

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**Desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica
simples para a análise de medicamentos em amostras de
sangue por UPLC-MS/MS**

Inês Ribeiro Nogueira

Mestrado em Química
Especialização em Química

Dissertação orientada por:
Professora Doutora Helena Margarida Guerreiro Galla Gaspar
Mestre Susana Maria dos Santos Sadler Simões

Dedicatória e agradecimentos

À Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa agradeço por me ter recebido durante 2 anos, ter-me permitido adquirir conhecimentos que vou levar para a vida e por ter possibilitado a realização deste estágio.

Quero agradecer ao Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. por ser a minha segunda casa desde 2018 de diferentes formas e por me ter acolhido, mais uma vez, para permitir o desenvolvimento deste projeto. Em especial agradeço ao Serviço de Química e Toxicologia Forenses que tanto me tem ensinado desde o final da licenciatura e onde posso pôr em prática todos os conhecimentos que lá me têm sido transmitidos.

O meu mérito não seria alcançado se não tivesse tido do meu lado a Mestre Susana Simões, minha orientadora externa, que me acompanhou do primeiro ao último dia, sempre com uma palavra amiga nos momentos mais difíceis, disposta a orientar-me no trabalho laboratorial e a esclarecer dúvidas em qualquer instante, mesmo com todos os inconvenientes que foram surgindo. Um simples “obrigada” nunca será suficiente.

Ao Dr. Mário Dias agradeço a preocupação e a disponibilidade em ajudar, sobretudo no que concerne ao trabalho escrito e ao Dr. João Miguel Franco o esforço feito para que este estágio fosse possível de realizar. A todos os restantes técnicos auxiliares e superiores do Serviço de Química e Toxicologia Forenses agradeço a boa disposição e a forma como me acolheram e me trataram durante este longo e exigente ano.

Agradeço à minha orientadora interna, a Professora Helena Gaspar, por ter sido incansável, sobretudo no processo de formalização do estágio e por despender do seu tempo sempre que necessário para me ajudar, tanto a nível académico como a nível pessoal.

Aos meus pais agradeço por me ouvirem todos os dias a contar as conquistas e os insucessos que foram acontecendo em laboratório, por terem de ouvir as minhas explicações científicas para tudo, por nunca me pressionarem a fazer algo porque acreditam em mim e nas minhas capacidades e por me apoiarem emocional (e financeira) mente.

Aos meus avós agradeço por se preocuparem constantemente comigo e com o meu futuro e perguntarem se já tenho emprego desde o meu primeiro dia de estágio (mal sabem eles que a minha maior preocupação são eles e não o emprego).

Ao António, o meu cúmplice, confidente e namorado há mais de 5 anos, que é a única pessoa que atura os meus choros nos momentos de maior frustração e insegurança, partilha comigo todas as conquistas e felicidades, que nunca me deixa desistir de nada e que, mesmo à distância, me apoia incondicionalmente e lembra-me constantemente daquilo que eu amo e do meu propósito, obrigada por seres o melhor companheiro de vida (e por também ouvires as minhas explicações científicas).

Agradeço aos meus amigos de toda a vida, incluindo aos poucos que fiz mais recentemente, por me apoiarem em todas as fases da vida e me incentivarem a concluir o mestrado, mesmo quando nada parecia dar certo. Em especial à Fi, agradeço por termos partilhado as nossas crises de ansiedade e, embora estivéssemos muitas vezes as duas num caco, arranjámos sempre forças para nos apoiarmos uma à outra.

Resumo

Desde 1990 que as perturbações mentais têm vindo a aumentar, bem como o consumo de antidepressivos, antipsicóticos, anticonvulsivantes e analgésicos, uma vez que o tratamento deste tipo de perturbações através de medicação é importante para uma positiva recuperação dos utentes. Porém, o consumo destas substâncias também apresenta riscos de sobredosagem associados, que podem conduzir a intoxicações ou à morte, sendo essencial desenvolver metodologias simples e sensíveis que permitam a deteção e identificação das mesmas em amostras biológicas, nomeadamente, em sangue.

Deste modo, este projeto teve como objetivo desenvolver e validar uma metodologia analítica para a confirmação qualitativa, em sangue, de um largo espectro de medicamentos (antidepressivos, antipsicóticos, anticonvulsivantes e analgésicos), completando um total de 25 fármacos, constituída por uma preparação de amostras e análise instrumental simples e rápidas, utilizando como equipamento analítico a tecnologia UPLC-MS/MS. O pré-tratamento das amostras foi realizado com recurso à técnica de precipitação de proteínas, seguindo-se a análise por cromatografia em fase líquida acoplada à espectrometria de massa em *tandem* a operar no modo de monitorização de múltiplas reações, através da seleção de duas transições iónicas para cada analito. O método demonstrou ser robusto e seletivo para cada analito, tendo sido obtidas recuperações entre 77 e 95%, não se verificando arrastamento. Não se observaram efeitos matriz significativos, com exceção da cetamina, metadona, sertralina e tramadol, mas tal fenómeno não comprometeu os restantes parâmetros de validação, nomeadamente, o limite de deteção. Para este último obtiveram-se valores entre 2 e 4 ng/mL, com exceção do fenobarbital (80 ng/mL), sendo estas concentrações subterapêuticas. Desta forma, foi possível desenvolver e validar com sucesso uma metodologia analítica rápida e simples para a identificação de 25 medicamentos, por UPLC-MS/MS, utilizando uma pequena quantidade de sangue periférico *postmortem*, fator favorável uma vez que este, muitas vezes, se encontra pouco disponível em cadáveres.

Palavras-chave: Precipitação de proteínas; Medicamentos; UPLC-MS/MS; Validação

Abstract

Mental disorders have increased since 1990, as well as the consumption of antidepressants, antipsychotics, anticonvulsants and analgesics, once the treatment of this type of disorders through medication is important for a positive recovery. Notwithstanding, the consumption of these substances also poses associated risks of overdose, which can lead to intoxication or death, and, for this reason, it is essential to develop simple and sensitive methodologies that allow their detection and identification in biological samples, namely in blood.

This way, this study aimed to develop and validate an analytical method for qualitative confirmation, in blood, of a wide spectrum of medicines (antidepressants, antipsychotics, anticonvulsants and analgesics), in a total of 25 medicines, using a fast and simple sample preparation procedure and UPLC-MS/MS instrumental analysis. Sample pre-treatment was performed using a protein precipitation technique, followed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, operating in multiple reaction monitoring acquisition mode, by selecting two ionic transitions for each analyte. The method proved to be robust and selective for each analyte, with extraction recoveries between 77 and 95%, with no carryover. No significant matrix effects were observed, except for ketamine, methadone, sertraline and tramadol, however this phenomenon did not compromise the other validation parameters, namely, the limit of detection (LD). For the latter, values between 2 and 4 ng/mL were obtained, except for phenobarbital with a LD of 80 ng/mL, these concentrations being subtherapeutic. Therefore, it was possible to successfully develop and validate a quick and simple analytical methodology for the identification of 25 medicines, by UPLC-MS/MS, using a small amount of *postmortem* peripheral blood, an important factor as it is usually less available.

Keywords: Protein precipitation; Medicines; UPLC-MS/MS; Validation

Índice

Dedicatória e agradecimentos	ii
Resumo.....	iv
Abstract	v
Índice.....	vi
Índice de Figuras	ix
Índice de Tabelas.....	xiv
Lista de abreviaturas e siglas.....	xix
Capítulo 1 – Introdução.....	1
1.1. Saúde mental	1
1.2. Tratamento farmacológico de perturbações mentais	2
1.2.1. Antidepressivos	2
1.2.1.1. Fluoxetina.....	4
1.2.1.2. Paroxetina.....	4
1.2.1.3. Sertralina	4
1.2.1.4. Citalopram.....	4
1.2.1.5. Venlafaxina	4
1.2.1.6. Mirtazapina.....	5
1.2.1.7. Trazodona.....	5
1.2.1.8. Mianserina.....	5
1.2.1.9. Amitriptilina	5
1.2.1.10. Nortriptilina.....	5
1.2.1.11. Clomipramina.....	6
1.2.2. Antipsicóticos.....	6
1.2.2.1. Ciamemazina	7
1.2.2.2. Clozapina.....	7
1.2.2.3. Haloperidol.....	7
1.2.2.4. Levomepromazina	8
1.2.2.5. Olanzapina.....	8
1.2.2.6. Quetiapina	8
1.2.3. Anticonvulsivantes	8
1.2.3.1. Carbamazepina	9
1.2.3.2. Fenitoína.....	9
1.2.3.3. Fenobarbital.....	9
1.2.3.4. Levetiracetam	9
1.2.3.5. Topiramato	10
1.2.4. Analgésicos	10
1.2.4.1. Cetamina.....	10

1.2.4.2. Metadona.....	10
1.2.4.3. Tramadol	11
1.3. Importância médico-legal do estudo de fármacos antidepressivos, antipsicóticos, anticonvulsivantes e analgésicos	15
1.4. Medicina Legal e Toxicologia Forense	15
1.4.1. Farmacocinética.....	16
1.4.2. Farmacodinâmica	16
1.4.3. Matrizes biológicas.....	17
1.5. Instituto Nacional De Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.	17
1.6. Metodologias de análise de substâncias no sangue	18
1.6.1. Preparação de amostras	18
1.6.2. Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em <i>tandem</i> (UPLC-MS/MS) .	19
1.6.2.1. Cromatografia líquida.....	19
1.6.2.2. Espectrometria de massa	20
1.6.3. Validação do método analítico	22
1.7. Objetivo.....	23
Capítulo 2 – Experimental.....	23
2.1. Reagentes e padrões	23
2.2. Preparação de misturas-padrão e soluções	23
2.3. Materiais e equipamentos.....	25
2.4. Amostras biológicas	26
2.5. Procedimento experimental	26
2.5.1. Construção do método no software	26
2.5.1.1. Espectrometria de massa	27
2.5.1.2. Cromatografia líquida de ultra eficiência	28
2.6. Desenvolvimento da metodologia (Procedimento de preparação das amostras).....	29
2.7. Validação do método.....	30
2.7.1. Seletividade/especificidade	31
2.7.2. Capacidade de identificação	33
2.7.3. Eficiência da extração	33
2.7.4. Arrastamento	34
2.7.5. Efeito de matriz	34
2.7.6. Limite de detecção	35
2.7.7. Robustez	37
2.8. Aplicação do método a amostras reais	37
Capítulo 3 – Resultados e Discussão.....	38
3.1. Desenvolvimento da metodologia.....	38
3.1.1. Escolha do solvente de extração.....	38
3.2. Validação do método.....	39
3.2.1. Seletividade/especificidade e capacidade de identificação	39

3.2.1.1. Critério da diferença do tempo de retenção relativo.....	39
3.2.1.2. Critério das intensidades relativas	41
3.2.2. Eficiência da extração	45
3.2.3. Arrastamento	46
3.2.4. Efeito de matriz	47
3.2.5. Limite de detecção (LD)	50
3.2.6. Robustez	56
3.3. Análise de amostras reais	56
Capítulo 4 – Conclusões.....	60
Capítulo 5 – Bibliografia.....	62
Capítulo 6 – Anexos	69
Anexo A – Análise do padrão de fragmentação dos fármacos antidepressivos, anticonvulsivantes, antipsicóticos, e analgésicos em estudo.....	69
Anexo B – Razão S/R para cada um dos analitos em cada uma das <i>pools</i> analisadas, na confirmação da positividade no estudo da seletividade/especificidade.....	82
Anexo C – Resultados obtidos para as amostras brancas e amostras fortificadas com benzodiazepinas a 100 ng/mL, no estudo da seletividade/especificidade.	85
Anexo D – Resultados obtidos para o estudo do limite de detecção.....	102
Anexo E – Razão S/R para cada um dos analitos em cada uma das <i>pools</i> analisadas, na confirmação da positividade no estudo do limite de detecção.	127

Índice de Figuras

Figura 1.1. Prevalência anual em Portugal das perturbações psiquiátricas (exceto esquizofrénicas e delirantes), em 2013. (Andrade de Carvalho et al., 2014).....	1
Figura 1.2. Representação esquemática do processo de precipitação de proteínas por adição de solvente orgânico. (Majors, 2013).....	19
Figura 1.3. Representação esquemática do processo de ionização por eletropulverização (ESI). (Banerjee and Mazumdar, 2011).....	21
Figura 1.4. Esquema do funcionamento de um analisador de massa quadrupolo. (Argoti, 2008).....	21
Figura 1.5. Princípio da espectrometria de massa em <i>tandem</i> (MS/MS) (Vogeser and Parhofer, 2007)	22
Figura 3.1. Cromatogramas da <i>pool 3</i> , sem fortificação (à esquerda) e com fortificação com mistura-padrão de 100 ng/mL de benzodiazepinas (à direita).....	44
Figura 3.2. Cromatogramas das amostras brancas A (à esquerda) e B (à direita) do estudo do fenómeno de arrastamento (<i>carryover</i>).	46
Figura 3.2. (continuação).....	47
Figura A1. Espetro de massa da amitriptilina (EC 18 eV).	69
Figura A2. Espetro de massa do citalopram (EC 18 eV).	69
Figura A3. Espetro de massa da fluoxetina (EC 10 eV).....	70
Figura A4. Espetro de massa da clomipramina (EC 16 eV).....	70
Figura A5. Espetro de massa da mianserina (EC 20 eV).	71
Figura A6. Espetro de massa da mirtazapina (EC 20 eV).....	71
Figura A7. Espetro de massa da nortriptilina (EC 16 eV).....	72
Figura A8. Espetro de massa da paroxetina (EC 22 eV).	72
Figura A9. Espetro de massa da sertralina (EC 12 eV).....	73
Figura A10. Espetro de massa da trazodona (EC 24 eV).	73
Figura A11. Espetro de massa da venlafaxina (EC 12 eV).	74
Figura A12. Espetro de massa da ciamemazina (EC 20 eV).....	74
Figura A13. Espetro de massa da clozapina (EC 20 eV).....	75
Figura A14. Espetro de massa do haloperidol (EC 20 eV).	75

Figura A15. Espetro de massa da levomepromazina (EC 18 eV).	76
Figura A16. Espetro de massa da olanzapina (EC 20 eV).....	76
Figura A17. Espetro de massa da quetiapina (EC 22 eV).	77
Figura A18. Espetro de massa da carbamazepina (EC 14 eV).....	77
Figura A19. Espetro de massa da fenitoína (EC 12 eV).....	78
Figura A20. Espetro de massa do fenobarbital (EC 12 eV).	78
Figura A21. Espetro de massa do levetiracetam (EC 8 eV).	79
Figura A22.1. Espetro de massa do topiramato (EC 6 eV).	79
Figura A22.2. Espetro de massa do topiramato (EC 10 eV).	80
Figura A23. Espetro de massa da cetamina (EC 18 eV).	80
Figura A24. Espetro de massa da metadona (EC 18 eV).	81
Figura A25. Espetro de massa do tramadol (EC 6 eV).	81
Figura C1. Cromatograma obtido no estudo da seletividade para a amostra branca <i>pool</i> 1.....	85
Figura C2. Cromatograma obtido no estudo da seletividade para a amostra branca <i>pool</i> 2.....	86
Figura C3. Cromatograma obtido no estudo da seletividade para a amostra branca <i>pool</i> 4.....	87
Figura C4. Cromatograma obtido no estudo da seletividade para a amostra branca <i>pool</i> 5.....	88
Figura C5. Cromatograma obtido no estudo da seletividade para a amostra branca <i>pool</i> 6.....	89
Figura C6. Cromatograma obtido no estudo da seletividade para a amostra branca <i>pool</i> 7.....	90
Figura C7. Cromatograma obtido no estudo da seletividade para a amostra branca <i>pool</i> 8.....	91
Figura C8. Cromatograma obtido no estudo da seletividade para a amostra branca <i>pool</i> 9.....	92
Figura C9. Cromatograma obtido no estudo da seletividade para a amostra branca <i>pool</i> 10.....	93
Figura C10. Cromatograma obtido no estudo da seletividade para a <i>pool</i> 1 fortificada com benzodiazepinas a 100 ng/mL.	94
Figura C11. Cromatograma obtido no estudo da seletividade para a <i>pool</i> 2 fortificada com benzodiazepinas a 100 ng/mL.	95
Figura C12. Cromatograma obtido no estudo da seletividade para a <i>pool</i> 4 fortificada com benzodiazepinas a 100 ng/mL.	96

Figura C13. Cromatograma obtido no estudo da seletividade para a <i>pool</i> 5 fortificada com benzodiazepinas a 100 ng/mL.	97
Figura C14. Cromatograma obtido no estudo da seletividade para a <i>pool</i> 7 fortificada com benzodiazepinas a 100 ng/mL.	98
Figura C15. Cromatograma obtido no estudo da seletividade para a <i>pool</i> 8 fortificada com benzodiazepinas a 100 ng/mL.	99
Figura C16. Cromatograma obtido no estudo da seletividade para a <i>pool</i> 9 fortificada com benzodiazepinas a 100 ng/mL.	100
Figura C17. Cromatograma obtido no estudo da seletividade para a <i>pool</i> 10 fortificada com benzodiazepinas a 100 ng/mL.	101
Figura D1. Curva de calibração do levetiracetam.	102
Figura D2. Gráfico do desenho de residuais do levetiracetam.	102
Figura D3. Curva de calibração da olanzapina.	103
Figura D4. Gráfico do desenho de residuais da olanzapina.	103
Figura D5. Curva de calibração da cetamina.	104
Figura D6. Gráfico do desenho de residuais da cetamina.	104
Figura D7. Curva de calibração do tramadol.	105
Figura D8. Gráfico do desenho de residuais do tramadol.	105
Figura D9. Curva de calibração da mirtazapina.	106
Figura D10. Gráfico do desenho de residuais da mirtazapina.	106
Figura D11. Curva de calibração da trazodona.	107
Figura D12. Gráfico do desenho de residuais da trazodona.	107
Figura D13. Curva de calibração do fenobarbital.	108
Figura D14. Gráfico do desenho de residuais do fenobarbital.	108
Figura D15. Curva de calibração do topiramato.	109
Figura D16. Gráfico do desenho de residuais do topiramato.	109
Figura D17. Curva de calibração da venlafaxina.	110
Figura D18. Gráfico do desenho de residuais da venlafaxina.	110
Figura D19. Curva de calibração do citalopram.	111

Figura D20. Gráfico do desenho de residuais do citalopram.	111
Figura D21. Curva de calibração da mianserina.	112
Figura D22. Gráfico do desenho de residuais do mianserina.	112
Figura D23. Curva de calibração da clozapina.	113
Figura D24. Gráfico do desenho de residuais da clozapina.	113
Figura D25. Curva de calibração da quetiapina.	114
Figura D26. Gráfico do desenho de residuais da quetiapina.	114
Figura D27. Curva de calibração do haloperidol.	115
Figura D28. Gráfico do desenho de residuais do haloperidol.	115
Figura D29. Curva de calibração da fenitoína.	116
Figura D30. Gráfico do desenho de residuais da fenitoína.	116
Figura D31. Curva de calibração da carbamazepina.	117
Figura D32. Gráfico do desenho de residuais da carbamazepina.	117
Figura D33. Curva de calibração da ciamemazina.	118
Figura D34. Gráfico do desenho de residuais da ciamemazina.	118
Figura D35. Curva de calibração da paroxetina.	119
Figura D36. Gráfico do desenho de residuais da paroxetina.	119
Figura D37. Curva de calibração da metadona.	120
Figura D38. Gráfico do desenho de residuais da metadona.	120
Figura D39. Curva de calibração da levomepromazina.	121
Figura D40. Gráfico do desenho de residuais da levomepromazina.	121
Figura D41. Curva de calibração da amitriptilina.	122
Figura D42. Gráfico do desenho de residuais da amitriptilina.	122
Figura D43. Curva de calibração da nortriptilina.	123
Figura D44. Gráfico do desenho de residuais da nortriptilina.	123
Figura D45. Curva de calibração da fluoxetina.	124

Figura D46. Gráfico do desenho de residuais da fluoxetina.....	124
Figura D47. Curva de calibração da sertralina.	125
Figura D48. Gráfico do desenho de residuais da sertralina.....	125
Figura D49. Curva de calibração da clomipramina.....	126
Figura D50. Gráfico do desenho de residuais da clomipramina.....	126

Índice de Tabelas

Tabela 1.1. Tabela resumo das propriedades dos analitos em estudo: dosagem terapêutica (ng/mL), dosagem tóxica (ng/mL), pico plasmático ($T_{máx}$, em horas), ligação a proteínas plasmáticas (%) e semivida ($T_{1/2}$, em horas). (C. Moffat et al., 2011) (Kim et al., 2021) (Repetto and Repetto, 2015) (Jann et al., 1993) (Landmark and Johannessen, 2020) (Altamura et al., 1994) (U.S. Department of Health and Human Services, 2018) (Bourin et al., 2006).....	11
Tabela 2.1. Parâmetros experimentais estabelecidos para a determinação dos fármacos antidepressivos, antipsicóticos, anticonvulsivantes e analgésicos: transições MRM (1 ^a e 2 ^a), voltagem do cone (VC), energia de colisão (EC) para a primeira (1 ^a) e segunda (2 ^a) transições e modo de ionização (ESI – positivo ou negativo).....	27
Tabela 2.1. (continuação).....	28
Tabela 2.2. Gradiente de fase móvel utilizado: solvente A – metanol (formato de amônio 2 mM, HCOOH 0,1%); solvente B – água (formato de amônio 2 mM, HCOOH 0,1%).....	28
Tabela 2.3. TR e janelas de aquisição estabelecidas para os diferentes analitos com base no mesmo.	29
Tabela 2.4. Intervalos de tolerância mínimos e máximos admitidos para as abundâncias relativas dos íons diagnóstico.....	32
Tabela 2.5. Preparação das curvas de calibração dos 25 fármacos em estudo: pontos da curva de calibração e respectivas concentrações (ng/mL).....	36
Tabela 3.1. TRR de cada analito em cada <i>pool</i> e na amostra controlo a 100 ng/mL.....	39
Tabela 3.1. (continuação).....	40
Tabela 3.2. Diferença entre o TRR de cada analito em cada <i>pool</i> e na amostra controlo (100 ng/mL).....	40
Tabela 3.2. (continuação).....	41
Tabela 3.3. Áreas relativas dos íons, em percentagem, dos analitos em estudo na amostra controlo e respetivo intervalo de tolerância.....	42
Tabela 3.4. Áreas relativas dos íons, em percentagem, dos fármacos em estudo, em amostras de sangue complexas.....	42
Tabela 3.4. (continuação).....	43
Tabela 3.5. Percentagem de recuperação obtida para cada analito à concentração de 100 e 1000 ng/mL.....	45
Tabela 3.6. Percentagem de efeito de matriz observada, numa única amostra, para cada analito em estudo em duas concentrações distintas e respetivo coeficiente de variação.....	48

Tabela 3.7. Percentagem de efeito de matriz observada, em diversas amostras, para cada analito em estudo a uma concentração de 1000 ng/mL.	49
Tabela 3.8. Equação resultante da curva de calibração de 10 pontos obtida para cada analito, respetivo coeficiente de determinação (R^2) e erro-padrão e limite de deteção calculado e real (ng/mL).	50
Tabela 3.8. (continuação).....	51
Tabela 3.9. Resultados obtidos para o controlo (C) e <i>pools</i> em estudo no teste do limite de deteção de cada analito: TR do analito (s) e do padrão interno (PI) em segundos, TRR, Δ TRR, área dos dois iões monitorizados para cada analito, abundâncias relativas e intervalo de tolerância das abundâncias relativas.	52
Tabela 3.9. (continuação).....	53
Tabela 3.9. (continuação).....	54
Tabela 3.9. (continuação).....	55
Tabela 3.9. (continuação).....	56
Tabela 3.10. Resultados obtidos (substância detetada) para as amostras reais e amostras de soro dos testes interlaboratoriais com o método desenvolvido de UPLC-MS/MS e respetiva comparação com o método de GC-MS.	57
Tabela 3.10. (continuação).....	58
Tabela 3.10. (continuação).....	59
Tabela B1. Tabela com relações S/R obtidas para cada analito em cada transição iónica, em cada amostra.	82
Tabela B1. (continuação).....	83
Tabela B1. (continuação).....	84
Tabela D1. Áreas obtidas no estudo do limite de deteção do levetiracetam.	102
Tabela D2. Estatística de regressão e coeficientes obtidos para o levetiracetam.	102
Tabela D3. Resultado de residuais obtidos para o levetiracetam.....	102
Tabela D4. Áreas obtidas no estudo do limite de deteção da olanzapina.....	103
Tabela D5. Estatística de regressão e coeficientes obtidos para a olanzapina.	103
Tabela D6. Resultado de residuais obtidos para a olanzapina.....	103
Tabela D7. Áreas obtidas no estudo do limite de deteção da cetamina.....	104
Tabela D8. Estatística de regressão e coeficientes obtidos para a cetamina.	104

Tabela D9. Resultado de residuais obtidos para a cetamina.....	104
Tabela D10. Áreas obtidas no estudo do limite de deteção do tramadol.....	105
Tabela D11. Estatística de regressão e coeficientes obtidos para o tramadol.	105
Tabela D12. Resultado de residuais obtidos para o tramadol.....	105
Tabela D13. Áreas obtidas no estudo do limite de deteção da mirtazapina.	106
Tabela D14. Estatística de regressão e coeficientes obtidos para a mirtazapina.	106
Tabela D15. Resultado de residuais obtidos para a mirtazapina	106
Tabela D16. Áreas obtidas no estudo do limite de deteção da trazodona.	107
Tabela D17. Estatística de regressão e coeficientes obtidos para a trazodona.	107
Tabela D18. Resultado de residuais obtidos para a trazodona	107
Tabela D19. Áreas obtidas no estudo do limite de deteção do fenobarbital.....	108
Tabela D20. Estatística de regressão e coeficientes obtidos para o fenobarbital.	108
Tabela D21. Resultado de residuais obtidos para o fenobarbital	108
Tabela D22. Áreas obtidas no estudo do limite de deteção do topiramato.....	109
Tabela D23. Estatística de regressão e coeficientes obtidos para o topiramato.	109
Tabela D24. Resultado de residuais obtidos para o topiramato	109
Tabela D25. Áreas obtidas no estudo do limite de deteção da venlafaxina.	110
Tabela D26. Estatística de regressão e coeficientes obtidos para a venlafaxina.	110
Tabela D27. Resultado de residuais obtidos para a venlafaxina	110
Tabela D28. Áreas obtidas no estudo do limite de deteção do citalopram.....	111
Tabela D29. Estatística de regressão e coeficientes obtidos para o citalopram.....	111
Tabela D30. Resultado de residuais obtidos para o citalopram.....	111
Tabela D31. Áreas obtidas no estudo do limite de deteção da mianserina.....	112
Tabela D32. Estatística de regressão e coeficientes obtidos para a mianserina.	112
Tabela D33. Resultado de residuais obtidos para a mianserina	112
Tabela D34. Áreas obtidas no estudo do limite de deteção da clozapina.....	113

Tabela D35. Estatística de regressão e coeficientes obtidos para a clozapina.....	113
Tabela D36. Resultado de residuais obtidos para a clozapina.....	113
Tabela D37. Áreas obtidas no estudo do limite de detecção da quetiapina.	114
Tabela D38. Estatística de regressão e coeficientes obtidos para a quetiapina.	114
Tabela D39. Resultado de residuais obtidos para a quetiapina	114
Tabela D40. Áreas obtidas no estudo do limite de detecção do haloperidol.....	115
Tabela D41. Estatística de regressão e coeficientes obtidos para o haloperidol.	115
Tabela D42. Resultado de residuais obtidos para o haloperidol.....	115
Tabela D43. Áreas obtidas no estudo do limite de detecção da fenitoína.	116
Tabela D44. Estatística de regressão e coeficientes obtidos para a fenitoína.....	116
Tabela D45. Resultado de residuais obtidos para a fenitoína.....	116
Tabela D46. Áreas obtidas no estudo do limite de detecção da carbamazepina.	117
Tabela D47. Estatística de regressão e coeficientes obtidos para a carbamazepina.	117
Tabela D48. Resultado de residuais obtidos para a carbamazepina	117
Tabela D49. Áreas obtidas no estudo do limite de detecção da ciamemazina.	118
Tabela D50. Estatística de regressão e coeficientes obtidos para a ciamemazina.	118
Tabela D51. Resultado de residuais obtidos para a ciamemazina.....	118
Tabela D52. Áreas obtidas no estudo do limite de detecção da paroxetina.	119
Tabela D53. Estatística de regressão e coeficientes obtidos para a paroxetina.	119
Tabela D54. Resultado de residuais obtidos para a paroxetina	119
Tabela D55. Áreas obtidas no estudo do limite de detecção da metadona.....	120
Tabela D56. Estatística de regressão e coeficientes obtidos para a metadona.	120
Tabela D57. Resultado de residuais obtidos para a metadona	120
Tabela D58. Áreas obtidas no estudo do limite de detecção da levomepromazina.	121
Tabela D59. Estatística de regressão e coeficientes obtidos para a levomepromazina.	121
Tabela D60. Resultado de residuais obtidos para a levomepromazina	121

Tabela D61. Áreas obtidas no estudo do limite de detecção da amitriptilina.	122
Tabela D62. Estatística de regressão e coeficientes obtidos para a amitriptilina.	122
Tabela D63. Resultado de residuais obtidos para a amitriptilina	122
Tabela D64. Áreas obtidas no estudo do limite de detecção da nortriptilina.	123
Tabela D65. Estatística de regressão e coeficientes obtidos para a nortriptilina.....	123
Tabela D66. Resultado de residuais obtidos para a nortriptilina.....	123
Tabela D67. Áreas obtidas no estudo do limite de detecção da fluoxetina.	124
Tabela D68. Estatística de regressão e coeficientes obtidos para a fluoxetina.....	124
Tabela D69. Resultado de residuais obtidos para a fluoxetina.....	124
Tabela D70. Áreas obtidas no estudo do limite de detecção da sertralina.	125
Tabela D71. Estatística de regressão e coeficientes obtidos para a sertralina.	125
Tabela D72. Resultado de residuais obtidos para a sertralina	125
Tabela D73. Áreas obtidas no estudo do limite de detecção da clomipramina.	126
Tabela D74. Estatística de regressão e coeficientes obtidos para a clomipramina.....	126
Tabela D75. Resultado de residuais obtidos para a clomipramina.....	126
Tabela E1. Tabela com relações S/R obtidas para cada analito em cada transição iónica, em cada amostra.	127
Tabela E1. (continuação).....	128

Lista de abreviaturas e siglas

5-HT – 5-hidroxitriptamina, ou serotonina

ACN – acetonitrilo

AED – medicamentos antiepiléticos, do inglês *antiepileptic drugs*

AMT – amitriptilina

CBZ – carbamazepina

CLP – clomipramina

CLZ – clozapina

CMZ – ciamemazina

COVID-19 – doença do coronavírus

CTL – citalopram

CV – coeficiente de variação

CYP – citocromo P450

DC – corrente contínua, do inglês *direct current*

DDD – doses diárias definidas

EC – energia de colisão

EDDP – 2-etil-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina

EDMP – 2-etil-5-metil-3,3-difenil-1-pirrolidina

EM – efeito de matriz

ESI – ionização por eletropulverização, do inglês *electrospray ionization*

EUA – Estados Unidos da América

eV – elétrons volt

FDA – *Food and Drug Administration*

FGA – antipsicóticos de primeira geração ou antipsicóticos típicos, do inglês *first generation antipsychotics*

FTX – fluoxetina

GABA – ácido γ -aminobutírico

GC – cromatografia gasosa, do inglês *gas chromatography*

HPD – haloperidol

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

IPS – Instituto Português do Sangue

KET – cetamina

LC – cromatografia líquida, do inglês *liquid chromatography*

LD – limite de deteção

LEV – levetiracetam

LLE – extração líquido-líquido, do inglês *liquid-liquid extraction*

LVM – levomepromazina

MAOI – inibidores da monoaminooxidase, do inglês *monoaminooxidase inhibitors*

mCPP – m-clorofenilpiperazina

MEC – concentração mínima efetiva, do inglês *minimum effective concentration*

MIRT – mirtazapina

MNS – mianserina

MP – mistura-padrão

MRM – monitorização de múltiplas reações, do inglês *multiple reaction monitoring*

MS – espetrometria de massa, do inglês *mass spectrometry*

MS/MS – espetrometria de massa em *tandem*, do inglês *mass spectrometry/mass spectrometry*

MTC – concentração máxima tolerada, do inglês *maximum tolerated concentration*

MTD – metadona

m/z – razão massa/carga

NaSSA – antidepressivo noradrenérgico e serotoninérgico específico, do inglês *noradrenergic and specific serotonergic antidepressant*

NET – transportadores de norepinefrina, do inglês *norepinephrine transporters*

NRT – nortriptilina

OCDE – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico

OLZ – olanzapina

OMS – Organização Mundial de Saúde

PB – fenobarbital

PHT – fenitoína

PI – padrão interno

POC – perturbação obsessiva-compulsiva

PPT – precipitação de proteínas, do inglês *protein precipitation*

PRX – paroxetina

QuEChERS – *quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*

QUET – quetiapina

R – analito recuperado

RF – corrente de radiofrequência, do inglês *radio-frequency current*

SEP – sintomas extrapiramidais

SERT – transportadores de serotonina, do inglês *serotonin transporters*

SGA – antipsicóticos de segunda geração ou antipsicóticos atípicos, do inglês *second generation antipsychotics*

SNRI – inibidores seletivos da recaptação de serotonina e norepinefrina, do inglês *serotonin-noradrenaline reuptake inhibitors*

SPE – extração em fase sólida, do inglês *solid phase extraction*

SQTF – Serviço de Química e Toxicologia Forenses

SRT – sertralina

SSRI – inibidores seletivos da recaptação de serotonina, do inglês *selective serotonin reuptake inhibitors*

S/R – razão sinal/ruído

$T_{1/2}$ – tempo de semi-vida

TCA – antidepressivos tricíclicos, do inglês *tricyclic antidepressants*

$T_{máx}$ – tempo do pico plasmático

TPM – topiramato

TQD – triplo quadrupolo

TR – tempo de retenção

TRA – tramadol

TRR – tempo de retenção relativo

TRZ – trazodona

UPLC – cromatografia líquida de ultra eficiência, do inglês *ultra performance liquid chromatography*

VC – voltagem do cone

VLf – venlafaxina

Capítulo 1 – Introdução

1.1. Saúde mental

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a saúde não é apenas a ausência de doença, mas sim um absoluto estado de bem-estar físico, mental e social. (World Health Organization (WHO), 1946) Muitas vezes, erradamente, a saúde é associada apenas ao bem-estar físico, mas também a saúde mental é essencial para que os indivíduos vivam bem e em harmonia. Na ausência de saúde mental, nomeadamente, existindo perturbações mentais, existem impactos em todos os momentos da vida: a nível laboral, pessoal e social. (OECD/European Union, 2020)

Entre as perturbações mentais existem os transtornos psicóticos (doenças psiquiátricas), responsáveis por 22-28% do total de doenças a nível mundial, que são condições de saúde mental gravemente debilitantes, que alteram a forma de sentir, pensar e agir de quem sofre da doença, podendo conduzir a delírios e alucinações. (Cipriani et al., 2018) (Hairston, 2021) Estes transtornos incluem a esquizofrenia, bipolaridade, depressão severa e suicídio psicótico que, no entanto, podem ser controlados ou tratados com recurso a terapia e medicação. (Hairston, 2021)

Desde 1990 que as perturbações psiquiátricas, sobretudo a depressão, têm vindo a aumentar e, com o aparecimento da pandemia da COVID-19, a saúde mental a nível mundial foi ainda mais prejudicada a partir do ano de 2020, aumentando o número de indivíduos com perturbações mentais (salientando-se a depressão, ansiedade e o stress pós-traumático), sobretudo em países com baixo rendimento. (Cipriani et al., 2018) (OECD/European Union, 2020) (Caldas de Almeida et al., 2020)

Em 2015, estimou-se haver mais de 300 milhões de pessoas (4,4% da população mundial) a sofrer de depressão, sendo na sua forma mais gravosa uma das principais causas de suicídio, tendo-se registado em 2019 mais de 700 000 casos, o que se traduz numa morte a cada 45 segundos. (Carvalho, 2018) (World Health Organization (WHO), 2021) Destarte, é urgente rever a importância dada à saúde mental e tratar convenientemente as pessoas, o que representa um enorme desafio para os sistemas de saúde. (Cipriani et al., 2018)

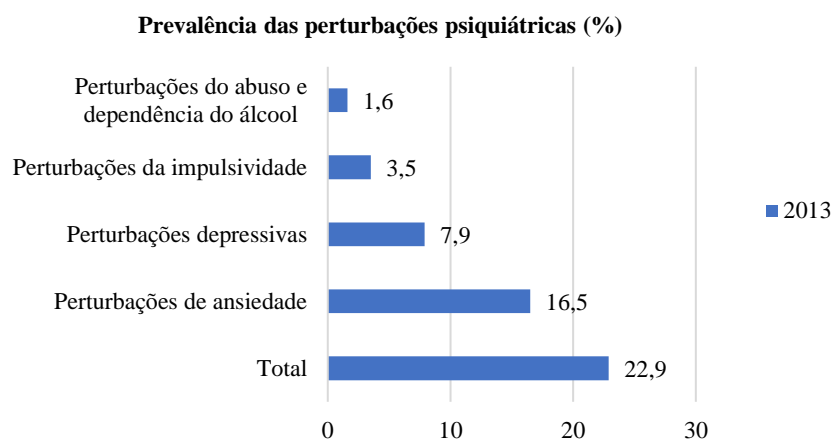


Figura 1.1. Prevalência anual em Portugal das perturbações psiquiátricas (exceto esquizofrénicas e delirantes), em 2013. (Andrade de Carvalho et al., 2014)

Segundo dados de 2013 (figura 1.1.), as perturbações psiquiátricas (excluindo as perturbações esquizofrénicas e delirantes) afetam mais de 20% da população portuguesa. (Andrade de Carvalho et al., 2014) Entre as perturbações psiquiátricas, as depressivas e de ansiedade são as de maior predominância em Portugal. Enquanto os homens possuem mais perturbações por abuso de substâncias e de controlo de impulsos, as mulheres demonstram maior incidência nas perturbações de ansiedade e nas depressões. (Andrade de Carvalho et al., 2014) (Caldas de Almeida et al., 2013)

1.2. Tratamento farmacológico de perturbações mentais

O acompanhamento e tratamento médicos e a reabilitação são fatores fundamentais para uma positiva recuperação de quem sofre de doenças mentais, sendo por isso muitas vezes necessário o controlo das diferentes patologias com recurso a medicação. (OECD/European Union, 2020) (Conselho Nacional da Saúde, 2019) (Hairston, 2021)

Assim, nos últimos anos, tem sido crescente o consumo de medicamentos antidepressores, com o objetivo de tratar as perturbações mentais, tendo atingido em Portugal as 111,6 doses diárias definidas (DDD) por 1000 habitantes por dia, em 2018. Também tem vindo a ser registada uma tendência crescente de consumo de antipsicóticos, embora não tão abrupta, que atingiu, em 2018, as 14 DDD por 1000 habitantes por dia. (Conselho Nacional da Saúde, 2019)

Entre os anos de 2000 e 2017, duplicou o consumo de antidepressivos nos países da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE). Portugal encontra-se no quinto lugar entre os países da OCDE onde mais existe consumo de fármacos antidepressores, possuindo uma taxa quase sete vezes (6,93) superior à registada na Letónia, país da OCDE com menor consumo de antidepressivos. (Conselho Nacional da Saúde, 2019) Se por um lado esta estatística representa um melhor diagnóstico da doença depressiva e maior acessibilidade ao tratamento farmacológico (Conselho Nacional da Saúde, 2019), por outro lado apresenta associados os riscos de sobredosagem (acidental ou suicida), pelo maior e mais fácil acesso a medicação que atua ao nível do Sistema Nervoso Central (SNC).

Os anticonvulsivantes, amplamente prescritos para o tratamento da doença bipolar, e os analgésicos, utilizados maioritariamente na terapêutica de combate à dor crónica, mas também no tratamento do abuso de substâncias e como antidepressivos, são duas das classes terapêuticas mais consumidas em Portugal, representando 2,9 e 2,8%, respetivamente, das embalagens de medicamentos vendidas entre janeiro e dezembro de 2019. (Chong and Lerman, 2016) (C. Watson, 2020) (Zarate and Niciu, 2015) (Infarmed, 2019)

1.2.1. Antidepressivos

Os medicamentos antidepressivos atuam no Sistema Nervoso Central, normalizando o estado de humor que está deprimido e são prescritos, maioritariamente, em casos de ansiedade, depressão e transtorno bipolar. (Cipriani et al., 2018) (Serretti et al., 2010)

No entanto, existe alguma preocupação em relação à eficácia dos antidepressivos, uma vez que a relação a longo prazo entre os efeitos adversos e os benefícios ainda está pouco investigada. Pelo que, a inovação em psicofarmacologia é fundamental, uma vez que os médicos possuem uma abrangente escolha de medicamentos dentro do mesmo grupo de fármacos e necessitam de evidências que lhes permitam fazer a escolha mais adequada a cada paciente. (Cipriani et al., 2018)

Atualmente, os antidepressivos são preferencialmente classificados de acordo com o seu mecanismo de ação. (Moreno et al., 1999) A classe que abrange a maioria dos antidepressivos é a dos moduladores monoaminérgicos, sendo que o principal mecanismo através do qual as monoaminas (dopamina, serotonina e norepinefrina) atuam é pela recaptação neuronal, isto é, a recaptação pelos mesmos terminais pré-sinápticos que as libertaram, aumentando assim a concentração destas monoaminas no neurónio. A classe dos moduladores monoaminérgicos é constituída por quatro subclasses: inibidores da monoaminoxidase (MAOI, *monoaminoxidase inhibitors*), inibidores da recaptação neuronal, antagonistas de α -2 adrenoceptores e multimodais. (Alvano and Zieher, 2019)

Inseridos na subclasse dos inibidores da recaptação neuronal, encontram-se os antidepressivos relativamente seletivos, por possuírem afinidade superior por determinados transportadores. Os que possuem maior afinidade pelos transportadores de serotonina ou SERT, (*serotonin transporters*) denominam-se inibidores seletivos da recaptação de serotonina (SSRI, *selective serotonin reuptake inhibitors*), onde se inserem o citalopram, a fluoxetina, a paroxetina e a sertralina, que possuem, paralelamente, outras ações. (Alvano and Zieher, 2019) (Moreno et al., 1999) (Telles-Correia et al., 2007) Outro grupo é o dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina e norepinefrina, SNRI (*serotonin-noradrenaline reuptake inhibitors*), com dupla ação nos SERT e nos NET (transportadores de norepinefrina, *norepinephrine transporters*), que inclui a venlafaxina. (Alvano and Zieher, 2019) (Moreno et al., 1999)

Os antagonistas de α -2 adrenoceptores compreendem o antidepressivo noradrenérgico e serotoninérgico específico, NaSSA (*noradrenergic and specific serotonergic antidepressant*), que é o caso da mirtazapina. (Alvano and Zieher, 2019) (Moreno et al., 1999)

Os antidepressivos multimodais, além de inibirem a recaptação neuronal de forma não-seletiva (podem inibir tanto os NET como os SERT), atuam em receptores distintos de acordo com o efeito antidepressivo, daí a sua denominação. Subdividem-se em serotoninérgicos (incluindo a trazodona), noradrenérgicos (onde se insere a mianserina), e serotoninérgicos/noradrenérgicos, incluindo os tradicionais antidepressivos tricíclicos (TCA, *tricyclic antidepressants*), como a amitriptilina, a nortriptilina, e a clomipramina. (Alvano and Zieher, 2019) Embora haja uma grande diversidade de antidepressivos, estes produzem aproximadamente a mesma resposta. (Alves et al., 2017)

Os fármacos SSRI são a subclasse de antidepressivos na qual se incluem os mais prescritos mundialmente (citalopram, fluoxetina, paroxetina e sertralina), sendo os preferidos de momento para o tratamento das perturbações de ansiedade e depressão, pois inibem a bomba de recaptação da serotonina (receptores 5-HT), uma vez que esta hormona é a responsável pela estabilização do humor e das emoções, potenciando seletivamente a atividade da mesma. (Telles-Correia et al., 2007) (Jonnakuty and Gragnoli, 2008)

Entre os diversos antidepressivos existentes, são de maior importância a fluoxetina, a paroxetina, a sertralina, o citalopram, a venlafaxina, a mirtazapina, a trazodona, a mianserina, a amitriptilina, a nortriptilina e a clomipramina, uma vez que, além de serem os mais prescritos, são aqueles que são detetados com maior frequência em amostras de sangue *postmortem* provenientes de autópsias médico-legais realizadas pelo Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. (INMLCF, I.P.), sendo crucial o seu estudo toxicológico para o possível estabelecimento de uma relação com a causa da morte.

1.2.1.1. Fluoxetina

A fluoxetina, pertencendo ao grupo dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina, permite a acumulação da mesma no espaço pré-sináptico, aumentando a função serotoninérgica, que conduz a efeitos antidepressivos, antiobsessivos, ansiolíticos e antibulímicos, sendo por isso utilizada no tratamento da depressão, ataques de pânico, perturbações de stress pós-traumático, transtornos obsessivo-compulsivos e perturbações alimentares. Este fármaco também inibe a recaptação de noradrenalina. (National Center for Biotechnology Information, 2022a) (Telles-Correia et al., 2007) A fluoxetina é metabolizada por *N*-desmetilação em norfluoxetina e tanto a fluoxetina como o seu metabolito sofrem glucuronização a fim de facilitar a sua excreção (metabolismo de fase II). (Margolis et al., 2000) (Perez-Caballero et al., 2014)

1.2.1.2. Paroxetina

A paroxetina é um fármaco antidepressor do tipo ISRS que inibe a recaptação de serotonina e de noradrenalina e possui atividade anticolinérgica, permitindo o tratamento da ansiedade, depressão, **p**erturbação **o**bsessiva-compulsiva (POC) e stress pós-traumático. (Telles-Correia et al., 2007) (National Center for Biotechnology Information, 2022b) A paroxetina é oxidada no fígado em paroxetina catecol que é posteriormente convertida, por metilação e conjugação, em metabolitos glucurónido e sulfato. (GlaxoSmithKline Inc., 2021)

1.2.1.3. Sertralina

A sertralina é utilizada na terapêutica do transtorno depressivo maior, ansiedade, pânico e POC, uma vez que é um fármaco inibidor seletivo da recaptação de serotonina, que também inibe a recaptação de dopamina. (Telles-Correia et al., 2007) A sertralina possui um metabolito ativo, a norsertralina, que é obtido por *N*-desmetilação. O metabolismo da sertralina também envolve desaminação oxidativa e consequente *N*-hidroxilação (redução) e glucuronização (conjugação), a fim da sua excreção. (FDA, 2016)

1.2.1.4. Citalopram

O citalopram é um antidepressivo seletivo para a inibição da recaptação da serotonina, que possui uma ligeira ação anti-histamínica, e está indicado para tratar a perturbação de pânico e episódios depressivos em fase inicial. (Telles-Correia et al., 2007) Por *N*-desmetilação, o citalopram é metabolizado em norcitalopram (desmetilcitalopram) e em didesmetilcitalopram e, através das monoaminas oxidases, é oxidado em citalopram-*N*-óxido. (Caccia, 1998) (Bezchlibnyk-Butler et al., 2000)

1.2.1.5. Venlafaxina

A venlafaxina é um inibidor seletivo da recaptação de serotonina e noradrenalina (SNRI), sendo a primeira superior à segunda. Este medicamento é utilizado no tratamento da ansiedade, do transtorno depressivo maior, fobia social e pânico. (National Center for Biotechnology Information, 2022c) A venlafaxina é metabolizada no fígado em *O*-desmetilvenlafaxina, *N*-desmetilvenlafaxina e *N,O*-didesmetilvenlafaxina, sendo o primeiro o seu principal metabolito. (FDA, 2017)

1.2.1.6. Mirtazapina

A mirtazapina, fármaco tetracíclico, é um antidepressivo noradrenérgico e serotoninérgico específico, tendo sido aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento do transtorno depressivo maior em 1997. (National Center for Biotechnology Information, 2022d) Os seus efeitos prejudicam algumas tarefas cognitivas, uma vez que diminui o estado de alerta. (Serretti et al., 2010) Os processos de metabolização da mirtazapina são, maioritariamente, desmetilação e hidroxilação, obtendo-se *N*-desmetilmirtazapina e 8-hidroxi-mirtazapina, sendo o segundo o metabolito mais comum. A *N*-desmetilmirtazapina sofre conjugação com o sulfato e a 8-hidroxi-mirtazapina com o ácido glucurónico para a sua excreção. (Timmer et al., 2000)

1.2.1.7. Trazodona

Derivado sintético da triazolopiridina, a trazodona é um antidepressivo multimodal que inibe a recaptção de serotonina e atua também como antagonista adrenérgico e anti-histamínico, e é utilizada não só no tratamento da depressão, como da insónia, devido às suas propriedades sedativas. (National Center for Biotechnology Information, 2022e) (Moreno et al., 1999) Este fármaco é altamente metabolizado no fígado em **m-clorofenilpiperazina** (mCPP), por *N*-desalquilação, sendo este o seu metabolito ativo. (Rotzinger et al., 1998)

1.2.1.8. Mianserina

A mianserina aumenta a libertação de noradrenalina através de um mecanismo duplo (inibição dos NET e antagonismo dos α -2 adrenoceptores pré-sináptico), sendo por isso classificada como um antidepressivo multimodal. Farmacologicamente, possui os mesmos efeitos da trazodona. (National Center for Biotechnology Information, 2022f) (Alvano and Zieher, 2019) Por *N*-desalquilação a mianserina é transformada em *N*-desmetil-(R)-mianserina e em desmetilmianserina, através de *N*-oxidação é metabolizada em *N*-oxi-mianserina e em *N*-oxi-(R)-mianserina e por hidroxilação aromática é transformada em 8-hidroxi-(R)-mianserina e em 8-hidroxi-mianserina. (Koyama et al., 1996)

1.2.1.9. Amitriptilina

A amitriptilina é um antidepressivo tricíclico (amina terciária) e analgésico que atua como inibidor da recaptção da serotonina e norepinefrina, com maior ação no bloqueio da serotonina, sendo adequado para o tratamento perturbação depressiva maior. Além da sua função antidepressiva, este fármaco também permite tratar cefaleia de tensão crónica e dor neuropática em adultos. (Alvano and Zieher, 2019) O metabolismo da amitriptilina é essencialmente obtido por reações de desmetilação e hidroxilação, seguindo-se o metabolismo de fase II (reações de conjugação). No metabolismo de fase I é obtida a 10-hidroxi-amitriptilina e a nortriptilina que, por si só, também é um fármaco antidepressivo e é o metabolito ativo da amitriptilina. (Dean, 2012)

1.2.1.10. Nortriptilina

A nortriptilina é uma amina secundária do grupo dos antidepressivos tricíclicos e é um inibidor mais potente da recaptção da norepinefrina do que de serotonina, permitindo o aumento da concentração de norepinefrina no sistema nervoso central. Permite, assim, tratar a perturbação depressiva maior a curto-prazo. Além de utilizada como fármaco, a nortriptilina é também um metabolito da biotransformação

da amitriptilina. (National Center for Biotechnology Information, 2022g) Antes da conjugação com ácido glucorónico, a nortriptilina é metabolizada no fígado por desmetilação e hidroxilação, sendo o seu principal metabolito ativo a E-10-hidroxi-nortriptilina. (Piatkov and Jones, 2011)

1.2.1.11. Clomipramina

Assim como a amitriptilina, a clomipramina é um antidepressivo tricíclico do tipo amina terciária, sendo um inibidor mais potente da recaptção da serotonina do que as aminas secundárias. Este fármaco tem funções terapêuticas sobretudo para casos de POC, síndrome de Tourette, esquizofrenia e depressão. (National Center for Biotechnology Information, 2022h) O metabolismo da clomipramina ocorre por *N*-desmetilação, 8- e 2-hidroxilação e *N*-oxidação, originando *N*-desmetilclomipramina, 8-hidroxiclomipramina, 2-hidroxiclomipramina e *N*-oxi-clomipramina, respetivamente. (Nielsen et al., 1996)

1.2.2. Antipsicóticos

Os medicamentos antipsicóticos são utilizados no tratamento de diversos distúrbios psiquiátricos graves, como transtornos psicóticos ou maníacos, demência, delírio, transtorno de personalidade *borderline*, esquizofrenia, síndrome de Tourette ou transtornos delirantes. Estes fármacos são divididos em dois grandes grupos, de acordo com a sua evolução: antipsicóticos de primeira geração ou típicos (FGA, *first generation antipsychotics*) e antipsicóticos de segunda geração ou atípicos (SGA, *second generation antipsychotics*). (Chokhawala and Stevens, 2021) (Gardner, 2005)

Os FGA (antipsicóticos convencionais/tradicionais), como a ciamemazina, o haloperidol e a levomepromazina, são antagonistas dos recetores de dopamina, que induzem sintomas **extrapiramidais** (SEP), incluindo distonias, discinesias e inquietação motora, quando utilizados em dosagens clinicamente eficientes. Para contornar estes efeitos, foram sendo desenvolvidos os SGA (antipsicóticos modernos), como a clozapina, olanzapina, e quetiapina que, ao invés dos anteriormente referidos, originam baixos ou desprezáveis níveis de efeitos adversos indesejáveis, mas com a mesma capacidade de tratar os sintomas psicóticos, por serem antagonistas dos recetores de serotonina e dopamina. (Gardner, 2005) (Seeman, 2004)

Foi um estudo de 1988 que impulsionou o desenvolvimento de fármacos antipsicóticos atípicos, pois demonstrou que a eficácia da clozapina (antipsicótico atípico) era superior à da clorpromazina (antipsicótico típico), sem apresentar os efeitos adversos característicos da segunda, em utentes diagnosticados com esquizofrenia e resistentes a altas doses de haloperidol. A clozapina passou a integrar o novo grupo dos antipsicóticos atípicos por possuir muito baixo risco de SEP adversos. Desde então, os antipsicóticos comercializados mais recentemente, têm vindo a ser designados com este termo, embora diverjam química e farmacologicamente. (Gardner, 2005)

A descoberta de que os agonistas da dopamina provocavam ou agravavam a psicose e de que os seus antagonistas eram eficientes contra os sintomas psicóticos, veio comprovar que a esquizofrenia é causada pelo aumento da atividade cerebral da dopamina. Na generalidade dos medicamentos antipsicóticos, sobretudo em casos em que ocorrem delírios e alucinações, a sua função de bloqueio dos recetores D₂ da dopamina é uma ação farmacológica suficiente, no entanto não é o único mecanismo antipsicótico existente. (Gardner, 2005)

Os antipsicóticos típicos, sobretudo os que possuem grande afinidade pelos recetores D₂ (por exemplo o haloperidol), mesmo em doses reduzidas, apresentam riscos elevados de sintomas extrapiramidais, porque interferem bastante com a neurotransmissão dopaminérgica. Ao contrário, o baixo risco de SEP associados aos antipsicóticos atípicos pode estar associado à sua maior afinidade pelos recetores de serotonina e não de dopamina, no entanto, este fenómeno não é linear em todos os antipsicóticos modernos. (Gardner, 2005)

A ciamemazina, a clozapina, o haloperidol, a levomepromazina, a olanzapina e a quetiapina são os antipsicóticos mais detetados em amostras de sangue *postmortem* recolhidas em sede de autópsia e, por isso, é importante que existam procedimentos toxicológicos que permitam a determinação destes compostos em amostras biológicas, nomeadamente em sangue, uma vez que podem permitir estabelecer uma relação com a causa da morte.

1.2.2.1. Ciamemazina

A ciamemazina é um derivado de fenotiazina que pertence ao grupo dos antipsicóticos típicos por ser um antagonista dos recetores D₂ da dopamina, no entanto, comporta-se como um antipsicótico atípico uma vez que bloqueia mais fortemente os recetores da serotonina (5-HT_{2A}) do que os da dopamina, motivo pelo qual também possui atividade ansiolítica. A ciamemazina não só é utilizada no controlo da esquizofrenia como também no da ansiedade. (Matias, 2015) (Hodé et al., 2011) Este fármaco é metabolizado no fígado em *N*-desmetil-ciamemazina e sulfóxido de ciamemazina, que são eliminados via urinária ao fim de 72 horas. (Hodé et al., 2011) (Bourin et al., 2006)

1.2.2.2. Clozapina

A clozapina é um derivado sintético da dibenzo-diazepina interage com os recetores da serotonina, dopamina, histamina, acetilcolina muscarínica, com os adrenorecetores α_1 e liga-se fracamente aos recetores D₂ da dopamina, não sendo estes últimos o seu maior alvo. Esta complexidade reduz o risco de sintomas extrapiramidais, sendo por isso classificada como um antipsicótico moderno, no tratamento da esquizofrenia. (Gardner, 2005) A clozapina é metabolizada no fígado no seu ativo e principal metabolito, a norclozapina (ou *N*-desmetilclozapina), por *N*-desmetilação, mas também em *N*-oxi-clozapina (metabolito inativo) por *N*-oxidação, sofrendo posteriormente reações de glucuronização para a sua excreção. (Dean and Kane, 2012) (Erickson-Ridout et al., 2012)

1.2.2.3. Haloperidol

O haloperidol é o fármaco anticonvulsivante derivado da fenilbutilpiperidina mais utilizado no tratamento da esquizofrenia aguda e crónica. Esta substância tem efeitos significativos na transmissão colinérgica e bloqueia os recetores D₂ da dopamina no sistema mesolímbico do cérebro, inibindo a sua neurotransmissão, provocando efeitos anti alucinogénios. (Mahadik et al., 1988) Este fármaco possui um extenso metabolismo no fígado, sendo que apenas 1% do mesmo não é metabolizado. É convertido, por *N*-desalquilação oxidativa em ácido *p*-fluorobenzoilpropiónico e em 4-(4-clorofenil)-4-hidroxipiperidina, por redução é transformado em haloperidol reduzido, por oxidação em metabolitos piridínio e em haloperidol glucurónido por glucuronização. (Kudo and Ishizaki, 1999)

1.2.2.4. Levomepromazina

A levomepromazina é um derivado de fenotiazina, do grupo dos antipsicóticos típicos, que bloqueia os recetores adrenérgicos e colinérgicos, produzindo efeitos antipsicóticos e sedativos, pelo que é utilizada no tratamento do transtorno bipolar, fases maníacas e esquizofrenia. (Warot et al., 1988) O seu mecanismo de ação não é totalmente conhecido, mas é sabido que atua como antagonista dos recetores dopaminérgicos, serotoninérgicos e colinérgicos, sendo que a sua atividade se assemelha à da clorpromazina. (National Center for Biotechnology Information, 2022i) Este fármaco é extensamente metabolizado antes de ser eliminado do organismo por hidroxilação aromática, *O*- e *N*-desmetilação, sulfoxidação e conjugação, possuindo mais de dez metabolitos. (Hals and Dahl, 1995)

1.2.2.5. Olanzapina

A olanzapina é um derivado sintético da tienobenzodiazepina que é utilizado no tratamento da esquizofrenia e da bipolaridade. Este fármaco é antagonista monoaminérgico seletivo, ligando-se fortemente aos recetores dopaminérgicos, serotoninérgicos, muscarínicos, histamina e α 1-adrenérgicos e fracamente ao GABA_A, o que limita o risco de SEP adversos. (Gardner, 2005) A principal via de biotransformação da olanzapina é o metabolismo de fase II, através da conjugação direta com ácido glucorónico, no entanto, também pode ser metabolizada por hidroxilação em 2-hidroxiometil-olanzapina, por *N*-desmetilação em 4'-*N*-desmetil-olanzapina e por *N*-oxidação em *N*-oxi-olanzapina. (Söderberg and Dahl, 2013)

1.2.2.6. Quetiapina

A quetiapina é um fármaco antipsicótico derivado da dibenzotiazepina e, como os restantes antipsicóticos atípicos referidos, liga-se mais fracamente ao recetor de dopamina do que a própria dopamina e tem atividade semelhante à olanzapina. (Seeman, 2004) Tal como na maioria das drogas e medicamentos, a quetiapina metaboliza-se, extensivamente, sobretudo no fígado, onde ocorre a sua oxidação, sulfoxidação, hidroxilação, *N*- e *O*-desalquilação e reações de fase II, sendo o seu principal metabolito ativo a *N*-desalquil-quetiapina, que produz um efeito antidepressivo. (Bakken et al., 2012) (Urichuk et al., 2008)

1.2.3. **Anticonvulsivantes**

A epilepsia é uma condição neuronal que afeta entre 0,5 a 1% da população mundial, para a qual existe tratamento farmacológico. (Malawska, 2012) Os anticonvulsivantes, também denominados por medicamentos antiepiléticos, AED (*anti epilepsy drugs*), são a base do tratamento da epilepsia, do transtorno bipolar e do controlo de impulsos, uma vez que estabilizam o humor. (Chong and Lerman, 2016) (WebMD Medical Reference, 2021)

Estes fármacos podem ser classificados, genericamente, em quatro grupos, de acordo com a sua atividade: moduladores de canais iónicos (onde se insere a carbamazepina e a fenitoína), potenciadores do ácido γ -aminobutírico (GABA) (como o fenobarbital), mecanismo de ação múltiplo (topiramato) e os estabilizadores de neurónios talâmicos. (Malawska, 2012)

Dos anticonvulsivantes existentes, a carbamazepina, a fenitoína, o fenobarbital, o levetiracetam e o topiramato são os de maior importância pois são aqueles que são detetados com maior frequência em

amostras de sangue *postmortem* provenientes de autópsias médico-legais realizadas pelo INMLCF, I.P., sendo crucial o desenvolvimento de procedimentos toxicológicos que permitam a determinação destes compostos em amostras biológicas, uma vez que podem permitir estabelecer uma relação com a causa da morte.

1.2.3.1. Carbamazepina

Este fármaco é um anticonvulsivante tricíclico, relacionado quimicamente com a família dos antidepressivos tricíclicos. O seu efeito anticonvulsivante é obtido através do bloqueio dos canais de sódio dependentes de voltagem e possui também propriedades analgésicas. (Chong and Lerman, 2016) A carbamazepina é maioritariamente metabolizada no fígado em 10,11-epoxycarbamazepina (por oxidação), o seu metabolito ativo, que é posteriormente convertido, por hidrólise, em 10,11-diolcarbamazepina (metabolito inativo) para ser excretada pela urina na forma livre ou conjugada. (Yoshimura et al., 1998)

1.2.3.2. Fenitoína

A fenitoína é um dos AED mais prescritos nos Estados Unidos da América e possui o mesmo mecanismo de ação da carbamazepina no tratamento das convulsões, uma vez que bloqueia os canais de sódio dependentes de voltagem, suprimindo o disparo elétrico repetitivo de alta frequência das convulsões. (Chong and Lerman, 2016) (Thorn et al., 2012) Este fármaco é metabolizado num intermediário óxido de areno reativo que é responsável por alguns dos efeitos adversos da fenitoína. Por sua vez, este é metabolizado em hidroxifenitoína (metabolito inativo), que se pode conjugar com ácido glucurónico para ser excretada ou ainda metabolizada em catecol. O óxido de areno também pode ser convertido, por hidrólise, em dihidrodiol-fenitoína, que também se pode metabolizar em catecol. O catecol pode oxidar espontaneamente originando uma quinona reativa ou ser metabolizado em metilcatecol, que é eliminado na urina. (Thorn et al., 2012)

1.2.3.3. Fenobarbital

O fenobarbital foi o primeiro anticonvulsivante eficaz introduzido em uso clínico, que pertence à classe dos barbitúricos e é utilizado como sedativo e no tratamento de convulsões, através do prolongamento da ativação do recetor GABA_A, reduzindo a atividade dos neurónios. (M. Pacifici, 2016) (Chong and Lerman, 2016) Este fármaco é metabolizado por hidroxilação no fígado em 4-hidroxifenobarbital e excretado pelos rins, na urina, na sua forma conjugada, maioritariamente por conjugação com ácido glucurónico, podendo também ocorrer a conjugação com sulfato. (M. Pacifici, 2016) (Kadi et al., 2011)

1.2.3.4. Levetiracetam

O levetiracetam é um derivado de pirrolidona e é um AED recente, motivo pelo qual não está inserido em nenhuma categoria de classificação dos anticonvulsivantes, inclusivamente porque diverge quimicamente dos mesmos. Este fármaco liga-se neuronalmente à proteína da vesícula sináptica 2A, modulando a exocitose, inibe parcialmente os canais de cálcio e a atividade excessiva entre os neurónios. (Lyseng-Williamson, 2011) A principal via metabólica do levetiracetam é a hidrólise enzimática do grupo acetamida, não envolvendo as enzimas do citocromo P450 e, contrariamente à maioria das drogas e medicamentos, este fármaco sofre primeiramente hidrólise no sangue. (Patsalos, 2004)

1.2.3.5. Topiramato

O topiramato é um monossacárido substituído por sulfamato, utilizado não só no tratamento de convulsões, mas também no tratamento do transtorno bipolar devido ao seu múltiplo mecanismo de ação, uma vez que modula os canais iônicos de sódio e cálcio dependentes de voltagem e potencia a ação do GABA. (Chong and Lerman, 2016) Este fármaco metaboliza-se por metabolismo de fase I (hidroxilação, hidrólise) e fase II (glucuronização) originando, entre outros, os metabolitos 2,3-desisopropilideno topiramato, 4,5-desisopropilidene topiramato, 9-hidroxi-topiramato e 10-hidroxi-topiramato. (Caldwell et al., 2005)

1.2.4. **Analgésicos**

A dor representa cerca de 70% das queixas de pacientes que se dirigem a consultas ou a serviços de urgência. (Botea, 2020) Além de ser considerada a percepção de uma sensação, a dor também é a reação psicológica do paciente à mesma e, por isso, esta varia de acordo com o seu significado e humor da pessoa. O limiar da dor é diminuído na presença de tristeza, ansiedade e depressão e aumentado quando existe toma de analgésicos, ansiolíticos ou antidepressivos. (Twycross, 1978)

O tratamento habitual e maioritariamente utilizado para reduzir ou tratar a dor é através da utilização de fármacos analgésicos, que são prescritos de acordo com o tipo de dor: recorrente, aguda, crónica ou crónica de malignidade. (Botea, 2020)

Os três analgésicos cetamina, metadona e tramadol demonstraram ser das drogas de uso mais prevalente, depois das metanfetaminas e da heroína. (Cheng et al., 2008)

1.2.4.1. Cetamina

A cetamina é um medicamento com propriedades sedativas, amnésicas e alucinogénias, além de analgésicas, amplamente utilizado como droga recreativa em discotecas devido às suas propriedades. (Cheng et al., 2008) Este fármaco é um bloqueador de poros de canal aberto, que regula o fluxo de catiões e a excitação neuronal. (Zarate and Niciu, 2015) Foi demonstrado, por Bermat et al., que a cetamina em doses reduzidas é capaz de produzir efeitos antidepressivos em pacientes com transtorno depressivo maior e bipolaridade. (Yang et al., 2019) O seu metabolismo ocorre por *N*-desalquilação, originando o seu metabolito principal (a norcetamina), hidroxilação do anel de ciclohexona e metabolismo de fase II por conjugação com ácido glucurónico. (Dinis-Oliveira, 2017)

1.2.4.2. Metadona

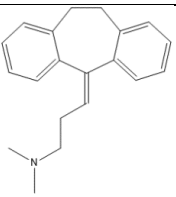
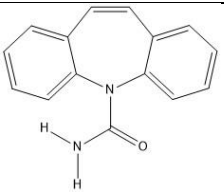
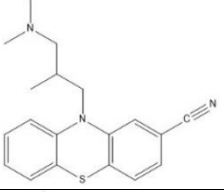
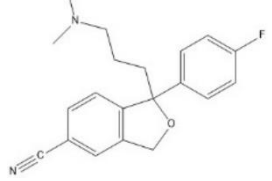
A metadona é um opioide sintético de longa duração utilizado no tratamento da toxicod dependência, da dispneia e da dor severa, que bloqueia a recaptação de serotonina e norepinefrina na fenda pré-sináptica e possui efeitos adversos característicos dos opioides, tais como náusea e sedação. (Friedrichsdorf, 2019) A metadona tem um metabolismo de fase I extenso, sofrendo primeiramente *N*-desmetilação, formando um composto altamente instável que se converte espontaneamente, por ciclização e desidratação, em EDDP (2-etil-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina) e este, por sua vez, é convertido em EMDP (2-etil-5-metil-3,3-difenil-1-pirrolina), por *N*-desmetilação. (Volpe et al., 2018)

1.2.4.3. Tramadol

O tramadol pertence à classe dos opioides e, desde 1977, tem vindo a ser utilizado como analgésico narcótico, com propriedades análogas à codeína, bloqueando a recaptação de serotonina e norepinefrina, sendo por isso recomendado para o tratamento da dor moderada a severa. (Cheng et al., 2008) (Botea, 2020) O uso de tramadol com antidepressivos dos grupos MAOI ou SNRI pode originar consequências sérias ou até mesmo fatais. (Botea, 2020) Este fármaco metaboliza-se no organismo por *N*- e *O*-desmetilação, produzindo *N*-desmetil-tramadol e *O*-desmetil-tramadol, e conjugação e possui mais de 20 metabolitos. (Kano and Miyagawa, 2006)

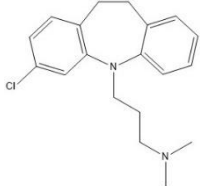
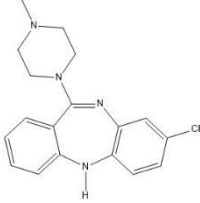
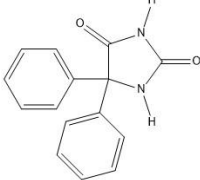
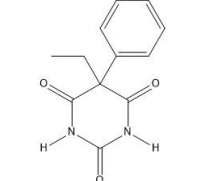
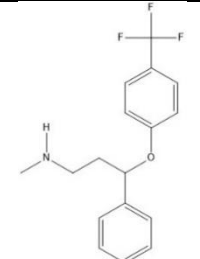
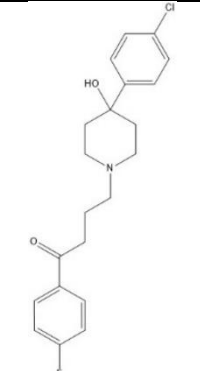
Na tabela 1.1 estão resumidas as principais propriedades químicas e farmacocinéticas dos fármacos antidepressivos, antipsicóticos, anticonvulsivantes e analgésicos, atrás referidos e que são maioritariamente detetados em amostras de sangue *postmortem* de cadáveres autopsiados na Delegação do Sul do INMLCF, I.P., bem como nos Gabinetes Médico-Legais que atuam na sua dependência, e que são objeto de estudo deste trabalho.

Tabela 1.1. Tabela resumo das propriedades dos analitos em estudo: dosagem terapêutica (ng/mL), dosagem tóxica (ng/mL), pico plasmático ($T_{\text{máx}}$, em horas), ligação a proteínas plasmáticas (%) e semivida ($T_{1/2}$, em horas). (C. Moffat et al., 2011) (Kim et al., 2021) (Repetto and Repetto, 2015) (Jann et al., 1993) (Landmark and Johannessen, 2020) (Altamura et al., 1994) (U.S. Department of Health and Human Services, 2018) (Bourin et al., 2006)

Fármaco/ Fórmula química	Massa molecular (g/mol)	Estrutura molecular	Dosagem terapêutica (ng/mL)	Dosagem tóxica (ng/mL)	$T_{\text{máx}}$ (h)	Ligação proteica (%)	$T_{1/2}$ (h)
Amitriptilina $C_{20}H_{23}N$	277,4		50-200 (s)	300-500 (p)	2-12	95	25
Carbamazepi- na $C_{15}H_{12}N_2O$	236,27		3000-10000 (s)	10000- 12000 (p)	19-26	75-80	35-40
Ciamemazina $C_{19}H_{21}N_3S$	323,5		500 (p)	9800 (L, s)	2,25	-	11
Citalopram $C_{20}H_{21}FN_2O$	324,4		10-200 (p)	400 (p); 500 (L, s)	4	80	35

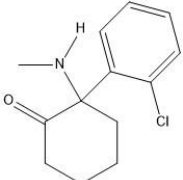
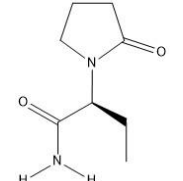
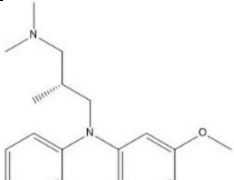
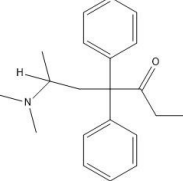
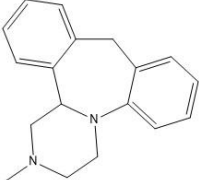
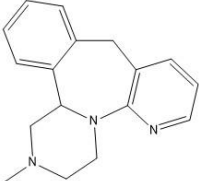
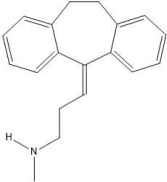
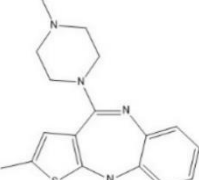
p – Concentração no plasma; s – concentração no sangue; L – letal; ¹ – administração aguda; ² – administração crónica; * – padrão de eliminação de duas fases.

Tabela 1.1. (continuação)

Fármaco/ Fórmula química	Massa molecular (g/mol)	Estrutura molecular	Dosagem terapêutica (ng/mL)	Dosagem tóxica (ng/mL)	T _{máx} (h)	Ligação proteica (%)	T _{1/2} (h)
Clomipramina C ₁₉ H ₂₃ ClN ₂	314,9		20-200 (p)	400 (p); 1000 (L, s)	2-6	97-98	32
Clozapina C ₁₈ H ₁₉ ClN ₄	326,8		100-500 (p)	600 (p); 4500 (L, s)	1,1- 3,6	97	8
Fenitoína C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	252,27		3000-15000 (p)	20000 (p); 50000 (L, s)	1,5-3	90	7-42
Fenobarbital C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₃	232,23		6000-30000 (s)	30000 (s); 50000 (L, s)	2-8	20-45	53-118
Fluoxetina C ₁₇ H ₁₈ F ₃ NO	309,33		100-500 (p)	1000 (p); 6000 (L, s)	6-8	94	1-3 dias ¹ 4-6 dias ²
Haloperidol C ₂₁ H ₂₃ ClFNO ₂	375,6		0,5-40 (p)	50 (p); 1000 (L, s)	1,7- 6,1	98,4- 92,5	14,5- 36,7

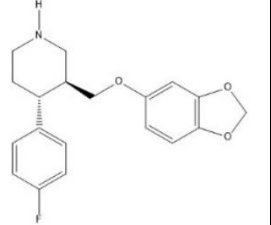
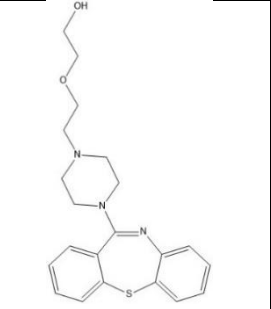
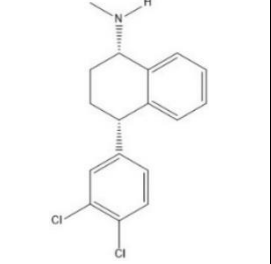
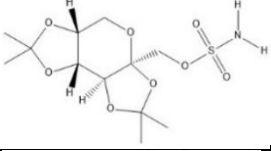
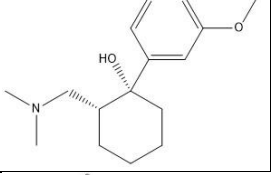
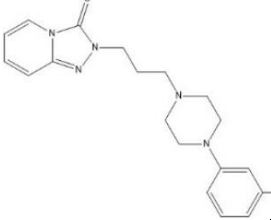
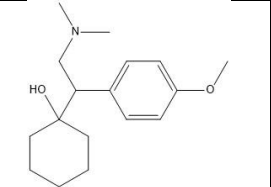
p – Concentração no plasma; s – concentração no sangue; L – letal; 1 – administração aguda; 2 – administração crônica;
* – padrão de eliminação de duas fases.

Tabela 1.1. (continuação)

Fármaco/ Fórmula química	Massa molecular (g/mol)	Estrutura molecular	Dosagem terapêutica (ng/mL)	Dosagem tóxica (ng/mL)	T _{máx} (h)	Ligação proteica (%)	T _{1/2} (h)
Cetamina C ₁₃ H ₁₆ ClNO	237,72		100-6000 (p)	7000 (p); 7000 (L, s)	8,5 min.	53,5	3
Levetiracetam C ₈ H ₁₄ N ₂ O ₂	170,21		3000-40000 (p)	400000 (p)	1	< 10	6-8
Levomepro- mazina C ₁₉ H ₂₄ N ₂ OS	328,5		80 (s), 5- 150 (p)	400 (p); 4000 (L, s)	-	-	20
Metadona C ₂₁ H ₂₇ NO	309,4		30-300 (s)	500-1000 (p); 400 (L, s)	1-7,5	85-90	7-59
Mianserina C ₁₉ H ₂₂ ClN ₅ O	371,9		50-100 (p)	100-500 (p); 100 (L,s)	1-3	90	10-17
Mirtazapina C ₁₇ H ₁₉ N ₃	265,35		20-100 (p)	1300-2300 (p)	2	85	20-40
Nortriptilina C ₁₉ H ₂₁ N	263,4		50-200 (p)	>250 (p); 10000 (L, s)	7-8,5	93	16-38
Olanzapina C ₁₇ H ₂₀ N ₄ S	312,4		10 (s)	100-200 (p); 160 (L, s)	6	93	21-54

p – Concentração no plasma; s – concentração no sangue; L – letal; 1 – administração aguda; 2 – administração crônica;
* – padrão de eliminação de duas fases.

Tabela 1.1. (continuação)

Fármaco/ Fórmula química	Massa molecular (g/mol)	Estrutura molecular	Dosagem terapêutica (ng/mL)	Dosagem tóxica (ng/mL)	T _{máx} (h)	Ligação proteica (%)	T _{1/2} (h)
Paroxetina C ₁₉ H ₂₀ FNO ₃	329,4		50-250 (p)	350 (p); 4000 (L, s)	-	95	21
Quetiapina C ₂₁ H ₂₅ N ₃ O ₂ S	383,5		20-400 (p)	1800 (p); 5000 (L, p)	1,5	83	6-7
Sertralina C ₁₇ H ₁₇ Cl ₂ N	306,2		50-250 (p)	300 (p); 400 (L, s)	4,5- 8,4	98-99	26
Topiramato C ₁₂ H ₂₁ NO ₈ S	339,36		2000-10000 (p)	20000 (p)	1,8- 4,3	15-41	19-23
Tramadol C ₁₆ H ₂₅ NO	263,37		100-800 (s)	1000 (s, p); 2000 (L, s)	2	20	5-6
Trazodona C ₁₉ H ₂₂ ClN ₅ O	371,9		300-1500 (p)	2000-4000 (p); 15000 (L, s)	1	89-95	3-6* 5-9*
Venlafaxina C ₁₇ H ₂₇ NO ₂	277,4		40-150 (750) (p)	6000 (s); 45000 (L, s)	-	27	5

p – Concentração no plasma; s – concentração no sangue; L – letal; ¹ – administração aguda; ² – administração crônica;
* – padrão de eliminação de duas fases.

1.3. Importância médico-legal do estudo de fármacos antidepressivos, antipsicóticos, anticonvulsivantes e analgésicos

A utilização de medicação para controlar as perturbações mentais é fundamental, contudo existem alguns riscos associados à utilização da mesma. Poderá ocorrer a sobredosagem (acidental ou não) de fármacos antidepressivos, antipsicóticos, anticonvulsivantes e/ou analgésicos e a toma de diferentes fármacos em simultâneo, que podem conduzir a intoxicações. No caso de indivíduos que se encontrem em tristeza profunda (como consequência da sua perturbação), estes poderão praticar ou tentar o suicídio, através da toma inadequada e premeditada das substâncias que lhe foram prescritas. Também se pode dar o caso de, em situação de toma incorreta e/ou excessiva dos fármacos prescritos, ocorrer uma intoxicação acidental.

Devido ao número elevado de intoxicações e suicídios associados à toma de antidepressivos, antipsicóticos, anticonvulsivantes e analgésicos, é de interesse da comunidade científica detetar e quantificar estas substâncias em matrizes biológicas (maioritariamente, em urina e sangue), uma vez que os resultados obtidos permitem auxiliar o médico-legista na determinação da causa e da etiologia médico-legais da morte. Poderão também permitir retirar conclusões relativamente ao estado de saúde em particular de cada indivíduo antes da morte e, da população em geral, reunindo todos os dados obtidos o que possibilita uma melhor monitorização da medicação prescrita e controlo do desenvolvimento das doenças mentais.

1.4. Medicina Legal e Toxicologia Forense

A autópsia médico-legal visa determinar a origem do óbito e as suas circunstâncias. Assim, esta só está concluída após ser feita a colheita de todas as amostras necessárias para se proceder aos exames complementares de diagnóstico, uma vez que estes possibilitam o apuramento de factos que a simples observação do corpo durante a autópsia não permite. (Calabuig, 2004)

A toxicologia forense é um dos exames complementares de diagnóstico, sendo a ciência que estuda as intoxicações e os agentes que as provocam, os tóxicos, com propósitos médico-legais. A diferença entre toxicologia clínica e toxicologia forense não é a ciência em si, mas o fim para o qual se destina, sendo que no caso da toxicologia forense o seu objetivo é dar resposta ao sistema legal, nomeadamente, em casos de segurança rodoviária, doping, crimes facilitados por drogas (p.e. abusos sexuais), testes ambientais e, no que concerne em casos de morte, à determinação da causa da mesma. (Smith and Bluth, 2016) (Drummer, 2010) A análise engloba, entre outros, o estudo do tóxico (propriedades químicas), mecanismos de ação, efeitos do seu consumo e os métodos de análise de substâncias (qualitativos e quantitativos). (Calabuig, 2004)

As análises toxicológicas são um procedimento normal e rotineiro decorrente das autópsias, uma vez que, se a autópsia for realizada dentro de um curto espaço de tempo após a morte e for realizada a colheita de matriz biológica (geralmente sangue) atempadamente, é possível identificar e até mesmo quantificar as substâncias presentes no cadáver no momento da morte, uma vez que o metabolismo das substâncias cessa após a mesma. (Smith and Bluth, 2016) Este tipo de análises requer equipamento analítico especializado e profissionais qualificados, sendo também importante o conhecimento da farmacocinética e farmacodinamia dos compostos, isto é, o percurso das substâncias no corpo humano e as suas consequências físicas, respetivamente. (Drummer, 2010)

1.4.1. Farmacocinética

A farmacocinética é o percurso realizado por um xenobiótico no interior do corpo humano, desde o momento da sua administração até à sua excreção. Assim, este percurso divide-se em quatro etapas: absorção, distribuição, metabolismo e eliminação. (Calabuig, 2004)

A absorção é a via pela qual os metabolitos entram no corpo. Pode dar-se por via digestiva, respiratória ou pela pele. A via digestiva é a mais frequente em intoxicações acidentais, suicidas ou homicidas e também a de interesse neste trabalho, uma vez que estão a ser estudados medicamentos, que são administrados oralmente. (Calabuig, 2004)

A distribuição dá-se quando ocorre passagem do xenobiótico para o sangue, entrando na corrente sanguínea e percorrendo o fluido extravascular, tecidos e locais de depósito. Este mecanismo é o mais eficiente que o corpo possui a fim de evitar consequências negativas de um tóxico letal que se degrade lentamente, pois permite assim que se tente manter um equilíbrio total do sistema. (Calabuig, 2004)

Para um xenobiótico ser eliminado pelo organismo, este necessita de sofrer biotransformação (também designado por metabolismo), que induz diversas modificações químicas nas moléculas, originando metabolitos dos compostos originais e que, usualmente, são menos tóxicos que os primeiros. Este processo tem como objetivo tornar os compostos lipossolúveis em hidrossolúveis para serem excretados, geralmente, através de urina e/ou fezes. O metabolismo pode ser de fase I (os compostos sofrem oxidação, redução ou hidrólise) ou de fase II (conjugação) e ocorre, na maioria dos casos, no fígado. (Calabuig, 2004) (Ereshefsky et al., 1995)

No metabolismo de fase I a maioria das oxidações são realizadas pelo citocromo P450 (CYP), um conjunto de isoenzimas, situadas sobretudo no fígado. As isoenzimas mais importantes na biotransformação são a CYP1, CYP2 e CYP3 que realizam hidroxilação, desalquilação e desmetilação. (Ereshefsky et al., 1995) Na biotransformação de fase II o xenobiótico oxidado conjuga-se, geralmente com ácido glucorónico (no fígado), formando uma molécula mais polar, capaz de ser eliminada. (Calabuig, 2004)

Após obtenção dos produtos finais, mais polares e hidrofílicos, capazes de serem excretados, estes são eliminados do corpo humano por diferentes vias, como a urina, as fezes, o suor, a saliva e o ar exalado. (Calabuig, 2004)

1.4.2. Farmacodinâmica

A farmacodinâmica é a resposta biológica do corpo ao xenobiótico, isto é, a relação entre a concentração do xenobiótico no local de ação e o seu consequente efeito, englobando os efeitos adversos que se fazem sentir, resultantes da concentração do mesmo no corpo.

Na farmacodinâmica a variabilidade biológica resulta na variabilidade de concentração mínima efetiva (MEC, *minimum effective concentration*) e de concentração máxima tolerada (MTC, *maximum tolerated concentration*) entre indivíduos, sendo que a avaliação destes parâmetros permite estabelecer as faixas de concentração terapêutica, tóxica e letal para cada substância. A banda de concentrações terapêuticas é aquela para a qual existe uma grande probabilidade de se obter o efeito terapêutico desejado, com baixa probabilidade de obtenção de efeitos indesejados (tóxicos). (Mehrotra et al., 2007)

1.4.3. Matrizes biológicas

As matrizes biológicas preferencialmente utilizadas para a análise de substâncias, nomeadamente drogas e medicamentos, são o sangue e a urina, uma vez que é através destes que ocorre a distribuição das substâncias pelo corpo e a sua excreção, respetivamente.

In vivo, geralmente é realizada a deteção, identificação e quantificação de substâncias em urina, uma vez que o volume de amostra disponível é maior e, sendo esta a principal via de excreção, as substâncias podem ser detetadas nesta matriz em grandes concentrações. (Drummer, 2010)

Em casos em que tenha ocorrido a morte, é preferencialmente utilizado o sangue. Este fornece a melhor evidência em relação a um xenobiótico no corpo e permite investigar quanto aos seus efeitos farmacológicos. Na colheita de sangue *postmortem*, o sangue periférico (recolhido da artéria femoral) é a matriz de eleição na quantificação de substâncias, uma vez que é a que melhor representa a quantidade em circulação no momento da morte, e a que sofre menos redistribuição *postmortem* no corpo, por se encontrar mais distante do trato gastrointestinal, de onde podem difundir substâncias, e de órgãos que possam começar a sofrer degradação. (Drummer, 2010)

1.5. Instituto Nacional De Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.

Os primeiros serviços médico-legais públicos, designados morgues, em Portugal, surgiram nos finais do século XIX, que tinham como única função a realização de exames de clínica médico-legal e autópsias, segundo a Carta de Lei de 17 de agosto de 1899. Desta forma, foram criados três serviços, cada um encarregue da respetiva região do país: Norte, Centro e Sul – localizados no Porto, Coimbra e Lisboa, respetivamente. (Vieira and Muñoz-Barús, 2009) (D.R. I Série. Nº 20, 1998) Em 1918, as morgues passaram a designar-se Institutos de Medicina Legal do Porto, Coimbra e Lisboa. (Vieira and Muñoz-Barús, 2009)

Como consequência da evolução doutrinária, científica e tecnológica, os serviços médico-legais passaram a abranger novos campos de intervenção pericial, incluindo todas as áreas da prática médico-legal e forense: clínica forense (exames no âmbito da psiquiatria e psicologia forenses e exames periciais a lesões), patologia forense (autópsias, antropologia e histopatologia forenses), genética e toxicologia forenses. (Vieira and Muñoz-Barús, 2009)

Uma vez introduzidas novas competências científicas no INML, surgiu o Decreto-Lei nº 166/2012 de 31 de julho (atualmente em vigor), que decretou a mudança de Instituto Nacional de Medicina Legal para Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses e estabeleceu a missão do INMLCF, I.P.: a colaboração com o Ministério Público, tribunais, órgãos de polícia criminal e ademais serviços e entidades que intercedem no sistema de administração da justiça, através da realização de perícias e exames forenses e médico-legais solicitados no âmbito da lei, fornecendo apoio laboratorial e técnico especializado, para a prática da justiça. (D.R. I Série. Nº 147, 2012)

Quanto à atribuição territorial, o INMLCF, I.P. tem sede em Coimbra com jurisdição em todo o território nacional, num total de 31 gabinetes médico-legais, possuindo também delegações em Lisboa, Coimbra e Porto, designadas como Delegação do Sul, Centro e Norte, respetivamente. Os órgãos do INMLCF, I.P. são o conselho diretivo, o conselho médico-legal, a comissão de ética, e o fiscal único. (Vieira and Muñoz-Barús, 2009) (D.R. I Série. Nº 147, 2012) A organização interna do INMLCF, I.P. é constituída por cinco unidades orgânicas nos serviços centrais (isto é, as delegações), sendo estas: o Departamento de Investigação, Formação e Documentação; o Departamento de Administração Geral; o Serviço de

Tecnologias Forenses e Criminalística; o Serviço de Genética e Biologia Forenses; o Serviço de Química e Toxicologia Forenses. (D.R. I Série. Nº 14, 2013)

Atualmente, o Serviço de Química e Toxicologia Forenses (SQTF) garante a realização de exames e perícias laboratoriais químicas e toxicológicas, tanto no âmbito dos serviços médico-legais como através de solicitação do presidente do conselho diretivo, ou das autoridades competentes. (D.R. I Série. Nº 14, 2013) O SQTF realiza análises de interesse forense, em diversas matrizes biológicas, para a deteção, identificação e quantificação de substâncias, designadamente: substâncias voláteis (p.e. etanol), pesticidas (p.e. organoclorados), drogas de abuso (p.e. canabinoides) e medicamentos (ansiolíticos, antidepressivos, antipsicóticos, anticonvulsivantes). (INMLCF, 2015)

Os laboratórios do SQTF encontram-se acreditados pelo Instituto Português de Acreditação, uma vez que a política de qualidade do serviço certifica que são cumpridos os requisitos da norma internacional NP EN ISO/IEC 17025:2005. (INMLCF, 2015)

1.6. Metodologias de análise de substâncias no sangue

Atualmente, existem diversas metodologias de deteção e quantificação de medicamentos em matrizes biológicas, que têm por base a separação cromatográfica líquida ou gasosa, acoplada à técnica de espetrometria de massa, nomeadamente cromatografia gasosa acoplada à espetrometria de massa (GC-MS, *gas chromatography-mass spectrometry*), cromatografia líquida acoplada à espetrometria de massa (LC-MS, *liquid chromatography-mass spectrometry*) e cromatografia líquida acoplada à espetrometria de massa em *tandem* (LC-MS/MS, *liquid chromatography-tandem mass spectrometry*), para as quais é necessário pré-tratamento das amostras. A preparação de amostras é essencial para a introdução das mesmas no equipamento analítico. (Gumustas et al., 2013)

1.6.1. Preparação de amostras

Antes da análise instrumental por qualquer técnica analítica, é necessário preparar as amostras, isolando os analitos de interesse, uma vez que, tratando-se de matrizes biológicas complexas, como o sangue, é essencial remover o mais possível a matriz devido à sua complexidade que pode interferir com a análise da amostra e até mesmo impedir a sua realização no equipamento analítico. (Sistik et al., 2016) (Gumustas et al., 2013)

As técnicas de preparação de amostras usualmente utilizadas são a extração líquido-líquido (LLE, *liquid-liquid extraction*), extração em fase sólida (SPE, *solid phase extraction*) e precipitação de proteínas (PPT, *protein precipitation*). (Sistik et al., 2016) Sendo as extrações LLE e SPE (técnica atualmente utilizada como preparação de amostras para a confirmação de medicamentos no sangue por GC-MS no SQTF), processos normalmente mais específicos e seletivos, obtendo-se extratos mais limpos, mas por outro lado mais morosos, decidiu optar-se por desenvolver um método com um procedimento extrativo mais simples, rápido e abrangente, a precipitação de proteínas, que aliado a uma análise por LC-MS/MS, equipamento analítico mais sensível e seletivo, permite utilizar volumes de amostra significativamente inferiores.

A precipitação de proteínas pode ser feita, entre outros, através da adição de iões metálicos, sais, polímeros não iónicos e/ou solventes orgânicos e previne que a coluna do cromatógrafo líquido fique obstruída e evita a contaminação na fonte do espectrómetro de massa. Esta é uma técnica simples uma vez que, após adição do solvente de extração selecionado à amostra, este reduz a solubilidade das

proteínas através da minimização das interações hidrofóbicas e do aumento das interações eletrostáticas entre estas, provocando a sua agregação e conseqüente precipitação, sendo que um simples processo de centrifugação permite remover o precipitado. Maioritariamente, a precipitação de proteínas é realizada com recurso a solventes orgânicos, nomeadamente, acetonitrilo, acetonitrilo acidificado, metanol, acetato de etilo e misturas de solventes em diversas proporções. (Sistik et al., 2016) (Majors, 2013)

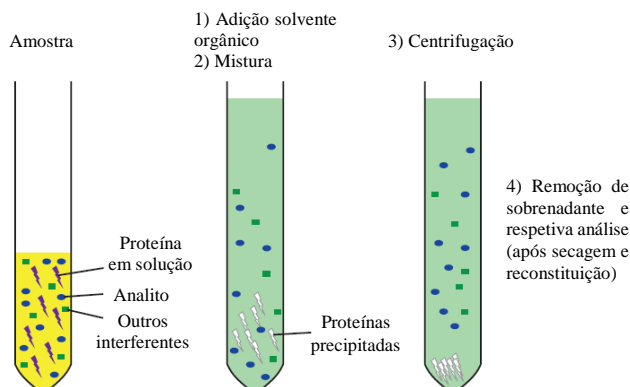


Figura 1.2. Representação esquemática do processo de precipitação de proteínas por adição de solvente orgânico. (Majors, 2013)

1.6.2. Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em *tandem* (UPLC-MS/MS)

1.6.2.1. Cromatografia líquida

A cromatografia líquida (LC, *liquid chromatography*) surgiu por volta de 1903 e, atualmente, é uma técnica analítica que permite separar compostos presentes numa mistura de substâncias, utilizando uma fase móvel na qual é introduzida a amostra e através da qual migram os analitos em estudo pela coluna cromatográfica (onde se encontra a fase estacionária) e, de acordo com as interações físico-químicas que ocorrem entre os analitos e a fase estacionária, os compostos migram diferencialmente, originando maior ou menor retenção dos mesmos. Quando determinado analito elui, o detetor do equipamento gera um sinal (correspondente ao tempo de retenção), que é captado e tratado por um *software* adequado, originando um cromatograma que demonstra a intensidade do sinal obtido em função do tempo de análise. (Gumustas et al., 2013) (Lanças, 2009)

A cromatografia líquida pode ser de fase normal ou de fase reversa, sendo a segunda a maioritariamente utilizada atualmente. Assim, na fase móvel são comumente utilizados como solventes o acetonitrilo, a água e/ou o metanol e esta pode operar em condições isocráticas, ou seja, possui sempre a mesma composição, não se alterando, ou em gradiente, isto é, constituída por vários solventes (geralmente dois) e variando o gradiente entre eles durante o tempo de análise. A segunda permite melhor separação das substâncias devido à diferença de afinidades das mesmas pela fase estacionária e móvel.

De entre os diversos tipos de cromatografia líquida existentes, destaca-se a cromatografia em fase normal e em fase reversa. Primeiramente surgiu a cromatografia de fase normal, na qual a fase estacionária é hidrofílica (polar) e a fase móvel mais hidrofóbica (apolar) sendo, por isso, utilizada para separar analitos moderadamente polares, que possuem maior afinidade com a fase estacionária. Na cromatografia líquida de fase reversa, o que foi utilizado neste estudo, as fases são invertidas, ou seja, a fase estacionária é mais hidrofóbica (apolar), enquanto a fase móvel é mais polar. Assim, as moléculas

apolares ficarão retidas mais tempo na fase estacionária, apresentando maior tempo de retenção (TR). (Pimenta, 2013) Neste tipo de cromatografia, a fase móvel opera habitualmente por gradiente, sendo constituída por um solvente orgânico e um solvente aquoso.

Com a necessidade de obter melhores resultados e de forma mais rápida, foram sendo feitos ajustes na cromatografia líquida, nomeadamente, na redução do tamanho das colunas cromatográficas, diminuição do tamanho das partículas da fase estacionária com o conseqüente aumento da pressão, até se obter uma das melhores versões de LC utilizadas atualmente, denominada cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC, *ultra performance liquid chromatography*, marca registada pela Waters). (Gumustas et al., 2013)

Uma vez que as colunas cromatográficas utilizadas em UPLC são mais curtas, de menor diâmetro e constituídas por partículas mais pequenas (< 2 µm), a resistência ao fluxo da fase móvel é maior, sendo necessário aplicar maior pressão no sistema. Surgiu assim o primeiro equipamento, desenvolvido pela Waters, capaz de operar a 15000 psi, denominado *ultra performance liquid chromatography system* (UPLC), sendo a sua abreviatura utilizada atualmente para designar esta técnica analítica. É utilizado um sistema binário de solventes com duas bombas que permitem obter gradientes dos solventes constituintes da fase móvel a altas pressões, de forma a impulsionar a mesma. (Maldaner and Jardim, 2009) Este aumento da pressão e diminuição do tamanho das partículas utilizadas nas colunas contribuem para uma análise mais rápida, sensível, eficiente e com melhor resolução. (Gumustas et al., 2013) (Lee et al., 2009)

O tempo de retenção obtido pela cromatografia, para determinada fase móvel e estacionária, é característico de cada analito, no entanto este não é único, existindo substâncias diferentes com o mesmo tempo de retenção. Por isso, as técnicas cromatográficas têm por hábito ser acopladas a outras, nomeadamente, no caso da UPLC, a espetrometria de massa em *tandem* (MS/MS). (Lanças, 2009) (Gumustas et al., 2013)

1.6.2.2. Espetrometria de massa

A espetrometria de massa é uma técnica que permite aplicar carga aos analitos, originando iões característicos dos mesmos, o que possibilita determinar as suas massas moleculares e dos seus fragmentos iónicos e, conseqüentemente, identificar determinada substância. (Lanças, 2009)

O modo de aquisição mais utilizado na análise de matrizes biológicas em espetrometria de massa é a monitorização de múltiplas reações (MRM, *multiple reaction monitoring*), que permite a deteção, identificação e quantificação de substâncias específicas numa mistura de substâncias, mesmo quando a separação cromatográfica não é eficaz. Para a aplicação desta técnica são utilizados analisadores de massa em sequência, conhecidos como espectrómetros de massa em *tandem* (MS/MS), nomeadamente, o triplo **quadrupolo** (TQD). Neste sistema, o analito que é introduzido (que, neste caso, provém do cromatógrafo) sofre ionização na fonte e, de seguida, os iões resultantes são encaminhados para um primeiro quadrupolo onde são selecionados de acordo com a sua razão massa/carga (m/z), seguidamente, na célula de colisão, sofrem colisão induzida por um gás inerte e a aplicação de um potencial elétrico dissociando-se em iões produto, que são transferidos para o segundo quadrupolo e detetados pelo mesmo, com razões características e específicas de m/z . (Sherwood et al., 2009)

No acoplamento das técnicas LC-MS, a forma de ionização das moléculas mais utilizada é a ionização por eletropulverização à pressão atmosférica (ESI, *electrospray ionization*), ao qual é aplicada determinada voltagem, e liberta-se deste sob a forma de gotículas que vão sendo dessolvatadas com

recurso a um gás de dessolvatação (o azoto), a elevadas temperaturas (350-450°C). O tamanho das gotículas vai diminuindo e aumenta a repulsão electrostática entre as cargas, até ao momento em que a tensão superficial das gotículas atinge o limite de Rayleigh, momento a partir do qual a tensão superficial que mantém as gotículas unidas se torna menor que a repulsão electrostática das cargas, originando a fissão de Coulomb. Ocorrem sucessivas fissões de Coulomb até à obtenção de um gás constituído pelos analitos ionizados. A ESI pode operar em modo positivo ou em modo negativo, sendo que no primeiro são originados iões moleculares protonados $[M+H]^+$ e no segundo iões moleculares desprotonados $[M-H]^-$. Em alguns casos existe também a formação de aductos, sendo os mais comuns os que resultam da adição de sódio $[M+Na]^+$ e potássio $[M+K]^+$, no modo positivo, e os aductos de cloro $[M+Cl]^-$, no modo negativo. A representação esquemática deste processo (em modo positivo) encontra-se na figura 1.3. (Lanças, 2009) (Banerjee and Mazumdar, 2011) O espectro de massa de apenas um ião limita a informação obtida, mas a combinação com a espectrometria de massa em *tandem* contorna esse inconveniente.

No espectrómetro de massa, os iões são separados de acordo com a sua razão m/z , permitindo a identificação das moléculas a que estes correspondem, bem como a sua quantificação, através da sua abundância. Estes equipamentos possuem uma fonte de ionização (conversão dos analitos em iões), analisador de massas (separação dos iões pela razão m/z), detetor (conversão da corrente dos iões em sinal elétrico) e computador com *software* adequado a receber o sinal e a tratar os resultados. Os analisadores podem ser, entre outros, do tipo quadrupolo, tendo sido este o utilizado na realização deste projeto (representado na figura 1.4). O analisador do tipo quadrupolo é constituído por quatro barras de metal cilíndricas, distribuídas paralelamente em dois pares opostos. São aplicadas uma corrente de radiofrequência (RF, *radio-frequency current*) e uma corrente contínua (DC, *direct current*), de forma alternada entre as barras, que interferem com a trajetória dos iões. Assim, variando as voltagens aplicadas, apenas os iões com específica razão m/z serão encaminhados pelo quadrupolo até ao detetor, enquanto os restantes irão colidir nas barras do quadrupolo e serão eliminados. (Lanças, 2009)

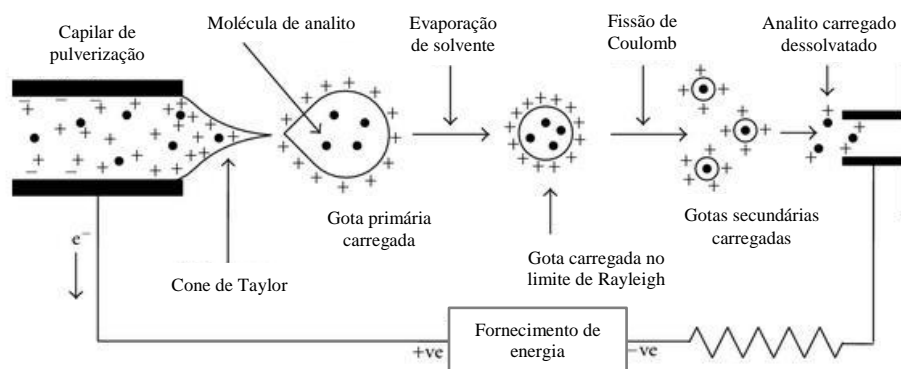


Figura 1.3. Representação esquemática do processo de ionização por eletropulverização (ESI). (Banerjee and Mazumdar, 2011)

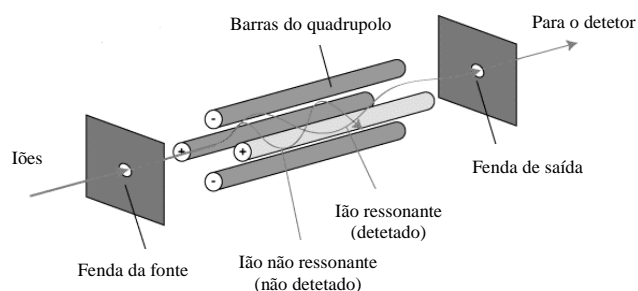


Figura 1.4. Esquema do funcionamento de um analisador de massa quadrupolo. (Argoti, 2008)

No caso dos analisadores do tipo TQD, estão montados em série dois quadrupolos, entre os quais se situa uma célula de colisão, responsável por fragmentar o ião precursor proveniente do primeiro quadrupolo em iões produto característicos, que serão analisados e selecionados consoante determinada razão m/z pelo segundo quadrupolo e seguirão para o detetor, aumentando a sensibilidade e seletividade do método. Nos dois quadrupolos são aplicadas a DC e a RF, mas na célula de colisão apenas é aplicada a corrente RF, uma vez que nesta se utiliza um gás inerte, geralmente o árgon, para colidir com o ião precursor anteriormente formado, como demonstrado na figura 1.5. Os iões provenientes do TQD produzem determinada corrente que é registada pelo detetor em função da sua massa, produzindo um espetro de massas. (Lanças, 2009)

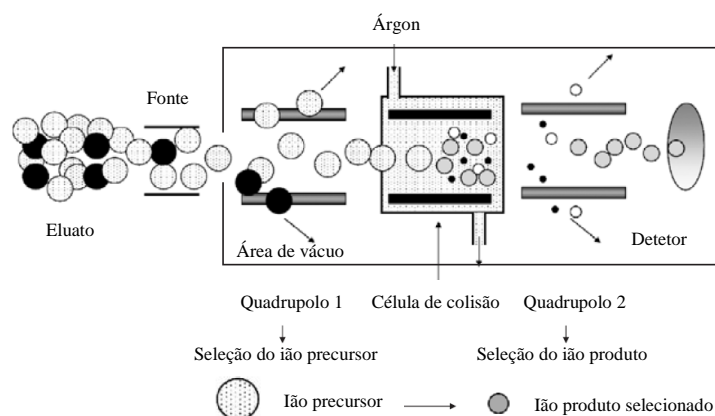


Figura 1.5. Princípio da espectrometria de massa em *tandem* (MS/MS) (Vogesser and Parhofer, 2007)

No modo de aquisição MRM, utilizado neste estudo, é selecionado um único ião precursor proveniente do primeiro quadrupolo e um ião produto proveniente do segundo quadrupolo, ambos com razão m/z específica. Ou seja, os resultados são obtidos em pares de iões, designados por transição e, sempre que possível, para cada analito, são selecionadas duas transições que permitem a sua identificação e quantificação.

1.6.3. Validação do método analítico

Quando é desenvolvido um método analítico é necessário validá-lo, uma vez que o seu objetivo é fornecer resultados com valores consistentes, fiáveis e precisos, demonstrando que se adequa para o fim a que se destina. Através da validação, é garantida a qualidade dos resultados e do método através do qual os mesmos foram obtidos, devendo ser respeitadas as normas em vigor para o tipo de análise que se pretende realizar. (Gumustas et al., 2013) Para métodos analíticos de confirmação qualitativa de substâncias os parâmetros a validar são a especificidade/seletividade, capacidade de identificação, eficiência da extração, avaliação do efeito de matriz, arrastamento (*carryover*), limite de deteção e robustez. (Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX), 2013) (IDCR Working Group (WADA Science), 2021)

1.7. Objetivo

A dissertação desta tese de mestrado tem como objetivo desenvolver e validar uma metodologia analítica mais simples e rápida, tanto em termos de pré-tratamento de amostras como em termos de análise instrumental, rentabilizando o tempo geral de análise em laboratório, e mais abrangente, que permita analisar 25 fármacos utilizados no tratamento de perturbações psicóticas, pertencentes a diferentes classes de substâncias, sem necessidade de aplicar uma técnica em específico para cada um dos grupos de fármacos estudados, garantindo em simultâneo boa sensibilidade e seletividade. Os fármacos selecionados para este trabalho (tabela 1.1.) são os antidepressivos, antipsicóticos, anticonvulsivantes e analgésicos, que são maioritariamente detetados em amostras de sangue *postmortem* de cadáveres autopsiados na Delegação do Sul do INMLCF, I.P., bem como nos Gabinetes Médico-Legais que atuam na sua dependência.

Capítulo 2 – Experimental

2.1. Reagentes e padrões

O acetonitrilo, a água e o metanol CHROMASOLV com grau de pureza para LC-MS, são provenientes da Honeywell Riedel-de-Haën (Seelze, Alemanha). O ácido fórmico 98-100% para análise EMSURE e o acetato de etilo para cromatografia líquida LiChrosolv foram adquiridos à Merck (Darmstadt, Alemanha). O formato de amónio como aditivo de eluente para LC-MS LiChropur é oriundo da Sigma-Aldrich, atual Merck (Darmstadt, Alemanha).

Os sais de QuEChERS utilizados (5982-6550, 5982-5650, 5982-7755) foram fornecidos pela Agilent Technologies (EUA) e o K_2CO_3 pela Sigma-Aldrich, atual Merck (Darmstadt, Alemanha).

Os padrões de cetamina e metadona em solução a 1 mg/mL em metanol foram adquiridos à LGC Ltd. (Luckenwalde, Alemanha). Os restantes padrões de fármacos (amitriptilina, carbamazepina, ciamemazina, citalopram, clomipramina, clozapina, fenitoína, fenobarbital, fluoxetina, haloperidol, levetiracetam, levomepromazina, mianserina, mirtazapina, nortriptilina, olanzapina, paroxetina, quetiapina, sertralina, topiramato, trazodona e venlafaxina) e deuterados (clomipramina-D3, fenobarbital-D5 e topiramato-D12) utilizados, também em solução 1 mg/mL em metanol, foram adquiridos à Sigma-Aldrich (Dorset, Reino Unido).

2.2. Preparação de misturas-padrão e soluções

Inicialmente, através das soluções-padrão de cada analito a 1 mg/mL, prepararam-se cinco misturas-padrão, a uma concentração de 10 µg/mL para cada analito:

- Mistura-padrão 1: num balão volumétrico de 10 mL adicionou-se uma ligeira quantidade de metanol, pipetaram-se 100 µL de amitriptilina, citalopram, fluoxetina, clomipramina e mianserina em solução (a 1 mg/mL cada) e aferiu-se com metanol.
- Mistura-padrão 2: num balão volumétrico de 10 mL adicionou-se uma ligeira quantidade de metanol, pipetaram-se 100 µL de mirtazapina, nortriptilina, paroxetina, sertralina, trazodona e venlafaxina em solução (a 1 mg/mL cada) e aferiu-se com metanol.

- Mistura-padrão 3: num balão volumétrico de 10 mL adicionou-se uma ligeira quantidade de metanol, pipetaram-se 100 µL de ciamemazina, clozapina, haloperidol, levomepromazina, olanzapina e quetiapina em solução (a 1 mg/mL cada) e aferiu-se com metanol.
- Mistura-padrão 4: num balão volumétrico de 10 mL adicionou-se uma ligeira quantidade de metanol, pipetaram-se 100 µL de carbamazepina, fenitoína, fenobarbital, levetiracetam e topiramato em solução (a 1 mg/mL cada) e aferiu-se com metanol.
- Mistura-padrão 5: num balão volumétrico de 10 mL adicionou-se uma ligeira quantidade de metanol, pipetaram-se 100 µL de cetamina, metadona e tramadol em solução (a 1 mg/mL cada) e aferiu-se com metanol.

A partir destas cinco misturas-padrão prepararam-se outras duas, uma de gama alta (1000 ng/mL) e uma de gama baixa (100 ng/mL) em metanol/água (1:1 v/v), possuindo cada uma delas todos os analitos em estudo.

Para preparar a mistura-padrão de gama alta, num balão volumétrico de 5 mL, adicionou-se uma ligeira quantidade de água, 500 µL de cada mistura-padrão anteriormente preparada e aferiu-se o restante com água. Assim, obteve-se uma mistura-padrão numa concentração de 1000 ng/mL para cada analito em metanol/água, 1:1 v/v.

De seguida, preparou-se uma solução de metanol/água (1:1, v/v), colocando num frasco 25 mL de água e 25 mL de metanol utilizando pipetas de vidro graduadas de 25 mL (esta solução foi posteriormente armazenada a uma temperatura de 2-8°C). A mistura-padrão de gama baixa foi obtida através de uma diluição de 1:10 da mistura-padrão de gama alta, ou seja, num balão volumétrico de 5 mL adicionou-se uma ligeira quantidade da solução de metanol/água (1:1, v/v) previamente preparada, 500 µL da mistura-padrão de gama alta e fez-se o restante com a solução de metanol/água (1:1, v/v).

Seguidamente, foi necessário escolher as substâncias a utilizar como padrões internos. O ideal seria utilizar como padrão interno o respetivo deuterado para cada fármaco em estudo, para uma melhor correção das áreas relativas dos picos, mas existem diversos motivos pelos quais esse cenário não é praticável no quotidiano, nomeadamente, a inexistência de deuterados para todas as substâncias. Deste modo, foi necessário escolher os padrões internos de acordo com a sua disponibilidade no laboratório, e a sua semelhança com as substâncias em estudo, tendo sido selecionados o topiramato-D12 e a clomipramina-D3, por serem os padrões deuterados de duas das substâncias em estudo, o topiramato e a clomipramina. Com o desenvolvimento do método, foi necessário introduzir também o fenobarbital-D5 como padrão interno, uma vez que a correção das áreas relativas não estava a ser adequada para o respetivo analito em estudo, o fenobarbital. Assim, preparou-se uma mistura dos deuterados selecionados, numa concentração de 1 µg/mL, partindo destas três soluções-padrão a 100 µg/mL:

- Mistura deuterados 1 µg/mL: num balão volumétrico de 10 mL adicionaram-se 5 mL de água para LC-MS, pipetaram-se 100 µL de topiramato-D12, clomipramina-D3 e fenobarbital-D5 em solução metanólica (a 100 µg/mL cada) e aferiu-se com metanol (aproximadamente 4,70 mL), de modo a manter a proporção de metanol/água (1:1, v/v).

Todas as soluções-padrão, misturas-padrão e a mistura de deuterados preparadas foram armazenadas a -20°C.

Para o estudo do solvente de extração a utilizar na precipitação de proteínas, foram preparadas três misturas, com diferentes proporções, de metanol/acetonitrilo e acetonitrilo acidificado em duas concentrações. Para a mistura metanol/acetonitrilo (3:1, v/v) adicionou-se, a um frasco de 100 mL, 75 mL de metanol e 25 mL de acetonitrilo medidos utilizando provetas graduadas. Na proporção de 1:3 v/v

as quantidades utilizadas foram invertidas, ou seja, foram adicionados 75 mL de acetonitrilo e 25 mL de metanol. Na última mistura, metanol/acetonitrilo (1:9, v/v), adicionou-se a um frasco de 100 mL, 90 mL de acetonitrilo e 10 mL de metanol. Para a preparação do acetonitrilo acidificado (ácido fórmico 1%), adicionou-se acetonitrilo até cerca de metade do volume de um balão volumétrico de 100 mL, 1 mL de ácido fórmico e aferiu-se o restante com acetonitrilo. No caso de a percentagem de ácido fórmico em acetonitrilo ser 0,1%, fez-se uma diluição de 1:10 (v/v) da solução anteriormente preparada, ou seja, foram adicionados 10 mL da solução de acetonitrilo (ácido fórmico 1%) obtida previamente a 90 mL de acetonitrilo. Todas as misturas de solventes preparadas foram posteriormente armazenadas a uma temperatura de 2-8°C.

Para a redissolução das amostras no final da aplicação de todo o procedimento extrativo (explicado em 2.6), foi necessário preparar uma solução com a composição inicial da fase móvel. Esta solução consiste em Solvente A/Solvente B (1:9, v/v), sendo o solvente A o solvente orgânico, metanol/formato de amónio 2 mM (ácido fórmico 0,1%), e o solvente B o solvente aquoso, água/formato de amónio 2 mM (ácido fórmico 0,1%). Num frasco de 50 mL, adicionaram-se 45 mL de solução B e 5 mL com solução A, utilizando pipetas graduadas. Esta solução foi armazenada a uma temperatura de 2-8°C. Para preparar cada um dos solventes da fase móvel, foram adicionados 2 mL de formato de amónio e 1 mL de ácido fórmico a dois balões volumétricos de 1000 mL previamente cheios até cerca de metade do seu volume, um com metanol e outro com água, perfazendo-se o restante volume, com o respetivo solvente, metanol (para o solvente A) e água (para o solvente B). De seguida, com ajuda de provetas, retiraram-se 50 mL de cada um dos balões volumétricos e adicionou-se o solvente retirado do balão do solvente A ao solvente B e o solvente retirado do balão do solvente B ao solvente A.

2.3. Materiais e equipamentos

Para a preparação das amostras foram utilizados os seguintes equipamentos: agitador mecânico roller mixer SRT9 da Stuart (Staffordshire, Reino Unido), o LP Vortex Mixer (Xangai, China) e a centrífuga Heraeus Megafuge 16 (Alemanha), ambos da Thermo Scientific, microcentrífuga refrigerada modelo 5424R da Eppendorf (AG, Alemanha), equipamento de ultrassons Elmasonic P 60 H da Elma (Singen, Alemanha) e evaporador TurboVap LV da Biotage (Uppsala, Suécia).

Para a análise instrumental por UPLC-MS/MS utilizou-se o sistema cromatográfico Acquity UPLC da Waters (Milford, MA, EUA), com uma coluna cromatográfica Acquity ULPC HSS T3 C18 1,8 µm também da Waters (Irlanda), com diâmetro interno de 2,1 mm e 50 mm de comprimento, acoplado a um espectrómetro de massa *tandem* com analisador de triplo quadrupolo (Acquity TQD), controlado pelo *software MassLynx V4.2*, da Waters (Milford, MA, EUA).

Da Eppendorf (Hamburgo, Alemanha) foram utilizados tubos de polipropileno de 2 mL Safe-Lock, micropipetas de capacidade volúmica variável (10-100, 50-200 e 100-1000 µL) e respetivas pontas Dualfilter T.I.P.S. Para armazenar as misturas-padrão, foram utilizados *vials* âmbar de 4 mL e respetivas tampas de PTFE/Si da Agilent Technologies, bem como *vials* de vidro 12x32 mm de 2 mL com as tampas de PTFE/Si da Waters. Os *vials* utilizados para a análise por UPLC-MS/MS são de polipropileno, com capacidade de 300 µL e são provenientes da Waters, bem como as suas respetivas tampas de PTFE/Si.

Durante o desenvolvimento do método foram utilizados outros materiais de vidro disponíveis no laboratório para a preparação de soluções e diluições, tais como copos, balões volumétricos, pipetas graduadas, provetas e frascos de vidro.

2.4. Amostras biológicas

Os estudos para o desenvolvimento desta metodologia foram executados com sangue branco proveniente do Instituto Português do Sangue (IPS).

A validação do método, consoante o parâmetro, é executada na amostra de sangue branco proveniente do IPS ou em *pools* de sangue branco, isto é, amostras de sangue o mais heterogéneas e complexas possível, de modo a corresponder à realidade de amostras que são analisadas rotineiramente em laboratório. Por isso, foi necessário preparar dez *pools* de sangue, ou seja, misturas de sangue, cada uma constituída por sangue periférico *postmortem* de quatro indivíduos diferentes. O sangue periférico utilizado foi recolhido em sede de autópsias médico-legais realizadas na Delegação do Sul do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. ou nos Gabinetes Médico-Legais que desta dependem.

Tanto a amostra de sangue fornecida pelo IPS como as amostras de sangue *postmortem* selecionadas para as *pools* foram previamente analisadas por GC-MS, sendo este o método de triagem de medicamentos atualmente utilizado no SQTf do INMLCF, tendo sido obtido resultado negativo para todas.

Para a preparação de cada *pool* adicionou-se 2 mL de sangue periférico *postmortem* de quatro indivíduos diferentes, num tubo de polipropileno, perfazendo um total de 8 mL.

Todas as amostras foram armazenadas a -10 °C e, sempre que necessário, eram retiradas do congelador e descongeladas à temperatura ambiente, num agitador mecânico, que executava movimentos de rotação.

Os diferentes controlos e calibradores que foram sendo necessários foram preparados seguindo sempre o mesmo princípio: adição de 100 µL da mistura-padrão constituída por todos os analitos em estudo (em diferentes concentrações, consoante a concentração pretendida) a 100 µL de sangue branco e adição de 50 µL de padrão interno. O mesmo processo foi aplicado às *pools* na validação dos parâmetros em que estas eram necessárias.

Para testar a aplicabilidade do método em amostras reais, o mesmo foi aplicado a 47 amostras de sangue periférico (*postmortem*) recolhidas em autópsias médico-legais, para as quais foi obtido um resultado positivo para os analitos de interesse na triagem de medicamentos por GC-MS, e a 11 amostras de soro fornecidas pela Arvecon GmbH (Waldorf, Alemanha) para a realização dos ensaios interlaboratoriais.

Importa ainda referir que a utilização de amostras de sangue colhidas no âmbito das atividades periciais do INMLCF, IP para fins de investigação científica, encontra-se previsto no artigo 31º da Deliberação nº 849/2010, de 07 de maio (Regulamento Interno do INMLCF, IP), pelo que não suscita questões de natureza ética ou legal.

2.5. Procedimento experimental

2.5.1. Construção do método no *software*

Para o desenvolvimento de uma nova metodologia, é necessário estudar, otimizar e estabelecer os valores para uma série de parâmetros do *software* que controla o equipamento de UPLC-MS/MS,

parâmetros esses necessários à análise dos diferentes compostos, e dos quais se destacam para o espectrômetro de massas, a energia de cone e de energia de colisão, otimizados individualmente para cada analito, e o gradiente de fase móvel para a separação cromatográfica, obtendo-se os tempos de retenção correspondentes a cada composto. O controle do equipamento e a aquisição de dados foi realizada através do software MassLynx™ V4.2 e o processamento de dados foi efetuado com recurso ao software TargetLynx™ na versão XS.

2.5.1.1. Espetrometria de massa

Para a otimização dos parâmetros do detetor foi necessário infundir diretamente no espectrômetro de massas as misturas-padrão (de 1 a 5) inicialmente preparadas com os fármacos em estudo a 10 µg/mL com infusão a 10 µL/min. Deste modo, foi possível determinar, através dos espectros obtidos para cada analito, duas transições iónicas características para cada fármaco em estudo, e estabelecer a voltagem de cone e respetivas energias de colisão ideais.

A ionização por eletropulverização foi a utilizada na fonte de ionização, em modo positivo e em modo negativo (de acordo com o fármaco em estudo), com uma voltagem de capilar de 1,00 kV, extrator 2,0 V e RF Lens 0,2 V. A temperatura da fonte foi estabelecida a 120°C com um fluxo de gás de cone de 0 L/hora e a temperatura de dessolvatação a 450°C com um fluxo de gás de dessolvatação (azoto) de 600 L/hora. O fluxo de gás de colisão utilizado, neste caso o árgon, foi estabelecido a 0,14 mL/min. O modo de aquisição em que operou o analisador de massas foi em *multiple reaction monitoring* (MRM). Com a definição destes modos de operação e o estudo do padrão de fragmentação de cada um dos fármacos em estudo (presentes no Anexo A), foi possível determinar as restantes condições a estabelecer para o método, que se encontram descritas na tabela 2.1.

As duas transições escolhidas para cada uma das substâncias em estudo respeitam os critérios estabelecidos pela **World Anti-Doping Agency** (WADA), constantes no Documento Técnico TD2021IDCR, para métodos de confirmação qualitativa com recurso a cromatografia acoplada a espectrometria de massa. (IDCR Working Group (WADA Science), 2021)

Tabela 2.1. Parâmetros experimentais estabelecidos para a determinação dos fármacos antidepressivos, antipsicóticos, anticonvulsivantes e analgésicos: transições MRM (1ª e 2ª), voltagem do cone (VC), energia de colisão (EC) para a primeira (1ª) e segunda (2ª) transições e modo de ionização (ESI – positivo ou negativo).

Analito	1ª transição (m/z)	2ª transição (m/z)	VC (V)	EC (eV)		ESI
				1ª	2ª	
Amitriptilina	278 > 233	278 > 191	40	16	18	+
Citalopram	325 > 109	325 > 262	45	20	18	+
Clomipramina	315 > 86	315 > 58	40	20	24	+
Fluoxetina	310 > 44	310 > 148	30	12	10	+
Mianserina	265 > 208	265 > 222	50	22	22	+
Mirtazapina	266 > 195	266 > 209	40	24	22	+
Nortriptilina	264 > 233	264 > 191	35	14	22	+
Paroxetina	330 > 192	330 > 123	50	20	24	+
Sertralina	306 > 159	306 > 275	20	22	12	+
Trazodona	372 > 176	372 > 148	50	24	34	+

Tabela 2.1. (continuação)

Analito	1ª transição (m/z)	2ª transição (m/z)	VC (V)	EC (eV)		ESI
				1ª	2ª	
Venlafaxina	278 > 58	278 > 260	30	16	12	+
Ciamemazina	324 > 100	324 > 237	40	20	22	+
Clozapina	327 > 270	327 > 296	45	20	22	+
Haloperidol	376 > 165	376 > 358	45	24	20	+
Levomepromazina	329 > 100	329 > 58	35	18	24	+
Olanzapina	313 > 256	313 > 84	45	24	22	+
Quetiapina	384 > 253	384 > 279	45	22	24	+
Carbamazepina	237 > 194	237 > 220	45	18	14	+
Fenitoína	253 > 182	253 > 225	40	16	12	+
Fenobarbital	231 > 42	231 > 188	40	12	12	-
Levetiracetam	171 > 126	171 > 154	20	14	8	+
Topiramato	340 > 264	340 > 184	35	6	10	+
Cetamina	238 > 125	238 > 179	30	20	16	+
Metadona	310 > 265	310 > 105	30	14	24	+
Tramadol	264 > 58	264 > 264	30	6	18	+

2.5.1.2. Cromatografia líquida de ultra eficiência

Uma vez otimizados os parâmetros do espectrómetro de massas, é necessário adicionar ao método as informações cromatográficas necessárias, ou seja, o tempo de retenção das substâncias em estudo.

Para tal, inicialmente, foi definida a fase móvel bem como o seu gradiente e a separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna Acquity UPLC® HSS T3 C18 (50 mm x 2,1 mm; 1,8 µm) (Waters, Milford, MA, EUA), à base de sílica, a uma temperatura de 45°C. A fase móvel é constituída por metanol (formato de amónio 2mM, ácido fórmico 0,1%), como solvente orgânico (solvente A), e água (formato de amónio 2mM, ácido fórmico 0,1%), como solvente aquoso (solvente B), a um fluxo de 0,4 mL/min, com um tempo de análise total de 9,0 minutos. A análise inicia-se com uma proporção de 9:1 de solvente B/solvente A e as condições de gradiente utilizado estão apresentadas na tabela seguinte:

Tabela 2.2. Gradiente de fase móvel utilizado: solvente A – metanol (formato de amónio 2 mM, HCOOH 0,1%); solvente B – água (formato de amónio 2 mM, HCOOH 0,1%).

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0,00	10	90
6,00	95	5
7,00	95	5
7,05	10	90
9,00	10	90

O método de HPLC utilizado baseou-se num método que o laboratório de Química e Toxicologia Forenses do INMLCF, I.P. já empregava nas suas análises de rotina e que estava previamente otimizado. Tendo em consideração que o objetivo deste trabalho experimental é o desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica simples, mantiveram-se os solventes e os gradientes previamente utilizados pelo SQTF.

De seguida, foi necessário injetar as misturas-padrão preparadas com todos os analitos em estudo no cromatógrafo. O objetivo foi observar quando é apresentado um sinal cromatográfico para cada analito e, com base no tempo de retenção em que este se observa, definir uma janela de aquisição de $\pm 0,2$ minutos (tabela 2.3).

Tabela 2.3. TR e janelas de aquisição estabelecidas para os diferentes analitos com base no mesmo.

Analito	TR (min.)	Janela de aquisição (min.)
Levetiracetam	1,20	1,00 – 1,40
Olanzapina	1,35	1,15 – 1,55
Cetamina	2,00	1,80 – 2,20
Tramadol	2,21	2,00 – 2,45
Mirtazapina	2,25	2,00 – 2,45
Trazodona	2,75	2,55 – 2,95
Fenobarbital	2,75	2,55 – 2,95
Topiramato	2,96	2,75 – 3,15
Venlafaxina	3,02	2,80 – 3,20
Citalopram	3,27	3,10 – 3,50
Mianserina	3,29	3,10 – 3,50
Clozapina	3,29	3,10 – 3,50
Quetiapina	3,41	3,20 – 3,60
Haloperidol	3,55	3,35 – 3,75
Fenitoína	3,55	3,35 – 3,75
Carbamazepina	3,77	3,55 – 3,95
Ciamemazina	3,80	3,60 – 4,05
Paroxetina	3,84	3,60 – 4,05
Metadona	4,03	3,85 – 4,30
Levomepromazina	4,06	3,85 – 4,30
Amitriptilina	4,08	3,85 – 4,30
Nortriptilina	4,16	3,95 – 4,40
Fluoxetina	4,20	3,95 – 4,40
Sertralina	4,39	4,20 – 4,60
Clomipramina	4,47	4,25 – 4,70

2.6. Desenvolvimento da metodologia (Procedimento de preparação das amostras)

Neste método, a precipitação de proteínas é realizada com **acetoneitrilo** (ACN) refrigerado (armazenado a -20°C), que promove a desnaturação das proteínas favorecendo a precipitação (Michopoulos et al., 2009), e com simultânea agitação em vórtex, uma vez que esta promove a movimentação das moléculas e, por conseguinte, favorece a libertação do analito das proteínas para a fase orgânica.

Adicionou-se um passo de ultrassons (durante 10 minutos, com frequência a 37 kHz e temperatura ambiente), uma vez que, durante o desenvolvimento do procedimento experimental, se verificou que para algumas substâncias se conseguia melhor reprodutibilidade na recuperação desses analitos.

Posteriormente, foi realizada uma centrifugação para separar a fase orgânica das proteínas precipitadas. Esta centrifugação é realizada numa microcentrifuga refrigerada (5°C) durante 10 minutos a 14000 rpm. O sobrenadante é seguidamente recolhido, por decantação direta, para tubos de vidro.

Seguidamente, foi necessário proceder-se à secagem das amostras em corrente de azoto (fluxo de 1,9 L/h, a 35°C), de modo a concentrar a amostra num volume mais reduzido, obtendo assim melhores limites de deteção, e, posteriormente, redissolver-se com 100 µL de solução de fase móvel inicial (solução A/solução B 1:9, v/v), evitando a deformação dos picos cromatográficos, principalmente dos analitos com menores tempos de retenção. As amostras são agitadas em vórtex durante alguns segundos, centrifugadas durante 3 minutos a 4500 rpm, transferidas para *vials* e analisadas.

Deste modo, o procedimento desenvolvido para uma análise de rotina consiste, resumidamente, nos seguintes passos:

1. Em tubos eppendorf de 2 mL adição de 100 µL de amostra de sangue periférico;
2. Adição de 100 µL da mistura-padrão em metanol/água (1:1, v/v) com o valor de concentração do respetivo controlo positivo (ou 100 µL de metanol/água (1:1, v/v) para as amostras brancas ou reais);
3. Adição de 50 µL de padrão interno;
4. Agitação (vórtex);
5. Adição de 900 µL ACN e simultânea agitação (vórtex);
6. Ultrassons (10 min., 37 kHz, temperatura ambiente);
7. Agitação (vórtex);
8. Centrifugação em microcentrifuga refrigerada (10 min., 5°C, 14000 rpm);
9. Recolha de sobrenadante para tubos de vidro (decantação);
10. Secura sob corrente de azoto (1,9 L/min., 35°C, ~ 30 min.);
11. Redissolução com 100 µL de solução de fase móvel inicial (solvente A/solvente B 1:9 v/v);
12. Agitação (vórtex);
13. Centrifugação (3 min., 4500 rpm);
14. Transferência de sobrenadante para *vials*.

Uma vez estabelecida a metodologia de preparação de amostras e os parâmetros da análise instrumental, é necessário validar a mesma.

2.7. Validação do método

Um método analítico tem como propósito fornecer resultados fiáveis e consistentes perante o tipo de resposta que se pretende obter, sendo necessário garantir a qualidade dos resultados aquando do desenvolvimento de um novo método, antes de este ser aplicado a amostras reais. A qualidade dos resultados é garantida através da validação do método. (Gumustas et al., 2013)

A validação de um novo método é realizada de acordo com as diretrizes comuns para a validação de métodos em Toxicologia Forense e as normas estabelecidas internacionalmente, tendo sido seguidas, neste caso, as regras para métodos de confirmação qualitativa com tecnologia de cromatografia acoplada a espectrometria de massa. (IDCR Working Group (WADA Science), 2021) (Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX), 2013) (Comissão Europeia, 2002) Deste modo, os parâmetros a validar são: especificidade/seletividade, capacidade de identificação, eficiência da extração, avaliação do efeito de matriz, arrastamento (*carryover*), limite de deteção e robustez. (SQTF INMLCF I.P., 2011)

2.7.1. Seletividade/especificidade

A seletividade e especificidade são dois termos que são considerados sinónimos com muita frequência, de forma errada. (SQTF INMLCF I.P., 2011) A seletividade de um método traduz a capacidade que este possui para separar as substâncias de uma mistura, identificando-as inequivocamente. (Ribani et al., 2004) Em química, a especificidade é a capacidade de um método determinar um único analito, na presença de outros componentes expectáveis de estarem presentes, por exemplo, impurezas, componentes da matriz, entre outros. (Gumustas et al., 2013) (SQTF INMLCF I.P., 2011) (Joint Committee for Guides in Metrology, 2021)

Assim, um método é específico quando permite identificar apenas um analito de interesse e seletivo quando permite identificar diferentes analitos de interesse, numa mistura de substâncias. (Ribani et al., 2004) Deste modo, uma vez que o método desenvolvido é um método cromatográfico, que permite separar e identificar diversos analitos numa mistura de substâncias, é mais adequado afirmar que o parâmetro em estudo é a seletividade.

Para este estudo preparou-se uma amostra controlo, adicionando 100 µL de uma mistura-padrão que continha todos os analitos em estudo numa concentração de 100 ng/mL a 100 µL de sangue branco, e prepararam-se três alíquotas de 100 µL de cada *pool* de sangue. A primeira alíquota foi fortificada com 100 µL da mistura-padrão a 100 ng/mL com os analitos em estudo, sendo que este conjunto de alíquotas representa os verdadeiros positivos, pois possuem os fármacos de interesse. A segunda alíquota de cada *pool* não foi fortificada com qualquer substância (apenas foram adicionados 100 µL de mistura metanol/água (1:1, v/v) para manter o fator de diluição), representando os verdadeiros negativos, e a terceira alíquota foi fortificada com 100 µL de uma mistura-padrão de benzodiazepinas a 100 ng/mL que são analisadas rotineiramente no SQTF. Esta terceira alíquota fortificada com outro conjunto de analitos permite determinar se sinais cromatográficos de outras substâncias, que não as que se encontram em estudo, são detetados (ou não) como falsos positivos. A todas as alíquotas foram adicionados 50 µL de padrão interno a 1 µg/mL e aplicado o procedimento extrativo descrito na secção do desenvolvimento da metodologia, procedendo-se de seguida à sua análise.

Após obtenção dos resultados, foi necessário repetir o procedimento para o estudo da seletividade do fenobarbital, uma vez que as áreas dos picos obtidas para este analito foram bastante reduzidas. Por isso, preparou-se uma amostra controlo, juntando 100 µL do sangue branco com 100 µL da mistura-padrão com os analitos de interesse a 1000 ng/mL, e preparou-se uma alíquota de 100 µL de cada *pool* às quais se adicionou a mesma mistura-padrão, seguindo as restantes etapas do procedimento.

Após a análise instrumental, verificou-se a positividade das alíquotas fortificadas com os analitos de interesse, sendo para tal necessário que cumpram os critérios do tempo de retenção relativo (TRR), áreas relativas dos picos e a razão sinal/ruído (S/R). Foi também verificado a negatividade das alíquotas não fortificadas e das fortificadas com benzodiazepinas.

Para que o critério do TRR seja cumprido, é necessário que o TRR de um analito, obtido através da equação 2.1 na amostra fortificada não difira mais do que 1% do TRR do mesmo analito na amostra controlo. Esta comparação pode ser efetuada através do cálculo da diferença dos tempos de retenção relativos (Δ TRR) obtida através da equação 2.2, entre ambas as amostras. (IDCR Working Group (WADA Science), 2021)

$$TRR = \frac{TR_{\text{analito}}}{TR_{\text{PI}}} \quad \text{Equação 2.1}$$

Onde:

TR_{analito} é o tempo de retenção do analito em estudo

TR_{PI} é o tempo de retenção do padrão interno

$$\Delta TRR = \frac{(TRR_{\text{amostra}} - TRR_{\text{controle}})}{TRR_{\text{controle}}} \quad \text{Equação 2.2}$$

Onde:

TRR_{amostra} é o tempo de retenção relativo do analito na amostra em estudo

TRR_{controle} é o tempo de retenção relativo do analito na amostra controle

A verificação do critério das áreas relativas dos iões (A_{relativa}), é realizada através da comparação das áreas relativas dos iões diagnóstico monitorizados, obtida através da equação 2.3, sendo que os valores não devem ultrapassar os intervalos de tolerância estabelecidos na tabela 2.4, quando comparadas as abundâncias relativas entre a amostra controle e as amostras em estudo. (IDCR Working Group (WADA Science), 2021)

$$A_{\text{relativa}} = \frac{A_{\text{ião} <}}{A_{\text{ião} >}} \times 100 \quad \text{Equação 2.3}$$

Onde:

$A_{\text{ião} <}$ é a área do ião diagnóstico de menor intensidade

$A_{\text{ião} >}$ é a área do ião diagnóstico de maior intensidade (ião pico base)

Tabela 2.4. Intervalos de tolerância mínimos e máximos admitidos para as abundâncias relativas dos iões diagnóstico.

Abundância relativa no controle (% pico base)¹	Tolerâncias máxima e mínima para a abundância relativa na amostra de ensaio
50 – 100	± 10 (absoluto)
25 – 50	± 20% (relativo)
1 – 25	± 5 (absoluto)

¹Amostra controle analisada nas mesmas condições e contemporaneamente

Adicionalmente, a razão S/R, isto é, a razão entre o sinal do ião e o sinal do ruído, deve ser superior a 3. (IDCR Working Group (WADA Science), 2021)

Para demonstrar a seletividade do método e validar com sucesso esse parâmetro, é necessário calcular a percentagem de falsos negativos em amostras fortificadas com os analitos em estudo e de falsos positivos em amostras brancas (não fortificadas com os analitos de interesse). Um método de

confirmação qualitativa é seletivo se a percentagem de falsos negativos for inferior a 10% e a percentagem de falsos positivos 0%. (SQTF INMLCF I.P., 2011)

2.7.2. Capacidade de identificação

Este parâmetro permite determinar se o método desenvolvido possui a capacidade inequívoca de identificar os analitos em estudo. A capacidade de identificação é avaliada concomitantemente com a seletividade/especificidade. