



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Maria João Vieira Coelho

**VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA A
DETERMINAÇÃO DE ANTIDEPRESSIVOS EM
AMOSTRAS DE SANGUE POR LC-MS/MS**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Química Forense, orientada pela Dra. Paula Proença e Cunha e coorientada pela Professora Doutora Teresa Pinho e Melo, apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2023

Maria João Vieira Coelho



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

**Validação de um método analítico para a determinação
de antidepressivos em amostras de sangue por
LC-MS/MS**

Dra. Paula Proença e Cunha

Professora Doutora Teresa Pinho e Melo

Dissertação submetida para a obtenção do grau de mestre em Química Forense.

Coimbra, 2023

AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação de mestrado, apesar de ter o meu nome como autora, só foi possível graças a outra tantas pessoas. Em primeiro lugar, à Dra. Paula Proença pela sua experiência e orientação. A sua dedicação e compromisso com o meu crescimento académico influenciaram a direção desta tese e enriqueceram a minha experiência de aprendizagem.

Gostaria ainda de agradecer, de uma forma mais geral, ao Serviço de Química e Toxicologia Forense do Instituto Nacional de Medicina Legal da Delegação do Centro pela forma como me acolheu. A todo o grupo que me recebeu de braços abertos e que sempre se demonstraram disponíveis para dar uma ajuda quando precisa.

Não só ao local de trabalho onde realizou este trabalho, mas também à Universidade de Coimbra e à Universidade NOVA de Lisboa por onde passei 7 anos da minha vida. Estas instituições foram os pilares onde cresci tanto a nível académico como a nível pessoal. Todas as escolhas que fiz valeram a pena e culminaram a ser a pessoa que sou hoje.

À minha família que está presente há 24 anos: aos meus pais, a todos os meus tios, especialmente à minha tia Noémia, que desde há memória foi a minha segunda mãe, à Catarina, à Laura, à minha madrinha. Se hoje estou onde estou, foi graças a tudo o que me ensinaram e deram até agora.

Por fim, mas não menos importantes, aos meus amigos. À Thaís, à Mafalda por terem sido, até agora, das pessoas que mais me influenciaram a nível pessoal e académico. Acredito que não teria tido metade das alegrias que tive nestes últimos anos sem vocês. À Rita, ao João e ao Alexandre por tudo o que vivemos. Aos amigos que a Universidade de Coimbra me deu, que tornaram a experiência de mestrado incrível. A vossa companhia, risos e apoio têm sido fundamentais para aguentar os altos e baixos que a vida académica carrega.

Por fim, quero expressar o meu agradecimento a todas as outras pessoas que não estão aqui mencionadas mas que contribuíram de várias formas para esta conquista. Cada interação, conversa e

momento partilhado contribuiu para o meu crescimento como química e como indivíduo.

Completar esta tese de mestrado foi um marco significativo na minha jornada académica e espero que daqui para diante a vida continue a trazer-me muitos sucessos!

RESUMO

O consumo dos antidepressivos (ADs) na última década tem vindo a aumentar e, portanto, a solicitação para a sua deteção em amostras biológicas no Serviço de Química e Toxicologia Forense, Delegação do Centro (SQTF-C) do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. (INMLCF, I.P.) tem sido cada vez maior. Por este motivo, é necessário que haja uma contínua evolução científica de técnicas de deteção e a respetiva validação de forma a acompanhar este crescimento. Este trabalho teve como objetivo a validação de um método analítico para determinação simultânea de 20 ADs (amitriptilina, bupropiona, citalopram, clomipramina, dosulepina, duloxetina, fluoxetina, fluvoxamina, imipramina, maprotilina, mianserina, mirtazapina, paroxetina, reboxetina, sertralina, tianeptina, trazodona, trimipramina, venlafaxina e vortioxetina) e 11 dos seus metabolitos.

O procedimento analítico para a determinação de ADs em amostras de sangue (100 μ L) envolveu uma precipitação proteica (PP) e a sua posterior análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa sequencial (LC-MS/MS), usando *Electrospray Ionization* (ESI) como fonte de ionização e deteção por *Multiple Reaction Monitoring* (MRM). Na separação cromatográfica foi utilizada uma coluna Acquity UPLC HSS T3 (100 mm x 2,1 mm, 1,8 μ m) e a fase móvel em gradiente, constituída por uma solução aquosa de formato de amónia 2 mM (com ácido fórmico 0,1 %) e metanol, com um fluxo de 0,4 mL/min e um volume de injeção de 10 μ L.

O método foi validado de acordo com as diretrizes da *Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology* da *American Academy of Forensic Science (AAFS) Standards Board (ASB)*. Os parâmetros de validação estudados incluíram: estudo das interferências, supressão iónica, linearidade, arrastamento, precisão e exatidão, limites de deteção e quantificação, integridade de diluição e estabilidade. O método demonstrou a ausência de interferentes por parte de outras substâncias e do padrão interno, com exceção da maprotilina e nortriptilina que evidenciaram interferir entre si, em particular na segunda transição iónica. A gama de trabalho escolhida demonstrou ser linear, considerando um

fator de ponderação de $1/x$, sempre com um coeficiente de correlação superior a 0,99. Não foi detetado nenhum fenómeno de arrastamento ou efeito matriz relevante. Os limites de deteção e quantificação obtidos são adequados tendo em conta a gama de trabalho estudada. No estudo da precisão (precisão intermédia e repetibilidade) e da exatidão, os resultados obtidos de coeficiente de variação (CV) foram $<20,0\%$. Para estas substâncias medicamentosas verificou-se estabilidade até às 72 h a uma temperatura ambiente e 1 semana após um processo de congelação. O estudo da integridade de diluição demonstrou ter precisão e exatidão na diluição de 1:5 (v/v).

O método analítico descrito cumpriu todos os parâmetros necessários segundo as diretrizes seguidas, pelo que se pode concluir que este foi validado e permite determinar e quantificar simultaneamente os 20 ADs e 11 dos seus metabolitos em amostras de sangue por LC-MS/MS.

Palavras-Chave: Antidepressivos; LC-MS/MS; Precipitação proteica; Sangue; Validação

ABSTRACT

The consumption of antidepressants (ADs) in the last decade has been increasing and, therefore, the request for their detection in biological samples in the Forensic Toxicology and Chemistry Service of the National Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences is also increasing. For this reason, it is necessary to have a continuous scientific evolution of detection techniques and their validation in order to keep up with this growth. This work aimed to validate an analytical method for the simultaneous determination of 20 ADs (amitriptyline, bupropion, citalopram, clomipramine, dosulepin, duloxetine, fluoxetine, fluvoxamine, imipramine, maprotiline, mianserin, mirtazapine, paroxetine, reboxetine, sertraline, tianeptine, trazodone, trimipramine, venlafaxine and vortioxetine) and 11 of their metabolites.

The analytical procedure for the determination of ADs in blood samples (100 μ L) involved a protein precipitation (PP) and its subsequent analysis by liquid chromatography coupled to sequential mass spectrometry (LC-MS/MS) using electrospray ionization (ESI) as a source of ionization and detection by multiple reaction monitoring (MRM). In the chromatographic separation, an Acquity UPLC HSS T3 column (100 mm x 2.1 mm, 1.8 μ m) was used and the mobile phase consisted of an aqueous solution of 2 mM ammonium formate (with 0.1 % formic acid) and methanol, in gradient mode, with a flow rate of 0.4 mL/min and an injection volume of 10 μ L.

The method was validated according to the Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology by the American Academy of Forensic Science (AAFS) Standards Board (ASB) guidelines. Validation parameters studied included: study of interferences, ion suppression, linearity, carryover, precision and accuracy, limits of detection and quantification, dilution integrity and stability. The method demonstrated the absence of interfering substances from other substances and from the internal standard, with the exception of maprotiline and nortriptyline, which proved to interfere with each other, particularly in the second ionic transition. The range of work chosen proved to be linear,

considering a weighting factor of $1/x$, always with a correlation coefficient greater than 0.99. No relevant carryover nor matrix effect was detected. The detection and quantification limits obtained are adequate taking into account the range of work studied. In the study of precision (intermediate precision and repeatability) and accuracy, the results obtained from the correlation coefficient (CV) were $<20.0\%$. For these substances, it was verified stability up to 72 h at room temperature and 1 week after a freezing process. The dilution integrity study demonstrated precision and accuracy at 1:5 (v/v) dilution.

The analytical method described met all the necessary parameters according to the guidelines followed, so it can be concluded that it has been validated and allows the simultaneous determination and quantification of 20 ADs and 11 of its metabolites in blood samples by LC-MS/MS.

Keywords: Antidepressants; LC-MS/MS; Protein precipitation; Blood; Validation

"Everything happens for a reason."

Greek Philosopher Aristotle

Índice

Lista de Figuras	xiv
Lista de Tabelas	xv
Glossário	xvii
Siglas	xviii
1 Introdução	2
1.1 Antidepressivos	2
1.1.1 Evolução	2
1.1.2 Epidemiologia	3
1.1.3 Classificação	4
1.1.3.1 Antidepressivos tricíclicos	7
1.1.3.2 Antidepressivos inibidores seletivos da recaptação de serotonina	12
1.1.3.3 Antidepressivos inibidores seletivos de recaptação de seroto-	
nina e norepinefrina	19
1.1.3.4 Antidepressivos atípicos	21
1.2 Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses	27
1.3 Serviço de Química e Toxicologia Forense	28
1.4 Amostras biológicas	29
2 Metodologias analíticas	30
2.1 Precipitação proteica	30
2.2 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa sequencial (LC-MS/MS) . .	31
3 Revisão bibliográfica	33
4 Objetivos	36
5 Procedimento experimental	37
5.1 Material, Reagentes e Equipamento	37
5.1.1 Padrões e Reagentes	37
5.1.2 Fases móveis do sistema LC-MS/MS	37
5.1.2.1 Fase móvel A (fase orgânica)	37
5.1.2.2 Fase móvel B (fase aquosa)	38

5.1.3	Material e Equipamento	38
5.1.4	Preparação de padrões, soluções e misturas padrão	38
5.2	Procedimento de ensaio	43
5.3	Condições do equipamento (LC-MS/MS)	43
5.3.1	Cromatografia líquida	43
5.3.2	Espectrometria de massa sequencial	44
5.4	Validação do método	47
5.4.1	Estudo de interferências	47
5.4.2	Supressão iônica	49
5.4.3	Linearidade	50
5.4.4	Arrastamento	50
5.4.5	Precisão	51
5.4.6	Exatidão	51
5.4.7	Limiares analíticos	52
5.4.8	Diluição	52
5.4.9	Estabilidade	53
6	Resultados e Discussão	55
6.1	Estudo do padrão de fragmentação dos antidepressivos	55
6.2	Parâmetros da validação	58
6.2.1	Estudo de interferências	58
6.2.2	Supressão iônica	58
6.2.3	Linearidade	58
6.2.3.1	Homogeneidade	58
6.2.3.2	Fatores de ponderação	61
6.2.3.3	Linearidade	62
6.2.4	Arrastamento	65
6.2.5	Precisão	66
6.2.6	Exatidão	68
6.2.7	Limiares analíticos	69
6.2.7.1	Teste ao LQ	70
6.2.8	Diluição	76
6.2.9	Estabilidade	77
6.2.9.1	Estabilidade à temperatura ambiente	77
6.2.9.2	Estabilidade após um processo de congelação	78

7	Aplicação do método a casos forenses	79
8	Conclusões e Perspetivas futuras	81
	Bibliografia	83
A	Controlo alto	94
B	Estudo das interferências	98
C	Arrastamento	111
D	Linearidade	113
	D.1 Homogeneidade	114
	D.2 Fatores de ponderação	118
	D.3 Linearidade	135
E	Estabilidade	167

Lista de Figuras

1.1	Estrutura química da monoamina norepinefrina 1.1a e da serotonina 1.1b.	3
1.2	Mecanismo de ação das classes de antidepressivos, adaptado de [10]. Os círculos azuis representam a serotonina e os quadrados verdes a norepinefrina. Os ISRS inibem a recaptação da serotonina e os TCA e ISRSN a recaptação da serotonina e norepinefrina.	6
1.3	Estrutura química da amitriptilina (a) e da nortriptilina (b).	9
1.4	Estrutura química da clomipramina (a) e da desmetilclomipramina (b).	10
1.5	Estrutura química da dosulepina (a) e da desmetildosulepina (b).	10
1.6	Estrutura química da imipramina.	11
1.7	Estrutura química da maprotilina.	12
1.8	Estrutura química da trimipramina (a) e da desmetiltrimipramina (b).	13
1.9	Estrutura química do citalopram (a) e do desmetilcitalopram (b).	15
1.10	Estrutura química da fluoxetina (a) e da desmetilfluoxetina (b).	16
1.11	Estrutura química da fluvoxamina.	16
1.12	Estrutura química da paroxetina.	17
1.13	Estrutura química da sertralina (a) e da desmetilsertralina (b).	18
1.14	Estrutura química da vortioxetina.	19
1.15	Estrutura química da duloxetina.	21
1.16	Estrutura química da venlafaxina (a) e da desmetilvenlafaxina (b).	22
1.17	Estrutura química da bupropiona.	22
1.18	Estrutura química da mianserina (a) e da desmetilmianserina (b).	23
1.19	Estrutura química da mirtazapina (a) e da desmetilmirtazapina (b).	24
1.20	Estrutura química da reboxetina.	25
1.21	Estrutura química da tianeptina.	26
1.22	Estrutura química da trazodona (a) e do m-CPP (b).	27
2.1	Esquema representativo do processo extrativo por precipitação proteica	31
2.2	Esquema do funcionamento de um analisador de massa triplo quadrupolo.	32
5.1	Equipamento LC-MS/MS Sciex	39

Lista de Tabelas

1.1	Evolução do consumo dos antidepressivos em Portugal entre 2000 e 2012, adaptado de [7].	4
1.2	Antidepressivos comercializados em Portugal e validados neste trabalho * metabolitos, # antidepressivo tetracíclico nor \equiv desmetil	5
1.3	Propriedades físico-químicas e concentrações terapêuticas, tóxicas e letais dos medicamentos em estudo [11] [12] [13].	6
3.1	Revisão da literatura sobre a validação de métodos para determinação de ADs em diferentes amostras biológicas, com informação ao volume de amostra, o tipo de amostra, à técnica de extração e analítica e o seu modo de ionização assim como o limite de deteção e o limite de quantificação obtido.	34
5.1	Preparação das soluções padrão dos ADs. Código SP - solução padrão, xxx - número de identificação da substância, CR/LG/TR - código de identificação da marca do fornecedor (Cerilliant, LGC e TRC), xxx - numeração correspondente à preparação de uma nova solução padrão	39
5.2	Preparação da mistura padrão (MP) utilizada para a realização das curvas de calibração e controlos.	40
5.3	Volumes e respetivas concentrações dos ADs para realizar a curva de calibração. . .	41
5.4	Procedimento analítico da preparação das amostras biológicas.	43
5.5	Condições experimentais utilizadas na determinação dos ADs selecionados e do padrão interno: tempo de retenção (min), valores da primeira e segunda transições, potencial de desagregação (DP), potencial de entrada (PE), energia de colisão (CE) e potencial de saída da célula de colisão (CXP).	45
5.6	Misturas de sangue utilizadas no estudo das interferências.	48
5.7	Concentração dos controlos utilizados para testar o limite de quantificação.	53

6.1	Identificação das fórmulas químicas do ião molecular e dos fragmentos da 1 ^o e 2 ^o transições de todos os ADs [94].	56
6.2	Efeito matriz na gama alta e baixa de cada substância	59
6.3	Valores do teste de Fischer e de Cochran para um nível de confiança de 99 %, para cada AD	60
6.4	Resumo dos resultados do estudo da linearidade de cada AD	63
6.5	Resultados do estudo do arrastamento.	65
6.6	Resultados da precisão intermédia	67
6.7	Resultados da repetibilidade	68
6.8	Resultados da exatidão	69
6.9	Resumo dos resultados obtidos no estudo dos limites de deteção e quantificação. . .	69
6.10	Resultados no teste do limite de quantificação.	71
6.11	Tempo de retenção relativo dos AD nas misturas de sangue.	72
6.12	Diferença relativa dos TRR entre os ADs e o controlo nas misturas de sangue, em percentagem.	73
6.13	Tolerância máxima para as áreas relativas das transições iónicas.	74
6.14	Área relativa do controlo, em percentagem, das respetivas substâncias e a tolerância mínima e máxima correspondente.	74
6.15	Áreas relativas das transições iónicas, em percentagem, das respetivas substâncias. .	75
6.16	Resultados do estudo da integridade da diluição.	76
7.1	Concentrações sanguíneas de ADs nos casos reais analisados.	79

GLOSSÁRIO

Agonista É uma molécula que pode ligar e ativar um recetor para induzir uma reação biológica.

Antagonista O inverso de agonista. É uma molécula que inibe a resposta biológica induzida por um agonista.

Farmacocinética É a ciência que estuda a ação do organismo sobre o medicamento.

Farmacodinâmica É a ciência que estuda a ação do medicamento sobre o organismo.

SIGLAS

AD antidepressivo

CID dissociação induzida por colisão

CPIC *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium* - Sigla Inglesa

CV coeficiente de variação

ESI *Electrospray Ionization* - Sigla Inglesa

FDA *Food and Drug Administration*

GC-MS cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa

IMAO antidepressivos inibidores da monoaminoxidase

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

IPST Instituto Português do Sangue e Transplantação

ISRN inibidores seletivos da recaptção de norepinefrina

ISRS inibidores seletivos da recaptção de serotonina

ISRSN inibidores seletivos da recaptção de serotonina-norepinefrina

LC cromatografia líquida

LC-MS/MS cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa sequencial

LD Limite de deteção

LLE *Liquid-Liquid Extraction* - Sigla Inglesa

LQ Limite de quantificação

m-CPP meta-clorofenilpiperazina

MP mistura padrão

MRM *Multiple Reaction Monitoring* - Sigla Inglesa

NET *norepinephrine transporter* - Sigla Inglesa

OMS Organização Mundial da Saúde

PI padrão interno

PP precipitação proteica

SERT *serotonin transporter* - Sigla Inglesa

SIM *selected ion monitoring* - Sigla Inglesa

SPE *Solid-Phase Extraction* - Sigla Inglesa

SPME *Solid-Phase Micro-Extraction* - Sigla Inglesa

SQTF-C Serviço de Química e Toxicologia Forense, Delegação do Centro

TCA antidepressivos tricíclicos

TRR tempo de retenção relativo

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1 Antidepressivos

1.1.1 Evolução

A descoberta dos ADs em 1954, revolucionou a área da psiquiatria, ao tratar um dos problemas mais frequentes no mundo atual, nomeadamente em Portugal, causando um importante impacto social e económico.

A depressão é um transtorno mental depressivo grave, que afeta o nosso humor, a forma como nos sentimos, como agimos e pensamos [1] e os sintomas mais comuns desta doença são humor depressivo, mudanças no apetite, dificuldade em dormir ou dormir demasiado, perda de energia, o desejo da morte, entre outros, mais ou menos graves [1]. Muitos destes sintomas podem ser aliviados e até mesmo tratados com a medicação psicotrópica adequada, contudo os ADs podem também ser indicados para outro tipo de doenças como é o caso de problemas de ansiedade e outras doenças psicóticas [2]. Ainda que o diagnóstico e tratamento desta doença se tenha desenvolvido exponencialmente nos últimos anos, existem numerosos casos em que a doença não é tratada adequadamente, seja por serem administradas doses subterapêuticas ou pelo tratamento ser feito com medicamentos ineficazes para a depressão, como é o caso de ansiolíticos [3].

Por definição, os ADs são medicamentos com a ação comprovada para o tratamento da doença da depressão, permitindo uma recuperação muito mais eficaz e rápida [3]. As primeiras classes a serem descobertas, acidentalmente, foram os antidepressivos tricíclicos (TCA) e os antidepressivos inibidores da monoaminoxidase (IMAO), as quais deram o nome de ADs de primeira-geração. A depressão sempre esteve associada ao défice do neurotransmissor norepinefrina e serotonina, figura 1.1a e 1.1b

e por isso o mecanismo de ação dos ADs de primeira-geração interfere com a concentração destes neurotransmissores ao nível da fenda sináptica [3] [2], ao inibirem a monoaminoxidase no caso da classe dos IMAO ou os *serotonin transporter* (SERT) e *norepinephrine transporter* (NET) no caso da classe dos TCA [2].



Figura 1.1: Estrutura química da monoamina norepinefrina 1.1a e da serotonina 1.1b.

Estas classes de ADs atuam em diversos recetores, como os de serotonina (5-hidroxitriptamina (5-HT)), norepinefrina (noradrenalina), histamina, acetilcolina, epinefrina e tiramina. No entanto, a interação com alguns destes recetores pode levar a efeitos secundários indesejados e por vezes graves. Neste contexto, surgiu uma nova geração de ADs para atuar seletivamente nos neurotransmissores serotonina e/ou norepinefrina, e diminuir alguns dos efeitos adversos presentes nos antidepressivos tricíclicos [4]. A nova geração envolve as seguintes classes: inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRS), inibidores seletivos da recaptção de serotonina-norepinefrina (ISRSN) e antidepressivos atípicos. Esta descoberta fez com que a prescrição dos IMAO e TCA caísse drasticamente a nível mundial [5].

1.1.2 Epidemiologia

Nesta secção vai ser exposta a epidemiologia e as estatísticas sobre a depressão e os ADs. Entre 2005 e 2015, houve um aumento de 18,4 % no número de pessoas a sofrerem com depressão, e existem evidências de que esta doença é mais predominante no sexo feminino (5,1 %) do que no sexo masculino (3,6 %). A nível mundial, estima-se que 4,4 % da população sofre com algum transtorno depressivo [6].

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), no ano de 2017, Portugal, juntamente com a Grécia, teve a segunda maior percentagem de população na Europa a sofrer de depressão (5,7 %). Apenas a Ucrânia, a Austrália, os EUA e o Brasil ultrapassaram o nosso país [6].

De acordo com o INFARMED, no relatório da Evolução do Consumo de Psicofármacos do consumo em Portugal Continental (2000 a 2012), houve um aumento da utilização de antipsicóticos e ADs, na última década. A sertralina e o citalopram foram as substâncias ativas que sofreram o aumento mais acentuado, a seguir à fluoxetina e paroxetina. Apesar destes quatro serem os mais consumidos, a

venlafaxina, a trazodona, a mirtazapina e a duloxetina aparecem no gráfico da evolução das principais substâncias ativas entre 2000 e 2009. Na tabela 1.1 está indicada a evolução do consumo dos antidepressivos em Portugal entre 2000 e 2012 [7].

Tabela 1.1: Evolução do consumo dos antidepressivos em Portugal entre 2000 e 2012, adaptado de [7].

Ano	Dose diária definida de antidepressivos por 1000 habitantes
2000	26
2012	88
Variação (2000 - 2012), em %	240 %

Mais recentemente, o Centro de Informação de Antivenenos publicou o boletim estatístico de 2021, onde é reportado que o grupo Ansiolíticos/Antidepressivos/Antipsicóticos foi o grupo que mais causou intoxicações medicamentosas (37,5 %) [8].

Uma vez que a maioria dos casos de intoxicações em Portugal foram causadas pelo consumo de ADs e antipsicóticos, a determinação destes grupos em amostras biológicas estão incluídos na perícia laboratorial do SQTFC do INMLCF, I.P., sendo por isso relevante a melhoria constante de técnicas de extração e de deteção destas substâncias.

1.1.3 Classificação

Os antidepressivos podem ser classificados de acordo com a sua estrutura química ou de acordo com o seu mecanismo de ação. Segundo o seu mecanismo de ação, estes podem estar divididos em 5 classes de ADs, já referidos anteriormente: TCA, IMAO, ISRS, ISRSN e antidepressivos atípicos.

Este trabalho foca-se em 20 ADs e 11 dos seus metabolitos, apresentados na tabela 1.2, divididos em 4 das classes mencionadas. Esta lista é representativa dos ADs que mais são consumidos pelos portugueses e nesta não estão incluídos quaisquer ADs da classe IMAO uma vez que nunca foram comercializados em Portugal devido à possibilidade de provocarem uma crise hipertensiva, apesar de demonstrarem uma boa eficácia. Apenas existem dois medicamentos que estão disponíveis em Portugal da classe IMAO, o moclobemida e o pirlindol, pois foram desenvolvidos para serem mais seletivos e consequentemente apresentam um menor risco de crises hipertensivas [9].

Neste subcapítulo será abordada a farmacocinética, farmacodinâmica e interações medicamentosas de quatro classes de ADs, nomeadamente “Antidepressivos tricíclicos”, “Antidepressivos inibidores seletivos da recaptção de serotonina”, “Antidepressivos inibidores seletivos da recaptção de serotonina e norepinefrina” e “Antidepressivos atípicos”. Informação sobre as substâncias ativas e respetivos metabolitos validados será igualmente incluída.

Tabela 1.2: Antidepressivos comercializados em Portugal e validados neste trabalho

* metabolitos, # antidepressivo tetracíclico

nor ≡ desmetil

Classificação	Substância ativa/Metabolito
Antidepressivos tricíclicos (TCA)	Amitriptilina Clomipramina Desmetilclomipramina* Dosulepina Desmetildosulepina* Imipramina Maprotilina # Nortriptilina* Trimipramina Desmetiltrimipramina*
Inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS)	Citalopram Desmetilcitalopram* Fluoxetina Desmetilfluoxetina* Fluvoxamina Paroxetina Sertralina Desmetilsertralina* Vortioxetina
Inibidores seletivos da recaptação de serotonina e norepinefrina (ISRSN)	Duloxetina Venlafaxina Desmetilvenlafaxina*
Antidepressivos atípicos	Bupropiona Mianserina Desmetilmianserina* Mirtazapina Desmetilmirtazapina* Reboxetina Tianeptina Trazodona m-CPP*

Na figura 1.2 está apresentado um esquema simplificado do mecanismo de ação de três destas classes de ADs. O mecanismo de ação dos ADs atípicos será descrito em mais detalhe posteriormente.

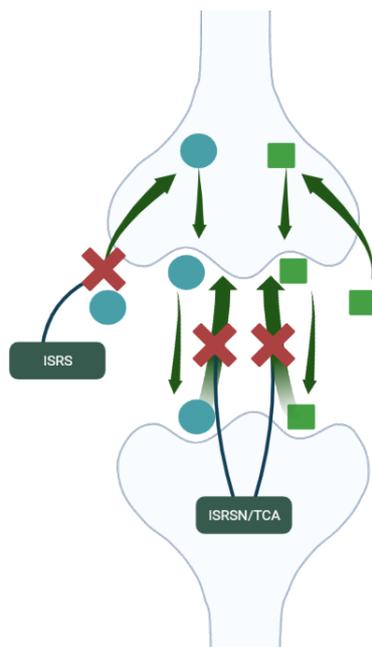


Figura 1.2: Mecanismo de ação das classes de antidepressivos, adaptado de [10]. Os círculos azuis representam a serotonina e os quadrados verdes a norepinefrina. Os ISRS inibem a recaptação da serotonina e os TCA e ISRSN a recaptação da serotonina e norepinefrina.

Na tabela 1.3 estão resumidas algumas propriedades físico-químicas e as concentrações terapêuticas, tóxicas e letais de cada substância.

Tabela 1.3: Propriedades físico-químicas e concentrações terapêuticas, tóxicas e letais dos medicamentos em estudo [11] [12] [13].

Substância	Fórmula molecular	Massa Molar (g/mol)	[Terapêutica] (ng/mL)	[Tóxica] (ng/mL)	[Letal] (ng/mL)
Amitriptilina	$C_{20}H_{23}N$	277,4	50-300	500-600	1500-2000
Bupropiona	$C_{13}H_{18}ClNO$	239,7	100-200	1200-2000	4000
Citalopram	$C_{20}H_{21}FN_2O$	324,4	50-110	220-2450	3400-10500
Desmetilcitalopram	$C_{19}H_{19}FN_2O$	310,4	-	-	-
Clomipramina	$C_{19}H_{23}ClN_2$	314,9	90-250	400-600	1000-2000
Desmetilclomipramina	$C_{18}H_{21}ClN_2$	300,8	-	-	580-2840
Dosulepina	$C_{19}H_{21}NS$	295,4	45-100	200-800	300-5800
Desmetildosulepina	$C_{18}H_{19}NS$	281,4	-	-	-
Duloxetina	$C_{18}H_{19}NOS$	297,4	30-120	240	-
Fluoxetina	$C_{17}H_{18}F_3NO$	309,3	120-500	1000	2200
Desmetilfluoxetina	$C_{16}H_{16}F_3NO$	295,3	-	-	-
Fluvoxamina	$C_{15}H_{21}F_3N_2O_2$	318,3	60-230	500-650	2800
Imipramina	$C_{19}H_{24}N_2$	280,4	50-350	500-1000	1500-2000

Tabela 1.3 continuação da página anterior

Substância	Fórmula molecular	Massa Molar (g/mol)	[Terapêutica] (ng/mL)	[Tóxica] (ng/mL)	[Letal] (ng/mL)
Maprotilina	C ₂₀ H ₂₃ N	277,4	75-130	500-1000	1000-5000
Mianserina	C ₁₈ H ₂₀ N ₂	264,4	15-70	140	1600
Desmetilmianserina	C ₁₇ H ₁₈ N ₂	250,4	-	-	-
Mirtazapina	C ₁₇ H ₁₉ N ₃	265,4	30-80	160	2000-3000
Desmetilmirtazapina	C ₁₆ H ₁₇ N ₃	251,4	-	-	-
Nortriptilina	C ₁₉ H ₂₁ N	263,4	70-170	300-500	1000-3000
Paroxetina	C ₁₉ H ₂₀ FNO ₃	329,4	20-65	120-400	1200
Reboxetina	C ₁₉ H ₂₃ NO ₃	313,4	60-350	700	-
Sertralina	C ₁₇ H ₁₇ Cl ₂ N	306,2	50-250	290-300	1100-1500
Desmetilsertralina	C ₁₆ H ₁₅ Cl ₂ N	292,2	-	-	-
Tianeptina	C ₂₁ H ₂₅ ClN ₂ O ₄ S	437,0	30-80	160	5100
Trazodona	C ₁₉ H ₂₂ ClN ₅ O	371,9	700-1000	1200	9000
m-CPP	C ₁₀ H ₁₃ ClN ₂ O	196,7	-	-	-
Trimipramina	C ₂₀ H ₂₆ N ₂	294,4	150-300	600	1700-8200
Desmetiltrimipramina	C ₁₉ H ₂₄ N ₂	280,4	-	-	-
Venlafaxina	C ₁₇ H ₂₇ NO ₂	277,4	100-400	800	3200-24000
Desmetilvenlafaxina	C ₁₆ H ₂₅ NO ₂	263,4	100-400	800	-
Vortioxetina	C ₁₈ H ₂₂ N ₂ S	298,4	6-40	80	-

1.1.3.1 Antidepressivos tricíclicos

O nome desta classe surgiu da sua estrutura química de três anéis e uma cadeia lateral crucial para a sua função e atividade. Esta classe pode ser dividida em aminas terciárias (amitriptilina, clomipramina, dosulepina, imipramina e trimipramina) ou em aminas secundárias (nortriptilina e maprotilina) [14].

• **Farmacodinâmica:** O mecanismo de ação desta classe está diretamente relacionado com o bloqueio da recaptação de neurotransmissores, mais concretamente a serotonina e a norepinefrina, aumentando a concentração destes na fenda sináptica. A recaptação de neurotransmissores na fenda sináptica envolve transportadores como o SERT, no caso da serotonina ou o NET, no caso da norepinefrina. Um detalhe importante, é que para existir algum tipo de efeito antidepressor, os SERT têm de estar 70 a 80 % saturados [15].

Neste ponto, as aminas terciárias são geralmente mais potentes no bloqueio da recaptação da serotonina e as aminas secundárias são mais potentes no bloqueio da recaptação da norepinefrina [14]

[16]. É interessante também referir que a amitriptilina (amina terciária) apresenta inibição para a recaptção de ambos neurotransmissores, contudo o seu metabolito, nortriptilina (amina secundária) são mais eficazes na recaptção de apenas uma das monoaminas, a norepinefrina [17].

Para além do efeito antidepressivo, estas substâncias são ainda responsáveis pela atividade antagonista em variados recetores no sistema nervosa central, por exemplo os recetores muscarínicos e os recetores da acetilcolina e histamina, o que pode explicar os elevados efeitos adversos ou efeitos secundários, como a obstipação, suores, boca seca, sedação e ganho de peso [3] [18].

• **Farmacocinética:** Conforme o *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium* (CPIC), a farmacocinética dos vários antidepressivos tricíclicos é semelhante [14], existindo poucas diferenças, residindo estas sobretudo nos efeitos secundários que apresentam [3].

Todos os TCA são absorvidos rapidamente após a sua administração oral e conseguem ligar-se fortemente aos tecidos extra vasculares, tendo como consequência um volume de distribuição muito elevado, entre 10 a 50 L/kg⁻¹. A capacidade de metabolização desta classe de ADs na população depende bastante de alguns fatores como por exemplo, a idade, a tolerância, algumas patologias e o peso. Isto leva a uma diferença importante de pessoa para pessoa na sua relação com as doses terapêuticas e tóxicas assim como aos seus efeitos secundários [19]. A maioria dos TCA têm um tempo de meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$ de eliminação) entre 10 a 50 horas.

• **Interações medicamentosas:** Os ADs desta classe têm contraindicações semelhantes, como é o caso do tratamento destes em simultâneo com outros ADs da classe IMAO. Esta toma simultânea pode causar síndrome de serotonina, caracterizada por sintomas como a agitação, confusão, tremor, mioclonia e hipertermia. Caso o tratamento envolva esta classe de ADs, é recomendado a paragem de 14 dias da utilização de antidepressivos IMAO [20]. Para além dos IMAO, é também de evitar a toma conjunta de ISRS [21]. Para além disto, os antidepressivos tricíclicos podem potenciar os efeitos do álcool e de outras substâncias depressoras do sistema nervoso central como é o caso de benzodiazepinas [22].

Amitriptilina/Nortriptilina

A amina terciária, amitriptilina, figura 1.3a é bastante utilizada para tratar a insónia devido aos seus efeitos sedativos [19].

A metabolização da amitriptilina é bastante extensiva, ocorre no fígado e tem como principal metabolito ativo a nortriptilina, figura 1.3b, outro antidepressivo tricíclico que é validado neste trabalho. Acredita-se que os efeitos antidepressivos da amitriptilina se devem ao seu principal metabolito. Cerca

de 35 % da amitriptilina é excretada sob a forma de metabolitos e 0,2 % eliminada sem sofrer metabolização. O tempo de meia-vida de eliminação da amitriptilina é de cerca de 16 h e da nortriptilina de 30 h [23].

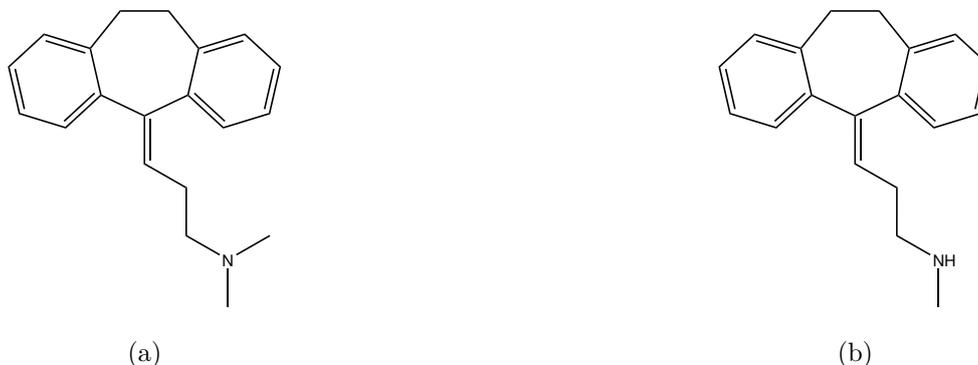


Figura 1.3: Estrutura química da amitriptilina (a) e da nortriptilina (b).

• **Comercialização:** O nome comercial da amitriptilina é ADT[®], está disponível em Portugal em comprimidos revestidos de cor amarela pálido ou acastanhada e comprimidos de libertação modificada, com dosagens de 10, 25 e 75 mg [24]. Existem ainda outros nomes comerciais como Elavil[®], Endep[®], Lentizol[®], entre outros [20]. A nortriptilina tem o nome comercial de Nortero1[®][24]. Ambas são comercializadas em forma de cloridrato.

Clomipramina/Desmetilclomipramina

A clomipramina, figura 1.4a, é um análogo da imipramina, em que o hidrogénio é substituído pelo cloro num dos seus anéis aromáticos.

Relativamente à sua farmacocinética, a clomipramina é completamente absorvida e ao fim de 14 dias, 92 % é eliminada sob a forma de metabolitos pela urina e fezes. O metabolito principal é a desmetilclomipramina, figura 1.4b, formado através da uma reação de N-desmetilação. O tempo de meia-vida de eliminação da clomipramina é de cerca de 32 h [25].

• **Comercialização:** Em Portugal está autorizada a comercialização de comprimidos revestidos 10 e 25 mg, solução injetável 25 mg/ 2 mL ou comprimidos de libertação prolongada 75 mg. O seu nome comercial é Anafranil[®]e os comprimidos contém cloridrato de clomipramina [22]. O metabolito ativo desmetilclomipramina não é comercializado.

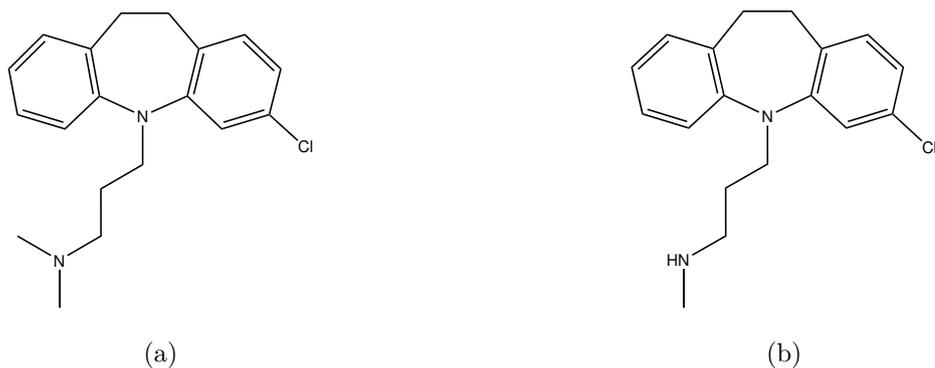


Figura 1.4: Estrutura química da clomipramina (a) e da desmetilclomipramina (b).

Dosulepina/Desmetildosulepina

Esta substância, também conhecida com dotiepina, figura 1.5a, tem uma estrutura relativamente semelhante à amitriptilina e começou a ser utilizada clinicamente em 1963 [23]. A dosulepina para além de inibir a recaptção de serotonina e norepinefrina, também inibe a recaptção da dopamina [26].

Sabe-se que a dosulepina é metabolizada através de reações de N-desmetilação, sulfoxidação e hidroxilação. Relativamente à sua excreção, em 24 h, cerca de metade é eliminada pela urina e 15 % pelas fezes, sob a forma de metabolitos, incluindo a desmetildosulepina [26] [23], figura 1.5b. O tempo de meia-vida de eliminação é de cerca de 22 h [25].

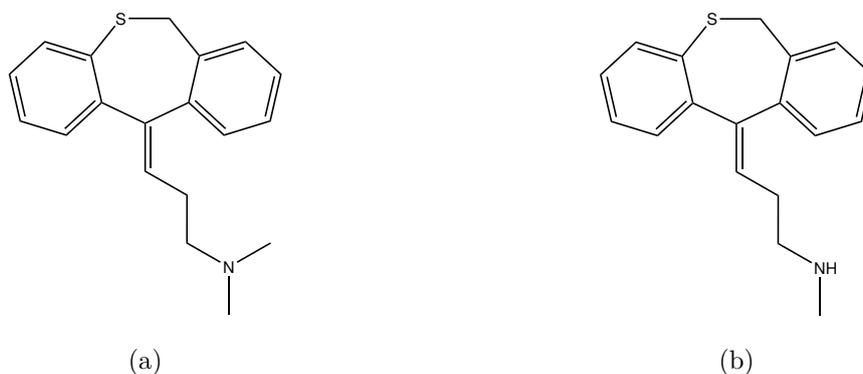


Figura 1.5: Estrutura química da dosulepina (a) e da desmetildosulepina (b).

• **Comercialização:** O nome comercial em Portugal é Protiadene[®] e apenas está disponível em comprimidos revestidos de 75 mg, de acordo com o INFARMED [24]. O metabolito não está disponível para comercializar.

Imipramina

A imipramina, figura 1.6, é uma das substâncias dos TCA que mais tem sido utilizada para o tratamento da depressão. Para além de tratar a depressão e melhorar o humor, o apetite e o sono, este AD pode ser utilizado para tratar a enurese em crianças.

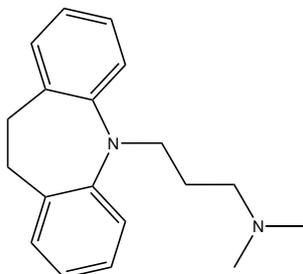


Figura 1.6: Estrutura química da imipramina.

A imipramina é principalmente metabolizada pela proteína enzimática P450 2C19 e posteriormente pela P450 2D6, para formar o metabolito ativo desipramina [14]. A imipramina é metabolizada ainda por N-desmetilação, N-oxidação, N-desaquilação e 2- e 10-hidroxilação que, conseqüentemente, formam pelo menos mais 20 metabolitos. Cerca de 70 % de uma dose é excretada na urina, 22 % nas fezes e 0,3 % da dose é eliminada sem sofrer metabolização. Tem um tempo de meia-vida de eliminação de cerca de 12 h [23].

• **Comercialização:** Em Portugal é comercializado cloridrato de imipramina na forma de comprimido revestido avermelhado de 10 mg ou 25 mg, com o nome comercial de Trofanil[®].

Maprotilina

A maprotilina, figura 1.7, apesar de não ser um composto tricíclico mas sim tetracíclico, inclui-se nesta classe devido às semelhanças das propriedades terapêuticas deste grupo. Este é utilizado para o tratamento da depressão, mas também no tratamento da ansiedade, que muitas vezes acompanha a depressão [27].

A maprotilina é estrutural e farmacologicamente diferente dos antidepressivos tricíclicos, uma vez que apesar de exercer um efeito inibidor potente e seletivo sobre a recaptação de norepinefrina nos neurónios pré-sinápticos, não aparenta ter um efeito inibidor sobre a recaptação de serotonina [28]. Para além disto, apresenta ainda uma ação antihistamínica e anticolinérgica [27].

Apesar da absorção desta substância ser lenta, é completamente absorvida. Relativamente à sua metabolização, a maprotilina transforma-se em desmetilmaprotilina, uma substância farmacologica-

mente ativa. A eliminação é feita principalmente através da urina e fezes sob a forma de metabolitos livres ou conjugados e tem um tempo de meia-vida de eliminação de 51 h [25] [28].

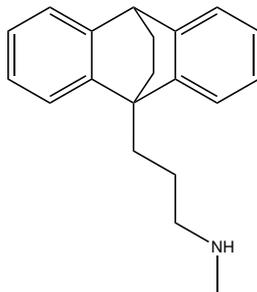


Figura 1.7: Estrutura química da maprotilina.

- **Comercialização:** Em Portugal existe o Ludiomil[®] e a Maprotilina Ratiopharm[®] em forma de comprimidos revestidos por película avermelhados em três dosagens: 25, 50 e 75 mg. A substância ativa deste é cloridrato de maprotilina e o seu metabolito não é comercializado.

Trimipramina/Desmetiltrimipramina

A trimipramina, figura 1.8a, é uma das primeiras opções para o tratamento de depressão, especialmente quando a sedação é necessária. É um TCA semelhante à imipramina com a diferença de apresentar mais propriedades antihistamínicas e sedativas [29].

O mecanismo de ação deste TCA é diferente dos restantes, uma vez que este apenas reduz e não bloqueia a recaptção da serotonina, norepinefrina e dopamina [29]. Relativamente à sua farmacocinética, a trimipramina passa a barreira hemato-encefálica e é metabolizada a nível hepático, formando o seu principal metabolito, desmetiltrimipramina, figura 1.8b. A sua eliminação é maioritariamente feita pela urina [30]. Para além da desmetiltrimipramina, são conhecidos outros 9 metabolitos [23]. O tempo de meia-vida de eliminação da trimipramina é de cerca de 16 h [25].

A trimipramina e o seu metabolito ativo são uns dos ADs que possuem um centro quiral mas a sua comercialização é feita como mistura racémica [31].

- **Comercialização:** Em Portugal é comercializado Surmontil[®] em forma de comprimidos com duas dosagens diferentes, a 25 e 100 mg. A substância ativa de cada comprimido é maleato de trimipramina, em que 35 mg deste equivale a 25 mg de trimipramina [30].

1.1.3.2 Antidepressivos inibidores seletivos da recaptção de serotonina

Esta classe de ADs permite evidenciar que a classificação feita se baseia na natureza do mecanismo de ação e não na semelhança das estruturas químicas. Enquanto os TCA têm estruturas bastante

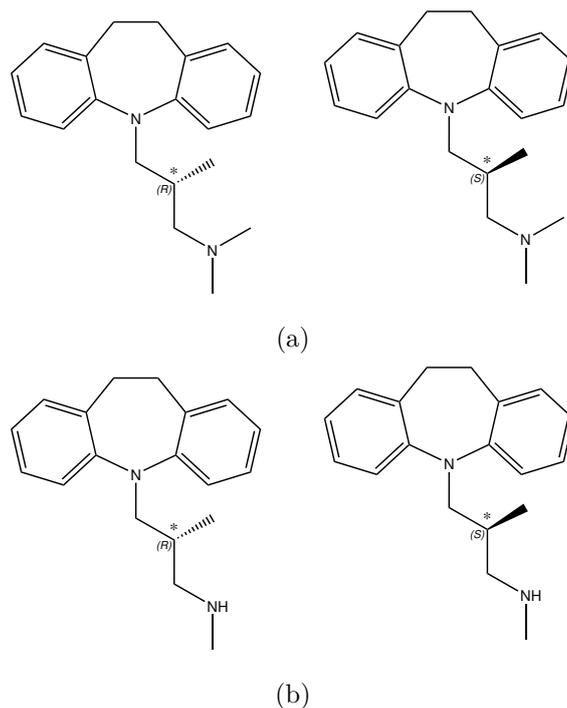


Figura 1.8: Estrutura química da trimipramina (a) e da desmetiltrimipramina (b).

semelhantes, estes antidepressivos têm em comum o tipo de ação farmacológica.

• **Farmacodinâmica:** Depois do aparecimento dos antidepressivos tricíclicos, e com o objetivo de desenvolver antidepressivos mais eficazes, mais toleráveis e com menos efeitos secundários, apareceu uma nova classe. O seu mecanismo de ação baseia-se na inibição seletiva da recaptação da serotonina e tem muito pouco efeito sobre a norepinefrina e a dopamina. Para além disso é desprovida de ação sobre alguns recetores, por exemplo os recetores α -adrenérgicos e recetores muscarínicos, levando a uma menor incidência de ações adversas, comparativamente aos antidepressivos tricíclicos, nomeadamente a sedação. Os efeitos colaterais estão relacionados com sua ação química, ou seja, efeitos serotoninérgicos, como insónia, náuseas, vômitos, diarreia, ansiedade, agitação, tremor e disfunção sexual, associados à atividade com alguns recetores da serotonina [3] [32].

• **Farmacocinética:** As substâncias desta classe têm um mecanismo de ação semelhante, mas uma farmacocinética bastante diferente, destacando-se o tempo de meia-vida de eliminação [3]. Isto é esperado, uma vez que os ISRS, ao contrário dos TCA, apresentam grandes diferenças na sua estrutura química [33]. Para além disto, a vortioxetina e a paroxetina dão origem a metabolitos inativos, enquanto a fluoxetina, a sertralina e o citalopram dão origem a metabolitos farmacologicamente ativos [34].

• **Interações medicamentosas:** Relativamente às interações medicamentosas, têm sido comprovadas algumas com antidepressivos tricíclicos, benzodiazepinas, carbamazepina e metadona [3]. Medicamentos com atividade sobre o citocromo P450: CYP2D6, CYP2C19, CYP1A2 e CYP3A3/4 poderá resultar na redução da eficácia e aumento da toxicidade do medicamento [3] [35]. A fluoxetina e a paroxetina atuam com mais eficácia no CYP3A3/4 comparativamente à fluvoxamina, deste modo, o risco de interações com substâncias que atuam nessa mesma isoenzima é maior para as primeiras [3]. Há registos de interações medicamentosas com os antidepressivos IMAO, aumentando o risco de síndrome de serotonina, à semelhança dos antidepressivos tricíclicos [3].

Citalopram/Desmetilcitalopram

O citalopram, figura 1.9a, é indicado para o tratamento da depressão, perturbação de pânico e perturbação obsessivo-compulsiva em adultos [36] [37]. Esta substância foi incluída na lista modelo de medicamentos essenciais da OMS para o tratamento da depressão [38].

O citalopram tem uma absorção bastante rápida, da sua metabolização resulta o seu principal metabolito, figura 1.9b, e a eliminação é feita principalmente através da urina, em que apenas 12 a 23 % é a substância não metabolizada. O desmetilcitalopram apesar de também ser um ISRS, tem uma atividade farmacológica menor [37].

O citalopram assim como o seu metabolito apresentam quiralidade mas a sua venda é feita como uma mistura racémica, tendo sido essa a sua forma original de venda.

• **Comercialização:** De acordo com os dados do INFARMED, na página de pesquisa de medicamentos, apenas existem medicamentos genéricos para comercialização em Portugal, com dosagens de 10, 20 e 40 mg de bromidrato de citalopram. Fora de Portugal, os seus nomes comerciais podem ser Celexa[®] e Cipramil[®][24]. Para além da via de administração oral, existe também um injetável com uma dosagem de 10 mg/5 mL contudo esta não está disponível em Portugal. O (S)-citalopram, também denominado de escitalopram, com maior poder de ação que também está disponível para comercialização no nosso país.

Fluoxetina/Desmetilfluoxetina

A fluoxetina, figura 1.10a, foi a primeira da sua classe a ser descoberta [39]. Ao contrário do que acontece com os ADs mencionados até agora, a fluoxetina não provoca sedação e pode ser utilizada para o tratamento da depressão, perturbação obsessivo-compulsiva e bulimia nervosa [40]. A fluoxetina é bem absorvida via oral e é metabolizada no fígado num metabolito ativo, a desmetilfluoxetina, figura 1.10b, e menos de 10 % da fluoxetina é excretada pela urina sem sofrer quaisquer alterações [3] [23].

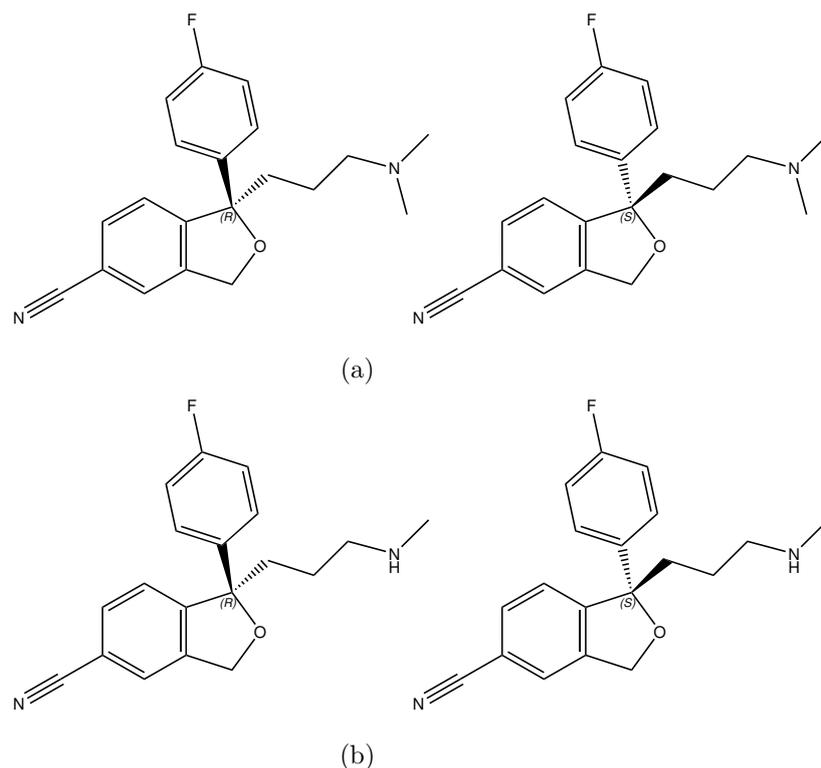


Figura 1.9: Estrutura química do citalopram (a) e do desmetilcitalopram (b).

Tanto a fluoxetina como a desmetilfluoxetina têm um tempo de meia-vida bastante longo: 4 a 6 dias e 4 a 16 dias, respetivamente [24]. Sobre a sua estabilidade, sabe-se que a fluoxetina é estável no plasma tanto a 5 °C como a -20 °C até 12 semanas mas observa-se degradação de cerca de 20 % quando exposta à temperatura ambiente [23].

Tanto a fluoxetina como o seu metabolito apresentam quiralidade mas a sua venda é feita como uma mistura racémica [31]. A questão da venda individual de enantiómeros foi levantada, uma vez que o (S)-fluoxetina apresenta algumas vantagens como um tempo de ação mais elevado, uma redução dos efeitos secundários, entre outros [31].

• **Comercialização:** De acordo com o INFARMED, em Portugal existem 2 nomes comerciais para a fluoxetina, Psipax® e Prozac® e outros genéricos. Apesar da desmetilfluoxetina ser um metabolito ativo, esta não é comercializada em Portugal. Em 2011, de acordo com o INFARMED, a fluoxetina foi a 39ª substância com um maior número de vendas [41].

Fluvoxamina

A fluvoxamina, figura 1.11, é uma substância que é utilizada maioritariamente para os distúrbios obsessivos compulsivos, problemas de ansiedade e também para casos de bulimia nervosa. Esta substância foi autorizada pela primeira vez em Portugal em 1985 [42].

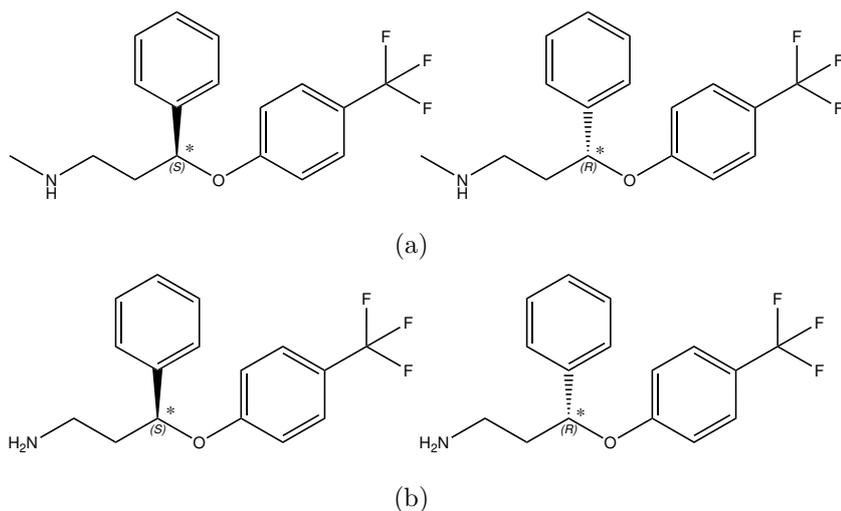


Figura 1.10: Estrutura química da fluoxetina (a) e da desmetilfluoxetina (b).

