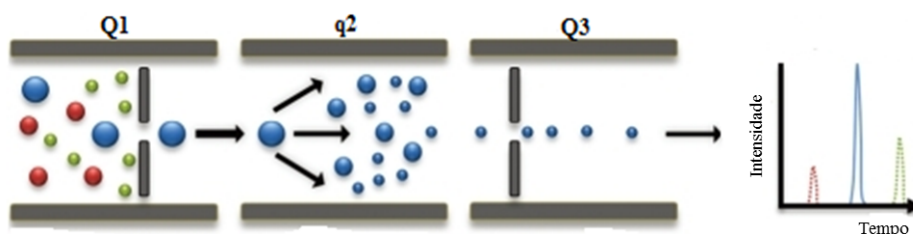


Figura 2.7: Esquema do método MRM no triplo quadrupolo. No MRM o ião precursor é seleccionado no primeiro quadrupolo (Q1) e entra no segundo quadrupolo (q2) onde sofre dissociação induzida por colisão (CID). Um ou mais iões de fragmentos são então seleccionados de acordo com as transições predefinidas e o sinal fornece as contagens espectrais para quantificação.

Abundância isotópica

Um parâmetro importante numa análise de espectrometria de massa é a abundância isotópica que afecta grande parte dos elementos presentes na natureza. Um exemplo desses elementos é o carbono, que advém de uma mistura de dois isótopos, ¹²C e ¹³C [36].

Isótopos como ¹H, ¹²C, ¹⁴N, ¹⁶O, ¹⁹F, ²³Na, ³¹P, ³²S, ³⁵Cl e ³⁹K são os mais abundantes na natureza e responsáveis pelo sinais cromatográfico mais abundante no espectrómetro de massa não indicar de facto o valor do peso molecular do composto, o que é justificado pelo agrupamento de isótopos¹⁶. É assim importante calcular o peso molecular do analito tendo em conta a abundância isotópica existente na natureza.

¹⁴Massa/carga

¹⁵Do Inglês, collision induced dissociation

¹⁶Grupo de sinais cromatográficos que representam iões com mesma composição, mas diferentes isótopos

2.1.3 Técnica HPLC-MS/MS

A conjugação da cromatografia líquida com a espectrometria de massa tornou-se uma técnica bastante popular e versátil ao combinar o que cada técnica individualmente apresenta, separação (HPLC) e identificação (MS) dos analitos de interesse. A HPLC-MS/MS é uma técnica bastante selectiva e sensível, permitindo assim dar resposta a novas exigências actuais, nomeadamente nos critérios de identificação de compostos, no aumento da complexidade das amostras e numa melhoria da sensibilidade dos métodos.

2.2 Validação do método

A validação do método analítico é de extrema importância para verificar se os resultados de quantificação são confiáveis, consistentes e reprodutíveis. Em estudos científicos, é importante verificar a qualidade dos dados, uma vez que resultados não confiáveis pode levar a super ou subestimação dos mesmos e a falsas interpretações e conclusões equivocadas. Assim como, durante o desenvolvimento do método analítico podem ocorrer alterações susceptíveis de acumular erros (sistemáticos e/ou aleatórios), podendo assim, alterar de forma significativa o valor do resultado final [37].

Assim, é importante a implementação do método de validação para demonstrar que este é adequado para quantificação do analito na matriz, num determinado nível de concentração, com exactidão e precisão satisfatórias.

Sobre validações do método existem várias guidelines de organizações internacionais de validação de laboratórios e que propõem certos critérios e/ou metodologias para validação do método. Organizações como agência mundial de antidopagem (WADA)¹⁷, conferência internacional de harmonização (ICH)¹⁸, entre outras, definem os parâmetros de validação do método:

- Identificação,
- Selectividade,
- Calibração,
- Limiares analíticos,
- Precisão e exactidão,
- Recuperação,
- Efeito da matriz,
- Estabilidade.

¹⁷Do Inglês, World Anti-Doping Agency

¹⁸Do Inglês, International Conference on Harmonisation

2.2.1 Identificação

Antes de tudo é crucial ter a certeza de que o sinal analítico que se pretende quantificar, dado pelo equipamento, corresponde ao analito em causa. Uma das causas que contribui para esta situação são as interferências causadas pela matriz, sendo necessária uma verificação experimental. Por norma, as condições de análise estão referidas na literatura.

2.2.2 Selectividade

A selectividade é utilizado em química analítica para expressar a dimensão com que um método particular possa determinar o analito específico, em determinadas condições e na presença de outros compostos semelhantes ao analito em questão, nomeadamente ao seu comportamento [38]. Por outras, palavras, é um método que permite identificar o analito de interesse numa mistura complexa sem interferência de outros componentes [39].

Para validar a selectividade é necessário um teste de análise cromatográfica. Esta análise consiste em comparar os sinais cromatográficos do cromatograma do analito de interesse com os sinais cromatográficos gerado no mesmo cromatograma pelo padrão interno (IS)¹⁹ contendo o analito.

2.2.3 Calibração

A calibração representa a capacidade do método em fornecer os resultados directamente proporcionais à concentração da substância dentro de uma gama de trabalho.

2.2.3.1 Gama de trabalho

O intervalo de concentrações onde o analito de interesse possa ser determinado com precisão, exactidão e linearidade através de um método analítico é denominado gama de trabalho [37]. Num método bioanalítico é esperado que o intervalo das concentrações seja relativamente grande, o que provoca diferenças nas variâncias, sendo assim imperativo avaliar a homocedasticidade através do teste da homogeneidade das variâncias.

2.2.3.2 Linearidade

A linearidade pode ser avaliada através do teste de Mandel ou pelo teste de Fischer-Snedecor, de acordo com a norma ISO²⁰ 8466-1.

¹⁹Do Inglês, internal standard

²⁰Do Inglês, International Organization for Standardization

O teste de Mandel (também conhecido como teste de Fischer diferencial) é utilizado para verificar se o conjunto de dados pode ser adequadamente representado através de um polinômio de primeiro grau ou terá que ser representado por um polinômio quadrático. Para tal é necessário recorrer às equações da variância de correlação linear $s_{fit(P01)}^2$ (equação 2.6) e da variância da correlação não-linear $s_{fit(P012)}^2$ (equação 2.7), para depois se obter o valor da diferença das variâncias ΔSS (equação 2.8).

$$s_{fit(P01)}^2 = \frac{\sum (y_i - b_0 - b_1 \cdot x_i)^2}{(N-2)} \quad (2.6)$$

$$s_{fit(P012)}^2 = \frac{\sum (y_i - b_0 - b_1 \cdot x_i - b_2 \cdot x_i^2)^2}{(N-3)} \quad (2.7)$$

$$\Delta SS = (N-2) s_{fit(P01)}^2 - (N-3) s_{fit(P012)}^2 \quad (2.8)$$

Após o cálculo variâncias residuais, calcula-se o valor de teste TV (equação 2.9)²¹:

$$TV = \frac{\Delta SS}{s_{fit(P012)}^2} \quad (2.9)$$

O valor de TV é comparado com o valor tabelado da distribuição F de Fischer-Snedecor unilateral, com 1 e (N-3) graus de liberdade, para um nível de confiança de 99%. Os critérios de decisão:

a) $TV \leq F_{0,01}^u(1, N-3)$: não existe diferença significativa entre as variâncias, assim, a função apresenta comportamento linear;

b) $TV > F_{0,01}^u(1, N-3)$: existe diferença significativa entre as variâncias, assim, a função apresenta comportamento não linear.

2.2.3.3 Homogeneidade das variâncias

A homogeneidade das variâncias ou homocedasticidade deve ser avaliada em qualquer análise de regressão linear. Este teste permite verificar se o erro é o mesmo em todos os valores da variável independente, caso não se verifique temos uma violação da homocedasticidade, ou seja, a heterocedasticidade. Para verificar qual a situação presente, homocedasticidade ou heterocedasticidade, aplica-se o teste de F (equação 2.10). Para este teste é necessário o cálculo da

²¹Do Inglês, test value

razão (TV) entre a variância obtida (s_a^2) e a mais elevada (s_b^2) concentração da gama de trabalho. O valor do TV é depois comparado com o valor tabelado de F (F_{crit}) bilateral a um nível de confiança de 99% para (N-1) graus de liberdade, quer no numerador, quer no denominador $F_{0.01(Na-1, Nb-1)}^b$.

$$TV = \frac{s_a^2}{s_b^2} \quad (2.10)$$

Critério de decisão:

a) $TV \leq F_{crit}$: não há diferença significativa entre as variâncias e assim a função segue comportamento homocedástico;

b) $TV > F_{crit}$: há uma diferença significativa entre as variâncias e assim a função segue comportamento heterocedástico.

2.2.3.4 Mínimos quadrados ponderados

No caso de o erro experimental não ser equitativo ao longo da gama analítica em teste, têm de ser atribuídos pesos estatísticos que tomam em consideração a relevância estatística de cada valor experimental na estimativa dos melhores parâmetros do modelo. O peso experimental (equação 2.11) no ponto de índice i (w_i) é dado por:

$$w_i = \frac{\frac{1}{S_i^2}}{\left(\frac{\sum_i^N \frac{1}{S_i^2}}{N} \right)} \quad (2.11)$$

onde N é o número de padrões da curva de calibração e s_i^2 a variância do sinal (variável dependente) em cada um dos valores testados.

Caso se esteja perante uma situação de heterocedasticidade, o próximo passo é usar os mínimos quadrados ponderados (WLS)²² [40]. Para implementar os mínimos quadrados ponderados, é necessário a escolha do factor de ponderação como $\frac{1}{x}; \frac{1}{x^2}; \frac{1}{x^{\frac{1}{2}}}; \frac{1}{y}; \frac{1}{y^2}; \frac{1}{y^{\frac{1}{2}}}$. O melhor factor de ponderação (w_i) é escolhido com base na percentagem do erro relativo (%RE) (equação 2.12)

$$\%RE = \frac{C_{exp} - C_{nom}}{C_{nom}} \times 100 \quad (2.12)$$

onde C_{exp} e C_{nom} representam a concentração obtida e a concentração nominal, respectivamente.

Importante também avaliar o gráfico %RE em função da concentração, pois é um bom indicador de boa ajustabilidade e um factor preponderante na avaliação de um bom w_i para o WLS. O melhor w_i será aquele que apresente uma ligeira

²²Do Inglês, weighted least squares

faixa de distribuição aleatória da %RE em torno dos eixos dos x e apresente menor valor de $\sum \%RE$. Escolhido o melhor w_i prossegue-se como cálculo dos parâmetros (b_1 ²³ e b_0 ²⁴) para a equação da regressão ponderada:

$$b_1 = \frac{\sum w_i \times \sum w_i x_i y_i - \sum w_i x_i \times \sum w_i y_i}{\sum w_i \times \sum w_i x_i^2 - (\sum w_i x_i)^2} \quad (2.13)$$

$$b_0 = \frac{\sum w_i x_i^2 \times \sum w_i y_i - \sum w_i x_i \times \sum w_i x_i \times y_i}{\sum w_i \times \sum w_i x_i^2 - (\sum w_i x_i)^2} \quad (2.14)$$

onde (x_i, y_i) são o par i do n total de dados e w_i o factor a ser escolhido. O grau de dependência estabelecido entre as duas variáveis é expresso pelo coeficiente de correlação, r_w , obtido pela equação 2.15:

$$r_w = \frac{\sum_{i=1}^N w_i (x_i - \bar{x}_w) (y_i - \bar{y}_w)}{\sqrt{\sum_{i=1}^N w_i (x_i - \bar{x}_w)^2} \sqrt{\sum_{i=1}^N w_i (y_i - \bar{y}_w)^2}} \quad (2.15)$$

2.2.4 Limiares analíticos

Quando são analisadas amostras com baixo teor de analito, é importante ter noção qual o menor valor da concentração do analito que possa ser detectado e quantificado. Numa curva de calibração pode-se ter a indicação da concentração a que o analito possa ser detectado e quantificado, analisando os limites inferiores. A estimação dos limites inferiores é feita com base nas leituras de réplicas de branco e de padrão. Caso não se disponha destas réplicas ou a concentração não apresentar significado físico, recorre-se aos parâmetros de calibração [37]. Alternativamente, estes limiares analíticos também podem ser estimados com base na razão sinal/ruído (S/N).

2.2.4.1 Limite de detecção

A mais pequena quantidade de analito a analisar que pode ser detectada numa amostra é denominado limite de detecção (LD). Apesar do analito ser detectado não implica que seja quantificado como valor exacto.

Em termos qualitativos, LD corresponde à concentração mínima que é possível distinguir do branco, ou seja, contém a mesma matriz mas não contém o analito [37].

Existem dois tipos de erro no LD:

- Erro do tipo I, também conhecido com erro de rejeição abusiva. Ocorre, por exemplo, quando existe uma evidência de o material testado está conforme

²³Ordenada na origem

²⁴Declive da recta

mas, por uma questão de confiança este é considerado como não conforme (fora das especificações);

- Erro do tipo II, também conhecido com erro de aceitação abusiva. Ocorre, por exemplo, quando existe uma evidência de o material testado não está conforme mas, ainda assim, é considerado como conforme (estando este fora das especificações).

O LD em termos quantitativos é obtido por:

$$LD = x_0 + 3.3\sigma_0 \quad (2.16)$$

em que x_0 corresponde à média aritmética de uma serie de brancos preparados de forma independente e lidos ao longo de vários dias de trabalho e σ_0 representa o desvio-padrão associado a esta.

No caso do sinal analítico ser directamente proporcional ao teor do analito (calibração linear apenas com um parâmetro), a equação 2.17 é reformulada e vem como:

$$LD = \frac{[3.3 * s_{fit}]}{m} \quad (2.17)$$

em que, s_{fit} é a variância de correlação da curva de calibração e m o declive da mesma.

Usando como referência a amplitude do ruído (N, estimada na linha de base próxima do sinal) e comparando com a amplitude do sinal (S), o limite de detecção corresponde à concentração onde $\frac{S}{N} = 3,30$.

2.2.4.2 Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) é a mais baixa concentração da curva calibração que pode ser quantificada com precisão e exactidão aceitáveis. O LQ deve ser determinado usando pelo menos cinco amostras independentes para averiguar se a exactidão e precisão conseguida é satisfatória [41, 42]. De realçar, segundo as recomendações da IUPAC, o coeficiente de variação (desvio padrão a dividir pela média dos valores encontrados, CV) não deve exceder 10%.

Quantitativamente o LQ obtém-se através de:

$$LQ = x_0 + 10\sigma_0 \quad (2.18)$$

em que x_0 é a média aritmética de uma série de brancos preparados de forma independente e lidos ao longo de vários dias de trabalho e σ_0 representa o desvio-padrão associado à media aritmética.

Caso o método envolva a utilização de uma calibração linear, então utiliza-se a equação 2.19, onde s_{fit} é a variância de correlação da curva de calibração e

m é o declive da mesma.

$$LQ = \frac{[10 * s_{fit}]}{m} \quad (2.19)$$

Usa-se também como referência o quociente de amplitudes sinal/ruído (S/N), o limite de quantificação corresponde à concentração onde $\frac{S}{N} = 10, 0$.

2.2.5 Precisão

A precisão é uma medida da dispersão dos valores obtidos pelo método analítico na repetição da análise sobre a mesma amostra, em condições definidas. A precisão compreende dois níveis, repetibilidade e reprodutibilidade. Importante referir que entre estes dois níveis existe um outro chamado de precisão intermédia. A repetibilidade (precisão entre ensaios) mede a dispersão dos resultados do método num curto intervalo de tempo e sempre nas mesmas condições, nomeadamente mesma amostra, analista, equipamento, método, laboratório entre outras. O resultado é expresso pelo coeficiente de variação de repetibilidade em percentagem (equação 2.20)

$$\%CV = 100 * \left(\frac{s_r}{\bar{x}} \right) \quad (2.20)$$

Em que s_r corresponde ao desvio-padrão da amostra e \bar{x} à respectiva média.

A reprodutibilidade avalia a dispersão dos valores obtidos de ensaios interlaboratoriais, relativamente à mesma amostra. Esta análise interlaboratorial implica que a amostra seja analisada por um outro analista. Na precisão intermédia é avaliada a precisão sobre a mesma amostra, mas variando determinadas condições, como diferentes analistas, equipamento, lotes de reagentes diferentes, outras micropipetas e com ou sem verificação de calibração. Não pode ser classificada como repetibilidade ou reprodutibilidade, apenas deve ser vista como uma avaliação suplementar [37].

2.2.6 Exactidão

A exactidão representa o grau de proximidade entre uma estimativa com o valor de referência ou assumido como correcto. É importante salientar que é um valor obtido por uma medição perfeita e indeterminado por natureza.

Para a determinação da exactidão, aplica-se a equação 2.21.

$$\%RE = 100 * \frac{X_2 - X_0}{X_1} \quad (2.21)$$

onde X_0 e X_2 correspondem aos teores encontrados na amostra antes e após da fortificação e X_1 a quantidade adicionada à amostra.

2.2.6.1 Carry-over

Este parâmetro tem a relevância de poder afectar a precisão e exactidão através da quantidade de analito de uma amostra anterior de maior concentração do que a injectada posteriormente. Para analisar este parâmetro os sinais cromatográficos do branco e da amostra não deve ser maior que 20% do LQ e 5% que o padrão interno, segundo a Agência Europeia da Medicina [43].

2.2.7 Recuperação

A medida da recuperação permite verificar se o método realmente proporciona uma resposta para a quantidade total do analito presente na amostra. Para obter uma medida da recuperação é necessário fortificar a matriz antes da amostra ser processada e fortificar a matriz depois da extracção com a mesma quantidade de analito. O valor de recuperação é depois dado pela equação 2.22:

$$\%Recuperação = \left(\frac{\text{amostra fortificada antes do processo de extracção}}{\text{amostra padrão fortificada depois do processo extracção}} \right) * 100 \quad (2.22)$$

2.2.8 Efeito matriz

O efeito matriz tem como objectivo averiguar possíveis interferências causadas pelas substâncias que compõem a matriz, provocando a diminuição ou ampliação da resposta instrumental. O valor do efeito matriz é dado pela equação 2.23:

$$Factor\ matricial = \frac{\text{resposta do sinal cromatográfico na presença da matriz biológica}}{\text{resposta do sinal cromatográfico na ausência da matriz biológica}} \quad (2.23)$$

No caso do factor da matriz ser igual a 1 não existe qualquer efeito matricial, caso seja inferior a 1 tem-se supressão do sinal do analito, caso seja superior a 1 tem-se enriquecimento de iões.

2.2.9 Estabilidade

Com o estudo deste parâmetro pretende-se demonstrar a estabilidade química ou física dos analitos numa matriz durante o armazenamento e o processamento das amostras [42].

Existem vários tipos de estabilidade que devem ser medidos como a estabilidade das soluções stock, ciclos de congelamento e descongelamento da amostra à temperatura ambiente e a estabilidade a curto e longo prazo. A estabilidade a curto e longo prazo deve ser medida em intervalos de tempo bem definidos dependendo do tempo requerido.

Capítulo 3

Materiais e métodos

3.1 Materiais e equipamentos

3.1.1 Reagentes e solventes

Sendo a técnica analítica usada (HPLC-MS/MS) extremamente sofisticada e sensível, houve necessidade de utilizar solventes e reagentes de elevada qualidade. Os reagentes utilizados foram adquiridos a empresas certificadas no seu estado mais puro possível, correspondendo a graus de pureza analítico ou superior. Na tabela 3.1 encontram-se listados os analitos mais relevantes para este trabalho.

Tabela 3.1: Lista de reagentes usados no projecto

Nome	Massa molecular (g/mol)	Fornecedor	Categoria
L-tirosina	181,19	Sigma-Aldrich-Fluka	Material de referência certificado
Levodopa	197,19	Sigma-Aldrich-Fluka	Padrão analítico
Dopamina hidrocloreídica	189,64	Sigma-Aldrich-Fluka	Padrão analítico
3-metoxitiramina hidrocloreídica	203,67	Sigma-Aldrich-Fluka	Padrão analítico
Ácido 3,4-dihidroxiifenilacético	168,15	Sigma-Aldrich-Fluka	Padrão analítico
Ácido Homovanílico	182,17	Sigma-Aldrich-Fluka	Padrão analítico
L-tirosina (D7-98%)	188,24	Cambridge Isotope Laboratories	Padrão interno
L-DOPA (fenil-D3)	200,21	Sigma-Aldrich-Fluka	Padrão interno
Dopamina-1,1,2,2-D4 hidrocloreídica	193,66	Sigma-Aldrich-Fluka	Padrão interno
3-metoxitiramina hidrocloreídica (1,1,2,2-D4,97%)	207,69	Cambridge Isotope Laboratories	Padrão interno
Ácido 3,4-dihidroxiifenilacético(anel-D3,2,2-D2,98%)	173,18	Cambridge Isotope Laboratories	Padrão interno
Ácido homovanílico-D3	185,19	Santa Cruz Biotechnology	Padrão interno

Os solventes utilizados foram:

- Acetonitrilo LC-MS (Biosolve)

- Água HiperSolv CHROMANORM para HPLC (VWR)
- Ácido fórmico (AMRESCO)

Escolha do padrão interno

Da lista de reagentes anteriores, existem vários compostos deuterados para cada analito, nomeadamente L-tirosina (D7-98%), L-DOPA (fenil-D3), ácido 3,4-dihidroxifenilacético (Anel-D3,2,2-D2,98%), 3-methoxitiramina hidrocloreídica (1,1,2,2-D4,97%) e ácido homovanílico-D3.

Segundo Dobson et al. [44], existem 4 critérios para a escolha de um padrão interno:

1. o padrão interno deve ser distinguível do analito de interesse usado no método de MS;
2. isótopos marcados devem ser suficientemente resistentes a mudanças químicas e físicas do ambiente onde estão;
3. a marcação deve ser conseguida por um processo sintético razoável;
4. o padrão interno deve ser farmacocineticamente indistinguível do analito.

O efeito matriz resultante da eluição dos componentes da matriz que afectam a ionização do analito de interesse tanto pode resultar em perda ou ganho de iões. Derivado o efeito matriz recorre-se ao uso do IS muito semelhante ao analito de interesse, para compensar esse ganho ou perda de iões que depois se traduz numa alteração de sinal [45]. Para além dos critérios mencionados para a escolha do IS, este deve-se comportar da mesma maneira que o analito, ou seja, ter a mesma eficiência de extracção da matriz que o analito e eluir em simultâneo, permitindo assim compensar perdas na extracção e preparação das amostras [46]. A escolha dos IS para o projecto recaiu sobre IS deuterados para o analito análogo.

3.1.2 Equipamentos

- Componentes da cromatografia líquida acoplada ao espectrómetro de massa:
 - Injector : autosampler CTC-xt (Eksigent/PAL)
 - Cromatografia líquida: *ekspertTM* ultraLC (Eksigent)
 - Fonte de ionização ESI, turbo *VTM*
 - Triplo quadrupolo híbrido/espectrómetro de massa linear de armadilha de iões, 4000*QTRAP*[®](ABSciex)

– Software *Analyst*[®]1.6.2

- Balança analítica (CP 224S, Sartorius) com resolução de massa até 0,1 mg
- Centrífuga de bancada (Minispin-Eppendorf)
- Vortex, modelo MS3 basic (*IKA*[®])

3.2 Procedimentos práticos

Os procedimentos práticos irão incidir nos passos de maior relevância para o projecto.

3.2.1 Preparação das soluções stock

Todos os reagentes utilizados neste projecto, foram armazenados consoante as especificações do fabricante, nomeadamente temperatura de armazenamento, exposição à luz entre outras. Os compostos foram diluídos com água de elevada pureza (LC-grade), à temperatura ambiente, sendo sujeitos posteriormente a uma agitação por vortex e spin. O armazenamento das soluções stock foi realizado à temperatura de $-20^{\circ}C$ e $-80^{\circ}C$.

3.2.2 Preparação da curva de calibração

A curva de calibração permite a obtenção de uma relação entre a resposta instrumental e as concentrações do analito.

Para a construção da curva de calibração é necessário ter uma gama de trabalho¹, que é definida com pelo menos 6 a 8 amostras, para a obtenção de um bom LD (3) e LQ (10), ter uma boa razão sinal/ruído, assim como uma boa precisão (entre 80 e 120) [47].

Para a definição da gama de trabalho foi realizado um estudo prévio com base na literatura para cada analito. Após várias experiências realizadas com a gama de trabalho definida, esta sofreu alterações, devido à curva de calibração ser feita com uma mistura de analitos e não com os analitos individualizados como o que encontrado na literatura.

Para a construção da curva de calibração as soluções stock dos analitos e padrões internos são descongeladas à temperatura ambiente e sujeitas a um vortex e spin posterior. De seguida, a estas soluções um certo volume é retirado para a preparação de um mix² contendo os analitos e outro mix contendo os IS,

¹intervalo de concentrações onde o analito de interesse possa ser determinado com precisão, exactidão e linearidade

²solução composta por analitos a concentrações diferentes na mesma solução

ambos a uma determinada concentração. De seguida, 9 soluções, a diferentes concentrações, são preparadas partindo do mix dos analitos através de diluições sucessivas para obtenção das 9 soluções a diferentes concentrações. No final, 50 uL de cada solução das 9 preparadas é adicionado 50 uL do mix de IS (calibração de padrão interno), para injeção posterior no LC-MS/MS.

3.2.3 Condições experimentais

3.2.3.1 Cromatografia líquida

A separação no sistema cromatográfico foi realizada com uma coluna Gemini C18 ($3\ \mu\text{m}$, $110\ \text{Å}$, $50\times 1\ \text{mm}$).

A eluição foi realizada com um fluxo de $150\ \mu\text{L}/\text{min}$, sendo o tempo de corrida de 4 minutos, o volume de amostra injectado foi de 10 uL. Amostras de branco foram também injectadas entre as amostras. A tabela 3.2 indica o gradiente usado tanto nas amostras como nos brancos.

Tabela 3.2: Gradiente usado na análise cromatográfica. Sendo AF (ácido fórmico) e ACN (acetoneitrilo).

Tempo (min)	Fluxo ($\mu\text{L}/\text{min}$)	Fase móvel (%v/v)	
		0,1% AF em H_2O	0,1% AF em ACN
0	0,15	98	2
4	0,15	2	98

3.2.3.2 Espectrometria de massa

O equipamento de espectrometria de massa é controlado pelo software Analyst 1.6.2 (ABSciex). O espectrómetro de massa possui um fonte ionização ESI e operou no modo positivo.

Os parâmetros otimizados no espectrómetro de massa foram:

- Cortina de gás (azoto ultrapuro) - 30 psi
- Fonte de iões gasosos - 30 psi
- Voltagem do spray de iões - 5500 V
- Temperatura - 450°C

Para monitorizar os iões precursor de cada analito e do respectivo padrão interno, o espectrómetro de massa operou em modo MRM tendo os seguintes parâmetros:

- Tempo de espera - 150 ms
- Entrada do potencial - 10 eV

- Gás de colisão - 8 psi

Tabela 3.3: Parâmetros de aquisição do espectrómetro de massa. Está representado as transições MRM e as suas energias de colisão (CE) dos analitos.

Analito	Percursor	Fragmento	CE (eV)
L-tirosina	182,20	91,06	40
		136,28	20
		165,13	14
L-DOPA	198,03	135,01	27
		152,01	20
		181,00	15
Dopamina	154,20	91,09	50
		119,17	34
		137,18	16
3-MT	168,17	65,02	35
		91,02	26
		151,13	15

Capítulo 4

Análise de Resultados

4.1 Validação do método analítico

Neste projecto o trabalho de caracterização e validação de métodos analíticos esteve concentrado em quatro analitos (L-tirosina, L-DOPA, dopamina e 3-metoxitiramina), ambos monitorizados através de três fragmentos cada, o que resulta no estudo de doze condições de quantificação. No sentido de não tornar a leitura demasiado fastidiosa e dificultar o seguimento do restante trabalho vamos apresentar e discutir os resultados de validação para o analito dopamina que achamos ser mais relevante já que este é demasiado importante para poder seguir os distúrbios que apresenta inerentes à doença, pois a dopamina é produzida tanto fora como dentro do cérebro e o défice da sua concentração no organismo é o grande responsável pela doença. Ainda assim, ao optar pela quantificação da dopamina, iremos considerar os fragmentos de maior abundância relativa (65,1, 91,1 e 137,2). Os resultados dos restantes analitos estão patentes no anexo I, II e III com os respectivos comentários e conclusões, agora indicados de uma forma muito resumida.

4.1.1 Identificação e selectividade

Numa análise por LC-MS/MS, a identificação dos compostos e a sua selectividade deriva do desenvolvimento do método do qual se obtém os espectros de fragmentação.

Espectros de fragmentação

O desenvolvimento do método permite saber quais os parâmetros necessários a otimizar em espectrometria de massa e principalmente para determinar qual o sinal do analito. Energia de colisão (CE)¹ e CID, são os parâmetros a ter em conta no desenvolvimento do método, nomeadamente a definir aquando da aplicação do ESI.

A CE indica qual o ião produto a monitorizar, pois as diferentes energias dão origem a diferentes fragmentos a monitorizar, como indicado na figura 4.1, onde estão representados os fragmentos com mais intensidade. É necessário otimizar a CE para obtenção dos espectros de fragmentação, gerados na célula de colisão.

¹Do Inglês, collision energy

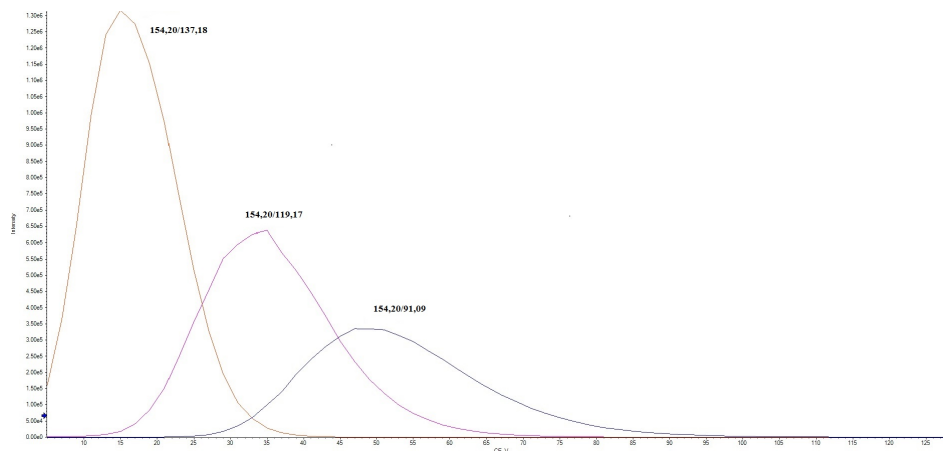
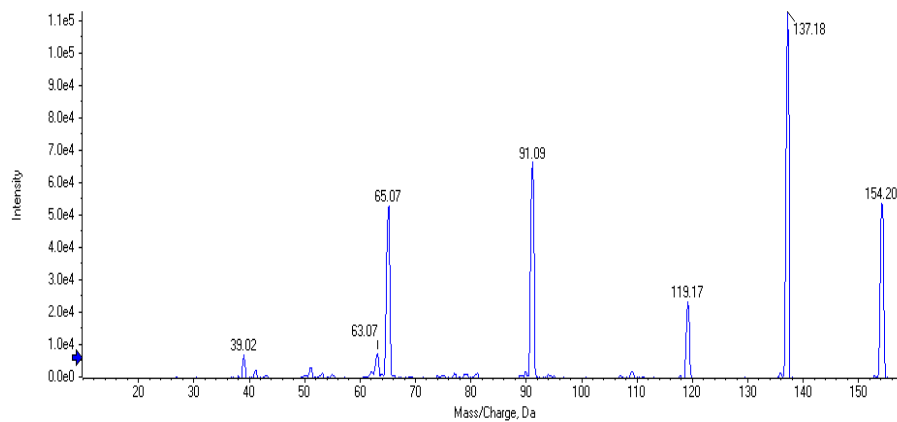
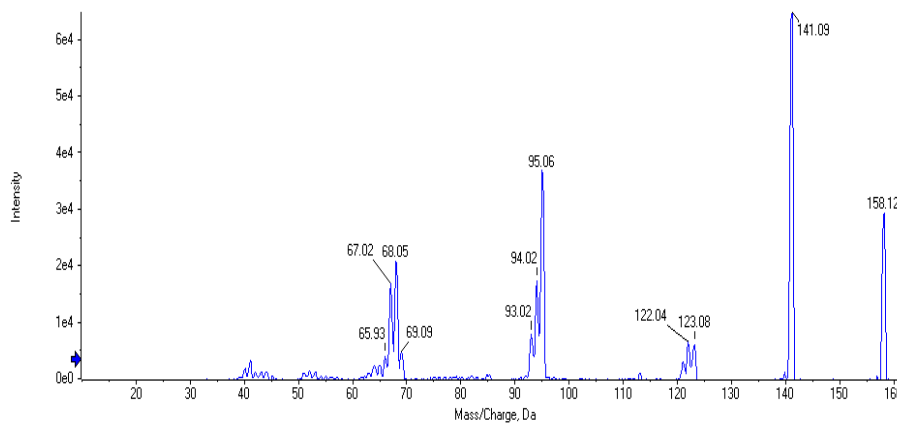


Figura 4.1: Representação das energias de colisão para os 3 fragmentos ideais da dopamina.

Nos espectros de fragmentação da dopamina e do padrão interno (figura 4.2a e figura 4.2b) o fragmento que representa o sinal de m/z 154,20 corresponde ao analito intacto (dopamina protonada). No que se refere ao seu padrão interno (figura 4.2b), este sinal surge a m/z 158 uma vez que a molécula é tetradeuterada (dopamina-D4 protonada). Os fragmentos a monitorizar são os m/z que apresentam maior intensidade, nomeadamente 91,09, 119,17 e 137,18 e os do padrão interno são 95,06, 123,08 e 141,09, serão os fragmentos a monitorizar. Apesar do sinal 65,07 apresentar grande intensidade este não corresponde a um fragmento da dopamina, corresponde a C_5H_5 (anel aromático C_6H_6 que sofre a ablação de CH) este tipo de fragmento é característico dos anéis aromáticos isolados!



(a) Espectro de fragmentação da dopamina hidrocloreídrica. Os fragmentos obtidos por no ESI no modo de ionização positivo variando a energia de colisão de 5V a 90V, para infusão de uma solução 12,7 mM de dopamina hidrolorídrica.



(b) Espectro de fragmentação da dopamina-1,1,2,2-D4-HCl. Os fragmentos obtidos por no ESI no modo de ionização positivo variando a energia de colisão de 5V a 90V, para infusão de uma solução 25,8 mM de dopamina-1,1,2,2-D4-HCl.

Figura 4.2: Espectros de fragmentação da dopamina hidrocloreídrica (4.2a) e da dopamina-1,1,2,2-D4-HCL (4.2b).

Pensando no composto dopamina ($C_8H_{11}NO_2$, m/z 153) os fragmentos poderão ser os indicados na figura 4.3.

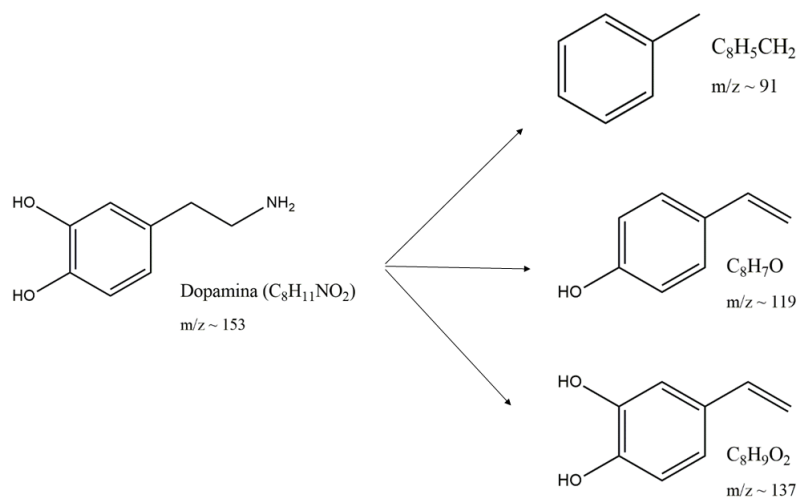


Figura 4.3: Estruturas moleculares dos fragmentos da dopamina a monitorizar

Na tabela 4.1 estão apresentados os fragmentos a monitorizar dos analitos em questão, estando os espectros de fragmentação nos anexos I, II e III.

Tabela 4.1: Fragmentos a monitorizar para a L-tirosina, L-DOPA, dopamina e 3-MT e respectivos padrões internos. Os valores de m/z indicados provêm dos sinais cromatográficos com mais intensidade dos espectros de fragmentação.

(a) Fragmentos dos analitos a monitorizar

Analito	Percursor	Fragmento
L-tirosina	182,19	91,06
		136,28
		165,13
L-DOPA	198,03	135,01
		152,01
		181,00
Dopamina	154,20	91,09
		119,17
		137,18
3-MT	168,17	65,02
		91,02
		151,13

(b) Fragmentos dos padrões internos a monitorizar

Padrão Interno	Percursor	Fragmento
L-tirosina (D7-98%)	189,07	96,07
		143,09
		172,02
L-DOPA-(fenil-D3)	201,25	137,15
		154,18
		183,15
Dopamina-1,1,2,2-D4-HCl	158,12	95,06
		123,08
		141,09
3-MT-HCl-(1,1,2,2-D4,97%)	172,11	68,05
		95,07
		155,09

4.1.2 Gama de trabalho

A gama de trabalho foi delineada com base na literatura e ajudada posteriormente, devido aos valores encontrados não apresentarem resultados satisfatórios. Sendo que as diferentes gamas de trabalho usadas para cada analito deve-se ao facto da intensidade do sinal ser diferente para cada analito, por exemplo, na L-DOPA a intensidade de sinal era bastante fraca ao contrário da dopamina que apresentava boa intensidade de sinal, sendo por isso necessário um aumento dos valores da gama de trabalho.

4.1.3 Calibração

Quando se pretende avaliar a linearidade, o que se está a avaliar é a proporcionalidade entre a concentração da amostra e a sua resposta. Para tal, é preciso delinear uma gama de trabalho através de 3 curvas de calibração idênticas, das quais se calcula o coeficiente de variação (%CV) entre os pontos da curva e o coeficiente de correlação (R).

Nesta secção pretende-se expor a linearidade da dopamina, nomeadamente a representatividade (homogeneidade das variâncias), linearidade pelo teste de Mandel e as curvas de calibração dos seus fragmentos.

4.1.3.1 Representatividade

Estando delineada a nossa gama de trabalho é necessário proceder a uma análise da homogeneidade da variância da gama de trabalho delineada. A homogeneidade ou heterogeneidade da variância é realizada com base nas concentrações dos controlos de qualidade, nos três níveis de concentração definidos para a dopamina (0,025, 0,050 e 0,0875 μM).

Na tabela 4.2 seguinte encontram-se os valores referentes (A/A_{IS}^2 e o sinal/ruído (S/N)) à quantificação da dopamina através do seu fragmento $m/z = 154,20/91,09$

² A/A_{IS} - Áreas do analito/área do padrão interno

Tabela 4.2: Estudo da gama de resposta analítica para quantificação da dopamina através da detecção do fragmento $m/z = 91,09$.

[Dopamina] (μM)	Dia 1		Dia 2		Dia 3	
	A/A_{IS}	S/N	A/A_{IS}	S/N	A/A_{IS}	S/N
0,0275	0,5909	331,9	0,5484	331,3	0,1949	227,3
	0,6021	338,0	0,5219	319,6	0,2057	225,4
	0,5445	314,6	0,5574	300,6	0,2128	248,5
0,0500	1,0650	583,8	1,0310	513,0	0,3401	395,3
	1,0230	564,3	1,0340	537,4	0,3472	395,9
	1,0100	501,0	1,0470	494,5	0,3738	389,1
0,0875	1,7880	1027,2	1,8880	935,2	0,6108	547,4
	1,8340	976,0	1,9110	963,7	0,5881	689,5
	1,7090	901,6	1,5360	797,4	0,6324	646,1

Atendendo às relações de intensidade de sinal em relação ao ruído (S/N), os sinais avaliados encontram-se acima do limite de quantificação ($S/N > 10$) e como tal pertencem à gama de quantificação.

Uma vez que este estudo foi realizado em três dias distintos com réplicas diárias, a variabilidade pode ser avaliada, através da ANOVA no sentido de, a cada nível de concentração, decompor a variabilidade total encontrada na contribuição puramente aleatória (intrínseca ao método) e a variabilidade inter-diária, caso esta apresente uma contribuição significativa.

Ao nível da menor concentração (0,0275 μM) obteve-se uma variabilidade devida ao efeito dia de 0,128 enquanto que a componente puramente aleatória apenas da ordem de 0,00045. O valor do teste deu $TV = 283,55$ o que excede largamente o valor previsto pela distribuição de Fisher unilateral ao nível de confiança de 99% e referente a 2 e 6 graus de liberdade, respectivamente ($F_{crit} = 10,92$). Assim sendo, existe um efeito inter-diário detectável ao nível desta concentração. Com base nesta informação obtida nos três dias de trabalho a estimativa puramente aleatória dá $s_{pe} = 0,021$ enquanto que a estimativa da incerteza interdiária dá $s_i = 0,25$.

Atendendo ainda a que as médias diárias obtidas foram 0,579, 0,543 e 0,204, verifica-se que os valores do terceiro dia são cerca de 1/3 dos dois anteriores. Removendo estes resultados e refazendo as estimativas ANOVA chega-se ao valor $TV = 3,16$ que corresponde a uma valor de prova de 0,150, significando que existe uma probabilidade de 15,0% de a hipótese nula ser válida ou seja, de não haver efeito inter-diário (os resultados serem estatisticamente concordantes). Olhando de novo à estimativa da variabilidade puramente aleatória temos obtemos $s_{pe} = 0,025$ o que está de acordo com a estimativa anterior. Deste estudo ao nível de concentração de 0,0275 μM resultou que a estimativa puramente aleatória aparenta ter o valor $s_{pe} = 0,021$.

Passando ao nível de concentração intermédio (0,0500 μM), de novo se evi-

dência que a contribuição inter-diária (0,464) é muito superior à contribuição aleatória (0,00053) e, conseqüentemente o valor de teste ($TV = 875,73$) excede largamente o valor crítico respectivo. A estimativa da dispersão interdiária deu $s_i = 0,482$ e a puramente aleatória $s_{pe} = 0,020$.

De igual modo se verifica ainda que os valores do terceiro dia são cerca de 1/3 dos valores dos restantes dias. Removendo esses valores deixa de haver efeito inter-diário e a estimativa puramente aleatória mantém um valor compatível com o anteriormente estimado ($s_{pe} = 0.021$).

Analisando agora o nível superior de concentração (0,0875 μM), continua a verificar-se um efeito inter-diário. A estimativa da dispersão interdiária deu $s_i = 0,820$ e a puramente aleatória $s_{pe} = 0,13$. Dado que também se observa que os valores do terceiro dia são cerca de 1/3 dos restantes dias, ao remover estes do conjunto e refazendo o teste ANOVA deixa de estar presente o efeito inter-diário e a variabilidade puramente aleatória permanece quase inalterada (0,16).

Não há dúvida que na gama 0,0275 a 0,0500 μM existe homogeneidade da variância ($s_{pe} = 0,021$ e $s_{pe} = 0,020$). Contudo temos de verificar se esta similaridade ainda se preserva até ao teor 0,0875 ($s_{pe} = 0,16$) através de um teste estatístico. Assumindo como hipótese nula a similaridade das variâncias, o valor de $TV = 58,05$ é superior ao respectivo valor crítico previsto pela distribuição bilateral de Fisher ($F_{0,01(6,6)}^b = 11,07$) indicando que a hipótese nula não é válida. Assim sendo estamos perante um caso de heterogeneidade da variância e, como tal é necessário utilizar métodos de regressão linear ponderada para efectuar estimativas paramétricas quanto à calibração e quanto à quantificação.

Na tabela 4.3 seguinte encontram-se os valores relativos à calibração do dopamina atendendo ao fragmento $m/z = 119,17$.

Tabela 4.3: Estudo da gama de resposta analítica para quantificação da dopamina através da detecção do fragmento $m/z = 119,17$.

[Dopamina] (μM)	Dia 1		Dia 2		Dia 3	
	A/A_{IS}	S/N	A/A_{IS}	S/N	A/A_{IS}	S/N
0,0275	1,3779	595,1	1,3405	605,2	0,4650	471,9
	1,2843	657,9	1,3104	724,4	0,4713	491,2
	1,3342	661,9	1,3849	680,2	0,4832	477,7
0,0500	2,4008	1 002,5	2,5996	1 147,1	0,8276	749,0
	2,3212	865,3	2,5673	1 009,0	0,8182	734,3
	2,3832	875,6	2,5110	1 091,1	0,8387	659,7
0,0875	4,1080	1 599,0	4,5748	1 345,5	1,4536	1 400,0
	4,4612	2 088,1	4,5032	1 156,3	1,4320	1 217,3
	4,0455	1 580,6	3,9445	1 670,1	1,4713	1 274,8

Observando as relações de sinal/ruído (S/N) verifica-se que todos os valores

se encontram dentro da gama de quantificação.

Usando a análise ANOVA de factor único, o nível da concentração mais baixa ($0,0275 \mu M$), verifica-se a presença de um efeito inter-diário ($TV = 609,98 \gg 10,92 = F_{0,01(6,6)}^b$). A precisão intermédia estimada dá $s_i = 0,612$ e a puramente aleatória $s_{pe} = 0,035$. Assim como no caso anterior relativo ao fragmento m/z 91,06, os valores do terceiro dia são cerca de $1/3$ dos restantes. A remoção destes valores faz com que deixe de haver efeito do factor dia mas a estimativa aleatória continua a manter-se relativamente inalterada ($s_{pe}(1) = 0,042$).

Ao nível de concentração intermédio ($0,0500 \mu M$), verifica-se também o efeito inter-diário. As estimativas obtidas apontam para $s_i = 1,16$ e $s_{pe} = 0,036$. Ao remover os valores do terceiro dia o efeito inter-diário atenua-se mas a incerteza aleatória mantém-se praticamente inalterada $s_{pe} = 0,041$.

Passando agora ao nível de concentração superior ($0,0875 \mu M$), obtém-se um efeito inter-diário com dispersão da ordem de $s_i = 1,99$ e dispersão aleatória da ordem de $s_{pe} = 0,24$. A remoção dos valores do terceiro dia anula o efeito inter-diário sobre a dispersão final mas não altera significativamente a estimativa puramente aleatória ($s_{pe} = 0,29$).

Comparando as estimativas da repetibilidade do sinal (devidas a efeitos puramente aleatórios) aos três níveis de concentração avaliados neste estudo verifica-se que existe homogeneidade da variância na gama $0,0275$ a $0,0500 \mu M$ ($s_{pe} = 0,035$ e $s_{pe} = 0,036$) contudo esta deixa de se verificar na gama $0,0500$ a $0,0875 \mu M$ ($s_{pe} = 0,035$ e $s_{pe} = 0,24$) já que o valor de teste dá $TV = 212,67$ e este excede largamente o respectivo valor crítico ($F_{0,01(6,6)}^b = 11,07$) evidenciando que estamos perante um novo caso de heterogeneidade da variância. Como tal, neste caso da monotorização do teor da dopamina através do fragmento m/z 119,17 as estimativas paramétricas a utilizar têm de ser obtidas por via ponderada.

Na tabela seguinte encontram-se os resultados relacionados com a quantificação da dopamina através do seu fragmento m/z 137,18.

Tabela 4.4: Na tabela seguinte encontram-se os resultados relacionados com a quantificação da dopamina através do seu fragmento m/z 137,18.

[Dopamina] (μM)	Dia 1		Dia 2		Dia 3	
	A/A_{IS}	S/N	A/A_{IS}	S/N	A/A_{IS}	S/N
0,0275	2,8440	1 298,7	2,9350	1 127,4	1,0750	623,4
	3,0310	1 072,8	2,8580	1 157,0	1,0500	657,5
	2,8460	787,5	3,1120	1 188,9	1,0830	714,1
0,050	5,2570	1 467,7	5,5910	1 692,8	1,9290	1 190,1
	5,0370	1 651,6	5,2770	1 727,1	1,9450	1 223,3
	5,0700	1 772,4	5,1550	1 683,2	1,9450	1 153,9
0,0875	9,5180	2 254,6	10,1200	2 334,3	3,2650	1 557,0
	9,3550	3 162,4	9,8770	2 431,3	3,3960	1 516,1
	9,1210	2 359,3	8,4620	1 511,2	3,4440	1 510,9

Por rápida inspeção às relações S/N verifica-se que em todos os casos o sinal avaliado se encontra acima do limite de quantificação ($S/N > 10$) e como tal estes podem ser utilizados com rigor estatístico.

Ao menor nível de concentração ($0,0275 \mu M$), através do estudo ANOVA verifica-se que existe um efeito inter-diário ($TV = 364,01 \gg 10,92 = F_{0,01(2,6)}^u$). As contribuições estimadas foram a inter-diária $s_i = 1,32$ e a aleatória de $s_{pe} = 0,098$. De modo similar se observa que os valores do terceiro dia são cerca de 1/3 dos restantes. Ao remover esses valores do conjunto e reprocessando a análise ANOVA deixa de se verificar o efeito inter-diário contudo a estimativa aleatória mantêm-se praticamente inalterada ($s_{pe} = 0,12$).

No nível de concentração intermédio ($0,0500 \mu M$) a avaliação ANOVA detecta de novo um efeito inter-diário sobre a variabilidade dos resultados ($TV = 503,58 \gg 10,92 = F_{0,01(2,6)}^u$). As contribuições agora estimadas para a inter-diária e puramente aleatória de $s_i = 2,33$ e $s_{pe} = 0,15$. De modo similar, removendo do conjunto de valores original os valores relativos ao terceiro dia de trabalho e reprocessando a análise ANOVA deixa de se verificar o efeito inter-diário contudo a estimativa aleatória mantêm-se praticamente inalterada ($s_{pe} = 0,18$).

Já para o nível de concentração superior ($0,0875 \mu M$) o tratamento ANOVA estima uma valor de teste elevado ($TV = 128,83 \gg 10,92 = F_{0,01(2,6)}^u$) o que é identificado como havendo também um efeito inter-diário sobre a variabilidade dos resultados. As contribuições agora estimadas para a inter-diária e puramente aleatória são de $s_i = 4,26$ e $s_{pe} = 0,53$. Por remoção do conjunto de valores do terceiro dia de trabalho, a análise ANOVA reprocessada indica que deixa de se verificar o efeito inter-diário contudo a estimativa aleatória mantêm-se praticamente inalterada ($s_{pe} = 0,65$).

Comparando agora a evolução da variabilidade do sinal ao longo da gama de trabalho ($s_{pe} = 0,098$, $s_{pe} = 0,15$ e $s_{pe} = 0,53$) verifica-se que existe homogeneidade da variância na gama de concentração situada entre $0,0275$ a $0,0500 \mu M$ ($TV = 2,34$) enquanto que na gama $0,0275$ a $0,0500 \mu M$ existe uma diferença muito significativa na variabilidade ($TV = 29,25 \gg 11,07 = F_{0,01(6,6)}^u$). Como tal estamos uma vez mais perante um caso de heterogeneidade da variância o que força a utilização de métodos estatísticos ponderados ao nível da calibração e da quantificação.

No que diz respeito à representatividade dos restantes analitos (anexo I, II e III) verificou-se do mesmo modo que para a dopamina a existência de heterogeneidade da variância.

4.1.3.2 Linearidade

O teste de Mandel permite dar a indicação do comportamento ser linear ou não linear, como verificar a existência ou não de diferenças significativas entre as variâncias, ou seja, dá indicação de o quão longe os valores obtidos se encontram do valor esperado. Para chegar a esta conclusão usa-se o critério de comparação entre o valor TV e o valor da distribuição de F (tabelado) a um nível de confiança de 99%.

Tabela 4.5: Teste de Mandel para os fragmentos da dopamina

Fragmento 154,20/91,09					
Dia 1		Dia 2		Dia 3	
Teste de Mandel		Teste de Mandel		Teste de Mandel	
ΔSS	6,05E-04	ΔSS	2,08E-02	ΔSS	1,01E-04
TV	0,653	TV	6,641	TV	0,331
$F_{0.01(1,6)}^u$	13,745	$F_{0.01(1,6)}^u$	13,745	$F_{0.01(1,6)}^u$	13,745

Fragmento 154,20/119,17					
Dia 1		Dia 2		Dia 3	
Teste de Mandel		Teste de Mandel		Teste de Mandel	
ΔSS	1,34E-02	ΔSS	5,33E-02	ΔSS	2,30E-03
TV	0,680	TV	3,102	TV	2,656
$F_{0.01(1,6)}^u$	13,745	$F_{0.01(1,6)}^u$	13,745	$F_{0.01(1,6)}^u$	13,745

Fragmento 154,20/137,18					
Dia 1		Dia 2		Dia 3	
Teste de Mandel		Teste de Mandel		Teste de Mandel	
ΔSS	2,66E-02	ΔSS	6,92E-02	ΔSS	2,78E-04
TV	0,386	TV	1,600	TV	0,179
$F_{0.01(1,6)}^u$	13,745	$F_{0.01(1,6)}^u$	13,745	$F_{0.01(1,6)}^u$	13,745

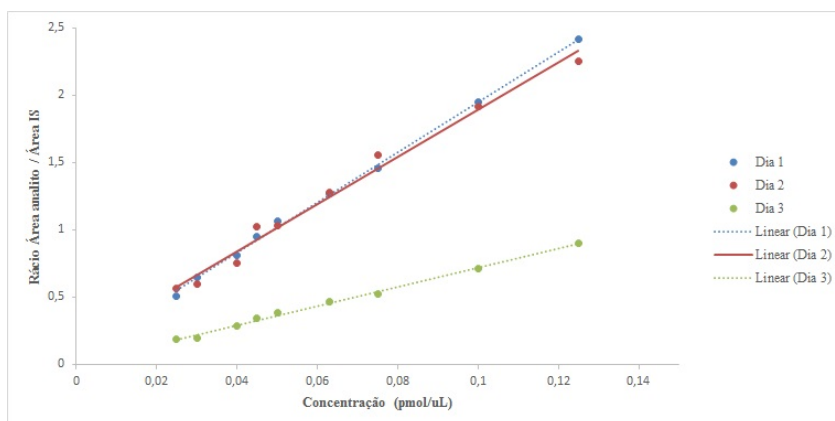
Na análise dos resultados da tabela 4.5, comprova-se que de facto pelo teste de Mandel não existe diferença significativa entre as variâncias pois TV é inferior ao valor de $F_{0.01(1,6)}^u$, assim os fragmentos da dopamina apresentam comportamento linear.

No que diz respeito à avaliação da linearidade os resultados encontrados foram relativamente similares (ver anexo I, II e III) para todos os fragmentos

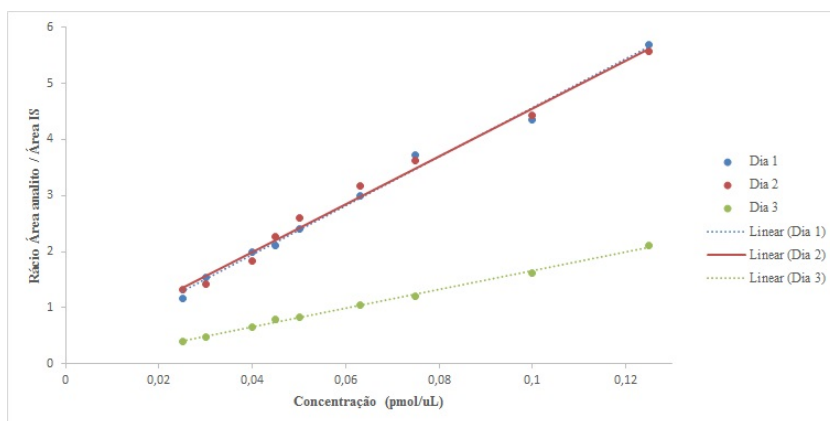
4.1.3.3 Curva de calibração

Tendo a nossa gama de trabalho definida é necessário demonstrar a linearidade dos resultados. Para tal recorre-se ao teste de Mandel para comprovar ou não a sua linearidade. A linearidade também pode ser demonstrada visualmente pelas curvas de calibração.

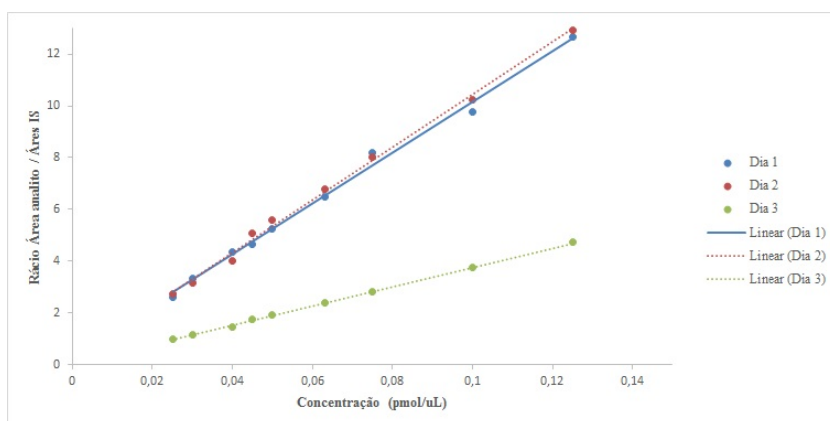
A avaliação da linearidade foi realizada através do processamento de dados, resultantes da injeção em LC-MS/MS de 9 calibradores (consoante a gama de trabalho delineada) durante 3 dias diferentes. Com a utilização de uma ferramenta de cálculo, nomeadamente, uma folha de excel e através da programação das células com as fórmulas já apresentadas para o estudo da linearidade os resultados são tratados e apresentados de seguida, correspondendo aos fragmentos seleccionados para cada analito.



(a) Curva calibração do fragmento 154,20/91,09



(b) Curva calibração do fragmento 154,20/119,17



(c) Curva calibração do fragmento 154,20/137,18

Figura 4.4: Curva de calibração dos 3 fragmentos da dopamina em 3 dias diferentes

Tabela 4.6: Resultados da dopamina para o modelo de regressão linear simples. Os resultados foram extraídos das curvas de calibração 4.4a, 4.4b e 4.4c durante os 3 dias. A gama de trabalho compreende os valores de 0,025-0,125 μM .

Dia 1					
Analito	Transição	Curva de calibração	R^2	Intervalo de confiança 95%	
				< 95%	> 95%
Dopamina	154,20/91,09	$y = 18,677x + 0,0807$	0,999	0,029	0,132
	154,20/119,17	$y = 43,647x + 0,1996$	0,996	-0,038	0,437
	154,20/137,18	$y = 98,122x + 0,3348$	0,997	-0,099	0,769

Dia 2					
Analito	Transição	Curva de calibração	R^2	Intervalo de confiança 95%	
				< 95%	> 95%
Dopamina	154,20/91,09	$y = 17,518x + 0,1407$	0,993	0,01	0,271
	154,20/119,17	$y = 42,713x + 0,29$	0,995	0,031	0,549
	154,20/137,18	$y = 101,61x + 0,2668$	0,998	-0,108	0,642

Dia 3					
Analito	Transição	Curva de calibração	R^2	Intervalo de confiança 95%	
				< 95%	> 95%
Dopamina	154,20/91,09	$y = 7,1223x + 0,0058$	0,998	-0,023	0,035
	154,20/119,17	$y = 16,515x + 0,0023$	0,998	-0,054	0,059
	154,20/137,18	$y = 37,206x + 0,0453$	0,999	-0,019	0,109

A linearidade da resposta na quantificação dos três fragmentos da dopamina também não pode ser posta em causa, pois cumpre todos os critérios de aceitação, tanto para o coeficiente de determinação ($R^2 > 0,99$, tabela 4.6) como para $F_{cal} > F_{crit}$ (tabelas 9.1, 9.3, 9.5, no anexo IV) e os gráficos 9.1, 9.2 e 9.3 dos resíduos versus concentração para cada um dos fragmentos estão posicionados, de forma aleatória, em torno do eixo das abcissas.

A linearidade da resposta na quantificação dos três fragmentos da dopamina também não pode ser posta em causa, pois cumpre todos os critérios de aceitação, tanto para o coeficiente de determinação ($R^2 > 0,99$, tabela 4.6) como para $F_{cal} > F_{crit}$ (tabela 9.1, 9.3, 9.5) e os gráficos 9.1, 9.2 e 9.3 dos resíduos versus concentração para cada fragmentos estão posicionados, de forma aleatória, em torno do eixo das abcissas.

As curvas de calibração dos analitos são apresentadas no anexo I, II e III, apresentando também resultados similares ao encontrado na dopamina.

4.1.3.4 Mínimos quadrados ponderados

Com o teste da homogeneidade das variâncias, torna-se mais claro o uso dos mínimos quadrados ponderados, principalmente em caso de heterocedasticidade. Em caso de homocedasticidade teria-se que recorrer ao mínimos quadrados ordinários (OLS³), contudo pelo teste da homogeneidade das variâncias não será necessário recorrer aos mínimos quadrados ordinários, pois todas as transições apresentam heterocedasticidade. Outro factor que não se pode descurar, são altas concentrações afectarem as mais baixas concentrações da gama de trabalho, podendo comprometer a linearidade, mesmo que à partida os testes anteriores indiquem que se pode ter confiança na mesma. Por isso a escolha do melhor factor de ponderação, $\frac{1}{x}; \frac{1}{x^2}; \frac{1}{x^{\frac{1}{2}}}; \frac{1}{y}; \frac{1}{y^2}$ e $\frac{1}{y^{1/2}}$, sendo escolhido com base no valor mais baixo do somatório da percentagem do erro residual ($\sum \%RE$) e também da média do R^2 .

Tabela 4.7: Resultados dos mínimos quadrados ponderados. Na tabelas está presente a soma da percentagem do erro residual ($\sum \%RE$) e também da média do R^2 através dos mínimos quadrados ponderados e ordinários.

		Dopamina					
Fragmento		154,20/91,09		154,20/119,17		154,20/137,18	
		$\sum \%RE$	R^2	$\sum \%RE$	R^2	$\sum \%RE$	R^2
Modelo 1	$\frac{1}{x^0}$	114,662	0,993	111,376	0,993	70,121	0,997
Modelo 2	$\frac{1}{x}$	107,687	0,991	106,435	0,992	66,869	0,996
Modelo 3	$\frac{1}{y}$	110,704	0,986	106,431	0,989	66,704	0,995
Modelo 4	$\frac{1}{x^2}$	108,89	0,991	106,725	0,992	66,526	0,996
Modelo 5	$\frac{1}{y^2}$	113,368	0,987	107,216	0,989	66,899	0,995
Modelo 6	$\frac{1}{\sqrt{x}}$	109,678	0,992	107,923	0,993	68,319	0,997
Modelo 7	$\frac{1}{\sqrt{y}}$	109,987	0,992	107,944	0,993	68,238	0,997

A dopamina apresenta (tabela 4.7) apenas 2 fragmentos (154,20/91,09 e 154,20/119,17) o modelo 2 para uma melhor linearidade na curva de calibração, enquanto que o fragmento 154,20/137,18 o modelo que melhor a linearidade apresenta é o modelo 4 que apresenta menor $\sum \%RE$.

Na avaliação dos mínimos quadrados ponderados dos analitos restantes os resultados encontrados (ver anexo I, II e III). Os 3 fragmentos da L-tirosina são concordantes quanto ao modelo a aplicar, ou seja, será o modelo 5 ($\frac{1}{y^2}$). Quanto à L-DOPA os fragmentos 198,03/152,01 e 198,03/181,00 a escolha do modelo recai sobre o mesmo, nomeadamente o modelo 5, enquanto que no fragmento 198,03/135,01 o modelo 3 é o escolhido. O modelo 4 é para o fragmento 168,17/65,02 o que apresenta melhor ajuste para a linearidade da curva de ca-

³Do Inglês, Ordinary Least Squares. Procura encontrar o melhor ajuste para um conjunto de dados que minimize a soma dos quadrados das diferenças entre valor estimado e observado (resíduos).

libração, assim como o modelo 2 e o modelo 5 para os fragmentos 168,17/91,02 e 168,17/151,13 da 3-MT, correspondentemente.

4.1.4 Limiares analíticos

Existem diferentes abordagens na determinação do LQ e LD, nomeadamente a precisão e exactidão, o sinal do sinal/ruído (S/N) e de parâmetros da curva calibração.

Uma vez que se verificou que através desta técnica que apresenta uma gama analítica relativamente alargada, temos verificado que o erro experimental no sinal (ârea/área IS) é heterocedástico o que força a ter-se de utilizar métodos de estimativa ponderada - este tipo de estimativa é mais difícil de efectuar já que requer uma prévia definição do erro experimental e este pode variar entre situações distintas como por exemplo entre dias, ao longo da utilização do equipamento, etc.

A relação sinal ruído (S/N) pode ser assim um processo muito útil para tentar chegar ao mesmo tipo de estimativa de limiares analíticos. Assim, quando esta relação atinge o valor nominal de 3,30 e 10,0 estamos perante as definições da IUPAC para limite de detecção e limite de quantificação

Na tabela 4.8 encontra-se sistematizada a informação relativa ao S/N em cada padrão da curva de calibração dos cinco analitos em estudo.

Tabela 4.8: Valores típicos obtidos na relação sinal ruído (S/N) ao longo da curva de calibração obtida com os analitos estudados.

Dia 1							
L-tirosina (182,19/91,06)		L-DOPA (198,03/135,01)		Dopamina (154,20/91,09)		3-MT (168,17/65,02)	
[Conc.] (μM)	S/N	[Conc.] (μM)	S/N	[Conc.] (μM)	S/N	[Conc.] (μM)	S/N
0,050	790,3	0,100	813,5	0,250	279,1	0,250	767
0,060	999,1	0,120	1029,1	0,030	361,9	0,030	1165,8
0,080	1211,1	0,160	1302,7	0,040	479,4	0,040	1354,6
0,090	1171,7	0,180	1112,3	0,045	491,7	0,045	1086,9
0,100	1325,3	0,200	1522,2	0,055	583,8	0,055	1804,5

Uma vez que os valores encontrados para a relação S/N estão muito acima dos valores que se pretende avaliar (3,30 e 10,0), fomos representar a sua evolução em função do respectivo teor, ver figura 4.5.

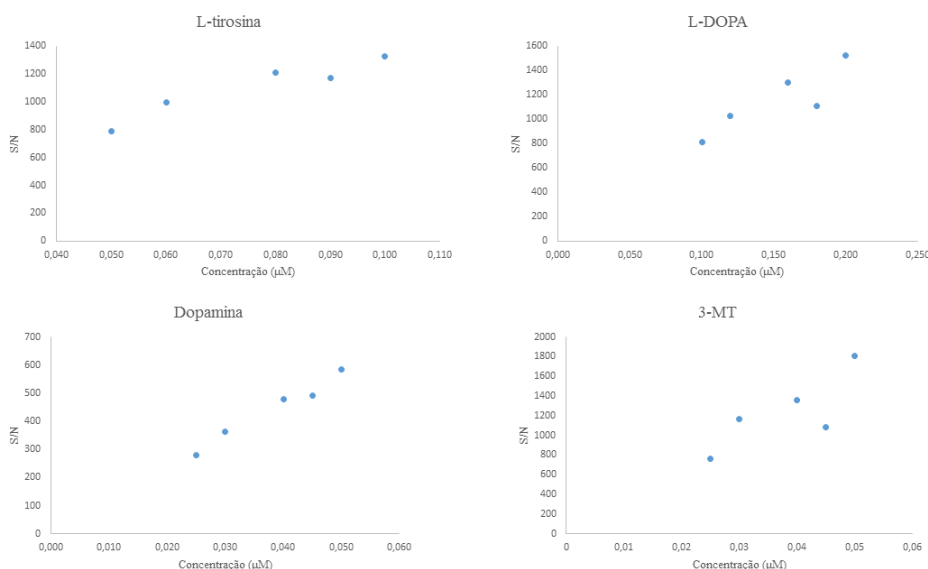


Figura 4.5: Representação da tendência S/N no extremo inferior da gama de trabalho relativas à quantificação da L-tirosina (m/z 182,19/91,06), L-DOPA (m/z 198/135), dopamina (m/z 154/65) e 3-MT (m/z 168/91).

Da figura anterior verifica-se que a evolução do S/N nesta curta gama de concentração tem um comportamento que pode ser aproximado por uma recta (polinómio de primeiro grau). Usando depois essa função como a representação da estimativa dos valores S/N pode-se então prever os respectivos limiares analíticos impondo valores (3,30 e 10,0) à variável dependente.

Na dopamina com o ajuste dos 5 valores com polinómio de primeiro grau obteve-se as estimativas $b_0 = 7,68 (4,14 \times 10^1)$ (ordenada na origem) e $b_1 = 1,14 \times 10^4 (1,06 \times 10^3)$ (declive da recta de calibração), quanto à incerteza percentual, b_0 apresenta um valor bastante alto (538,9%), e juntamente com o valor do teste t-student (0,865), significando assim que o valor de b_0 não apresenta qualquer significado estatístico, considerando-se assim apenas o declive. Avaliando, agora a dependência do sinal apenas com o declive obtém-se os parâmetros $b_1 = 1,15 \times 10^4 (2,18 \times 10^2)$, mantendo o $N=5$, tendo-se obtido também 0,000 para o valor de prova. Assim, os valores para o LD e LQ são, respectivamente, 0,29 nM e 0,87 nM.

A análise realizada para a obtenção dos LD e LQ de um fragmento da dopamina foi a mesma análise realizada para um fragmento dos restantes analitos. Na tabela 4.9 seguinte estão apresentados os valores dos LD e LQ.

Tabela 4.9: Limiares analíticos dos restantes fragmentos da L-tirosina, L-DOPA, dopamina, 3-MT.

	L-tirosina	L-DOPA	Dopamina	3-MT
m/z	182,19/136	198/152	154/91	168/119
LD (nM)	0,29	0,30	0,16	0,15
LQ (nM)	0,87	0,92	0,48	0,46

4.1.5 Precisão

Como já referido, a precisão divide-se em dois níveis, repetibilidade e reprodutibilidade, e um outro suplementar a precisão intermédia. Neste projecto apenas a repetibilidade e precisão intermédia serão avaliadas, isto porque não houve aplicação do método noutros laboratórios, por isso a reprodutibilidade não pode ser avaliada.

Os critérios da avaliação da precisão é feito com base no valor da percentagem do coeficiente de variação (%CV), sendo o valor aceitável da %CV inferior a $\pm 15\%$, enquanto para baixa concentração (LOQ) de $\pm 20\%$. Os valores de precisão apresentados na tabela 4.10, indicam que todos os fragmentos da dopamina apresentam boa repetibilidade e precisão intermédia.

Tabela 4.10: Resultados da precisão para os 3 fragmentos da dopamina, relativo aos calibradores de concentração alta, média e baixa.

Fragmento	Concentração nominal (μM)	Repetibilidade (%CV)	Precisão intermédia (%CV)
154,20/91,09	0,0275	4,863	6,516
	0,05	4,158	4,634
	0,0875	6,620	8,035
154,20/119,17	0,0275	4,142	4,463
	0,05	3,099	4,02
	0,0875	5,091	5,928
154,20/137,18	0,0275	4,324	4,618
	0,05	3,401	3,485
	0,0875	4,840	5,554

Os outros analitos apresentam bons resultados de precisão para os fragmentos 198,03/135,01 na L-DOPA, na 3-MT todos os fragmentos apresentam boa precisão, enquanto a L-tirosina não apresenta quaisquer valores aceitáveis de precisão (ver anexos I, II e III).

4.1.6 Exactidão

A exactidão é avaliada em termos do erro médio relativo (%RE), sendo medida com base na média da concentração dos controlos de qualidade (alto, médio e baixo) dos 3 dias e da concentração nominal. Os critérios de avaliação são semelhantes aos da precisão, nomeadamente o valor aceitável da %RE inferior a $\pm 15\%$, enquanto para baixa concentração (LOQ) de $\pm 20\%$.

As concentrações nominais usadas pelos calibradores são de gama alta, média e baixa, dentro da gama de trabalho usada. Dos três fragmentos da dopamina os valores exactidão apresentados na tabela 4.11, revelam que apenas o fragmento com m/z 154,2/91,09 apresenta boa exactidão.

Tabela 4.11: Resultados da exactidão para os 3 fragmentos da dopamina, relativo aos calibradores de concentração alta, média e baixa.

Fragmento	Concentração nominal (μM)	Exactidão (%MRE)
154,20/91,09	0,0275	-3,498
	0,0500	0,258
	0,0875	1,908
154,20/119,17	0,0275	82,81
	0,0500	-46,40
	0,0875	4,11
154,20/137,18	0,0275	82,54
	0,0500	-45,44
	0,0875	2,75

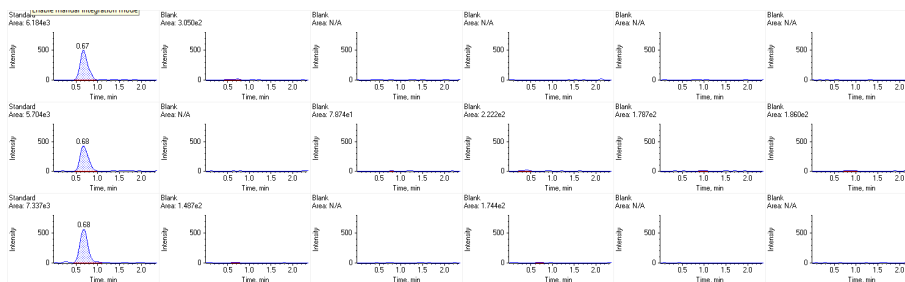
Bons resultados de exactidão é apresentada pelo fragmento da L-tirosina m/z 182,19/91,06 e no fragmento m/z 198,03/135,01 L-DOPA, enquanto que na 3-MT todos apresentam bons resultados de exactidão, como se pode verificar nso anexos I, II e III.

4.1.7 Carry-over

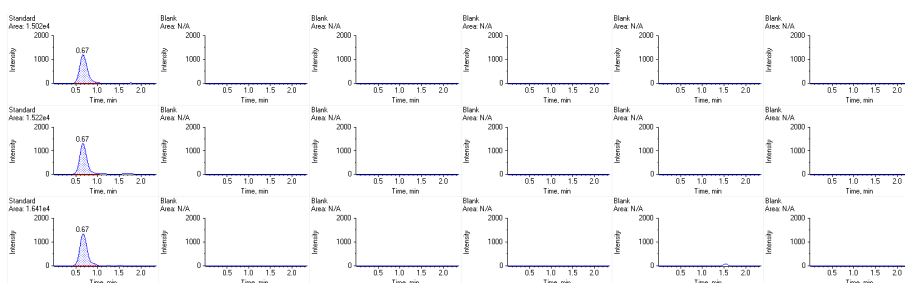
O carry-over assume particular relevância na precisão e exactidão pois pode afectar ambos. Isto acontece devido à injeção de concentrações mais elevadas anteriormente às menos concentradas afectando assim a precisão e exactidão. Para contornar este problema amostras de brancos são injectadas entre os calibradores, afim de remover quantidades de analito que possam ter ficado na coluna.

Para demonstrar o efeito de carry-over a figura 4.6 apresentam vários cromatogramas onde está representado para cada analito a injeção de 3 réplicas do calibrador mais alto, seguido de 5 brancos entre as réplicas. Para não ocorrer

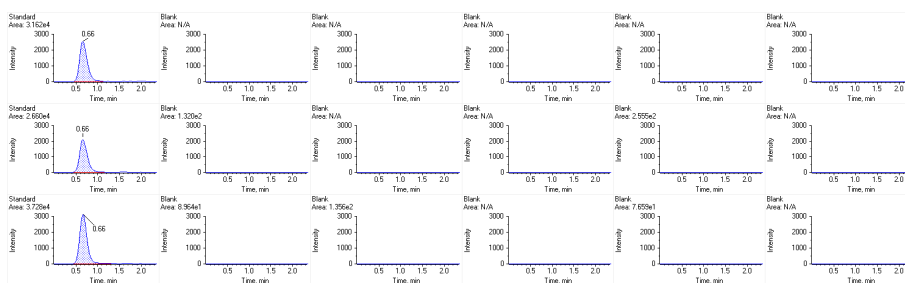
efeito carry-over os cromatogramas do branco não podem ter nenhum sinais cromatográfico, pois caso contrário temos efeito de carry-over que não é o desejado.



(a) Transição 154,20/91,09



(b) Transição 154,20/119,17



(c) Transição 154,20/137,18

Figura 4.6: Cromatogramas representando a injeção das 3 réplicas do calibrador mais alto da dopamina, seguido dos 5 brancos.

Analisando as figuras anteriores dos cromatogramas para os diferentes fragmentos da dopamina, verifica-se a não existência de carry-over que era o pretendido, não afectando assim os resultados de precisão e exactidão obtidos. A L-tirosina, levodopa e 3-MT também não apresentam efeito de carry-over (anexo I, II e III)

Capítulo 5

Conclusão e perspectivas futuras

Estudos recentes apontam para que alterações no metabolismo da dopamina estejam intimamente relacionados com o surgimento da doença de Parkinson. O metabolismo da dopamina não ocorre apenas nos neurónios mas também no plasma sanguíneo, o que torna possível fazer um simples teste de diagnóstico, como uma análise sanguínea. Por isso é importante saber primeiro se é possível a quantificação das quatro catecolaminas presentes no metabolismo da dopamina (L-tirosina, L-DOPA, dopamina e 3-MT).

Este projecto teve como objectivo a determinação das catecolaminas, por LC-MS/MS, em solvente, antes de partir para uma análise numa matriz biológica (onde estão presentes outros analitos). Sendo por isso necessário averiguar o comportamento dos analitos sem interferências de outras moléculas presentes na matriz biológica pudessem ter nos analitos em questão, pois poderia-se estar a quantificar o analito errado, pois é importante não esquecer que os analitos em questão são endógenos.

Na avaliação dos resultados foram usados parâmetros de validação como selectividade, calibração, limites de quantificação e detecção e, por último, precisão e exactidão. Sendo que os restantes parâmetros referido (recuperação, efeito matriz e estabilidade) não puderam ser avaliados já que não foram realizados testes em matriz biológica. Essa será a próxima etapa na continuação deste projecto.

O primeiro parâmetro apresentado permitiu identificar os analitos em questão, assim como a sua selectividade foi comprovada pelos espectros de fragmentação, dos quais foi possível retirar as transições para os 4 analitos, para proceder a análise dos parâmetros seguintes para a escolha da melhor transição de cada

analito para ser usado em possíveis quantificações.

A gama de trabalho delineada para averiguar a linearidade foi diferente para cada analito pois houve a necessidade de a ajustar devido à intensidade demonstrada nos cromatogramas, ser mais baixa na L-DOPA (0,1-0,5 μM) daí possui concentrações mais altas comparativamente com a dopamina (0,025-0,125 μM), a 3-MT (0,025-0,125 μM) e a L-tirosina (0,05-0,25 μM) apresentarem já intensidades mais altas, podendo provocar saturação de sinal.

A primeira fase da calibração trata da avaliação da variabilidade da resposta analítica na gama de concentração de interesse. No caso da dopamina verificou-se que, para todos os fragmentos considerados (m/z 154,20/91,09, 154,20/119,17 e 154,20/137,18), a avaliação efectuada através da ANOVA em três dias distintos revelou haver um importante efeito interdiário. As estimativas ANOVA da variabilidade puramente aleatória, estimada nos extremos da curva de calibração, permitiram efectuar o teste de homogeneidade da variância tendo este demonstrado ser necessário o uso de pesos estatísticos na estimativa dos parâmetros da função de calibração. Estas constatações foram também similares no caso dos analitos L-tirosina, L-DOPA e 3-MT.

Avaliada a calibração, procedeu-se ao cálculo dos limiares analíticos através da evolução sinal/ruído (S/N) numa curta gama de concentração apresentando um comportamento aproximado a uma recta (polinómio de primeiro grau). Como as estimativas na ordenada da origem (b_0) apresentam incertezas percentuais altas, logo não apresentam valor estatístico significativo, os limiares analíticos foram então calculados avaliando apenas a dependência do sinal com o declive (b_1) para todos os analitos.

Na precisão e exactidão apenas uma transição da L-DOPA e da dopamina apresenta boa exactidão e precisão daí ser a transição que possa ser usada para a quantificação do analito em questão. Situação oposta apresenta a L-tirosina e a 3-MT, pois a L-tirosina não apresenta qualquer bons resultados de precisão e exactidão e na 3-MT todos os fragmentos possuem boa precisão e exactidão. O carry-over apresentando pelos cromatogramas não ocorreu podendo-se assim confiar nos resultados de precisão e exactidão.

Para a obtenção dos resultados apresentados, protocolos foram redigidos com base na literatura, não sendo fácil derivado à escassez de informação dos analitos em questão não serem muito testados numa análise por LC-MS/MS.

Em suma, os resultados obtidos neste projecto poderão assim dar início ao próximo passo a dar para um possível teste de diagnóstico. Contudo, os próximo passo para a continuação deste projecto e para que se possa alcançar um futuro teste de diagnóstico, implica ajustar vários factores relativos à L-tirosina para definir uma transição para a sua quantificação por LC-MS/MS, e uma análise dos restantes analitos do metabolismo da dopamina (DOPAC e HVA) pois ao

contrário dos analitos estudados estes ionizam no modo negativo. Por fim é necessário a implementação deste método de validação numa matriz biológica (plasma sanguíneo) para averiguar a possibilidade dos analitos poderem ser quantificados

Bibliografia

- [1] World Health Organization. Neurological disorders: a public health approach. *Neurological disorders: public health challenges.*, pages 41–176, 2006.
- [2] Francesca Antonelli and Antonio P Strafella. Behavioral disorders in Parkinson’s disease: the role of dopamine. *Parkinsonism & related disorders*, 20 Suppl 1:S10–2, January 2014.
- [3] Lawrence I. Golbe, Margery H. Mark, and Jacob I. Sage. *Parkinson Disease handbook*. The American Parkinson Disease Association, Inc., 1 edition edition, 2009.
- [4] Johannes Meiser, Daniel Weindl, and Karsten Hiller. Complexity of dopamine metabolism. *Cell communication and signaling : CCS*, 11:34, 2013.
- [5] Arvid Carlsson. A half-century of neurotransmitter research: impact on neurology and psychiatry, 2000.
- [6] Alternative Medicine. L-Tyrosine, 2007.
- [7] Neurotransmitter Systems. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*. Springer US, Boston, MA, 2007.
- [8] William Dauer and Serge Przedborski. Parkinson’s Disease : Mechanisms and Models. *Neuron*, 39:889–909, 2003.
- [9] A. Carlsson, M. Lindqvist, and T. Magnusson. 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists., 1957.
- [10] Erik J. Giltay, King H. Kho, Ben a. Blansjaar, Marcel M. Verbeek, P. B H Geurtz, Johanna M. Geleijnse, and L. J G Gooren. The sex difference of plasma homovanillic acid is unaffected by cross-sex hormone administration in transsexual subjects. *Journal of Endocrinology*, 187:109–116, 2005.
- [11] George Siegel, R. Wayne Labers, Scott Brady, and Donald Price. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 2006.

- [12] Oliver von Bohlen und Halbach and Rolf Dermietzel. *Neurotransmitters and Neuromodulators*, volume 9. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, FRG, February 2002.
- [13] Graeme Eisenhofer, Anders Aneman, Peter Friberg, Douglas Hooper, Lars Fändriks, Hans Lonroth, Béla Hunyady, and Eva Mezey. Substantial production of Dopamine in the human gastrointestinal tract. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82(11):3864–3871, 1997.
- [14] Nico C van de Merbel, Gert Hendriks, Roos Imbos, Johanna Tuunainen, Juha Rouru, and Hanna Nikkanen. Quantitative determination of free and total dopamine in human plasma by LC-MS/MS: the importance of sample preparation. *Bioanalysis*, 3:1949–1961, 2011.
- [15] Ebbe Eldrup. Significance and origin of DOPA, DOPAC, and dopamine-sulphate in plasma, tissues and cerebrospinal fluid. *Danish medical bulletin*, 51(February):34–62, 2004.
- [16] David S. Goldstein and Courtney Holmes. Neuronal source of plasma dopamine. *Clinical Chemistry*, 54:1864–1871, 2008.
- [17] International Union, Of Pure, and Applied Chemistry. International Union of Pure Commission on Analytical Nomenclature (nomenclature for chromatography, IUPAC recommendations 1993). *Pure and Applied Chemistry*, 65(4), 1995.
- [18] Raymond P.W. Scott. *Principles and practice of chromatography*. ChromEd Book Series, 2003.
- [19] Robert L Grob and Eugene F Barry. *Modern Practice of Gas Chromatography*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, May 2004.
- [20] Jiri Sevcik. Detectors in Gas Chromatography. *Journal of chromatography library*, Volume 4(Detectors in Gas Chromatography).
- [21] Royal Society Chemistry. Techniques, Modern Chemical. In *Modern Chemical Techniques*, chapter 5. Chromat, pages 116–159.
- [22] Michael W. Dong. *Modern HPLC for Practicing Scientists*. John Wiley & Sons, Ltd, 2006.
- [23] Robert E Ardrey. *LIQUID CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY*, volume 1. John Wiley & Sons, Ltd, 2003.
- [24] Veonika R. Meyer. *Practical High-Performance Liquid Chromatography FIFTH EDITION*. John Wiley & Sons, Ltd, 5 edition, 2010.

- [25] <http://labvirtual.eq.uc.pt/>.
- [26] Heinz Engelhardt. *High Performance Liquid Chromatography*. Chemical Laboratory Practice. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1979.
- [27] Yuri Kazakevich and Rosario Lobrutto. *HPLC for Pharmaceutical Scientists*. John Wiley & Sons, Ltd, 2007.
- [28] John B Fenn, Matthias Mann, Chin K a I Meng, Shek Fu Wong, and Craig M Whitehouse. Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules. *Science*, 246(6), 1989.
- [29] Jurgen H Gross. *Mass Spectrometry. A Textbook*. Springer US, 2nd edition, 2011.
- [30] Fernando Mauro Lanças. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente "compatíveis"? *Scientia Chromatographica*, 1(Lc):35–61, 2009.
- [31] Natalie Thompson. Mass Spectrometry in Bioanalysis. *Particle Sciences, Drug Development Services*, 4(April), 2013.
- [32] <Http://www.shimadzu.com/an/lcms/support/>.
- [33] Crawford Scientific Chromacademy. Mass Spectrometry Fundamental LC-MS Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (APCI). Technical report.
- [34] Robert K. Boyd, Cecilia Basic, and Robert a. Bethem. *Trace Quantitative Analysis by Mass Spectrometry*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, April 2008.
- [35] John M Walker. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, 2013.
- [36] Edmond Hoffmann and Vincent Stroobant. *Mass Spectrometry*, volume 17. John Wiley & Sons, Ltd, February 2007.
- [37] Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal. Guia RELACRE 13 Validação de métodos internos de ensaio em análise química, 2000.
- [38] International Union, O F Pure, Applied Chemistry, Analytical Chemistry Division, Commission On, General Aspects, O F Analytical, Raluca I Stefan, Jacobus F V a N Staden, Klaus Danzer, Wolfgang Lindner, Duncan Thorburn Burns, and Ales Fajgelj. Commission on general aspects of analytical chemistry* (IUPAC recommendations 2001). *Pure and Applied Chemistry*, 73(8):1381–1386, 2001.

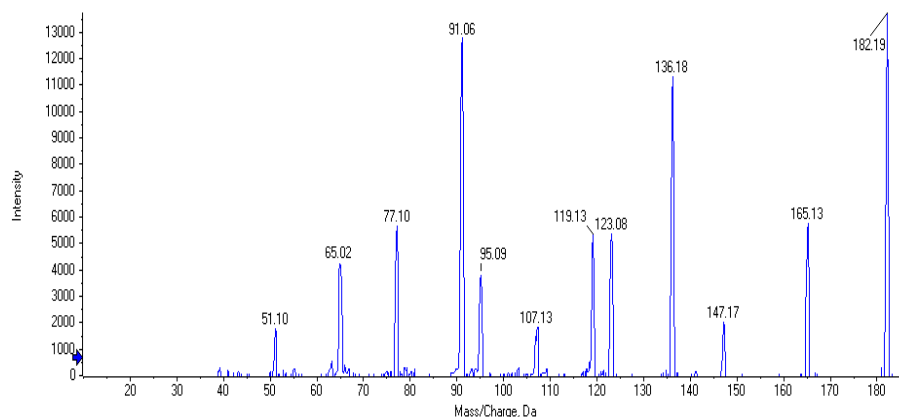
- [39] A. Gustavo González and M. Ángeles Herrador. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 26(3):227–238, 2007.
- [40] A. M. Almeida, M. M. Castel-Branco, and A. C. Falcão. Linear regression for calibration lines revisited: Weighting schemes for bioanalytical methods. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 774:215–222, 2002.
- [41] Frank T. Peters and Hans H. Maurer. Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology-A review. *Validation in Chemical Measurement*, pages 1–9, 2005.
- [42] Marian Kelley and Binodh DeSilva. Key elements of bioanalytical method validation for macromolecules. *The AAPS journal*, 9(1):E156–E163, 2007.
- [43] Agency European Medicines. Guideline on bioanalytical method validation Table of contents. 44(July 2011):1–23, 2012.
- [44] R L Dobson, G R Kelm, and D M Neal. Automated gas chromatography/tandem mass spectrometry assay for tebufelone and a ¹³C,¹⁸O-labeled analog in plasma: applicability to absolute bioavailability determination. *Biological mass spectrometry*, 23(September 1993):75–81, 1994.
- [45] Sherry Wang, Matthew Cyronak, and Eric Yang. Does a stable isotopically labeled internal standard always correct analyte response?. A matrix effect study on a LC/MS/MS method for the determination of carvedilol enantiomers in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43:701–707, 2007.
- [46] Erin E Chambers, Diane M Diehl, and Waters Corporation. The use of stable-isotope-labeled (SIL) internal standards to compensate for matrix effects: key considerations, 2007.
- [47] Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. *U.S. Department of Health and Human Services*, (May):4–10, 2001.

Capítulo 6

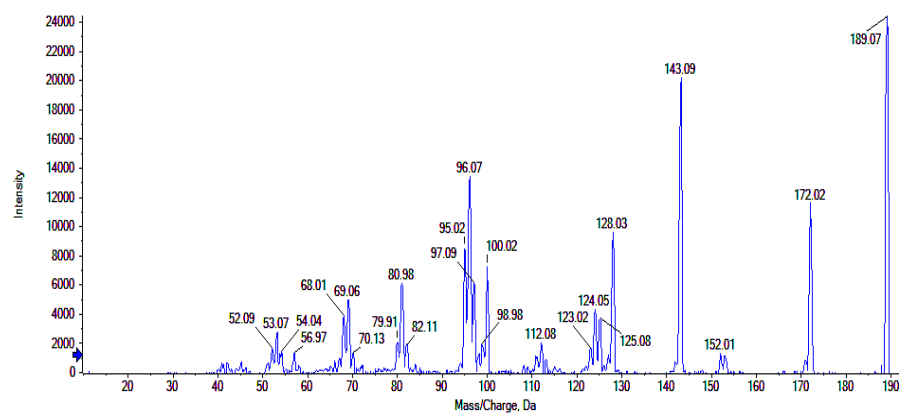
Anexo I - L-tirosina

Anexo I - Resultados obtidos para a L-tirosina, referentes aos fragmentos 91,06, 136,18 e 165,13.

Identificação e selectividade



(a) Espectro de fragmentação da L-tirosina. Fragmentos obtidos por ESI no modo de ionização positivo variando a energia de colisão de 10V a 110V, infusão de uma solução 1,98 mM de L-tirosina.



(b) Espectro de fragmentação da L-tirosina (D7-98%). Fragmentos obtidos por ESI no modo de ionização positivo variando a energia de colisão de 10V a 90V, infusão de uma solução 2,02 mM de L-tirosina (D7-98%).

Figura 6.1: Espectros de fragmentação da L-tirosina (6.1a) e L-tirosina (D7-98%) (6.1b).

Nas figuras 6.1a e 6.1b estão representados os espectros de fragmentação da L-tirosina e do padrão interno, respectivamente. Os espectros de fragmentação são bastantes similares sendo o sinais cromatográfico mais intenso para a L-tirosina de m/z 182,19 e para o padrão interno um m/z de 187,35, representando o ião precursor. A diferença registada entre os m/z deriva da substituição dos hidrogénios pelos deutérios. Os fragmentos da L-tirosina 91,06, 136,18 e 165,13

serão os fragmentos a monitorizar pois são os que possuem maior intensidade e correspondem aos sinais cromatográficos do padrão interno 96,07, 143,09 e 172,02.

Calibração

Representatividade

O fragmento da L-tirosina com m/z 182,19/91,06 apresenta na tabela 6.1, os valores da sua quantificação.

Tabela 6.1: Estudo da gama de resposta analítica para quantificação da L-tirosina através da detecção do fragmento $m/z = 91,06$.

[L-tirosina] (μM)	Dia 1		Dia 2		Dia 3	
	A/A_{IS}	S/N	A/A_{IS}	S/N	A/A_{IS}	S/N
0,055	0,4862	830,1	0,439	571	0,9199	1191,6
	0,4895	899,9	0,4486	738,6	0,4793	721,5
	0,513	924	0,4669	759,3	0,4172	638,3
0,100	0,931	1527,4	0,8107	1174,2	0,7819	1101,4
	0,8441	1365,4	0,8206	1156,7	0,744	1113,2
	0,9027	1230,8	0,767	1094,9	0,8097	1109,8
0,175	1,489	1985,7	1,4	1594,9	1,331	1659
	1,549	2278,1	1,382	1454,7	1,291	1732,9
	1,551	1605	1,381	1635,4	1,279	1737,2

Com uma menor concentração ($0,055 \mu M$) não se obteve um efeito inter-diário, nem mesmo retirando um dia. Do estudo, da concentração de $0,055 \mu M$, resultou numa estimativa puramente aleatória com o valor de $s_{pe}=0,194$. A um nível de concentração intermédio $0,10 \mu M$, a estimativa de dispersão interdiária deu $s_i=0,070$ e a puramente aleatória $s_{pe}=0,031$. Removendo os valores do dia 3, o efeito inter-diário deixa de ocorrer. Na concentração superior ($0,175 \mu M$), ocorre efeito inter-diário. estando sempre presente e o valor da estimativa puramente aleatória mantém-se inalterado ($s_{pe}=0,021$). É evidente que na gama de $0,100$ a $0,175 \mu M$ existe homogeneidade da variância ($s_{pe} = 0,031$ e $s_{pe} = 0,031$). Contudo esta similaridade não se preserva até no ao teor de $0,055$ a $0,10 \mu M$, pois o valor $s_{pe} = 0,194$ de $0,055 \mu M$, não é similar aos anteriores, logo terá de ser provada através de um teste estatístico. Assumindo como hipótese nula a similaridade das variâncias, o valor de $TV = 39,16$ é superior ao respectivo valor crítico previsto pela distribuição bilateral de Fisher ($F_{0,01(6,6)}^b = 11,07$) indicando que a hipótese nula não é válida. Assim sendo, estamos perante um caso de heterogeneidade da variância e, como tal, é necessário utilizar métodos de regressão linear ponderada para efectuar estimativas paramétricas quanto à

calibração e quanto à quantificação

No fragmento 182,2/136,2 os valores de quantificação referentes à sua quantificação são apresentados na tabela 6.2.

Tabela 6.2: Estudo da gama de resposta analítica para quantificação da L-tirosina através da detecção do fragmento $m/z = 136,2$.

[L-tirosina] (μM)	Dia 1		Dia 2		Dia 3	
	A/A_{IS}	S/N	A/A_{IS}	S/N	A/A_{IS}	S/N
0,055	0,8018	567,9	0,7788	533,3	1,5060	758,3
	0,7804	567,9	0,8097	694,3	0,7798	388,3
	0,9129	717,8	0,7603	635,1	0,7503	556,2
0,100	1,5140	1 124,2	1,4230	1 025,1	1,3520	702,5
	1,5000	955,7	1,4300	864,2	1,2390	684,5
	1,5220	949,2	1,3750	702,1	1,3750	794,1
0,175	2,7360	1 606,7	2,3980	1 473,8	2,3900	1 460,3
	2,8710	2 101,5	2,3810	1 103,6	2,3270	1 166,7
	2,8230	1 621,2	2,4080	1 310,7	2,2060	1 026,3

O fragmento 182,19/136,18, ao nível de concentração mais baixo (0,055 μM) não apresenta efeito inter-diário, facilmente justificado pelo valor de TV (0,69) sendo inferior ao valor crítico (Fcrit) 10,92. O mesmo não acontece para a concentração intermédia, ao obter-se um valor da dispersão inter-diária (s_i) 0,11 e o próprio valor de TV (12,88) ser superior ao valor crítico (10,92) indicando assim, a existência de um efeito inter-diário, mesmo eliminando qualquer um dos dias (as médias diárias estão bastantes próximas, daí a eliminação do dia não ser de a escolha mais fácil ao qual se junta um aumento da estimativa puramente aleatória, atendendo ao seu valor inicial ($s_{pe}=0,046$). Na concentração mais alta é possível observar o mesmo resultado que na concentração intermédia, ou seja, temos sempre efeito inter-diário mesmo eliminando um dia e os valores da estimativa da dispersão interdiária é $s_i=0,325$ e da estimativa puramente aleatória mantém-se inalterado ($s_{pe}=0,067$). Na gama de 0,100 a 0,175 μM existe homogeneidade da variância ($s_{pe} = 0,046$ e $s_{pe} = 0,067$). Contudo esta similaridade não se preserva até ao teor de 0,055 a 0,100 μM , pois o valor $s_{pe} = 0,281$ de 0,055 μM não é similar aos anteriores. Assumindo como hipótese nula a similaridade das variâncias, o valor de TV = 29,27 é superior ao respectivo valor crítico previsto pela distribuição bilateral de Fisher ($F_{0.01(6,6)}^b = 11,07$), indicando que a hipótese nula não é válida Assim sendo, estamos perante um caso de heterogeneidade da variância e, como tal é necessário utilizar métodos de regressão linear ponderada para efectuar estimativas paramétricas quanto à calibração e quanto à quantificação.

Na tabela seguinte estão presentes os valores relativos à calibração da L-tirosina relativos ao fragmento m/z 165,13.

Tabela 6.3: Estudo da gama de resposta analítica para quantificação da L-tirosina através da detecção do fragmento $m/z = 165,13$.

[L-tirosina] (μM)	Dia 1		Dia 2		Dia 3	
	A/A_{IS}	S/N	A/A_{IS}	S/N	A/A_{IS}	S/N
0,055	0,8475	873,6	0,7644	635,2	1,5960	1 091,4
	0,8483	856,3	0,7913	820,1	0,7953	606,0
	0,8914	921,4	0,7631	665,1	0,7166	475,8
0,100	1,5070	1 314,2	1,3600	899,6	1,3020	1 121,0
	1,4500	1 103,8	1,3940	1 057,6	1,2970	1 050,1
	1,5360	1 390,1	1,3670	956,1	1,3710	1 090,6
0,175	2,6690	1 508,8	2,3930	1 464,3	2,3040	1 470,7
	2,6720	1 852,9	2,2840	1 549,0	2,2430	1 393,2
	2,7080	1 545,5	2,3870	1 451,0	2,2400	1 287,8

Ao menor nível de concentração (0,055 μM), através do estudo ANOVA verifica-se que não existe um efeito inter-diário ($TV = 0,68 < 10,92 = F_{0,01(2,6)}^u$). Não existindo contribuição interdiária, foi observada apenas a aleatória de $s_{pe} = 0,098$.

No nível de concentração intermédio (0,100 μM), as contribuições estimadas para a interdiária e puramente aleatória foi de $s_i = 0,107$ e $s_{pe} = 0,036$. De modo similar, removendo do conjunto de valores original os valores relativos ao primeiro dia de trabalho e reprocessando a análise ANOVA, deixa de se verificar o efeito inter-diário ($TV < F_{crit}$). Contudo a estimativa aleatória tende a atenuar ($s_{pe} = 0,32$).

Já para o nível de concentração superior (0,175 μM), o tratamento ANOVA estima uma valor de teste elevado ($TV = 79,56 \gg 10,92 = F_{0,01(2,6)}^u$), o que permite identificar que existe, também para esta concentração, um efeito inter-diário sobre a variabilidade dos resultados e as contribuições agora estimadas para a interdiária e puramente aleatória de $s_i = 0,269$ e $s_{pe} = 0,043$. Por remoção do conjunto de valores do primeiro dia de trabalho, a análise ANOVA reprocessada indica que deixa de se verificar o efeito inter-diário, contudo a estimativa aleatória aumenta ($s_{pe} = 0,65$).

NA gama de 0,100 a 0,175 μM existe homogeneidade da variância ($s_{pe} = 0,036$ e $s_{pe} = 0,043$). Contudo esta similaridade não se preserva até no teor de 0,055 a 0,100 μM , pois uma vez que o valor $s_{pe} = 0,281$ de 0,055 μM não é similar aos anteriores, mas tem de ser provada através de um teste estatístico. Assumindo como hipótese nula a similaridade das variâncias, o valor de $TV = 60,97$ é superior ao respectivo valor crítico previsto pela distribuição bilateral de Fisher ($F_{0,01(6,6)}^b = 11,07$) indicando que a hipótese nula não é válida. Assim sendo estamos perante um caso de heterogeneidade da variância e, como tal é necessário utilizar métodos de regressão linear ponderada para efectuar estimativas paramétricas quanto à calibração e quanto à quantificação.

Teste de Mandel

Tabela 6.4: Teste de Mandel para os fragmentos da L-tirosina

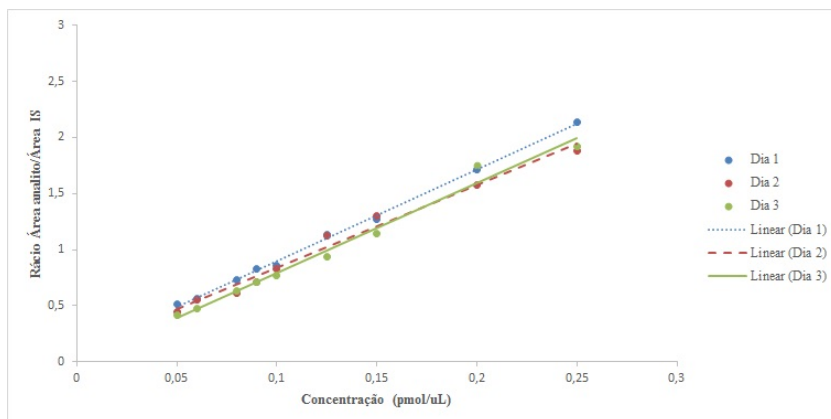
Fragmento 182,19/91,06					
Dia 1		Dia 2		Dia 3	
Teste de Mandel		Teste de Mandel		Teste de Mandel	
ΔSS	0,008	ΔSS	0,019	ΔSS	9,97E-05
TV	1,350	TV	0,838	TV	0,108
$F_{0.01(1,6)}^u$	13,745	$F_{0.01(1,6)}^u$	13,745	$F_{0.01(1,6)}^u$	13,745

Fragmento 182,19/136,18					
Dia 1		Dia 2		Dia 3	
Teste de Mandel		Teste de Mandel		Teste de Mandel	
ΔSS	0,003	ΔSS	0,005	ΔSS	4,43E-04
TV	1,341	TV	3,099	TV	0,600
$F_{0.01(1,6)}^u$	13,745	$F_{0.01(1,6)}^u$	13,745	$F_{0.01(1,6)}^u$	13,745

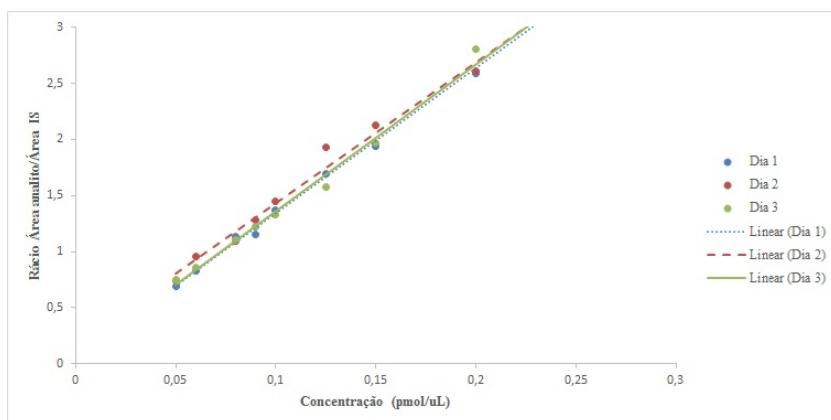
Fragmento 182,19/165,13					
Dia 1		Dia 2		Dia 3	
Teste de Mandel		Teste de Mandel		Teste de Mandel	
ΔSS	0,002	ΔSS	0,039	ΔSS	0,091
TV	0,033	TV	1,418	TV	13,070
$F_{0.01(1,6)}^u$	13,745	$F_{0.01(1,6)}^u$	13,745	$F_{0.01(1,6)}^u$	13,745

Tendo em conta os resultados da tabela 6.4, os fragmentos da L-tirosina nos 3 dias em que as amostras foram injectadas apresentam um valor de TV inferior ao valor de F, significando assim que não há diferenças entre as variâncias, apresentando assim um comportamento linear.

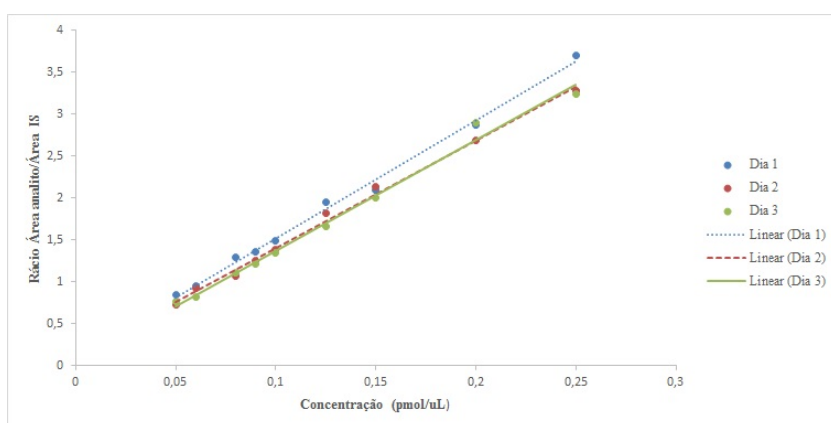
Curvas de calibração



(a) Curva de calibração do fragmento 182,19/91,06



(b) Curva de calibração do fragmento 182,19/136,18



(c) Curva de calibração do fragmento 182,18/165,13

Figura 6.2: Curva de calibração dos 3 fragmentos da L-tirosina em 3 dias diferentes

Os resultados da L-tirosina demonstram durante 3 dias apresentam uma boa linearidade como comprovado pelas curvas de calibração 6.2a, 6.2b e 6.2c, para cada fragmento. Outro factor que comprova que é seguido um modelo de regressão linear provém do valor de R^2 ($>0,99$), o que pela tabela 6.5, é comprovado que todos os fragmentos da L-tirosina, nos 3 dias diferentes, possuem $R^2 > 0,99$.

Contudo não só pelas curvas de calibração se pode assegurar com total garantia que os resultados apresentam linearidade, pois existem possíveis erros imperceptíveis que podem na mesma apresentar valores de R aceitáveis. Como tal é necessário fazer uso da ANOVA (tabelas 6.6, 6.8, 6.10) para avaliar tanto a linearidade como a validade da regressão linear ($F_{cal} > F_{crit}$), o que pelas tabelas 6.6, 6.8 e 6.10 se verifica para todos os fragmentos que não existe diferença significativa. Não obstante, por si só os erros estão totalmente descartados pela ANOVA, sendo também necessário verificar os gráficos de resíduos *versus* concentração, sendo aceitável que os valores do resíduos estejam em redor do eixo dos xx, tal está implícito nos gráficos 6.3, 6.4 e 6.11.

Tabela 6.5: Resultados da L-tirosina para o modelo de regressão linear simples. Os resultados foram extraídos das curvas de calibração 6.2a, 6.2b e 6.2c durante os 3 dias. A gama de trabalho compreende os valores de 0,05-0,25 μM .

Dia 1					
Analito	Transição	Curva de calibração	R^2	Intervalo de confiança 95%	
				< 95%	> 95%
L-tirosina	182,19/91,06	$y = 8,1806x + 0,0782$	0,999	0,0318	0,1246
	182,19/136,18	$y = 14,23x + 0,1182$	0,997	-0,0153	0,2516
	182,19/165,13	$y = 14,066x + 0,1107$	0,997	-0,0115	0,233

Dia 2					
Analito	Transição	Curva de calibração	R^2	Intervalo de confiança 95%	
				< 95%	> 95%
L-tirosina	182,19/91,06	$y = 7,3954x + 0,0951$	0,992	-0,023	0,213
	182,19/136,18	$y = 12,531x + 0,1787$	0,995	0,021	0,337
	182,19/165,13	$y = 12,847x + 0,1196$	0,997	0,011	0,228

Dia 3					
Analito	Transição	Curva de calibração	R^2	Intervalo de confiança 95%	
				< 95%	> 95%
L-tirosina	182,19/91,06	$y = 8,0298x - 0,0116$	0,995	-0,139	0,116
	182,19/136,18	$y = 7,1498x + 0,0246$	0,997	-0,084	0,17
	182,19/165,13	$y = 13,18x + 0,0531$	0,995	-0,107	0,213

Tabela 6.6: Tabela da resultados da ANOVA para os 3 dias do fragmento 182,19/91,06 da L-tirosina. Estão apresentados na tabela da ANOVA valores relativamente à soma dos quadrados (SQ), graus de liberdade (GL), média quadrática (MQ) e b_0 e b_1 representam a ordenada na origem e o declive, respectivamente.

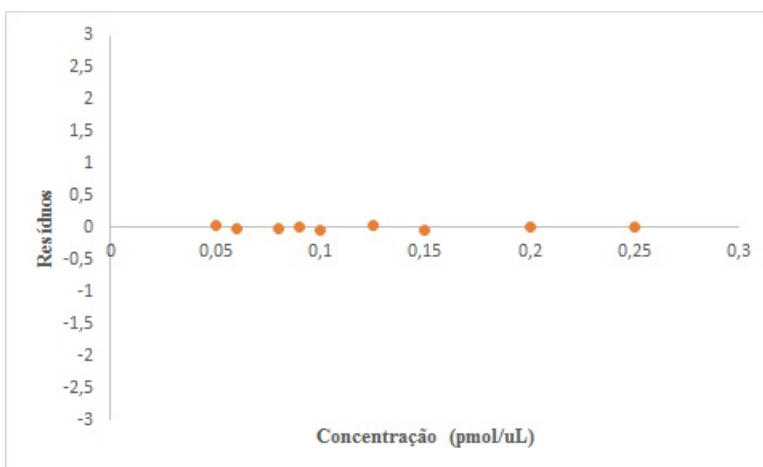
Dia 1													
ANOVA													
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Fcal	Fsignif	Fcrit	Erro Padrão	tcal	p-value	< 95%	> 95%	< 99%	> 99%
Regressão	2,380	1	2,38	3305,173	1,26E-10	5,592							
Residual	0,005	7	0,001										
Total	2,385	8											
b_0	0,020	3,983	0,005	0,032	0,125	0,001	0,147						
b_1	0,142	57,491	0,000	7,844	8,517	7,683	8,679						

Dia 2													
ANOVA													
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Fcal	Fsignif	Fcrit	Erro Padrão	tcal	p-value	< 95%	> 95%	< 99%	> 99%
Regressão	1,945	1	1,945	419,585	1,656E-07	5,592							
Residual	0,032	7	0,005										
Total	1,977	8											
b_0	0,050	1,910	0,098	-0,023	0,213	-0,080	0,270						
b_1	0,361	20,484	1,658E-07	6,542	8,249	6,132	8,659						

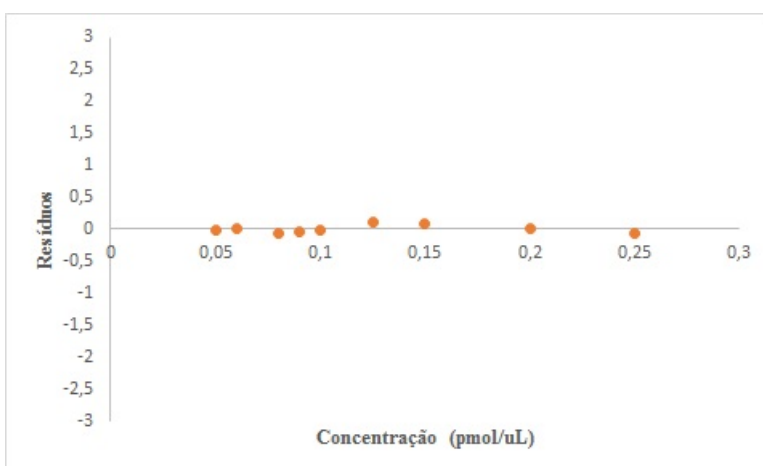
Dia 3													
ANOVA													
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Fcal	Fsignif	Fcrit	Erro Padrão	tcal	p-value	< 95%	> 95%	< 99%	> 99%
Regressão	2,293	1	2,293	422,312	1,621E-07	5,592							
Residual	0,038	7	0,005										
Total	2,331	8											
b_0	0,054	-0,216	0,835	-0,139	0,116	-0,200	0,177						
b_1	0,391	20,550	1,621E-07	7,106	8,954	6,662	9,397						

Tabela 6.7: Tabela de resíduos do fragmento 182,19/91,06 daL-tirosina

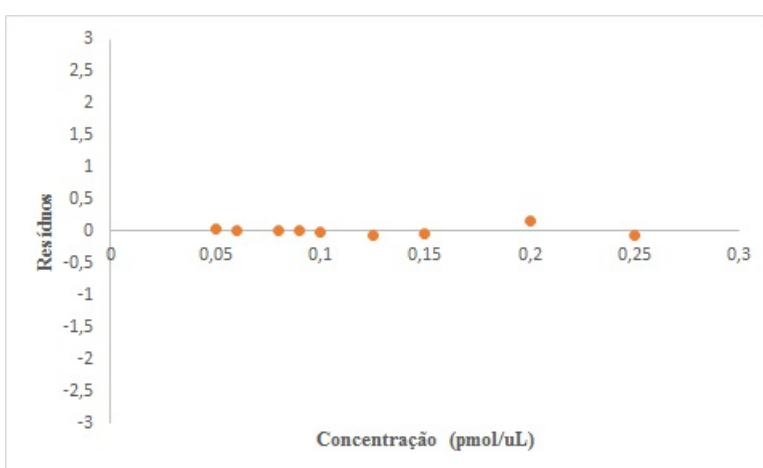
	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Concentração (μM)	Resíduos	Resíduos	Resíduos
0,05	0,024	-0,017	0,029
0,06	-0,005	0,017	0,008
0,08	-0,007	-0,076	-0,004
0,09	0,013	-0,049	-0,002
0,10	-0,039	-0,01	-0,02
0,125	0,037	0,104	-0,055
0,15	-0,035	0,095	-0,047
0,20	0,003	-0,002	0,162
0,25	0,01	-0,062	-0,072



(a) Gráficos dos resíduos *versus* concentração do dia 1



(b) Gráficos dos resíduos *versus* concentração do dia 2



(c) Gráficos dos resíduos *versus* concentração do dia 3

Figura 6.3: Gráficos dos resíduos *versus* concentração do fragmento 182,19/91,06 da L-tirosina , referentes à tabela 6.7

Tabela 6.8: Tabela da resultados da ANOVA para os 3 dias do fragmento 182,19/136,18 da L-tirosina. Estão apresentados na tabela da ANOVA valores relativamente à soma dos quadrados (SQ), graus de liberdade (GL), média quadrática (MQ) e b_0 e b_1 representam a ordenada na origem e o declive, respectivamente.

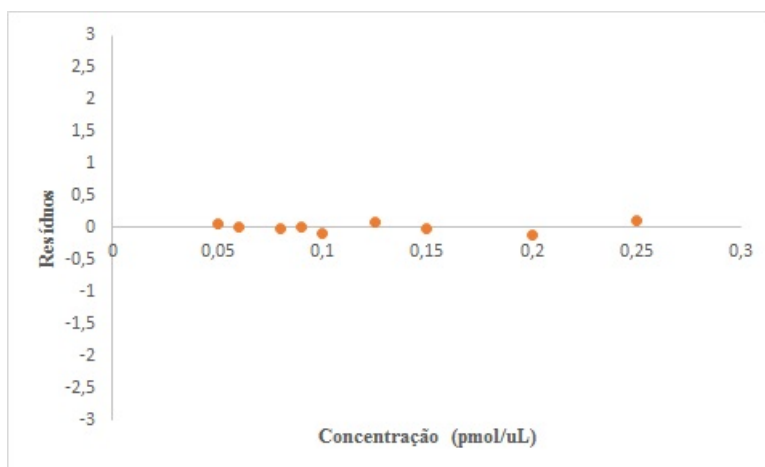
Dia 1										
ANOVA										
Fonte de variação	SS	df	SQ	GL	MQ	Fcrit				
Regressão	7,199	1	7,199	1209,902	4,21E-09	5,592				
Residual	0,042	7	0,006							
Total	7,241	8								
	Erro Padrão	tcal	p-value	< 95%	> 95%	< 99%	> 99%			
b_0	0,056	2,094	0,074512543	-0,015	0,252	-0,079	0,316			
b_1	0,409	34,784	4,21E-09	13,262	15,197	12,798	15,661			

Dia 2										
ANOVA										
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Fcal	Fsignif	Fcrit				
Regressão	5,583	1	5,583	669,612	3,29E-08	5,592				
Residual	0,058	7	0,008							
Total	5,642	8								
	Erro Padrão	tcal	p-value	< 95%	> 95%	< 99%	> 99%			
b_0	0,067	2,676	0,032	0,0208	0,337	-0,055	0,413			
b_1	0,484	25,877	3,29E-08	11,386	13,676	10,837	14,226			

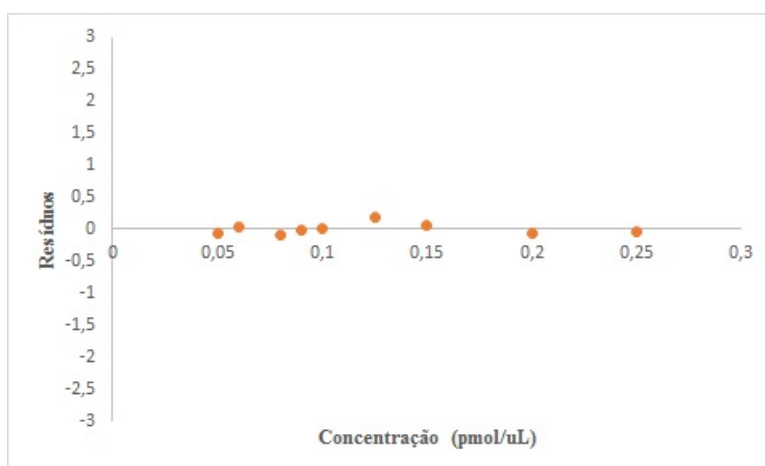
Dia 3										
ANOVA										
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Fcal	Fsignif	Fcrit				
Regressão	6,145	1	6,145	1145,886	5,09E-09	5,592				
Residual	0,038	7	0,005							
Total	6,183	8								
	Erro Padrão	tcal	p-value	< 95%	> 95%	< 99%	> 99%			
b_0	0,054	0,802	0,449	-0,084	0,170	-0,145	0,230			
b_1	0,388	33,851	5,09E-09	12,229	14,065	11,788	14,506			

Tabela 6.9: Tabela de resíduos do fragmento 182,19/136,18 da L-tirosina

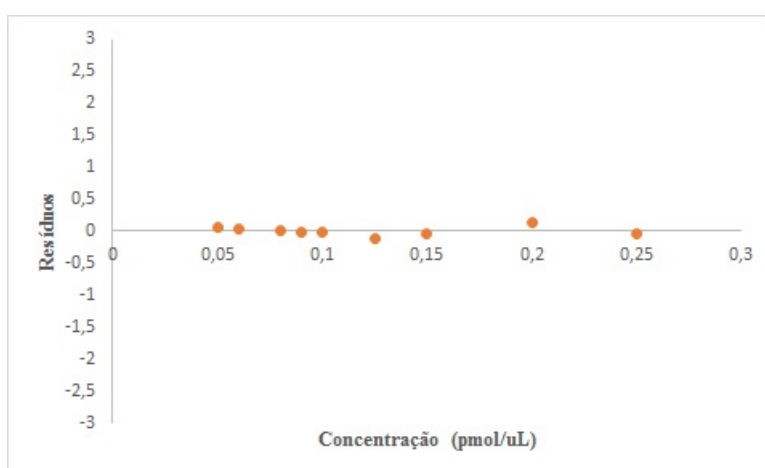
	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Concentração (μM)	Resíduos	Resíduos	Resíduos
0,05	0,049	-0,07	0,054
0,06	0,009	0,021	0,024
0,08	-0,015	-0,086	0,012
0,09	0,016	-0,023	-0,007
0,10	-0,083	0,019	-0,028
0,125	0,073	0,183	-0,11
0,15	-0,016	0,066	-0,048
0,20	-0,129	-0,077	0,134
0,25	0,097	-0,032	-0,03



(a) Gráfico dos resíduos *versus* concentração do dia 1



(b) Gráficos dos resíduos *versus* concentração do fragmento do dia 2



(c) Gráficos dos resíduos *versus* concentração do dia 3

Figura 6.4: Gráficos dos resíduos *versus* concentração do fragmento 182,19/136,18 da L-tirosina, correspondentes aos valores da tabela 6.9

Tabela 6.10: Tabela da resultados da ANOVA para os 3 dias do fragmento 182,19/165,13 da L-tirosina. Estão apresentados na tabela da ANOVA valores relativamente à soma dos quadrados (SQ), graus de liberdade (GL), média quadrática (MQ) e b_0 e b_1 representam a ordenada na origem e o declive, respectivamente.

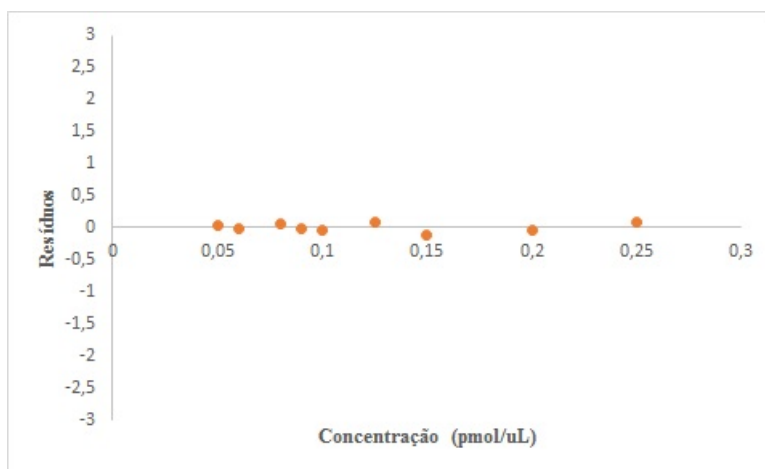
Dia 1													
ANOVA													
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Fcal	Fsignif	Fcrit	Erro Padrão	tcal	p-value	< 95%	> 95%	< 99%	> 99%
Regressão	7,035	1	7,035	1408,993	2,48E-09	5,592	0,052	2,143	0,069	-0,012	0,233	-0,070	0,292
Residual	0,035	7	0,005				0,375	37,537	2,48E-09	13,180	14,952	12,755	15,377
Total	7,070	8											
b_0													
b_1													

Dia 2													
ANOVA													
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Fcal	Fsignif	Fcrit	Erro Padrão	tcal	p-value	< 95%	> 95%	< 99%	> 99%
Regressão	5,868	1	5,868	1498,367	2,00E-09	5,592	0,027	7	0,004				
Residual	0,027	7	0,004				5,895	8					
Total	5,895	8											
b_0	0,046	2,612	0,035	0,011	0,228	-0,041	0,280						
b_1	0,332	38,709	2,00E-09	12,062	13,632	11,690	14,008						

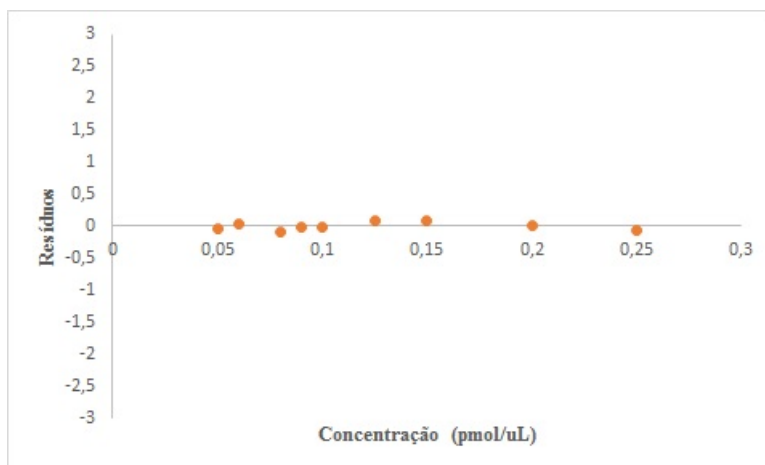
Dia 3													
ANOVA													
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Fcal	Fsignif	Fcrit	Erro Padrão	tcal	p-value	< 95%	> 95%	< 99%	> 99%
Regressão	6,180	1	6,176	722,350	2,53E-08	5,592	0,056	7	0,009				
Residual	0,056	7	0,009				6,236	8					
Total	6,236	8											
b_0	0,068	0,784	0,459				0,290						
b_1	0,490	26,877	2,53E-08	12,020	14,340	11,464	14,896						

Tabela 6.11: Tabela de resíduos do fragmento 182,19/165,13 da L-tirosina

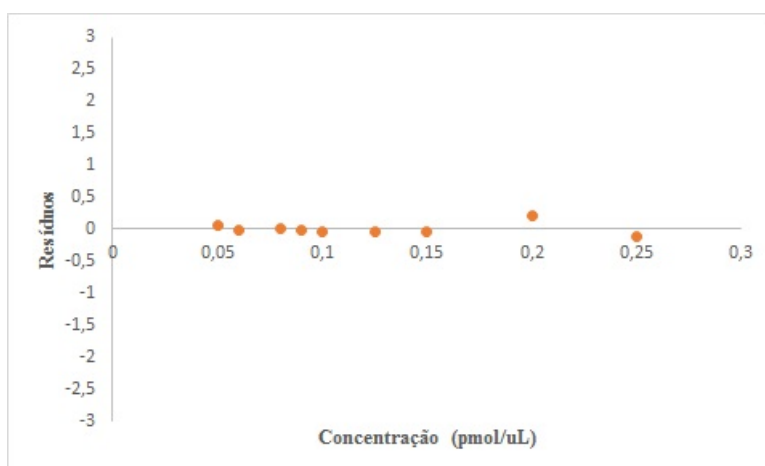
	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Concentração (μM)	Resíduos	Resíduos	Resíduos
0,05	0,032	-0,037	0,049
0,06	-0,008	0,036	-0,019
0,08	0,05	-0,08	0,005
0,09	-0,018	-0,018	-0,022
0,10	-0,034	-0,017	-0,032
0,125	0,075	0,089	-0,046
0,15	-0,123	0,083	-0,032
0,20	-0,053	0	0,203
0,25	0,078	-0,056	-0,106



(a) Gráficos dos resíduos *versus* concentração do dia 1



(b) Gráficos dos resíduos *versus* concentração do dia 2



(c) Gráficos dos resíduos *versus* concentração do dia 3

Figura 6.5: Gráficos dos resíduos *versus* concentração do fragmento 182,19/165,13 da L-tirosina, referentes à tabela 6.11

Mínimos quadrados ponderados

Das possibilidades para a escolha do modelo do factor de ponderação, o escolhido será aquele que apresente o menor valor $\sum \%RE$. Com a tabela 6.12, observa-se que os 3 fragmentos da L-tirosina são concordantes quanto ao modelo a aplicar, ou seja, será o modelo 5 ($\frac{1}{y^2}$) que expressa a melhor ajuste das curvas de calibração da tirosina, pois apresenta menor $\sum \%RE$.

Tabela 6.12: Resultados dos mínimos quadrados ponderados. Na tabelas está presente a soma da percentagem do erro residual ($\sum \%RE$) e também da média do R^2 através dos mínimos quadrados ponderados e ordinários.

Fragmento		Tirosina					
		182,2/91,1		182,2/136,2		182,2/165,1	
		$\sum \%RE$	$\overline{R^2}$	$\sum \%RE$	$\overline{R^2}$	$\sum \%RE$	$\overline{R^2}$
Modelo 1	$\frac{1}{x^0}$	110,057	0,988	103,93	0,993	90,565	0,994
Modelo 2	$\frac{1}{x}$	106,167	0,988	95,565	0,992	88,619	0,994
Modelo 3	$\frac{1}{y}$	104,612	0,987	93,565	0,99	86,884	0,992
Modelo 4	$\frac{1}{x^2}$	103,986	0,989	95,681	0,992	87,702	0,994
Modelo 5	$\frac{1}{y^2}$	101,51	0,987	92,748	0,991	85,006	0,993
Modelo 6	$\frac{1}{\sqrt{x}}$	107,836	0,989	99,249	0,992	89,478	0,994
Modelo 7	$\frac{1}{\sqrt{y}}$	106,752	0,989	99,509	0,992	89,015	0,994

Limiares analíticos

Para o caso da L-tirosina, ajustando os 5 valores com um polinómio de primeiro grau obteve-se as estimativas de $b_0 = 9,61 \times 10^3$ ($1,36 \times 10^2$) e $b_1 = 3,69 \times 10^2$ ($1,74 \times 10^3$)¹. Em termos de incerteza percentual das estimativas, ambos valores são elevados (36,9% e 18,1% respectivamente) o que levanta sérias suspeitas sobre as estimativas obtidas. Efectuando o respectivo teste t-student para confrontar as estimativas de b_0 e b_1 com o valor nulo (hipótese nula), obteve-se os valores de prova 0,073 e 0,012. Atendendo a que a convenção estabelecida para os testes estatísticos impõem que valores de prova superiores a 0,05 são indicativo da validade da hipótese nula enquanto que valores inferiores a 0,01 sugerem a sua rejeição, somos obrigados a assumir que o parâmetro b_0 (ordenada na origem) não tem significado estatístico e que existem erros graves na avaliação de b_1 (declive). Se relembrarmos a figura 4.5 e tabela 4.8, verifica-se que o valor S/N referente ao teor $0,09 \mu M$ se encontra desviado (para baixo) em relação à restante tendência. Efectuando novo ajuste sem este valor, obteve-se as estimativas $b_0 = 3,31 \times 10^4$ ($1,38 \times 10^3$) e $b_1 = 1,03 \times 10^2$ ($1,38 \times 10^2$). De novo a ordenada na origem continua a acusar uma incerteza muito elevada (41,6%)

¹As estimativas entre parêntesis correspondem ao respectivo erro padrão do parâmetro.

enquanto que o declive está agora um pouco melhor definido (erro relativo de apenas 17,8%). O teste estatístico para a verificação do significado estatístico dos parâmetros conduziu aos valores de prova 0,138 e 0,03, respectivamente – mais uma vez se conclui que a ordenada na origem não deve ser considerada, apenas o declive. Efectuando agora o estudo da avaliação do sinal apenas em dependência exclusiva com um parâmetro (o declive), obteve-se as estimativas $b_1 = 1,42 \times 10^4 (6,64 \times 10^2)$ e $b_1 = 1,46 \times 10^4 (7,58 \times 10^2)$ ao ajustar os $N = 5$ e os $N = 4$ valores, como na tentativa anterior. Em ambos os casos o parâmetro estimado tem valor estatístico já que o respectivo valor de prova deu 0.000 (probabilidade nula de o parâmetro estimado ser nulo). Estes modelos conduzem os mesmos valores 0,23 nM para o limite de detecção e 0,70 e 0,68 nM para a quantificação, respectivamente. Pode-se então definir os limiares analíticos como sendo 0,70 nM (LQ) e 0,60 nM (LQ) para a L-tirosina.

Precisão

Tabela 6.13: Resultados da precisão e exactidão para os 3 fragmentos da L-tirosina, relativo aos calibradores de concentração alta, média e baixa.

Fragmento	Concentração nominal (μM)	Repetibilidade (%CV)	Precisão intermédia (%CV)
	0,055	18,022	35,94
182,19/91,06	0,10	4,591	4,477
	0,175	1,794	2,783
	0,055	3,028	3,545
182,19/136,18	0,10	20,440	35,188
	0,175	2,477	4,114
	0,055	1,733	2,7
182,19/165,13	0,10	18,480	36,629
	0,175	1,733	3,186

A L-tirosina tendo em conta os critérios de avaliação não existem quaisquer fragmentos com boa precisão (tabela 6.13) na concentração de 0,10 μM para o fragmento m/z 182,19/136,18 e 182,19/165,13, o fragmento m/z 182,19/91,06 demonstra o mesmo na concentração 0,055 μM .

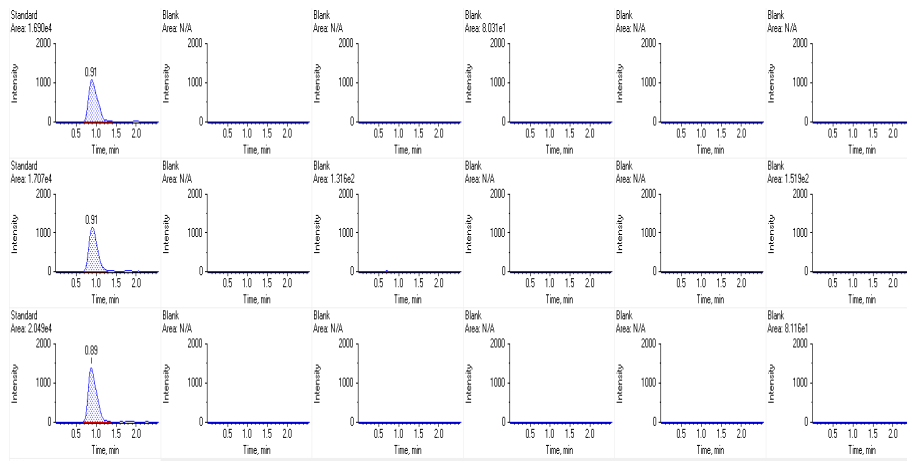
Exactidão

Tabela 6.14: Resultados da exactidão para os 3 fragmentos da L-tirosina, relativo aos calibradores de concentração alta, média e baixa.

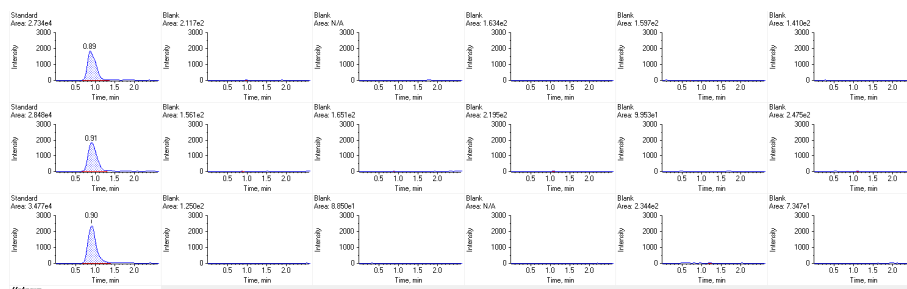
Fragmento	Concentração nominal (μM)	Exactidão (%RE)
	0,055	7,366
182,19/91,06	0,10	-1,729
	0,175	-1,077
	0,055	78,283
182,19/136,18	0,10	-42,541
	0,175	3,249
	0,055	77,734
182,19/165,13	0,10	-40,341
	0,175	0,414

Apenas um fragmento da L-tirosina, m/z 182,19/91,06 apresenta boa exactidão, tendo em conta os resultados apresentados por este fragmento na tabela 6.14 cumprir os critérios de avaliação.

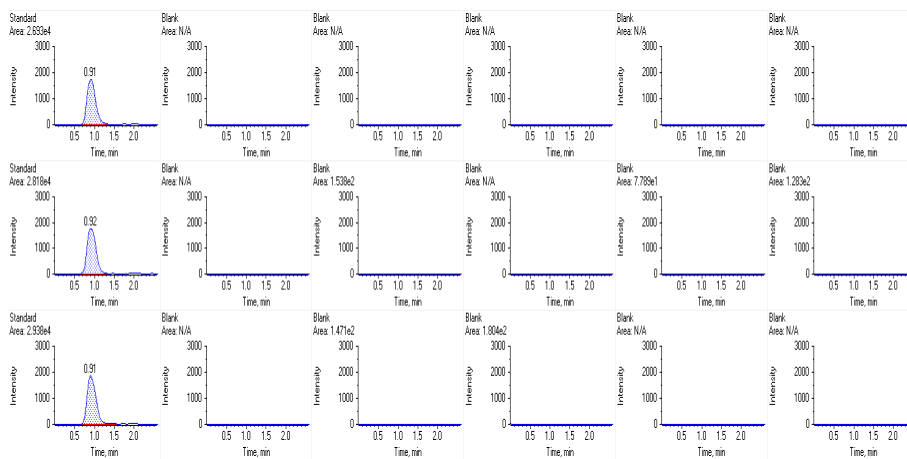
Carry-over



(a) Transição 182,19/91,06



(b) Transição 182,19/136,18



(c) Transição 182,19/165,13

Figura 6.6: Cromatogramas representando a injeção das 3 réplicas do calibrador mais alto da L-tirosina, seguido dos 5 brancos.

Não ocorre efeito de carry-over como demonstrado pelos cromatogramas (figura 6.6)

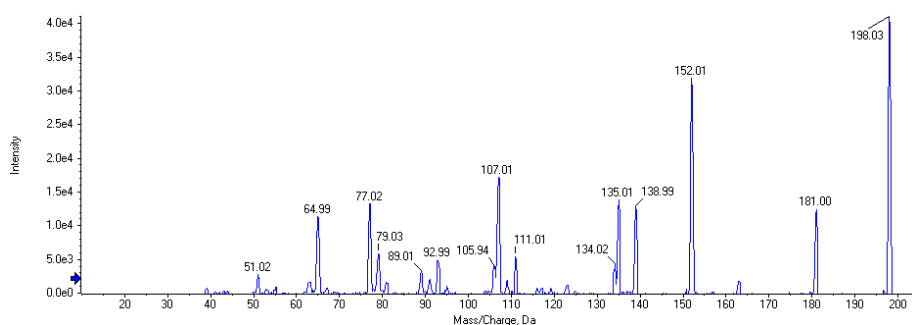
Capítulo 7

Anexo II - L-DOPA

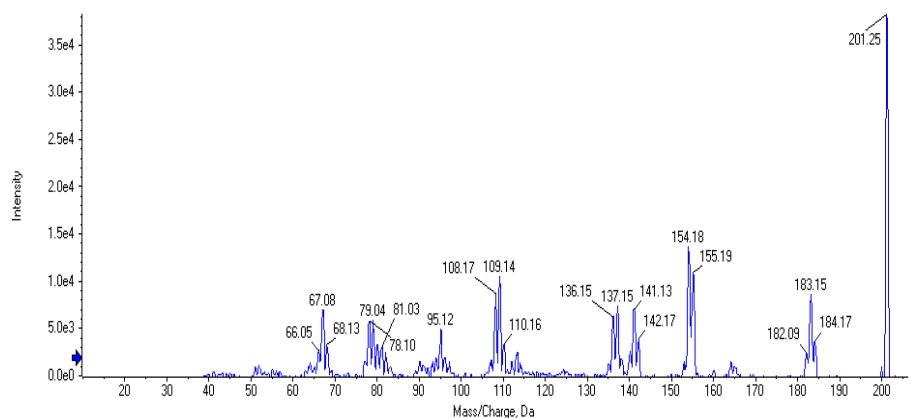
Resultados obtidos para a L-DOPA, referentes aos fragmentos 135,01, 152,01 e 181,00.

Identificação e selectividade

O analito L-DOPA, apresenta nas figuras 7.1a e 7.1b os espectros de fragmentação da L-DOPA e do padrão interno, respectivamente. Os espectros de fragmentação são bastantes similares sendo o sinais cromatográfico mais intenso para a L-DOPA de m/z 198,03 e para o padrão interno um m/z de 201,25, representando o analito intacto. Os fragmentos da L-DOPA 135,01, 152,01 e 181 serão os fragmentos a monitorizar pois são os que possuem maior intensidade e sinais cromatográficos do padrão interno 137,15, 154,18 e 183,15.



(a) Espectro de fragmentação da L-DOPA. Os fragmentos obtidos por no ESI no modo de ionização positivo variando a energia de colisão de 10V a 75V, para infusão de uma solução 3.04 mM de L-DOPA.



(b) Espectro de fragmentação da L-DOPA- (fenil-D3). Os fragmentos obtidos por no ESI no modo de ionização positivo variando a energia de colisão de 5V a 90V, para infusão de uma solução 3,00 mM d2 L-DOPA- (fenil-D3).

Figura 7.1: Espectros de fragmentação da L-DOPA (7.1a) e da L-DOPA- (fenil-D3) (7.1b).

Calibração

Representatividade

Na tabela 7.1, estão representados os valores de quantificação do fragmento m/z 198/135,01.

Tabela 7.1: Estudo da gama de resposta analítica para quantificação da L-DOPA através da detecção do fragmento $m/z = 135,01$.

[L-DOPA] (μM)	Dia 1		Dia 2		Dia 3	
	A/A_{IS}	S/N	A/A_{IS}	S/N	A/A_{IS}	S/N
0,11	0,2717	808,2	0,2793	927,5	0,3009	770,2
	0,2757	811,9	0,2783	945,9	0,3113	794,1
	0,2926	874,4	0,2820	980,8	0,3166	776,6
0,20	0,5365	1484,8	0,5100	1547,9	0,5833	1368,5
	0,5046	1421,4	0,5410	1515,8	0,5797	1399,5
	0,4927	1470,0	0,4903	1148,0	0,5998	1498,8
0,35	0,9133	2101,7	0,8580	2025,7	0,9579	2038,1
	0,9554	2186,4	0,9168	1792,0	0,9649	1747,4
	0,9404	1846,7	0,9311	2819,2	1,0030	1888,4

Ao nível da menor concentração (0,110 μM) existe um efeito inter-diário, ainda que baixo, detectável ao nível desta concentração. Com base nesta informação, obtida nos três dias de trabalho, a estimativa puramente aleatória dá $s_{pe} = 0,008$ enquanto que a estimativa da incerteza interdiária dá $s_i = 0,02$. Removendo o terceiro dia deixa de ocorrer o efeito inter-diário e a estimativa puramente aleatória mantém o seu valor.

Passando ao nível de concentração intermédia (0,200 μM), as estimativas da dispersão interdiária $s_i = 0,051$ e a puramente aleatória $s_{pe} = 0,021$. Como na concentração anterior, o efeito inter-diário ($s_i=0,40$) diminui ao eliminar os resultados do terceiro dia e a puramente aleatória diminui ($s_{pe} = 0,029$). Analisando agora o nível superior de concentração (0,35 μM), continua a verificar-se um efeito inter-diário. A estimativa da dispersão interdiária deu $s_i = 0,040$ e a puramente aleatória $s_{pe} = 0,029$. O efeito inter-diário ao eliminar o terceiro dia não deixa de existir mas ao eliminar o terceiro dia, não se deixa de o observar o efeito inter-diário, mas verifica-se uma diminuição deste como se pode comprovar pela dispersão interdiária interdiária $s_i = 0,028$. Relativamente à puramente aleatoria, observa-se um aumento puramente aleatória aumentou $s_{pe} = 0,031$. É claramente observado que na gama de 0,11 a 0,35 μM não existe homogeneidade da variância ($s_{pe} = 0.008$ e $s_{pe} = 0.029$). Assim sendo, estamos perante um caso de heterogeneidade da variância e, como tal é necessário utilizar métodos de regressão linear ponderada para efectuar estimativas paramétricas quanto à calibração e quanto à quantificação. Assumindo como hipótese nula a similaridade das variâncias, o valor de $TV = 15,02$ é superior ao respectivo valor crítico previsto pela distribuição bilateral de Fisher ($F_{0.01(6,6)}^b = 11.07$) indicando que a hipótese nula não é válida Assim sendo estamos perante um caso de heterogeneidade da variância e, como tal é necessário utilizar métodos de regressão linear ponderada para efectuar estimativas paramétricas quanto à calibração e quanto à quantificação.

Para a quantificação do fragmento com m/z 198/152,01, os valores respectivos estão apresentados na tabela 7.2.

Tabela 7.2: Estudo da gama de resposta analítica para quantificação da L-DOPA através da detecção do fragmento m/z = 152,01.

[L-DOPA] (μM)	Dia 1		Dia 2		Dia 3	
	A/A _{IS}	S/N	A/A _{IS}	S/N	A/A _{IS}	S/N
0,11	0,9764	1 222,3	0,9036	1 151,3	1,0260	842,3
	0,9407	1 275,1	0,9371	1 240,2	1,0850	863,5
	0,9549	1 129,5	0,9349	1 129,7	1,0390	801,0
0,20	1,7900	1 815,9	1,7100	1 652,4	1,9690	1 370,8
	1,7310	1 880,0	1,7680	1 224,0	1,8790	1 169,8
	1,6840	2 055,2	1,7000	1 467,9	1,9040	1 320,7
0,35	3,1440	2 368,6	3,0000	2 246,6	3,2900	1 691,7
	3,1140	3 147,2	3,1760	2 211,9	3,2210	1 449,6
	3,2930	3 035,0	3,0310	1 976,6	3,3510	1 880,6

Usando a análise ANOVA de factor único, ao nível da concentração mais baixa (0,11 μM), verifica-se a presença de um efeito inter-diário ($TV = 23,11 \gg 10,92 = F_{0,01(6,6)}^b$). A precisão intermédia estimada dá $s_i = 0,078$ e a puramente aleatória $s_{pe} = 0,023$. Com a remoção dos valores do terceiro dia, deixou de se observar o efeito do factor dia ($TV < F_{crit}$) e a estimativa aleatória diminuiu ($s_{pe} = 0,035$), assim como a incerteza interdiária ($s_i = 0,025$).

Ao nível de concentração intermédia (0,200 μM), verifica-se também o efeito inter-diário. As estimativas obtidas apontam para $s_i = 0,128$ e $s_{pe} = 0,046$. Ao remover os valores do terceiro dia o efeito inter-diário desaparece mas a incerteza aleatória mantém-se praticamente inalterada $s_{pe} = 0,046$.

Passando agora ao nível de concentração superior (0,35 μM), obtém-se um efeito inter-diário com uma dispersão da ordem de $s_i = 0,119$ e uma dispersão aleatória da ordem de $s_{pe} = 0,86$. A remoção dos valores do terceiro dia anula o efeito inter-diário sobre a dispersão final, fazendo com que o efeito inter-diário diminua ($s_i = 0,104$). Assumindo como hipótese nula a similaridade das variâncias (da gama de concentração de 0,11 a 0,35 μM), o valor de $TV = 27,85$ é superior ao respectivo valor crítico previsto pela distribuição bilateral de Fisher ($F_{0,01(6,6)}^b = 11,07$) o que indica que a hipótese nula não é válida. Assim sendo estamos perante um caso de heterogeneidade da variância e, como tal é necessário utilizar métodos de regressão linear ponderada para efectuar estimativas paramétricas quanto à calibração e quanto à quantificação.

Os valores de quantificação para o fragmento da L-DOPA, m/z 198/181, são apresentados na tabela 7.3.

Tabela 7.3: Estudo da gama de resposta analítica para quantificação da L-DOPA através da detecção do fragmento $m/z = 152,01$.

[L-DOPA] (μM)	Dia 1		Dia 2		Dia 3	
	A/A_{IS}	S/N	A/A_{IS}	S/N	A/A_{IS}	S/N
0,11	0,6750	1 176,5	0,6486	1 009,8	0,7147	1 054,6
	0,6648	966,8	0,6725	1 071,2	0,7578	1 060,5
	0,6976	1 112,7	0,6579	1 009,3	0,7314	917,1
0,20	1,2890	1 202,5	1,2130	1 649,0	1,3560	1 461,8
	1,1600	1 531,8	1,2030	1 136,5	1,3150	1 258,5
	1,1860	1 499,1	1,1750	1 316,0	1,3520	1 471,2
0,35	2,1510	2 569,4	2,0990	2 304,5	2,3310	1 956,0
	2,1530	2 384,7	2,1530	2 117,9	2,3380	2 202,1
	2,1610	2 222,1	2,1140	2 204,2	2,3590	2 208,4

Ao menor nível de concentração (0,11 μM), através do estudo ANOVA verifica-se que existe um efeito inter-diário ($TV = 15,15 \gg 10,92 = F_{0,01(2,6)}^u$). As contribuições estimadas foram a interdiária $s_i = 0,046$ e a aleatória de $s_{pe} = 0,017$. Ao remover os valores do terceiro dia do conjunto e reprocessando a análise ANOVA verifica-se um menor o efeito inter-diário, pois $TV < F_{crit}$. O mesmo acontece com a estimativa interdiária que decresceu ($s_i = 0,019$).

No nível de concentração intermédio (0,20 μM) a avaliação ANOVA detecta de novo um efeito inter-diário e as estimadas para a inter-diária e puramente aleatória de $s_i = 0,092$ e $s_{pe} = 0,043$. De modo similar, removendo do conjunto de valores original os valores relativos ao terceiro dia de trabalho e reprocessando a análise ANOVA, deixa de se verificar o efeito inter-diário. Contudo a estimativa aleatória aumentou ligeiramente ($s_{pe} = 0,05$).

Já para o nível de concentração superior (0,35 μM) o tratamento ANOVA estima uma valor de teste elevado ($TV = 125,33 \gg 10,92 = F_{0,01(2,6)}^u$) o que indica que, para esta concentração, também se verifica um efeito inter-diário sobre a variabilidade dos resultados. As contribuições agora estimadas para as estimativas interdiária e puramente aleatória são de $s_i = 0,145$ e $s_{pe} = 0,118$. Por remoção do conjunto de valores do terceiro dia de trabalho, a análise ANOVA reprocessada indica que deixa de se verificar um maior efeito inter-diário e os valores das estimadas para a interdiária e puramente aleatória sofrem alterações, $s_i = 0,035$ e $s_{pe} = 0,020$, respectivamente. Assumindo como hipótese nula a similaridade das variâncias (da gama de concentração de 0,11 a 0,35 μM), o valor de $TV = 48,18$ é superior ao respectivo valor crítico previsto pela distribuição bilateral de Fisher ($F_{0,01(6,6)}^b = 11,07$) o que indica que a hipótese nula não é válida. Conclui-se por isso, que estamos perante um caso de heterogeneidade da variância e, como tal é necessário utilizar métodos de regressão linear ponderada para efectuar estimativas paramétricas quanto à calibração e quanto à quantificação.

Teste de Mandel

Tabela 7.4: Teste de Mandel para os fragmentos da L-DOPA

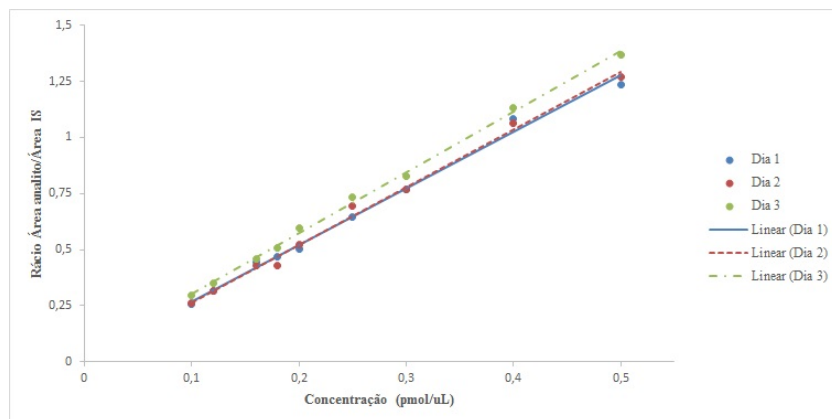
Fragmento 198,03/135,01					
Dia 1		Dia 2		Dia 3	
Teste de Mandel		Teste de Mandel		Teste de Mandel	
ΔSS	9,46E-04	ΔSS	5,96E-04	ΔSS	5,66E-04
TV	1,125	TV	0,828	TV	1,974
$F_{0.01(1,6)}^u$	13,745	$F_{0.01(1,6)}^u$	13,745	$F_{0.01(1,6)}^u$	13,745

Fragmento 198,03/152,01					
Dia 1		Dia 2		Dia 3	
Teste de Mandel		Teste de Mandel		Teste de Mandel	
ΔSS	5,35E-04	ΔSS	2,31E-03	ΔSS	1,35E-03
TV	0,381	TV	0,533	TV	1,117
$F_{0.01(1,6)}^u$	13,745	$F_{0.01(1,6)}^u$	13,745	$F_{0.01(1,6)}^u$	13,745

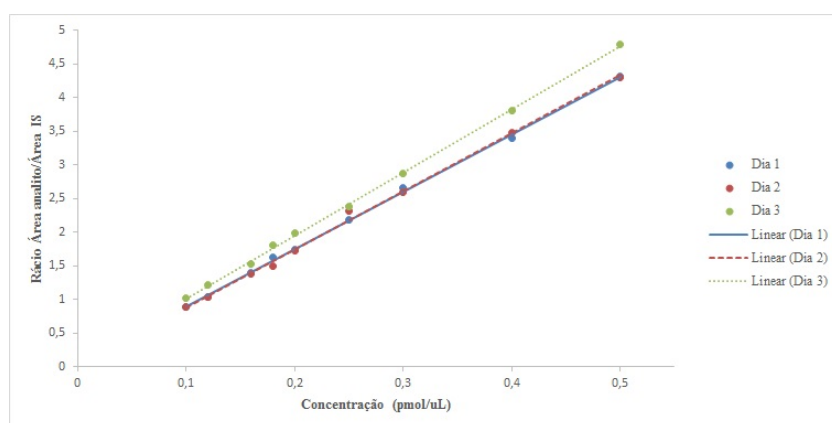
Fragmento 198,03/181,00					
Dia 1		Dia 2		Dia 3	
Teste de Mandel		Teste de Mandel		Teste de Mandel	
ΔSS	5,28E-04	ΔSS	2,48E-03	ΔSS	2,77E-04
TV	0,497	TV	0,785	TV	0,528
$F_{0.01(1,6)}^u$	13,745	$F_{0.01(1,6)}^u$	13,745	$F_{0.01(1,6)}^u$	13,745

Como demonstrado pela tabela 7.4, os fragmentos da L-DOPA não apresentam variabilidade pois TV é sempre menor que o valor de F, como tal não existe variabilidade, podendo-se afirmar também o seguimento de um comportamento linear por parte da gama de trabalho estabelecida.

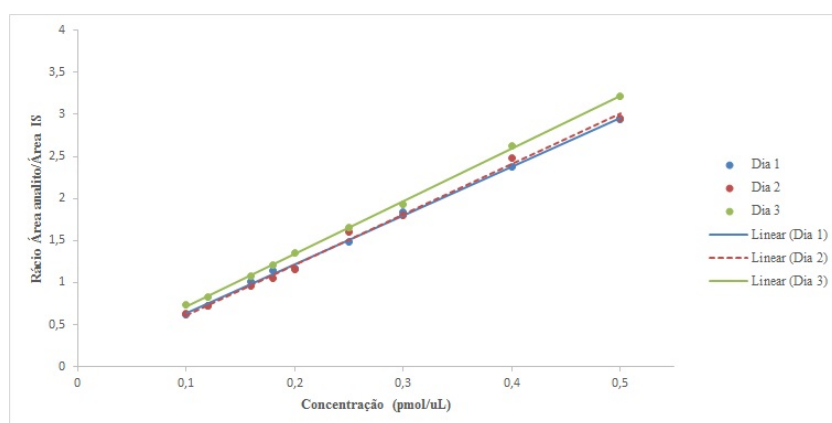
Curvas de calibração



(a) Curva de calibração para o fragmento 198,02/135,01



(b) Curva de calibração para o fragmento 198,03/152,01



(c) Curva de calibração do fragmento 198,03/181,00

Figura 7.2: Curva de calibração dos 3 fragmentos da L-DOPA em 3 dias diferentes

Análise semelhante à da L-tirosina é preferida para a L-DOPA, onde é perfeitamente notória a existência de linearidade e o cumprimento dos critérios de aceitação ($R^2 > 0,99$; tabela 7.5) durante os 3 dias. A linearidade também é comprovada e assegurada pela tabela da ANOVA, para cada fragmento (tabela 7.6, 7.8, 7.10) onde se verifica $F_{cal} > F_{crit}$ e os gráficos dos resíduos *versus* concentração, estão em redor do eixo dos xx. Em suma, os 3 fragmentos da L-DOPA apresentam uma linearidade comprovada pois cumpre os critérios de aceitação exigidos.

Tabela 7.5: Resultados da L-DOPA para o modelo de regressão linear simples. Os resultados foram extraídos das curvas de calibração 7.2a, 7.2b e 7.2c durante os 3 dias. A gama de trabalho compreende os valores de 0,1-0,5 μM .

Dia 1					
Analito	Transição	Curva de calibração	R^2	Intervalo de confiança 95%	
				< 95%	> 95%
L-DOPA	198,03/135,01	$y = 2,5158x + 0,017$	0,996	-0,034	0,068
	198,03/152,01	$y = 8,5223x + 0,0459$	0,999	-0,016	0,108
	198,03/181,00	$y = 5,8096x + 0,0526$	0,999	-0,002	0,107

Dia 2					
Analito	Transição	Curva de calibração	R^2	Intervalo de confiança 95%	
				< 95%	> 95%
L-DOPA	198,03/135,01	$y = 2,5671x + 0,0081$	0,997	-0,038	0,054
	198,03/152,01	$y = 8,6371x + 0,0158$	0,998	-0,094	0,126
	198,03/181	$y = 6,0143x + 0,0055$	0,998	-0,09	0,101

Dia 3					
Analito	Transição	Curva de calibração	R^2	Intervalo de confiança 95%	
				< 95%	> 95%
L-DOPA	198,03/135,01	$y = 2,701x + 0,0329$	0,999	0,002	0,064
	198,03/152,01	$y = 9,3531x + 0,0827$	0,999	0,022	0,143
	198,03/181	$y = 6,2689x + 0,0852$	0,999	0,047	0,123

Tabela 7.6: Tabela da resultados da ANOVA para os 3 dias do fragmento 198,03/135,01 da L-DOPA. Estão apresentados na tabela da ANOVA valores relativamente à soma dos quadrados (SQ), graus de liberdade (GL), média quadrática (MQ) e b_0 e b_1 representam a ordenada na origem e o declive, respectivamente.

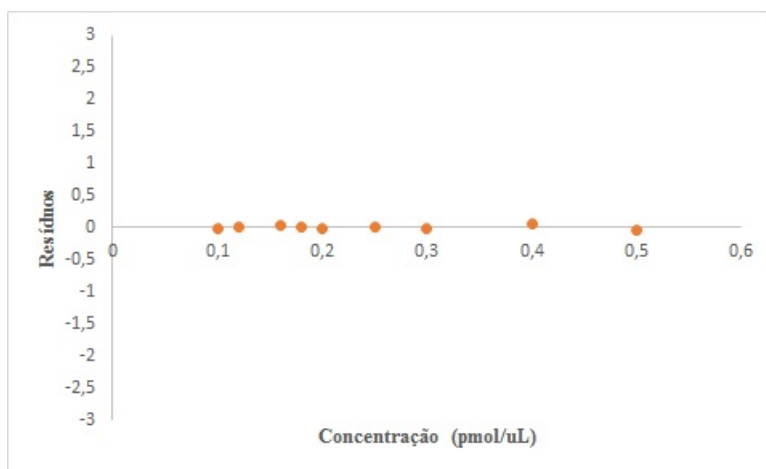
Dia 1											
ANOVA											
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Fcal	Fsignif	Fcrit					
Regressão	0,900	1	0,900	1051,587	6,86E-09	5,592					
Residual	0,006	7	0,0001								
Total	0,906	8									
Erro Padrão		tcal	p-value	< 95%	> 95%	< 99%	> 99%				
b_0	0,021	0,795	0,453	-0,034	0,068	-0,058	0,092				
b_1	0,078	32,428	6,86E-09	2,332	2,699	2,244	2,787				

Dia 2											
ANOVA											
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Fcal	Fsignif	Fcrit					
Regressão	0,937	1	0,937	1334,697	2,99E-09	5,591					
Residual	0,005	7	0,0007								
Total	0,942	8									
Erro Padrão		tcal	p-value	< 95%	> 95%	< 99%	> 99%				
b_0	0,019	0,420	0,686	-0,038	0,054	-0,060	0,080				
b_1	0,0703	36,533	2,99E-09	2,401	2,733	2,321	2,813				

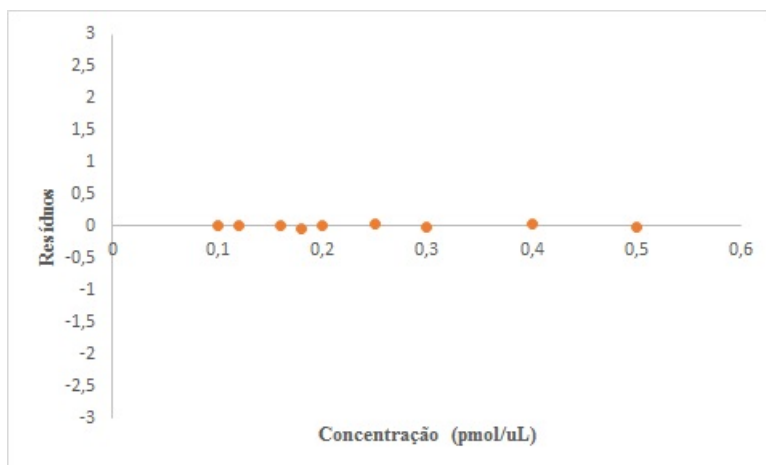
Dia 3											
ANOVA											
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Fcal	Fsignif	Fcrit					
Regressão	1,038	1	1,038	3177,075	1,45E-10	5,592					
Residual	0,002	7	0,0003								
Total	1,040	8									
Erro Padrão		tcal	p-value	< 95%	> 95%	< 99%	> 99%				
b_0	0,013	2,488	0,042	0,002	0,064	-0,013	0,079				
b_1	0,048	56,366	1,45E-10	2,588	2,814	2,533	2,869				

Tabela 7.7: Tabela de resíduos do fragmento 198,03/135,01 da L-DOPA

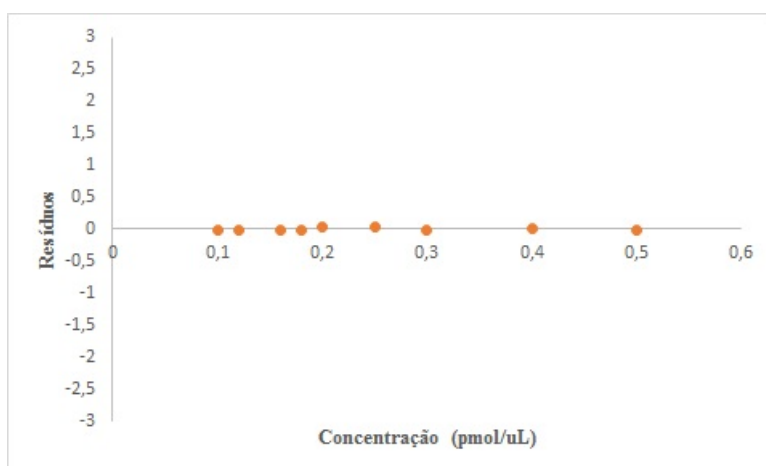
	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Concentração (μM)	Resíduos	Resíduos	Resíduos
0,10	-0,012	-0,002	-0,007
0,12	-0,004	-0,001	-0,008
0,16	0,024	0,01	-0,007
0,18	0	-0,04	-0,011
0,20	-0,02	-0,002	0,024
0,25	-0,002	0,043	0,025
0,30	-0,005	-0,012	-0,016
0,40	0,058	0,026	0,016
0,50	-0,039	-0,023	-0,016



(a) Gráficos dos resíduos *versus* concentração do dia 1



(b) Gráficos dos resíduos *versus* concentração do dia 2



(c) Gráficos dos resíduos *versus* concentração do dia 3

Figura 7.3: Gráficos dos resíduos *versus* concentração do fragmento 198,03/135,01 da L-DOPA, referentes à tabela 7.7

Tabela 7.8: Tabela da resultados da ANOVA para os 3 dias do fragmento 198,03/152,01 da L-DOPA. Estão apresentados na tabela da ANOVA valores relativamente à soma dos quadrados (SQ), graus de liberdade (GL), média quadrática (MQ) e b_0 e b_1 representam a ordenada na origem e o declive, respectivamente.

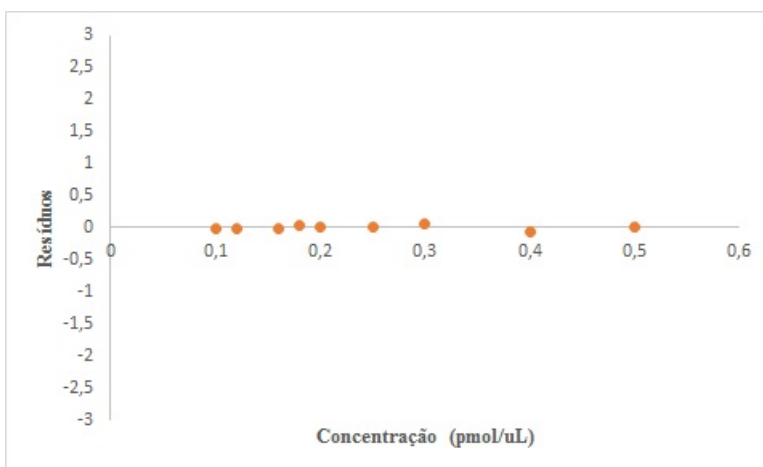
Dia 1											
ANOVA											
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Fcal	Fsignif	Fcrit	Erro Padrão	tcal	p-value	< 95%	> 99%
Regressão	10,329	1	10,329	8067,091	5,59E-12	5,592	0,026	1,753	0,123	-0,016	-0,138
Residual	0,009	7	0,001				0,095	89,817	5,59E-12	8,298	8,190
Total	10,338	8									8,854
b_0											
b_1											

Dia 2											
ANOVA											
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Fcal	Fsignif	Fcrit	Erro Padrão	tcal	p-value	< 95%	> 99%
Regressão	10,610	1	10,610	2617,155	2,86E-10	5,592	0,047	0,340	0,744	-0,094	-0,179
Residual	0,028	7	0,004				0,169	51,158	2,86E-10	8,238	9,046
Total	10,638	8									9,228
b_0											
b_1											

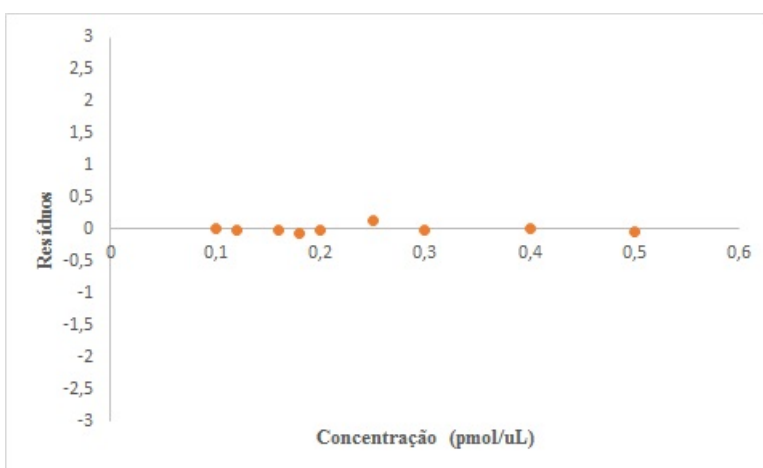
Dia 3											
ANOVA											
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Fcal	Fsignif	Fcrit	Erro Padrão	tcal	p-value	< 95%	> 99%
Regressão	12,441	1	12,442	10115,950	2,53E-12	5,592	0,009	7	0,001		
Residual	0,009	7	0,001				12,450	8			
Total	12,450	8									
b_0											
b_1											

Tabela 7.9: Tabela de resíduos do fragmento 198,03/152,01 da L-DOPA

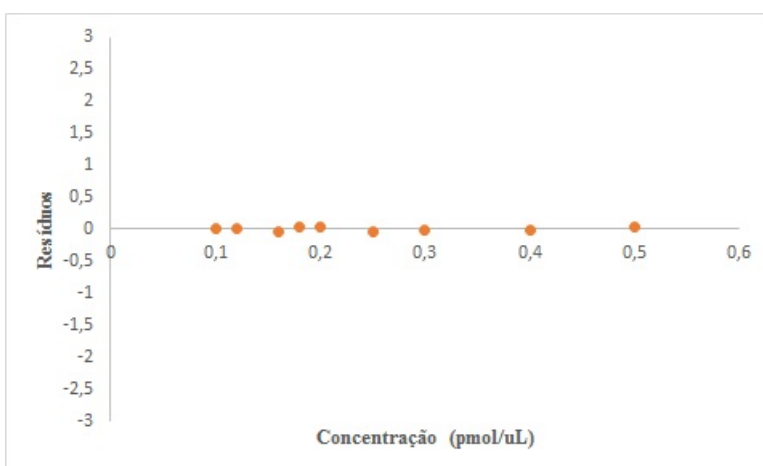
	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Concentração (μM)	Resíduos	Resíduos	Resíduos
0,10	-0,012	0,016	0,009
0,12	-0,026	-0,01	0,018
0,16	-0,009	-0,015	-0,054
0,18	0,041	-0,077	0,037
0,20	-0,004	-0,021	0,036
0,25	0,005	0,142	-0,034
0,30	0,051	-0,015	-0,021
0,40	-0,06	0,012	-0,018
0,50	0,013	-0,031	0,027



(a) Gráficos dos resíduos *versus* concentração do dia 1



(b) Gráficos dos resíduos *versus* concentração do dia 2



(c) Gráficos dos resíduos *versus* concentração do dia 3

Figura 7.4: Gráficos dos resíduos *versus* concentração do fragmento 198,03/152,01 da L-DOPA, referentes à tabela 7.9

Tabela 7.10: Tabela da resultados da ANOVA para os 3 dias do fragmento 198,03/181 da L-DOPA. Estão apresentados na tabela da ANOVA valores relativamente à soma dos quadrados (SQ), graus de liberdade (GL), média quadrática (MQ) $e b_0$ e b_1 representam a ordenada na origem e o declive, respectivamente.

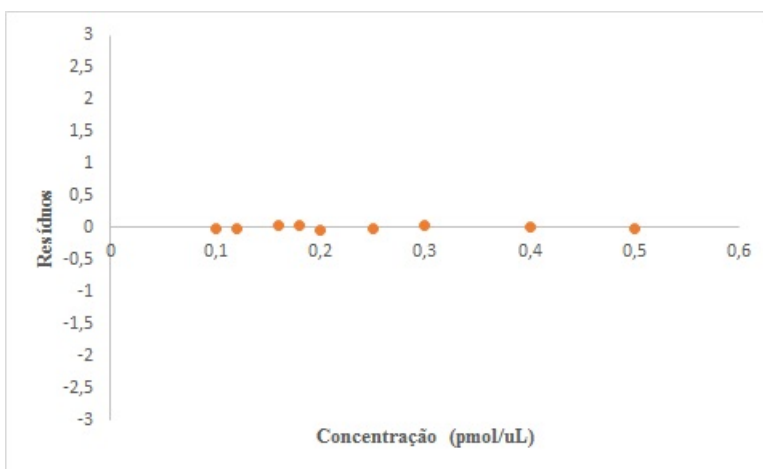
Dia 1											
ANOVA											
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Fcal	Fsignif	Fcrit	Erro Padrão	tcal	p-value	< 95%	> 99%
Regressão	4,800	1	4,800	4862,430	3,28E-11	5,592	0,023	2,290	0,056	-0,002	0,110
Residual	0,007	7	0,001				0,083	69,731	3,28E-11	5,613	5,518
Total	4,807	8									6,101
b_0											0,133
b_1											6,007

Dia 2											
ANOVA											
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Fcal	Fsignif	Fcrit	Erro Padrão	tcal	p-value	< 95%	> 99%
Regressão	5,144	1	5,144	1681,241	1,34E-09	5,591	0,021	7	0,003		
Residual	0,021	7	0,003				5,165	8			
Total	5,165	8									
b_0	0,040	0,137	0,895	-0,090	0,101	-0,136	0,147	41,003	1,34E-09	5,667	6,361
b_1	0,147	41,003	1,34E-09	5,667	6,361	5,501	6,528				

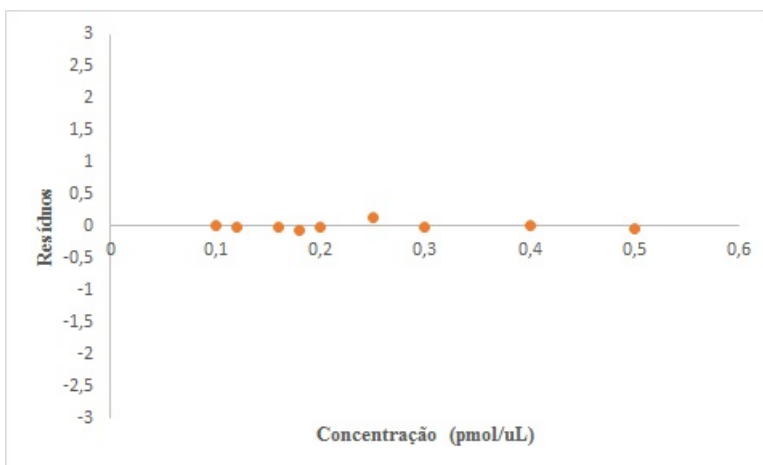
Dia 3											
ANOVA											
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Fcal	Fsignif	Fcrit	Erro Padrão	tcal	p-value	< 95%	> 99%
Regressão	5,589	1	5,589	11441,476	1,65E-12	5,592	0,016	5,271	0,001	0,047	0,123
Residual	0,003	7	0,0005				0,059	106,965	1,65E-12	6,130	6,408
Total	5,592	8									6,474
b_0											0,142
b_1											6,063

Tabela 7.11: Tabela de resíduos do fragmento 198,03/181 da L-DOPA

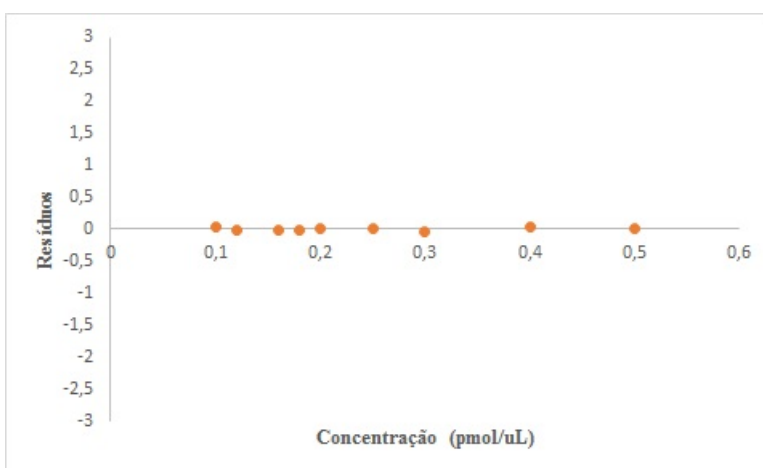
	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Concentração (μM)	Resíduos	Resíduos	Resíduos
0,10	-0,011	0,02	0,025
0,12	-0,024	-0,006	-0,007
0,16	0,031	-0,013	-0,014
0,18	0,039	-0,041	-0,01
0,20	-0,042	-0,054	0,018
0,25	-0,018	0,094	-0,001
0,30	0,039	-0,009	-0,037
0,40	-0,003	0,065	0,028
0,50	-0,011	-0,056	-0,002



(a) Gráficos dos resíduos *versus* concentração do dia 1



(b) Gráficos dos resíduos *versus* concentração do dia 2



(c) Gráficos dos resíduos *versus* concentração do dia 3

Figura 7.5: Gráficos dos resíduos *versus* concentração do fragmento 198,03/181 da L-DOPA, referentes à tabela 7.11

Mínimos quadrados ponderados

Na L-DOPA (tabela 7.12) apenas nos fragmentos 198,03/152,01 e 198,03/181 a escolha do modelo recai sobre o mesmo, nomeadamente o modelo 5, enquanto que o fragmento 198,03/135,01 o modelo 3 é o que apresenta menor valor $\sum \%RE$.

Tabela 7.12: Resultados dos mínimos quadrados ponderados. Na tabelas está presente a soma da percentagem do erro residual ($\sum \%RE$) e também da média do R^2 através dos mínimos quadrados ponderados e ordinários.

Fragmento		L-DOPA					
		198,2/135,1		198,2/152,1		198,2/181,00	
		$\sum \%RE $	$\overline{R^2}$	$\sum \%RE $	$\overline{R^2}$	$\sum \%RE $	$\overline{R^2}$
Modelo 1	$\frac{1}{x^0}$	73,101	0,995	43,68	0,999	56,71	0,998
Modelo 2	$\frac{1}{x}$	67,521	0,995	40,835	0,998	56,222	0,997
Modelo 3	$\frac{1}{y}$	65,86	0,994	39,406	0,998	56,667	0,997
Modelo 4	$\frac{1}{x^2}$	67,514	0,995	40,739	0,998	55,679	0,998
Modelo 5	$\frac{1}{y^2}$	66,034	0,994	39,033	0,998	55,602	0,997
Modelo 6	$\frac{1}{\sqrt{x}}$	69,353	0,995	42,147	0,998	56,255	0,998
Modelo 7	$\frac{1}{\sqrt{y}}$	69,128	0,995	42,098	0,998	55,973	0,998

Limiares analíticos

Quanto à L-DOPA, ajustando os 5 valores com um polinómio de primeiro grau obteve-se as estimativas de $b_0 = 2,86 \times 10^2$ ($2,78 \times 10^2$) e $b_1 = 5,73 \times 10^3$ ($1,78 \times 10^3$) e os termos de incerteza percentual das estimativas, ambos valores são muito elevados (97,5 e 31,1% respectivamente) o que levanta sérias suspeitas sobre as estimativas obtidas. Efectuando o respectivo teste t-student para confrontar as estimativas de b_0 e b_1 com o valor nulo (hipótese nula), obteve-se os valores de prova 0,380 e 0,049, tendo em em conta o valor de b_0 ser elevado não tem significado estatístico e que existem erros graves na avaliação de b_1 (declive). Como anteriormente, na figura 4.5 e tabela 4.8, verifica-se também que o valor S/N referente ao teor $0,180 \mu M$ se encontra desviado (para baixo) em relação à restante tendência. Ajustando novamente sem este valor, obteve-se as estimativas $b_0 = 1,61 \times 10^2$ ($0,09 \times 10^2$) e $b_1 = 6,94 \times 10^3$ ($0,63 \times 10^3$). Contudo, a ordenada na origem continua a acusar uma incerteza muito elevada (58,6%) enquanto que o declive está agora muito melhor definido (erro relativo de apenas 9,1%). O teste estatístico para a verificação do significado estatístico dos parâmetros conduziu aos valores de prova 0,230 e 0,008, respectivamente, conclui-se assim que a ordenada na origem não deve ser considerada, apenas o declive. Como para a L-tirosina efectua-se novamente agora o estudo da avaliação do sinal apenas em

dependência exclusiva com um parâmetro (o declive), obteve-se as estimativas $b_1 = 7,50 \times 10^3$ ($0,42 \times 10^3$) e $b_1 = 7,98 \times 10^3$ ($0,21 \times 10^3$) ao ajustar os $N = 5$ e os $N = 4$ valores. Em ambos os casos o parâmetro estimado tem valor estatístico já que o respectivo valor de prova deu 0,000 (probabilidade nula de o parâmetro estimado ser nulo). Assim, estes modelos conduzem aos valores 0,44 e 0,41 nM para o limite de detecção e 1,33 e 1,25 nM para a quantificação, respectivamente. Pode-se então definir os limiares analíticos como sendo 0,42 nM (LQ) e 1,3 nM (LQ) para a L-DOPA.

Precisão

Tabela 7.13: Resultados da precisão e exactidão para os 3 fragmentos da L-DOPA, relativo aos calibradores de concentração alta, média e baixa.

Fragmento	Concentração nominal (μM)	Repetibilidade (%CV)	Precisão intermédia (%CV)
	0,11	3,061	2,868
198,03/135,01	0,20	3,810	4,029
	0,35	3,061	3,375
	0,11	2,210	17,861
198,03/152,01	0,20	2,816	23,359
	0,35	2,716	3,221
	0,11	2,020	17,836
198,03/181	0,20	3,685	23,481
	0,35	0,746	1,095

Os resultados da tabela 7.13 demonstram que apenas o fragmento com m/z 198,03/135,01 apresenta boa precisão.

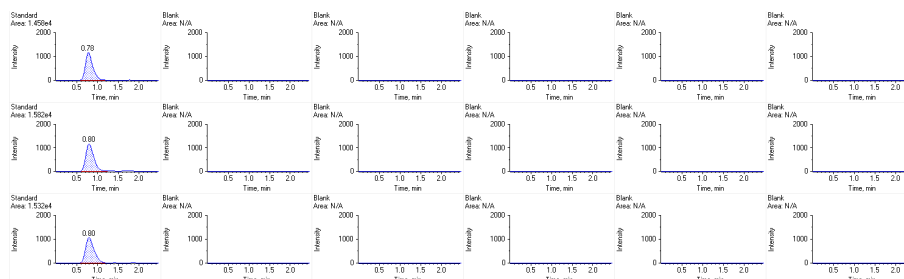
Exactidão

Tabela 7.14: Resultados da exactidão para os 3 fragmentos da L-DOPA, relativo aos calibradores de concentração alta, média e baixa.

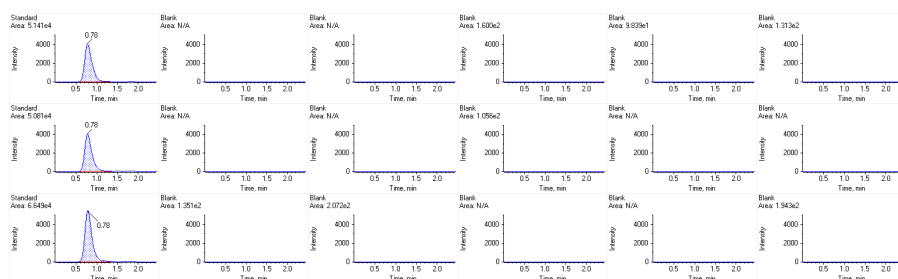
Fragmento	Concentração nominal (μM)	Exactidão (%RE)
198,03/135,01	0,11	-3,965
	0,20	0,103
	0,35	1,022
198,03/152,01	0,11	52,389
	0,20	-32,185
	0,35	1,361
198,03/181	0,11	53,996
	0,20	-31,475
	0,35	2,451

Os valores de exactidão (figura 7.14) demonstram que o fragmento m/z 198,03/135,01 apresenta valores de exactidão aceitáveis.

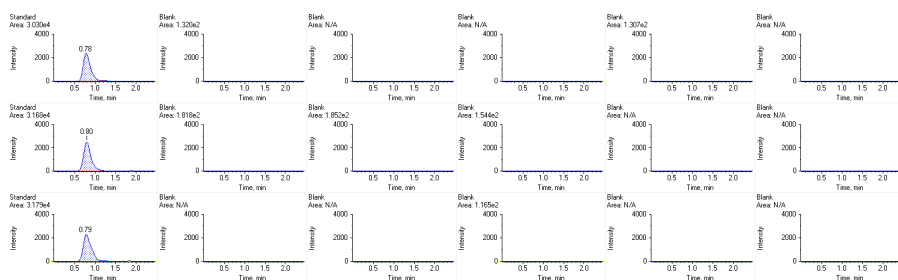
Carry-over



(a) Transição 198,03/135,01



(b) Transição 198,03/152,01



(c) Transição 198,03/181,00

Figura 7.6: Cromatogramas representando a injeção das 3 réplicas do calibrador mais alto da L-DOPA, seguido dos 5 brancos.

Não existe qualquer efeito de carry-over em nenhum fragmento da L-DOPA.

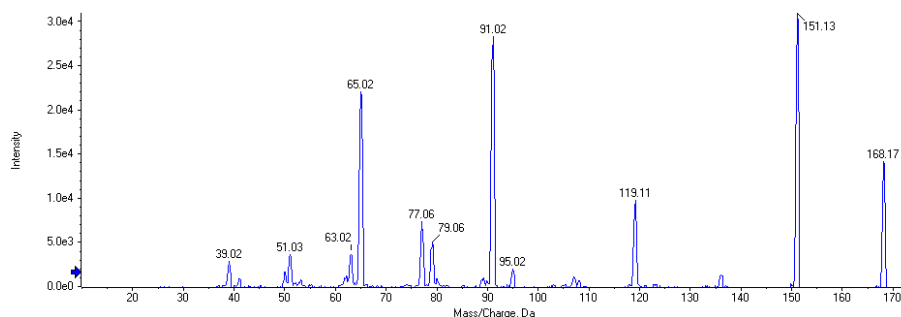
Capítulo 8

Anexo III - 3-MT

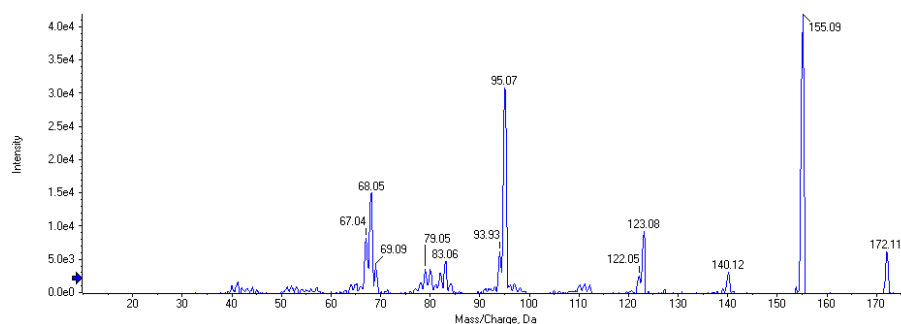
Resultados obtidos para a 3-MT , referentes aos fragmentos 65,02, 91,02 e 151,13.

Identificação e selectividade

A análise aos espectros de fragmentação da 3-MT e do seu padrão interno (figura 8.1) indica que os m/z a monitorizar são 151,13; 91,02 e 65,02, relativo ao 3-MT. Quanto ao padrão interno os m/z são 68,05, 95,07 e 155,08.



(a) Espectro de fragmentação da 3-MT-HCl. Os fragmentos obtidos por no ESI no modo de ionização positivo variando a energia de colisão de 5V a 90V, para infusão de uma solução 5,89 mM de 3-metoxitiramina-HCl.



(b) Espectro de fragmentação da 3-MT-HCl – (1,1,2,2-D4,97%). Os fragmentos obtidos por no ESI no modo de ionização positivo variando a energia de colisão de 10V a 90V, para infusão de uma solução 13,00mM de 3-metoxitiramina- HCl – (1,1,2,2-D4,97%).

Figura 8.1: Espectros de fraguementação de 3-MT-HCl (8.1a) e 3-MT-HCl-(1,1,2,2-D4,97%) (8.1b).

Representatividade

O fragmento da 3-MT com m/z 168,17/65,02 apresenta na tabela 8.1, os valores da sua quantificação.

Tabela 8.1: Na tabela seguinte encontram-se os resultados relacionados com a quantificação da dopamina através do seu fragmento m/z 65,02.

[3-MT] (μM)	Dia 1		Dia 2		Dia 3	
	A/A_{IS}	S/N	A/A_{IS}	S/N	A/A_{IS}	S/N
0,0275	1,407	1097,7	2,095	923,9	0,7258	927,9
	1,324	994,3	2,209	1013	0,8294	907,8
	1,473	819,6	2,284	939,3	0,8197	941,3
0,0500	2,65	1684,5	4,186	1232,5	1,348	1398,5
	2,47	1454,3	3,869	1311,9	1,355	1246,5
	2,416	1455,6	3,905	1321,4	1,544	1377,2
0,0875	4,651	2088	7,338	1944,4	2,44	1828
	4,922	2820	7,36	1567,1	2,37	1573,4
	4,565	2170,6	6,649	2035,9	2,264	1785,7

Ao nível da menor concentração (0,275 μM) existe um efeito inter-diário detectável ao nível desta concentração. Com base nesta informação obtida nos três dias de trabalho, a estimativa puramente aleatória dá $s_{pe} = 0,077$ enquanto que a estimativa da incerteza interdiária dá $s_i = 0,86$. Mesmo removendo os resultados de alguns dos dias, o efeito inter-diário não desaparece uma vez que TV é sempre superior ao F_{crit} e o valor de s_{pe} tende a diminuir.

Passando ao nível de concentração intermédio (0,500 μM) a estimativa da dispersão interdiária deu $s_i = 1,577$ e a puramente aleatória $s_{pe} = 0,138$. Como na concentração anterior, o efeito inter-diário mantém-se.

Analisando agora o nível superior de concentração (0,0875 μM), continua a verificar-se um efeito inter-diário. A estimativa da dispersão interdiária deu $s_i = 2,980$ e a puramente aleatória $s_{pe} = 0,262$. O efeito mantém-se, independentemente dos valores a retirar dos dias.

Relativamente à gama de trabalho utilizada, os valores s_{pe} são discrepantes, o que à partida se assume a heterogeneidade das variâncias. Para confirmar a heterogeneidade das variâncias assume-se como hipótese nula a similaridade das variâncias, o valor de $TV = 11,58$ é superior ao respectivo valor crítico previsto pela distribuição bilateral de Fisher ($F_{0.01(6,6)}^b = 11,07$) indicando que a hipótese nula não é válida ou seja, estamos perante um caso de heterogeneidade da variância e, como tal é necessário utilizar métodos de regressão linear ponderada para efectuar estimativas paramétricas quanto à calibração e quanto à quantificação.

Os valores de quantificação para o fragmento da L-DOPA, m/z 168,17/91,02, são apresentados na tabela 8.2.

Tabela 8.2: Na tabela seguinte encontram-se os resultados relacionados com a quantificação da dopamina através do seu fragmento m/z 91,02.

[3-MT] (μM)	Dia 1		Dia 2		Dia 3	
	A/A_{IS}	S/N	A/A_{IS}	S/N	A/A_{IS}	S/N
0,0275	0,7400	600,3	0,7262	576,6	0,3608	489,8
	0,7156	570,9	0,6766	563,4	0,4175	520,3
	0,7610	567,3	0,7260	664,2	0,4326	542,2
0,0500	1,3600	1 048,5	1,2190	1 014,1	0,7021	952,6
	1,3220	1 018,9	1,2490	1 033,0	0,7416	951,9
	1,3080	1 054,7	1,3160	1 085,5	0,7796	971,5
0,0875	2,4440	1 973,1	2,3620	1 901,8	1,2300	1 627,9
	2,5660	2 861,4	2,2480	1 875,9	1,2120	1 688,3
	2,3800	1 952,4	2,3270	1 869,9	1,2120	1 782,6

Usando a análise ANOVA de factor único, ao nível da concentração mais baixa (0,0275 μM), verifica-se a presença de um efeito inter-diário ($TV = 112,18 \gg 10,92 = F_{0,01(6,6)}^b$). A precisão intermédia estimada dá $s_i = 0,226$ e a puramente aleatória $s_{pe} = 0,030$. Com a remoção dos valores do terceiro dia, deixa de se observar efeito do factor dia ($TV > F_{crit}$) e a estimativa aleatória diminui ($s_{pe} = 0,026$), tal como acontece com a incerteza interdiária ($s_i = 0,025$).

Ao nível de concentração intermédia (0,0500 μM), verifica-se também o efeito inter-diário. As estimativas obtidas apontam para $s_i = 0,393$ e $s_{pe} = 0,040$. Ao remover os valores do terceiro dia o efeito inter-diário atenua-se, mas a incerteza aleatória mantém-se praticamente inalterada $s_{pe} = 0,040$.

Passando agora ao nível de concentração superior (0,0875 μM), obtém-se um efeito inter-diário com dispersão da ordem de $s_i = 0,831$ e dispersão aleatória da ordem de $s_{pe} = 0,130$. A remoção dos valores do terceiro dia anula o efeito inter-diário sobre a dispersão final, o que faz com que o efeito inter-diário diminua ($s_i = 0,167$).

Relativamente à gama de trabalho utilizada, os valores s_{pe} são discrepantes, o que à partida se assume a heterogeneidade das variâncias. Para confirmar a heterogeneidade das variâncias assume-se como hipótese nula a similaridade das variâncias, o valor de $TV = 18,78$ é superior ao respectivo valor crítico previsto pela distribuição bilateral de Fisher ($F_{0,01(6,6)}^b = 11,07$), o que indicando que a hipótese nula não é válida. Concluimos assim, que estamos perante um caso de heterogeneidade da variância e, como tal é necessário utilizar métodos de regressão linear ponderada para efectuar estimativas paramétricas quanto à calibração e quanto à quantificação.

Por último, na tabela 8.3, os valores de quantificação da 3-MT do fragmento m/z 168,17/151,13 são apresentados.

Tabela 8.3: Na tabela seguinte encontram-se os resultados relacionados com a quantificação da dopamina através do seu fragmento m/z 151,1.

[3-MT] (μM)	Dia 1		Dia 2		Dia 3	
	A/A_{IS}	S/N	A/A_{IS}	S/N	A/A_{IS}	S/N
0,0275	3,4470	425,1	3,4480	453,1	1,8980	460,8
	3,3890	414,3	3,3380	515,9	2,0150	564,8
	3,7660	422,4	3,3060	485,3	1,9430	498,8
0,0500	6,5890	609,5	5,9090	714,0	3,3540	698,2
	6,2750	624,6	6,0010	677,6	3,4700	708,1
	6,1170	710,5	5,9610	709,3	3,7940	674,2
0,0875	11,4200	876,1	11,2200	1 000,9	5,8190	894,9
	11,6500	879,2	10,2600	978,7	6,0020	954,2
	11,3300	958,6	10,9100	985,4	5,8900	823,5

Ao menor nível de concentração (0,0275 μM), através do estudo ANOVA verifica-se que existe um efeito inter-diário ($TV = 135,01 \gg 10,92 = F_{0,01(2,6)}^u$). As contribuições estimadas foram a interdiária $s_i = 1,060$ e a aleatória de $s_{pe} = 0,013$. Ao remover os valores do terceiro dia do conjunto e reprocessando a análise ANOVA deixa de se verificar o efeito inter-diário, pois $TV < F_{crit}$. Além disso, verifica-se também que assim como a estimativa interdiária decresceu.

No nível de concentração intermédio (0,050 μM) as contribuições agora estimadas para a interdiária e puramente aleatória de $s_i = 1,849$ e $s_{pe} = 0,193$. De modo similar, removendo do conjunto de valores original os valores relativos ao terceiro dia de trabalho e reprocessando a análise ANOVA deixa de se verificar o efeito inter-diário, contudo a estimativa aleatória diminui um pouco ($s_{pe} = 0,173$).

Já para o nível de concentração superior (0,0875 μM), as contribuições agora estimadas para a interdiária e puramente aleatória é de $s_i = 3,713$ e $s_{pe} = 0,363$. Através da remoção do conjunto de valores do terceiro dia de trabalho, a análise ANOVA reprocessada indica que deixa de se verificar o efeito inter-diário, porém contudo a estimativa aleatória mantém-se praticamente inalterada ($s_{pe} = 0,36$).

Relativamente à gama de trabalho utilizada, apesar de os valores s_{pe} serem pouco discrepantes, os valores de TV são superiores ao respectivo valor crítico previsto pela distribuição bilateral de Fisher ($F_{0,01(6,6)}^b = 11,07$) indicando que a hipótese nula é válida. Através deste resultado, é perceptível que estamos perante um caso de heterogeneidade da variância e, como tal é necessário utilizar métodos de regressão linear ponderada para efectuar estimativas paramétricas quanto à calibração e quanto à quantificação.

Teste de Mandel

Tabela 8.4: Teste de Mandel para os fragmentos da 3-MT

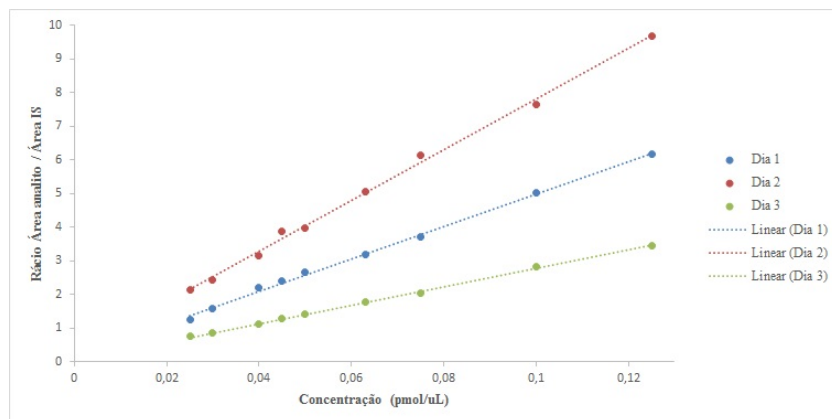
Fragmento 168,17/65,02					
Dia 1		Dia 2		Dia 3	
Teste de Mandel		Teste de Mandel		Teste de Mandel	
ΔSS	8,23E-03	ΔSS	1,92E-02	ΔSS	9,97E-05
TV	1,350	TV	0,838	TV	0,108
$F_{0.01(1,6)}^u$	13,745	$F_{0.01(1,6)}^u$	13,745	$F_{0.01(1,6)}^u$	13,745

Fragmento 168,17/91,02					
Dia 1		Dia 2		Dia 3	
Teste de Mandel		Teste de Mandel		Teste de Mandel	
ΔSS	2,55E-03	ΔSS	5,27E-03	ΔSS	4,43E-04
TV	1,341	TV	3,099	TV	0,600
$F_{0.01(1,6)}^u$	13,745	$F_{0.01(1,6)}^u$	13,745	$F_{0.01(1,6)}^u$	13,745

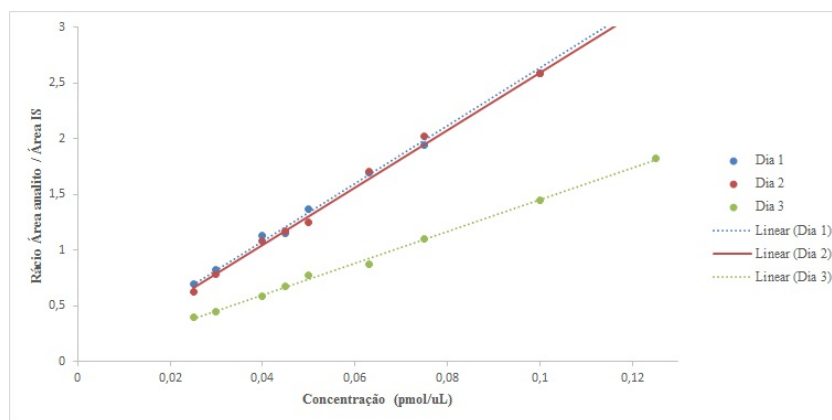
Fragmento 168,17/151,13					
Dia 1		Dia 2		Dia 3	
Teste de Mandel		Teste de Mandel		Teste de Mandel	
ΔSS	1,54E-03	ΔSS	3,87E-02	ΔSS	9,13E-02
TV	0,033	TV	1,418	TV	13,070
$F_{0.01(1,6)}^u$	13,745	$F_{0.01(1,6)}^u$	13,745	$F_{0.01(1,6)}^u$	13,745

Quanto à 3-MT é possível, pela tabela 8.4, verificar que os resultados dos seus fragmentos não apresentam diferença significativa das variâncias, logo apresentam comportamento linear ($TV < F$).

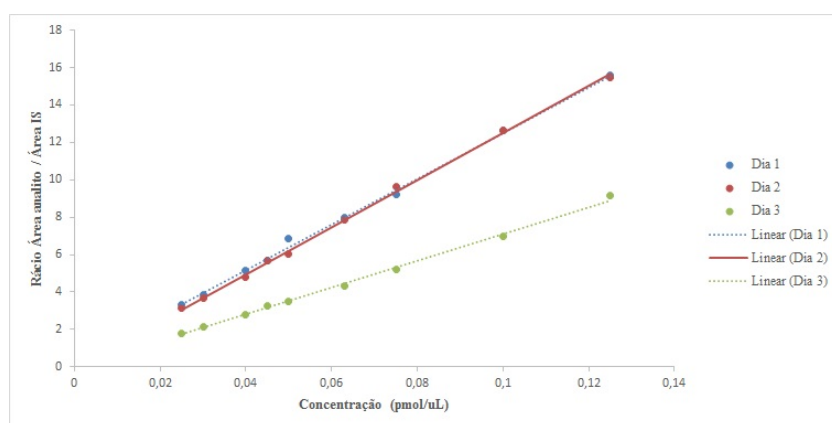
Curvas de calibração



(a) Curva de calibração do fragmento 168,17/65,02



(b) Curva de calibração fragmento 168,17/91,02



(c) Curva de calibração fragmento 168,17/151,13

Figura 8.2: Curva de calibração dos 3 fragmentos da 3-MT em 3 dias diferentes

De igual modo aos anteriores analitos, também a 3-MT apresenta bons resultados de linearidade comprovado à primeira vista pelas curvas de calibração 8.2a, 8.2b e 8.2c de cada fragmento nos 3 dias em que foram realizadas. Na tabela 8.5, verifica-se em todos os fragmentos $R^2 > 0,99$, assim como pelas tabelas da ANOVA (8.6, 8.8, 8.10) os 3 fragmentos apresentam $F_{cal} > F_{crit}$ e por fim nos gráficos 8.3, 8.4 e 8.5 os resíduos dos 3 fragmentos estão em redor os eixos dos xx, ou seja, a linearidade para a 3-MT está comprovada devido ao passar os critérios de aceitação impostos.

Tabela 8.5: Resultados da 3-MT para o modelo de regressão linear simples. Os resultados foram extraídos das curvas de calibração 8.2a, 8.2b e 8.2c durante os 3 dias. A gama de trabalho compreende os valores de 0,025-0,125 μM .

Dia 1					
Analito	Transição	Curva de calibração	R^2	Intervalo de confiança 95%	
				< 95%	> 95%
3-MT	168,17/65,02	$y = 48,134x + 0,1707$	0,999	0,032	0,309
	168,17/91,02	$y = 25,933x + 0,0422$	0,999	-0,035	0,119
	168,17/151,13	$y = 122,55x + 0,2713$	0,999	-0,078	0,621

Dia 2					
Analito	Transição	Curva de calibração	R^2	Intervalo de confiança 95%	
				< 95%	> 95%
3-MT	168,17/65,02	$y = 75,388x + 0,266$	0,998	0,007	0,525
	168,17/91,02	$y = 25,855x + 0,0155$	0,998	-0,066	0,097
	168,17/151,13	$y = 126x - 0,0944$	0,999	-0,389	0,2

Dia 3					
Analito	Transição	Curva de calibração	R^2	Intervalo de confiança 95%	
				< 95%	> 95%
3-MT	168,17/65,02	$y = 27,43x + 0,0397$	0,999	-0,009	0,089
	168,17/91,02	$y = 14,296x + 0,0241$	0,998	-0,022	0,07
	168,17/151,13	$y = 71,871x - 0,0741$	0,998	-0,313	0,165

Tabela 8.6: Tabela da resultados da ANOVA para os 3 dias do fragmento 168,17/65,02 da 3-MT. Estão apresentados na tabela da ANOVA valores relativamente à soma dos quadrados (SQ), graus de liberdade (GL), média quadrática (MQ) e b_0 e b_1 representam a ordenada na origem e o declive, respectivamente.

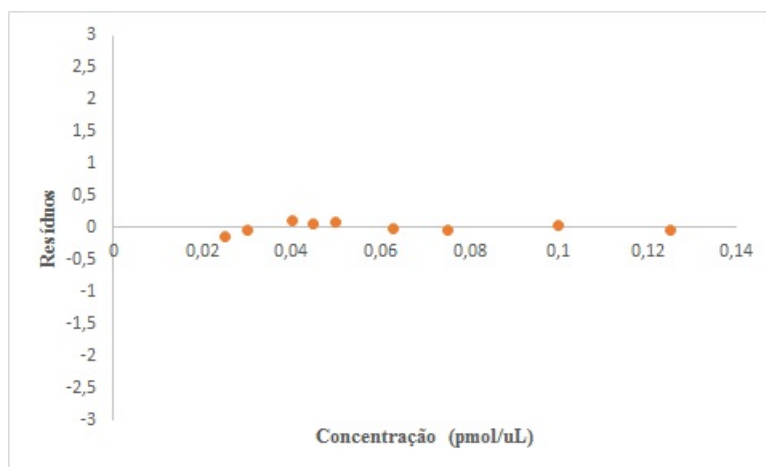
Dia 1										
ANOVA										
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Fcal	Fsignif	Fcrit				
Regressão	20,597	1	20,597	3216,484	1,39E-10	5,592				
Residual	0,045	7	0,006							
Total	20,642	8								
Erro Padrão										
	tcal	p-value	< 95%	> 95%	< 99%	> 99%				
b_0	2,914	0,023	0,032	0,309	-0,034	0,376				
b_1	56,714	1,39E-10	46,127	50,140	45,164	51,104				

Dia 2										
ANOVA										
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Fcal	Fsignif	Fcrit				
Regressão	50,527	1	50,527	2251,140	4,83E-10	5,592				
Residual	0,157	7	0,022							
Total	50,684	8								
Erro Padrão										
	tcal	p-value	< 95%	> 95%	< 99%	> 99%				
b_0	2,425	0,046	0,007	0,525	-0,118	0,650				
b_1	47,450	4,83E-10	71,631	79,145	69,828	80,950				

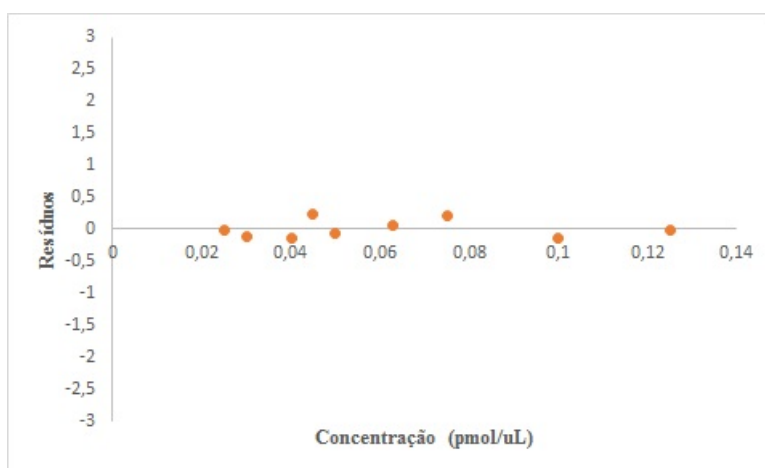
Dia 3										
ANOVA										
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Fcal	Fsignif	Fcrit				
Regressão	6,689	1	6,689	8304,766	5,05E-12	5,592				
Residual	0,006	7	0,0008							
Total	6,694	8								
Erro Padrão										
	tcal	p-value	< 95%	> 95%	< 99%	> 99%				
b_0	1,910	0,100	-0,010	0,090	-0,033	0,112				
b_1	91,130	5,05E-12	26,718	28,142	26,380	28,483				

Tabela 8.7: Tabela de resíduos do fragmento 168,17/65,02 da 3-MT.

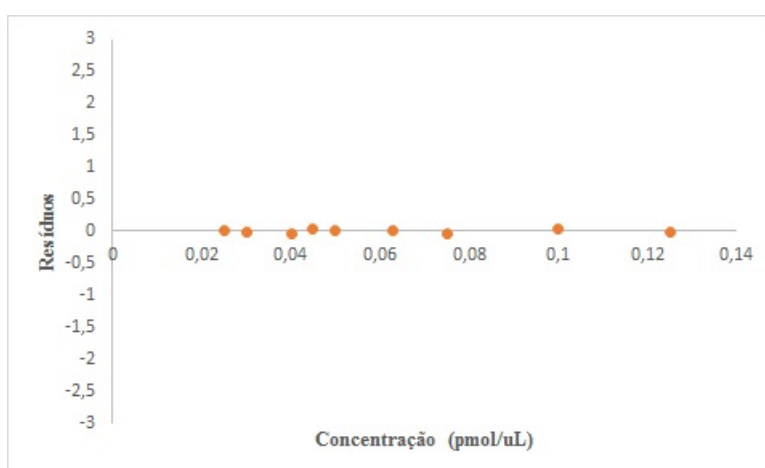
	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Concentração (μM)	Resíduos	Resíduos	Resíduos
0,025	-0,13	-0,007	0,018
0,030	-0,044	-0,111	-0,01
0,040	0,107	-0,138	-0,031
0,045	0,06	0,224	0,024
0,050	0,08	-0,069	0,017
0,063	-0,01	0,055	-0,001
0,075	-0,054	0,212	-0,046
0,100	0,023	-0,151	0,034
0,125	-0,032	-0,015	-0,006



(a) Gráficos dos resíduos *versus* concentração do dia 1



(b) Gráficos dos resíduos *versus* concentração do dia 2

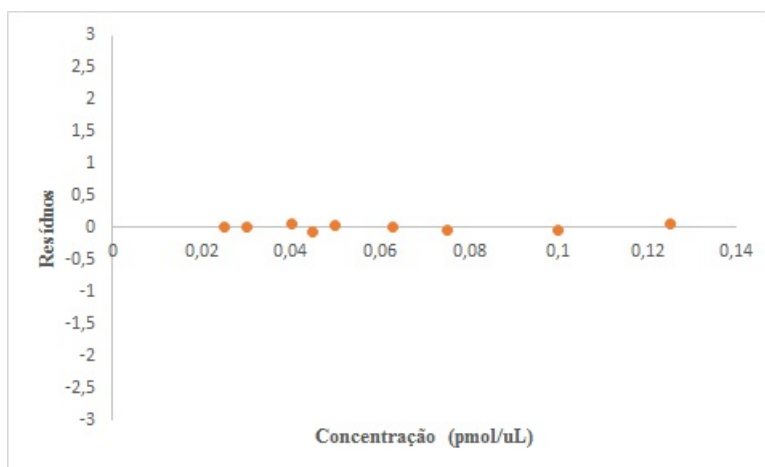


(c) Gráficos dos resíduos *versus* concentração do dia 3

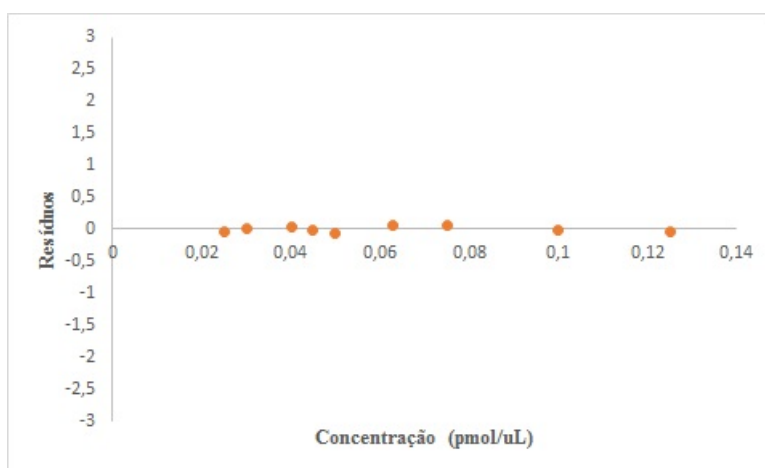
Figura 8.3: Gráficos dos resíduos *versus* concentração do fragmento 168,17/65,02 da 3-MT, referentes à tabela 8.7

Tabela 8.9: Tabela de resíduos do fragmento 168,17/91,02 da 3-MT.

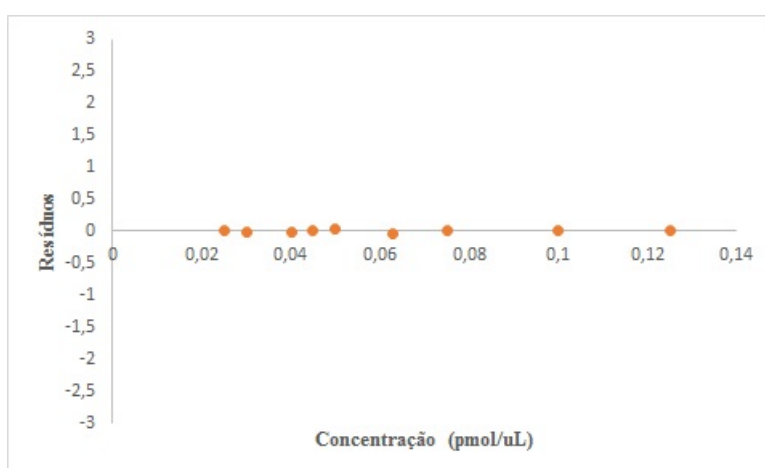
	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Concentração (μM)	Residuais	Residuais	Residuais
0,025	0,001	-0,038	0,015
0,030	0,004	-0,003	-0,006
0,040	0,05	0,03	-0,012
0,045	-0,056	-0,013	0,004
0,050	0,03	-0,057	0,039
0,063	0,019	0,062	-0,053
0,075	-0,05	0,067	0,005
0,100	-0,047	-0,014	-0,003
0,125	0,049	-0,034	0,012



(a) Gráficos dos resíduos *versus* concentração do dia 1



(b) Gráficos dos resíduos *versus* concentração do dia 2



(c) Gráficos dos resíduos *versus* concentração do dia 3

Figura 8.4: Gráficos dos resíduos *versus* concentração do fragmento 168,17/91,02 da 3-MT, referentes à tabela 8.9.

Tabela 8.10: Tabela da resultados da ANOVA para os 3 dias do fragmento 168,17/151,13 da 3-MT. Estão apresentados na tabela da ANOVA valores relativamente à soma dos quadrados (SQ), graus de liberdade (GL), média quadrática (MQ) e b_0 e b_1 representam a ordenada na origem e o declive, respectivamente.

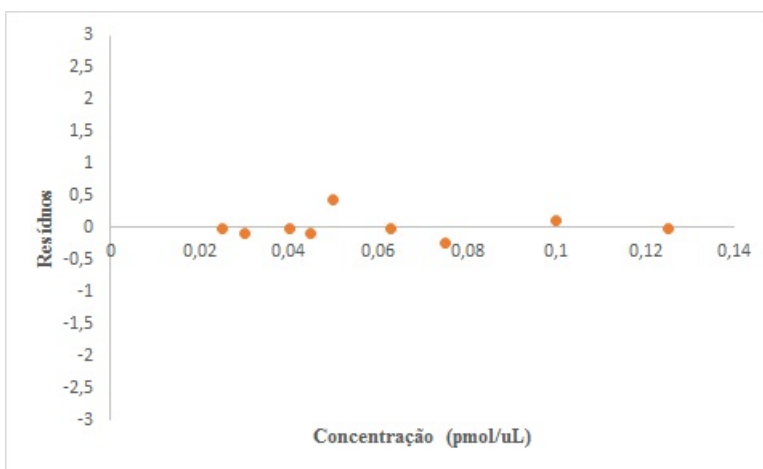
Dia 1										
ANOVA										
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Fcal	Fsignif	Fcrit				
Regressão	133,517	1	133,517	3272,697	1,31E-10	5,592				
Residual	0,286	7	0,041							
Total	133,803	8								
Erro Padrão										
		tcal	p-value	< 95%	> 95%	< 99%	> 99%			
b_0	0,148	1,835	0,109	-0,078	0,621	-0,246	0,789			
b_1	2,142	57,208	1,31E-10	117,484	127,615	115,053	130,046			

Dia 2										
ANOVA										
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Fcal	Fsignif	Fcrit				
Regressão	141,136	1	141,136	4880,202	3,24E-11	5,592				
Residual	0,202	7	0,029							
Total	141,340	8								
Erro Padrão										
		tcal	p-value	< 95%	> 95%	< 99%	> 99%			
b_0	0,125	-0,758	0,473	-0,389	0,200	-0,530	0,341			
b_1	1,804	69,858	3,24E-11	121,733	130,263	119,686	132,309			

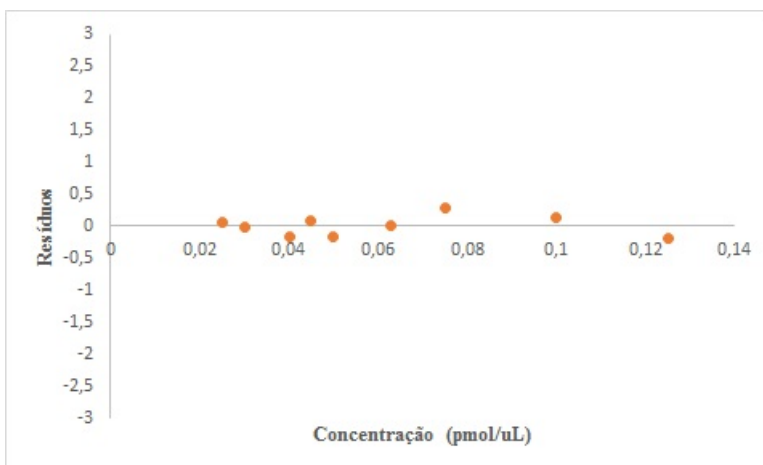
Dia 3										
ANOVA										
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Fcal	Fsignif	Fcrit				
Regressão	45,922	1	45,922	2413,165	3,79E-10	5,592				
Residual	0,134	7	0,019							
Total	46,056	8								
Erro Padrão										
		tcal	p-value	< 95%	> 95%	< 99%	> 99%			
b_0	0,101	-0,734	0,487	-0,313	0,165	-0,428	0,279			
b_1	1,463	49,124	3,79E-10	68,412	75,331	66,751	76,991			

Tabela 8.11: Tabela de resíduos do fragmento 168,17/151,13 da 3-MT.

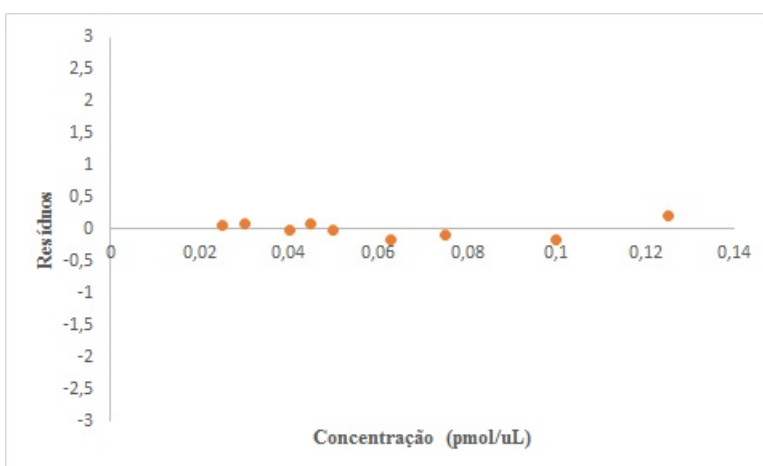
	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Concentração (μM)	Residuais	Residuais	Residuais
0,025	-0,022	0,06	0,071
0,030	-0,101	-0,022	0,075
0,040	-0,02	-0,17	-0,006
0,045	-0,103	0,075	0,094
0,050	0,438	-0,169	-0,025
0,063	-0,021	-0,004	-0,163
0,075	-0,246	0,278	-0,103
0,100	0,1	0,144	-0,164
0,125	-0,025	-0,192	0,221



(a) Gráficos dos resíduos *versus* concentração do dia 1



(b) Gráficos dos resíduos *versus* concentração do dia 2



(c) Gráficos dos resíduos *versus* concentração do dia 3

Figura 8.5: Gráficos dos resíduos *versus* concentração do fragmento 168,17/151,13 da 3-MT, referentes à tabela 8.11.

Mínimos quadrados ponderados

Por último, os fragmentos da 3-MT apresentam resultados discordantes quanto à escolha do modelo, derivado ao menor valor de $\sum \%RE$, como comprovado pela tabela 8.12. O modelo 4 é para o fragmento 168,17/65,02 o que apresenta melhor ajuste para a linearidade da curva de calibração, assim como o modelo 2 e o modelo 5 para os fragmentos 168,17/91,02 e 168,17/151,13, correspondentemente.

Tabela 8.12: Resultados dos mínimos quadrados ponderados. Na tabelas está presente a soma da percentagem do erro residual ($\sum \%RE$) e também da média do R^2 através dos mínimos quadrados ponderados e ordinários.

Fragmento		3-MT					
		168,3/91,06		168,3/119,11		168,3/151,13	
		$\sum \%RE$	$\overline{R^2}$	$\sum \%RE$	$\overline{R^2}$	$\sum \%RE$	$\overline{R^2}$
Modelo 1	$\frac{1}{x^0}$	67,324	0,998	64,093	0,997	53,595	0,998
Modelo 2	$\frac{1}{x}$	65,008	0,997	63,087	0,997	49,257	0,998
Modelo 3	$\frac{1}{y}$	66,541	0,995	64,512	0,996	46,779	0,997
Modelo 4	$\frac{1}{x^2}$	64,673	0,997	63,283	0,997	48,748	0,998
Modelo 5	$\frac{1}{y^2}$	66,514	0,996	64,888	0,996	46,232	0,997
Modelo 6	$\frac{1}{\sqrt{x}}$	65,726	0,998	62,897	0,997	51,302	0,998
Modelo 7	$\frac{1}{\sqrt{y}}$	65,6	0,998	62,947	0,997	51,023	0,998

Limiares analíticos

A 3-MT apresenta as estimativas $b_0 = 1,16 \times 10^2$ ($1,28 \times 10^4$) e $b_1 = 1,16 \times 10^2$ ($5,0 \times 10^2$) pelo ajuste com polinómio de primeiro grau. O valor de b_0 não possui qualquer significado estatístico, devido ao valor elevado tanto da incerteza percentual (432,1%) como o valor do teste de t-student (0,832), optando-se assim por avaliar a dependência apenas do declive. Com a estimativa feita apenas com o declive obtém-se $b_1 = 3,23 \times 10^4$ ($2,56 \times 10^3$) e o valor de t-student obtém-se 0,000 para valor de prova. Com estes valores obtém-se um LD de 0,10 nM e um LQ de 0,31.

Precisão

O analito 3-MT apresenta em todos os fragmentos bons resultados de precisão (tabela 8.13).

Tabela 8.13: Resultados da precisão para os 3 fragmentos da 3-MT, relativo aos calibradores de concentração alta, média e baixa.

Fragmento	Concentração nominal (μM)	Repetibilidade (%CV)	Precisão intermédia (%CV)
168,17/65,02	0,0275	6,017	5,96
	0,05	5,904	5,843
	0,0875	4,566	5,135
168,17/91,02	0,0275	5,811	6,217
	0,05	3,835	3,989
	0,0875	2,429	4,180
168,17/151,13	0,0275	3,785	3,933
	0,05	3,742	4,411
	0,0875	2,507	3,573

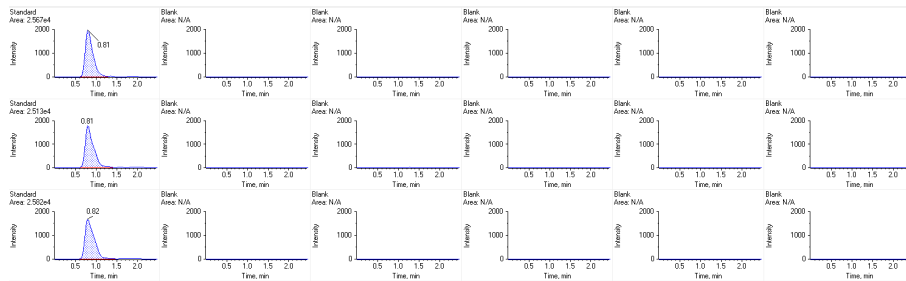
Exactidão

A tabela 8.14 demonstra que qualquer fragmento da 3-MT apresenta boa exactidão.

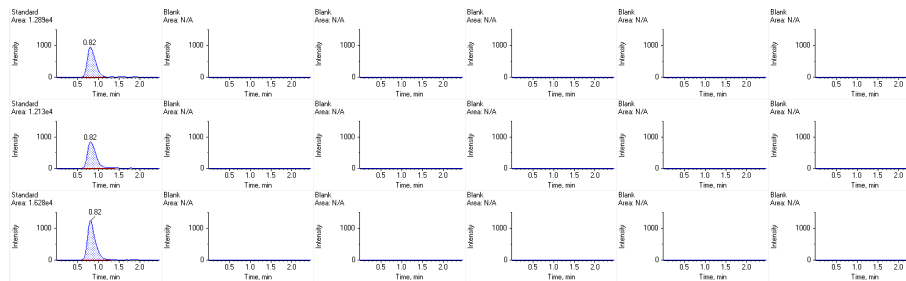
Tabela 8.14: Resultados da precisão e exactidão para os 3 fragmentos da 3-MT, relativo aos calibradores de concentração alta, média e baixa.

Fragmento	Concentração nominal (μM)	Exactidão (%MER)
168,17/65,02	0,0275	-2,988
	0,05	-1,064
	0,0875	1,957
168,17/91,02	0,0275	-2,689
	0,05	-1,309
	0,0875	1,217
168,17/151,13	0,0275	-0,922
	0,05	-1,475
	0,0875	-0,240

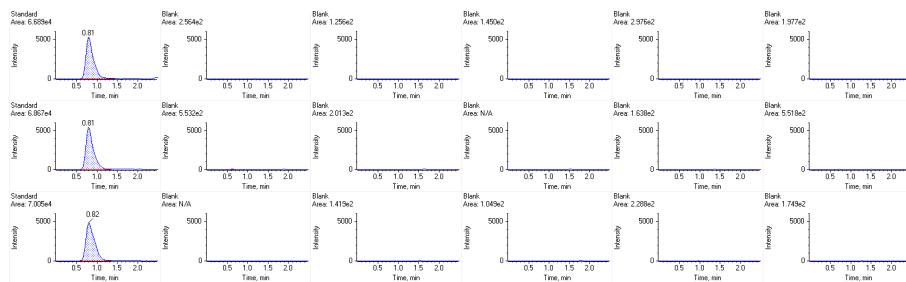
Carry-over



(a) Transição 168,17/65,02



(b) Transição 168,17/91,02



(c) Transição 168,17/151,13

Figura 8.6: Cromatogramas representando a injeção das 3 réplicas do calibrador mais alto da 3-MT, seguido dos 5 brancos.

Não existe efeito carry-over em qualquer fragmento da 3-MT, como se comprova na figura 8.6.

Capítulo 9

Anexo IV - Dopamina

Resultados da dopamina referentes às curvas de calibração dos fragmentos.

Tabela 9.1: Tabela da resultados da ANOVA para os 3 dias do fragmento 154,20/65,07 da dopamina. Estão apresentados na tabela da ANOVA valores relativamente à soma dos quadrados (SQ), graus de liberdade (GL), média quadrática (MQ) e b_0 e b_1 representam a ordenada na origem e o declive, respectivamente.

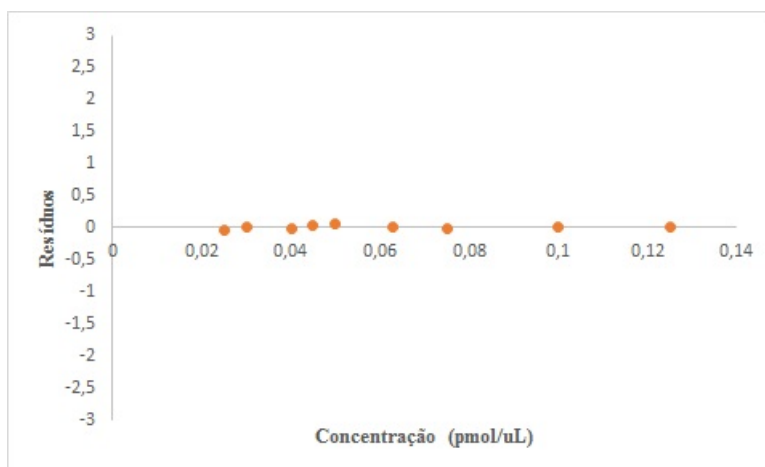
Dia 1													
ANOVA													
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Fcal	Fsignif	Fcrit	Erro Padrão	tcal	p-value	< 95%	> 95%	< 99%	> 99%
Regressão	3,101	1	3,101	3519,232	1,02E-10	5,592							
Residual	0,006	7	0,0009										
Total	3,107	8											
b_0	0,022	3,712	0,008	0,029	0,132	0,005	0,157						
b_1	0,315	59,323	1,02E-10	17,932	19,421	17,575	19,778						

Dia 2													
ANOVA													
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Fcal	Fsignif	Fcrit	Erro Padrão	tcal	p-value	< 95%	> 95%	< 99%	> 99%
Regressão	2,728	1	2,728	481,999	1,03E-07	5,592							
Residual	0,040	7	0,006										
Total	2,768	8											
b_0	0,056	2,554	0,038	0,010	0,271	-0,052	0,333						
b_1	0,798	21,954	1,03E-07	15,631	19,405	14,726	20,310						

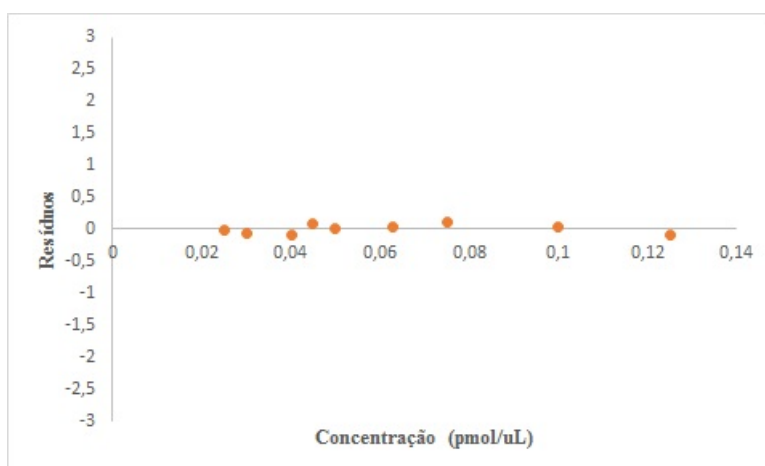
Dia 3													
ANOVA													
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Fcal	Fsignif	Fcrit	Erro Padrão	tcal	p-value	< 95%	> 95%	< 99%	> 99%
Regressão	0,451	1	0,451	1631,357	1,49E-09	5,592							
Residual	0,002	7	0,0003										
Total	0,453	8											
b_0	0,012	0,477	0,648	-0,023	0,035	-0,037	0,048						
b_1	0,176	40,390	1,49E-09	6,705	7,539	6,505	7,739						

Tabela 9.2: Tabela de resíduos do fragmento 154,20/65,07 da dopamina

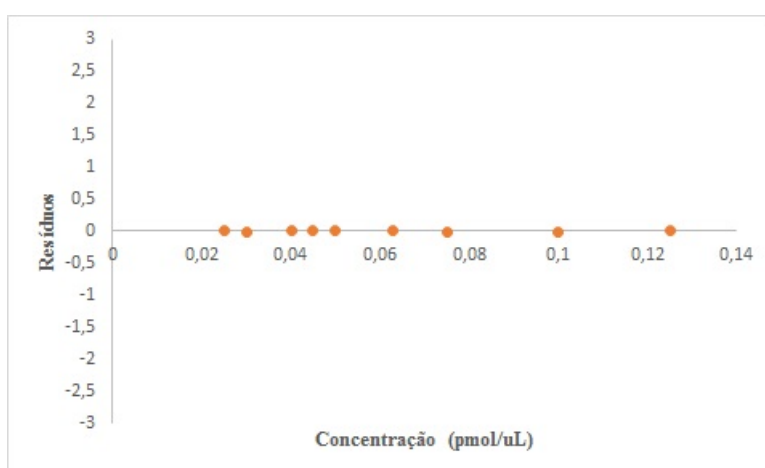
	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Concentração (μM)	Residuais	Residuais	Residuais
0,025	-0,038	-0,019	0,002
0,03	0,001	-0,071	-0,028
0,04	-0,019	-0,086	-0,003
0,045	0,031	0,093	0,017
0,05	0,051	0,015	0,02
0,063	0,008	0,028	0,012
0,075	-0,027	0,1	-0,015
0,100	-0,003	0,021	-0,007
0,125	-0,003	-0,082	0,001



(a) Gráficos dos resíduos *versus* concentração do dia 1



(b) Gráficos dos resíduos *versus* concentração do dia 2



(c) Gráficos dos resíduos *versus* concentração do dia 3

Figura 9.1: Gráficos dos resíduos *versus* concentração do fragmento 154,20/65,07 da dopamina, referentes à tabela 9.2

Tabela 9.3: Tabela da resultados da ANOVA para os 3 dias do fragmento 154,20/91,09 da dopamina. Estão apresentados na tabela da ANOVA valores relativamente à soma dos quadrados (SQ), graus de liberdade (GL), média quadrática (MQ) e b_0 e b_1 representam a ordenada na origem e o declive, respectivamente.

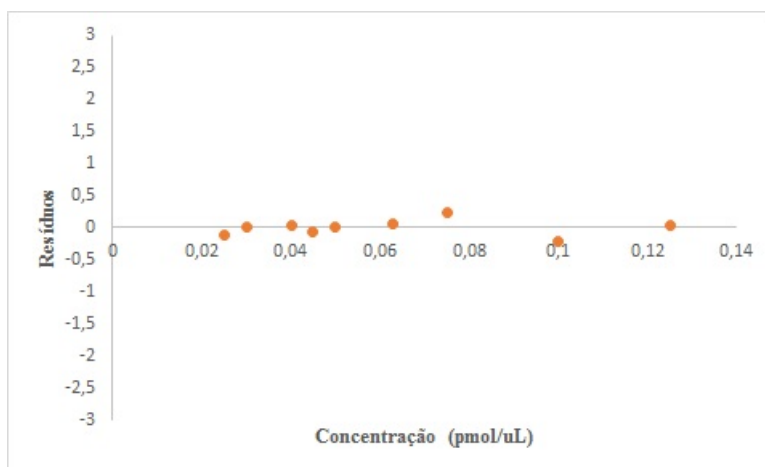
Dia 1										
ANOVA										
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Fcal	Fsignif	Fcrit				
Regressão	16,936	1	16,936	898,949	1,18E-08	5,592				
Residual	0,132	7	0,019							
Total	17,068	8								
Erro Padrão										
	tcal	p-value	< 95%	> 95%	< 99%	> 99%				
b_0	1,987	0,087	-0,038	0,437	-0,152	0,551				
b_1	29,982	1,18E-08	40,204	47,089	38,552	48,741				

Dia 2										
ANOVA										
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Fcal	Fsignif	Fcrit				
Regressão	16,219	1	16,219	726,297	2,48E-08	5,592				
Residual	0,156	7	0,022							
Total	16,375	8								
Erro Padrão										
	tcal	p-value	< 95%	> 95%	< 99%	> 99%				
b_0	2,651	0,0329	0,031	0,549	-0,093	0,673				
b_1	26,950	2,48E-08	38,965	46,461	37,167	48,260				

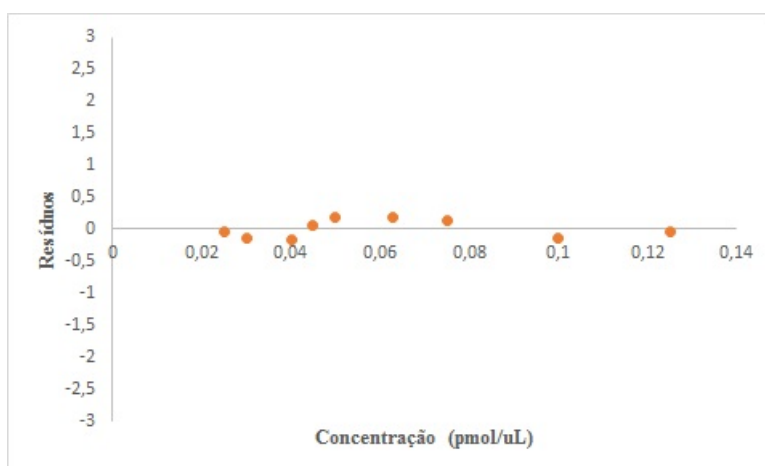
Dia 3										
ANOVA										
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Fcal	Fsignif	Fcrit				
Regressão	2,425	1	2,425	2267,806	4,71E-10	5,592				
Residual	0,008	7	0,001							
Total	2,433	8								
Erro Padrão										
	tcal	p-value	< 95%	> 95%	< 99%	> 99%				
b_0	0,095	0,927	-0,054	0,059	-0,081	0,086				
b_1	47,622	4,71E-10	15,695	17,335	15,301	17,728				

Tabela 9.4: Tabela de resíduos do fragmento 154,20/91,09 da dopmina

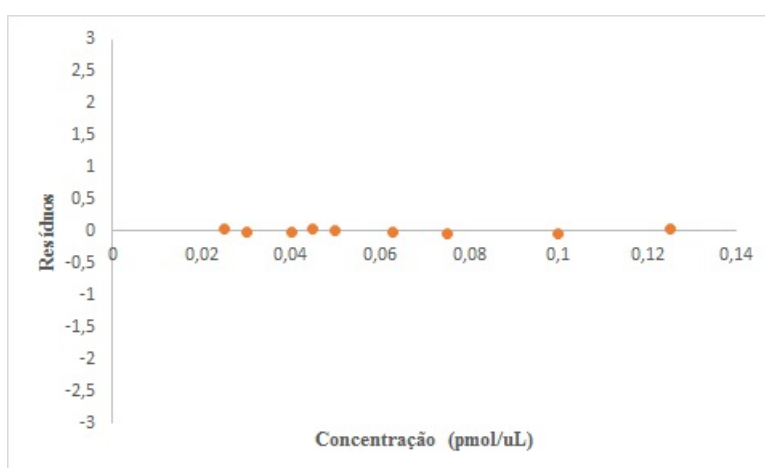
	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Concentração (μM)	Residuais	Residuais	Residuais
0,025	-0,117	-0,036	0,033
0,03	0,02	-0,145	-0,026
0,04	0,041	-0,171	-0,011
0,045	-0,059	0,055	0,038
0,05	0,019	0,174	0
0,063	0,048	0,188	-0,006
0,075	0,245	0,122	-0,031
0,100	-0,221	-0,135	-0,038
0,125	0,025	-0,053	0,042



(a) Gráficos dos resíduos *versus* concentração do dia 1



(b) Gráficos dos resíduos *versus* concentração do dia 2



(c) Gráficos dos resíduos *versus* concentração do dia 3

Figura 9.2: Gráficos dos resíduos *versus* concentração do fragmento 154,20/91,09 da dopamina referentes à tabela 9.4

Tabela 9.5: Tabela da resultados da ANOVA para os 3 dias do fragmento 154,20/137,18 da dopamina. Estão apresentados na tabela da ANOVA valores relativamente à soma dos quadrados (SQ), graus de liberdade (GL), média quadrática (MQ) e b_0 e b_1 representam a ordenada na origem e o declive, respectivamente.

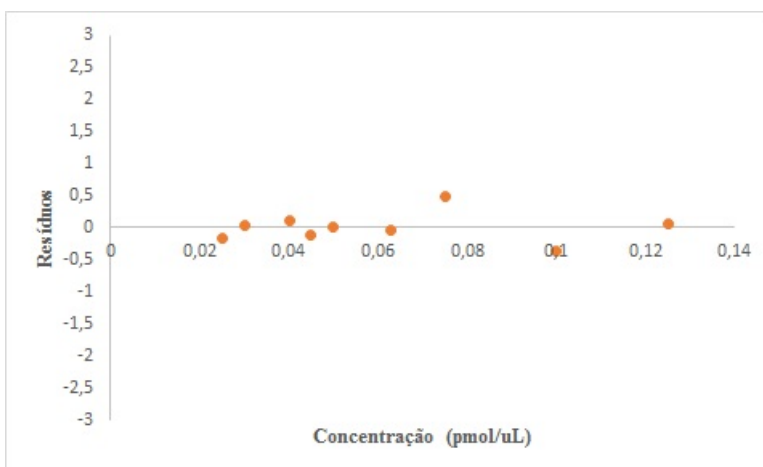
Dia 1													
ANOVA													
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Fcal	Fsignif	Fcrit	Erro Padrão	tcal	p-value	< 95%	> 95%	< 99%	> 99%
Regressão	85,595	1	85,595	1361,184	2,79E-09	5,592	0,184	1,824	0,111	-0,099	0,769	-0,308	0,977
Residual	0,440	7	0,063				2,660	36,894	2,79E-09	91,833	104,411	88,815	107,429
Total	86,035	8											
b_0													
b_1													

Dia 2													
ANOVA													
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Fcal	Fsignif	Fcrit	Erro Padrão	tcal	p-value	< 95%	> 95%	< 99%	> 99%
Regressão	91,780	1	91,780	1954,488	7,91E-10	5,592	0,329	7	0,047				
Residual	0,329	7	0,047				92,109	8					
Total	92,109	8											
b_0	0,159	1,682	0,137	-0,108	0,642	-0,288	2,298	44,210	7,91E-10	96,171	107,040	93,563	109,650
b_1													

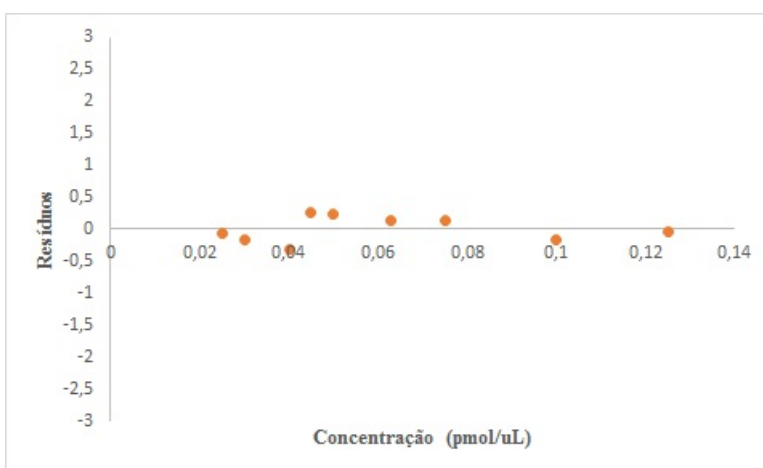
Dia 3													
ANOVA													
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Fcal	Fsignif	Fcrit	Erro Padrão	tcal	p-value	< 95%	> 95%	< 99%	> 99%
Regressão	12,307	1	12,307	8970,138	3,85E-12	5,592	0,010	7	0,001				
Residual	0,010	7	0,001				12,317	8					
Total	12,317	8											
b_0	0,027	1,670	0,139	-0,019	0,109	-0,050	0,393	94,711	3,85E-12	36,277	38,135	35,832	38,581
b_1													

Tabela 9.6: Tabela de resíduos do fragmento 154,20/137,18 da dopmina.

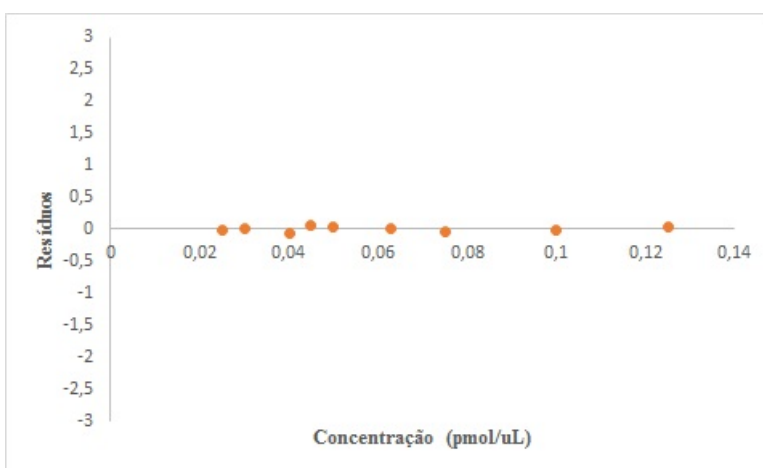
	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Concentração (μM)	Residuais	Residuais	Residuais
0,025	-0,168	-0,073	-0,005
0,03	0,035	-0,156	0,009
0,04	0,099	-0,322	-0,057
0,045	-0,117	0,253	0,054
0,05	0,016	0,244	0,023
0,063	-0,039	0,136	0,013
0,075	0,496	0,14	-0,034
0,100	-0,37	-0,179	-0,028
0,125	0,047	-0,043	0,025



(a) Gráficos dos resíduos *versus* concentração do dia 1



(b) Gráficos dos resíduos *versus* concentração do dia 2



(c) Gráficos dos resíduos *versus* concentração do dia 3

Figura 9.3: Gráficos dos resíduos *versus* concentração do fragmento 154,20/137,18 da dopamina, referentes à tabela 9.6.