A fluvoxamina é metabolizada em produtos que são posteriormente eliminados na urina. São conhecidos pelo menos 11 metabolitos formados a partir de várias vias metabólicas e cerca de 94 % de uma dose de fluvoxamina é eliminada sob a forma destes [23].

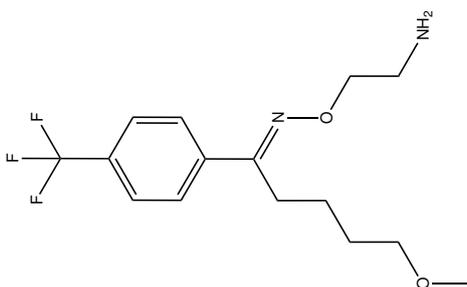


Figura 1.11: Estrutura química da fluvoxamina.

• **Comercialização:** A marca disponível em Portugal para ser comercializada tem o nome de Dumyrox[®]. Este medicamento está disponível como um maleato de fluvoxamina e é apresentado em duas dosagens: 50 e 100 mg [24]. Existem outros nomes comerciais como Luvox[®] (nome mais comum disponível em países como o Brasil e Argentina), Movox[®], disponível na Austrália, Fevarin[®], disponível em vários países nomeadamente a Alemanha, entre outros [43].

Paroxetina

A paroxetina, um derivado da fenilpiperidina, figura 1.12, é utilizada como antidepressivo mas tem eficácia para o tratamento de perturbação obsessiva-compulsiva, perturbação de ansiedade social, ansiedade, perturbação de stress pós-traumático e da perturbação de pânico. A sua estrutura química

difere muito de todos os outros ADs mencionados até agora e é o ISRS mais potente desta classe [44] [45]. Esta substância é ainda a única deste grupo que tem atividade anticolinérgica, ou seja, todos os efeitos associados a esta atividade podem ser esperados, como é o caso de boca seca, obstipação, visão turva, confusão, entre outros [46].

A paroxetina é biotransformada em produtos de oxidação e N-desmetilação. Não foi observada atividade farmacológica elevada destes para que se pudesse afirmar que estes contribuísssem para os efeitos terapêuticos da paroxetina. A eliminação da paroxetina dá-se maioritariamente sob a forma de metabolitos pelas fezes, sendo apenas 2 % eliminada sem sofrer metabolização [45].

A paroxetina apresenta dois centros quirais, o que justifica a representação de quatro estereoisómeros, mas apenas um é comercializado (3S,4R) [31] [47]. Dos quatro estereoisómeros apresentados, tanto o par (3S,4S)-paroxetina e (3R,4R)-paroxetina como o (3R,4S)-paroxetina e (3S,4R)-paroxetina correspondem a um par de enantiómeros. Da mesma forma, o par (3S,4S)-paroxetina e (3R,4S)-paroxetina e o par (3R,4R)-paroxetina e (3S,4R)-paroxetina denominam-se de diastereoisómeros, por não serem espelhos um do outro.

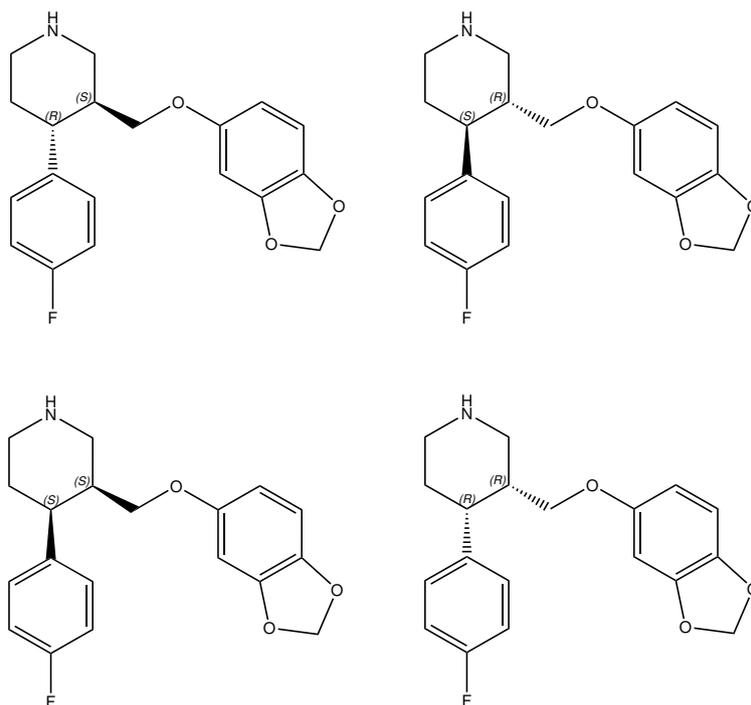


Figura 1.12: Estrutura química da paroxetina.

• **Comercialização:** Segundo o INFARMED, existe em comercialização a marca Seroxat[®] e Dropax[®]. A primeira substância é administrada por via oral, com comprimidos de 20 mg e a última por uma solução de 10 mg/mL, em que a administração é feita também por via oral (gotas orais) [24]. Em 2011, de acordo com o INFARMED, a paroxetina foi a 98^o substância com um maior número de vendas [41].

Sertralina/Desmetilsertralina

A sertralina, figura 1.13a, é utilizada no tratamento não só da depressão mas também da perturbação obsessiva-compulsiva, perturbação de ansiedade social e perturbação de stress pós-traumático [48].

Este antidepressivo tem uma particularidade que a difere dos outros ISRS, de ter uma absorção bastante lenta. Da sua extensa metabolização no fígado, obtém-se o seu metabolito ativo, a desmetilsertralina, figura 1.13b, através de uma reação de N-desmetilação. A desmetilsertralina, apesar de ser farmacologicamente ativa, tem apenas 10 % a 20 % da atividade farmacológica da sertralina, que se acumula no plasma devido à sua eliminação lenta: 62-104 h [48]. Os metabolitos são excretados pela urina e fezes na mesma proporção e a sertralina não metabolizada é excretada pela urina (0,2 %) [23].

Tanto a sertralina como o seu metabolito apresentam dois centros quirais, o que justifica a representação de quatro estereoisómeros, mas apenas o enantiómero (1S,4S) é comercializado [31] [49]. Dos quatro estereoisómeros apresentados, tanto o par (1S,4S)-sertralina e (1R,4R)-sertralina como o (1R,4S)-sertralina e (1S,4R)-sertralina correspondem a um par de enantiómeros. Da mesma forma, o par (1S,4S)-sertralina e (1R,4S)-sertralina e o par (1R,4R)-sertralina e (1S,4R)-sertralina, são diastereoisómeros.

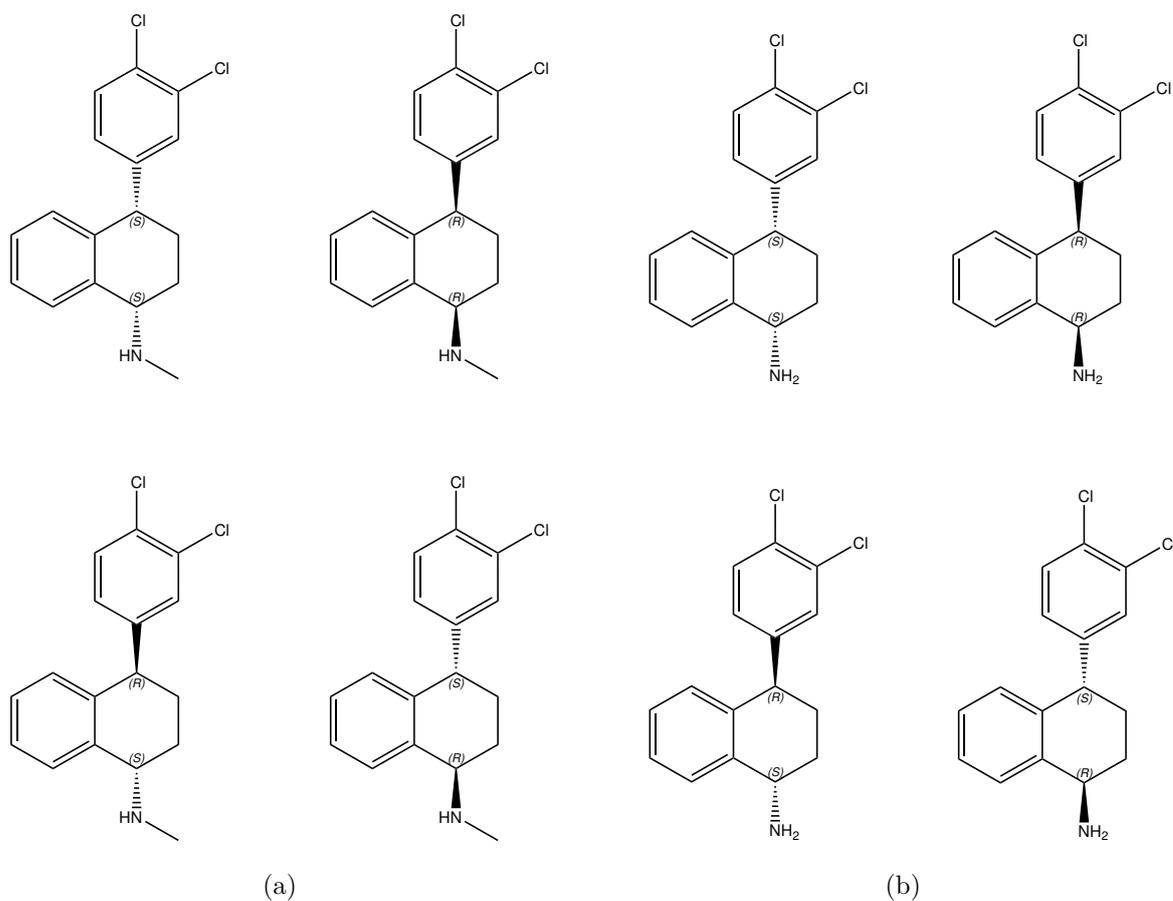


Figura 1.13: Estrutura química da sertralina (a) e da desmetilsertralina (b).

• **Comercialização:** A comercialização da sertralina é feita com a marca Zoloft® com uma dosagem de 50 mg, contudo existem outras dezenas de marcas genéricas [24]. Em 2011, de acordo com o INFARMED, a sertralina foi a 43ª substância com um maior número de vendas [41].

Vortioxetina

A vortioxetina, figura 1.14, é indicada para o tratamento de episódios depressivos em adultos [50]. O mecanismo de ação da vortioxetina não é bem conhecido mas acredita-se que as propriedades antidepressivas da vortioxetina relacionam-se com as afinidades ao SERT e alguns recetores de serotonina, que levam a uma inibição da recaptção de serotonina e às atividades antagonistas em alguns recetores da serotonina (5-HT_{1D}, 5-HT₇, and 5-HT₃), respetivamente [51].

O metabolito principal da vortioxetina é farmacologicamente inativo e aproximadamente 59 % dos metabolitos inativos da vortioxetina são excretados na urina e aproximadamente 26 % nas fezes [50].

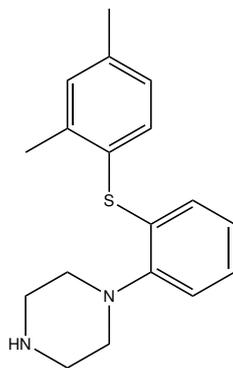


Figura 1.14: Estrutura química da vortioxetina.

• **Comercialização:** Em Portugal existe uma marca comercializada, denominada Brintellix®, disponível em duas formas de apresentação diferentes: comprimidos revestidos por película de 5 mg (comprimido revestido por película rosa), 10 mg (comprimido revestido por película amarela), 15 mg (comprimido revestido por película laranja) e 20 mg (comprimido revestido por película vermelha) e em solução (gotas orais) de 20 mg/mL [24]. Com a autorização da *Food and Drug Administration* (FDA), os EUA (e agora também Canadá) mudaram o nome comercial em 2016 de Brintellix® para Trintellix® [52] [53].

1.1.3.3 Antidepressivos inibidores seletivos de recaptção de serotonina e norepinefrina

Por vezes esta classe de ADs pode ser confundida com os TCA, dado atuarem na recaptção de serotonina e norepinefrina, contudo estes distinguem-se pelo facto de não apresentarem tantos efeitos

adversos, resultantes da pouca afinidade para os recetores adrenérgicos, recetores da histamina, da acetilcolina e da dopamina e recetores pós sinápticos da serotonina [54].

A taxa de eficiência do tratamento ao utilizar TCA é de cerca de 60-70 % e menos de 50 % atingem a remissão total. Contudo a taxa de eficácia dos ISRS não é muito superior à dos TCA e acredita-se até que alguns são menos eficazes que os últimos em casos de depressão severa [18]. Esta observação levou ao desenvolvimento da estratégia de combinar a especificidade dos transportadores de serotonina com os da norepinefrina para aumentar a eficácia dos tratamentos.

- **Farmacodinâmica:** Esta classe de antidepressivos, inibe a recaptura tanto da monoamina serotonina como da norepinefrina, prolongando os efeitos destas na fenda sináptica, aumentando as atividades neuronais [55]. Apesar de serem todos da mesma classe, as substâncias diferem nas suas afinidades para os recetores dos neurotransmissores.

- **Farmacocinética:** Todos os ISRSN são absorvidos muito rapidamente após uma administração oral e comparados aos ISRS, esta classe tem um tempo de meia-vida de eliminação bem mais curto, 4 h para a venlafaxina, 10 h para a desmetilvenlafaxina e cerca de 12 h para a duloxetina [56].

- **Interações medicamentosas:** Como já explicado também anteriormente, uma vez que a metabolização é feita pela enzima citocromo P450 2D6, quaisquer substâncias que sejam administradas juntamente com estas e que inibam esta enzima do seu funcionamento normal, vão fazer com que existam interações medicamentosas [56]. É contraindicado a toma simultânea de ADs das classes IMAO e ISRSN, sob risco da manifestação do síndrome de serotonina [57].

Duloxetina

A duloxetina, figura 1.15 tem um *ratio* mais equilibrado, ou seja, é apenas 10 vezes mais potente na inibição da recaptção da serotonina do que da norepinefrina. Também a duloxetina não tem grande afinidade para o transportador da dopamina [54]. A duloxetina e os seus metabolitos (farmacologicamente inativos), são excretados principalmente pela urina (70 %) mas também pelas fezes (20 %) [58].

Relativamente à quiralidade, a duloxetina apresenta um centro quiral e uma vez que se descobriu que o enantiómero R era duas vezes mais ativo que o enantiómero S, a sua comercialização não é feita de forma racémica [59].

- **Comercialização:** Em Portugal, para além das marcas genéricas, existem outras duas marcas comerciais com o nome de Cymbalta[®] e Dulxetenon[®] com dosagens de 30, 60, 90 e 120 mg. Ao contrário

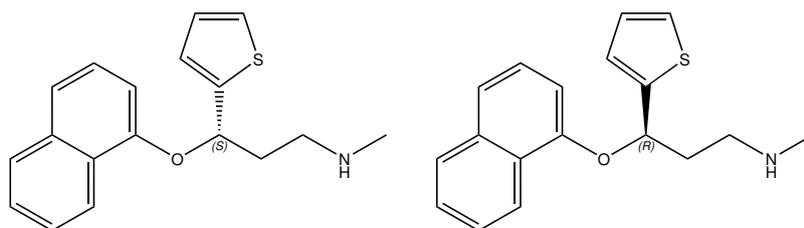


Figura 1.15: Estrutura química da duloxetina.

de todas as outras substâncias apresentadas até agora, a forma de apresentação desta é uma cápsula gastrorresistente [24]. A diferença entre estas cápsulas e as outras tradicionais é que esta se desintegra no intestino e não no estômago.

Venlafaxina/Desmetilvenlafaxina

A venlafaxina, figura 1.16a, é 30 vezes mais potente para a inibição da recaptação de serotonina. Na verdade, estudos apontam que só em doses elevadas é que a venlafaxina inibe a recaptação de ambos neurotransmissores. A venlafaxina tem também pouca afinidade para o transportador da dopamina [54].

Esta substância é metabolizada no seu principal metabolito ativo, a desmetilvenlafaxina, figura 1.16b, e cerca de 87 % de uma dose é excretada pela urina nas 48 h depois da administração [57].

A venlafaxina assim como o seu metabolito apresentam quiralidade mas a sua venda é feita como uma mistura racémica [31].

• **Comercialização:** A venlafaxina existe para comercialização em Portugal em várias formas de apresentação, nomeadamente em cápsulas de libertação prolongada, comprimidos revestidos por película e comprimido de libertação prolongada com as marcas Venlafaxina toLif[®], Genexin[®], Zarelix[®], Efexor XR[®], Venlafaxina Desinax[®] e Pracet[®] com dosagens de 37.5, 75, 150 e 225 mg [24]. O seu metabolito ativo não é comercializado em Portugal mas a vende-se pela marca Pristiq[®], Zodel[®], Deller[®], Desve[®] ou Imense[®] [60].

1.1.3.4 Antidepressivos atípicos

Neste grupo, estão incluídos os restantes ADs que não se encaixam nas classes até agora mencionadas, como é o caso da bupropiona que é um antidepressivo inibidor de recaptação de norepinefrina e dopamina, da trazodona que é um antagonista e inibidor de recaptação da serotonina e da mirtazapina que é um potente antagonista dos recetores adrenérgicos α_2 , 5-HT₂, 5-HT₃ e da histamina [61]. A reboxetina, apesar de estar incluída nos antidepressivos atípicos, faz parte do grupo de inibidores seletivos da recaptação de norepinefrina (ISRN).

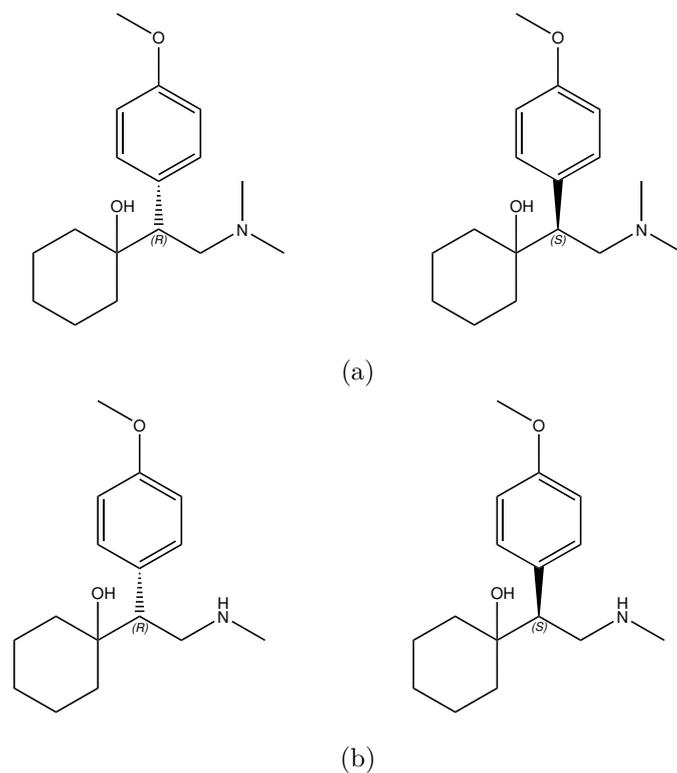


Figura 1.16: Estrutura química da venlafaxina (a) e da desmetilvenlafaxina (b).

Bupropiona

Estudos indicam que a atividade antidepressiva da bupropiona, figura 1.17, está relacionada apenas com a dopamina, com uma fraca ação da serotonina e norepinefrina [3], enquanto outros responsabilizam os seus efeitos tanto à dopamina como à norepinefrina [62]. Contudo, ainda se desconhece o mecanismo de ação deste antidepressivo [15].

Quanto à sua farmacocinética, a bupropiona é extensivamente metabolizada em três substâncias que apresentam alguma atividade. A sua eliminação dá-se pela urina na forma inalterada (1 %) e na forma de metabolitos (80 %) e pelas fezes (10 %) sob a forma de metabolitos.

A bupropiona apresenta quiralidade mas a sua venda é feita como uma mistura racémica [63].

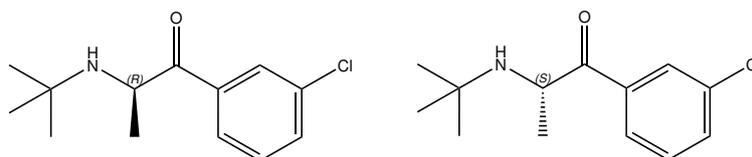


Figura 1.17: Estrutura química da bupropiona.

• **Comercialização:** Em Portugal existem duas marcas disponíveis, Elontril[®] e Wellbutrin XR[®] com duas dosagens diferentes, 150 e 300 mg. A sua forma de apresentação é em comprimido de libertação

prolongada.

Mianserina/Desmetilmianserina

A mianserina, figura 1.18a, é um análogo da mirtazapina, diferenciando-se apenas pela substituição de um átomo de azoto num dos anéis. Esta substância é utilizada no tratamento tanto da depressão como de distúrbios do sono.

O mecanismo de ação da mianserina é bastante parecido ao da mirtazapina, tendo atividade antagonista nos recetores 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}, 5-HT₃ e α_2 -adrenérgicos e agonista do recetor 5-HT_{1A}. Este antidepressivo distingue-se apenas por ter efeitos adicionais sobre o recetor α_1 [64].

Relativamente à sua farmacocinética, a mianserina é metabolizada no fígado, formando o principal metabolito (farmacologicamente ativo), desmetilmianserina, figura 1.18b. Ao fim de 7-9 dias, é eliminada pela urina e fezes, na forma metabolizada e, em menos quantidades, na forma intacta [65].

Tanto a mianserina como o seu metabolito apresentam quiralidade mas a sua venda é feita como uma mistura racémica [31].

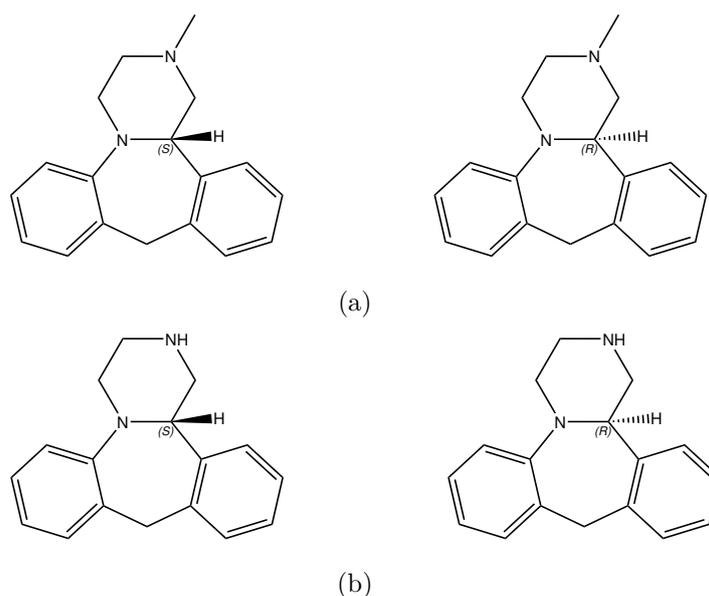


Figura 1.18: Estrutura química da mianserina (a) e da desmetilmianserina (b).

• **Comercialização:** A comercialização da mianserina em Portugal dá-se pela marca Tolvon[®], em forma de comprimidos revestidos por película com uma dosagem de 30 mg. Pode ter outros nomes como Lumin[®], comercializado na Austrália.

Mirtazapina/Desmetilmirtazapina

A mirtazapina não tem propriedades de inibição de recaptação de serotonina ou norepinefrina. O mecanismo de ação desta substância baseia-se na atividade antagonista dos recetores α_2 -adrenérgicos (autorecetores nos neurónios noradrenérgicos e heterorecetores nos neurónios serotoninérgicos) e também atividade antagonista para os recetores 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C} e o 5-HT₃. A atividade antagonista do primeiro recetor (5-HT_{2A}) resulta em propriedades ansiolíticas, do segundo recetor (5-HT_{2C}) no tratamento da disfunção erétil e do último recetor (5-HT₃) em propriedades antieméticas [66]. Para além de ser antagonista dos recetores mencionados, a mirtazapina é agonista do recetor 5-HT_{1A}, resultado do aumento da concentração de serotonina, que resulta num aumento da neurotransmissão. Esta substância não é responsável pela inibição da atividade de nenhum dos transportes de serotonina ou norepinefrina [66].

A mirtazapina sofre metabolização hepática através de desmetilação e hidroxilação dando origem a metabolitos ativos. A desmetilmirtazapina, figura 1.19b, é encontrada em baixos níveis. A eliminação é feita pela urina, cerca de 75 % e pelas fezes, cerca de 15 % [67].

Tanto a mirtazapina como o seu metabolito apresentam quiralidade mas a sua venda é feita como uma mistura racémica [31].

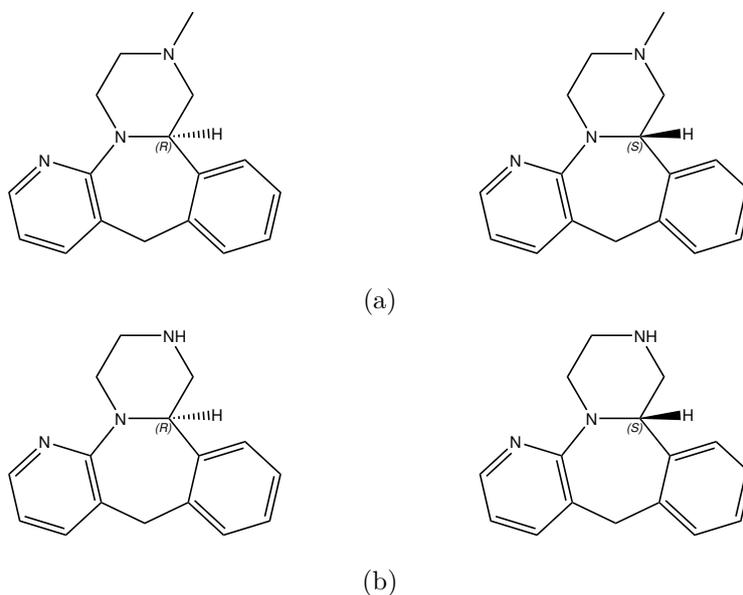


Figura 1.19: Estrutura química da mirtazapina (a) e da desmetilmirtazapina (b).

• **Comercialização:** A marca vendida em Portugal é a Remeron Soltab[®], em forma de comprimido orodispersível com uma dosagem de 15, 30 ou 45 mg [24]. Esta forma farmacêutica dissolve-se na boca e não é necessário o recurso a líquidos para a sua ingestão.

Reboxetina

Como já foi referido no início deste capítulo, a reboxetina faz parte da classe de ISRN. Este AD vai inibir o funcionamento correto do transportador da norepinefrina e consequentemente aumentar a concentração deste neurotransmissor na fenda sináptica. Esta substância é estruturalmente semelhante à fluoxetina e é utilizada como antidepressivo desde 1996 [23].

Alguns dados importantes relativos à sua farmacocinética são que o seu tempo de meia-vida é de cerca de 12-13 h e que a eliminação é feita principalmente pela urina e pelas fezes, numa proporção de 3 para 1 [67].

A reboxetina apresenta quiralidade mas a sua venda é feita como uma mistura racémica [31]. Assim como a sertralina e a paroxetina, a reboxetina apresenta dois centros quirais, o que justifica a representação de quatro estereoisómeros. Dos quatro estereoisómeros apresentados, tanto o par (S,S)-reboxetina e (R,R)-reboxetina como o (R,S)-reboxetina e (S,R)-reboxetina correspondem a um par de enantiómeros. Da mesma forma, o par (S,S)-reboxetina e (R,S)-reboxetina e o par (R,R)-reboxetina e (S,R)-reboxetina, são diastereoisómeros.

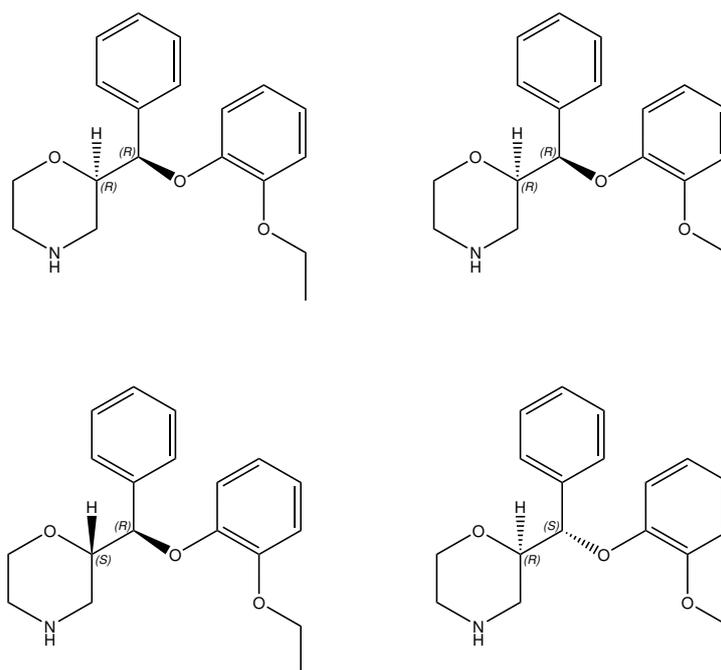


Figura 1.20: Estrutura química da reboxetina.

• **Comercialização:** Em Portugal existe apenas uma marca comercializada, a Edronax[®], em doses de 4 mg, para ser administrada via oral mas existem outras marcas como Norebox[®], Prolift[®], Solvex[®], Davedax[®] ou Vestra[®].

Tianeptina

Este medicamento é aprovado em muitos países mas nos EUA não foi aprovado pela FDA, devido aos efeitos secundários e aditivos que se têm reportado, nomeadamente agitação, náuseas, vômitos, suores, batimento cardíaco elevado, coma e até morte [68].

A tianeptina, figura 1.21, contém na sua estrutura uma cadeia lateral com um aminoácido de sete carbonos, diferente dos outros antidepressivos tricíclicos. Ao contrário dos ISRS, que apenas apresentam uma seletividade para a inibição da recaptação da serotonina, pensa-se que a tianeptina estimula a recaptação de serotonina e também, em menor grau, da norepinefrina e da dopamina. Estudos realizados mais recentemente indicam, contrariamente ao que se acreditava, que a tianeptina não afeta a transmissão sináptica da serotonina [69].

Esta informação parece ser paradoxal, uma vez que todas as substâncias apresentadas até agora apresentam efeitos antidepressivos em consequência do aumento da concentração dos neurotransmissores. Acredita-se que este efeito antidepressivo está relacionado com a remodelação neuronal central e restauração da plasticidade neuronal, questionando assim todos os mecanismos de ação propostos pelos quais foram explicados a maioria dos antidepressivos conhecidos [70].

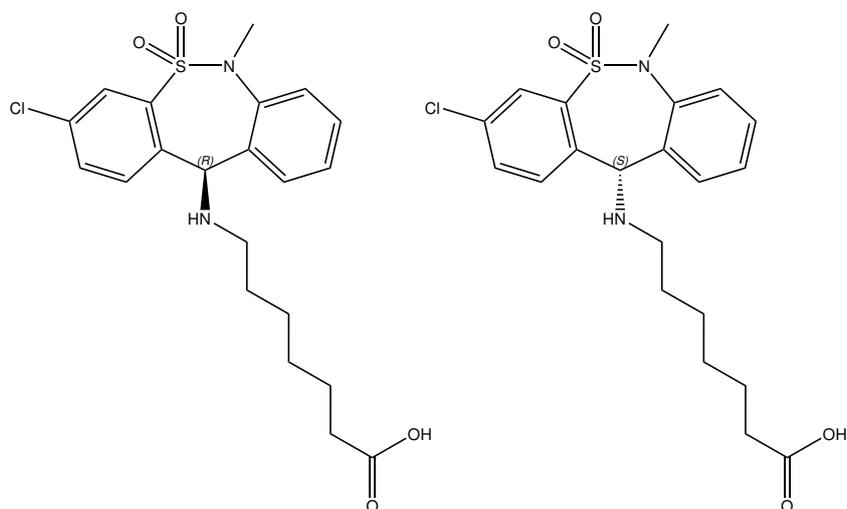


Figura 1.21: Estrutura química da tianeptina.

• **Comercialização:** De acordo com o INFARMED, está disponível em Portugal a marca Stablon[®], em forma de comprimido revestido por película. Cada comprimido contém 12,5 mg de tianeptina sódica [24].

Trazodona/m-CPP

A trazodona, figura 1.22a, atua no bloqueio da recaptação da serotonina, assim como no bloqueio dos recetores 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} e tem atividade antagonista nos recetores histamínicos. Por vezes pode ser confundida com um antidepressivo do grupo dos ISRS mas esta tem a particularidade de ter propriedades antagonistas para com os recetores 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}, evitando os efeitos adversos associados a esses recetores [15].

O uso de trazodona e os seus efeitos terapêuticos são apenas observados quando tomadas doses de 300 mg ou mais, o que pode fazer com que seja intolerável para alguns doentes devido ao excesso de sedação [61]. Isto acontece porque a trazodona é mais potente nos seus efeitos antagonistas do que na sua afinidade para com o SERT, fazendo com que esta substância em doses mais baixas não se ligue a estes transportadores [15].

A sua eliminação dá-se principalmente na urina (60-70 %) após 48 h e nas fezes (9-29 %) entre as 60 e 100 h após administração. Apresenta um metabolito ativo, o meta-clorofenilpiperazina (m-CPP), figura 1.22b [71].

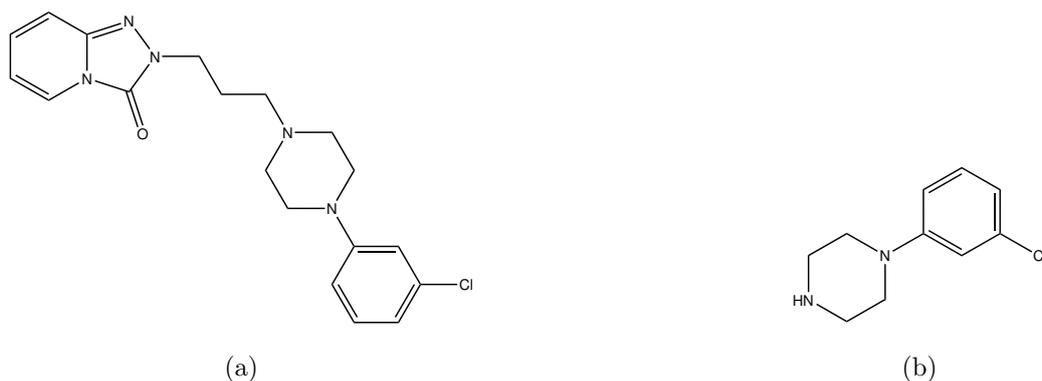


Figura 1.22: Estrutura química da trazodona (a) e do m-CPP (b).

• **Comercialização:** De acordo com o relatório anual de 2011 do INFARMED [41], a trazodona foi a 69^o substância com mais embalagens vendidas em Portugal no ano de 2011. Estas são comercializadas com a marca Triticum AC[®] ou Trazone OD[®] com dosagens a variarem entre os 100, 150 e 300 mg [24]. A trazodona é administrada via oral em forma de comprimidos de libertação modificada. O seu metabolito não é comercializado em Portugal.

1.2 Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses

O INMLCF, I.P., assegura, em todo o território nacional, a realização de autópsias médico-legais, outros exames cadavéricos, exames e perícias em pessoas, perícias e exames laboratoriais químicos e toxicológicos, perícias e exames de identificação genéticos, perícias e exames psiquiátricos e psicológicos

e perícias e exames de anatomia patológica forense, que lhe forem solicitados de forma a cooperar com os tribunais, com o Ministério Público e com os órgãos de polícia criminal e demais serviços e entidades que intervêm no sistema de administração da justiça. "O INMLCF, I.P. é o Laboratório do Estado com funções periciais, médico-legais e forenses que atua no âmbito da administração da justiça"[72].

A componente prática desta dissertação de mestrado foi realizada no SQTF-C, do INMLCF, I.P., contudo existem outras duas delegações, a delegação do norte e sul, localizadas no Porto e Lisboa, respetivamente.

1.3 Serviço de Química e Toxicologia Forense

A toxicologia forense é um ramo da ciência que se dedica à análise de uma vasta gama de xenobióticos, mais concretamente drogas, medicamentos, pesticidas ou álcool, para fins Médico-Legais e Forenses. Para ser possível realizar estas análises, são necessários conhecimentos a nível da química, da bioquímica, da farmacologia, entre outros.

As informações provenientes deste serviço podem ser bastante úteis e aplicadas em situações médico-legais, ajudando o médico legista a perceber a causa da morte, em casos de seguros de vida ou de trabalho e em casos de acidentes de viação, percebendo por exemplo, se o indivíduo estava sob o efeito de álcool ou de substâncias psicotrópicas aquando do acidente. É preciso ter em consideração que o toxicologista não avalia a intenção da morte nem a etiologia da morte, estando este dever destinado ao Ministério Público: "Constituem funções específicas do MP (...) a prolação de despacho final que termine o inquérito por acusação, por arquivamento ou por qualquer meio legalmente consagrado de consensualização"[73].

O SQTF-C está dividido em três setores: receção das amostras, registo e armazenamento das mesmas e análises químicas e toxicológicas. O último está ainda dividido por equipas, de acordo com as análises e os exames às substâncias acima descritas:

- **Equipa I:** responsável pela realização de ensaios imunoenzimáticos (EIA) utilizando o analisador automático EVOLIS, da BioRad, a drogas de abuso, nomeadamente opiáceos, opióides, cocaína, anfetaminas/metanfetaminas e canabinóides, em amostras de sangue e urina.

- **Equipa II:** responsável pela realização das análises pela técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) de opiáceos, opióides, cocaína e anfetaminas/metanfetamina. Estas análises são efetuadas após a triagem da equipa I, com o intuito de confirmar a positividade destes grupos nas amostras biológicas.

- **Equipa III:** responsável pela realização das análises pela técnica de LC-MS/MS de substâncias medicamentosas e canabinóides. Esta equipa é responsável tanto pela triagem das substâncias medicamentosas, como pela confirmação e quantificação das substâncias medicamentosas e canabinóides.

- **Equipa IV:** responsável pela análise de substâncias voláteis através da técnica de GC/FID. No INMLCF, I.P., a substância mais analisada é o etanol, mas podem ainda ser analisado o metanol, o clorofórmio, entre outros.

- **Equipa V:** responsável pela análise de monóxido de carbono e alguns metais através da espectrofotometria UV/vis e absorção atômica.

1.4 Amostras biológicas

Diferentes amostras biológicas podem ser recolhidas para realizar a análise de xenobióticos, contudo a mais importante, relevante e utilizada é o sangue. O sangue é a matriz que melhor permite correlacionar a concentração das substâncias presentes e o seu respetivo efeito no organismo. É possível detetar nesta amostra, tanto *ante-mortem* como *post-mortem*, substâncias como medicamentos, substâncias ilícitas, pesticidas, etanol, entre outras.

Pode-se utilizar ainda amostras biológicas de urina, estômago, conteúdo gástrico, fígado, rim, cabelo e unhas e outras, sendo que todas elas necessitam de ser tratadas com metodologias extrativas distintas dadas as suas características.

CAPÍTULO 2

METODOLOGIAS ANALÍTICAS

2.1 Precipitação proteica

A extração analítica é um passo muito importante pois os componentes de uma matriz biológica (sangue), principalmente as proteínas, podem ser adsorvidas irreversivelmente na coluna cromatográfica, levando a uma baixa eficiência de extração e ao entupimento da própria coluna [74]. As técnicas de extração mais comuns utilizadas para esta matriz são a *Solid-Phase Extraction* (SPE), *Liquid-Liquid Extraction* (LLE) e a precipitação proteica (PP).

A técnica de PP baseia-se em adicionar à amostra biológica, 3 a 5 vezes o volume de um solvente orgânico (acetonitrilo, metanol, acetona), sulfato de amônio ou ácido tricloroacético com o objetivo de quebrar as ligações proteína-analito que existam. Estes solventes vão diminuir a solubilidade das proteínas fazendo com que elas precipitem [75]. Estudos indicam que entre os solventes orgânicos mencionados atrás, o acetonitrilo proporciona cerca de 40 % menos fosfolípidos comparando ao metanol [76]. De acordo com estudos descritos na literatura, onde esta técnica de extração foi otimizada com base na eficácia da remoção proteica e nos efeitos iônicos na técnica de LC-MS/MS, o acetonitrilo precipita 94,9 % das proteínas em matéria orgânica (4:1, v/v) [77].

Após a adição destes solventes, os componentes proteicos precipitam, ficando no sobrenadante o(s) nosso(s) princípio(s) ativo(s). Por vezes há a necessidade de submeter as amostras à centrifugação, figura 2.1. Após estes passos, o extrato pode ser analisado logo de seguida ou evaporado e reconstituído num solvente adequado para a análise por cromatografia líquida (LC), quase sempre a fase móvel [78].

Esta técnica é a escolhida como técnica de extração para este trabalho, uma vez que é a mais simples, de baixo custo, muito rápida, com perda mínima de analitos, extremamente eficiente mesmo

para volumes reduzidos de amostra e aplicável para a extração de um número elevado de xenobióticos [79].

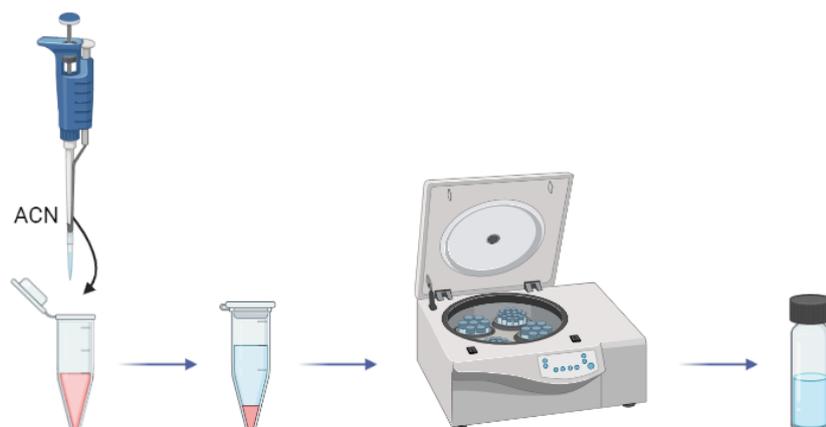


Figura 2.1: Esquema representativo do processo extrativo por precipitação proteica

2.2 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa sequencial (LC-MS/MS)

A LC-MS/MS, é uma técnica muito versátil e de elevado interesse para a análise toxicológica, uma vez que tem a capacidade de determinar compostos polares, de elevado massa molecular e termicamente lábeis [80]. Através desta técnica é possível separar os analitos presentes numa determinada amostra e proceder posteriormente a uma análise com recurso a um detetor de massa. Após a sua separação, os analitos são sujeitos a uma fonte de ionização, no caso deste trabalho prático, uma sonda por *electrospray* (ESI). Uma fonte de ESI consiste num tubo capilar onde uma determinada voltagem é aplicada. Esta voltagem, devido à diferença de potencial, tem a capacidade de nebulizar o líquido que flui para o capilar. As gotas nebulizadas são evaporadas, diminuindo o seu tamanho e, dependendo da polaridade da voltagem, podem estar positivamente ou negativamente carregadas [80].

Após a ionização estar concluída, o analisador de massa mede a razão massa-carga (m/z) dos iões. Nesta fase, é necessário que exista uma interface, uma vez que o analisador tem de estar em vácuo para que o caminho seja livre para os iões. O analisador do tipo triplo quadropolo é um dos mais utilizados no ramo da toxicologia forense por ser muito sensível e seletivo [80].

Este tipo de analisador consiste num quadropolo sujeito a um potencial elétrico. Uma combinação estratégica deste, cria uma frequência de ressonância para uma razão m/z específica, em que os iões com essa mesma razão são detetados e os iões com uma razão m/z maior ou menos são eliminados. Logicamente, ao alterar o tal potencial elétrico, a frequência de ressonância é também alterada e outra

razão m/z pode ser detetada [80].

A análise e deteção deste iões é realizada por quadrupolos e estes podem ser utilizados em modos diferentes: modo *selected ion monitoring* (SIM)), onde apenas uma razão m/z é selecionada, aumentando a seletividade para um determinado analito, modo *scan*, onde se obtém um espectro de massa total ou de um intervalo de massa desejado, permitindo observar todas as razões m/z presentes no total ou nesse intervalo selecionado.

O modo MRM é um modo de elevada seletividade, que produz pouco ruído e que permite realizar análises quantitativas e é tipicamente utilizado em equipamento de triplo quadrupolo. Este consiste no primeiro quadrupolo, Q1, filtrar um ião precursor, deixando apenas passar esse ião com uma razão m/z específica para o segundo quadrupolo, Q2. Este vai produzir um outro ião produto da colisão entre o ião precursor com um gás de colisão, normalmente azoto. A este processo dá-se o nome de dissociação induzida por colisão (CID). Estes iões originados na célula de colisão entram no terceiro quadrupolo, Q3, onde apenas passa um ião com uma razão m/z específica [81]. Na figura 2.2 encontra-se um esquema do funcionamento de um triplo quadrupolo.

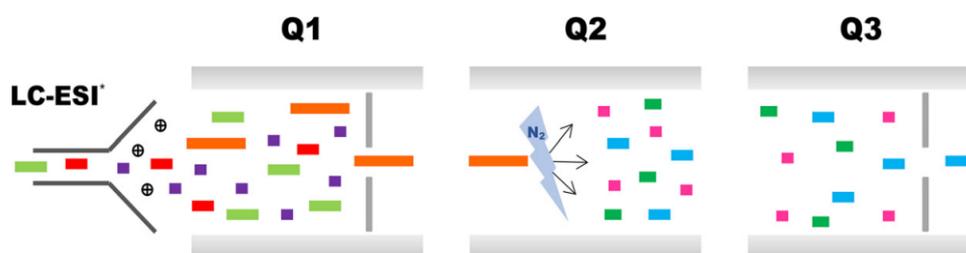


Figura 2.2: Esquema do funcionamento de um analisador de massa triplo quadrupolo.

CAPÍTULO 3

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os estudos encontrados na literatura no que diz respeito à determinação de ADs em amostras de sangue envolvem algumas técnicas de cromatografia líquida e procedimentos de extração como a PP, escolhida para a este trabalho e outras como LLE, SPE ou *Solid-Phase Micro-Extraction* - Sigla Inglesa (SPME).

Uma breve seleção de estudos foi feita (10 no total abrangendo um período de publicação de 2008 a 2023.) e na tabela 3.1 encontra-se um resumo da informação relevante de cada um, incluindo o volume da amostra, o tipo de amostra, a técnica de extração e analítica e o seu modo de ionização.

Observando os dados recolhidos dos estudos apresentados, é possível perceber que poucos são desenvolvidos utilizando sangue *post-mortem*. Para além disso, a maioria destes trabalhos que foram desenvolvidos apenas determinam apenas um AD e o(s) seu(s) metabolito(s) ou uma classe de ADs, por exemplo os TCA.

Tabela 3.1: Revisão da literatura sobre a validação de métodos para determinação de ADs em diferentes amostras biológicas, com informação ao volume de amostra, o tipo de amostra, à técnica de extração e analítica e o seu modo de ionização assim como o limite de detecção e o limite de quantificação obtido.

Substância	Volume amostra (μL)	Tipo amostra	Técnica extração	Técnica analítica	Modo ionização	LD (ng/mL)	LQ (ng/mL)	Referência
Amitriptilina						4,0	10	
Desipramina	500	Serum	PP	LC-MS/MS	ESI	5,4	14	[82]
Imipramina						2,5	19	
Nortriptilina						5,5	21	
Vortioxetina	100	Sangue <i>post-mortem</i>	PP	LC-MS/MS	ESI	4,9	20	[83]
Bupropiona						-	1	
Reboxetina	500	Plasma	SPE	LC-MS	ESI	-	1	[84]
Trazodona						-	2	
Amitriptilina						Plasma: 0,07	Plasma: 0,23	Urina: 0,28
Fluoxetina						0,09	0,30	0,33
Citalopram						0,15	0,49	0,19
Trazodona	500	Plasma e urina	SPME	LC-MS	ESI	0,10	0,34	0,19
Clomipramina						0,10	0,35	0,56
Sertralina						2,87	9,56	8,79
Paroxetina						1,50	5,00	0,26
Fluvoxamina						0,66	2,19	9,45
Mirtazapina	200	Plasma	LLE	LC-MS/MS	ESI	0,17	0,5	[86]

Tabela 3.1 continuação da página anterior

Substância	Volume amostra (μL)	Tipo amostra	Técnica extração	Técnica analítica	Modo ionização	LD (ng/mL)	LQ (ng/mL)	Referência
Mirtazapina	200	Plasma	SPE	LC-MS/MS	ESI	n.d.	n.d.	[87]
Mirtazapina-M								
27 ADS	100	Plasma	LLE	LC-MS/MS	ESI	0,20 - 10	2,5 - 10	[88]
34 ADs	500	Plasma	LLE	LC-MS/MS	APCI	3,8 - 60	7,5 - 300	[89]
Amitriptilina								
Imipramina								
Clomipramina								
Clomipramina-M								
Fluoxetina								
Fluoxetina-M	200	Plasma e fluido oral	SPE	LC-MS/MS	ESI	-		[90]
Paroxetina								
Sertralina								
Fluvoxamina								
Citalopram								
Venlafaxina								
Nortriptilina								
Sertralina	200	Plasma	PP	LC-MS/MS	ESI	n.d.	3,13	[91]
Sertralina-M							12,5	

Plasma: Fluido oral:

CAPÍTULO 4

OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho consistiu na validação de um método analítico para a determinação de um total de 20 ADs e 11 dos seus metabolitos em amostras de sangue por PP e deteção por LC-MS/MS. Para além disso, este trabalho permitiu-me ter uma aprendizagem educacional tanto sobre a rotina laboratorial do SQTF-C do INMLCF, I.P., como dos diversos procedimentos envolvidos no funcionamento de um laboratório acreditado, mais especificamente na equipa III, que trabalha diretamente com a técnica de LC-MS/MS.

CAPÍTULO 5

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

5.1 Material, Reagentes e Equipamento

5.1.1 Padrões e Reagentes

Os padrões de referência dos ADs foram adquiridos de três marcas distintas, Cerilliant, LGC e TRC, todos a uma concentração de 1 mg/mL, com exceção da desmetilsertralina e a desmetilvenlafaxina, que foram adquiridos com uma concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. O padrão interno (PI) utilizado foi a clomipramina- d_3 adquirida à Cerilliant, a uma concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A água, o acetonitrilo e o metanol (grau de pureza LC-MS) foram adquiridas à Riedel-de Haën. O ácido fórmico (98 % - 100 %) foi fornecido pela Supelco e o formato de amónia (≥ 99 %) pela Sigma-Aldrich.

5.1.2 Fases móveis do sistema LC-MS/MS

5.1.2.1 Fase móvel A (fase orgânica)

Nesta fase móvel, o solvente orgânico consistiu em metanol e formato de amónia 2 mM em ácido fórmico 0,1 % (95:5, v/v). Num balão volumétrico de 500 mL, acertou-se o menisco com metanol. A esta solução, adicionou-se 1 mL de formato de amónio 1 M (dissolveu-se aproximadamente 3,153 g de formato de amónia em 50 mL de água e 1 mL de ácido fórmico 0,1 %) e 500 μL de ácido fórmico. Por fim a solução foi homogeneizada em banho de ultrassons durante 15 minutos e armazenou-se no frigorífico entre 2 a 8 °C até à sua utilização, momento em que este tem de ficar à temperatura ambiente.

5.1.2.2 Fase móvel B (fase aquosa)

A preparação da fase móvel B consistiu em medir com precisão 500 mL de água e adicionar 1 mL de formato de amônio 1 M e 500 μL de ácido fórmico 0,1 %. Por fim, adicionou-se 5 mL da Fase Móvel A ou fase móvel orgânica. Adicionou-se os 50 mL de metanol retirados no ponto anterior. Por fim a solução foi homogeneizada em banho de ultrassons durante 15 minutos e armazenou-se no frigorífico entre 2 a 8 °C até à sua utilização, momento em que este tem de ficar à temperatura ambiente.

5.1.3 Material e Equipamento

O agitador vortex utilizado foi um Reax 2000 da Heidolph, a centrífuga refrigerada, modelo Heraeus Fresco 21 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) e o equipamento de ultrassons, modelo Sonorex Super RK 510H (Bandelin, Berlim, Alemanha). Todas as micropipetas de volume variável e respetivas pontas utilizadas foram da Eppendorf (Hamburgo, Alemanha), da Gilson (Middleton, Wisconsin) ou da Sartorius (Gottingen, Alemanha). Para além do material anteriormente referido, foram utilizados tubos *eppendorf* de 2 mL e vials de polipropileno de 300 μL e outros materiais de vidro de uso do laboratorial, tais como balões volumétricos, provetas e copos. O equipamento LC-MS/MS foi um sistema Sciex ExionLCTM HPLC, modelo AD, (AB Sciex, Framingham, Massachusetts, U.S.A), constituído por duas bombas binárias, um compartimento de forno da coluna, um módulo desgaseificador e um injetor automático refrigerado, figura 5.1. Na separação cromatográfica utilizou-se a uma coluna Acquity UPLC® HSS T3 (100x2,1 mm, 1,8 μm) da Waters (Milford, Massachusetts, USA). O fornecimento de azoto necessário para o equipamento de LC-MS/MS foi realizado através de um gerador de azoto (Pneumatech, Worthington Creyssensac, Espanha) associado a um compressor de ar comprimido da mesma marca. O azoto foi utilizado como nebulizador, gás de dessolvatação e como gás de colisão.

5.1.4 Preparação de padrões, soluções e misturas padrão

Utilizando um volume de 50 ou 100 μL dos padrões primários de ADs adquiridos, preparou-se soluções de trabalho a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ou 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, dependendo da substância, num balão volumétrico de 1 ou 2 mL e por fim fez-se o volume com metanol. O procedimento está detalhado na tabela 5.1.



Figura 5.1: Equipamento LC-MS/MS Sciex

Tabela 5.1: Preparação das soluções padrão dos ADs.

Código SP - solução padrão, xxx - número de identificação da substância, CR/LG/TR - código de identificação da marca do fornecedor (Cerilliant, LGC e TRC), xxx - numeração correspondente à preparação de uma nova solução padrão

Substância	Código da solução padrão	Volume inicial do padrão primário do AD (μL)	Concentração final da SP ($\mu\text{g/mL}$)
Amitriptilina	SP037CR006	50	50
Bupropiona	SP674CR003	50	50
Citalopram	SP042LG006	50	50
Desmetilcitalopram	SP044CR04	50	50
Clomipramina	SP043LG001	50	50
Desmetilclomipramina	SP044CR004	50	50
Dosulepina	SP052CR002	50	50
Desmetildosulepina	SPa050LG001	100	10
Duloxetina	SP676CR003	50	50
Fluoxetina	SP055LG006	50	50
Desmetilfluoxetina	SPa036LG002	50	50
Fluvoxamina	SP209TR015	50	50
Imipramina	SP059LG004	50	50
Maprotilina	SP064LG005	50	50
Mianserina	SP066CR0045	50	50
Desmetilmianserina	SPa065LG001	100	10
Mirtazapina	SP067LG006	50	50

Tabela 5.1 continuação da página anterior

Substância	Código da solução padrão	Volume inicial do padrão primário do AD (μL)	Concentração final da SP ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Desmetilmirtazapina	SPa066CR002	100	10
Nortriptilina	SP071CR007	50	50
Paroxetina	SP075LG005	50	50
Reboxetina	SP688LG003	50	50
Sertralina	SP276CR008	50	50
Desmetilsertralina	SP087LG001	100	10
Tianeptina	SP149TR002	50	50
Trazodona	SP094LG003	100	100
m-CPP	SPa035LG002	100	10
Trimipramina	SP095LG006	50	50
Desmetiltrimipramina	SPa071LG002	50	50
Venlafaxina	SP097LG005	50	50
Desmetilvenlafaxina	SP099LG010	100	100
Vortioxetina	SPa003LG002	50	50

Estas soluções padrão foram armazenadas no congelador a aproximadamente $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até à sua utilização.

Posteriormente preparou-se uma MP, com concentrações a variarem de acordo com o AD em estudo, a partir das soluções padrão mencionadas atrás. Na tabela 5.2 está descrita a concentração das soluções padrão utilizadas, o volume retirado de cada uma delas e a concentração final da MP de cada AD, onde se fez o volume final de 1 mL com metanol. A curva de calibração foi preparada utilizando diferentes volumes desta MP e diluindo com uma solução de metanol:água (1:1, v/v). Na tabela 5.3 encontra-se descrito estes volumes e a concentração respetiva de cada um dos calibradores para cada AD.

Tabela 5.2: Preparação da MP utilizada para a realização das curvas de calibração e controlos.

Substância	[Solução padrão] ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Volume (μL)	[MP] (ng/mL)
Amitriptilina	50	20	1000
Bupropiona	50	10	500
Citalopram	50	20	1000
Desmetilcitalopram	50	10	500
Clomipramina	50	10	500
Desmetilclomipramina	50	10	500
Dosulepina	50	10	500

Tabela 5.2 continuação da página anterior

Substância	[Solução padrão] ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Volume (μL)	[MP] (ng/mL)
Desmetildosulepina	10	50	500
Duloxetina	50	20	1000
Fluoxetina	50	20	1000
Desmetilfluoxetina	50	20	1000
Fluvoxamina	50	20	1000
Imipramina	50	20	1000
Maprotilina	50	20	1000
Mianserina	50	10	500
Desmetilmianserina	10	50	500
Mirtazapina	50	10	500
Desmetilmirtazapina	10	20	200
Nortriptilina	50	20	1000
Paroxetina	50	20	1000
Reboxetina	50	20	1000
Sertralina	50	20	1000
Desmetilsertralina	10	50	500
Tianeptina	50	20	1000
Trazodona	100	20	2000
m-CPP	10	20	200
Trimipramina	50	20	1000
Desmetiltrimipramina	50	10	500
Venlafaxina	50	20	1000
Desmetilvenlafaxina	100	10	1000
Vortioxetina	50	10	500

Tabela 5.3: Volumes e respectivas concentrações dos ADs para realizar a curva de calibração.

	Volume (μL)						
MP	5	10	20	40	60	80	100
H ₂ O:MeOH (1:1, v/v)	95	90	80	60	40	20	0
	Concentração (ng/mL)						
	CAL1	CAL2	CAL3	CAL4	CAL5	CAL6	CAL7
Amitriptilina	50	100	200	400	600	800	1000
Bupropiona	25	50	100	200	300	400	500
Citalopram	50	100	200	400	600	800	1000
Desmetilcitalopram	25	50	100	200	300	400	500

Tabela 5.3 continuação da página anterior

	Concentração (ng/mL)						
	CAL1	CAL2	CAL3	CAL4	CAL5	CAL6	CAL7
Clomipramina	25	50	100	200	300	400	500
Desmetilclomipramina	25	50	100	200	300	400	500
Dosulepina	25	50	100	200	300	400	500
Desmetildosulepina	25	50	100	200	300	400	500
Duloxetina	50	100	200	400	600	800	1000
Fluoxetina	50	100	200	400	600	800	1000
Desmetilfluoxetina	50	100	200	400	600	800	1000
Fluvoxamina	50	100	200	400	600	800	1000
Imipramina	50	100	200	400	600	800	1000
Maprotilina	50	100	200	400	600	800	1000
Mianserina	25	50	100	200	300	400	500
Desmetilmianserina	25	50	100	200	300	400	500
Mirtazapina	25	50	100	200	300	400	500
Desmetilmirtazapina	10	20	40	80	120	160	200
Nortriptilina	50	100	200	400	600	800	1000
Paroxetina	50	100	200	400	600	800	1000
Reboxetina	50	100	200	400	600	800	1000
Sertralina	50	100	200	400	600	800	1000
Desmetilsertralina	25	50	100	200	300	400	500
Tianeptina	50	100	200	400	600	800	1000
Trazodona	100	200	400	800	1200	1600	2000
m-CPP	10	20	40	80	120	160	200
Trimipramina	50	100	200	400	600	800	1000
Desmetiltrimipramina	50	100	200	400	600	800	1000
Venlafaxina	50	100	200	400	600	800	1000
Desmetilvenlafaxina	50	100	200	400	600	800	1000
Vortioxetina	25	50	100	200	300	400	500

Para o estudo dos limiares analíticos, foi necessário preparar outras soluções de trabalho, com concentrações menores, de forma a MP ter uma gama de concentrações mais baixas. Paralelamente foi construída também uma curva de calibração distinta.

Por fim, uma outra curva de calibração foi preparada para o estudo da linearidade. Esta vai ter uma gama de trabalho igual à apresentada na tabela 5.3, com a diferença de ser construída com 10 calibradores.

Os controlos baixos, médios e altos, que vão sendo utilizados durante a validação, de acordo com

[92], têm de ser no máximo três vezes superior ao calibrador mais baixo da curva de calibração, a meio da curva de calibração e aproximadamente 80 % da concentração do ponto mais elevado da curva de calibração, respetivamente. Dito isto, o controlo baixo corresponde ao CAL 2, o médio ao CAL4 e o alto ao CAL6, da tabela 5.3. No apêndice A encontram-se os cromatogramas com as transições iónicas de todos os ADs estudados e do PI, num controlo alto.

5.2 Procedimento de ensaio

As amostras de sangue foram sujeitas a um procedimento analítico, aplicado na rotina laboratorial do SQTF-C, detalhado na tabela 5.4.

A solução de PI foi uma solução de clomipramina-d₃ a 1 µg/mL.

Tabela 5.4: Procedimento analítico da preparação das amostras biológicas.

	Branco de reagentes	Amostra branca	Calibradores	Amostras
Água LC-MS/MS	100 µL	-	-	-
Metanol:Água (1:1, v/v)	100 µL	100 µL	-	100 µL
Sangue	-	100 µL	100 µL	100 µL
Soluções CAL	-	-	*variam de acordo com o AD	-
Solução de PI	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL

As concentrações das soluções dos calibradores e os controlos variam de acordo com a substância a ser estudada, uma vez que cada antidepressivo tem uma dose terapêutica mais baixa ou mais alta. Após as medições de todas as soluções feitas, procedeu-se à precipitação proteica, adicionando-se 900 µL de acetonitrilo gelado, sob agitação no vortex. De seguida, os tubos *ependorfs* foram colocados numa centrífuga refrigerada e programada a 5° C e a 14000 rpm durante 10 minutos. Por último, 50 µL do sobrenadante foi diluído em 200 µL de uma solução de fase móvel nas condições iniciais.

5.3 Condições do equipamento (LC-MS/MS)

5.3.1 Cromatografia líquida

A fase móvel com um fluxo de 0,4 mL/min realizou-se em modo gradiente, ou seja, 45 % da fase móvel A aos 0 minutos com um aumento linear até 60 % da fase móvel A em 5 minutos e até 95 % em 1 minuto. Durante 1,5 minutos há uma eluição isocrática, seguida de um decréscimo para as condições iniciais em 0,05 minutos e um tempo de equilíbrio durante 1,95 minutos, resultando um total de 10

minutos. As temperaturas do injetor automático e do forno da coluna analítica estavam programadas para 15 °C e 45 °C, respectivamente.

5.3.2 Espectrometria de massa sequencial

O espectrómetro de massa sequencial utilizado foi um QTRAP® 6500+ (armadilha de iões linear triplo quadrupolo) equipado com uma interface TurboIonSpray®. Os parâmetros otimizados de MS/MS são os seguintes: temperatura da fonte, 450 °C; voltagem de pulverização de iões (IS), +5500 V /-5500 V; pressão na fonte do gás 1 (GS1), 40 psi; pressão na fonte do gás 2 (GS1), 60 psi; pressão do gás de dessolvatação (CUR), 25 psi; gás de colisão (CAD), médio. Para o controlo do sistema de LC-MS/MS foi utilizado o software Analyst 1.7.2 e para o tratamento de dados o SCIEXOS Q 2.2.

O analisador de massa do tipo triplo quadrupolo operou em MRM de acordo com as condições estabelecidas na tabela 5.5.

Tabela 5.5: Condições experimentais utilizadas na determinação dos ADs selecionados e do padrão interno: tempo de retenção (min), valores da primeira e segunda transições, potencial de desagregação (DP), potencial de entrada (PE), energia de colisão (CE) e potencial de saída da célula de colisão (CXP).

Substância	Tempo de retenção (min)	1º transição	2º transição	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
Amitriptilina	6.30	278.1>233.3	278.1>91.2	80/80	10/10	25/35	10/10
Bupropiona	4.80	240.1>184.0	240>131.0	60/60	10/10	25/45	10/10
Citalopram	5.43	325.1>109	325.1>262.1	91/91	10/10	33/27	12/10
Desmetilcitalopram	5.47	311.0>109	311.0>262.0	71/71	10/10	29/23	12/28
Clomipramina	6.71	315.1>86.1	315.1>58.0	96/96	10/10	23/65	10/8
Desmetilclomipramina	6.77	301.0>72.2	301.0>44.1	66/66	10/10	19/65	8/20
Dosulepina	5.93	296.1>223.0	296.1>218.1	90/90	10/10	33/33	10/12
Desmetildosulepina	6.00	281.99>225.0	281.99>202.0	56/56	10/10	23/67	12/20
Duloxetine	6.20	298.10>154.00	298.10>44.10	30/30	10/10	9/67	10/6
Fluoxetine	6.39	310.10>44.10	310.10>148.20	60/60	10/10	73/11	6/12
Desmetilfluoxetine	6.40	296.00>134.10	296.00>30.20	30/30	10/10	9/45	16/14
Fluoxamina	6.34	319.00>71.10	319.00>258.10	50/50	10/10	19/15	8/10
Imipramina	6.16	281.10>86.00	281.10>58.00	61/61	10/10	21/57	10/8
Maprotilina	6.21	278.10>250.10	278.10>191.10	100/100	10/10	25/49	10/12
Mianserina	5.48	265.10>208.10	265.10>58.10	91/91	10/10	29/49	12/8
Desmetilmianserina	5.59	251.10>208.10	251.10>118.00	86/86	10/10	29/39	12/14
Mirtazapina	4.25	266.10>195.00	266.10>72.00	101/101	10/10	33/23	12/8
Desmetilmirtazapina	4.27	252.10>195.00	252.10>209.10	141/141	10/10	29/33	18/16
Nortriptilina	6.38	264.10>233.10	264.10>91.00	70/70	10/10	19/29	14/10
Paroxetina	6.00	330.40>192.30	330.40>70.20	120/120	10/10	30/49	10/10
Reboxetina	5.86	314.10>176.10	314.10>90.90	40/40	10/10	17/39	8/10

Table 5.5 continuação da página anterior

Substância	Tempo de retenção (min)	1º transição	2º transição	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
Sertralina	6.61	306.00>275.10	306.00>158.90	30/30	10/10	17/33	10/10
Desmetilsertralina	6.71	291.90>158.90	291.90>129.20	10/10	10/10	29/27	18/14
Tianeptina	5.63	437.00>228.10	437.00>292.00	30/30	10/10	49/21	14/10
Trazodona	4.83	372.20>176.30	372.20>148.20	81/81	10/10	35/48	10/10
m-CPP	4.14	197.10>118.10	197.10>119.00	40/40	10/10	50/34	10/10
Trimipramina	6.36	295.10>100.10	295.10>58.10	46/46	10/10	23/59	12/14
Desmetiltrimipramina	6.16	281.06>86.10	281.06>208.10	66/66	10/10	21/29	10/24
Venlafaxina	5.14	278.10>260.20	278.10>58.00	46/46	10/10	17/57	10/8
Desmetilvenlafaxina	4.10	264.10>58.10	264.10>107.10	46/46	10/10	51/39	26/12
Vortioxetina	6.86	299.00>150.00	299.00>109.00	76/76	10/10	33/47	16/12
Clomipramina-d ³	6.66	318.10>89.00	318.10 >61.00	96/96	10/10	23/65	10/8

5.4 Validação do método

A validação de um método analítico consiste em realizar o estudo de alguns parâmetros, com o objetivo de evidenciar que o método é adequado para o seu propósito (identificar analito, mais concretamente, os ADs) e tentar perceber quais são as suas limitações [92]. Este processo e os seus parâmetros a serem estudados vão depender bastante no tipo de estudo, se qualitativo ou quantitativo, das técnicas e do tipo de matrizes utilizadas, por exemplo.

A validação seguiu as diretrizes da *Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology* da *American Academy of Forensic Science (AAFS) Standards Board (ASB)*, um documento utilizado especificamente para o SQTf-C.

De acordo com este documento, para a validação de um método quantitativo, é necessário estudar os seguintes parâmetros:

- **Estudo de interferências;**
- **Supressão iónica;**
- **Linearidade;**
- **Arrastamento;**
- **Precisão;**
- **Exatidão;**
- **Limite de deteção (LD) e Limite de quantificação (LQ);**
- **Integridade de diluição;**
- **Estabilidade.**

5.4.1 Estudo de interferências

O estudo das interferências tem como propósito demonstrar a existência ou ausência de interferências mais comuns que possam existir. Estas interferências podem existir devido à matriz biológica, à interação entre as substâncias a validar, à interação entre o padrão interno (PI) e as substâncias ou por parte da interação de outros xenobióticos.

Com isto, e de acordo a literatura, quatro tipos de estudos de interferências devem ser realizados [92]:

- 1) Ausência de interferências nos tempos de retenção dos ADs resultantes da matriz biológica;
- 2) Ausência de interferências nos tempos de retenção dos ADs com a adição de PI, resultantes do próprio PI.
- 3) Ausência de sinais interferentes no tempo de retenção do PI sem a adição do PI, resultantes dos ADs.

4) Ausências de sinais interferentes nos tempos de retenção dos ADs, resultantes de outros xenobióticos.

O ponto 2) e 3) é especialmente importante dado que o PI utilizado é um composto deuterado de uma substância a ser validada (clomipramina), que pode ter como impureza o seu composto não deuterado. Isto leva a que o sinal do PI possa interferir com o sinal dos ADs e vice-versa.

Segundo [93] e [92], esta avaliação é feita visualmente, observando os cromatogramas obtidos no estudo. Ao contrário dos outros 3 pontos, a preparação do primeiro é realizada com pelo menos 10 amostras de sangue branco diferentes, em que o procedimento de ensaio descrito em 5.2 foi aplicado com exceção da fortificação do PI. Estas 10 amostras de sangue branco correspondem a 10 misturas (*pools*), cada uma delas constituída por cinco amostras negativas para antidepressivos previamente analisadas por ensaio imuno-enzimático (EVOLIS, Bio-Rad), tabela 5.6. A maioria das amostras dos sangues brancos selecionados são sangues da cavidade periférica (*post-mortem*), com exceção da amostra de sangue dos seguintes processos: 3049/21, 1866/22, 2064/2022 e 2536/22. Para além disso, a POOL10 é ainda constituída por apenas sangues *ante-mortem*, recolhidos ou no âmbito do controlo rodoviário ou cedidos pelo Instituto Português do Sangue e Transplantação (IPST).

Para o ponto 2) e 3), a uma amostra de sangue branco foram extraídas duas alíquotas, uma com a adição de PI e outra sem a adição de PI e com a fortificação de 80 μL da MP de ADs descrita em 5.2 após a extração. Por fim, para a avaliação do ponto 4), uma alíquota de 100 μL de amostra de sangue branco foi extraída e posteriormente fortificada com 50 μL de uma solução de uma mistura padrão de 23 benzodiazepinas (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Tabela 5.6: Misturas de sangue utilizadas no estudo das interferências.

Código (Misturas de sangue)	Número de processo/Ano
POOL1	3049/21; 3043/21; 2899/21; 2857/21; 108/22
POOL2	110/22; 507/22; 553/22; 588/22; 596/22
POOL3	663/22; 938/22; 988/22; 1114/22; 1153/22
POOL4	1193/22; 1493/22; 1553/22; 1555/22; 1561/22
POOL5	1562/22; 1573/22; 1675/22; 1677/22; 1866/22
POOL6	1878/22; 2064/22; 1975/22; 2536/22; 176/22
POOL7	2517/22; 2519/22; 2525/22; 2531/22; 2538/22
POOL8	2541/22; 1491/22; 2534/22; 2540/22; 2544/22;
POOL9	2545/22; 2551/22; 2595/22; 2596/22; 2722/22
POOL10	2160/22; 3265/22; 800/23; SV130-08; SV155-12

5.4.2 Supressão iónica

A supressão iónica do analito resulta de possíveis efeitos da matriz, resultantes de componentes que possam estar presentes na matriz biológica e influenciar a resposta do método analítico. O estudo deste parâmetro é de elevada importância uma vez que a co-eluição de componentes é um fenómeno bastante comum em análises realizadas com a técnica de LC-MS/MS [92] [93].

O estudo deste parâmetro de validação pode ser realizado por uma de duas formas: método de infusão em coluna e o método de fortificação pós-extração [93] [92]. A diferença entre estes dois métodos reside no tipo de estudo que se pretende realizar, isto é, se for pretendido um teste qualitativo ou o desenvolvimento do método, o mais correto é testar o primeiro método uma vez que fornece informações sobre os tempos de retenção em que a supressão iónica é esperada. Contudo, se o pretendido for uma análise quantitativa, o método de fortificação pós-extração é o mais indicado uma vez que produz uma estimativa quantitativa do efeito matriz e sua variabilidade, tornando-se mais objetivo [93].

De acordo com as normas a seguir neste trabalho, são necessárias 10 matrizes biológicas diferentes (por tipo de matriz) e a sua fortificação tem de ser feita com uma de duas concentrações diferentes, uma de gama baixa e uma de gama alta [92].

Com isto, foram utilizadas as *pools* descritas anteriormente. A cada uma delas foi realizado o procedimento de ensaio descrito no capítulo 5.2, sem a adição do PI. Para cada uma das 10 *pools* extraídas, 2 conjuntos foram preparados (Lote 1 e Lote 2):

1) 50 μL do extrato foi adicionado 80 μL da MP e 120 μL da solução da fase móvel nas condições iniciais - Lote 1

2) 50 μL do extrato foi adicionado 10 μL da MP e 190 μL da solução da fase móvel nas condições iniciais - Lote 2

Paralelamente, outros 2 conjuntos (Lote 3 e Lote 4) foram preparados:

3) 170 μL da solução da fase móvel nas condições iniciais e 80 μL da MP - Lote 3

4) 240 μL da solução da fase móvel nas condições iniciais e 10 μL da MP - Lote 4

Tanto o Lote 3 e o Lote 4 foram injetados 6 vezes, estando de acordo com as normas de [92], com o objetivo de estabelecer uma média da área do pico de eluição para cada concentração.

A análise deste parâmetro baseia-se na comparação de respostas obtidas do Lote 3 e Lote 4 com o Lote 1 e o Lote 2, respetivamente. Se o valor da supressão iónica, calculado a partir da equação 6.1 exceder $\pm 25\%$ é necessário verificar se outros parâmetros da validação (i.e. LD, precisão ou exatidão) são afetados, pois estes podem sofrer impacto com um valor alto do efeito matriz [92].

5.4.3 Linearidade

O modelo de calibração corresponde ao modelo que descreve a relação entre a resposta do sinal, por exemplo a área do pico do analito, e do PI, e a sua respetiva concentração. Para que este parâmetro seja testado, tem se estabelecer uma gama de trabalho, equivalente àquele que seja esperado na rotina de trabalho do SQTf-C. Este modelo pode variar entre um modelo linear, um modelo ponderado linear, um modelo quadrático, entre outros, dependendo de qual descreve melhor a relação mencionada anteriormente.

Para que seja possível perceber qual é o modelo mais adequado para testar este parâmetro, é necessário testar a homogeneidade da variância e perceber se o modelo cumpre o critério da homocedasticidade. Para se comprovar tal critério pode se utilizar gráficos de resíduos parciais. Se estes gráficos demonstrarem que os valores estão distribuídos de forma aleatória sobre o eixo vertical, então as variâncias são homogêneas. Para comprovar esta homogeneidade, realiza-se ou o teste de Fischer ou o teste de Cochran, ambos adequados para este tipo de estudo. Uma vez que se trata de uma gama de concentração bastante ampla, o teste de Cochran é o mais indicado. Caso as variâncias venham a ser homogêneas, considera-se o método linear, contudo se o resultado for heterogêneo, um fator de ponderação tem de ser aplicado e a linearidade comprovada. Este fator de ponderação vai fazer com que a contribuição da variância dos calibradores de maior concentração não seja tão elevada, como aconteceria se não existisse nenhum fator de ponderação.

Após verificar a homogeneidade das variâncias e, caso seja preciso, de se escolher os fatores de ponderação mais adequados, avalia-se a linearidade. De acordo com [92], a avaliação da linearidade é feita não só pelo coeficiente de correlação (r^2) mas também pelos gráficos de resíduos parciais. Através destes gráficos, é possível detetar possíveis *outliers* e é possível demonstrar também se o modelo escolhido é o indicado para representar os resultados.

Apesar dos resultados obtidos no parâmetro do efeito matriz terem sido satisfatórios, é recomendado que a linearidade seja avaliada utilizando uma matriz biológica. Foram escolhidas 10 concentrações de cada analito, diferentes de zero e 5 réplicas de cada concentração foram analisadas. O procedimento experimental consistiu em fortificar 100 μL de sangue branco, de acordo com a tabela 5.3 e de seguida realizar o procedimento de ensaio descrito em 5.2.

5.4.4 Arrastamento

O arrastamento, ou *carryover* em inglês, é tomado como o erro induzido resultante de contaminações de um analito em análises anteriores. Este parâmetro, quando comprovado que existe, influencia nos resultados da análise, tanto qualitativos como quantitativos.

Para avaliar este parâmetro, amostras brancas de sangue são injetadas logo após uma amostra

fortificada com uma concentração elevada dos analitos a serem validados. A validação deste método foi realizado em simultâneo com o anterior. De acordo com [92], é necessário a injeção em triplicado, pelo que se injetou três amostras de sangue branco após a injeção do calibrador mais alto, a fim de verificar se existia alguma contaminação.

5.4.5 Precisão

Este parâmetro pode ser validado em simultâneo com o parâmetro da exatidão. A precisão relaciona-se com o grau de concordância entre várias medições, nas mesmas condições, e pode ser expressa pela % do CV. A precisão pode ser dividida em três níveis diferentes: repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade.

- A repetibilidade exprime a precisão de um método sob as mesmas condições, num curto espaço de tempo e pode também ser denominada como precisão intra-dias ou dentro de grupos. Reflete a concordância dos resultados entre sucessivas extrações e injeções da mesma amostra.

- A precisão intermédia (entre grupos) traduz-se na precisão do método quando sujeito ao maior número de variações nas condições. No caso deste estudo, a sua realização realizou-se em 5 dias distintos, com preparação diária de curva de calibração e controlos, assim como sangues brancos e pipetas automáticas distintas. Para além destas variações realizadas de forma deliberada, existe todas as variações não-intencionais que estão intrínsecas ao método analítico a ser validado, como é o caso das alterações associadas ao equipamento de LC-MS/MS (e.g. oscilações da pressão, da temperatura).

- A reprodutibilidade que se define como a dispersão de resultados do método obtida com estudos interlaboratoriais. Este nível não pode ser estudado uma vez que envolve outros laboratórios.

De acordo com as normas a seguir neste trabalho, para estudar a precisão, é necessário a construção de 5 curvas de calibração distintas, em 5 dias diferentes, de acordo com 5.3 [92]. Paralelamente a cada curva, são preparadas 3 controlos (baixa, média e alta), em triplicado, e aplicado o procedimento de ensaio descrito em 5.2. Segundo [93], existem duas abordagens para estudar a precisão (repetibilidade e precisão intermédia), sendo a utilização da ferramenta da ANOVA (fator único) a mais adequada, uma vez que a estimativa de repetibilidade obtida nesta abordagem é baseada em dados adquiridos não apenas em uma única, mas em várias momentos e, portanto, é mais provável que reflita o desempenho de repetibilidade real do método.

5.4.6 Exatidão

Assim como a precisão, a exatidão é também validada utilizando 3 controlos diferentes (baixo, médio e alto), em 3 amostras distintas, realizando 5 injeções separadas. Paralelamente é necessário a realização de 5 curvas de calibração para ser possível determinar o valor de concentração de cada substância.

5.4.7 Limiares analíticos

O LD de um método é definido como a concentração mais baixa de um analito numa amostra que consegue ser detetada e não confundida com o sinal do ruído. Este valor pode ser estudado através de inúmeras formas, nomeadamente [93]:

- 1) Assumindo o valor do calibrador mais baixo (diferente de zero) da curva de calibração e testá-lo através dos critérios de confirmação (descritos mais à frente);
- 2) Assumir um valor fixo e testá-lo através dos critérios de confirmação;
- 3) Calcular o valor através do sinal do ruído;
- 4) Calcular o valor através dos parâmetros de uma curva de calibração.

A abordagem escolhida foi a última, em que o valor do LD calculado, através de uma equação apresentada mais à frente no trabalho, vai depender da gama de trabalho escolhida para a curva de calibração.

Para tal, três curvas de calibração foram construídas, numa gama de trabalho o mais perto possível do limite de deteção esperado.

O LQ por definição é a concentração mais baixa de um analito a ser quantificado através de um método analítico. Segundo [92], existem duas possibilidades de estudar este parâmetro: utilizar o primeiro calibrador da curva de calibração como o LQ ou assumir um valor fixo e testá-lo através dos critérios de confirmação.

Decidiu-se calcular, através de uma equação apresentada mais à frente no trabalho, o valor de LQ através da mesma curva de calibração descrita acima e de seguida testar este valor demonstrando o cumprimento de todos os critérios de identificação, precisão e exatidão. De forma a testar o valor de LQ calculado, preparou-se um controlo a uma concentração próxima do valor obtido de cada substância e injetou-se em triplicado. Paralelamente, preparou-se uma curva de calibração semelhante à preparada anteriormente para a determinação dos limites. As concentrações dos controlos estão apresentadas na tabela 5.7.

5.4.8 Diluição

Apesar de serem menos frequentes as ocasiões em que existem amostras biológicas com valores de concentrações elevadas, estas também têm de ser analisadas. Uma vez que a gama de trabalho escolhida para a validação deste método analítico tem um máximo de concentração de 200, 500, 1000 e 2000 ng/mL, dependendo do AD, é necessário diluir as amostras que têm um valor de concentração superior a este. Com isto dito, a integridade da diluição tem de ser estudada para perceber se afeta a precisão e a exatidão do método.

De acordo com [92], este estudo deve ser feito fortificando uma amostra de sangue branco com

Tabela 5.7: Concentração dos controlos utilizados para testar o limite de quantificação.

Substância	Concentração (ng/mL)	Substância	Concentração (ng/mL)
Amitriptilina	40	Mirtazapina	10
Bupropiona	10	Desmetilmirtazapina	10
Citalopram	40	Nortriptilina	40
Desmetilcitalopram	10	Paroxetina	40
Clomipramina	10	Reboxetina	40
Desmetilclomipramina	10	Sertralina	40
Dosulepina	10	Desmetilsertralina	10
Desmetildosulepina	10	Tianeptina	40
Duloxetina	40	Trazodona	100
Fluoxetina	40	m-CPP	10
Desmetilfluoxetina	40	Trimipramina	40
Fluoxamina	40	Desmetiltrimipramina	40
Imipramina	40	Venlafaxina	40
Maprotilina	40	Desmetilvenlafaxina	40
Mianserina	10	Vortioxetina	10
Desmetilmianserina	10		

uma concentração elevada para que esta possa vir a ser diluída. Os fatores de diluição escolhidos para serem estudados são de 1:5 e 1:10. Para tal, fortificou-se uma amostra de sangue branco com 100 μL de uma MP num total de 1 mL, a 5, 10 e 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para obter uma concentração final de 500, 1000 e 2000 ng/mL, respetivamente (de todas as substâncias à exceção da desmetilmirtazapina e m-CPP). Para o primeiro fator de diluição (1:5), retirou-se 100 μL da mistura anterior para um tudo *ependorf* e acrescentou-se 400 μL de sangue branco e para o segundo fator de diluição (1:10), 100 μL da mistura anterior foram adicionados 900 μL de sangue branco. De seguida, procedeu-se à realização do procedimento de ensaio descrito em 5.2. Cada solução foi realizada em 5 replicados independentes e cada replicado foi injetado 3 vezes. A avaliação fez-se estudando a precisão e a exatidão.

5.4.9 Estabilidade

A estabilidade é um parâmetro importante a ser estudado uma vez que todos os passos de uma análise podem não ser realizados de forma contínua. Com isto, é necessário avaliar quanto tempo as amostras biológicas extraídas podem ser mantidas sem ocorrer alterações irreversíveis e inaceitáveis [92].

Para tal, foram preparados dois controlos, um baixo e um alto, e às amostras foi aplicado o procedimento de ensaio descrito em 5.2. De seguida, 4 alíquotas foram colocadas em 4 vials distintos,

e diluídas com a solução da fase móvel nas condições iniciais, de cada concentração, e armazenados nas condições a que costumam ser mantidas antes de uma análise, ou seja, num suporte à temperatura ambiente. A primeira alíquota foi analisada e corresponde à estabilidade no tempo 0 h, a segunda analisada 24 h depois, a terceira analisada 72 h depois e por último, ao final de 7 dias.

Outra análise foi ainda feita, semelhante à anterior, diferenciando apenas as condições a que são sujeitas as amostras antes da injeção. Isto é, após a extração, logo após a centrifugação, o tubo *ependorf* foi armazenado no congelador, a -20 °C. A estabilidade foi estudada a 7 dias (168 h) e 1 mês (730 h), ou seja, 7 dias e 1 mês depois da extração o tubo *ependorf* é retirado do congelador, colocado no vial, diluído com a solução da fase móvel nas condições iniciais e por fim analisado no sistema de LC-MS/MS.

CAPÍTULO 6

RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Estudo do padrão de fragmentação dos antidepressivos

Na tabela 5.5 estão mencionadas as 2 transições iônicas escolhidas para o método analítico. Neste capítulo estão descritas as possíveis fórmulas químicas de cada um dos fragmentos correspondentes a cada transição iônica. O modo MRM requer a obtenção de, pelo menos, duas transições iônicas por analito para a sua correta identificação. A 1^o transição iônica é sempre a mais intensa e é utilizada para a quantificação enquanto que a 2^o transição permite a confirmação da substância.

Tabela 6.1: Identificação das fórmulas químicas do íão molecular e dos fragmentos da 1^o e 2^o transições de todos os ADs [94].

Substância	Íão molecular	1 ^o transição	2 ^o transição
Amitriptilina	C20H24N+ (m/z 278)	C18H17+ (m/z 233)	C7H7+ (m/z 91)
Bupropiona	C13H19NClO+ (m/z 240)	C9H9NClO+ (m/z 184)	C9H7O+ (m/z 131)
Citalopram	C20H22FN2O+ (m/z 325)	C18H13FN+ (m/z 262)	C7H6F+ (m/z 109)
Desmetilcitalopram	C19H20FN2O+ (m/z 311)	C7H6F+ (m/z 109)	C18H13FN+ (m/z 262)
Clomipramina	C19H24ClN2+ (m/z 315)	C5H12N+ (m/z 86)	C3H8N+ (m/z 58)
Desmetilclomipramina	C18H22ClN2 (m/z 301)	C4H10N+ (m/z 72)	C2H6N+ (m/z 44)
Dosulepina	C19H22NS+ (m/z 296)	C15H11S+ (m/z 223)	C13H16NS+ (m/z 218)
Desmetildosulepina	C18H20NS+ (m/z 282)	C15H13S+ (m/z 225)	C12H12NS+ (m/z 202)
Duloxetina	C18H20NOS+ (m/z 298)	C8H12NS+ (m/z 154)	C2H6N+ (m/z 298)
Fluoxetina	C17H19F3NO+ (m/z 310)	C2H6N+ (m/z 44)	C10H14N+ (m/z 148)
Desmetilfluoxetina	C16H17F3NO+ (m/z 296)	C9H12N+ (m/z 134)	CH4N+ (m/z 30)
Fluoxamina	C15H22F3N2O2+ (m/z 319)	C4H7O+ (m/z 71)	C13H15F3NO+ (m/z 258)
Imipramina	C19H25N2+ (m/z 281)	C5H12N+ (m/z 86)	C3H8N+ (m/z 58)
Maprotilina	C20H24N+ (m/z 278)	C18H20N+ (m/z 250)	C15H11+ (m/z 191)
Mianserina	C18H21N2+ (m/z 265)	C18H20N2+ (m/z 208)	C18H20N2+ (m/z 58)
Desmetilmianserina	C17H19N2+ (m/z 251)	C18H20N2+ (m/z 208)	C8H8N+ (m/z 118)
Mirtazapina	C17H19N3+ (m/z 266)	C13H11N2+ (m/z 195)	C4H10N+ (m/z 72)
Desmetilmirtazapina	C16H17N3+ (m/z 252)	C13H11N2+ (m/z 195)	C14H13N2+ (m/z 209)
Nortriptilina	C19H22N+ (m/z 264)	C18H17+ (m/z 233)	C7H7+ (m/z 91)
Paroxetina	C19H21FNO3+ (m/z 330)	C12H15FN+ (m/z 192)	C4H8N+ (m/z 70)
Reboxetina	C19H24NO3+ (m/z 314)	C11H14NO+ (m/z 176)	C7H7+ (m/z 91)
Sertralina	C17H18Cl2N+ (m/z 306)	C16H13Cl2+ (m/z 275)	C7H5Cl2+ (m/z 159)
Desmetilsertralina	C16H16Cl2N+ (m/z 292)	C7H5Cl2+ (m/z 159)	C10H9+ (m/z 129)

Tabela 6.1 continuação da página anterior

Substância	Ião molecular	1º transição	2º transição
Tianeptina	C21H26ClN2O4S+ (m/z 437)	C14H11ClN+ (m/z 228)	C14H11ClNO2S+ (m/z 292)
Trazodona	C19H23ClN5O+ (m/z 372)	C9H10N3O+ (m/z 176)	C7H6N3O+ (m/z 148)
m-CPP	C10H14ClN2+ (m/z 197)	C8H8N+ (m/z 118)	C7H7N2+ (m/z 119)
Trimipramina	C20H27N2+ (m/z 295)	C6H14N+ (m/z 100)	C3H8N+ (m/z 58)
Desmetiltrimipramina	C19H25N2+ (m/z 281)	C5H12N+ (m/z 86)	C15H14N+ (m/z 208)
Venlafaxina	C17H28NO2+ (m/z 278)	C17H26NO+ (m/z 260)	C3H8N+ (m/z 58)
Desmetilvenlafaxina	C16H26NO2+ (m/z 264)	C3H8N+ (m/z 58)	C7H7O+ (m/z 107)
Vortioxetina	C18H23N2S+ (m/z 299)	C8H8NS+ (m/z 150)	C6H5S+ (m/z 109)

6.2 Parâmetros da validação

6.2.1 Estudo de interferências

Após análise visual dos cromatogramas do ponto 1), pode-se afirmar que não existe nenhuma interferência causada pela matriz, uma vez que todo o sinal existente tem um valor insignificante. No apêndice B estão apresentados todos os cromatogramas, no tempo de retenção respectivo, de todas as substâncias validadas, dos 4 pontos estudados.

A análise dos cromatogramas do estudo do ponto 2) demonstram a ausência de interferentes no tempo de retenção esperado dos ADs. Através da análise dos cromatogramas do estudo do ponto 3) podemos, para além de confirmar que não existe nenhuma interferência dos ADs no sinal do PI, verificar que existe uma interferência entre duas substâncias, a amitriptilina e a maprotilina, na segunda transição. Esta interferência faz com que exista um "ombro" nos picos correspondentes às duas substâncias, dificultando a confirmação numa matriz biológica.

A amostra de sangue branco fortificada com benzodiazepinas demonstra a ausência de sinais interferentes no tempo de retenção dos ADs.

6.2.2 Supressão iónica

A equação que traduz o efeito matriz está apresentada a seguir, equação 6.1. O valor de A corresponde à média da área dos picos do Lote 1 ou Lote 2 e o valor de B, à média da área dos picos do Lote 3 ou Lote 4, dependendo da concentração que se quer avaliar.

$$EM(\%) = \left(\frac{A}{B} - 1 \right) \cdot 100 \quad (6.1)$$

Através da equação acima descrita, calculou-se a percentagem do efeito matriz, resultados apresentados na tabela 6.2.

Um valor do efeito matriz negativo corresponde a uma supressão iónica e um valor positivo a um aumento de ionização.

Como é possível observar pelos resultados do efeito matriz, nenhum apresenta efeito matriz. É possível ainda afirmar que no conjunto de ADs, o efeito matriz que se observa é de supressão iónica.

6.2.3 Linearidade

6.2.3.1 Homogeneidade

A fim de perceber se existe homogeneidade das variâncias ao longo da gama de trabalho estudada, observaram-se os gráficos de resíduos parciais. Através destes (figuras apresentadas no apêndice D.1)

Tabela 6.2: Efeito matriz na gama alta e baixa de cada substância

Substância	Efeito matriz (%)		Substância	Efeito matriz (%)	
	Alta	Baixa		Alta	Baixa
Amitriptilina	-6,35	-18,39	Mirtazapina	-6,29	-20,99
Bupropiona	-12,63	-20,11	Desmetilmirtazapina	-8,34	-22,21
Citalopram	-7,37	-20,29	Nortriptilina	-6,89	-14,75
Desmetilcitalopram	-12,42	-20,55	Paroxetina	-12,74	-19,17
Clomipramina	-12,47	-20,51	Reboxetina	-4,50	-15,75
Desmetilclomipramina	-10,74	-15,03	Sertralina	-10,64	-12,33
Dosulepina	-10,13	-21,38	Desmetilsertralina	-18,19	-19,53
Desmetildosulepina	-12,33	-20,43	Tianeptina	-5,97	-18,05
Duloxetina	-10,15	-20,68	Trazodona	-4,89	-23,79
Fluoxetina	-11,08	-20,81	m-CPP	-13,27	-24,15
Desmetilfluoxetina	-12,28	-18,36	Trimipramina	-5,15	-17,19
Fluvoxamina	-8,81	-17,18	Desmetiltrimipramina	-6,08	-15,60
Imipramina	-5,76	-15,65	Venlafaxina	-5,78	-17,57
Maprotilina	-6,28	-16,27	Desmetilvenlafaxina	-9,71	-24,03
Mianserina	-10,60	-21,55	Vortioxetina	-10,42	-10,11
Desmetilmianserina	-7,56	-20,80			

é possível perceber que os valores não estão distribuídos de forma aleatória ao longo do eixo vertical. Estes gráficos demonstram que existe um aumento de variância diretamente proporcional ao aumento da concentração.

De forma a comprovar a homogeneidade das variâncias, foi realizado o teste de Cochran, no qual o seu valor experimental (C_{exp}), calculado a partir da equação 6.2, tem de ser inferior ao seu valor crítico teórico (C_{crit}) ($m=5$, $n=10$ e nível de confiança de 99 %). Como mencionado anteriormente, se $C_{\text{exp}} < C_{\text{crit}}$, então as variâncias são homogêneas e o modelo de regressão linear simples é comprovado, contudo se o contrário ocorrer, é necessário optar por um modelo de regressão linear ponderado. De acordo com [95], a homogeneidade das variâncias pode ser também testada pelo teste de Fischer, equação 6.3, pelo que se realizou ambos.

$$C_{\text{exp}} = \frac{S_{\text{max}}^2}{\sum_{i=1}^n S_i^2} \quad (6.2)$$

$$F_{\text{exp}} = \frac{S_2^2}{S_1^2} \quad (6.3)$$

Na tabela 6.3 estão apresentados os resultados do teste de Cochran e do teste de Fischer de cada AD. Pelo teste de Fischer, todas as variâncias são heterogêneas, à exceção da bupropiona, clomipramina, fluvoxamina, desmetilsertralina e tianeptina. Já pelo teste de Cochran, quase todas são homogêneas, à exceção de 10 substâncias, sendo estas, dosulepina, desmetildosulepina, fluvoxamina, mianserina, nortriptilina, trazodona, venlafaxina e desmetilvenlafaxina. Uma vez que estes teste de Cochran é somente um teste estatístico, existe heterocedasticidade em algumas substâncias e não se pretende reduzir a gama de trabalho, considerou-se que haveria a necessidade de recorrer a um modelo linear ponderado.

Tabela 6.3: Valores do teste de Fischer e de Cochran para um nível de confiança de 99 %, para cada AD

Substância	$F_{0,01(1,8)}^u$	$X_{c0,01(8,8)}$
	53,44	0,39
	Valor do teste (Fischer)	Valor do teste (Cochran)
Amitriptilina	369,55	0,32
Bupropiona	26,75	0,39
Citalopram	659,51	0,34
Desmetilcitalopram	73,51	0,30
Clomipramina	49,19	0,23
Desmetilclomipramina	235,03	0,33
Dosulepina	111,77	0,45
Desmetildosulepina	146,49	0,51
Duloxetina	71,77	0,36
Fluoxetina	2596,26	0,35
Desmetilfluoxetina	1664,64	0,30
Fluvoxamina	30,23	0,46
Imipramina	740,24	0,39
Maprotilina	108,74	0,34
Mianserina	84,71	0,53
Desmetilmianserina	90,77	0,25
Desmetilmirtazapina	749,34	0,32
Nortriptilina	203,09	0,40
Paroxetina	156,41	0,43
Reboxetina	373,09	0,28
Sertralina	207,27	0,39
Desmetilsertralina	38,22	0,33
Tianeptina	6,24	0,35

Tabela 6.3 continuação da página anterior

Substância	$F_{0,01(1,8)}^u$	$Xc_{0,01(8,8)}$
	53,44	0,39
	Valor do teste (Fischer)	Valor do teste (Cochran)
Trazodona	10097,80	0,40
m-CPP	3693,71	0,24
Trimipramina	96,57	0,46
Desmetiltrimipramina	109,87	0,38
Venlafaxina	211,46	0,43
Desmetilvenlafaxina	1071,41	0,49
Vortioxetina	233,84	0,23

6.2.3.2 Fatores de ponderação

De acordo com [95], os principais fatores de ponderação a serem estudados são $w = 1/x, 1/x^2, 1/x^{1/2}, 1/y, 1/x^2$ e $1/y^{1/2}$. Para se escolher o melhor, calculou-se o somatório dos resíduos e o r^2 . O fator de ponderação escolhido é aquele que tiver simultaneamente o menor somatório dos resíduos e o maior r^2 . Para ser possível calcular a percentagem do somatório dos resíduos, calculada através da equação 6.6, e o r^2 , calculado através da equação 6.7, é necessário o cálculo da declive da reta (m) e o ordenada na origem (b) a partir das equações 6.4 e 6.5, sendo w o fator de ponderação a ser utilizado e x_i e y_i , os resultados obtidos de cada ponto [95].

$$m = \frac{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i y_i - \sum w_i x_i \cdot \sum w_i y_i}{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i^2 - (\sum w_i x_i)^2} \quad (6.4)$$

$$b = \frac{\sum w_i x_i^2 \cdot \sum w_i y_i - \sum w_i x_i \cdot \sum w_i x_i y_i}{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i^2 - (\sum w_i x_i)^2} \quad (6.5)$$

$$r = \frac{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i y_i - \sum w_i x_i \cdot \sum w_i y_i}{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i^2 - (\sqrt{\sum w_i x_i})^2 \cdot \sqrt{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i^2 - (\sum w_i x_i)^2}} \quad (6.6)$$

$$ER (\%) = \frac{C_{\text{exp}} - C_{\text{teórico}}}{C_{\text{teórico}}} \cdot 100 \quad (6.7)$$

Os dados utilizados para o estudo dos fatores de ponderação foram os da linearidade, isto é, foram utilizados os dados das curvas de calibração que se construíram em quintuplicado. Os resultados obtidos do somatório dos resíduos e do r^2 estão apresentados no apêndice D.2. É necessário realizar-se uma normalização dos dados, uma vez que estes parâmetros são independentes entre si. Para isso utilizou-se a equação 6.8. O fator de ponderação escolhido, isto é, o que apresentou o menor valor da

soma do valor normalizado do somatório dos resíduos com o valor normalizado de $1-r^2$ foi o $1/x$ para todas as substâncias.

$$Z = \frac{x - \mu}{\delta} \quad (6.8)$$

6.2.3.3 Linearidade

Por fim, depois da homogeneidade e os fatores de ponderação estudados, avalia-se a linearidade. O critério de avaliação deste parâmetro, segundo [92], é a análise dos gráficos dos valores residuais. Como já referido anteriormente, através deste é possível eliminar pontos aberrantes (*outliers*), quando o seu desvio residual é superior ao dobro do erro padrão estimado no estudo da regressão para as curvas de calibração. Para além deste, também foi aplicado o critério do r^2 superior a 0,99 e a inclusão do valor zero na intersecção da curva com o eixo das ordenadas, tendo em consideração um intervalo de confiança de 95 %.

Na tabela 6.4 estão apresentadas as curvas de calibração com o corresponde valor do r^2 , o erro padrão, o intervalo de interceção da ordenada na origem e o número de pontos utilizados em cada curva.

Tabela 6.4: Resumo dos resultados do estudo da linearidade de cada AD

Substância	Equação	r ²	Erro padrão (S _{y/x})	Intervalo de intercepção da ordenada na origem Calibradores		
				95% inf.	95% sup.	
Amitriptilina	$y = 0,0047x - 0,0909$	0,9965	0,09352	-0,05793	0,26155	9
Bupropiona	$y = 0,0027x + 0,0104$	0,9946	0,03863	-0,02700	0,04772	10
Citalopram	$y = 0,0052x + 0,0123$	0,9985	0,06804	-0,06145	0,08620	9
Desmetilcitalopram	$y = 0,0061x + 0,0224$	0,9962	0,05658	-0,03896	0,08381	9
Clomipramina	$y = 0,0056x + 0,0321$	0,9960	0,07557	-0,04100	0,10518	10
Desmetilclomipramina	$y = 0,0023x + 0,0107$	0,9965	0,02179	-0,01297	0,03432	9
Dosulepina	$y = 0,0038x + 0,0313$	0,9934	0,06448	-0,03110	0,09362	10
Desmetildosulepina	$y = 0,0024x + 0,0098$	0,9990	0,01294	-0,00428	0,02381	9
Duloxetina	$y = 0,0012x + 0,0072$	0,9913	0,04237	-0,03374	0,04822	10
Fluoxetina	$y = 0,0010x + 0,0156$	0,9974	0,01790	-0,00384	0,03501	9
Desmetilfluoxetina	$y = 0,0008x + 0,0152$	0,9947	0,01502	-0,00105	0,03154	9
Fluoxamina	$y = 0,0012x + 0,0112$	0,9953	0,02123	-0,01174	0,03433	9
Imipramina	$y = 0,0072x + 0,0990$	0,9954	0,15134	-0,06523	0,26316	9
Maprotilina	$y = 0,0075x + 0,2203$	0,9908	0,20570	-0,00289	0,44345	9
Mianserina	$y = 0,0050x + 0,0118$	0,9962	0,05167	-0,04429	0,06782	9
Desmetilmianserina	$y = 0,0060x + 0,0465$	0,9936	0,09975	-0,04996	0,14297	10
Mirtazapina	$y = 0,0099x + 0,0460$	0,9950	0,12693	-0,07672	0,16877	10
Desmetilmirtazapina	$y = 0,0136x + 0,0163$	0,9922	0,10117	-0,08147	0,11419	10
Nortriptilina	$y = 0,0054x + 0,1152$	0,9921	0,20774	-0,08566	0,31613	10
Paroxetina	$y = 0,0014x + 0,0206$	0,9965	0,02839	-0,01018	0,05143	9
Reboxetina	$y = 0,0078x + 0,0865$	0,9973	0,15527	-0,08197	0,25495	9

Tabela6.4 continuação da página anterior

Substância	Equação	r ²	Erro padrão (S _{y/x})	Intervalo de interceção da ordenada na origem		Calibradores
				95% inf.	95% sup.	
Sertralina	$y = 0,0027x + 0,0113$	0,9940	0,04278	-0,03868	0,05662	9
Desmetilsertralina	$y = 0,0002x + 0,0025$	0,9971	0,00233	-0,00004	0,00501	9
Tianeptina	$y = 0,0079x + 0,0609$	0,9947	0,21396	-0,17120	0,29307	10
Trazodona	$y = 0,0043x + 0,1544$	0,9958	0,23999	-0,07764	0,38653	10
m-CPP	$y = 0,00204x + 0,0049$	0,9925	0,02037	-0,01476	0,02465	10
Trimipramina	$y = 0,0078x + 0,1053$	0,9937	0,22461	-0,11196	0,32247	10
Desmetiltrimipramina	$y = 0,0132x + 0,1462$	0,9942	0,13858	-0,00465	0,29699	8
Venlafaxina	$y = 0,0033x + 0,0400$	0,9961	0,08192	-0,03917	0,11927	10
Desmetilvenlafaxina	$y = 0,0014x + 0,0093$	0,9964	0,03209	-0,02173	0,04034	9
Vortioxetina	$y = 0,0079x + 0,0467$	0,9938	0,11227	-0,06187	0,15528	10

Através dos resultados apresentados, percebe-se que todas as substâncias têm um valor de r^2 superior a 0,99 e que o critério da inclusão do valor zero na intersecção da curva com o eixo das ordenadas é cumprido. O número de calibradores utilizados varia entre as substâncias uma vez que algumas apresentaram pontos aberrantes. No caso da desmetiltrimipramina, 2 pontos da curva de calibração foram removidos devido ao critério da inclusão do valor zero na intersecção da curva com o eixo das ordenadas não ser cumprido.

Com isto, o estudo da linearidade permite concluir que o método é linear na gama de trabalho estudada.

6.2.4 Arrastamento

Segundo [92], para que não esteja presente o fenómeno de arrastamento, o sinal deste não pode exceder 10 % do sinal do calibrador mais baixo. Como tal não se observou, pode-se afirmar que não existe arrastamento significativo neste método analítico. Os resultados estão apresentados na tabela 6.5.

Tabela 6.5: Resultados do estudo do arrastamento.

Substância	Arrastamento (%)	Substância	Arrastamento (%)
Amitriptilina	0,59	Mirtazapina	0,89
Bupropiona	1,76	Desmetilmirtazapina	1,44
Citalopram	0,68	Nortriptilina	0,34
Desmetilcitalopram	0,36	Paroxetina	1,18
Clomipramina	1,07	Reboxetina	1,02
Desmetilclomipramina	1,54	Sertralina	1,15
Dosulepina	1,21	Desmetilsertralina	9,93
Desmetildosulepina	1,32	Tianeptina	0,64
Duloxetina	1,54	Trazodona	1,46
Fluoxetina	4,52	m-CPP	0,12
Desmetilfluoxetina	0,99	Trimipramina	0,68
Fluvoxamina	1,36	Desmetiltrimipramina	0,36
Imipramina	0,90	Venlafaxina	0,90
Maprotilina	0,56	Desmetilvenlafaxina	0,32
Mianserina	1,33	Vortioxetina	1,27
Desmetilmianserina	1,06		

Os valores das intensidades da amostra branca e do calibrador mais baixo estão apresentados no apêndice C.

6.2.5 Precisão

O estudo da precisão foi realizado através da ferramenta ANOVA (fator único), de onde foram adquiridas as médias quadráticas, necessárias para o cálculo da estimativa da precisão intermédia (entre grupos) e da repetibilidade (dentro de grupos), em valor de CV (%), de cada uma das três gamas de concentração. Este valor foi calculado a partir das equações seguintes, 6.9 e 6.10.

$$CV(\%)(\text{dentro de grupos}) = \frac{\sqrt{MQ_{dg}}}{\text{Média total}} \quad (6.9)$$

$$CV(\%)(\text{entre grupos}) = \frac{\sqrt{MQ_{eg} + (n-1) \cdot MQ_{dg}}}{\text{Média total}} \quad (6.10)$$

em que,

MQ_{dg} é a média quadrática obtida através da ANOVA (fator único) da estimativa dentro de grupos MQ_{eg} é a média quadrática obtida através da ANOVA (fator único) da estimativa entre grupos n o número total de réplicas por cada análise

Os resultados apresentam-se nas tabelas seguintes, 6.6 e 6.7, em que CT1 corresponde aos resultados da gama de concentração baixa, o CT2 da concentração média e o CT3 da concentração alta, para ambos os casos. Para que a precisão intermédia e a repetibilidade seja validada, o valor de CV (%) não pode exceder os 20 % em cada gama de concentração. Como é possível observar, apesar de alguns valores se aproximarem muito do valor máximo, todos cumpriram o critério imposto, sendo possível a validação deste parâmetro em todas as substâncias.

Tabela 6.6: Resultados da precisão intermédia

Substância	CV (%)			Substância	CV (%)		
	CT1	CT2	CT3		CT1	CT2	CT3
Amitriptilina	16,2	17,7	11,1	Mirtazapina	13,6	15,8	16,8
Bupropiona	11,3	13,6	16,5	Desmetilmirtazapina	15,6	18,7	15,7
Citalopram	13,8	16,2	12,9	Nortriptilina	14,2	16,4	14,4
Desmetilcitalopram	14,9	16,8	14,4	Paroxetina	18,1	15,7	13,5
Clomipramina	12,8	19,3	12,4	Reboxetina	15,1	15,9	16,1
Desmetilclomipramina	12,5	19,3	12,4	Sertralina	14,3	14,8	19,2
Dosulepina	16,5	16,5	12,6	Desmetilsertralina	18,4	19,7	14,8
Desmetildosulepina	15,2	18,4	15,7	Tianeptina	15,1	15,4	13,4
Duloxetina	19,6	16,7	10,7	Trazodona	16,0	20,0	16,7
Fluoxetina	12,5	15,3	12,2	m-CPP	14,5	18,5	16,9
Desmetilfluoxetina	17,9	16,4	10,7	Trimipramina	13,9	15,8	15,6
Fluvoxamina	12,9	15,7	10,8	Desmetiltrimipramina	15,3	16,6	15,5
Imipramina	13,3	15,2	13,2	Venlafaxina	15,1	18,3	13,4
Maprotilina	14,9	16,0	8,1	Desmetilvenlafaxina	13,5	17,4	20,0
Mianserina	15,6	16,4	16,0	Vortioxetina	11,7	18,7	12,3
Desmetilmianserina	15,5	15,0	11,8				

Tabela 6.7: Resultados da repetibilidade

Substância	CV (%)			Substância	CV (%)		
	CT1	CT2	CT3		CT1	CT2	CT3
Amitriptilina	14,7	13,3	9,8	Mirtazapina	11,4	13,3	12,5
Bupropiona	10,4	9,5	11,2	Desmetilmirtazapina	12,4	12,8	11,7
Citalopram	11,3	12,2	9,8	Nortriptilina	11,6	15,3	15,6
Desmetilcitalopram	13,0	13,0	10,5	Paroxetina	16,4	13,1	6,8
Clomipramina	9,6	11,7	5,0	Reboxetina	9,6	11,8	12,3
Desmetilclomipramina	11,7	5,0	5,0	Sertralina	10,4	11,9	10,2
Dosulepina	15,3	13,2	9,8	Desmetilsertralina	15,2	18,2	11,8
Desmetildosulepina	13,9	13,1	11,5	Tianeptina	11,8	9,9	11,8
Duloxetina	14,2	11,2	7,4	Trazodona	11,7	14,1	11,6
Fluoxetina	12,9	11,2	9,0	m-CPP	13,1	14,4	11,4
Desmetilfluoxetina	17,8	12,5	7,8	Trimipramina	10,8	12,7	12,7
Fluvoxamina	10,0	12,2	8,1	Desmetiltrimipramina	11,0	11,7	10,5
Imipramina	10,0	11,9	9,8	Venlafaxina	11,1	13,0	10,5
Maprotilina	10,9	11,4	4,3	Desmetilvenlafaxina	10,1	13,2	13,3
Mianserina	13,9	12,5	11,8	Vortioxetina	9,2	12,9	7,6
Desmetilmianserina	11,6	11,9	9,5				

6.2.6 Exatidão

A exatidão é calculada a partir da equação 6.11, em que a média de cada concentração inclui os valores das 3 réplicas e das 5 injeções realizadas de cada substância.

$$\text{Exatidão (\%)} = \left(\frac{\text{Média da concentração}_x \text{ calculada} - \text{Concentração exata}}{\text{Concentração exata}} \right) \cdot 100 \quad (6.11)$$

Na tabela 6.8 encontram-se os resultados obtidos, em que CT1 corresponde à concentração baixa, CT2 à concentração média e CT3 à concentração alta. Assim como na precisão intermédia, para este parâmetro ser validado, o valor da exatidão em percentagem, tem de ser menor que 20 %. Através dos resultados, pode-se afirmar que o método é exato.

Tabela 6.8: Resultados da exatidão

Substância	Exatidão (%)			Substância	Exatidão (%)		
	CT1	CT2	CT3		CT1	CT2	CT3
Amitriptilina	-3,8	2,6	6,2	Mirtazapina	13,6	15,8	16,8
Bupropiona	-0,4	13,6	16,5	Desmetilmirtazapina	15,6	18,7	15,7
Citalopram	13,8	16,2	12,9	Nortriptilina	14,2	16,4	14,4
Desmetilcitalopram	14,9	16,8	14,4	Paroxetina	18,1	15,7	13,5
Clomipramina	12,8	19,3	12,4	Reboxetina	15,1	15,9	16,1
Desmetilclomipramina	12,5	19,3	12,4	Sertralina	14,3	14,8	19,2
Dosulepina	16,5	16,5	12,6	Desmetilsertralina	18,4	19,7	14,8
Desmetildosulepina	15,2	18,4	15,7	Tianeptina	15,1	15,4	13,4
Duloxetina	19,6	16,7	10,7	Trazodona	16,0	20,0	16,7
Fluoxetina	12,5	15,3	12,2	m-CPP	14,5	18,5	16,9
Desmetilfluoxetina	17,9	16,4	10,7	Trimipramina	13,9	15,8	15,6
Fluvoxamina	12,9	15,7	10,8	Desmetiltrimipramina	15,3	16,6	15,5
Imipramina	13,3	15,2	13,2	Venlafaxina	15,1	18,3	13,4
Maprotilina	14,9	16,0	8,1	Desmetilvenlafaxina	13,5	17,4	20,0
Mianserina	15,6	16,4	16,0	Vortioxetina	11,7	18,7	12,3
Desmetilmianserina	15,5	15,0	11,8				

6.2.7 Limiares analíticos

Através das equações abaixo, equação 6.12 e equação 6.13, calculou-se os valores de LD e LQ, respectivamente.

$$LD = \frac{3.3 \cdot s_{y/x}}{b} \quad (6.12)$$

$$LQ = \frac{10 \cdot s_{y/x}}{b} \quad (6.13)$$

Na tabela seguinte, tabela 6.9 estão os valores da média dos desvios padrão e das médias do declive das três curvas de calibração construídas, com um fator de ponderação $1/x$ e os valores de LD e LQ.

Tabela 6.9: Resumo dos resultados obtidos no estudo dos limites de detecção e quantificação.

Substância	$S_{y/x}$	b	LD	LQ
Amitriptilina	0,01735	0,004981	11,49	34,82
Bupropiona	0,00230	0,00207	3,66	11,10
Citalopram	0,01890	0,00512	12,18	36,92

Tabela 6.9 continuação da página anterior

Substância	S_{y/x}	b	LD	LQ
Desmetilcitalopram	0,02084	0,02151	3,20	9,69
Clomipramina	0,00321	0,00326	3,26	9,87
Desmetilclomipramina	0,00242	0,00188	4,26	12,92
Dosulepina	0,00365	0,00317	3,80	11,52
Desmetildosulepina	0,00234	0,00223	3,45	10,46
Duloxetina	0,00396	0,00111	11,76	35,63
Fluoxetina	0,00495	0,00109	15,03	45,55
Desmetilfluoxetina	0,00270	0,00065	13,81	41,84
Fluvoxamina	0,00637	0,00112	18,72	56,72
Imipramina	0,02473	0,00801	10,18	30,86
Maprotilina	0,02230	0,00745	9,88	29,95
Mianserina	0,00444	0,00375	3,90	11,83
Desmetilmianserina	0,00441	0,00522	2,78	8,43
Mirtazapina	0,007911	0,011520	2,27	6,87
Desmetilmirtazapina	0,01097	0,01358	2,67	8,08
Nortriptilina	0,02973	0,00609	16,11	48,81
Paroxetina	0,00605	0,00129	15,53	47,07
Reboxetina	0,02715	0,00834	10,74	32,55
Sertralina	0,00745	0,00181	13,57	41,12
Desmetilsertralina	0,00018	0,00021	2,89	8,76
Tianeptina	0,03534	0,00785	14,85	45,02
Trazodona	0,06853	0,00563	40,14	121,65
m-CPP	0,00291	0,00332	2,89	8,76
Trimipramina	0,02587	0,00848	10,07	30,52
Desmetiltrimipramina	0,03009	0,00715	13,88	42,07
Venlafaxina	0,01421	0,00348	13,48	40,85
Desmetilvenlafaxina	0,00694	0,00165	13,89	42,10
Vortioxetina	0,00716	0,00934	2,53	7,66

6.2.7.1 Teste ao LQ

Os valores da precisão e da exatidão foram calculados a partir da equação 6.14 e 6.11, respectivamente, e os resultados do teste ao LQ para todos os ADs são inferiores a 20 %, tabela 6.10, à exceção da desmetilsertralina. Esta substância tem um valor de exatidão adequado mas um valor de CV ligeiramente superior a 20 %.

$$CV\% = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Média}} \cdot 100 \quad (6.14)$$

Tabela 6.10: Resultados no teste do limite de quantificação.

Substância	CV (%)	Exatidão (%)	Substância	CV (%)	Exatidão (%)
Amitriptilina	2,50	9,75	Mirtazapina	3,64	10,00
Bupropiona	6,80	18,00	Desmetilmirtazapina	2,53	14,00
Citalopram	4,76	13,25	Nortriptilina	2,82	10,00
Desmetilcitalopram	2,98	8,00	Paroxetina	5,88	6,75
Clomipramina	5,35	4,00	Reboxetina	2,73	6,00
Desmetilclomipramina	0,60	-3,00	Sertralina	5,17	14,25
Dosulepina	10,97	-4,00	Desmetilsertralina	22,70	12,00
Desmetildosulepina	4,44	11,00	Tianeptina	4,59	7,00
Duloxetina	4,01	-2,50	Trazodona	3,68	1,90
Fluoxetina	5,34	16,25	Tm-CPP	4,92	12,00
Desmetilfluoxetina	17,30	12,75	Trimipramina	4,81	10,25
Fluvoxamina	5,97	-0,75	Desmetiltrimipramina	4,49	9,25
Imipramina	6,87	14,00	Venlafaxina	4,57	14,75
Maprotilina	2,54	3,50	Desmetilvenlafaxina	2,98	9,50
Mianserina	4,68	19,00	Vortioxetina	4,77	-1,00
Desmetilmianserina	3,34	5,00			

Foram ainda verificados os critérios de identificação para o LQ, isto é, o tempo de retenção relativo (TRR) e as relações iônicas das transições estudadas. Das três réplicas realizadas, a última foi utilizada como controlo positivo.

Critério do Tempo de Retenção Relativo

O primeiro critério, critério do tempo de retenção relativo, consiste na diferença relativa entre o TRR de uma dada substância na amostra e no controlo, réplica C, ser inferior a 1 %, calculada a partir da equação 6.15 e da equação 6.16.

$$TRR = \frac{TR_{\text{Analito}}}{TR_{\text{PI}}} \quad (6.15)$$

$$\Delta TRR = \frac{TRR_{\text{Analito}} - TRR_{\text{Controlo}}}{TRR_{\text{Controlo}}} \quad (6.16)$$

Para que esta condição seja cumprida, é necessário o cálculo do TRR de todas as substâncias e o cálculo do Δ TRR percentual, para que seja possível perceber se a sua diferença relativa é inferior a 1%. Os resultados estão apresentados nas tabelas seguintes, tabela 6.11 e 6.12.

Tabela 6.11: Tempo de retenção relativo dos AD nas misturas de sangue.

Substância	A	B	C	Substância	A	B	C
Amitriptilina	0,938	0,939	0,938	Mirtazapina	0,644	0,646	0,646
Bupropiona	0,720	0,720	0,720	Desmetilmirtazapina	0,649	0,650	0,649
Citalopram	0,796	0,796	0,795	Nortriptilina	0,948	0,949	0,948
Desmetilcitalopram	0,802	0,801	0,801	Paroxetina	0,888	0,888	0,890
Clomipramina	1,000	1,000	1,001	Reboxetina	0,869	0,869	0,868
Desmetilclomipramina	1,010	1,010	1,010	Sertralina	0,984	0,985	0,984
Dosulepina	0,879	0,881	0,879	Desmetilsertralina	1,004	0,997	0,999
Desmetildosulepina	0,890	0,890	0,888	Tianeptina	0,833	0,833	0,832
Duloxetina	0,921	0,923	0,921	Trazodona	0,720	0,720	0,720
Fluoxetina	0,949	0,949	0,948	m-CPP	0,624	0,624	0,624
Desmetilfluoxetina	0,951	0,951	0,951	Trimipramina	0,946	0,946	0,946
Fluvoxamina	0,940	0,942	0,942	Desmetiltrimipramina	0,915	0,917	0,915
Imipramina	0,917	0,917	0,917	Venlafaxina	0,766	0,765	0,765
Maprotilina	0,923	0,923	0,923	Desmetilvenlafaxina	0,598	0,600	0,598
Mianserina	0,810	0,808	0,807	Vortioxetina	1,024	1,024	1,024
Desmetilmianserina	0,826	0,824	0,824				

Tabela 6.12: Diferença relativa dos TRR entre os ADs e o controle nas misturas de sangue, em percentagem.

Substância	A (%)	B (%)	C (%)	Substância	A (%)	B (%)	C (%)
Amitriptilina	0,00	0,16	0,00	Mirtazapina	-0,23	0,00	0,00
Bupropiona	0,00	0,00	0,00	Desmetilmirtazapina	0,00	0,23	0,00
Citalopram	0,19	0,19	0,00	Nortriptilina	0,00	0,16	0,00
Desmetilcitalopram	0,19	0,00	0,00	Paroxetina	-0,17	-0,17	0,00
Clomipramina	-0,15	-0,15	0,00	Reboxetina	0,17	0,17	0,00
Desmetilclomipramina	0,00	0,00	0,00	Sertralina	0,00	0,15	0,00
Dosulepina	0,00	0,17	0,00	Desmetilsertralina	0,60	-0,15	0,00
Desmetildosulepina	0,17	0,17	0,00	Tianeptina	0,18	0,18	0,00
Duloxetina	0,00	0,16	0,00	Trazodona	0,00	0,00	0,00
Fluoxetina	0,16	0,16	0,00	m-CPP	0,00	0,00	0,00
Desmetilfluoxetina	0,00	0,00	0,00	Trimipramina	0,00	0,00	0,00
Fluvoxamina	-0,16	0,00	0,00	Desmetiltrimipramina	0,00	0,16	0,00
Imipramina	0,00	0,00	0,00	Venlafaxina	0,19	0,00	0,00
Maprotilina	0,00	0,00	0,00	Desmetilvenlafaxina	0,00	0,25	0,00
Mianserina	0,37	0,18	0,00	Vortioxetina	0,00	0,00	0,00
Desmetilmianserina	0,18	0,00	0,00				

Pelos resultados apresentados, percebe-se que nenhuma substância em nenhuma das misturas de sangue apresentam um valor superior a 1 %, podendo afirmar que o critério do tempo de retenção relativo é cumprido.

Critério das Relações Iônicas das Transições

O segundo critério envolve uma outra condição: as áreas relativas de cada substância têm de se encontrar no intervalo de tolerância dada pela tabela 6.13 [96]. Nesta tabela, o primeiro e o terceiro valor correspondem a valores absolutos e os restantes a valores relativos. Para estudar esta condição, é necessário primeiramente que a tolerância mínima e máxima seja calculada através de um controle, réplica B. Os resultados estão apresentados nas tabelas 6.14 e 6.15. As áreas relativas de todas as substâncias estão dentro do intervalo imposto, à exceção da desmetilsertralina em uma das réplicas, tabela 6.15.

Tabela 6.13: Tolerância máxima para as áreas relativas das transições iônicas.

Áreas relativas (% do pico base)	Tolerância
>50%	± 10
25% - 50%	± 20%
5% - 25%	± 5
<5%	± 50%

Tabela 6.14: Área relativa do controlo, em percentagem, das respectivas substâncias e a tolerância mínima e máxima correspondente.

Substância	Área relativa	Tolerância	
		Mínima (%)	Máxima (%)
Amitriptilina	63,17	53,17	73,17
Bupropiona	82,23	72,23	92,23
Citalopram	74,18	64,18	84,18
Desmetilcitalopram	94,33	84,33	104,33
Clomipramina	84,35	74,35	94,35
Desmetilclomipramina	43,43	34,74	52,12
Dosulepina	96,23	86,23	106,23
Desmetildosulepina	81,35	71,35	91,35
Duloxetina	51,58	41,58	61,58
Fluoxetina	57,15	47,15	67,15
Desmetilfluoxetina	12,84	7,84	17,84
Fluvoxamina	76,47	66,47	86,47
Imipramina	46,19	36,95	55,43
Maprotilina	65,26	55,26	75,26
Mianserina	22,52	17,52	27,52
Desmetilmianserina	23,47	18,47	28,47
Mirtazapina	23,89	18,89	28,89
Desmetilmirtazapina	22,46	17,46	27,46
Nortriptilina	37,44	29,95	44,92
Paroxetina	34,6	27,71	41,57
Reboxetina	23,19	18,55	27,83
Sertralina	12,87	7,87	17,87
Desmetilsertralina	62,99	52,99	72,99
Tianeptina	17,32	12,32	22,32
Trazodona	90,34	80,34	100,34

m-CPP	86,08	76,08	96,08
Trimipramina	45,85	36,68	55,02
Desmetiltrimipramina	11,98	6,98	16,98
Venlafaxina	96,17	86,17	106,17
Desmetilvenlafaxina	55,71	45,71	65,71
Vortioxetina	34,67	27,74	41,61

Tabela 6.15: Áreas relativas das transições iônicas, em porcentagem, das respectivas substâncias.

Substância	Área relativa, %			Substância	Área relativa, %		
	A	B	C		A	B	C
Amitriptilina	73,06	63,17	63,98	Mirtazapina	24,29	23,89	24,03
Bupropiona	77,70	82,23	86,08	Desmetilmirtazapina	24,95	22,46	24,95
Citalopram	72,02	74,18	78,10	Nortriptilina	37,54	37,44	36,84
Desmetilcitalopram	98,63	94,33	92,34	Paroxetina	31,44	34,64	33,84
Clomipramina	74,95	84,35	93,78	Reboxetina	26,91	23,19	25,47
Desmetilclomipramina	42,26	43,43	49,38	Sertralina	9,28	12,87	8,94
Dosulepina	105,84	96,23	100,34	Desmetilsertralina	83,92	62,99	70,03
Desmetildosulepina	80,89	81,35	72,49	Tianeptina	17,50	17,32	16,22
Duloxetina	52,83	51,58	61,29	Trazodona	84,76	90,34	90,30
Fluoxetina	52,00	57,15	52,27	m-CPP	85,10	86,08	80,42
Desmetilfluoxetina	17,61	12,60	13,00	Trimipramina	50,95	45,85	44,85
Fluvoxamina	74,32	76,47	83,55	Desmetiltrimipramina	8,68	11,98	11,17
Imipramina	49,00	46,19	48,35	Venlafaxina	102,77	96,17	93,74
Maprotilina	71,86	65,26	73,80	Desmetilvenlafaxina	57,09	55,71	55,32
Mianserina	24,58	22,52	23,51	Vortioxetina	38,92	34,67	40,79
Desmetilmianserina	26,78	23,47	26,60				

Os resultados deste teste demonstram o cumprimento dos dois critérios permitindo aceitar os limites de quantificação testados. A desmetilsertralina falhou em apenas uma das réplicas contudo este valor foi aceite, demonstrando a importância da execução de replicados neste tipo de estudos.

Comparando os valores terapêuticos mencionados na tabela 1.3 e os LD e LQ calculados, pode-se afirmar que o valor mínimo do intervalo da concentração terapêutica está acima do valor calculado de LD e LQ.

6.2.8 Diluição

O tratamento de dados da integridade da diluição foi muito semelhante ao do teste do LQ, isto é, a validação consiste em calcular a precisão, através da equação 6.14 e a exatidão, através da equação 6.11, associada a cada fator de diluição de cada substância.

Para o cálculo da exatidão, o valor da concentração exata corresponde ao valor da concentração calculada da amostra injetada sem diluição. Os resultados estão apresentados na tabela 6.16.

Tabela 6.16: Resultados do estudo da integridade da diluição.

Substância	1:5		1:10	
	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)
Amitriptilina	8,91	8,29	17,95	-11,27
Bupropiona	9,72	11,16	15,97	4,20
Citalopram	5,97	0,11	15,10	19,85
Desmetilcitalopram	3,46	-2,02	11,87	-9,13
Clomipramina	3,93	1,31	14,06	-12,09
Desmetilclomipramina	7,19	-11,39	13,99	-23,12
Dosulepina	6,68	4,02	19,65	-11,72
Desmetildosulepina	8,75	-11,25	15,95	-24,81
Duloxetina	4,35	-15,44	12,38	-16,96
Fluoxetina	5,57	-11,87	10,49	-20,28
Desmetilfluoxetina	8,08	-11,63	14,77	-21,64
Fluvoxamina	6,01	-15,02	13,08	-28,43
Imipramina	5,09	-5,44	7,00	-16,29
Maprotilina	4,85	-7,23	9,81	-14,93
Mianserina	5,29	12,38	14,47	-1,57
Desmetilmianserina	7,48	-4,41	16,05	-10,89
Mirtazapina	12,33	6,65	21,82	-17,80
Nortriptilina	5,04	-8,56	7,87	-19,26
Paroxetina	7,83	-12,59	9,91	-17,99
Reboxetina	3,33	-13,62	8,45	-19,07
Sertralina	5,04	-19,30	17,06	-26,39
Tianeptina	12,68	19,22	22,84	29,39
Trazodona	7,71	-17,42	9,57	-24,77
m-CPP	6,10	0,33	11,69	-16,75
Trimipramina	4,38	-7,75	8,10	-19,69
Desmetiltrimipramina	5,65	-6,56	8,73	-9,28
Venlafaxina	4,19	-12,51	11,54	-23,47

Tabela 6.16 continuação da página anterior

Substância	1:5		1:10	
	CV	Exatidão	CV	Exatidão
Desmetilvenlafaxina	7,60	17,25	11,16	-20,62
Vortioxetina	7,03	-6,67	16,27	-23,32

Pelos resultados apresentados percebe-se que tanto a precisão como a exatidão na diluição de 1:5 (v/v) são inferiores a 20 %, pelo que se pode concluir que, caso seja necessário, é possível diluir as amostras até 5 vezes. Relativamente à diluição de 1:10 (v/v), alguns valores ultrapassam o valor permitido, pelo que não se recomenda diluir 10 vezes uma amostra de sangue pois poderá influenciar nos resultados obtidos. Seria proveitoso avaliar o estudo da integridade da diluição utilizando água na diluição, de forma a tentar validar este parâmetro para fatores de diluição superiores, como descrevem alguns autores [84].

6.2.9 Estabilidade

A análise da estabilidade vai ser realizada calculando a razão da área do pico da substância e do PI para cada controlo e comparada àquela observada no tempo zero. Uma substância é considerada estável se não se observar um aumento ou diminuição da razão da área do pico correspondente, equivalente a ± 20 % da área do pico da substância no tempo zero, ou seja, injetada logo após a sua extração.

6.2.9.1 Estabilidade à temperatura ambiente

Inicialmente calculou-se o intervalo de valores, para cada controlo, equivalente a ± 20 % do valor da área do pico de cada substância no tempo zero. Através dos gráficos apresentados no apêndice E, é possível perceber se as razões calculadas para cada AD, correspondentes a 24 h, 72 h e 7 dias estão ou não dentro deste intervalo e posteriormente, consideradas estáveis ou não.

Tendo em conta a razão da área e o intervalo de cada AD, é possível afirmar que 3 substâncias perdem a estabilidade após 24 h (fluvoxamina, desmetilsertralina e trazodona) e 2 substâncias (desmetilclomipramina e nortriptilina) após 72 h, dado que o valor da razão da área ultrapassa o valor mínimo ou máximo correspondente. Observando os resultados, percebe-se que, apesar de 4 substâncias apresentarem instabilidade apenas no controlo baixo, a nortriptilina mostra-se estável só até às 72 h em ambos os controlos. Este resultado está de acordo com os resultados dos métodos publicados em [89] e [97], que inclui muitos dos ADs validados neste trabalho, em que as substâncias são estáveis por um período de, pelo menos, 24 h.

6.2.9.2 Estabilidade após um processo de congelação

A construção dos gráficos para a análise da estabilidade após um processo de congelação foi semelhante à descrita anteriormente e os gráficos estão apresentados no apêndice E. Observando os resultados, é possível verificar que todos os ADs que se demonstraram instáveis à temperatura ambiente, tiveram o mesmo resultado após um processo de congelação. Para além destes, a desmetilfluoxetina, a desmetilmirtazapina e a venlafaxina também demonstraram instabilidade.

Apesar disto, os valores obtidos destas três substâncias no estudo da estabilidade à temperatura ambiente estavam bastante perto do limite do intervalo mínimo ou máximo. Mais uma vez, este resultado é mais notório no controlo baixo, apesar da desmetilclomipramina e a nortriptilina também apresentar-se estável apenas até às 168 h em ambos os controlos.

CAPÍTULO 7

APLICAÇÃO DO MÉTODO A CASOS FORENSES

Após a validação do método ter sido realizada, aplicou-se o mesmo a amostras de sangue *post-mortem* de casos forenses com o objetivo de demonstrar a utilidade deste no SQTF-C, do INMLCF, I.P.. Para tal, foram reunidos os resultados das concentrações da confirmação e da quantificação dos ADs validados de sangues *post-mortem* recolhidos entre janeiro e junho de 2023. As amostras analisadas foram recolhidas tanto nas autópsias médico-legais efetuadas no Serviço de Patologia Forense da Delegação do Centro do INMLCF, I.P. como nos Gabinetes Médico-Legais que atuam na sua dependência.

Na tabela 7.1 estão resumidas as concentrações sanguíneas mínimas e máximas dos ADs e a sua média.

Tabela 7.1: Concentrações sanguíneas de ADs nos casos reais analisados.

Substância	Casos (n)	[mínima] (ng/mL)	[máxima] (ng/mL)	[média] (ng/mL)
Amitriptilina	12	70	605	254
Bupropiona	5	62	4174	95
Citalopram	30	10	867	235
Desmetilcitalopram	28	9	570	61
Clomipramina	7	31	1197	290
Desmetilclomipramina	4	130	343	241
Dosulepina	1	281	281	281
Desmetildosulepina	1	172	172	172

Tabela 7.1 continuação da página anterior

Substância	Casos (n)	[mínima] (ng/mL)	[máxima] (ng/mL)	[média] (ng/mL)
Duloxetina	3	40	67	47
Fluoxetina	13	10	2101	229
Desmetilfluoxetina	16	125	1413	425
Fluvoxamina	6	233	2075	1168
Maprotilina	1	4381	4381	4381
Mianserina	1	43	43	43
Desmetilmianserina	4	7	637	298
Mirtazapina	46	10	479	123
Desmetilmirtazapina	42	10	136	50
Nortriptilina	11	29	166	82
Paroxetina	12	27	981	145
Sertralina	39	15	711	145
Desmetilsertralina	41	49	1900	316
Trazodona	41	24	2553	343
m-CPP	28	3	305	21
Venlafaxina	15	161	5719	480
Desmetilvenlafaxina	13	226	1385	698
Vortioxetina	2	20	106	63

CAPÍTULO 8

CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

Este trabalho permitiu desenvolver um método analítico para determinar e quantificar 20 ADs (amitriptilina, bupropiona, citalopram, clomipramina, dosulepina, duloxetina, fluoxetina, fluvoxamina, imipramina, maprotilina, mianserina, mirtazapina, paroxetina, reboxetina, sertralina, tianeptina, trazodona, trimipramina, venlafaxina e vortioxetina) e 11 dos seus metabolitos (nortriptilina, desmetilcitalopram, desmetilclomipramina, desmetildosulepina, desmetilfluoxetina, desmetilmianserina, desmetilmirtazapina, desmetilsertralina, m-CPP, desmetiltrimipramina e desmetilvenlafaxina) em amostras de sangue.

Uma vez que existem inúmeros ADs em comercialização que não foram validados neste trabalho por falta de padrões primários, sugere-se também a aquisição destes por parte do SQTFC, para que possam ser futuramente validados utilizando o método descrito neste trabalho e integrados na rotina do laboratório do SQTFC do INMLCF, I.P..

O procedimento de ensaio apresentado e validado incluiu como técnica de extração a PP e a sua análise pela técnica LC-MS/MS, com ionização por ESI e um analisador de massa triplo quadrupolo. A técnica de LC-MS/MS utilizada demonstrou ser uma técnica bastante sensível e de grande utilidade, uma vez que conseguiu detetar concentrações muito baixas dos ADs estudados.

A validação deste método seguiu as orientações da *Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology* da *American Academy of Forensic Science (AAFS) Standards Board (ASB)* que inclui os seguintes parâmetros: linearidade, exatidão, precisão, LD, LQ, integridade da diluição, supressão iónica, estudos de interferência, estabilidade e arrastamento. Após o estudo de todos estes parâmetros, é possível afirmar que o método se demonstrou rápido e linear numa gama de concentrações que varia de acordo com a substância. Os resultados dos limites de deteção e quantificação

de todas as substâncias são adequados tendo em conta, novamente, os valores terapêuticos e tóxicos de cada substância. Não foi detetado nenhum arrastamento nem nenhuma interferência, com exceção da maprotilina e nortriptilina que interferem entre si, em particular na segunda transição iónica. O método revelou também ser exato e preciso, uma vez que os valores de CV e de exatidão foram inferiores a 20 % e também sem nenhuma evidência de efeito matriz. O estudo da integridade de diluição permitiu concluir que, caso seja necessário, é possível diluir as amostras biológicas até 5 vezes, sem que este fator tenha impacto nos resultados obtidos. Por fim, o estudo da estabilidade, revelou que todas as substâncias são estáveis numa temperatura ambiente até às 24 h e até 1 semana, após um processo de congelação.

Tendo sido cumprido todos os parâmetros de validação propostos, este foi aplicado a amostras de sangue *post-mortem* de casos forenses. O método demonstrou ser adequado para detetar e quantificar, caso necessário, estes ADs em amostras de sangue e pode, deste modo, ser integrado na rotina do laboratório do SQTF-C do INMLCF, I.P..

BIBLIOGRAFIA

- [1] F. Torres. (2020) What Is Depression? Acedido a 13.03.2023. [Online]. Available: <https://www.psychiatry.org/patients-families/depression/what-is-depression>
- [2] D. J. Stein, “Antidepressants: past, present and future.” in *Antidepressants and Major Depressive Disorder*. Future Medicine, 2012, pp. 2–11. [Online]. Available: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/ebo.11.394>
- [3] S. Guimarães, D. Moura, and P. Soares da Silva, *Terapêutica medicamentosa e suas bases farmacológicas.*, 5th ed. Porto: Porto Editora, 2006.
- [4] J. P. Feighner, “Mechanism of action of antidepressant medications.” *The Journal of Clinical Psychiatry*, vol. 60 Suppl 4, pp. 4–11; Discussion 12–3, 1999. [Online]. Available: <https://europepmc.org/article/med/10086478>
- [5] R. Chockalingam, B. M. Gott, and C. R. Conway, “Tricyclic Antidepressants and Monoamine Oxidase Inhibitors: Are They Too Old for a New Look?” in *Handbook of experimental pharmacology*. Handb Exp Pharmacol, 2019, vol. 250, pp. 37–48. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30105472/>
- [6] World Health Organization, “Depression and other common mental disorders: global health estimates.” *World Health Organization*, 2017. [Online]. Available: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/254610>
- [7] C. Furtado, “Psicofármacos: Evolução do consumo em Portugal continental (2000 – 2012).” *In-farmed, Gabinete de Estudos e Projectos*.

- [8] INEM. (2021) CIAV - Dados estatísticos 2021. Acedido a 19.03.2023. [Online]. Available: https://www.inem.pt/wp-content/uploads/2022/03/Boletim-CIAV_Ano-2021.pdf
- [9] C. R. Félix, “Antidepressivos em portugal e no mundo.” 2014, Monografia, Universidade de Coimbra. [Online]. Available: <https://estudogeral.uc.pt/bitstream/10316/92827/1/Mcristianfelix.pdf>
- [10] R. V. Rensburg and H. Reuter, “An overview of analgesics - anticonvulsants, antidepressants, and other medications (part 3).” *South African Family Practice*, vol. 61, pp. 59–63, 2019.
- [11] M. Schulz, A. Schmoltdt, H. Andresen-Streichert, and S. Iwersen-Bergmann, “Revisited: Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 1100 drugs and other xenobiotics.” *Critical Care*, vol. 24, no. 1, p. 195, 2020. [Online]. Available: <https://ccforum.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13054-020-02915-5>
- [12] C. Hiemke *et al.*, “Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring in Neuropsychopharmacology: Update 2017.” *Pharmacopsychiatry*, vol. 51, no. 01/02, pp. 9–62, 2018. [Online]. Available: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0043-116492>
- [13] D. Uges, ““TIAFT Reference blood level list of therapeutic and toxic substances.” 2004. [Online]. Available: <https://www.yumpu.com/en/document/read/13423269/tiaft-reference-blood-level-list-of-therapeutic-and-toxic-gtfch>
- [14] L. Dean, “Imipramine Therapy and CYP2D6 and CYP2C19 Genotype.” *Medical Genetics Summaries*, 2017. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK425164/>
- [15] J. Tabaka, “Mechanisms of action of antidepressants and their combination for major depressive disorder treatment: a theoretical and clinical approach.” 2014, Tese de Mestrado, Universidade McGill. [Online]. Available: <https://escholarship.mcgill.ca/concern/theses/jw827g00j?locale=en>
- [16] J. Moraczewski and K. K. Aedma, “Tricyclic Antidepressants.” *Veterinary Psychopharmacology*, pp. 231–256, 2022. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557791/>
- [17] F. P. Bymaster, L. J. Dreshfield-Ahmad, P. G. Threlkeld, J. L. Shaw, L. Thompson, D. L. Nelson, S. K. Hemrick-Luecke, and D. T. Wong, “Comparative affinity of duloxetine and venlafaxine for serotonin and norepinephrine transporters in vitro and in vivo, human serotonin receptor subtypes, and other neuronal receptors.” *Neuropsychopharmacology*, vol. 25, no. 6, pp. 871–880, 2001. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11750180/>
- [18] S. Montgomery, “Serotonin noradrenaline reuptake inhibitors: Logical evolution of antidepressant development.” *International journal of psychiatry in clinical practice*, vol. 10 Suppl 2, pp. 5–11, 2006. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24921676/>

- [19] A. D. Krystal, “Pharmacologic Treatment of Insomnia: Other Medications.” *Principles and Practice of Sleep Medicine*, pp. 842–854.e5, 2017. [Online]. Available: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978032324288200088X>
- [20] European Commission, “Lista das denominações, formas farmacêuticas, dosagens, vias de administração dos medicamentos, titulares das autorizações de introdução no mercado nos estados membros.” [Online]. Available: https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2003/200312016445/anx_6445_pt.pdf
- [21] Imipramine HCl - Uses, Side Effects, and More. Acedido a 12.03.2023. [Online]. Available: <https://www.webmd.com/drugs/2/drug-8664/imipramine-oral/details>
- [22] Infarmed - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde. (2022) Resumo das características do medicamento - Anafranil. Acedido a 12.03.2023. [Online]. Available: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>
- [23] R. Baselt C., *Disposition of toxic drugs and chemicals in man.*, 7th ed. Biomedical Publications, 2004.
- [24] Infarmed - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde. (2023) Pesquisa do Medicamento. Acedido a 10.03.2023. [Online]. Available: <https://www.infarmed.pt/web/infarmed/servicos-on-line/pesquisa-do-medicamento>
- [25] M. Abdollahi and S. Mostafalou, “Tricyclic Antidepressants.” *Encyclopedia of Toxicology*, pp. 838–845, 2014.
- [26] Infarmed Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde. (2011) Resumo das características do medicamento - Protiadene. Acedido a 12.03.2023. [Online]. Available: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>
- [27] National Center for Biotechnology Information. (2023) Infarmed - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde. Compound Summary for CID 4011, Maprotiline. Acedido a 12.03.2023. [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Maprotiline#section=Pharmacology-and-Biochemistry>
- [28] Infarmed - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde. (2022) Resumo das características do medicamento - Ludiomil. Acedido a 12.03.2023. [Online]. Available: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>
- [29] Toxin and Toxin Target Database. (2023) Trimipramine (T3D2870). Acedido a 11.03.2023. [Online]. Available: <http://www.t3db.ca/toxins/T3D2870>

- [30] Infarmed - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde. (2010) Resumo das características do medicamento - Surmontil. Acedido a 11.03.2023. [Online]. Available: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>
- [31] G. B. Baker, T. I. Prior, and R. T. Coutts, “Chirality and drugs used to treat psychiatric disorders.” *Journal of psychiatry and neuroscience*, vol. 27, no. 6, pp. 401–3, 2002. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12491572><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC161712>
- [32] C. C. Aguiar, T. R. Castro, A. F. Carvalho, O. C. Vale, F. C. Sousa, and S. M. Vasconcelos, “Antidepressant drugs.” *Acta medica portuguesa*, vol. 24, pp. 91–8, 2011.
- [33] S. J. V. den Berg, “Comparing ssris: From chemistry to clinical choice.” *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental*, vol. 10, pp. S199–S209, 1995.
- [34] F. López-Muñoz and C. Álamo, “Active metabolites as antidepressant drugs: The role of norquetiapine in the mechanism of action of quetiapine in the treatment of mood disorders,” *Frontiers in Psychiatry*, vol. 4, 2013.
- [35] C. de Lima Braz, T. P. de Figueiredo, S. C. C. Barroso, and A. M. M. Reis, “Drugs with activity on the cytochrome p450 used by elderly at home.” *Revista Médica de Minas Gerais*, vol. 28, 2018.
- [36] B. Rawe and P. May. (2009) Citalopram: A new treatment for depression. Acedido a 16.03.2023. [Online]. Available: <http://www.chm.bris.ac.uk/motm/citalopram/citalopramh.htm>
- [37] Infarmed - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde. (2022) Resumo das características do medicamento - Citalopram. Acedido a 11.03.2023. [Online]. Available: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>
- [38] N. S. Shoar, K. A. Fariba, and R. K. Padhy. (2021) Citalopram. Acedido a 15.03.2023. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482222/>
- [39] National Center for Biotechnology Information. (2023) PubChem Compound Summary for CID 3386, Fluoxetine. Acedido a 15.03.2023. [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fluoxetine>
- [40] Infarmed - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde. (2021) Resumo das características do medicamento - Nodepe. Acedido a 11.03.2023. [Online]. Available: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>

- [41] Infarmed, “Estatística do medicamento 2011.” 2012. [Online]. Available: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>
- [42] Infarmed - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde. (2021) Resumo das características do medicamento - Dumyrox. Acedido a 17.03.2023. [Online]. Available: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>
- [43] C. P. Weiner and C. Buhimschi, “F.” in *Drugs for Pregnant and Lactating Women*. W.B. Saunders, 2009, pp. 384–437. [Online]. Available: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781416040132000065>
- [44] M. Bourin, P. Chue, and Y. Guillon, “Paroxetine: A review.” *CNS Drug Reviews*, vol. 7, pp. 25–47, 2006.
- [45] Infarmed - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde. (2023) Resumo das características do medicamento - Paroxetina. Acedido a 11.03.2023. [Online]. Available: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>
- [46] R. M. Nevels, S. T. Gontkovsky, and B. E. Williams, “Paroxetine - The Antidepressant from Hell? Probably Not, But Caution Required.” *Psychopharmacology Bulletin*, vol. 46, no. 1, p. 77, 2016. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34844489/>
- [47] M. Segura, L. Roura, R. de la Torre, and J. Joglar, “Synthesis of the major metabolites of Paroxetine.” *Bioorganic Chemistry*, vol. 31, no. 3, pp. 248–258, 2003. [Online]. Available: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045206803000403>
- [48] National Center for Biotechnology Information. (2023) PubChem Compound Summary for CID 68617, Sertraline. Acedido a 15.03.2023. [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/sertraline>
- [49] H. Cheng, B. He, Q. Zhang, and Y. Tu, “Chiral Separation of Sertraline with Microemulsion Electrokinetic Chromatography on a Polymer/ β -cyclodextrin Assembling Molecular Film Modified Capillary.” *Analytical Sciences*, vol. 26, no. 10, pp. 1087–1092, 2010. [Online]. Available: <https://link.springer.com/10.2116/analsci.26.1087>
- [50] Infarmed - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde. (2010) Resumo das características do medicamento - Brintellix. Acedido a 17.03.2023. [Online]. Available: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>

- [51] A. D'Agostino, C. D. English, and J. A. Rey, "Vortioxetine (Brintellix): A New Serotonergic Antidepressant." *Pharmacy and Therapeutics*, vol. 40, no. 1, p. 36, 2015. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4296590/>
- [52] U.S. Food & Drug Administration. (2023) FDA Drug Safety Podcast: FDA approves brand name change for antidepressant drug Brintellix (vortioxetine) to avoid confusion with antiplatelet drug Brilinta (ticagrelor) | FDA. Acedido a 17.03.2023. [Online]. Available: <https://www.fda.gov/drugs/fda-drug-safety-podcasts/fda-drug-safety-podcast-fda-approves-brand-name-change-antidepressant-drug-brintellix-vortioxetine>
- [53] G. Chen, A. M. Højer, J. Areberg, and G. Nomikos, "Vortioxetine: Clinical Pharmacokinetics and Drug Interactions." *Clinical Pharmacokinetics*, vol. 57, no. 6, p. 673, 2018. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5973995/>
- [54] T. M. Hillhouse and J. H. Porter, "A brief history of the development of antidepressant drugs: From monoamines to glutamate." *Experimental and clinical psychopharmacology*, vol. 23, no. 1, p. 1, 2015. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4428540/>
- [55] D. Fanelli, G. Weller, and H. Liu, "New Serotonin-Norepinephrine Reuptake Inhibitors and Their Anesthetic and Analgesic Considerations." *Neurology International*, vol. 13, no. 4, p. 497, 2021. [Online]. Available: [/pmc/articles/PMC8544373/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8544373/)[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8544373/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8544373/?report=abstract)
- [56] S. M. Stahl, M. M. Grady, C. Moret, and M. Briley, "SNRIs: their pharmacology, clinical efficacy, and tolerability in comparison with other classes of antidepressants." *CNS spectrums*, vol. 10, no. 9, pp. 732–747, 2005. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16142213/>
- [57] Infarmed - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde. (2010) Resumo das características do medicamento - Venlafaxina. Acedido a 18.03.2023. [Online]. Available: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>
- [58] National Center for Biotechnology Information. (2023) PubChem Compound Summary for CID 60835, Duloxetine. Acedido a 12.03.2023. [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Duloxetine>
- [59] M. Budău, G. Hancu, A. Rusu, M. Cărcu-Dobrin, and D. L. Muntean, "Chirality of Modern Antidepressants: An Overview." *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, vol. 7, no. 4, pp. 495–500, 2017. [Online]. Available: <http://apb.tbzmed.ac.ir/Abstract/apb-19336>

- [60] Tua Saúde. (2010) Desvenlafaxina (Pristiq) - Tua Saúde. Acedido a 18.03.2023. [Online]. Available: <https://www.tuasaude.com/desvenlafaxina/>
- [61] E. Haller, M. Geier, and P. Finley, “Pharmacology of antidepressants.” in *Encyclopedia of the Neurological Sciences*. Academic Press, 2014, pp. 219–223.
- [62] S. M. Stahl, J. F. Pradko, B. R. Haight, J. G. Modell, C. B. Rockett, and S. Learned-Coughlin, “A Review of the Neuropharmacology of Bupropion, a Dual Norepinephrine and Dopamine Reuptake Inhibitor.” *Primary care companion to the Journal of clinical psychiatry*, vol. 6, no. 4, pp. 159–166, 2004. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15361919/>
- [63] R. P. Dash, R. Rais, and N. R. Srinivas, “Chirality and neuropsychiatric drugs: an update on stereoselective disposition and clinical pharmacokinetics of bupropion.” *Xenobiotica*, vol. 48, no. 9, pp. 945–957, 2018. [Online]. Available: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00498254.2017.1376765>
- [64] J. Kelder, C. Funke, T. De Boer, L. Delbressine, D. Leysen, and V. Nickolson, “A Comparison of the Physicochemical and Biological Properties of Mirtazapine and Mianserin.” *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 49, no. 4, pp. 403–411, 2011. [Online]. Available: <https://academic.oup.com/jpp/article/49/4/403/6152885>
- [65] Infarmed - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde. (2010) Resumo das características do medicamento - Mianserina. Acedido a 19.03.2023. [Online]. Available: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>
- [66] T. De Boer, “The effects of mirtazapine on central noradrenergic and serotonergic neurotransmission.” *International clinical psychopharmacology*, vol. 10 Suppl 4, pp. 19–23, 1995. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8930006/>
- [67] R. A. Moreno, M. D. H., and D. M. S. M. B., “Psicofarmacologia de antidepressivos.” *Brazilian Journal of Psychiatry*, vol. 21 Suppl 1, pp. 24–40, 1999. [Online]. Available: <http://www.scielo.br/j/rbp/a/XxBdP5vFDFbwBGDxrYPLCgC/?lang=pt>
- [68] U.S. Food & Drug Administration. (2022) Tianeptine Products Linked to Serious Harm, Overdoses, Death. Acedido a 19.03.2023. [Online]. Available: <https://www.fda.gov/consumers/consumer-updates/tianeptine-products-linked-serious-harm-overdoses-death>
- [69] T. I. Uzbay, “Tianeptine: potential influences on neuroplasticity and novel pharmacological effects.” *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, vol. 32, no. 4, pp. 915–924, 2008. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17826881/>

- [70] C. B. Brink, B. H. Harvey, and L. Brand, “Tianeptine: a novel atypical antidepressant that may provide new insights into the biomolecular basis of depression.” *Recent patents on CNS drug discovery*, vol. 1, no. 1, pp. 29–41, 2006. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18221189/>
- [71] National Center for Biotechnology Information. (2023) PubChem Compound Summary for CID 5533, Trazodone. Acedido a 31.03.2023. [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Trazodone#section=Metabolism-Metabolites>
- [72] Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses. Acedido a 13.03.2023. [Online]. Available: <https://inmlcf.justica.gov.pt/>
- [73] Ministério Público. Jurisdição Penal. Acedido a 13.03.2023. [Online]. Available: <https://www.ministeriopublico.pt/pagina/jurisdicao-penal/>
- [74] S. Souverain, S. Rudaz, and J.-L. Veuthey, “Protein precipitation for the analysis of a drug cocktail in plasma by lc–esi–ms.” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 35, pp. 913–920, 2004.
- [75] L. Zhao and M. Juck, *Protein Precipitation for Biological Fluid Samples Using Agilent Captiva EMR-Lipid 96-Well Plates*. Agilent Technologies, 2018. [Online]. Available: https://www.agilent.com/cs/library/applications/5991-9222EN_ppt_biological_fluid_samples_application.pdf
- [76] C. Bylda, R. Thiele, U. Kobold, and D. A. Volmer, “Recent advances in sample preparation techniques to overcome difficulties encountered during quantitative analysis of small molecules from biofluids using LC-MS/MS.” *The Analyst*, vol. 139, no. 10, p. 2265, 2014. [Online]. Available: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c4an00094c>
- [77] C. Polson, P. Sarkar, B. Incedon, V. Raguvaran, and R. Grant, “Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography–tandem mass spectrometry.” *Journal of Chromatography B*, vol. 785, no. 2, pp. 263–275, 2003. [Online]. Available: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023202009145>
- [78] M. Sargent, *Guide to achieving reliable quantitative LC-MS measurements.*, 1st ed. RSC Analytical Methods Committee, 2013. [Online]. Available: https://www.rsc.org/images/AMC%20LCMS%20Guide_tcm18-240030.pdf
- [79] J. Stone, “Sample preparation techniques for mass spectrometry in the clinical laboratory.” in *Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory*. Academic Press, 2017, pp. 37–62.

- [80] A. Poletti, *Applications of LC-MS in toxicology*. Pharmaceutical Press, 2006.
- [81] A. Schreiber, “Advantages of Using Triple Quadrupole over Single Quadrupole Mass Spectrometry to Quantify and Identify the Presence of Pesticides in Water and Soil Samples.” p. 1, 2013.
- [82] A. R. Breaud, R. Harlan, M. Kozak, and W. Clarke, “A rapid and reliable method for the quantitation of tricyclic antidepressants in serum using HPLC-MS/MS.” *Clinical Biochemistry*, vol. 42, no. 12, pp. 1300–1307, 2009.
- [83] P. Zuccarello, G. Carnazza, and N. Barbera, “Development and validation of a LC-MS/MS method for analysis of vortioxetine in postmortem specimens. First data from an authentic case.” *Journal of Forensic Sciences*, vol. 68, no. 2, pp. 578–585, 2023. [Online]. Available: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1556-4029.15198><https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1556-4029.15198><https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1556-4029.15198>
- [84] E. Choong, S. Rudaz, A. Kottelat, S. Haldemann, D. Guilleme, J.-L. Veuthey, and C. B. Eap, “Quantification of 4 antidepressants and a metabolite by LC-MS for therapeutic drug monitoring.” *Journal of Chromatography B*, vol. 879, no. 19, pp. 1544–1550, 2011. [Online]. Available: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023211002182>
- [85] M.-M. Zheng, S.-T. Wang, W.-K. Hu, and Y.-Q. Feng, “In-tube solid-phase microextraction based on hybrid silica monolith coupled to liquid chromatography–mass spectrometry for automated analysis of ten antidepressants in human urine and plasma.” *Journal of Chromatography A*, vol. 1217, no. 48, pp. 7493–7501, 2010. [Online]. Available: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002196731001349X>
- [86] M. Chorilli, R. Bonfilio, C. R. Louvandini, F. A. R. M. Gonçalves, and H. R. N. Salgado, “Development and Validation of an LC-MS/MS Method for Quantitative Analysis of Mirtazapine in Human Plasma.” *American Journal of Analytical Chemistry*, vol. 02, no. 06, pp. 650–657, 2011. [Online]. Available: <http://www.scirp.org/journal/doi.aspx?DOI=10.4236/ajac.2011.26074>
- [87] S. Kuchekar, M. Kundlik, and B. Zaware, “Rapid quantification of mirtazapine and desmethyl mirtazapine in human plasma by LC-ESI-MS/MS: Application to a bioequivalence study.” *Journal of Saudi Chemical Society*, vol. 15, no. 2, pp. 145–153, 2011. [Online]. Available: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1319610310000955>
- [88] M. del Mar Ramírez Fernández, S. M. R. Wille, and N. Samyn, “Quantitative Method Validation for the Analysis of 27 Antidepressants and Metabolites in Plasma With Ultraperformance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry.” *Therapeutic Drug Monitoring*, vol. 34, no. 1, pp. 11–24, 2012. [Online]. Available: <https://journals.lww.com/00007691-201202000-00004>

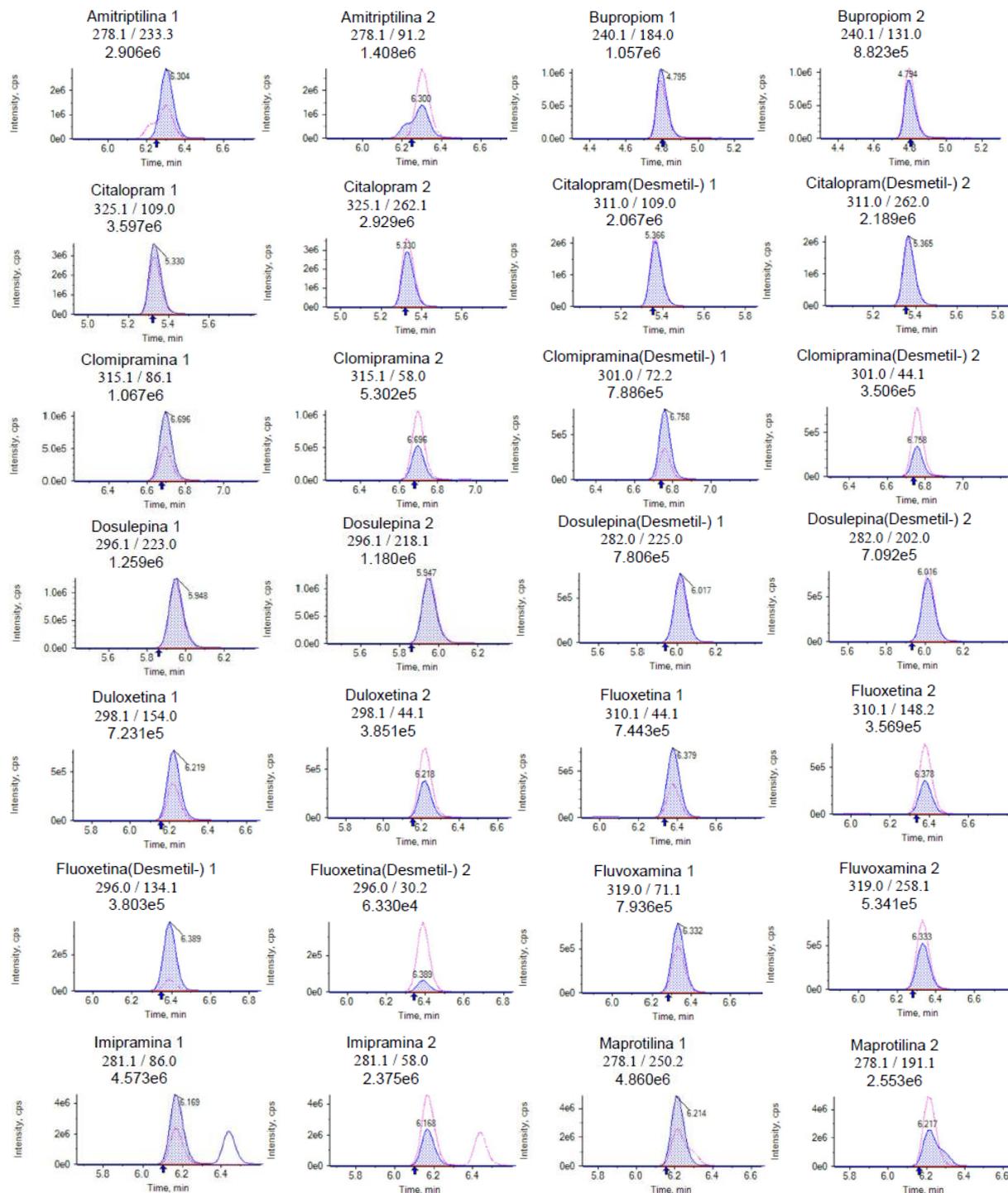
- [89] D. Remane, M. R. Meyer, D. K. Wissenbach, and H. H. Maurer, “Full validation and application of an ultra high performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometric procedure for target screening and quantification of 34 antidepressants in human blood plasma as part of a comprehensive multi-analyte approach.” *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 400, no. 7, pp. 2093–2107, 2011. [Online]. Available: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-011-4959-6>
- [90] A. de Castro, M. Concheiro, O. Quintela, A. Cruz, and M. López-Rivadulla, “LC–MS/MS method for the determination of nine antidepressants and some of their main metabolites in oral fluid and plasma.” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 48, no. 1, pp. 183–193, 2008. [Online]. Available: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708508003026>
- [91] C. M. Phogole, R. Hastie, and T. Kellermann, “A simple and sensitive LC-MS/MS method for the quantitation of sertraline and N-desmethylertraline in human plasma,” *Journal of Chromatography B*, vol. 1228, p. 123827, aug 2023. [Online]. Available: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023223002374>
- [92] AAFS Standards Board, “Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology.” *American Academy of Forensic Sciences: Colorado Springs, CO*, 2019. [Online]. Available: www.asbstandardsboard.org.
- [93] F. T. Peters, O. H. Drummer, and F. Musshoff, “Validation of new methods.” *Forensic Science International*, vol. 165, no. 2-3, pp. 216–224, 2007. [Online]. Available: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0379073806003239>
- [94] W. M. A. Niessen, “Fragmentation of toxicologically relevant drugs in positive-ion liquid chromatography-tandem mass spectrometry.” *Mass Spectrometry Reviews*, vol. 30, no. 4, pp. 626–663, 2011. [Online]. Available: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mas.20332>
- [95] A. Almeida, M. Castel-Branco, and A. Falcão, “Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods.” *Journal of Chromatography B*, vol. 774, no. 2, pp. 215–222, 2002. [Online]. Available: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023202002441>
- [96] World Anti Doping Agency, “Identification criteria for qualitative assays incorporating column chromatography and mass spectrometry.” 2010.
- [97] A. E. Steuer, M. Poetzsch, M. Koenig, E. Tingelhoff, S. N. Staeheli, A. T. Roemmelt, and T. Kraemer, “Comparison of conventional liquid chromatography–tandem mass spectrometry versus microflow liquid chromatography–tandem mass spectrometry within the framework

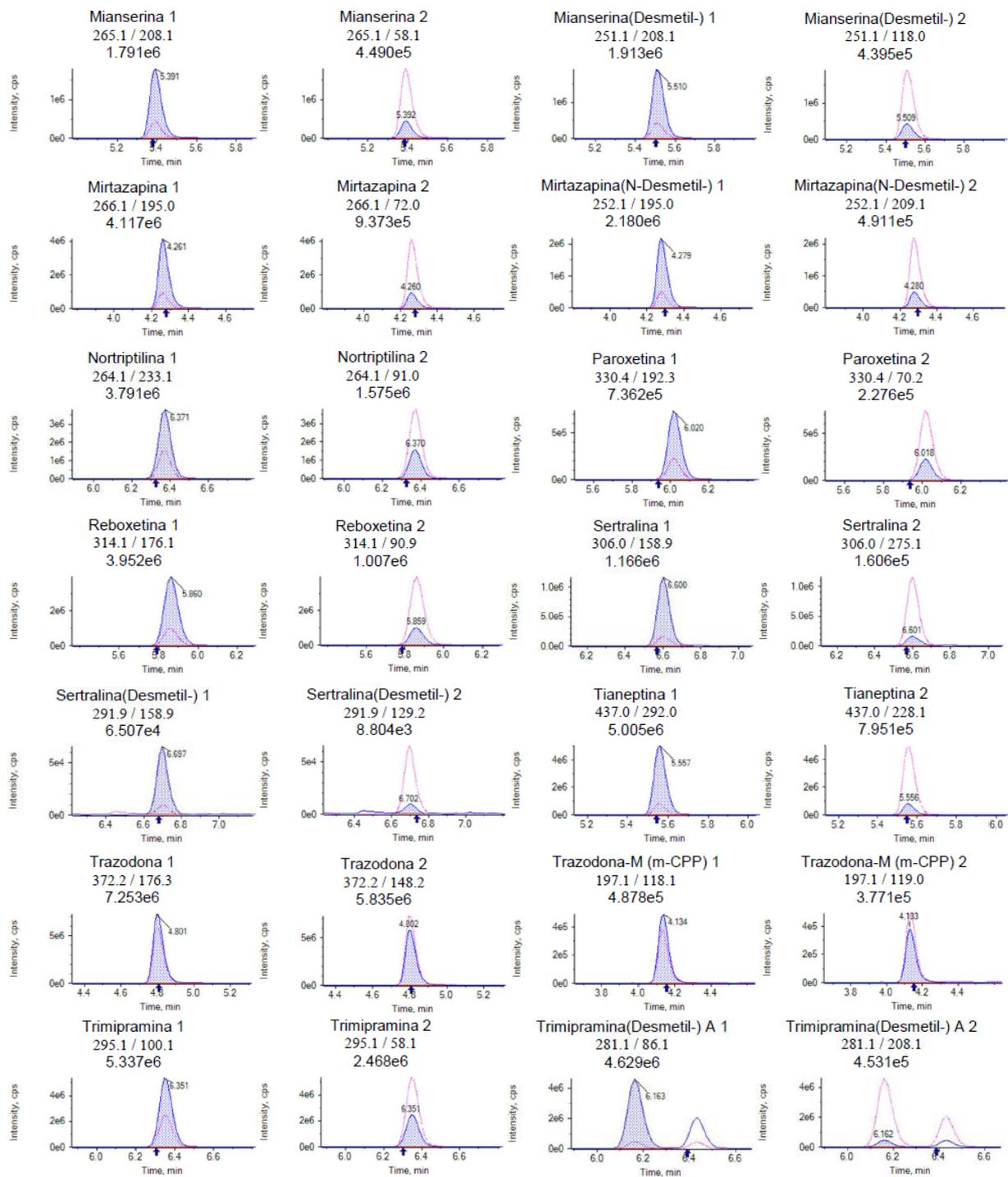
of full method validation for simultaneous quantification of 40 antidepressants and neuroleptics.” *Journal of Chromatography A*, vol. 1381, pp. 87–100, 2015. [Online]. Available: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967315000254>

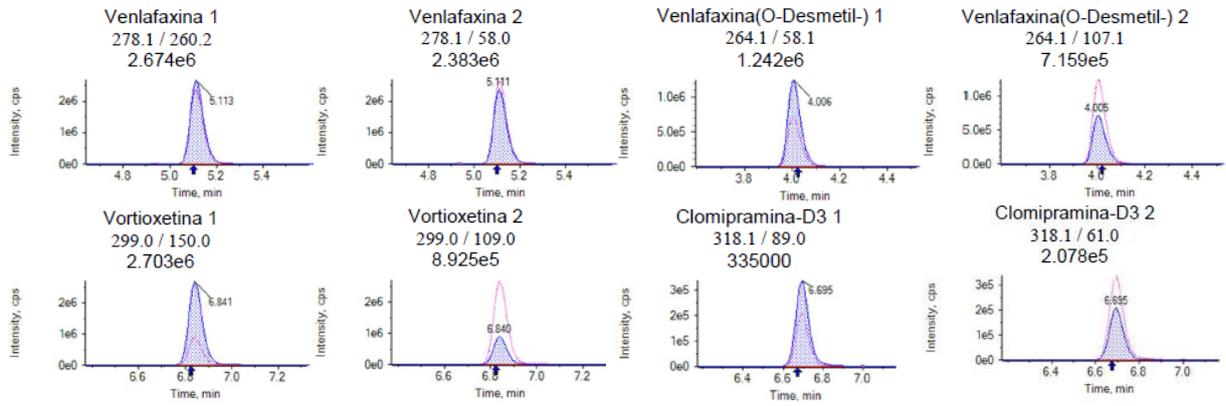
APÊNDICE A

CONTROLO ALTO

Cromatogramas com as transições iônicas dos ADs estudados num controlo alto.



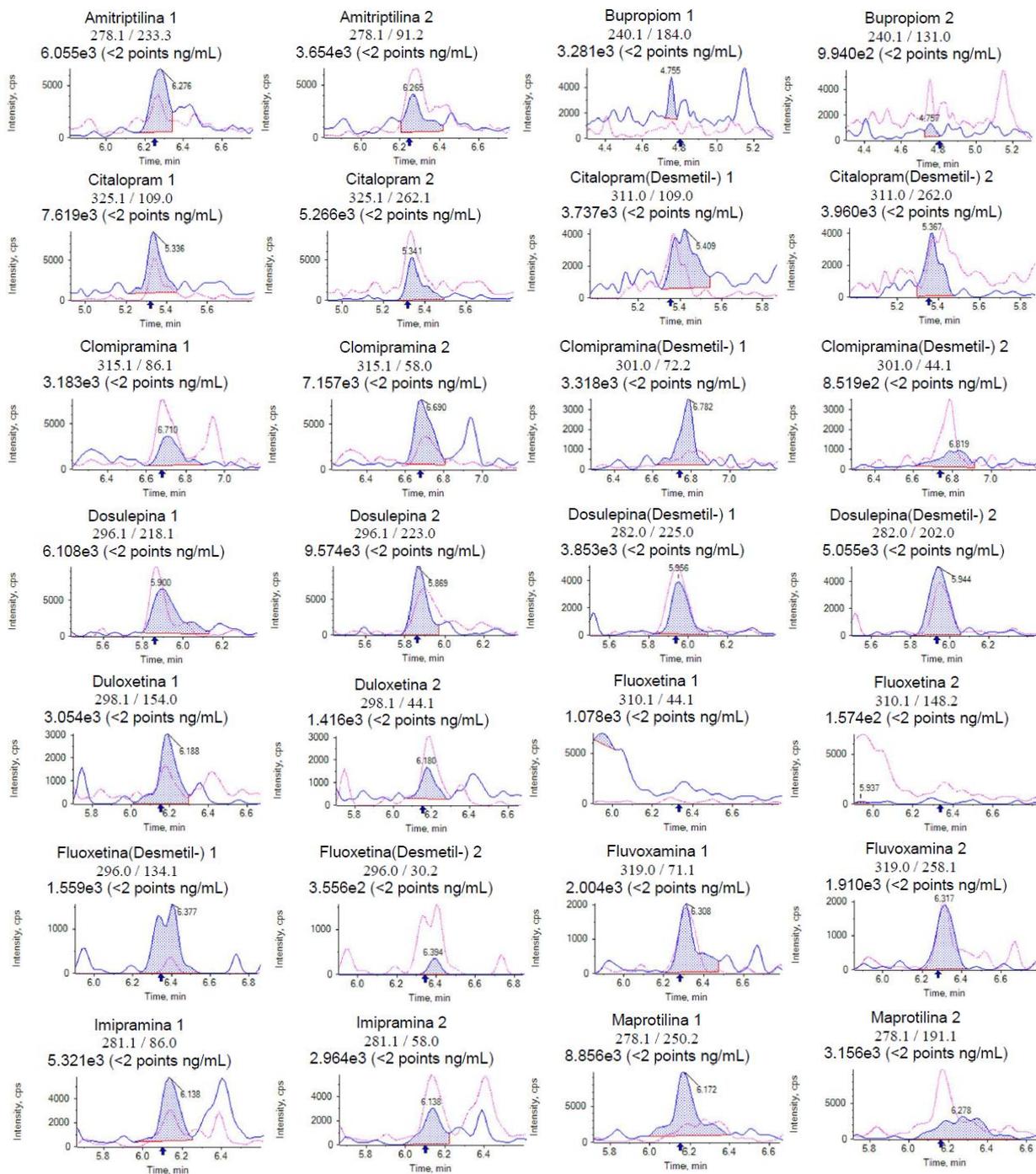


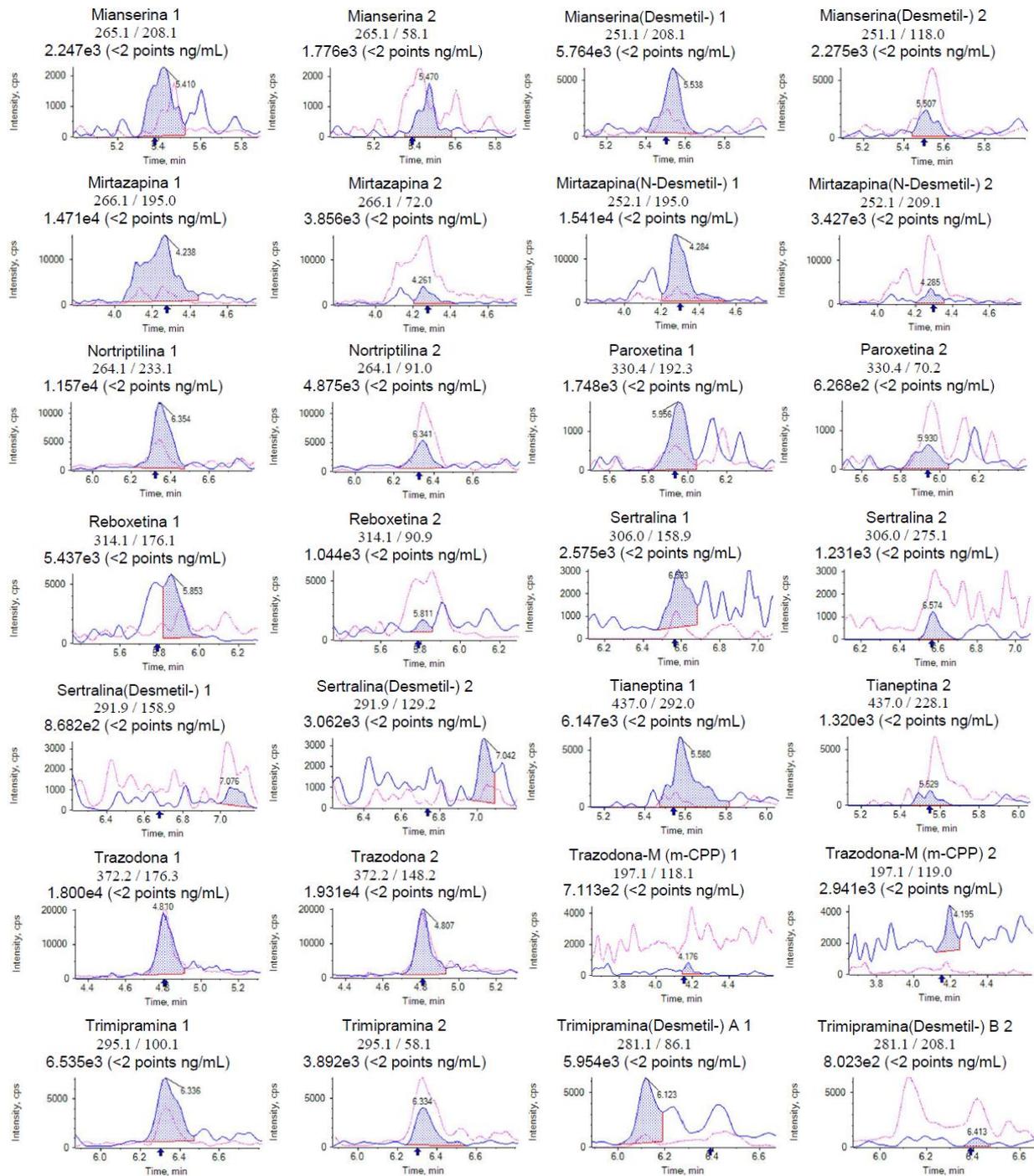


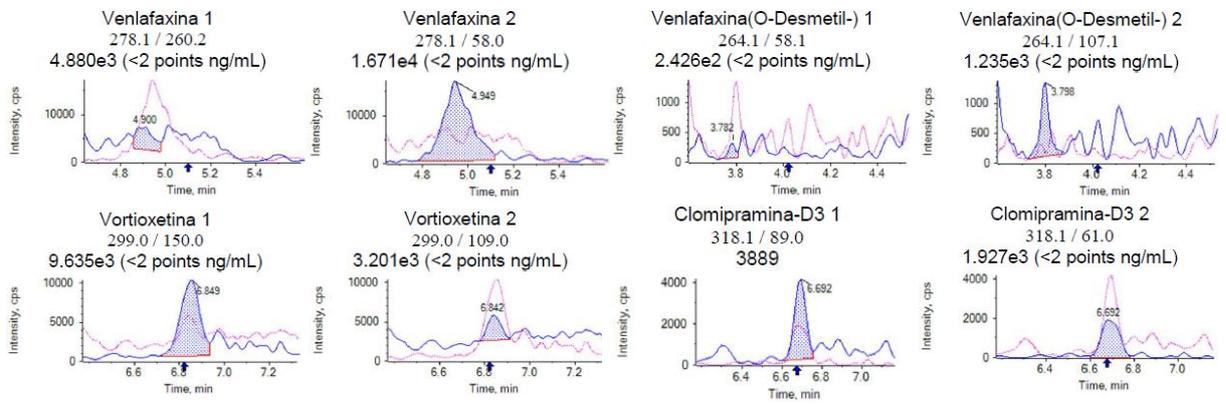
APÊNDICE B

ESTUDO DAS INTERFERÊNCIAS

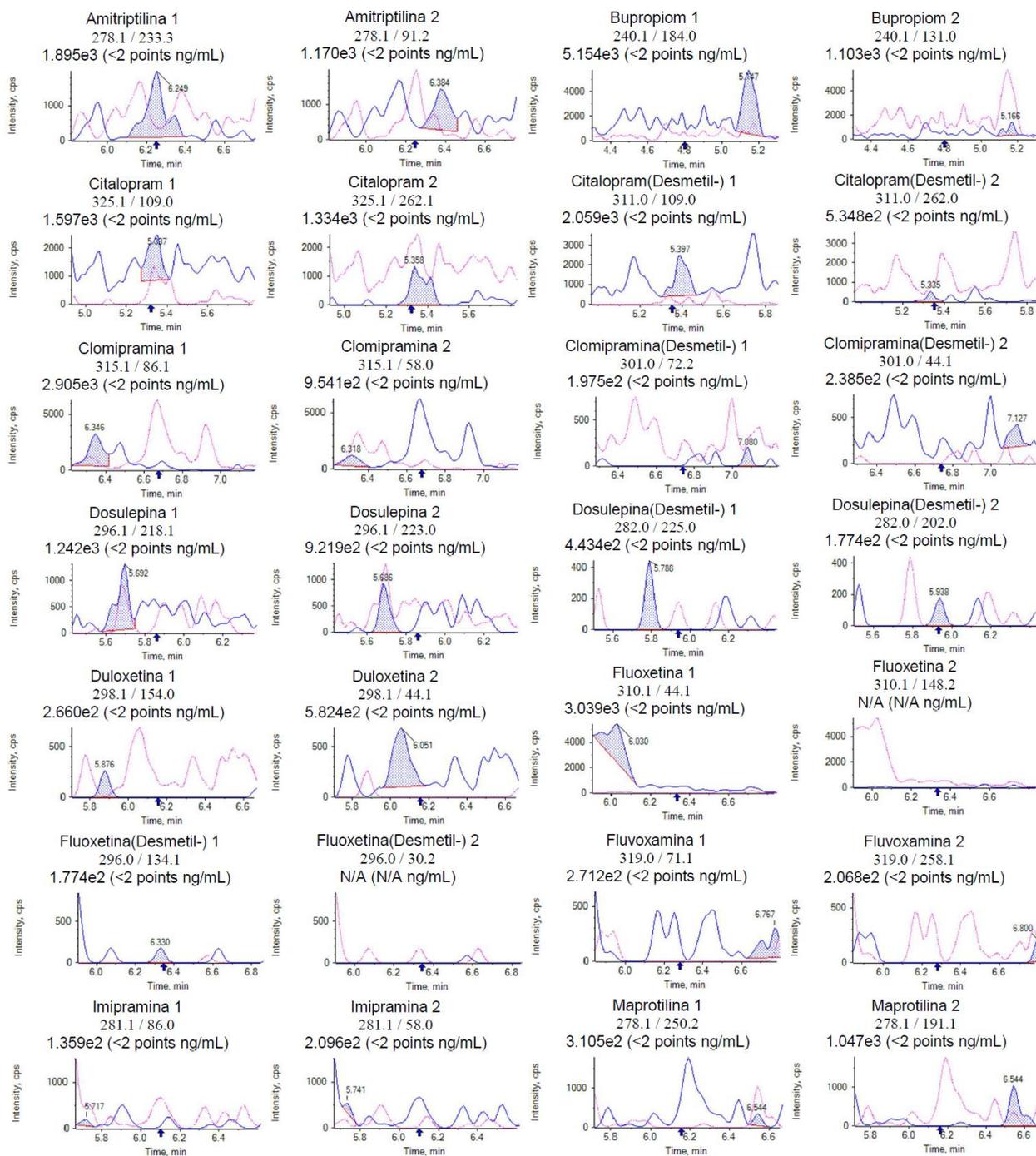
Cromatogramas com as transições iônicas dos ADs para o ponto 1) no estudo das interferências.

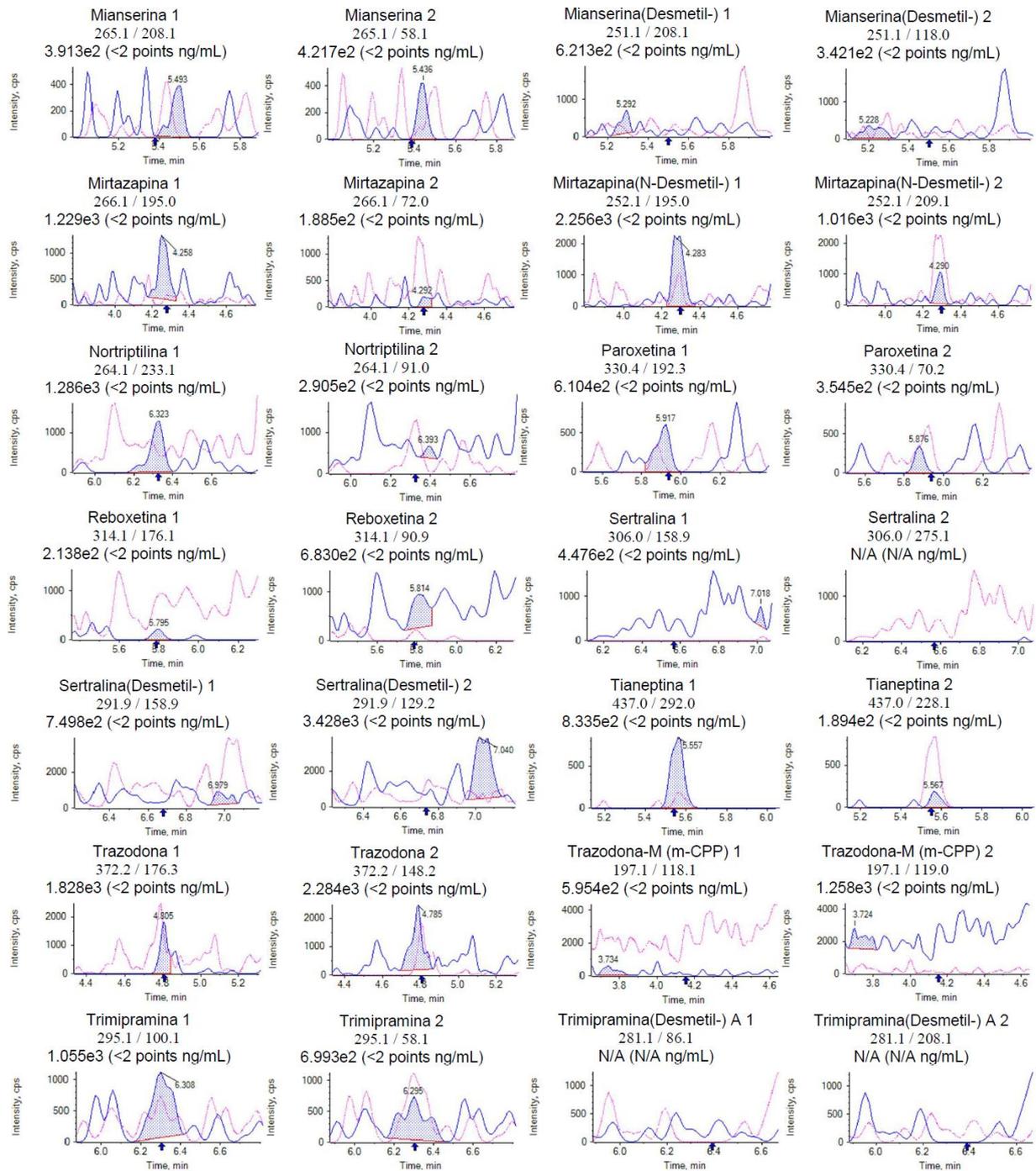


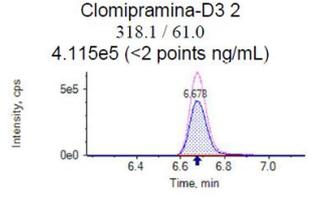
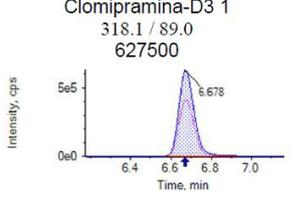
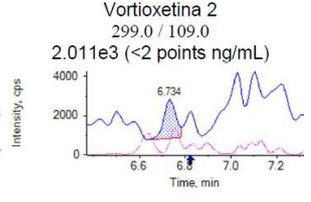
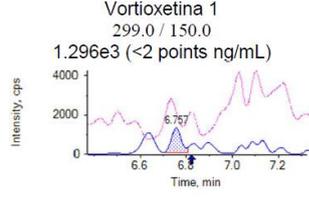
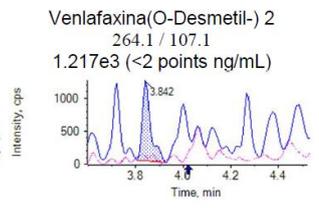
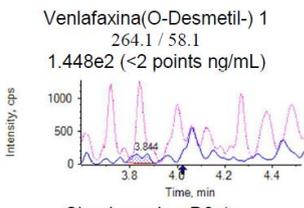
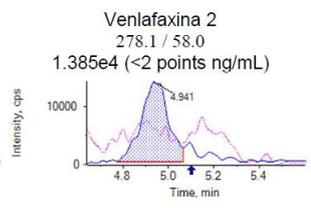
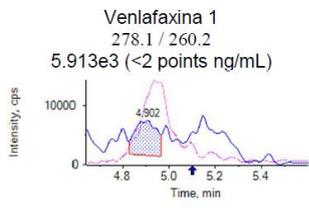




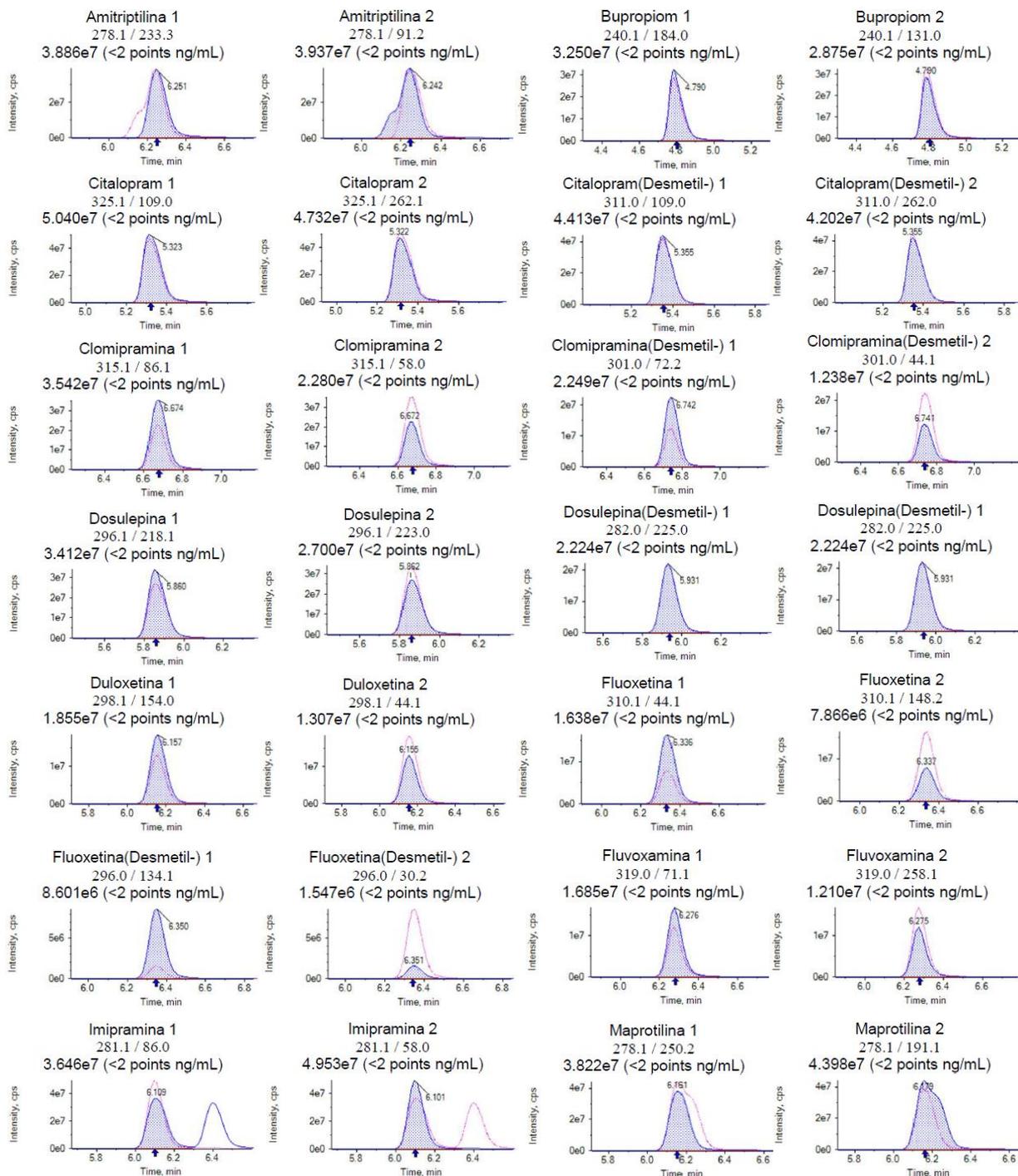
Cromatogramas com as transições iônicas dos ADs para o ponto 2) no estudo das interferências.

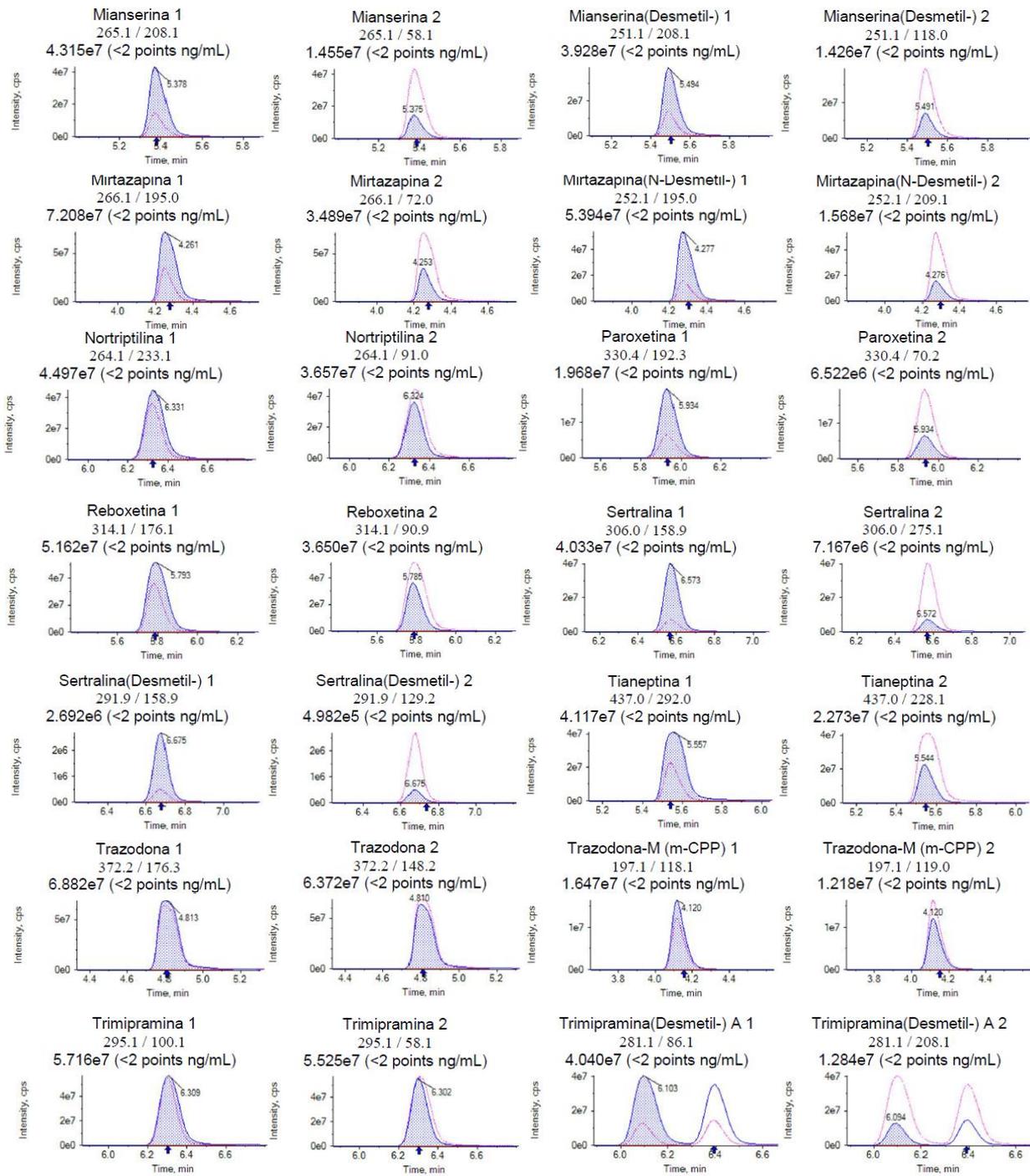


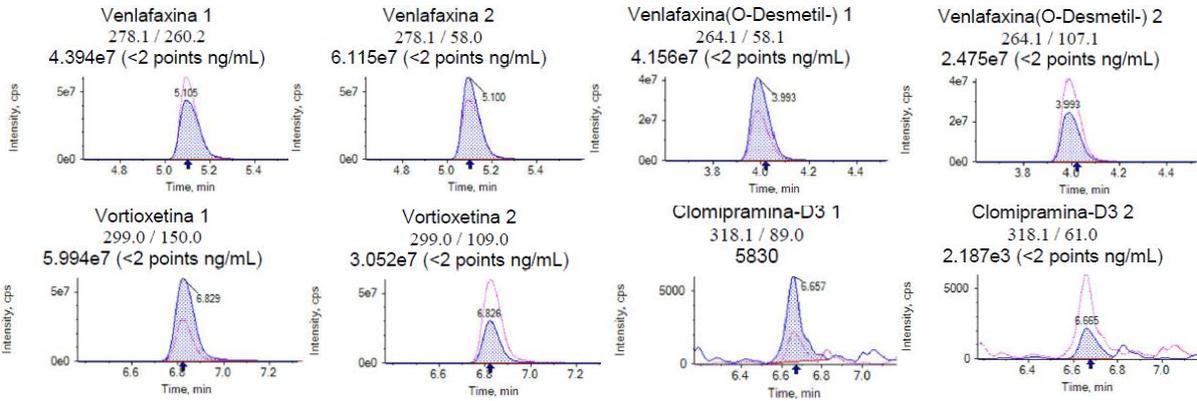




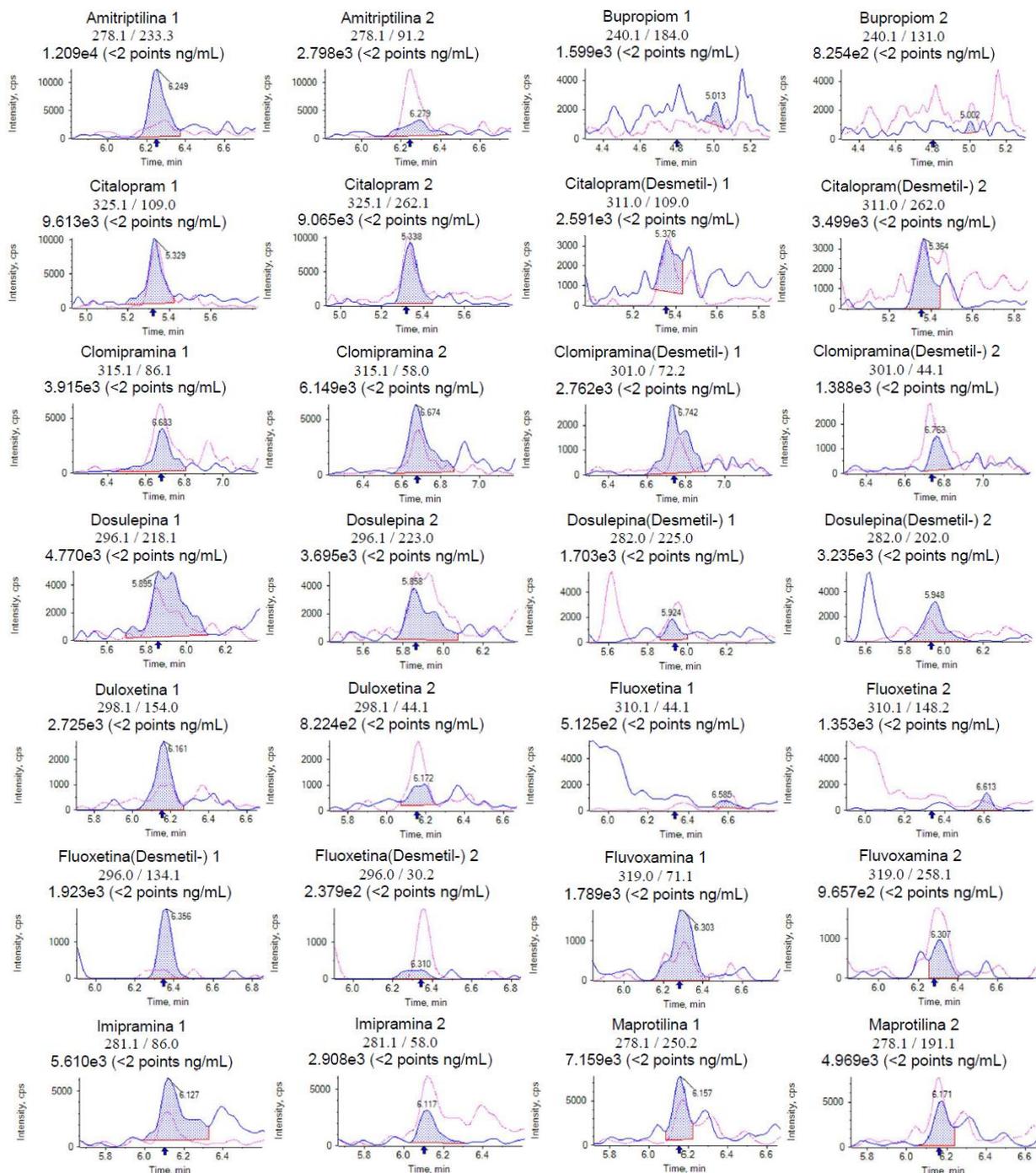
Cromatogramas com as transições iônicas dos ADs para o ponto 3) no estudo das interferências.

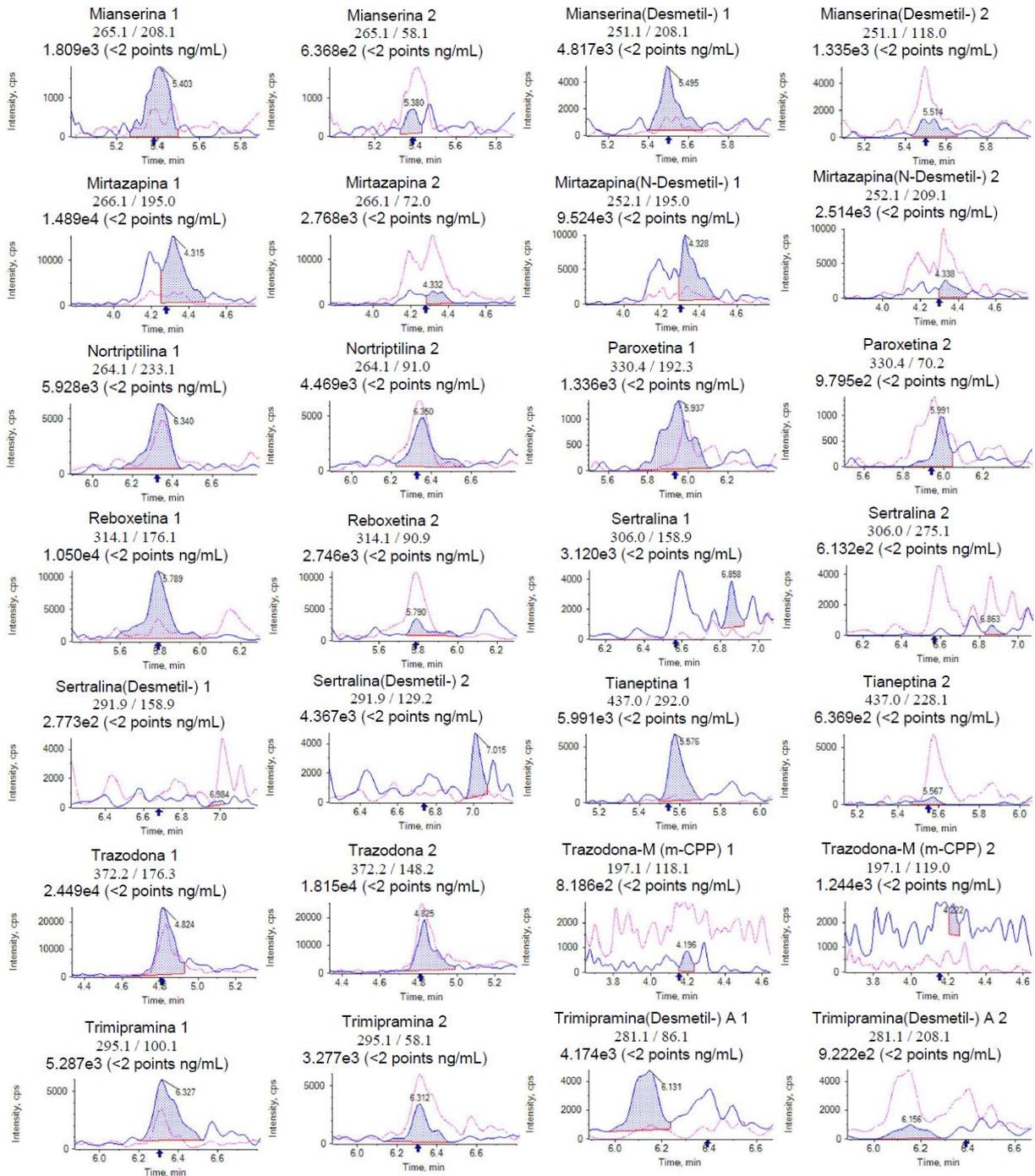


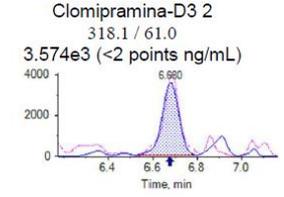
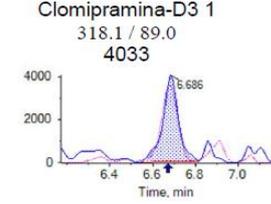
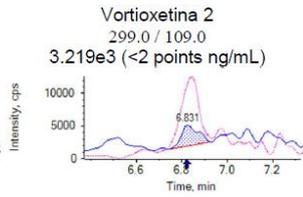
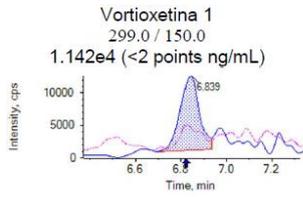
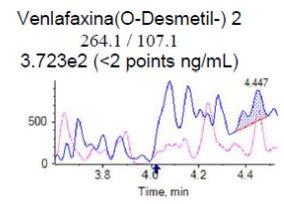
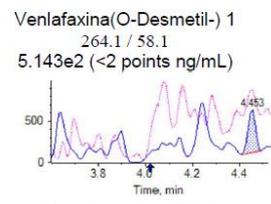
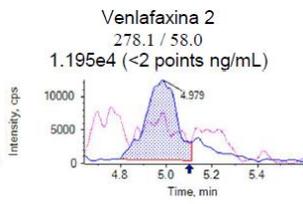
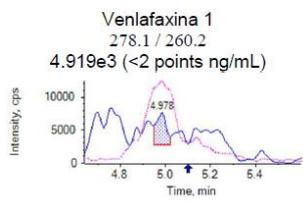




Cromatogramas com as transições iônicas dos ADs para o ponto 4) no estudo das interferências.







APÊNDICE C

ARRASTAMENTO

Intensidades dos picos do CAL1, dos picos da amostra branca e respectivas % de arrastamento.

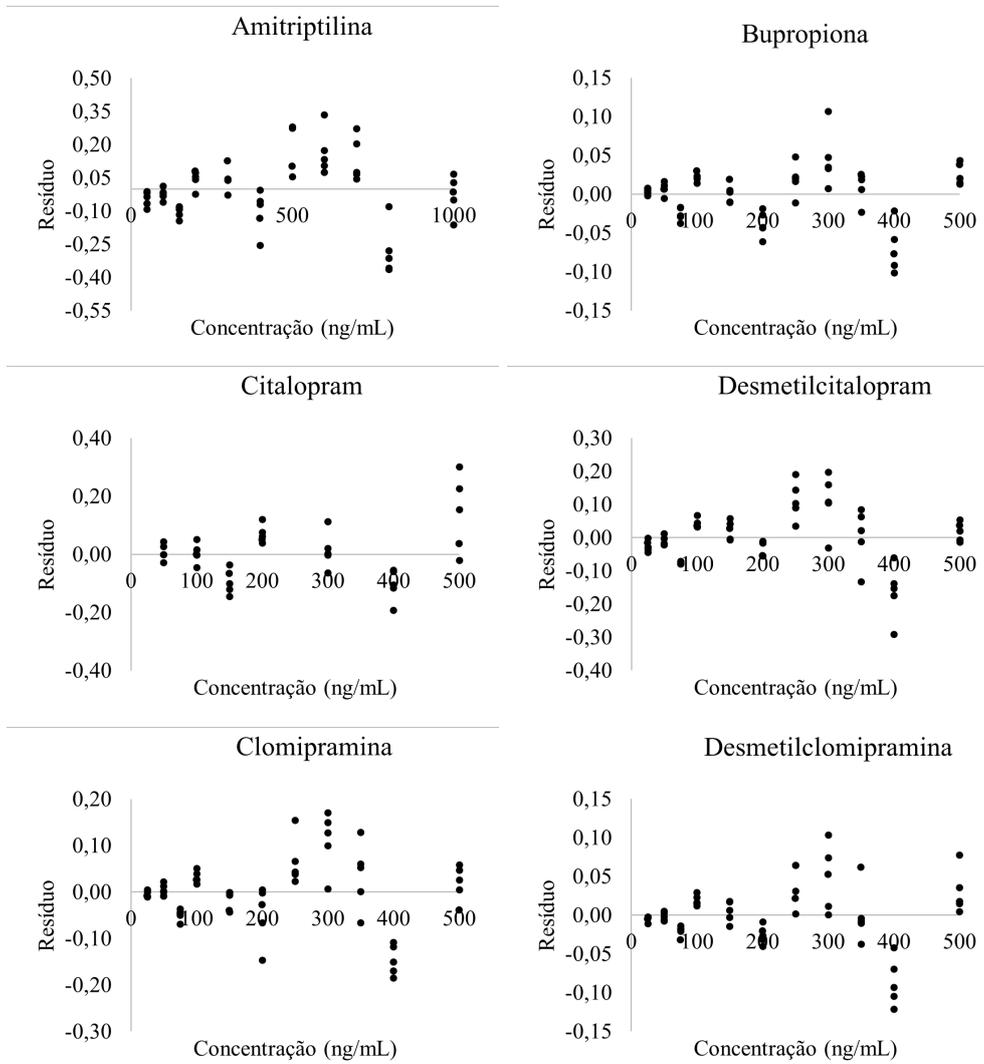
Substância	Intensidade CAL1	Intensidade AB	Arrastamento
Amitriptilina	2607324,7	15268,6	0,59%
Bupropiona	652363	11454,3	1,76%
Citalopram	2423024,7	16504	0,68%
Desmetilcitalopram	1493671	5388,4	0,36%
Clomipramina	1437442,8	15448,1	1,07%
Desmetilclomipramina	601987	9255,7	1,54%
Dosulepina	987533	11948,4	1,21%
Desmetildosulepina	591461,9	7778,8	1,32%
Duloxetina	595240,7	9156,9	1,54%
Fluoxetina	562622,5	25453,5	4,52%
Desmetilfluoxetina	421327,4	4170,7	0,99%
Fluvoxamina	586329,1	7971,6	1,36%
Imipramina	3602792,9	32508,3	0,90%
Maprotilina	4424799,2	24640,8	0,56%
Mianserina	1175564,8	15632,7	1,33%
Desmetilmianserina	1582030,7	16743,6	1,06%
Mirtazapina	2434472,7	21782,9	0,89%
Desmetilmirtazapina	1270748,5	18355,4	1,44%
Nortriptilina	2797039,2	9464,1	0,34%
Paroxetina	698912,3	8224,8	1,18%
Reboxetina	4004800,5	40936,7	1,02%
Sertralina	684724,9	7877,9	1,15%
Desmetilsertralina	71145,7	7067,3	9,93%
Tianeptina	730535,9	4664,8	0,64%
Trazodona	4449279,8	65068	1,46%
m-CPP	310371,8	369,3	0,12%
Trimipramina	3823973,7	25976,6	0,68%
Desmetiltrimipramina	3804945,1	13595,4	0,36%
Venlafaxina	1717230,2	15374,4	0,90%
Desmetilvenlafaxina	693334,8	2211,6	0,32%
Vortioxetina	1944364,2	24751,7	1,27%

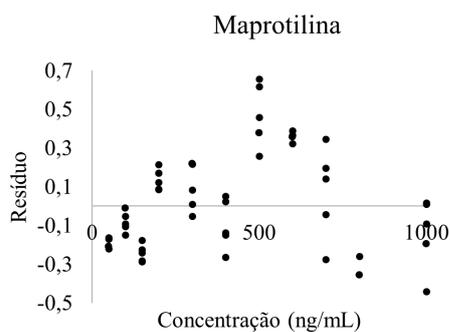
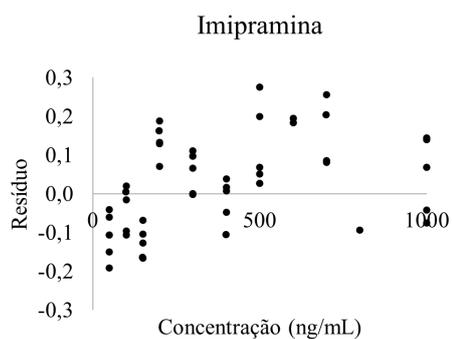
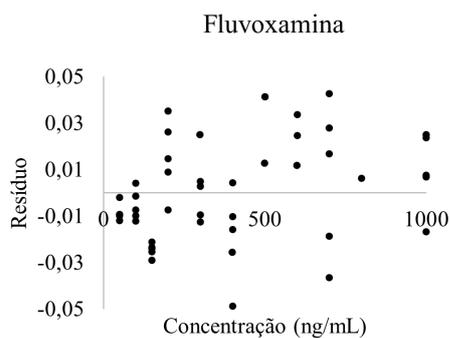
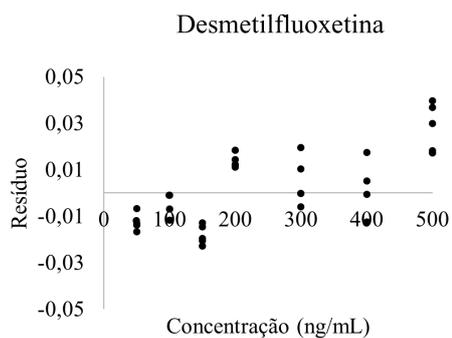
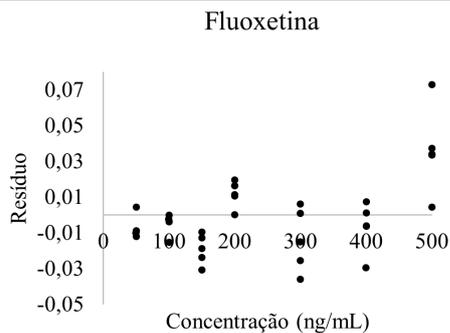
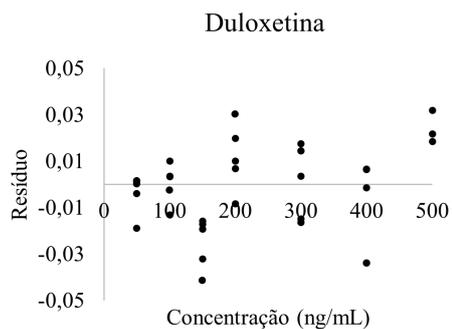
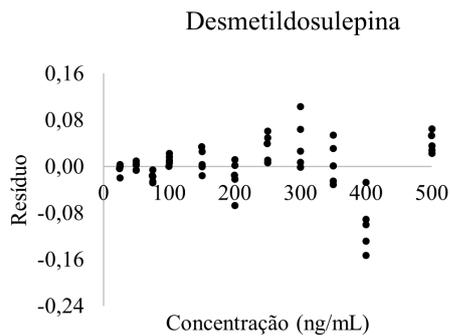
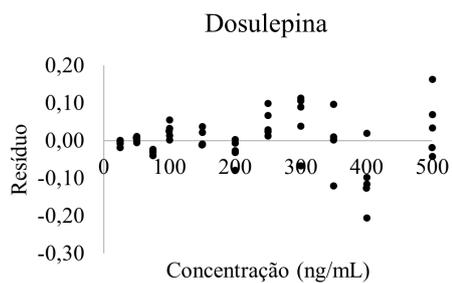
APÊNDICE D

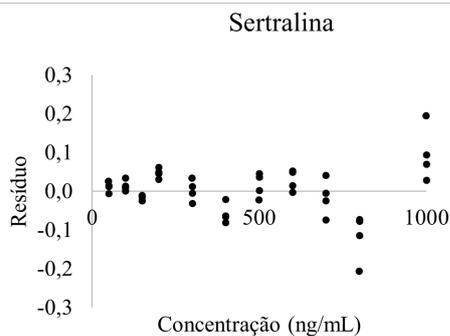
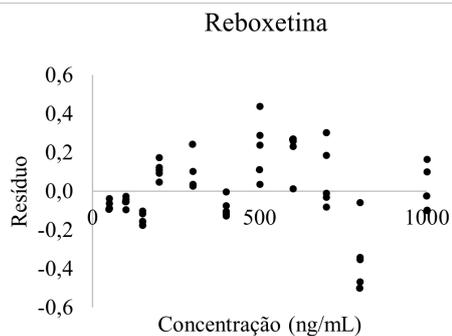
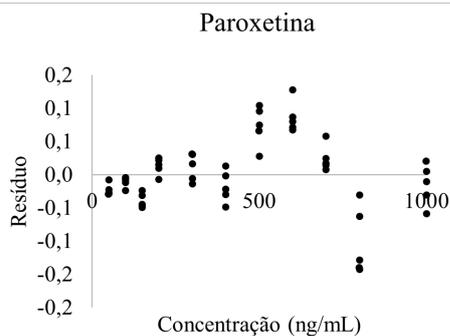
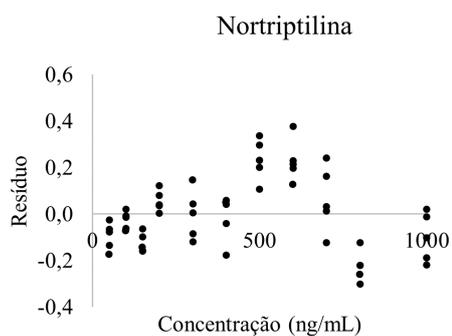
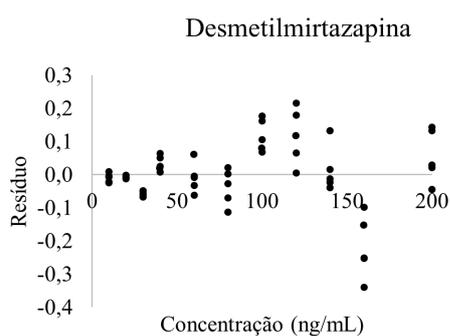
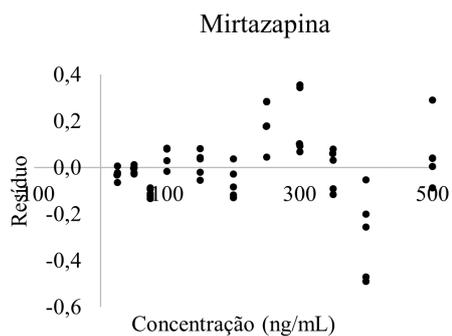
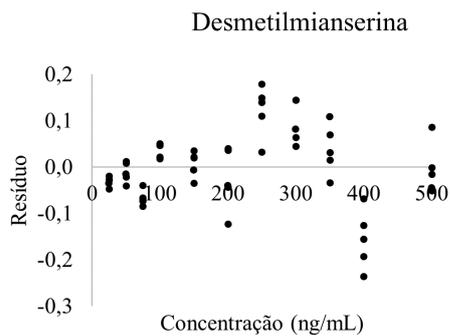
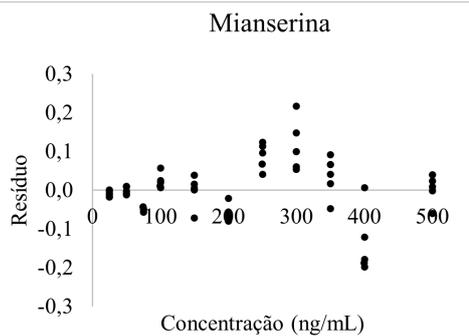
LINEARIDADE

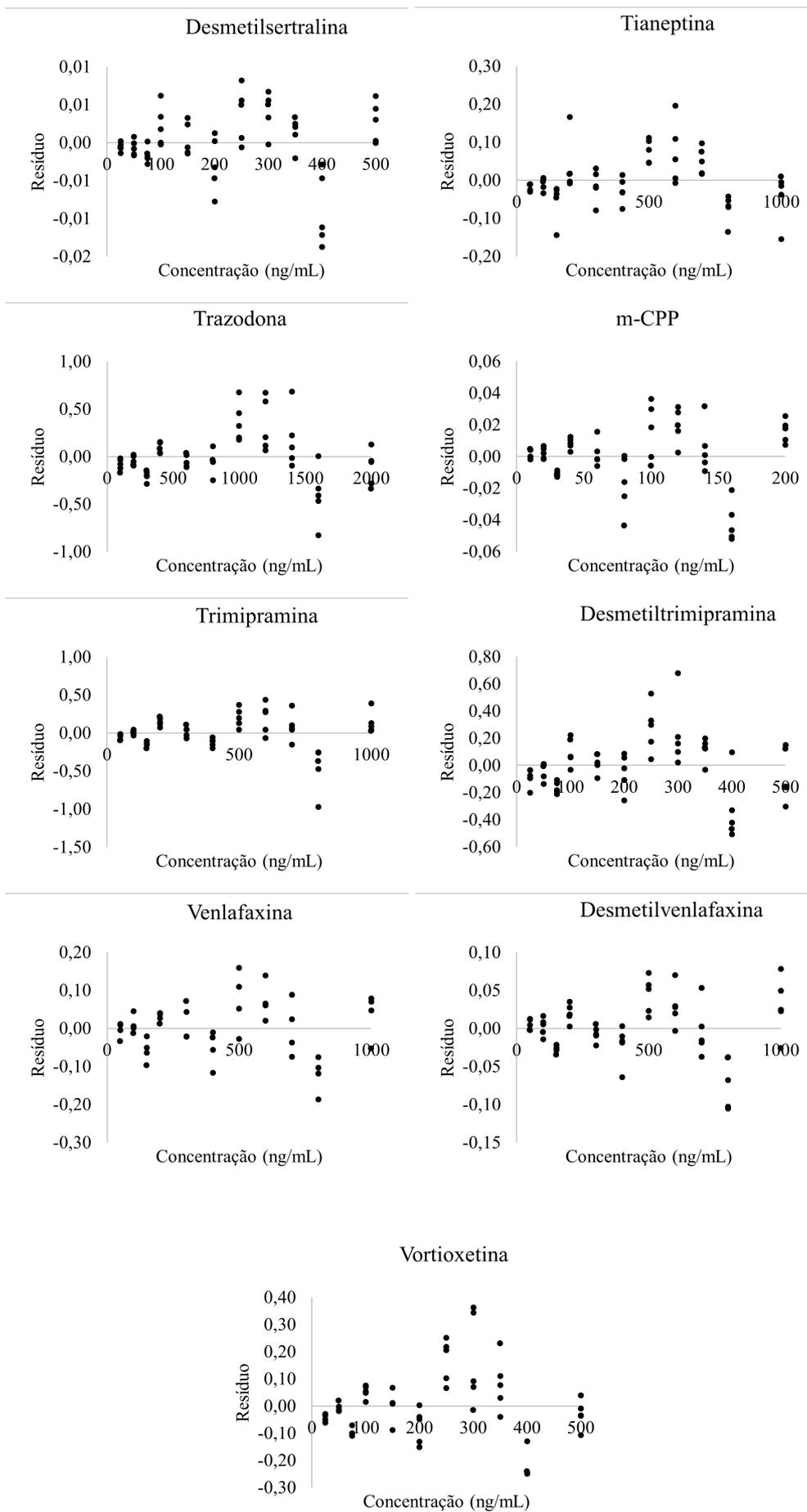
D.1 Homogeneidade

Gráficos dos resíduos em função da concentração de 5 réplicas de um total de 10 concentrações diferentes, relativos ao estudo da homogeneidade dos diferentes ADs.









D.2 Fatores de ponderação

Amitriptilina							
Data							Média Σ res (%)
Σ res (%)	w = 1/x	56,88	42,77	53,01	41,12	49,06	48,57
	w = 1/x ²	51,41	41,33	47,12	39,04	48,75	45,53
	w = 1/x ^{1/2}	61,68	42,14	58,58	42,62	50,27	51,06
	w = 1/y	58,45	44,89	54,16	41,39	51,09	49,99
	w = 1/y ²	52,87	43,98	49,29	39,67	51,92	47,54
	w = 1/y ^{1/2}	62,23	43,31	59,26	42,76	51,69	51,85
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média r ²
r ²	w = 1/x	0,99458	0,99735	0,99479	0,99597	0,99476	0,99549
	w = 1/x ²	0,99281	0,99414	0,99455	0,99551	0,99318	0,99404
	w = 1/x ^{1/2}	0,99424	0,99774	0,99385	0,99518	0,99454	0,99511
	w = 1/y	0,99448	0,99720	0,99456	0,99572	0,99444	0,99528
	w = 1/y ²	0,99328	0,99334	0,99417	0,99537	0,99280	0,99379
	w = 1/y ^{1/2}	0,99407	0,99768	0,99369	0,99496	0,99432	0,99495
Normalização		Σ res	(1-r ²)	Soma			
Fatores	w = 1/x	-3,91	-1,10	-5,00			
	w = 1/x ²	-5,90	-0,16	-6,06			
	w = 1/x ^{1/2}	-2,27	-0,85	-3,12			
	w = 1/y	-2,97	-0,96	-3,93			
	w = 1/y ²	-4,58	0,00	-4,58			
	w = 1/y ^{1/2}	-1,75	-0,74	-2,49			

Bupropiona							
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média Σ res (%)
Σ res (%)	w = 1/x	56,54	46,07	54,75	60,25	50,88	53,70
	w = 1/x ²	55,82	40,91	54,38	58,93	49,75	51,96
	w = 1/x ^{1/2}	58,54	47,44	54,23	62,24	53,31	55,15
	w = 1/y	58,81	44,59	56,32	63,40	52,95	55,21
	w = 1/y ²	58,34	41,72	56,03	64,34	52,94	54,67
	w = 1/y ^{1/2}	60,06	48,49	54,62	63,98	54,71	56,37
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média r ²
r ²	w = 1/x	0,99460	0,99731	0,99410	0,99355	0,99528	0,99497
	w = 1/x ²	0,99131	0,99487	0,99091	0,99075	0,99367	0,99230
	w = 1/x ^{1/2}	0,99452	0,99762	0,99383	0,99288	0,99513	0,99480
	w = 1/y	0,99444	0,99716	0,99383	0,99301	0,99494	0,99468
	w = 1/y ²	0,99088	0,99438	0,98956	0,98899	0,99298	0,99136
	w = 1/y ^{1/2}	0,99442	0,99757	0,99371	0,99259	0,99495	0,99464
Normalização		Σ res	(1-r ²)	Soma			
Fatores	w = 1/x	-0,53	-0,76	-1,29			
	w = 1/x ²	-1,68	0,96	-0,72			
	w = 1/x ^{1/2}	0,42	-0,65	-0,23			
	w = 1/y	0,46	-0,57	-0,11			
	w = 1/y ²	0,11	1,57	1,68			
	w = 1/y ^{1/2}	1,22	-0,55	0,67			

Citalopram							
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média Σ res (%)
Σ res (%)	w = 1/x	42,36	37,41	55,04	56,54	59,60	50,19
	w = 1/x ²	41,79	32,12	56,54	54,05	56,41	48,18
	w = 1/x ^{1/2}	43,77	43,18	61,01	55,90	62,09	53,19
	w = 1/y	43,48	38,14	55,08	59,60	62,14	51,69
	w = 1/y ²	44,14	33,07	55,56	59,53	61,36	50,73
	w = 1/y ^{1/2}	44,21	43,70	59,71	57,82	63,74	53,84
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média r ²
r ²	w = 1/x	0,99376	0,99761	0,99446	0,99392	0,99390	0,99473
	w = 1/x ²	0,99494	0,99706	0,99128	0,98968	0,99105	0,99280
	w = 1/x ^{1/2}	0,99172	0,99729	0,99448	0,99415	0,99375	0,99428
	w = 1/y	0,99317	0,99754	0,99457	0,99377	0,99359	0,99453
	w = 1/y ²	0,99426	0,99691	0,99133	0,98796	0,98996	0,99208
	w = 1/y ^{1/2}	0,99128	0,99725	0,99454	0,99415	0,99360	0,99416
Normalização		Σ res	(1-r ²)	Soma			
Fatores	w = 1/x	-0,54	-0,90	-1,44			
	w = 1/x ²	-1,51	0,90	-0,60			
	w = 1/x ^{1/2}	0,91	-0,48	0,43			
	w = 1/y	0,19	-0,72	-0,53			
	w = 1/y ²	-0,28	1,57	1,30			
	w = 1/y ^{1/2}	1,22	-0,38	0,85			

Desmetilcitalopram							
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média Σ res (%)
Σ res (%)	w = 1/x	56,39	47,30	60,37	50,28	55,87	54,04
	w = 1/x ²	55,17	44,99	51,82	48,14	54,63	50,95
	w = 1/x ^{1/2}	58,17	48,11	65,49	53,11	62,73	57,52
	w = 1/y	56,35	49,46	62,51	50,36	54,98	54,73
	w = 1/y ²	57,86	48,29	56,36	48,54	55,15	53,24
	w = 1/y ^{1/2}	58,01	49,31	66,50	53,22	61,62	57,73
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média r ²
r ²	w = 1/x	0,99457	0,99598	0,99263	0,99519	0,99386	0,99445
	w = 1/x ²	0,99147	0,99337	0,99126	0,99329	0,99044	0,99196
	w = 1/x ^{1/2}	0,99434	0,99594	0,99142	0,99498	0,99397	0,99413
	w = 1/y	0,99430	0,99575	0,99216	0,99516	0,99390	0,99425
	w = 1/y ²	0,99068	0,99258	0,99089	0,99322	0,99072	0,99162
	w = 1/y ^{1/2}	0,99417	0,99578	0,99103	0,99494	0,99393	0,99397
Normalização		Σ res	(1-r ²)	Soma			
Fatores	w = 1/x	-0,25	-0,83	-1,09			
	w = 1/x ²	-1,44	1,14	-0,31			
	w = 1/x ^{1/2}	1,08	-0,58	0,50			
	w = 1/y	0,01	-0,68	-0,67			
	w = 1/y ²	-0,56	1,41	0,85			
	w = 1/y ^{1/2}	1,16	-0,46	0,71			

Clomipramina							
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média Σ res (%)
Σ res (%)	w = 1/x	37,71	46,61	35,45	49,06	63,97	46,56
	w = 1/x ²	38,16	46,92	33,06	47,87	60,92	45,39
	w = 1/x ^{1/2}	42,81	47,68	38,02	47,88	64,63	48,20
	w = 1/y	37,79	48,64	36,30	51,74	64,73	47,84
	w = 1/y ²	39,30	49,36	35,15	52,71	65,67	48,44
	w = 1/y ^{1/2}	42,77	48,91	38,47	49,33	64,65	48,83
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média r ²
r ²	w = 1/x	0,99604	0,99627	0,99696	0,99459	0,99299	0,99537
	w = 1/x ²	0,99559	0,99379	0,99660	0,99165	0,99119	0,99376
	w = 1/x ^{1/2}	0,99540	0,99626	0,99635	0,99446	0,99243	0,99498
	w = 1/y	0,99595	0,99613	0,99674	0,99448	0,99257	0,99517
	w = 1/y ²	0,99543	0,99324	0,99627	0,99062	0,99070	0,99325
	w = 1/y ^{1/2}	0,99533	0,99619	0,99620	0,99443	0,99215	0,99486
Normalização		Σ res	(1-r ²)	Soma			
Fatores	w = 1/x	-0,75	-0,94	-1,69			
	w = 1/x ²	-1,64	0,94	-0,70			
	w = 1/x ^{1/2}	0,50	-0,48	0,02			
	w = 1/y	0,23	-0,71	-0,49			
	w = 1/y ²	0,68	1,54	2,22			
	w = 1/y ^{1/2}	0,98	-0,34	0,64			

Desmetilclomipramina							
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média Σ res (%)
Σ res (%)	w = 1/x	51,74	46,18	47,71	55,99	43,06	48,94
	w = 1/x ²	53,49	44,66	43,83	51,14	43,00	47,22
	w = 1/x ^{1/2}	59,27	45,89	53,06	59,76	42,22	52,04
	w = 1/y	52,95	45,72	49,05	56,83	44,08	49,73
	w = 1/y ²	56,11	44,98	45,74	52,90	45,06	48,96
	w = 1/y ^{1/2}	59,13	45,46	53,52	60,08	42,85	52,21
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média r ²
r ²	w = 1/x	0,99290	0,99672	0,99383	0,99383	0,99591	0,9946
	w = 1/x ²	0,99110	0,99403	0,99422	0,99230	0,99496	0,9933
	w = 1/x ^{1/2}	0,99194	0,99689	0,99256	0,99312	0,99545	0,9940
	w = 1/y	0,99242	0,99677	0,99363	0,99369	0,99579	0,9945
	w = 1/y ²	0,99021	0,99446	0,99420	0,99223	0,99475	0,9932
	w = 1/y ^{1/2}	0,99162	0,99688	0,99239	0,99297	0,99536	0,9938
Normalização		Σ res	(1-r ²)	Soma			
Fatores	w = 1/x	-0,47	-1,25	-1,72			
	w = 1/x ²	-1,35	0,99	-0,36			
	w = 1/x ^{1/2}	1,13	-0,15	0,98			
	w = 1/y	-0,06	-0,94	-1,00			
	w = 1/y ²	-0,46	1,24	0,79			
	w = 1/y ^{1/2}	1,21	0,10	1,32			

Dosulepina							
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média Σ res (%)
Σ res (%)	w = 1/x	65,04	24,92	38,85	47,68	74,73	50,24
	w = 1/x ²	60,50	24,95	37,49	45,51	69,81	47,65
	w = 1/x ^{1/2}	68,00	24,63	40,14	47,93	75,95	51,33
	w = 1/y	65,31	25,17	40,29	48,15	75,38	50,86
	w = 1/y ²	61,52	25,38	39,64	47,35	72,84	49,35
	w = 1/y ^{1/2}	69,15	24,73	40,85	48,07	76,13	51,78
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média r ²
r ²	w = 1/x	0,99336	0,99902	0,99679	0,99575	0,99151	0,99529
	w = 1/x ²	0,99113	0,99821	0,99622	0,99455	0,98989	0,99400
	w = 1/x ^{1/2}	0,99260	0,99899	0,99619	0,99516	0,99000	0,99459
	w = 1/y	0,99324	0,99899	0,99655	0,99562	0,99119	0,99512
	w = 1/y ²	0,99146	0,99814	0,99586	0,99452	0,99041	0,99408
	w = 1/y ^{1/2}	0,99245	0,99897	0,99602	0,99503	0,98961	0,99442
Normalização		Σ res	(1-r ²)	Soma			
Fatores	w = 1/x	0,03	-1,33	-1,30			
	w = 1/x ²	-1,69	1,10	-0,59			
	w = 1/x ^{1/2}	0,75	-0,01	0,74			
	w = 1/y	0,43	-1,01	-0,58			
	w = 1/y ²	-0,57	0,95	0,38			
	w = 1/y ^{1/2}	1,05	0,31	1,36			

Desmetildosulepina							
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média Σ res (%)
Σ res (%)	w = 1/x	34,65	35,48	68,00	56,28	56,12	50,11
	w = 1/x ²	35,76	33,89	55,79	56,26	52,31	46,80
	w = 1/x ^{1/2}	37,11	37,81	76,37	59,08	56,99	53,47
	w = 1/y	35,52	36,35	71,77	57,45	57,56	51,73
	w = 1/y ²	37,11	34,63	60,21	58,74	56,36	49,41
	w = 1/y ^{1/2}	37,54	38,42	78,36	58,61	57,49	54,08
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média r ²
r ²	w = 1/x	0,99584	0,99811	0,99096	0,99392	0,99301	0,9944
	w = 1/x ²	0,99642	0,99700	0,99120	0,99115	0,99290	0,9937
	w = 1/x ^{1/2}	0,99443	0,99806	0,98891	0,99351	0,99175	0,9933
	w = 1/y	0,99552	0,99806	0,98999	0,99365	0,99249	0,9939
	w = 1/y ²	0,99617	0,99683	0,99015	0,99070	0,99246	0,9933
	w = 1/y ^{1/2}	0,99416	0,99803	0,98818	0,99331	0,99135	0,9930
Normalização		Σ res	(1-r ²)	Soma			
Fatores	w = 1/x	-0,30	-1,51	-1,82			
	w = 1/x ²	-1,52	-0,25	-1,77			
	w = 1/x ^{1/2}	0,93	0,55	1,48			
	w = 1/y	0,29	-0,67	-0,37			
	w = 1/y ²	-0,56	0,69	0,13			
	w = 1/y ^{1/2}	1,16	1,19	2,35			

Duloxetine							
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média Σ res (%)
Σ res (%)	w = 1/x	72,32	46,04	50,44	43,56	50,33	52,54
	w = 1/x ²	70,21	45,53	41,67	42,77	49,86	50,01
	w = 1/x ^{1/2}	74,09	45,19	64,55	46,69	50,61	56,23
	w = 1/y	77,00	48,60	51,21	42,96	51,81	54,32
	w = 1/y ²	75,91	49,71	41,13	42,08	52,68	52,30
	w = 1/y ^{1/2}	76,92	46,53	64,96	46,44	51,38	57,25
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média r ²
r ²	w = 1/x	0,99128	0,99630	0,99472	0,99585	0,99345	0,99432
	w = 1/x ²	0,98443	0,99314	0,99458	0,99425	0,99400	0,99208
	w = 1/x ^{1/2}	0,99151	0,99633	0,99399	0,99557	0,99187	0,99386
	w = 1/y	0,99075	0,99601	0,99472	0,99590	0,99298	0,99407
	w = 1/y ²	0,98147	0,99203	0,99470	0,99433	0,99341	0,99119
	w = 1/y ^{1/2}	0,99128	0,99618	0,99395	0,99559	0,99154	0,99371
Normalização		Σ res	(1-r ²)	Soma			
Fatores	w = 1/x	-0,46	-0,88	-1,34			
	w = 1/x ²	-1,40	0,89	-0,51			
	w = 1/x ^{1/2}	0,91	-0,51	0,40			
	w = 1/y	0,20	-0,68	-0,48			
	w = 1/y ²	-0,55	1,59	1,05			
	w = 1/y ^{1/2}	1,29	-0,40	0,89			

Fluoxetine							
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média Σ res (%)
Σ res (%)	w = 1/x	50,45	31,79	32,09	41,32	45,25	40,18
	w = 1/x ²	49,22	29,69	33,29	39,42	45,35	39,39
	w = 1/x ^{1/2}	52,33	34,18	37,43	46,58	45,02	43,11
	w = 1/y	50,45	31,93	31,98	41,74	45,90	40,40
	w = 1/y ²	49,64	29,78	32,94	39,00	46,65	39,60
	w = 1/y ^{1/2}	52,58	34,28	37,73	47,10	45,34	43,41
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média r ²
r ²	w = 1/x	0,99476	0,99863	0,99610	0,99664	0,99588	0,9964
	w = 1/x ²	0,99328	0,99744	0,99634	0,99597	0,99515	0,9956
	w = 1/x ^{1/2}	0,99388	0,99865	0,99530	0,99646	0,99508	0,9959
	w = 1/y	0,99439	0,99863	0,99617	0,99666	0,99568	0,9963
	w = 1/y ²	0,99303	0,99758	0,99648	0,99613	0,99495	0,9956
	w = 1/y ^{1/2}	0,99359	0,99864	0,99533	0,99644	0,99494	0,9958
Normalização		Σ res	(1-r ²)	Soma			
Fatores	w = 1/x	-0,47	-1,38	-1,85			
	w = 1/x ²	-0,91	0,91	0,00			
	w = 1/x ^{1/2}	1,18	0,20	1,37			
	w = 1/y	-0,35	-1,09	-1,44			
	w = 1/y ²	-0,80	0,91	0,12			
	w = 1/y ^{1/2}	1,34	0,46	1,80			

Desmetilfluoxetina							
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média Σ res (%)
Σ res (%)	w = 1/x	73,13	56,86	62,45	65,52	65,66	64,72
	w = 1/x ²	67,19	51,05	53,23	60,53	58,15	58,03
	w = 1/x ^{1/2}	78,27	63,80	78,61	69,17	76,42	73,26
	w = 1/y	73,44	57,22	64,22	66,59	67,07	65,71
	w = 1/y ²	68,41	51,92	54,80	62,33	60,25	59,54
	w = 1/y ^{1/2}	78,36	64,26	80,03	69,74	77,77	74,03
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média r ²
r ²	w = 1/x	0,99284	0,99577	0,99318	0,99173	0,99191	0,99309
	w = 1/x ²	0,98725	0,99272	0,99146	0,99175	0,99174	0,99098
	w = 1/x ^{1/2}	0,99318	0,99623	0,99281	0,99010	0,99058	0,99258
	w = 1/y	0,99283	0,99595	0,99316	0,99135	0,99162	0,99298
	w = 1/y ²	0,98837	0,99353	0,99200	0,99146	0,99167	0,99140
	w = 1/y ^{1/2}	0,99302	0,99626	0,99268	0,98974	0,99029	0,99240
Normalização		Σ res	(1-r ²)	Soma			
Fatores	w = 1/x	-0,17	-0,99	-1,16			
	w = 1/x ²	-1,17	1,46	0,29			
	w = 1/x ^{1/2}	1,10	-0,40	0,71			
	w = 1/y	-0,03	-0,87	-0,89			
	w = 1/y ²	-0,95	0,97	0,02			
	w = 1/y ^{1/2}	1,22	-0,18	1,03			

Fluvoxamina							
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média Σ res (%)
Σ res (%)	w = 1/x	61,49	44,43	43,89	49,62	61,28	52,14
	w = 1/x ²	56,83	44,45	44,14	45,71	56,71	49,57
	w = 1/x ^{1/2}	63,67	45,41	47,66	57,25	67,83	56,36
	w = 1/y	61,48	46,22	45,78	50,65	62,31	53,29
	w = 1/y ²	59,83	46,92	48,85	47,19	60,32	52,62
	w = 1/y ^{1/2}	63,36	45,04	49,62	57,94	67,58	56,71
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média r ²
r ²	w = 1/x	0,99368	0,99671	0,99110	0,99433	0,99202	0,9936
	w = 1/x ²	0,98926	0,99373	0,99310	0,99443	0,99050	0,9922
	w = 1/x ^{1/2}	0,99387	0,99701	0,98840	0,99325	0,99125	0,9928
	w = 1/y	0,99371	0,99661	0,98989	0,99409	0,99174	0,9932
	w = 1/y ²	0,98993	0,99330	0,99168	0,99416	0,99054	0,9919
	w = 1/y ^{1/2}	0,99377	0,99696	0,98753	0,99305	0,99098	0,9925
Normalização		Σ res	(1-r ²)	Soma			
Fatores	w = 1/x	-0,48	-1,42	-1,91			
	w = 1/x ²	-1,43	0,78	-0,66			
	w = 1/x ^{1/2}	1,08	-0,11	0,97			
	w = 1/y	-0,06	-0,84	-0,90			
	w = 1/y ²	-0,31	1,23	0,93			
	w = 1/y ^{1/2}	1,20	0,37	1,57			

Imipramina							
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média Σ res (%)
Σ res (%)	w = 1/x	71,38	55,36	61,96	60,22	37,07	57,20
	w = 1/x ²	65,73	49,12	51,04	51,93	33,33	50,23
	w = 1/x ^{1/2}	76,96	57,91	78,09	76,19	39,86	65,80
	w = 1/y	72,43	55,90	64,34	61,79	38,23	58,54
	w = 1/y ²	65,96	51,60	55,23	53,32	35,28	52,28
	w = 1/y ^{1/2}	77,36	58,03	80,21	77,36	40,65	66,72
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média r ²
r ²	w = 1/x	0,99227	0,99575	0,99197	0,99361	0,99562	0,99384
	w = 1/x ²	0,98858	0,99293	0,99247	0,99213	0,99640	0,99250
	w = 1/x ^{1/2}	0,99174	0,99574	0,99039	0,99327	0,99440	0,99311
	w = 1/y	0,99217	0,99568	0,99163	0,99366	0,99534	0,99369
	w = 1/y ²	0,98955	0,99344	0,99199	0,99263	0,99611	0,99274
	w = 1/y ^{1/2}	0,99152	0,99562	0,99011	0,99321	0,99418	0,99293
Normalização		Σ res	(1-r ²)	Soma			
Fatores	w = 1/x	-0,19	-1,33	-1,52			
	w = 1/x ²	-1,21	1,20	-0,02			
	w = 1/x ^{1/2}	1,08	0,05	1,13			
	w = 1/y	0,01	-1,05	-1,04			
	w = 1/y ²	-0,91	0,74	-0,17			
	w = 1/y ^{1/2}	1,22	0,39	1,61			

Maprotilina							
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média Σ res (%)
Σ res (%)	w = 1/x	94,72	72,43	79,30	50,92	71,10	73,70
	w = 1/x ²	87,75	65,29	69,16	48,16	63,02	66,68
	w = 1/x ^{1/2}	101,64	84,91	98,97	56,70	77,07	83,86
	w = 1/y	94,48	73,18	82,59	53,29	71,88	75,08
	w = 1/y ²	86,16	67,07	71,74	48,01	64,91	67,58
	w = 1/y ^{1/2}	101,35	85,43	102,62	58,06	77,53	85,00
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média r ²
r ²	w = 1/x	0,99119	0,99186	0,99019	0,99351	0,99317	0,9920
	w = 1/x ²	0,97990	0,98767	0,98848	0,99386	0,98945	0,9879
	w = 1/x ^{1/2}	0,99293	0,99223	0,98935	0,99225	0,99302	0,9920
	w = 1/y	0,99195	0,99221	0,99009	0,99317	0,99313	0,9921
	w = 1/y ²	0,98489	0,98932	0,98889	0,99374	0,99062	0,9895
	w = 1/y ^{1/2}	0,99304	0,99226	0,98916	0,99193	0,99283	0,9918
Normalização		Σ res	(1-r ²)	Soma			
Fatores	w = 1/x	-0,21	-0,62	-0,83			
	w = 1/x ²	-1,11	1,69	0,58			
	w = 1/x ^{1/2}	1,10	-0,61	0,49			
	w = 1/y	-0,03	-0,69	-0,72			
	w = 1/y ²	-0,99	0,78	-0,21			
	w = 1/y ^{1/2}	1,24	-0,54	0,70			

Mianserina							
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média Σ res (%)
Σ res (%)	w = 1/x	56,72	45,19	50,11	60,52	41,55	50,82
	w = 1/x ²	56,83	44,20	50,11	55,97	40,81	49,58
	w = 1/x ^{1/2}	57,29	45,36	49,33	63,10	42,72	51,56
	w = 1/y	57,69	47,28	50,99	60,82	41,40	51,64
	w = 1/y ²	59,70	47,37	52,25	58,87	41,87	52,01
	w = 1/y ^{1/2}	57,68	46,57	49,85	63,02	42,55	51,93
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média r ²
r ²	w = 1/x	0,99307	0,99687	0,99286	0,99383	0,99670	0,99467
	w = 1/x ²	0,99254	0,99439	0,99241	0,99070	0,99552	0,99311
	w = 1/x ^{1/2}	0,99178	0,99705	0,99146	0,99359	0,99646	0,99407
	w = 1/y	0,99262	0,99669	0,99253	0,99371	0,99666	0,99444
	w = 1/y ²	0,99198	0,99371	0,99173	0,99086	0,99545	0,99274
	w = 1/y ^{1/2}	0,99147	0,99686	0,99126	0,99345	0,99643	0,99389
Normalização		Σ res	(1-r ²)	Soma			
Fatores	w = 1/x	-0,47	-1,13	-1,60			
	w = 1/x ²	-1,82	0,94	-0,87			
	w = 1/x ^{1/2}	0,33	-0,33	0,00			
	w = 1/y	0,41	-0,83	-0,42			
	w = 1/y ²	0,82	1,43	2,25			
	w = 1/y ^{1/2}	0,73	-0,10	0,64			

Desmetilmianserina							
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média Σ res (%)
Σ res (%)	w = 1/x	61,03	45,56	66,57	45,96	60,68	55,96
	w = 1/x ²	57,07	43,76	55,52	44,26	57,28	51,58
	w = 1/x ^{1/2}	65,95	47,05	83,34	50,52	63,20	62,01
	w = 1/y	61,33	44,99	67,46	46,96	60,85	56,32
	w = 1/y ²	57,97	43,78	59,47	46,92	58,39	53,31
	w = 1/y ^{1/2}	66,14	46,65	83,90	51,00	63,14	62,17
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média r ²
r ²	w = 1/x	0,99361	0,99733	0,99155	0,99458	0,99398	0,9942
	w = 1/x ²	0,99212	0,99399	0,99081	0,99438	0,99239	0,9927
	w = 1/x ^{1/2}	0,99292	0,99780	0,99036	0,99341	0,99344	0,9936
	w = 1/y	0,99350	0,99732	0,99138	0,99413	0,99385	0,9940
	w = 1/y ²	0,99198	0,99402	0,99038	0,99372	0,99253	0,9925
	w = 1/y ^{1/2}	0,99282	0,99778	0,99025	0,99309	0,99333	0,9935
Normalização		Σ res	(1-r ²)	Soma			
Fatores	w = 1/x	-0,21	-1,16	-1,37			
	w = 1/x ²	-1,21	1,02	-0,19			
	w = 1/x ^{1/2}	1,17	-0,24	0,93			
	w = 1/y	-0,13	-0,90	-1,03			
	w = 1/y ²	-0,82	1,32	0,51			
	w = 1/y ^{1/2}	1,20	-0,04	1,16			

Mirtazapina							
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média Σ res (%)
Σ res (%)	w = 1/x	54,80	43,36	54,44	45,72	71,86	54,03
	w = 1/x ²	54,05	41,22	53,29	45,91	65,58	52,01
	w = 1/x ^{1/2}	56,43	44,90	52,58	51,05	78,09	56,61
	w = 1/y	55,18	42,96	55,94	46,68	72,54	54,66
	w = 1/y ²	57,13	41,17	55,38	49,22	65,92	53,76
	w = 1/y ^{1/2}	55,91	44,60	52,62	51,41	78,84	56,68
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média r ²
r ²	w = 1/x	0,99496	0,99755	0,99167	0,99354	0,99211	0,99396
	w = 1/x ²	0,99139	0,99468	0,99117	0,99340	0,98918	0,99196
	w = 1/x ^{1/2}	0,99517	0,99794	0,99030	0,99221	0,99183	0,99349
	w = 1/y	0,99482	0,99757	0,99171	0,99309	0,99219	0,99387
	w = 1/y ²	0,99072	0,99492	0,99112	0,99258	0,99007	0,99188
	w = 1/y ^{1/2}	0,99510	0,99793	0,99034	0,99192	0,99173	0,99340
Normalização		Σ res	(1-r ²)	Soma			
Fatores	w = 1/x	-0,33	-0,93	-1,26			
	w = 1/x ²	-1,46	1,21	-0,25			
	w = 1/x ^{1/2}	1,11	-0,42	0,68			
	w = 1/y	0,02	-0,83	-0,81			
	w = 1/y ²	-0,48	1,30	0,82			
	w = 1/y ^{1/2}	1,14	-0,33	0,81			

Desmetilmirtazapina							
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média Σ res (%)
Σ res (%)	w = 1/x	63,33	46,77	48,58	53,60	58,49	54,15
	w = 1/x ²	63,19	44,11	48,84	53,92	55,11	53,04
	w = 1/x ^{1/2}	65,15	51,02	48,38	53,08	61,09	55,74
	w = 1/y	65,68	47,00	49,68	55,41	59,43	55,44
	w = 1/y ²	65,44	43,66	51,22	57,76	56,75	54,97
	w = 1/y ^{1/2}	64,99	50,96	48,88	53,93	61,63	56,08
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média r ²
r ²	w = 1/x	0,99217	0,99637	0,99331	0,99394	0,99160	0,9935
	w = 1/x ²	0,99090	0,99436	0,99281	0,99212	0,99190	0,9924
	w = 1/x ^{1/2}	0,99111	0,99645	0,99185	0,99308	0,98959	0,9924
	w = 1/y	0,99189	0,99641	0,99281	0,99347	0,99086	0,9931
	w = 1/y ²	0,99013	0,99469	0,99181	0,99107	0,99126	0,9918
	w = 1/y ^{1/2}	0,99097	0,99643	0,99154	0,99279	0,98899	0,9921
Normalização		Σ res	(1-r ²)	Soma			
Fatores	w = 1/x	-0,66	-1,49	-2,15			
	w = 1/x ²	-1,65	0,22	-1,43			
	w = 1/x ^{1/2}	0,74	0,23	0,97			
	w = 1/y	0,47	-0,86	-0,38			
	w = 1/y ²	0,06	1,23	1,29			
	w = 1/y ^{1/2}	1,04	0,67	1,70			

Nortriptilina							
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média Σ res (%)
Σ res (%)	w = 1/x	76,93	48,75	74,08	55,17	57,81	62,55
	w = 1/x ²	60,50	44,43	60,80	53,99	55,98	55,14
	w = 1/x ^{1/2}	87,92	52,43	84,30	59,50	60,20	68,87
	w = 1/y	79,13	49,13	75,76	55,01	57,51	63,31
	w = 1/y ²	64,85	45,07	64,65	53,12	55,34	56,61
	w = 1/y ^{1/2}	89,25	52,69	85,57	59,41	60,41	69,46
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média r ²
r ²	w = 1/x	0,99211	0,99716	0,99266	0,99379	0,99458	0,99406
	w = 1/x ²	0,99072	0,99589	0,99085	0,99182	0,99273	0,99240
	w = 1/x ^{1/2}	0,99116	0,99707	0,99193	0,99325	0,99438	0,99356
	w = 1/y	0,99209	0,99717	0,99265	0,99383	0,99450	0,99405
	w = 1/y ²	0,99120	0,99616	0,99126	0,99156	0,99298	0,99263
	w = 1/y ^{1/2}	0,99107	0,99705	0,99191	0,99328	0,99426	0,99351
Normalização		Σ res	(1-r ²)	Soma			
Fatores	w = 1/x	-0,02	-0,98	-1,00			
	w = 1/x ²	-1,26	1,37	0,11			
	w = 1/x ^{1/2}	1,04	-0,27	0,77			
	w = 1/y	0,11	-0,97	-0,86			
	w = 1/y ²	-1,01	1,05	0,04			
	w = 1/y ^{1/2}	1,14	-0,21	0,93			

Paroxetina							
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média Σ res (%)
Σ res (%)	w = 1/x	76,01	44,66	74,59	55,88	72,67	64,76
	w = 1/x ²	66,11	44,11	67,71	55,92	63,39	59,45
	w = 1/x ^{1/2}	80,53	50,97	83,46	62,11	78,34	71,08
	w = 1/y	77,28	44,36	76,49	57,15	75,59	66,17
	w = 1/y ²	70,59	45,38	69,42	59,32	66,33	62,21
	w = 1/y ^{1/2}	81,12	50,74	84,57	62,96	79,27	71,73
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média r ²
r ²	w = 1/x	0,99121	0,99551	0,99043	0,99144	0,99110	0,9919
	w = 1/x ²	0,98684	0,99449	0,98927	0,99064	0,98997	0,9902
	w = 1/x ^{1/2}	0,99022	0,99508	0,98890	0,98987	0,98949	0,9907
	w = 1/y	0,99062	0,99555	0,99024	0,99073	0,99059	0,9915
	w = 1/y ²	0,98751	0,99458	0,98883	0,98923	0,98993	0,9900
	w = 1/y ^{1/2}	0,98965	0,99508	0,98877	0,98943	0,98903	0,9904
Normalização		Σ res	(1-r ²)	Soma			
Fatores	w = 1/x	-0,23	-1,47	-1,71			
	w = 1/x ²	-1,33	0,73	-0,60			
	w = 1/x ^{1/2}	1,07	0,12	1,19			
	w = 1/y	0,06	-0,96	-0,90			
	w = 1/y ²	-0,76	1,03	0,27			
	w = 1/y ^{1/2}	1,20	0,54	1,74			

Reboxetina							
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média Σ res (%)
Σ res (%)	w = 1/x	49,24	39,56	52,20	47,51	44,19	46,54
	w = 1/x ²	47,18	37,74	48,66	45,66	43,54	44,56
	w = 1/x ^{1/2}	52,15	42,20	56,66	53,85	49,01	50,77
	w = 1/y	49,61	39,53	52,46	47,11	43,91	46,52
	w = 1/y ²	47,85	37,37	49,36	47,44	43,69	45,14
	w = 1/y ^{1/2}	52,42	42,23	56,69	53,55	48,85	50,75
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média r ²
r ²	w = 1/x	0,99472	0,99792	0,99535	0,99508	0,99598	0,99581
	w = 1/x ²	0,99449	0,99627	0,99452	0,99262	0,99523	0,99463
	w = 1/x ^{1/2}	0,99362	0,99811	0,99480	0,99491	0,99554	0,99539
	w = 1/y	0,99442	0,99801	0,99530	0,99506	0,99593	0,99574
	w = 1/y ²	0,99418	0,99673	0,99450	0,99316	0,99536	0,99479
	w = 1/y ^{1/2}	0,99340	0,99812	0,99475	0,99481	0,99547	0,99531
Normalização		Σ res	(1-r ²)	Soma			
Fatores	w = 1/x	-0,31	-1,09	-1,40			
	w = 1/x ²	-1,03	1,34	0,31			
	w = 1/x ^{1/2}	1,24	-0,24	1,00			
	w = 1/y	-0,31	-0,96	-1,27			
	w = 1/y ²	-0,82	1,01	0,19			
	w = 1/y ^{1/2}	1,23	-0,07	1,17			

Sertralina							
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média Σ res (%)
Σ res (%)	w = 1/x	60,08	59,16	56,15	48,93	62,11	57,29
	w = 1/x ²	61,22	57,86	54,46	47,83	62,58	56,79
	w = 1/x ^{1/2}	67,91	62,80	57,34	51,68	62,28	60,40
	w = 1/y	59,44	61,83	56,95	50,05	64,93	58,64
	w = 1/y ²	62,65	60,21	57,53	49,28	66,43	59,22
	w = 1/y ^{1/2}	67,77	64,71	57,50	52,37	64,25	61,32
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média r ²
r ²	w = 1/x	0,99001	0,99307	0,99355	0,99485	0,99355	0,9930
	w = 1/x ²	0,99035	0,98895	0,99262	0,99382	0,98900	0,9909
	w = 1/x ^{1/2}	0,98741	0,99317	0,99270	0,99386	0,99369	0,9922
	w = 1/y	0,99002	0,99302	0,99329	0,99482	0,99324	0,9929
	w = 1/y ²	0,99047	0,98903	0,99226	0,99379	0,98732	0,9906
	w = 1/y ^{1/2}	0,98729	0,99313	0,99253	0,99392	0,99358	0,9921
Normalização		Σ res	(1-r ²)	Soma			
Fatores	w = 1/x	-0,95	-1,07	-2,01			
	w = 1/x ²	-1,23	1,00	-0,23			
	w = 1/x ^{1/2}	0,83	-0,22	0,61			
	w = 1/y	-0,17	-0,94	-1,11			
	w = 1/y ²	0,16	1,38	1,54			
	w = 1/y ^{1/2}	1,36	-0,15	1,21			

Demetilsertalina							
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média Σ res (%)
Σ res (%)	w = 1/x	51,38	46,92	67,98	65,77	57,57	57,92
	w = 1/x ²	51,59	46,60	67,74	65,92	57,48	57,86
	w = 1/x ^{1/2}	50,53	48,03	69,23	65,80	59,77	58,67
	w = 1/y	53,54	47,37	69,49	67,30	61,20	59,78
	w = 1/y ²	55,74	45,65	70,98	68,78	61,93	60,62
	w = 1/y ^{1/2}	51,26	48,23	68,78	66,49	62,69	59,49
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média r ²
r ²	w = 1/x	0,99105	0,99647	0,99088	0,99230	0,99208	0,99256
	w = 1/x ²	0,99336	0,99370	0,98774	0,98984	0,98579	0,99009
	w = 1/x ^{1/2}	0,98816	0,99628	0,98986	0,99067	0,99325	0,99164
	w = 1/y	0,98969	0,99656	0,99052	0,99172	0,99198	0,99209
	w = 1/y ²	0,99204	0,99464	0,98842	0,98940	0,98669	0,99024
	w = 1/y ^{1/2}	0,98708	0,99627	0,98946	0,99022	0,99311	0,99123
Normalização		Σ res	(1-r ²)	Soma			
Fatores	w = 1/x	-1,04	-1,26	-2,29			
	w = 1/x ²	-1,09	1,23	0,14			
	w = 1/x ^{1/2}	-0,35	-0,34	-0,69			
	w = 1/y	0,66	-0,79	-0,13			
	w = 1/y ²	1,42	1,08	2,50			
	w = 1/y ^{1/2}	0,40	0,08	0,47			

Tianeptina							
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média Σ res (%)
Σ res (%)	w = 1/x	69,99	38,52	66,18	41,80	65,00	56,30
	w = 1/x ²	65,04	38,51	54,28	37,46	58,59	50,78
	w = 1/x ^{1/2}	75,59	43,96	81,78	48,18	70,54	64,01
	w = 1/y	70,84	38,16	67,04	42,54	65,24	56,76
	w = 1/y ²	67,80	38,95	54,78	38,83	59,44	51,96
	w = 1/y ^{1/2}	75,97	43,55	82,77	48,92	70,68	64,38
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média r ²
r ²	w = 1/x	0,99182	0,99725	0,99269	0,99676	0,99416	0,9945
	w = 1/x ²	0,98894	0,99467	0,99214	0,99607	0,99227	0,9928
	w = 1/x ^{1/2}	0,99086	0,99757	0,99205	0,99636	0,99358	0,9941
	w = 1/y	0,99139	0,99729	0,99271	0,99665	0,99416	0,9944
	w = 1/y ²	0,98771	0,99497	0,99227	0,99600	0,99269	0,9927
	w = 1/y ^{1/2}	0,99062	0,99756	0,99200	0,99627	0,99353	0,9940
Normalização		Σ res	(1-r ²)	Soma			
Fatores	w = 1/x	-0,18	-0,97	-1,15			
	w = 1/x ²	-1,14	1,19	0,05			
	w = 1/x ^{1/2}	1,15	-0,40	0,75			
	w = 1/y	-0,10	-0,84	-0,95			
	w = 1/y ²	-0,93	1,30	0,37			
	w = 1/y ^{1/2}	1,21	-0,29	0,93			

Trazodona							
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média Σ res (%)
Σ res (%)	w = 1/x	50,54	34,19	61,13	32,50	56,69	47,01
	w = 1/x ²	44,06	33,95	61,26	32,63	51,89	44,76
	w = 1/x ^{1/2}	60,58	35,15	75,48	34,54	60,55	53,26
	w = 1/y	51,79	33,97	62,64	32,30	57,29	47,60
	w = 1/y ²	44,28	34,69	65,07	33,74	53,55	46,27
	w = 1/y ^{1/2}	61,83	34,78	75,90	34,43	60,75	53,54
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média r ²
r ²	w = 1/x	0,99576	0,99811	0,99019	0,99757	0,99451	0,99523
	w = 1/x ²	0,99510	0,99568	0,98972	0,99621	0,99206	0,99375
	w = 1/x ^{1/2}	0,99531	0,99850	0,98840	0,99755	0,99441	0,99483
	w = 1/y	0,99580	0,99807	0,99007	0,99752	0,99434	0,99516
	w = 1/y ²	0,99538	0,99544	0,98869	0,99597	0,99220	0,99354
	w = 1/y ^{1/2}	0,99529	0,99849	0,98842	0,99752	0,99399	0,99474
Normalização		Σ res	(1-r ²)	Soma			
Fatores	w = 1/x	-0,46	-0,95	-1,41			
	w = 1/x ²	-1,07	1,09	0,03			
	w = 1/x ^{1/2}	1,21	-0,41	0,81			
	w = 1/y	-0,30	-0,86	-1,16			
	w = 1/y ²	-0,66	1,39	0,73			
	w = 1/y ^{1/2}	1,29	-0,27	1,01			

m-CPP							
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média Σ res (%)
	w = 1/x	65,69	35,69	50,58	43,40	62,37	51,54
	w = 1/x ²	64,97	34,82	50,40	43,45	60,15	50,76
	w = 1/x ^{1/2}	69,57	37,01	50,00	42,22	65,96	52,95
	w = 1/y	69,59	35,39	50,76	45,04	65,24	53,20
	w = 1/y ²	70,50	34,11	50,59	47,04	64,90	53,43
	w = 1/y ^{1/2}	72,19	36,79	50,14	43,01	67,60	53,95
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média r ²
r ²	w = 1/x	0,99250	0,99776	0,99411	0,99436	0,99255	0,9943
	w = 1/x ²	0,98876	0,99587	0,99390	0,99372	0,99119	0,9927
	w = 1/x ^{1/2}	0,99263	0,99786	0,99314	0,99315	0,99152	0,9937
	w = 1/y	0,99179	0,99774	0,99407	0,99394	0,99201	0,9939
	w = 1/y ²	0,98724	0,99591	0,99382	0,99302	0,99000	0,9920
	w = 1/y ^{1/2}	0,99226	0,99783	0,99312	0,99286	0,99120	0,9935
Normalização		Σ res	(1-r ²)	Soma			
Fatores	w = 1/x	-0,89	-1,11	-2,00			
	w = 1/x ²	-1,54	0,77	-0,77			
	w = 1/x ^{1/2}	0,26	-0,40	-0,14			
	w = 1/y	0,46	-0,70	-0,23			
	w = 1/y ²	0,64	1,59	2,23			
	w = 1/y ^{1/2}	1,07	-0,15	0,92			

Trimipramina							
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média Σ res (%)
Σ res (%)	w = 1/x	68,80	45,43	51,53	47,41	61,84	55,00
	w = 1/x ²	65,90	42,94	48,67	45,75	55,84	51,82
	w = 1/x ^{1/2}	71,89	46,99	56,66	48,91	67,65	58,42
	w = 1/y	67,63	45,59	52,40	47,17	63,70	55,30
	w = 1/y ²	64,34	43,64	47,90	46,05	60,27	52,44
	w = 1/y ^{1/2}	71,35	46,95	57,05	48,68	68,28	58,46
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média r ²
r ²	w = 1/x	0,99368	0,99704	0,99495	0,99624	0,99084	0,99455
	w = 1/x ²	0,98841	0,99503	0,99360	0,99435	0,98999	0,99227
	w = 1/x ^{1/2}	0,99405	0,99705	0,99444	0,99614	0,98912	0,99416
	w = 1/y	0,99387	0,99702	0,99485	0,99628	0,99013	0,99443
	w = 1/y ²	0,98958	0,99534	0,99374	0,99444	0,98973	0,99256
	w = 1/y ^{1/2}	0,99405	0,99700	0,99432	0,99615	0,98850	0,99400
Normalização		Σ res	(1-r ²)	Soma			
Fatores	w = 1/x	-0,08	-0,90	-0,98			
	w = 1/x ²	-1,21	1,41	0,20			
	w = 1/x ^{1/2}	1,12	-0,50	0,62			
	w = 1/y	0,02	-0,78	-0,76			
	w = 1/y ²	-0,99	1,11	0,12			
	w = 1/y ^{1/2}	1,14	-0,34	0,79			

Desmetiltrimipramina							
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média Σ res (%)
	w = 1/x	73,75	34,83	70,82	47,79	53,17	56,07
	w = 1/x ²	65,99	33,71	56,40	47,81	51,02	50,99
	w = 1/x ^{1/2}	78,48	36,66	92,85	51,36	53,13	62,49
	w = 1/y	74,48	34,55	73,32	49,03	53,41	56,96
	w = 1/y ²	68,80	33,60	60,80	51,42	52,35	53,39
	w = 1/y ^{1/2}	78,60	36,54	95,08	51,47	52,97	62,93
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média r ²
r ²	w = 1/x	0,99208	0,99817	0,99111	0,99463	0,99477	0,9942
	w = 1/x ²	0,98633	0,99626	0,99181	0,99313	0,99319	0,9921
	w = 1/x ^{1/2}	0,99230	0,99830	0,98946	0,99400	0,99417	0,9936
	w = 1/y	0,99206	0,99813	0,99101	0,99443	0,99461	0,9940
	w = 1/y ²	0,98778	0,99618	0,99164	0,99245	0,99349	0,9923
	w = 1/y ^{1/2}	0,99208	0,99827	0,98936	0,99389	0,99398	0,9935
Normalização		Σ res	(1-r ²)	Soma			
Fatores	w = 1/x	-0,22	-0,98	-1,20			
	w = 1/x ²	-1,28	1,33	0,05			
	w = 1/x ^{1/2}	1,12	-0,40	0,72			
	w = 1/y	-0,04	-0,86	-0,89			
	w = 1/y ²	-0,78	1,15	0,37			
	w = 1/y ^{1/2}	1,21	-0,25	0,96			

Venlafaxina							
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média Σ res (%)
Σ res (%)	w = 1/x	48,81	46,48	52,68	37,36	63,14	49,70
	w = 1/x ²	46,48	48,37	52,65	36,21	63,30	49,40
	w = 1/x ^{1/2}	49,51	49,59	51,83	43,45	63,00	51,48
	w = 1/y	47,04	47,63	53,94	37,49	65,58	50,34
	w = 1/y ²	48,82	48,30	54,53	37,44	67,79	51,37
	w = 1/y ^{1/2}	49,32	50,91	51,70	43,43	65,39	52,15
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média r ²
r ²	w = 1/x	0,99605	0,99681	0,99406	0,99742	0,99245	0,99536
	w = 1/x ²	0,99365	0,99339	0,99301	0,99582	0,98788	0,99275
	w = 1/x ^{1/2}	0,99593	0,99721	0,99328	0,99750	0,99269	0,99532
	w = 1/y	0,99588	0,99668	0,99392	0,99739	0,99220	0,99522
	w = 1/y ²	0,99292	0,99328	0,99263	0,99574	0,98775	0,99246
	w = 1/y ^{1/2}	0,95849	0,99714	0,99318	0,99748	0,99250	0,99508
Normalização		Σ res	(1-r ²)	Soma			
Fatores	w = 1/x	-0,95	-0,73	-1,68			
	w = 1/x ²	-1,22	1,18	-0,04			
	w = 1/x ^{1/2}	0,67	-0,70	-0,03			
	w = 1/y	-0,37	-0,62	-0,99			
	w = 1/y ²	0,58	1,39	1,97			
	w = 1/y ^{1/2}	1,29	-0,52	0,77			

Desmetilvenlafaxina							
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média Σ res (%)
	w = 1/x	47,49	42,56	55,18	50,94	66,04	52,44
	w = 1/x ²	46,59	40,32	55,21	49,80	64,15	51,21
	w = 1/x ^{1/2}	46,97	44,32	54,20	54,00	70,54	54,00
	w = 1/y	49,49	44,45	56,30	51,71	69,80	54,35
	w = 1/y ²	47,97	42,55	57,42	50,29	70,92	53,83
	w = 1/y ^{1/2}	47,31	45,45	54,75	54,77	72,72	55,00
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média r ²
r ²	w = 1/x	0,99637	0,99749	0,99264	0,99427	0,99281	0,9947
	w = 1/x ²	0,99348	0,99476	0,99217	0,99313	0,98824	0,9924
	w = 1/x ^{1/2}	0,99640	0,99776	0,99112	0,99303	0,99303	0,9943
	w = 1/y	0,99620	0,99735	0,99243	0,99401	0,99234	0,9945
	w = 1/y ²	0,99247	0,99400	0,99183	0,99248	0,98620	0,9914
	w = 1/y ^{1/2}	0,99634	0,99770	0,99100	0,99286	0,99285	0,9941
Normalização		Σ res	(1-r ²)	Soma			
Fatores	w = 1/x	-0,74	-0,86	-1,60			
	w = 1/x ²	-1,62	0,89	-0,73			
	w = 1/x ^{1/2}	0,38	-0,53	-0,14			
	w = 1/y	0,63	-0,67	-0,04			
	w = 1/y ²	0,26	1,60	1,85			
	w = 1/y ^{1/2}	1,10	-0,44	0,66			

Vortioxetina							
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média Σ res (%)
Σ res (%)	w = 1/x	67,45	46,97	59,38	44,17	60,51	55,70
	w = 1/x ²	62,54	42,23	55,07	43,57	57,49	52,18
	w = 1/x ^{1/2}	69,63	50,65	64,27	46,00	64,73	59,06
	w = 1/y	67,30	47,09	59,66	44,89	61,32	56,05
	w = 1/y ²	65,50	43,56	55,78	46,57	58,83	54,05
	w = 1/y ^{1/2}	69,21	50,67	64,50	46,08	65,06	59,10
Data		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média r ²
r ²	w = 1/x	0,99384	0,99705	0,99449	0,99587	0,99482	0,99521
	w = 1/x ²	0,98910	0,99466	0,99306	0,99430	0,99238	0,99270
	w = 1/x ^{1/2}	0,99416	0,99721	0,99372	0,99542	0,99460	0,99502
	w = 1/y	0,99381	0,99702	0,99431	0,99561	0,99479	0,99511
	w = 1/y ²	0,98948	0,99462	0,99290	0,99371	0,99304	0,99275
	w = 1/y ^{1/2}	0,99408	0,99718	0,99359	0,99525	0,99449	0,99492
Normalização		Σ res	(1-r ²)	Soma			
Fatores	w = 1/x	-0,12	-0,77	-0,88			
	w = 1/x ²	-1,40	1,31	-0,10			
	w = 1/x ^{1/2}	1,11	-0,61	0,50			
	w = 1/y	0,01	-0,68	-0,67			
	w = 1/y ²	-0,72	1,27	0,54			
	w = 1/y ^{1/2}	1,13	-0,52	0,60			

D.3 Linearidade

Estudo Linearidade da Amitriptilina

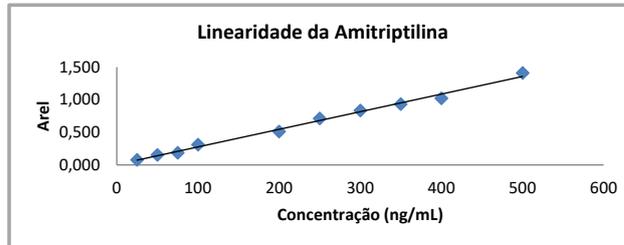
Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel
50	2607325	8372147	0,311
100	5250771	9201353	0,571
150	7306873	9904673	0,738
200	9209163	8103575	1,136
400	17284094	9457653	1,828
500	19585634	7787791	2,515
600	23876148	8122443	2,940
700	27696292	8271151	3,349
800	32075617	9284476	3,455
1000	41102900	8821058	4,660

Conc. (ng/mL)	Arel
50	0,311
100	0,571
150	0,738
200	1,136
400	1,828
500	2,515
600	2,940
700	3,349
1000	4,660

Desprezando o ponto de calibração a 800 ng/mL

Considerando um modelo de regressão linear ponderada
w=1/x

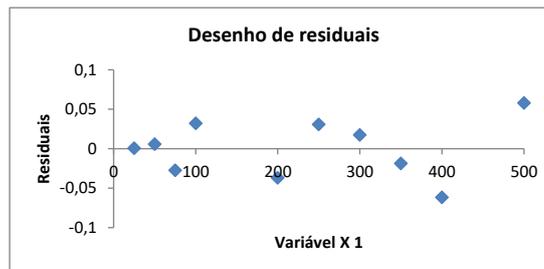
Estatística de regressão	
R	0,998251393
Quadrado de R	0,996505844
Erro-padrão	0,09336611
Observações	9



	Coefficientes	Erro-padrão	95% inferior	95% superior
Ordenada na origem	0,090938026	0,042838725	-0,010359462	0,192235514
Declive	0,004656198	0,000151639	0,004297629	0,005014767

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
50	0,323747934	-0,012319481
100	0,557856069	0,012796004
150	0,785321391	-0,047601613
200	1,012786713	0,123645398
400	1,922648001	-0,09512345
500	2,377578645	0,137336606
600	2,832509288	0,107018755
700	3,287439932	0,061101494
1000	4,652231864	0,007401883



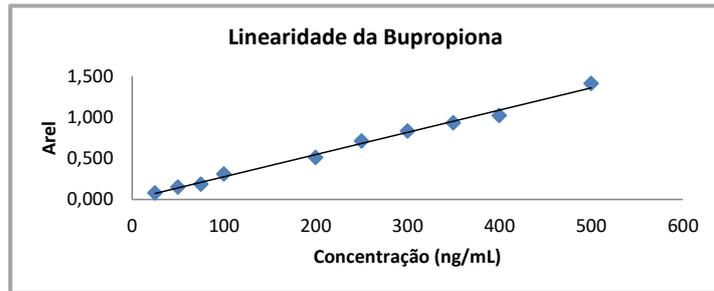
Estudo Linearidade da Bupropiona

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel
25	652363	8372147	0,078
50	1383100	9201353	0,150
75	1822742	9904673	0,184
100	2516946	8103575	0,311
200	4819261	9457653	0,510
250	5540145	7787791	0,711
300	6759693	8122443	0,832
350	7693587	8271151	0,930
400	9480392	9284476	1,021
500	12426755	8821058	1,409

Conc. (ng/mL)	Arel
25	0,078
50	0,150
75	0,184
100	0,311
200	0,510
250	0,711
300	0,832
350	0,930
400	1,021
500	1,409

Considerando um modelo de regressão linear ponderada
w=1/x

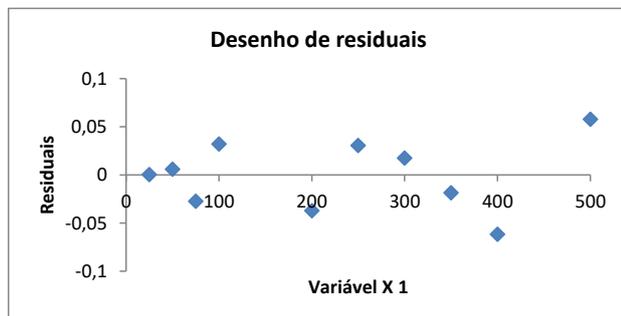
Estatística de regressão	
R	0,997297721
Quadrado de R	0,994602745
Erro-padrão	0,038633844
Observações	10



	Coefficientes	Erro-padrão	95% inferior	95% superior
Ordenada na origem	0,010357577	0,016201842	-0,027003937	0,047719092
Declive	0,002681108	0,000109633	0,002428293	0,002933922

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
25	0,077385273	0,000535363
50	0,144412969	0,005901875
75	0,211440665	-0,027412216
100	0,278468362	0,032128613
200	0,546579146	-0,037017096
250	0,680634538	0,030754007
300	0,81468993	0,017534198
350	0,948745323	-0,018574116
400	1,082800715	-0,061699309
500	1,350911499	0,057848681



Estudo Linearidade da Citalopram

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel
50	2423025	8372147	0,289
100	5017840	9201353	0,545
150	7262265	9904673	0,733
200	8942835	8103575	1,104
400	19060507	9457653	2,015
500	20360350	7787791	2,614
600	25215789	8122443	3,104
700	30910358	8271151	3,737
800	33711306	9284476	3,631
1000	47263315	8821058	5,358

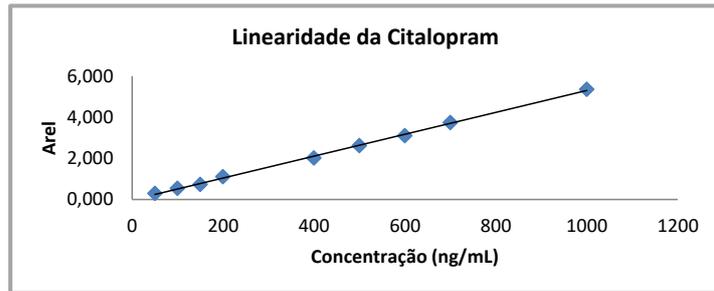
Conc. (ng/mL)	Arel
50	0,289
100	0,545
150	0,733
200	1,104
400	2,015
500	2,614
600	3,104
700	3,737
1000	5,358

Desprezando o ponto de calibração a 800 ng/mL

Considerando um modelo de regressão linear ponderada

$w=1/x$

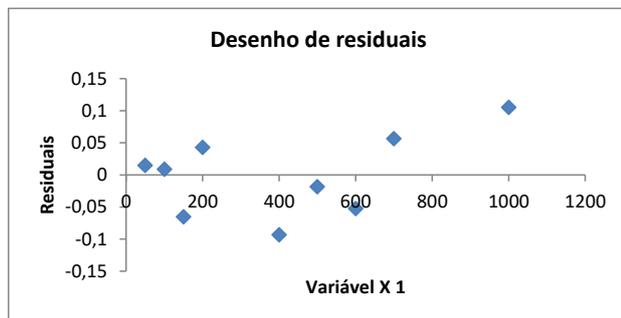
Estatística de regressão	
R	0,999255523
Quadrado de R	0,998511601
Erro-padrão	0,068048144
Observações	9



	Coefficientes	Erro-padrão	95% inferior	95% superior
Ordenada na origem	0,012374828	0,031222204	-0,061453952	0,086203608
Declive	0,005240407	0,000110519	0,00497907	0,005501743

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
50	0,274395165	0,015019818
100	0,536415503	0,008921687
150	0,79843584	-0,065219844
200	1,060456177	0,04311038
400	2,108537525	-0,093184869
500	2,632578199	-0,018184594
600	3,156618873	-0,052160088
700	3,680659547	0,056469375
1000	5,25278157	0,105228134



Estudo Linearidade da Desmetilcitalopram

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel
25	1493671	8372147	0,178
50	3266284	9201353	0,355
75	4124223	9904673	0,416
100	5503493	8103575	0,679
200	11238141	9457653	1,188
250	12700739	7787791	1,631
300	15799449	8122443	1,945
350	17880815	8271151	2,162
400	21033939	9284476	2,265
500	27136374	8821058	3,076

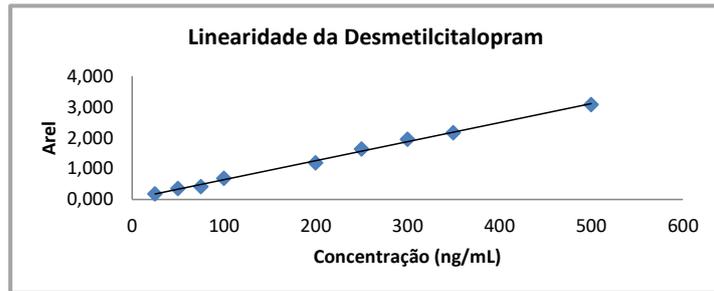
Conc. (ng/mL)	Arel
25	0,178
50	0,355
75	0,416
100	0,679
200	1,188
250	1,631
300	1,945
350	2,162
500	3,076

Desprezando o ponto de calibração a 400 ng/mL

Considerando um modelo de regressão linear ponderada

w=1/x

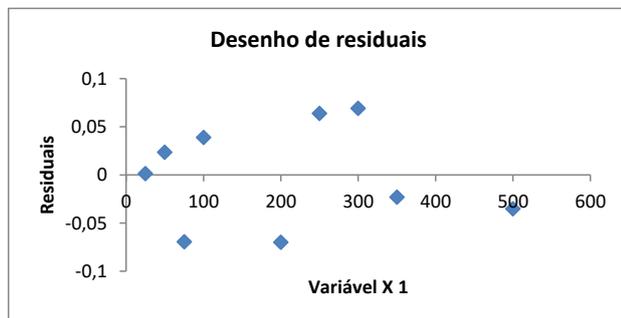
Estatística de regressão	
R	0,998107499
Quadrado de R	0,996218579
Erro-padrão	0,056580476
Observações	9



	Coefficientes	Erro-padrão	95% inferior	95% superior
Ordenada na origem	0,022422221	0,025960549	-0,038964722	0,083809164
Declive	0,00617813	0,000183788	0,00574354	0,006612721

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
25	0,176875482	0,001534077
50	0,331328744	0,023649851
75	0,485782005	-0,069390364
100	0,640235267	0,038908547
200	1,258048312	-0,06978936
250	1,566954835	0,063897738
300	1,875861358	0,069298489
350	2,184767881	-0,022938834
500	3,11148745	-0,035170143



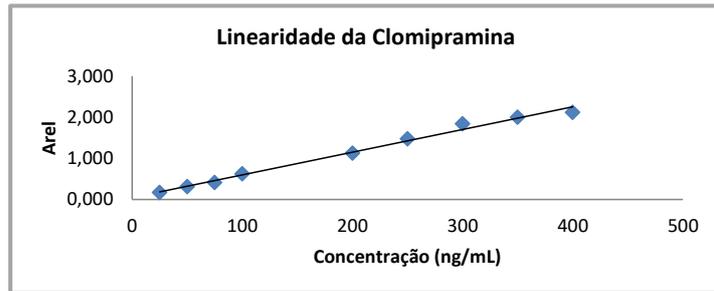
Estudo Linearidade da Clomipramina

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel
25	1437443	8372147	0,172
50	2851712	9201353	0,310
75	4081475	9904673	0,412
100	5058076	8103575	0,624
200	10660896	9457653	1,127
250	11491368	7787791	1,476
300	14933067	8122443	1,838
350	16544499	8271151	2,000
400	19660654	9284476	2,118
500	24580017	8821058	2,787

Conc. (ng/mL)	Arel
25	0,172
50	0,310
75	0,412
100	0,624
200	1,127
250	1,476
300	1,838
350	2,000
400	2,118
500	2,787

Considerando um modelo de regressão linear ponderada
w=1/x

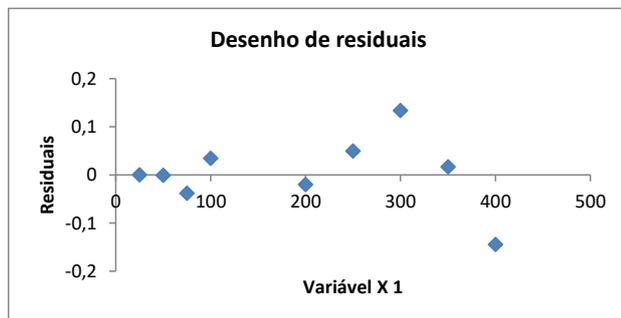
Estatística de regressão	
R	0,998016037
Quadrado de R	0,99603601
Erro-padrão	0,075574776
Observações	10



	Coefficientes	Erro-padrão	95% inferior	95% superior
Ordenada na origem	0,032090859	0,031693729	-0,040995011	0,105176729
Declive	0,005574492	0,000214462	0,005079941	0,006069043

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
25	0,171453166	0,00024029
50	0,310815472	-0,000892369
75	0,450177779	-0,038102081
100	0,589540086	0,034638212
200	1,146989312	-0,019765057
250	1,425713925	0,049848098
300	1,704438538	0,134056019
350	1,983163152	0,017102434
400	2,261887765	-0,144304212
500	2,819336991	-0,032821335



Estudo Linearidade da Desmetilclomipramina

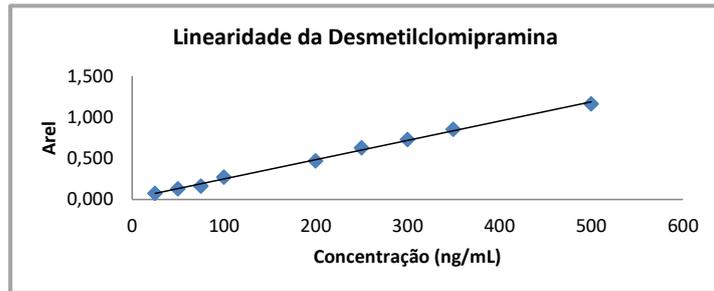
Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel
25	601987	8372147	0,072
50	1188143	9201353	0,129
75	1613009	9904673	0,163
100	2183420	8103575	0,269
200	4431264	9457653	0,469
250	4895297	7787791	0,629
300	5923980	8122443	0,729
350	7048136	8271151	0,852
400	7788812	9284476	0,839
500	10251001	8821058	1,162

Conc. (ng/mL)	Arel
25	0,072
50	0,129
75	0,163
100	0,269
200	0,469
250	0,629
300	0,729
350	0,852
500	1,162

Desprezando o ponto de calibração a 400 ng/mL

Considerando um modelo de regressão linear ponderada
w=1/x

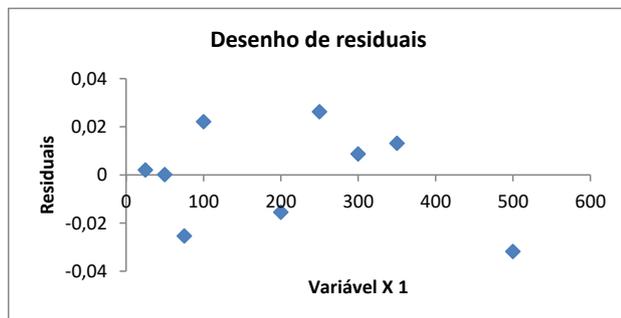
Estatística de regressão	
R	0,99826604
Quadrado de R	0,996535087
Erro-padrão	0,021793502
Observações	9



	Coefficientes	Erro-padrão	95% inferior	95% superior
Ordenada na origem	0,010679731	0,009999408	-0,012965112	0,034324574
Declive	0,002366435	7,07911E-05	0,00219904	0,002533829

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
25	0,069840597	0,002062945
50	0,129001463	0,000125509
75	0,188162329	-0,025309005
100	0,247323195	0,022115873
200	0,483966658	-0,015429278
250	0,60228839	0,026297699
300	0,720610122	0,008724676
350	0,838931853	0,013203033
500	1,193897049	-0,031791451



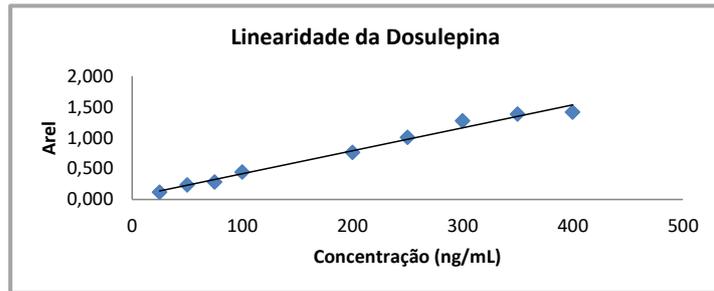
Estudo Linearidade da Dosulepina

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel
25	987533	8372147	0,118
50	2182311	9201353	0,237
75	2806497	9904673	0,283
100	3588168	8103575	0,443
200	7196398	9457653	0,761
250	7819710	7787791	1,004
300	10339142	8122443	1,273
350	11458084	8271151	1,385
400	13144643	9284476	1,416
500	16748405	8821058	1,899

Conc. (ng/mL)	Arel
25	0,118
50	0,237
75	0,283
100	0,443
200	0,761
250	1,004
300	1,273
350	1,385
400	1,416
500	1,899

Considerando um modelo de regressão linear ponderada
w=1/x

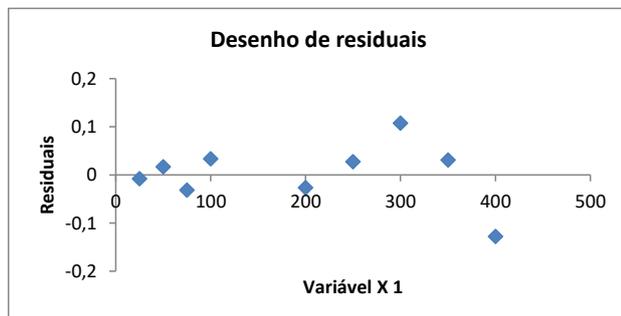
Estatística de regressão	
R	0,996676239
Quadrado de R	0,993363525
Erro-padrão	0,06448218
Observações	10



	Coefficientes	Erro-padrão	95% inferior	95% superior
Ordenada na origem	0,031256959	0,027041836	-0,031101628	0,093615545
Declive	0,003780609	0,000182984	0,003358647	0,004202572

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
25	0,125772186	-0,007817612
50	0,220287413	0,016885403
75	0,31480264	-0,031451869
100	0,409317867	0,033470411
200	0,787378776	-0,026471395
250	0,97640923	0,027689429
300	1,165439684	0,107470755
350	1,354470138	0,030836932
400	1,543500593	-0,127734919
500	1,921561501	-0,022877136



Estudo Linearidade da Desmetildosulepina

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel
25	591462	8372147	0,071
50	1244851	9201353	0,135
75	1735857	9904673	0,175
100	2025670	8103575	0,250
200	4439344	9457653	0,469
250	4714234	7787791	0,605
300	5826799	8122443	0,717
350	6919624	8271151	0,837
400	8003362	9284476	0,862
500	10942425	8821058	1,240

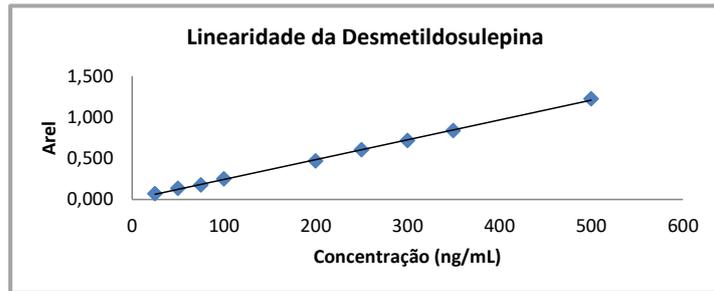
Conc. (ng/mL)	Arel
25	0,071
50	0,135
75	0,175
100	0,250
200	0,469
250	0,605
300	0,717
350	0,837
500	1,223

Desprezando o ponto de calibração a 400 ng/mL

Considerando um modelo de regressão linear ponderada

$w=1/x$

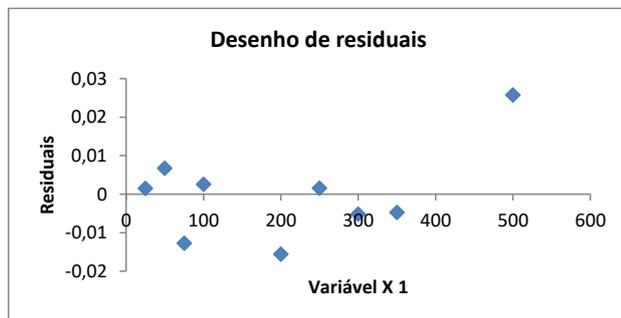
Estatística de regressão	
R	0,999498728
Quadrado de R	0,998997708
Erro-padrão	0,012944355
Observações	9



	Coefficientes	Erro-padrão	95% inferior	95% superior
Ordenada na origem	0,009764646	0,005939196	-0,004279322	0,023808614
Declive	0,002375926	4,20467E-05	0,002276501	0,002475351

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
25	0,069162798	0,001483587
50	0,128560951	0,006728995
75	0,187959103	-0,012702785
100	0,247357255	0,002615109
200	0,484949864	-0,015558202
250	0,603746169	0,001590336
300	0,722542474	-0,00517218
350	0,841338778	-0,00474133
500	1,197727692	0,025756473



Estudo Linearidade da Duloxetina

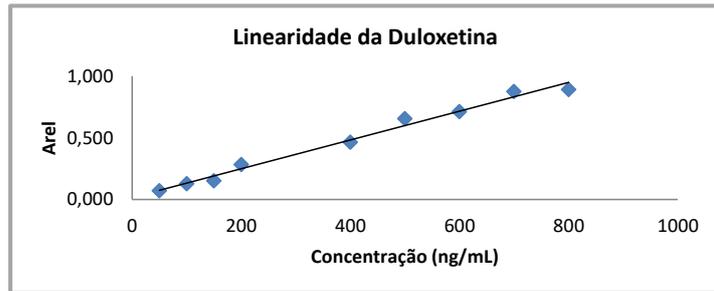
Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel
50	595241	8372147	0,071
100	1179695	9201353	0,128
150	1488903	9904673	0,150
200	2294440	8103575	0,283
400	4385003	9457653	0,464
500	5091253	7787791	0,654
600	5774696	8122443	0,711
700	7232960	8271151	0,874
800	8270395	9284476	0,891
1000	11057988	8821058	1,254

Conc. (ng/mL)	Arel
50	0,071
100	0,128
150	0,150
200	0,283
400	0,464
500	0,654
600	0,711
700	0,874
800	0,891
1000	1,254

Considerando um modelo de regressão linear ponderada

w=1/x

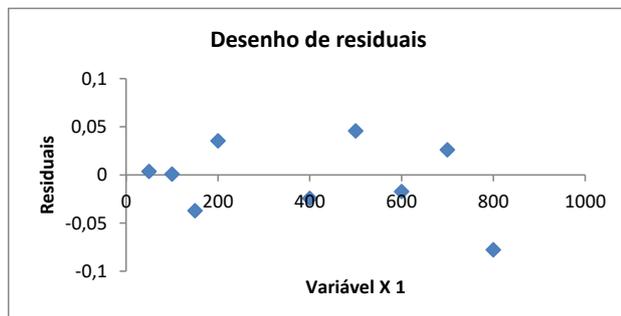
Estatística de regressão	
R	0,995630806
Quadrado de R	0,991280701
Erro-padrão	0,042372255
Observações	10



	Coefficientes	Erro-padrão	95% inferior	95% superior
Ordenada na origem	0,007239714	0,017769616	-0,033737095	0,048216522
Declive	0,001201682	6,01209E-05	0,001063043	0,001340321

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
50	0,067323807	0,003773932
100	0,1274079	0,000801
150	0,187491994	-0,037168736
200	0,247576087	0,035563106
400	0,487912461	-0,024266505
500	0,608080648	0,045667353
600	0,728248834	-0,0172932
700	0,848417021	0,026063412
800	0,968585208	-0,077808494
1000	1,208921582	0,044668132



Estudo Linearidade da Fluoxetina

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel
50	562623	8372147	0,067
100	1172397	9201353	0,127
150	1497712	9904673	0,151
200	1830438	8103575	0,226
400	3918938	9457653	0,414
500	4145840	7787791	0,532
600	5316637	8122443	0,655
700	6266598	8271151	0,758
800	6970827	9284476	0,751
1000	8983961	8821058	1,018

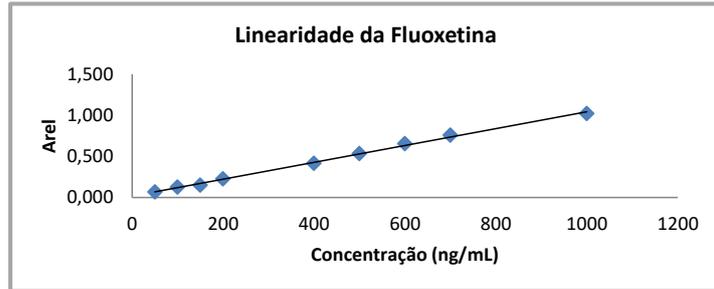
Conc. (ng/mL)	Arel
50	0,067
100	0,127
150	0,151
200	0,226
400	0,414
500	0,532
600	0,655
700	0,758
800	0,751
1000	1,018

Desprezando o ponto de calibração a 800 ng/mL

Considerando um modelo de regressão linear ponderada

$w=1/x$

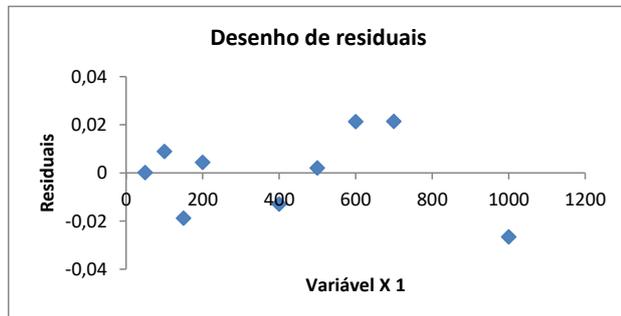
Estatística de regressão	
R	0,998694262
Quadrado de R	0,997390228
Erro-padrão	0,017904457
Observações	9



	Coefficientes	Erro-padrão	95% inferior	95% superior
Ordenada na origem	0,015584213	0,008215016	-0,003841214	0,035009639
Declive	0,001029417	2,90792E-05	0,000960656	0,001098179

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
50	0,067055084	0,000146617
100	0,118525956	0,008889713
150	0,169996827	-0,018784201
200	0,221467699	0,004412534
400	0,427351185	-0,012984293
500	0,530292928	0,002058308
600	0,633234671	0,021326623
700	0,736176414	0,021468807
1000	1,045001642	-0,026534107



Estudo Linearidade da Desmetilfluoxetina

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel
50	421327	8372147	0,050
100	893629	9201353	0,097
150	1102640	9904673	0,111
200	1527710	8103575	0,189
400	2847659	9457653	0,301
500	3139949	7787791	0,403
600	3866271	8122443	0,476
700	4505572	8271151	0,545
800	5172265	9284476	0,557
1000	6630380	8821058	0,752

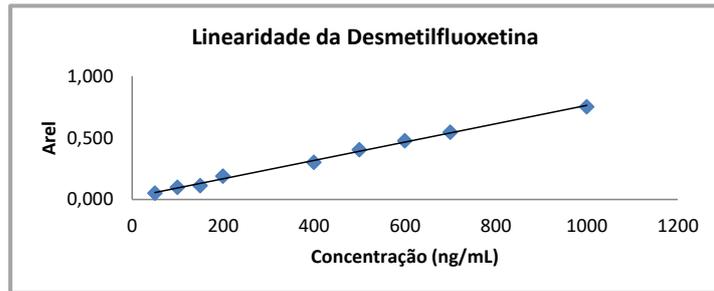
Conc. (ng/mL)	Arel
50	0,050
100	0,097
150	0,111
200	0,189
400	0,301
500	0,403
600	0,476
700	0,545
800	0,557
1000	0,752

Desprezando o ponto de calibração a 800 ng/mL

Considerando um modelo de regressão linear ponderada

$w=1/x$

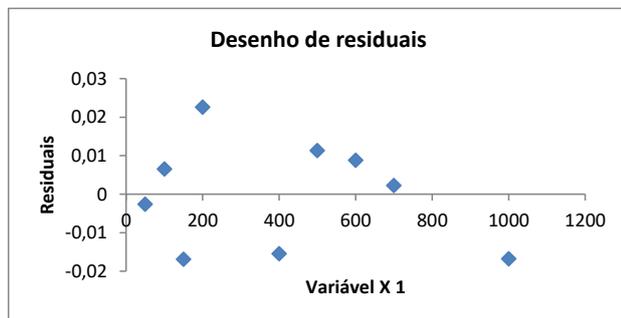
Estatística de regressão	
R	0,997351399
Quadrado de R	0,994709813
Erro-padrão	0,015020095
Observações	9



	Coefficientes	Erro-padrão	95% inferior	95% superior
Ordenada na origem	0,015242307	0,006891598	-0,001053733	0,031538347
Declive	0,000753184	2,43946E-05	0,0006955	0,000810868

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
50	0,052901515	-0,002576621
100	0,090560724	0,006558522
150	0,128219932	-0,016894711
200	0,16587914	0,022643805
400	0,316515974	-0,015420204
500	0,39183439	0,011354219
600	0,467152807	0,008845725
700	0,542471224	0,002262193
1000	0,768426474	-0,016772928



Estudo Linearidade da Fluvoxamina

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel
50	586329	8372147	0,070
100	1252303	9201353	0,136
150	1650156	9904673	0,167
200	2340855	8103575	0,289
400	4350345	9457653	0,460
500	4784309	7787791	0,614
600	5925117	8122443	0,729
700	7126963	8271151	0,862
800	8155615	9284476	0,878
1000	10645426	8821058	1,207

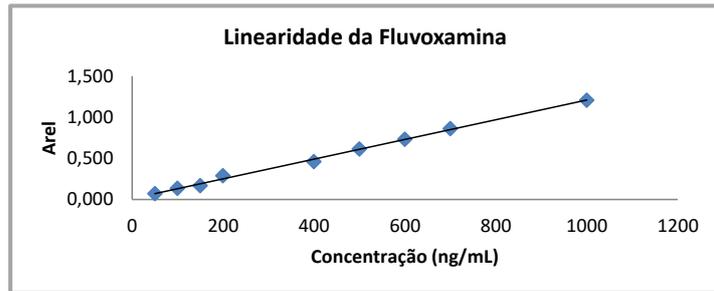
Conc. (ng/mL)	Arel
50	0,070
100	0,136
150	0,167
200	0,289
400	0,460
500	0,614
600	0,729
700	0,862
800	0,878
1000	1,207

Desprezando o ponto de calibração a 800 ng/mL

Considerando um modelo de regressão linear ponderada

$w=1/x$

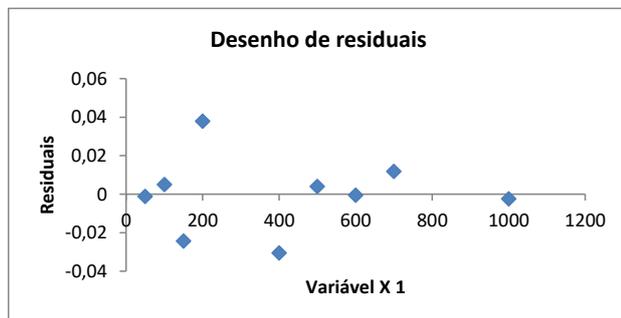
Estatística de regressão	
R	0,997669341
Quadrado de R	0,995344114
Erro-padrão	0,021231997
Observações	9



	Coefficientes	Erro-padrão	95% inferior	95% superior
Ordenada na origem	0,01129783	0,009741776	-0,011737808	0,034333469
Declive	0,001197892	3,44836E-05	0,001116351	0,001279432

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
50	0,071192411	-0,001159106
100	0,131086992	0,005012834
150	0,190981573	-0,024377787
200	0,250876154	0,037990832
400	0,490454477	-0,030473046
500	0,610243638	0,004090887
600	0,7300328	-0,000558033
700	0,849821962	0,011843254
1000	1,209189447	-0,002369836



Estudo Linearidade da Imipramina

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel
50	3602793	8372147	0,430
100	8152712	9201353	0,886
150	10508272	9904673	1,061
200	14028327	8103575	1,731
400	26835356	9457653	2,837
500	28483994	7787791	3,658
600	37694152	8122443	4,641
700	43086702	8271151	5,209
800	48113002	9284476	5,182
1000	62944011	8821058	7,136

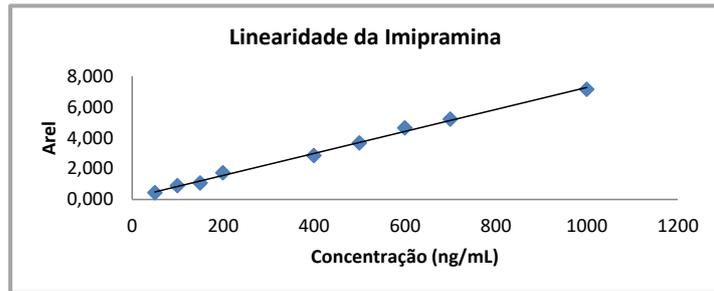
Conc. (ng/mL)	Arel
50	0,430
100	0,886
150	1,061
200	1,731
400	2,837
500	3,658
600	4,641
700	5,209
1000	7,136

Desprezando o ponto de calibração a 800 ng/mL

Considerando um modelo de regressão linear ponderada

$w=1/x$

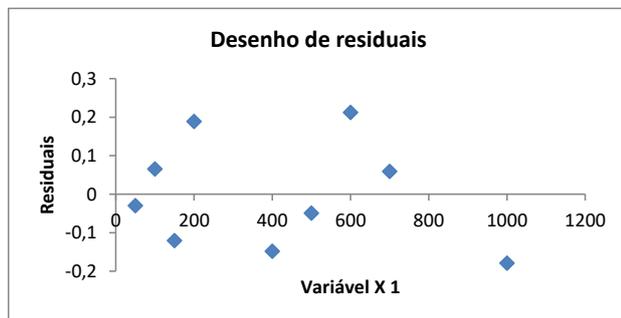
Estatística de regressão	
R	0,997676009
Quadrado de R	0,995357419
Erro-padrão	0,151340085
Observações	9



	Coefficientes	Erro-padrão	95% inferior	95% superior
Ordenada na origem	0,098966723	0,069438646	-0,065229583	0,26316303
Declive	0,007215769	0,000245796	0,006634553	0,007796985

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
50	0,459755155	-0,029424317
100	0,820543586	0,065490462
150	1,181332017	-0,120391146
200	1,542120449	0,189007629
400	2,985274174	-0,147851956
500	3,706851036	-0,049331786
600	4,428427899	0,212312946
700	5,150004761	0,059270414
1000	7,314735349	-0,179082246



Estudo Linearidade da Maprotilina

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel
50	4424799	8372147	0,529
100	10034880	9201353	1,091
150	11673647	9904673	1,179
200	16162747	8103575	1,995
400	28497509	9457653	3,013
500	32491594	7787791	4,172
600	39313411	8122443	4,840
700	44792432	8271151	5,416
800	54086409	9284476	5,825
1000	65624522	8821058	7,440

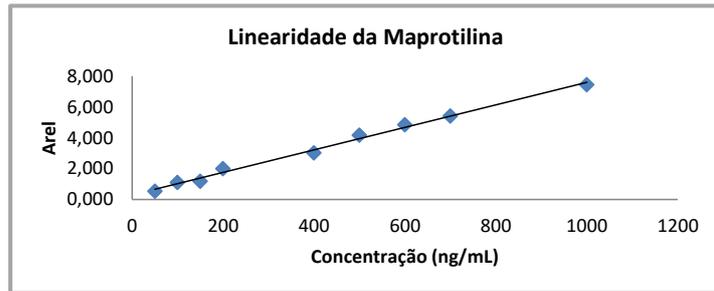
Conc. (ng/mL)	Arel
50	0,529
100	1,091
150	1,179
200	1,995
400	3,013
500	4,172
600	4,840
700	5,416
800	5,825
1000	7,440

Desprezando o ponto de calibração a 800 ng/mL

Considerando um modelo de regressão linear ponderada

$w=1/x$

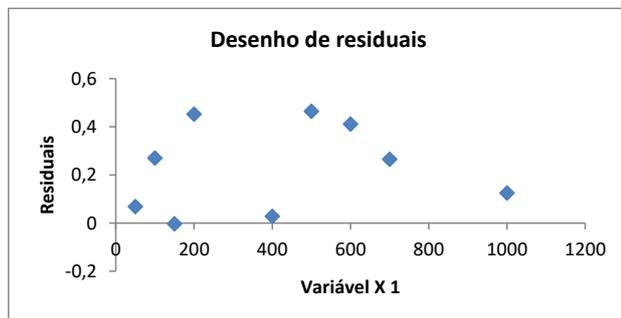
Estatística de regressão	
R	0,995373243
Quadrado de R	0,990767892
Erro-padrão	0,205695877
Observações	9



	Coefficientes	Erro-padrão	95% inferior	95% superior
Ordenada na origem	0,220280364	0,094378454	-0,002889216	0,443449944
Declive	0,007483815	0,000334077	0,006693848	0,008273782

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
50	0,459755155	0,068759139
100	0,820543586	0,270043827
150	1,181332017	-0,002732025
200	1,542120449	0,452399995
400	2,985274174	0,027894907
500	3,706851036	0,465268484
600	4,428427899	0,411669145
700	5,150004761	0,265496837
1000	7,314735349	0,124794201



Foi retirado um ponto devido à inclusão do valor zero naintersecção da curva com o eixo das ordenadas

Estudo Linearidade da Mianserina

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel
25	1175565	8372147	0,140
50	2584207	9201353	0,281
75	3461826	9904673	0,350
100	4250684	8103575	0,525
200	8687407	9457653	0,919
250	10185437	7787791	1,308
300	12855517	8122443	1,583
350	14819595	8271151	1,792
400	16533583	9284476	1,781
500	21990087	8821058	2,493

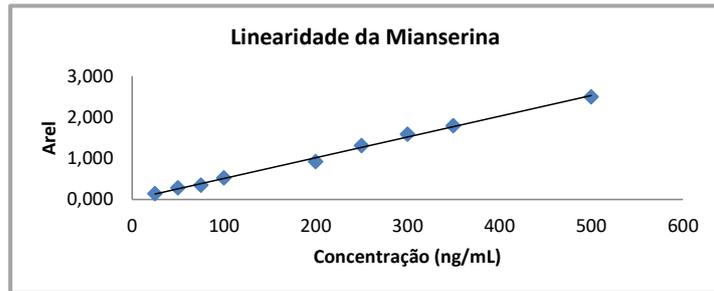
Conc. (ng/mL)	Arel
25	0,140
50	0,281
75	0,350
100	0,525
200	0,919
250	1,308
300	1,583
350	1,792
500	2,493

Desprezando o ponto de calibração a 400 ng/mL

Considerando um modelo de regressão linear ponderada

$w=1/x$

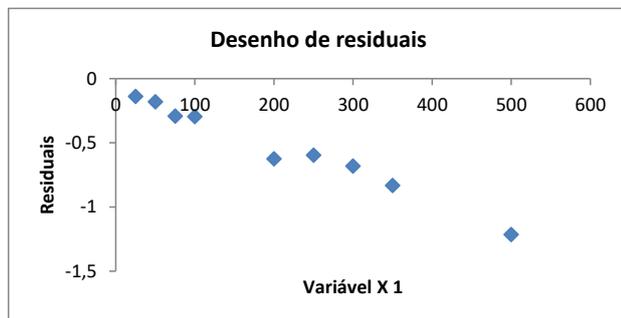
Estatística de regressão	
R	0,998116038
Quadrado de R	0,996235626
Erro-padrão	0,051668002
Observações	9



	Coefficientes	Erro-padrão	95% inferior	95% superior
Ordenada na origem	0,011764606	0,023706582	-0,044292552	0,067821764
Declive	0,005017955	0,000167831	0,004621097	0,005414813

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
25	0,279360939	-0,138947155
50	0,459755155	-0,178904416
75	0,64014937	-0,29063491
100	0,820543586	-0,295999346
200	1,542120449	-0,623562047
250	1,90290888	-0,595036379
300	2,263697311	-0,680981671
350	2,624485742	-0,832764793
500	3,706851036	-1,213942912



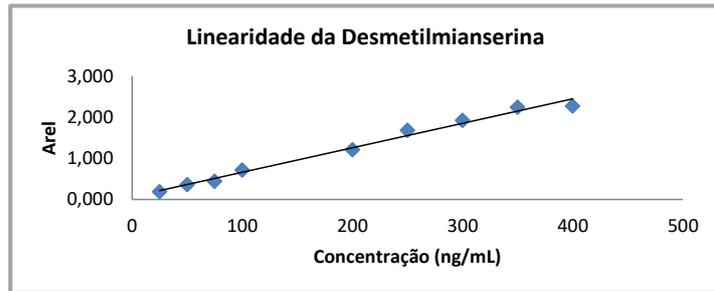
Estudo Linearidade da Desmetilmianserina

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel
25	1582031	8372147	0,189
50	3275563	9201353	0,356
75	4394338	9904673	0,444
100	5751295	8103575	0,710
200	11449411	9457653	1,211
250	13104534	7787791	1,683
300	15585964	8122443	1,919
350	18515298	8271151	2,239
400	21051595	9284476	2,267
500	26158522	8821058	2,965

Conc. (ng/mL)	Arel
25	0,189
50	0,356
75	0,444
100	0,710
200	1,211
250	1,683
300	1,919
350	2,239
400	2,267
500	2,965

Considerando um modelo de regressão linear ponderada
w=1/x

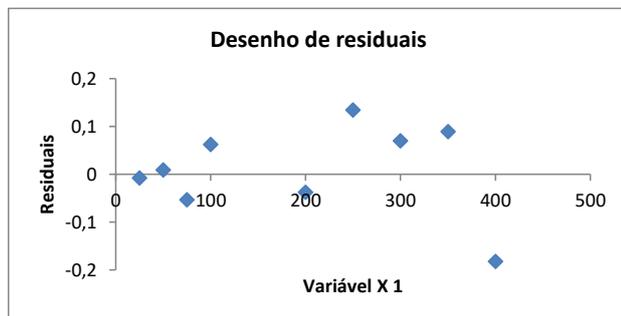
Estatística de regressão	
R	0,996801495
Quadrado de R	0,99361322
Erro-padrão	0,0997504
Observações	10



	Coefficientes	Erro-padrão	95% inferior	95% superior
Ordenada na origem	0,046509338	0,04183224	-0,049955981	0,142974656
Declive	0,006007475	0,000283067	0,005354723	0,006660228

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
25	0,196696221	-0,007732654
50	0,346883104	0,009104016
75	0,497069988	-0,053406866
100	0,647256871	0,062466284
200	1,248004404	-0,037406961
250	1,548378171	0,134324255
300	1,848751938	0,070124462
350	2,149125704	0,089413778
400	2,449499471	-0,182102329
500	3,050247004	-0,084783983



Estudo Linearidade da Mirtazapina

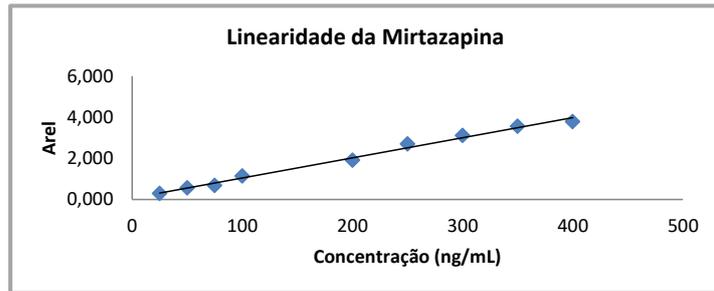
Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel
25	2434473	8372147	0,291
50	5185370	9201353	0,564
75	6719696	9904673	0,678
100	9210016	8103575	1,137
200	18003082	9457653	1,904
250	21018534	7787791	2,699
300	25281860	8122443	3,113
350	29421541	8271151	3,557
400	35154948	9284476	3,786
500	43824093	8821058	4,968

Conc. (ng/mL)	Arel
25	0,291
50	0,564
75	0,678
100	1,137
200	1,904
250	2,699
300	3,113
350	3,557
400	3,786
500	4,968

Considerando um modelo de regressão linear ponderada

$w=1/x$

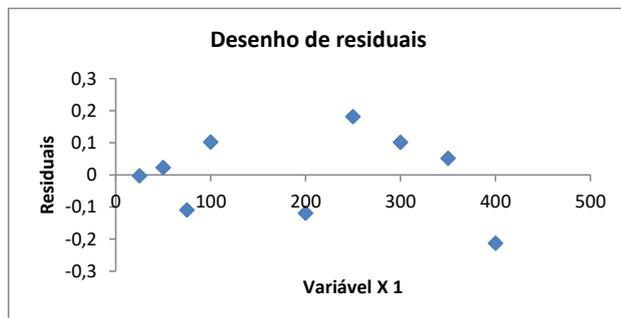
Estatística de regressão	
R	0,997475599
Quadrado de R	0,994957571
Erro-padrão	0,126925026
Observações	10



	Coefficientes	Erro-padrão	95% inferior	95% superior
Ordenada na origem	0,046029394	0,053228439	-0,076715607	0,168774396
Declive	0,009882545	0,000360181	0,009051966	0,010713125

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
25	0,293093028	-0,002310653
50	0,540156662	0,023387556
75	0,787220295	-0,108783333
100	1,034283929	0,102253395
200	2,022538464	-0,118992095
250	2,516665731	0,182242728
300	3,010792999	0,101800261
350	3,504920266	0,052207411
400	3,999047533	-0,212625258
500	4,987302068	-0,019180012



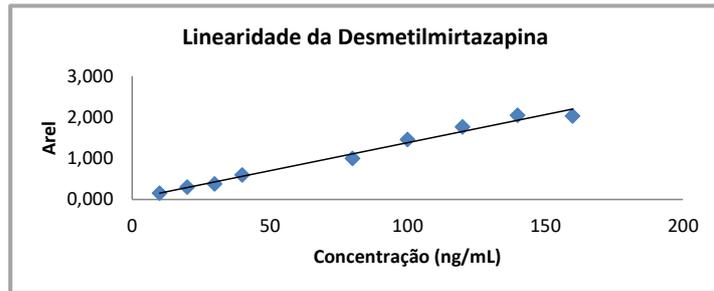
Estudo Linearidade da Desmetilmirtazapina

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel
10	1270749	8372147	0,152
20	2770878	9201353	0,301
30	3707104	9904673	0,374
40	4820320	8103575	0,595
80	9421928	9457653	0,996
100	11348147	7787791	1,457
120	14303023	8122443	1,761
140	16904184	8271151	2,044
160	18810620	9284476	2,026
200	23528320	8821058	2,667

Conc. (ng/mL)	Arel
10	0,152
20	0,301
30	0,374
40	0,595
80	0,996
100	1,457
120	1,761
140	2,044
160	2,026
200	2,667

Considerando um modelo de regressão linear ponderada
w=1/x

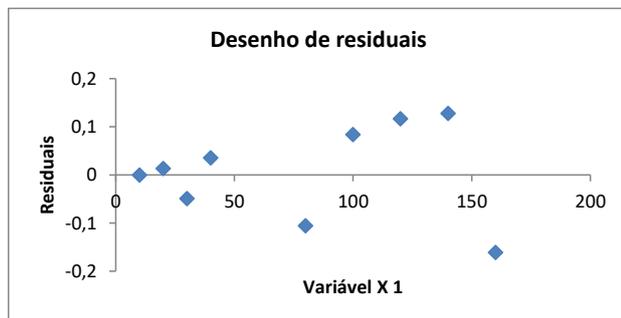
Estatística de regressão	
R	0,996078315
Quadrado de R	0,99217201
Erro-padrão	0,101165508
Observações	10



	Coefficientes	Erro-padrão	95% inferior	95% superior
Ordenada na origem	0,01635929	0,042425692	-0,081474532	0,114193112
Declive	0,013566485	0,000717706	0,011911453	0,015221518

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
10	0,152024143	-0,000241268
20	0,287688997	0,013449051
30	0,42335385	-0,049075564
40	0,559018703	0,035819916
80	1,101678117	-0,105455555
100	1,373007823	0,084163657
120	1,64433753	0,116588786
140	1,915667237	0,128085005
160	2,186996943	-0,160967699
200	2,729656356	-0,062366329



Estudo Linearidade da Nortriptilina

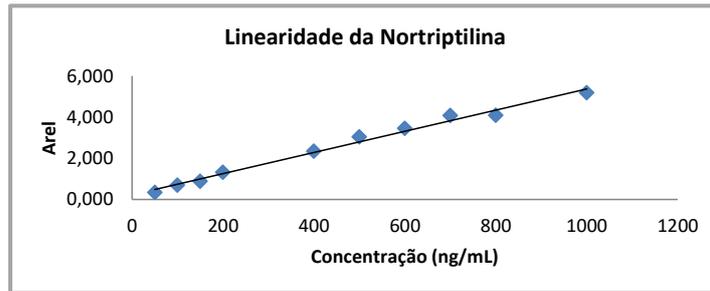
Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel
50	2797039	8372147	0,334
100	6361545	9201353	0,691
150	8687416	9904673	0,877
200	10655146	8103575	1,315
400	22233018	9457653	2,351
500	23704702	7787791	3,044
600	28039329	8122443	3,452
700	33728500	8271151	4,078
800	37972887	9284476	4,090
1000	45743845	8821058	5,186

Conc. (ng/mL)	Arel
50	0,334
100	0,691
150	0,877
200	1,315
400	2,351
500	3,044
600	3,452
700	4,078
800	4,090
1000	5,186

Considerando um modelo de regressão linear ponderada

w=1/x

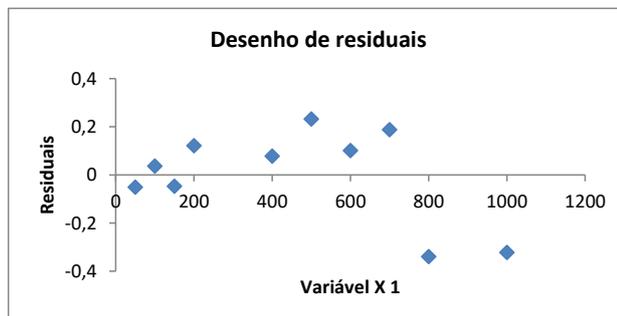
Estatística de regressão	
R	0,996046552
Quadrado de R	0,992108733
Erro-padrão	0,207737614
Observações	10



	Coefficientes	Erro-padrão	95% inferior	95% superior
Ordenada na origem	0,115236635	0,087118745	-0,085659552	0,316132822
Declive	0,005392291	0,000294754	0,004712588	0,006071994

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
50	0,384851168	-0,050762517
100	0,654465701	0,036904864
150	0,924080235	-0,046977448
200	1,193694768	0,121174975
400	2,272152901	0,078643549
500	2,811381968	0,232446817
600	3,350611034	0,101469828
700	3,889840101	0,188008314
800	4,429069168	-0,339135995
1000	5,507527301	-0,321772385



Estudo Linearidade da Paroxetina

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel
50	698912	8372147	0,083
100	1597496	9201353	0,174
150	1953587	9904673	0,197
200	2601306	8103575	0,321
400	5165350	9457653	0,546
500	5428897	7787791	0,697
600	6897701	8122443	0,849
700	8066030	8271151	0,975
800	8802203	9284476	0,948
1000	12075144	8821058	1,369

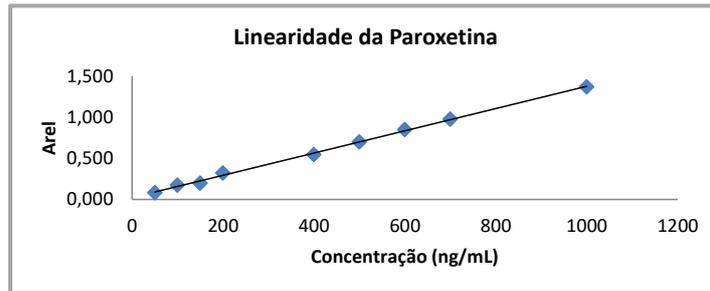
Conc. (ng/mL)	Arel
50	0,083
100	0,174
150	0,197
200	0,321
400	0,546
500	0,697
600	0,849
700	0,975
800	0,948
1000	1,369

Desprezando o ponto de calibração a 800 ng/mL

Considerando um modelo de regressão linear ponderada

w=1/x

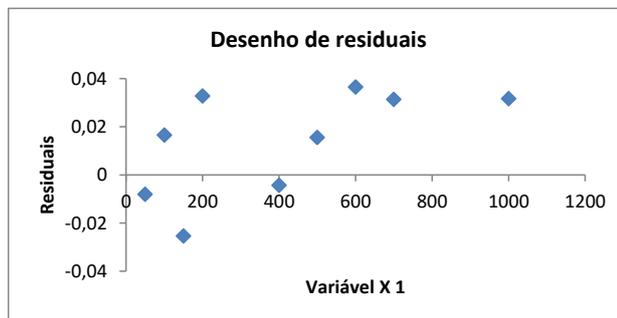
Estatística de regressão	
R	0,998224314
Quadrado de R	0,996451781
Erro-padrão	0,028392062
Observações	9



	Coefficientes	Erro-padrão	95% inferior	95% superior
Ordenada na origem	0,020623591	0,013026994	-0,010180354	0,051427536
Declive	0,001358461	4,61125E-05	0,001249422	0,001467499

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
50	0,09147746	-0,007996804
100	0,157042431	0,016572931
150	0,222607402	-0,025368521
200	0,288172373	0,032834771
400	0,550432258	-0,004276733
500	0,6815622	0,015541357
600	0,812692142	0,036522996
700	0,943822085	0,031378356
1000	1,337211912	0,031687767



Estudo Linearidade da Reboxetina

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel
50	4004801	8372147	0,478
100	8201500	9201353	0,891
150	11299037	9904673	1,141
200	14086450	8103575	1,738
400	29085755	9457653	3,075
500	31447119	7787791	4,038
600	40111893	8122443	4,938
700	47305963	8271151	5,719
800	52572395	9284476	5,662
1000	67288917	8821058	7,628

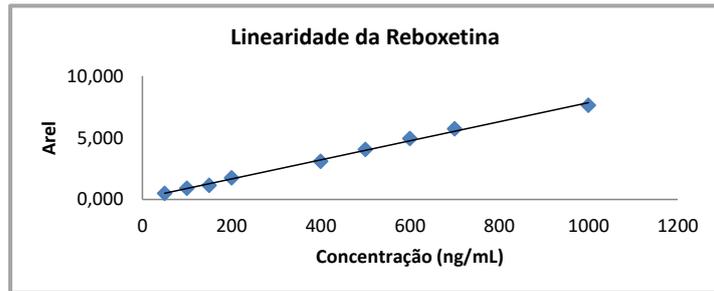
Conc. (ng/mL)	Arel
50	0,478
100	0,891
150	1,141
200	1,738
400	3,075
500	4,038
600	4,938
700	5,719
1000	7,628

Desprezando o ponto de calibração a 800 ng/mL

Considerando um modelo de regressão linear ponderada

w=1/x

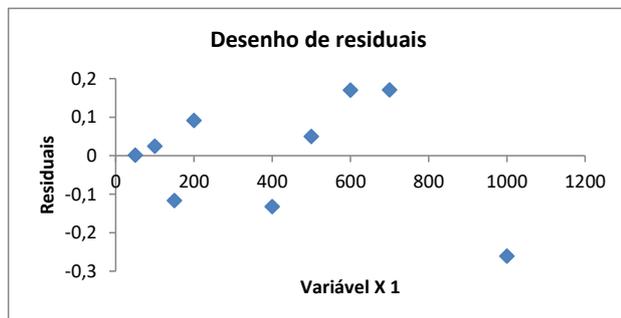
Estatística de regressão	
R	0,998647675
Quadrado de R	0,997297179
Erro-padrão	0,155268605
Observações	9



	Coefficientes	Erro-padrão	95% inferior	95% superior
Ordenada na origem	0,086492125	0,07124115	-0,081966426	0,254950676
Declive	0,007802625	0,000252177	0,007206322	0,008398929

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
50	0,476623383	0,001724721
100	0,866754642	0,024581583
150	1,2568859	-0,1161075
200	1,647017158	0,091283432
400	3,207542191	-0,132175197
500	3,987804707	0,050197868
600	4,768067224	0,170335481
700	5,54832974	0,171063139
1000	7,889117289	-0,260903527



Estudo Linearidade da Sertralina

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel
50	684725	8372147	0,082
100	1660360	9201353	0,180
150	2233066	9904673	0,225
200	2923123	8103575	0,361
400	5729604	9457653	0,606
500	6570368	7787791	0,844
600	8019718	8122443	0,987
700	9518733	8271151	1,151
800	11141520	9284476	1,200
1000	16207405	8821058	1,837

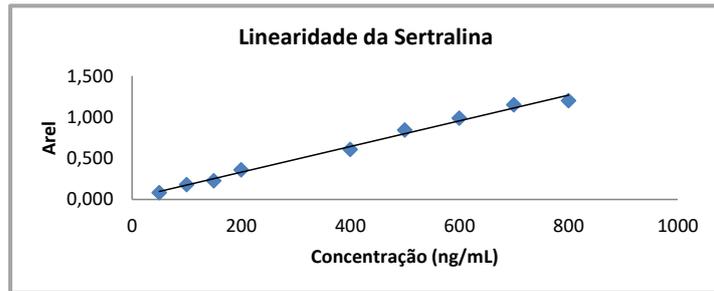
Conc. (ng/mL)	Arel
50	0,082
100	0,180
150	0,225
200	0,361
400	0,606
500	0,844
600	0,987
700	1,151
800	1,200

Desprezando o ponto de calibração a 1000 ng/mL

Considerando um modelo de regressão linear ponderada

$w=1/x$

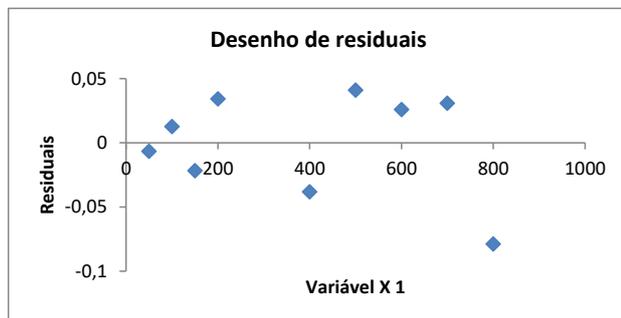
Estatística de regressão	
R	0,997009049
Quadrado de R	0,994027044
Erro-padrão	0,042782044
Observações	9



	Coefficientes	Erro-padrão	95% inferior	95% superior
Ordenada na origem	0,008971517	0,020151356	-0,038678868	0,056621901
Declive	0,001587246	7,33407E-05	0,001413823	0,00176067

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
50	0,088333835	-0,006547774
100	0,167696154	0,01275117
150	0,247058473	-0,021602658
200	0,326420791	0,034299391
400	0,643870066	-0,038053389
500	0,802594704	0,041080821
600	0,961319341	0,026033688
700	1,120043978	0,030791387
800	1,278768616	-0,078752636



Estudo Linearidade da Desmetilsertralina

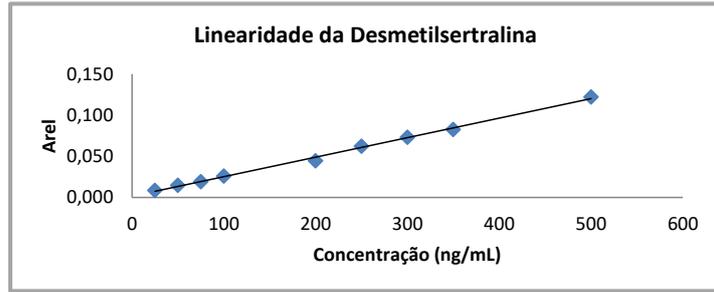
Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel
25	71146	8372147	0,008
50	135405	9201353	0,015
75	189034	9904673	0,019
100	210790	8103575	0,026
200	420220	9457653	0,044
250	484657	7787791	0,062
300	594199	8122443	0,073
350	683192	8271151	0,083
400	752932	9284476	0,081
500	1077191	8821058	0,122

Conc. (ng/mL)	Arel
25	0,008
50	0,015
75	0,019
100	0,026
200	0,044
250	0,062
300	0,073
350	0,083
500	0,122

Desprezando o ponto de calibração a 400 ng/mL

Considerando um modelo de regressão linear ponderada
w=1/x

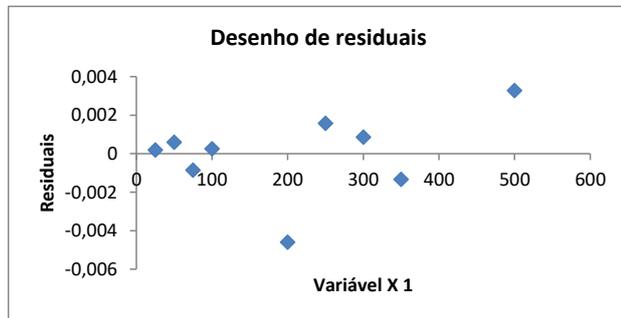
Estatística de regressão	
R	0,998558095
Quadrado de R	0,997118269
Erro-padrão	0,002331132
Observações	9



	Coefficientes	Erro-padrão	95% inferior	95% superior
Ordenada na origem	0,002484293	0,001069582	-4,48665E-05	0,005013453
Declive	0,000232696	7,57213E-06	0,000214791	0,000250601

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
25	0,00830169	0,000196214
50	0,014119086	0,000596716
75	0,019936483	-0,000851148
100	0,025753879	0,000258058
200	0,049023466	-0,004591757
250	0,060658259	0,001574628
300	0,072293052	0,000862121
350	0,083927845	-0,001328423
500	0,118832225	0,00328359



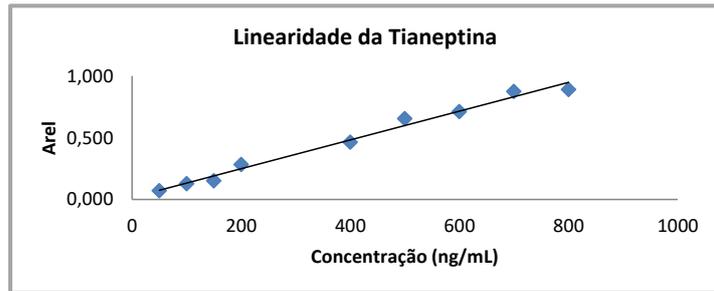
Estudo Linearidade da Tianeptina

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel
50	595241	8372147	0,071
100	1179695	9201353	0,128
150	1488903	9904673	0,150
200	2294440	8103575	0,283
400	4385003	9457653	0,464
500	5091253	7787791	0,654
600	5774696	8122443	0,711
700	7232960	8271151	0,874
800	8270395	9284476	0,891
1000	11057988	8821058	1,254

Conc. (ng/mL)	Arel
50	0,071
100	0,128
150	0,150
200	0,283
400	0,464
500	0,654
600	0,711
700	0,874
800	0,891
1000	1,254

Considerando um modelo de regressão linear ponderada
w=1/x

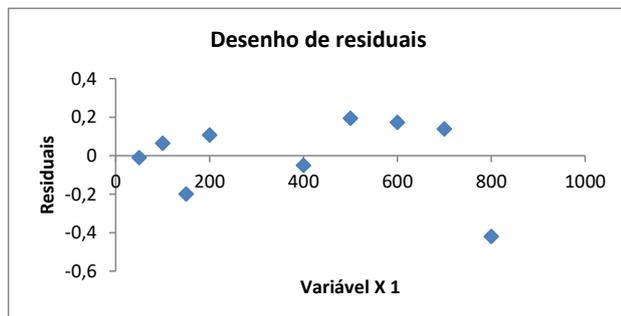
Estatística de regressão	
R	0,997339282
Quadrado de R	0,994685643
Erro-padrão	0,213957508
Observações	9



	Coefficientes	Erro-padrão	95% inferior	95% superior
Ordenada na origem	0,060936984	0,098169098	-0,171196046	0,293070014
Declive	0,007920734	0,000347495	0,007099038	0,00874243

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
50	0,456973668	-0,009228336
100	0,853010352	0,064323548
150	1,249047036	-0,199072857
200	1,645083721	0,107779442
400	3,229230457	-0,050337254
500	4,021303826	0,194404424
600	4,813377194	0,17265564
700	5,605450563	0,138567123
1000	7,981670668	-0,41909173
1000	1,208921582	0,044668132



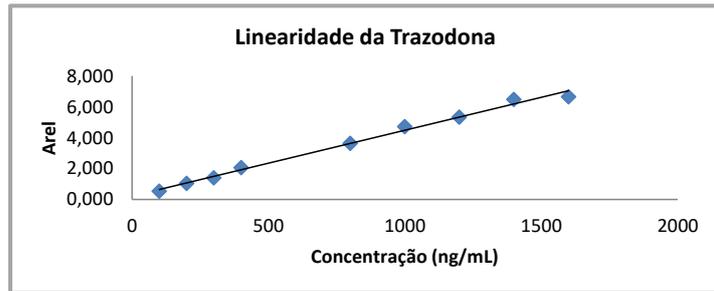
Estudo Linearidade da Trazodona

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel
100	4449280	8372147	0,531
200	9522905	9201353	1,035
300	13879258	9904673	1,401
400	16657046	8103575	2,056
800	34362828	9457653	3,633
1000	36740628	7787791	4,718
1200	43308402	8122443	5,332
1400	53618723	8271151	6,483
1600	61759237	9284476	6,652
2000	74323419	8821058	8,426

Conc. (ng/mL)	Arel
100	0,531
200	1,035
300	1,401
400	2,056
800	3,633
1000	4,718
1200	5,332
1400	6,483
1600	6,652
2000	8,426

Considerando um modelo de regressão linear ponderada
w=1/x

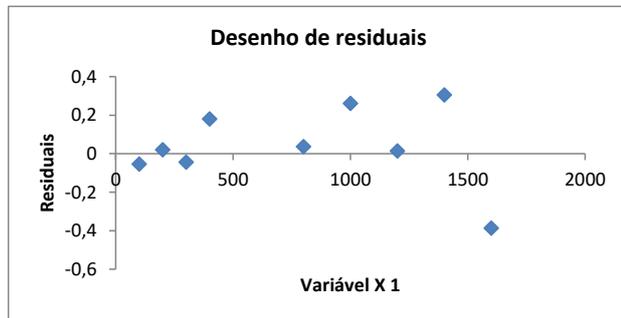
Estatística de regressão	
R	0,99787891
Quadrado de R	0,99576232
Erro-padrão	0,239989058
Observações	10



	Coefficientes	Erro-padrão	95% inferior	95% superior
Ordenada na origem	0,154445645	0,100644006	-0,077639848	0,386531139
Declive	0,004302435	0,000170257	0,003909821	0,004695048

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
100	0,58468911	-0,053250764
200	1,014932575	0,020013534
300	1,445176041	-0,043892188
400	1,875419506	0,18009863
800	3,596393366	0,036942221
1000	4,456880296	0,260841304
1200	5,317367226	0,014575799
1400	6,177854156	0,304765065
1600	7,038341086	-0,386459389
2000	8,759314947	-0,333634211



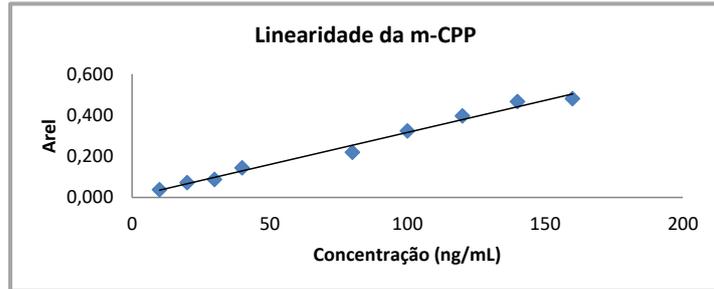
Estudo Linearidade da m-CPP

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel
10	310372	8372147	0,037
20	661360	9201353	0,072
30	858102	9904673	0,087
40	1162951	8103575	0,144
80	2074426	9457653	0,219
100	2514381	7787791	0,323
120	3219711	8122443	0,396
140	3849551	8271151	0,465
160	4453944	9284476	0,480
200	5701808	8821058	0,646

Conc. (ng/mL)	Arel
10	0,037
20	0,072
30	0,087
40	0,144
80	0,219
100	0,323
120	0,396
140	0,465
160	0,480
200	0,646

Considerando um modelo de regressão linear ponderada
w=1/x

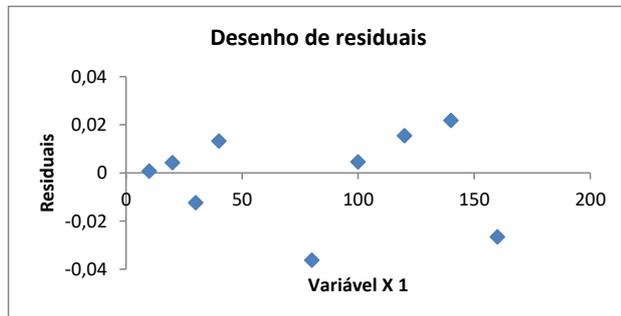
Estatística de regressão	
R	0,99624442
Quadrado de R	0,992502945
Erro-padrão	0,020374695
Observações	10



	Coefficientes	Erro-padrão	95% inferior	95% superior
Ordenada na origem	0,004948621	0,008544519	-0,014755074	0,024652316
Declive	0,003133034	0,000144546	0,002799711	0,003466357

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
10	0,03627896	0,00079299
20	0,067609299	0,00426703
30	0,098939638	-0,012303591
40	0,130269977	0,013240812
80	0,255591333	-0,036252979
100	0,31825201	0,004609953
120	0,380912688	0,015484186
140	0,443573366	0,021845613
160	0,506234044	-0,026514607
200	0,6315554	0,014830593



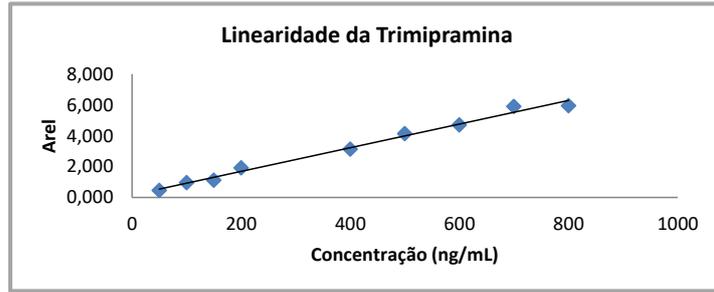
Estudo Linearidade da Trimipramina

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel
50	3823974	8372147	0,457
100	8750506	9201353	0,951
150	11089826	9904673	1,120
200	15546878	8103575	1,919
400	29626867	9457653	3,133
500	32195376	7787791	4,134
600	38218400	8122443	4,705
700	48794456	8271151	5,899
800	55125572	9284476	5,937
1000	69445193	8821058	7,873

Conc. (ng/mL)	Arel
50	0,457
100	0,951
150	1,120
200	1,919
400	3,133
500	4,134
600	4,705
700	5,899
800	5,937
1000	7,873

Considerando um modelo de regressão linear ponderada
w=1/x

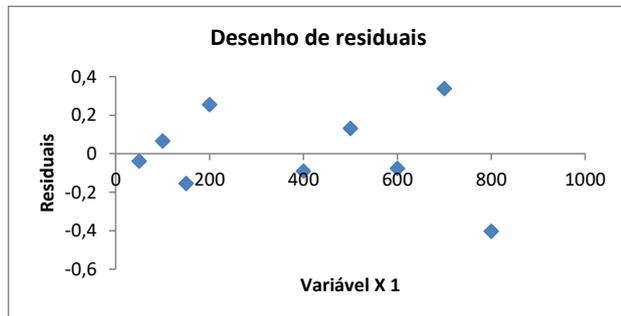
Estatística de regressão	
R	0,996835066
Quadrado de R	0,993680149
Erro-padrão	0,224609235
Observações	10



	Coefficientes	Erro-padrão	95% inferior	95% superior
Ordenada na origem	0,105257005	0,094194183	-0,111955169	0,32246918
Declive	0,007794381	0,000318692	0,007059475	0,008529287

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
50	0,494976047	-0,038226561
100	0,884695088	0,066306968
150	1,274414129	-0,154758174
200	1,664133171	0,254387684
400	3,223009336	-0,090428139
500	4,002447419	0,131635986
600	4,781885502	-0,076601524
700	5,561323585	0,338031379
800	6,340761668	-0,403369949
1000	7,899637833	-0,02697767



Estudo Linearidade da Desmetiltrimipamina

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel
25	3804945	8372147	0,454
50	7931346	9201353	0,862
75	9848223	9904673	0,994
100	13741241	8103575	1,696
200	25294482	9457653	2,674
250	27848204	7787791	3,576
300	33116273	8122443	4,077
350	39927697	8271151	4,827
400	45185946	9284476	4,867
500	59393040	8821058	6,733

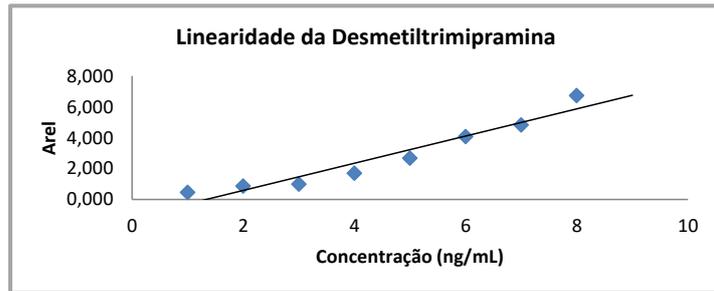
Conc. (ng/mL)	Arel
25	0,454
50	0,862
75	0,994
100	1,696
200	2,674
300	4,077
350	4,827
500	6,733

Desprezando o ponto de calibração a 250 e 400 ng/mL

Considerando um modelo de regressão linear ponderada

$w=1/x$

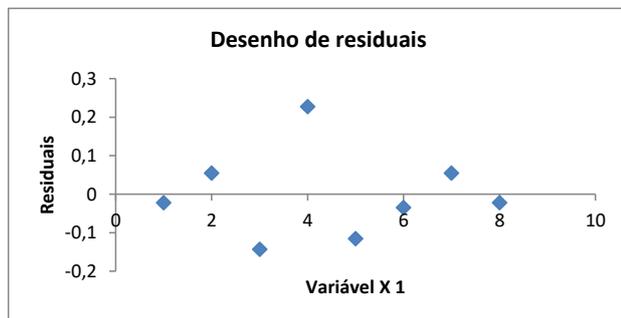
Estatística de regressão	
R	0,997105035
Quadrado de R	0,99421845
Erro-padrão	0,138576084
Observações	8



	Coefficientes	Erro-padrão	95% inferior	95% superior
Ordenada na origem	0,146165738	0,061637176	-0,004654997	0,296986474
Declive	0,013218251	0,000442381	0,012135783	0,014300718

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
25	0,476622004	-0,022145364
50	0,807078269	0,054897709
75	1,137534534	-0,143233864
100	1,4679908	0,22771015
200	2,789815861	-0,115317124
300	4,111640922	-0,034508632
350	4,772553452	0,054791184
500	6,755291044	-0,022194059



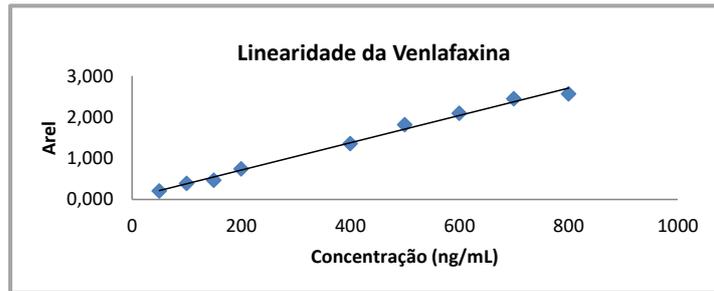
Estudo Linearidade da Venlafaxina

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel
50	1717230	8372147	0,205
100	3578042	9201353	0,389
150	4632774	9904673	0,468
200	5996969	8103575	0,740
400	12813352	9457653	1,355
500	14128651	7787791	1,814
600	16988508	8122443	2,092
700	20221728	8271151	2,445
800	23805301	9284476	2,564
1000	28944236	8821058	3,281

Conc. (ng/mL)	Arel
50	0,205
100	0,389
150	0,468
200	0,740
400	1,355
500	1,814
600	2,092
700	2,445
800	2,564
1000	3,281

Considerando um modelo de regressão linear ponderada
w=1/x

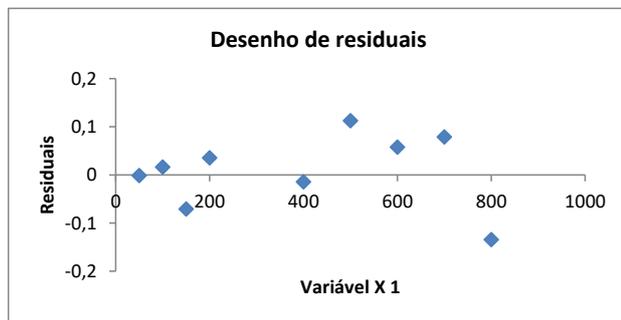
Estatística de regressão	
R	0,998023727
Quadrado de R	0,996051359
Erro-padrão	0,081921832
Observações	10



	Coefficientes	Erro-padrão	95% inferior	95% superior
Ordenada na origem	0,040049948	0,034355488	-0,039173951	0,119273846
Declive	0,00332265	0,000116237	0,003054607	0,003590693

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
50	0,206182449	-0,001070157
100	0,372314951	0,016545453
150	0,538447452	-0,070711259
200	0,704579954	0,035459906
400	1,36910996	-0,014296911
500	1,701374963	0,112830329
600	2,033639966	0,057911606
700	2,365904969	0,078945506
800	2,698169972	-0,134180288
1000	3,362699978	-0,081434185



Estudo Linearidade da Desmetilvenlafaxina

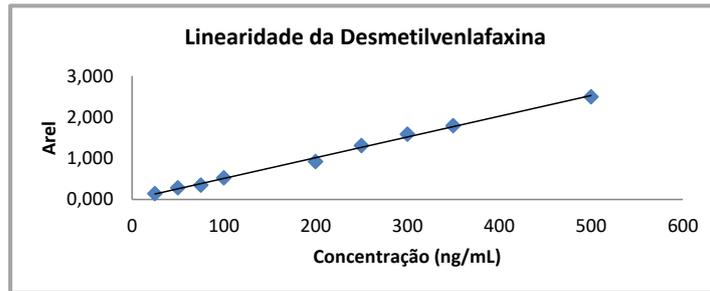
Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel
50	693335	8372147	0,083
100	1371617	9201353	0,149
150	1870093	9904673	0,189
200	2501951	8103575	0,309
400	5210200	9457653	0,551
500	5693276	7787791	0,731
600	7103145	8122443	0,875
700	8592000	8271151	1,039
800	10079108	9284476	1,086
1000	12131431	8821058	1,375

Conc. (ng/mL)	Arel
25	0,140
50	0,281
75	0,350
100	0,525
200	0,919
250	1,308
300	1,583
350	1,792
500	2,493

Desprezando o ponto de calibração a 400 ng/mL

Considerando um modelo de regressão linear ponderada
w=1/x

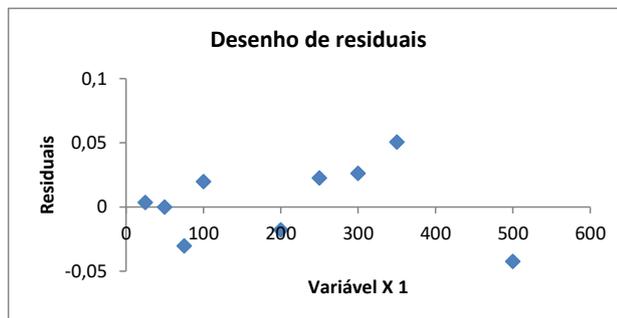
Estatística de regressão	
R	0,998184024
Quadrado de R	0,996371345
Erro-padrão	0,032092438
Observações	10



	Coefficientes	Erro-padrão	95% inferior	95% superior
Ordenada na origem	0,009300625	0,013458578	-0,021734912	0,040336162
Declive	0,001398344	4,55351E-05	0,00129334	0,001503348

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
50	0,079217821	0,003596639
100	0,149135016	-6,81188E-05
150	0,219052211	-0,030243099
200	0,288969406	0,019777187
400	0,568638188	-0,017740483
500	0,708472578	0,022578848
600	0,848306969	0,026201496
700	0,98814136	0,05064994
800	1,12797575	-0,042388628
1000	1,407644532	-0,032363782



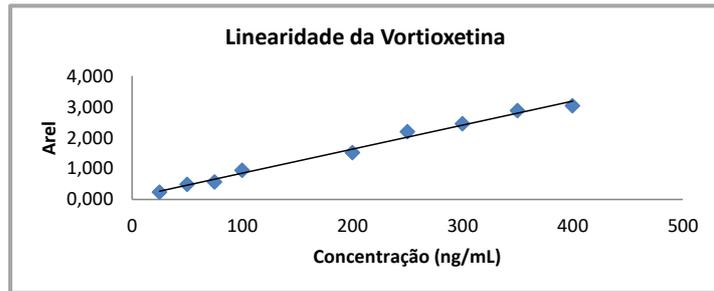
Estudo Linearidade da Vortioxetina

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel
25	1944364	8372147	0,232
50	4437426	9201353	0,482
75	5580341	9904673	0,563
100	7610712	8103575	0,939
200	14321636	9457653	1,514
250	17099156	7787791	2,196
300	19933784	8122443	2,454
350	23767889	8271151	2,874
400	28143597	9284476	3,031
500	35842500	8821058	4,063

Conc. (ng/mL)	Arel
25	0,232
50	0,482
75	0,563
100	0,939
200	1,514
250	2,196
300	2,454
350	2,874
400	3,031
500	4,063

Considerando um modelo de regressão linear ponderada
w=1/x

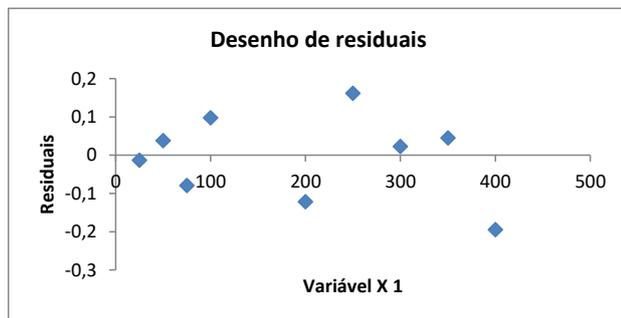
Estatística de regressão	
R	0,996915995
Quadrado de R	0,993841502
Erro-padrão	0,112273046
Observações	10



	Coefficientes	Erro-padrão	95% inferior	95% superior
Ordenada na origem	0,046701484	0,047083851	-0,061874071	0,155277039
Declive	0,007947683	0,000318603	0,007212984	0,008682383

RESULTADO RESIDUAL

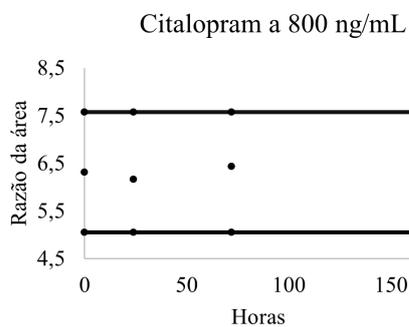
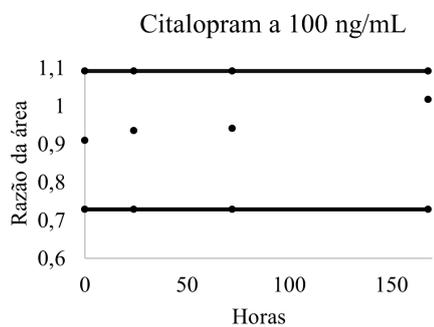
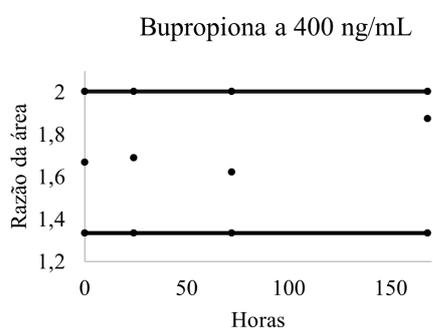
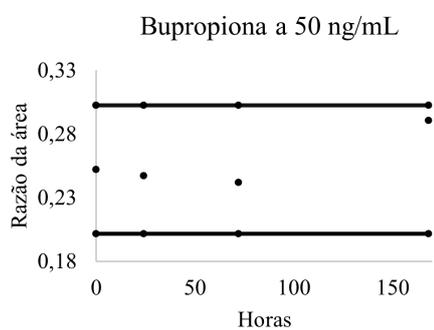
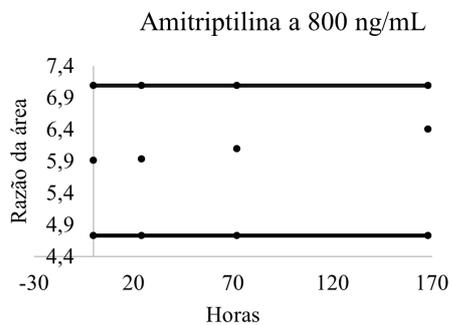
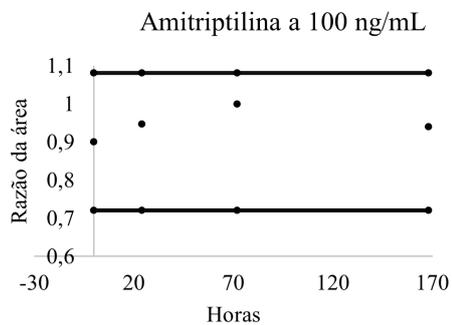
Observação	Y previsto	Residuais
25	0,245393571	-0,013151559
50	0,444085659	0,038172353
75	0,642777746	-0,079372861
100	0,841469834	0,097709655
200	1,636238183	-0,121947498
250	2,033622358	0,162013896
300	2,431006533	0,023154726
350	2,828390708	0,045198254
400	3,225774883	-0,194521811
500	4,020543232	0,042744844

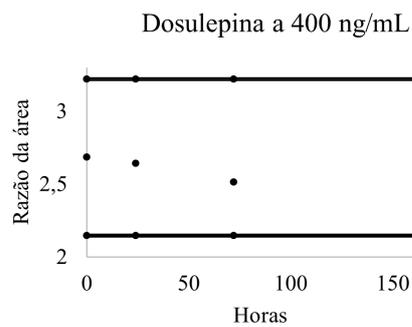
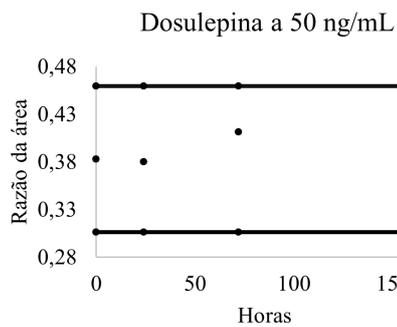
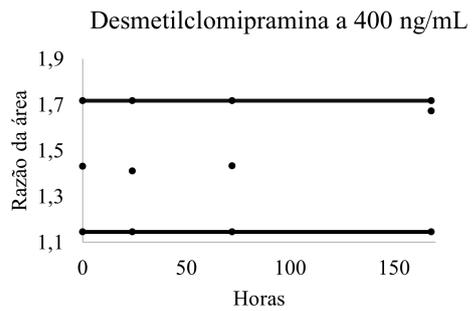
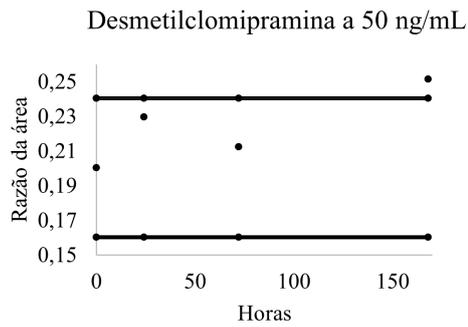
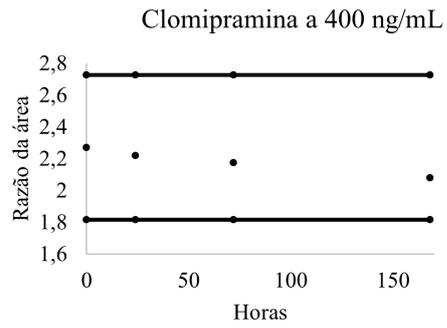
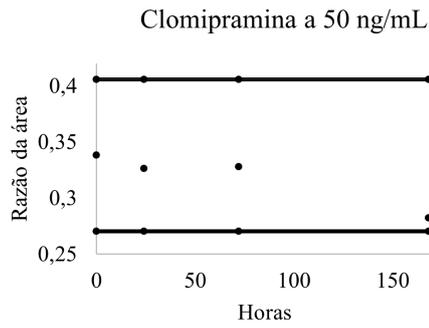
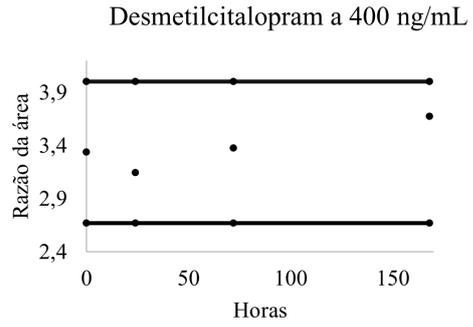
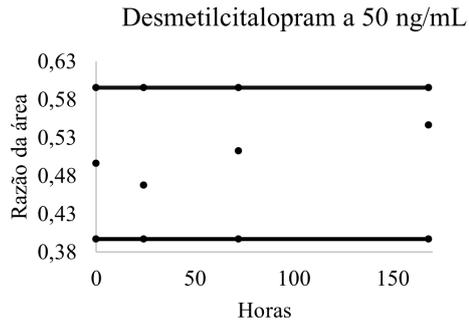


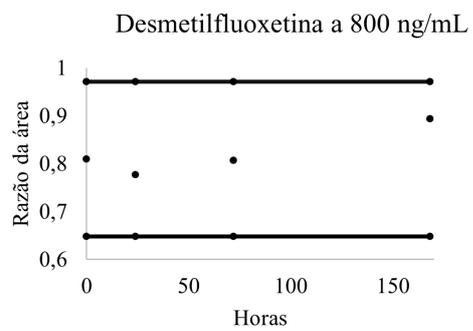
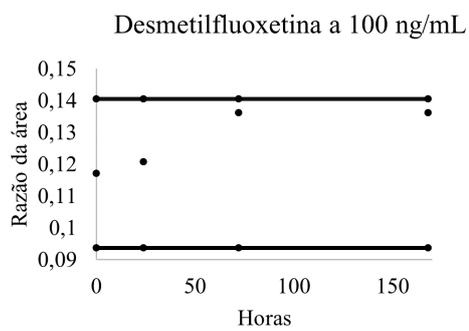
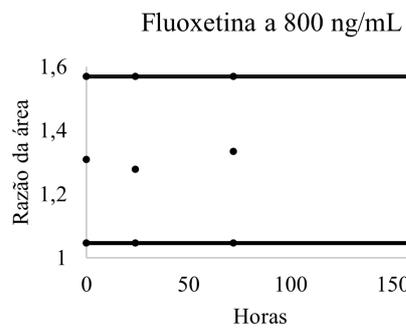
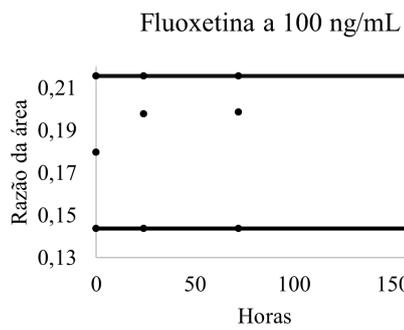
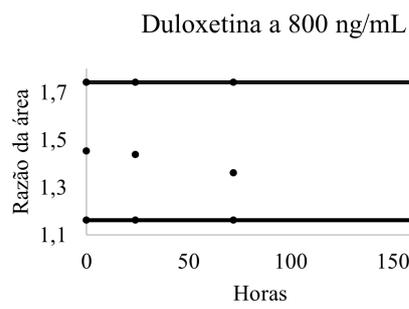
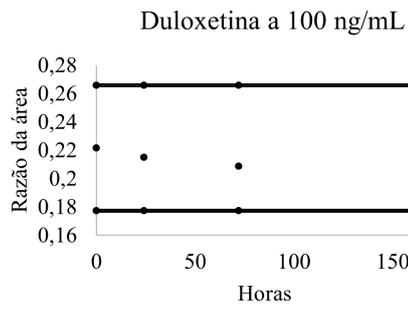
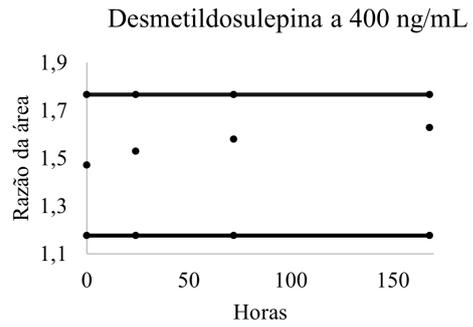
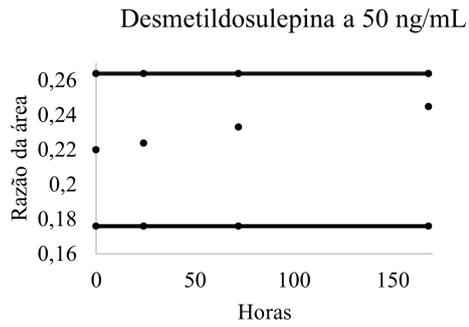
APÊNDICE E

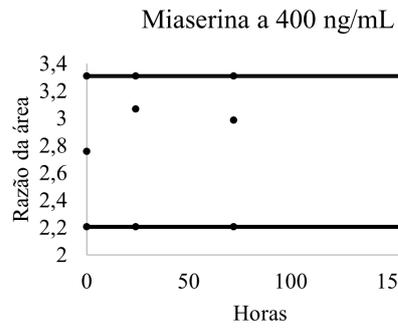
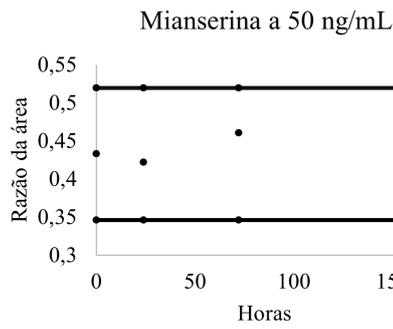
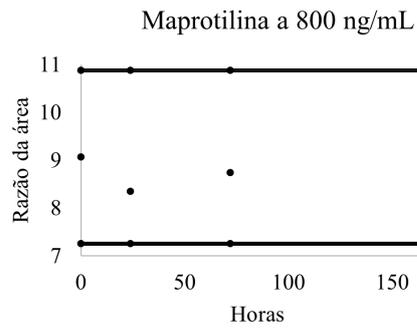
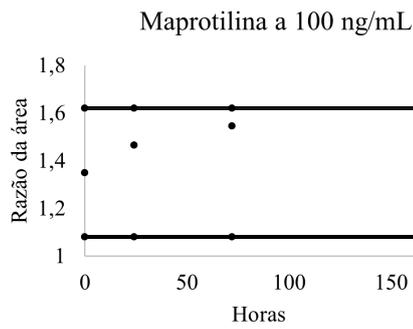
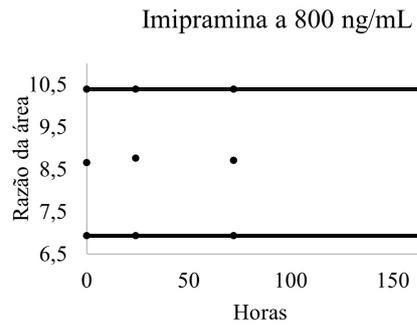
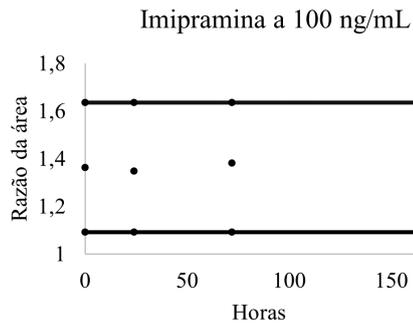
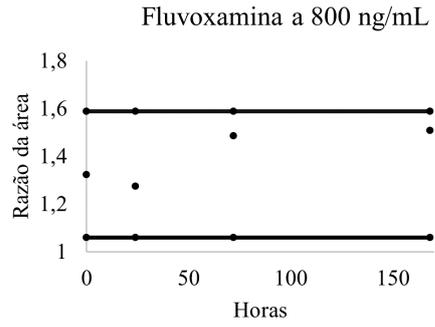
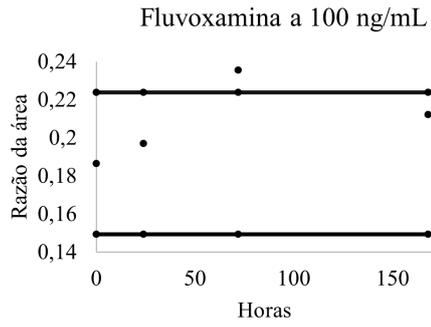
ESTABILIDADE

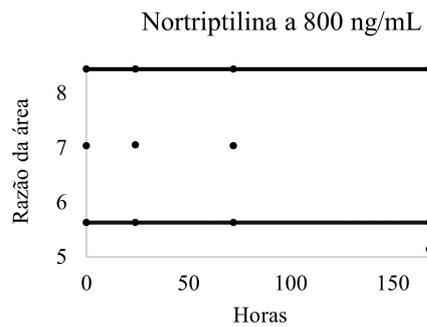
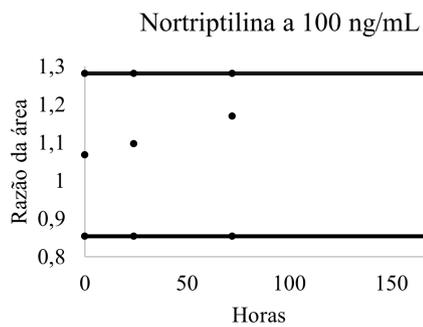
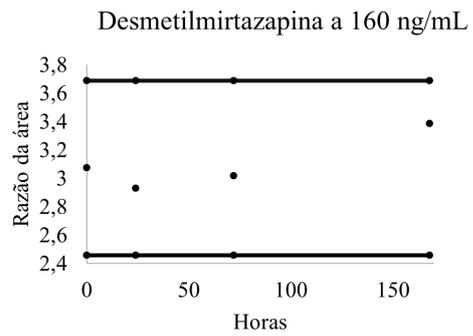
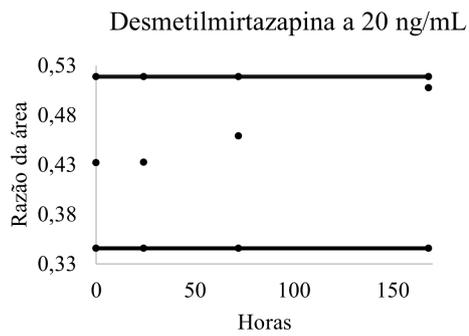
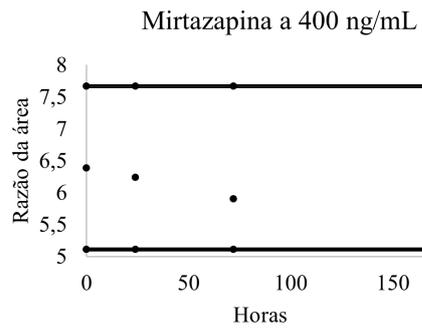
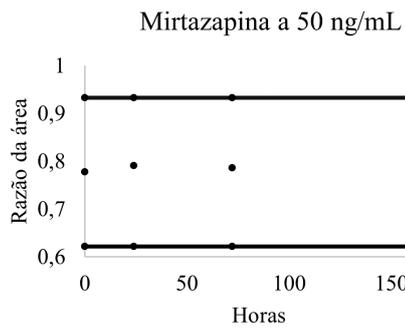
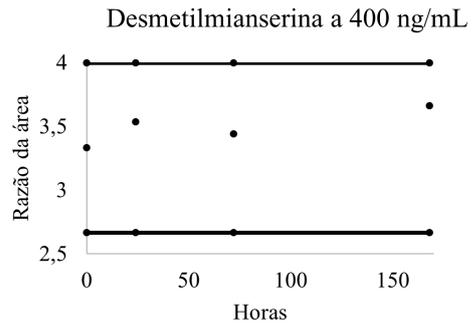
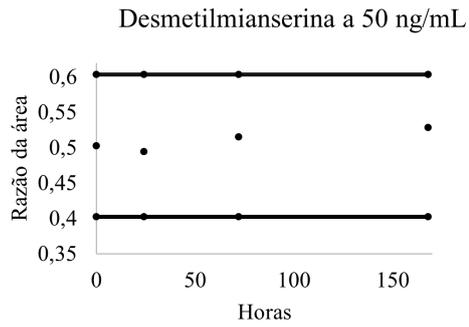
Gráficos do estudo da estabilidade (razão área do composto/área do PI em função das horas) dos diferentes ADs quando estas permaneceram à temperatura ambiente após a extração por PP e diluição.

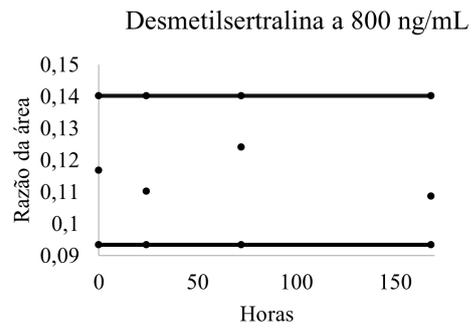
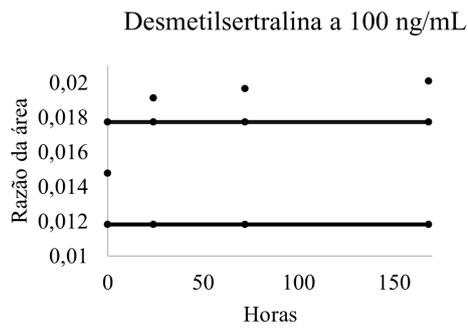
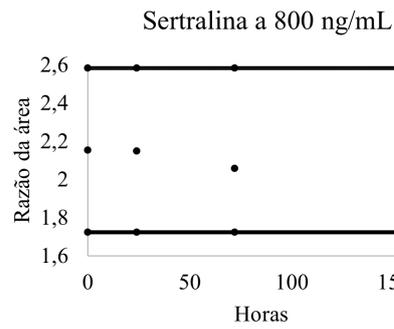
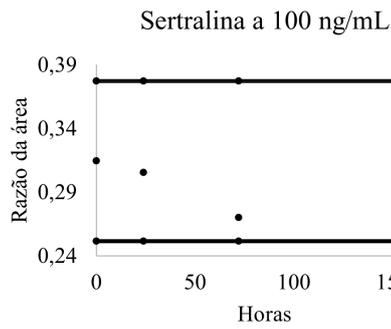
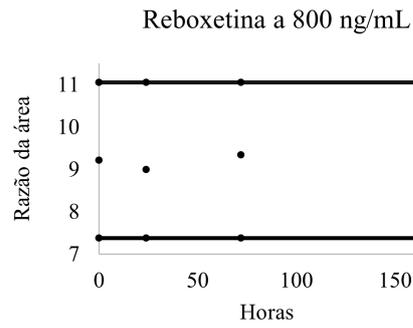
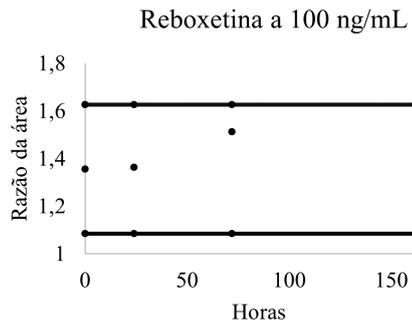
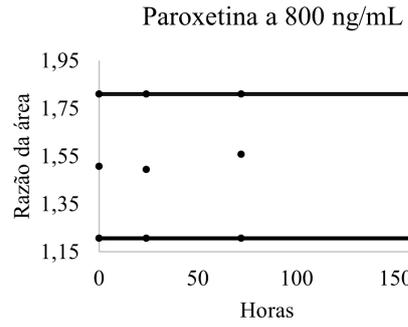
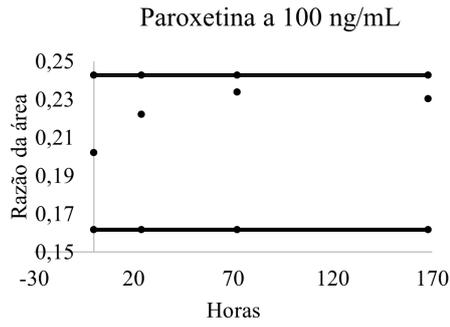


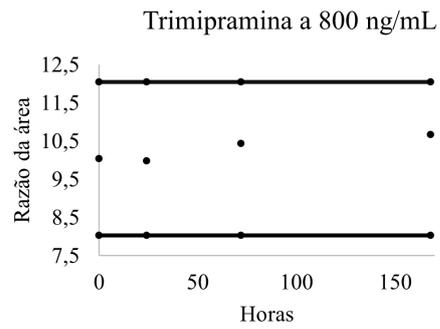
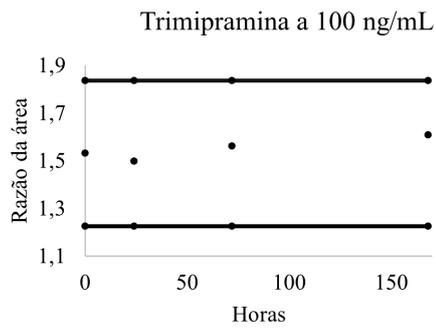
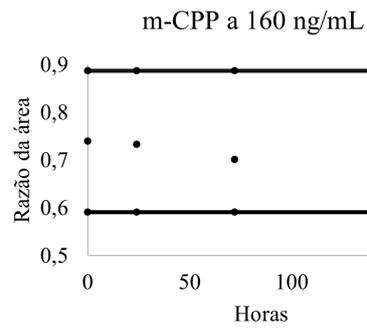
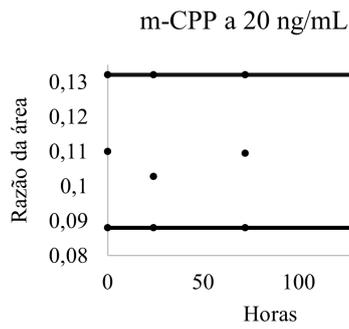
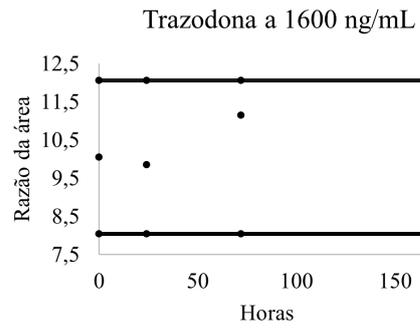
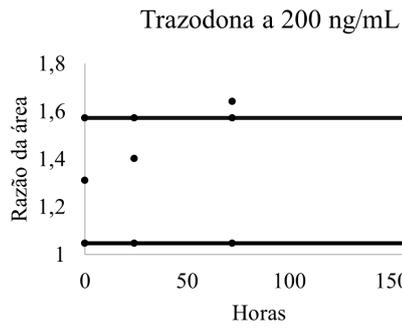
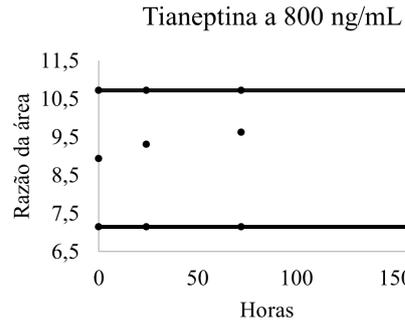
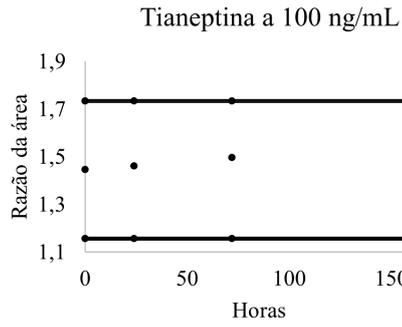


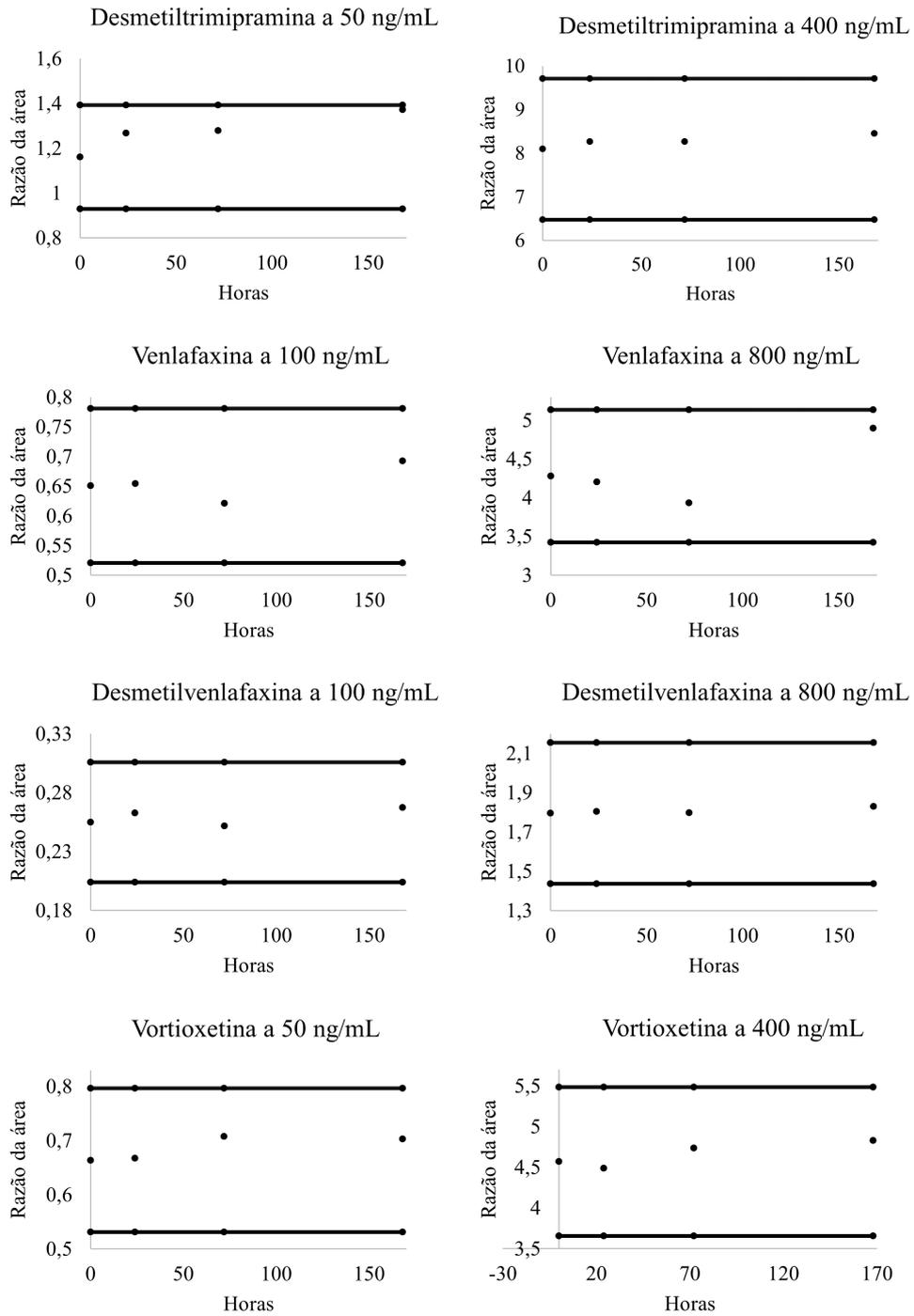












Gráficos do estudo da estabilidade (razão área do composto/área do PI em função das horas) dos diferentes AD quando estas permaneceram congelados a uma temperatura de -20 °C após extração por PP e antes da diluição.

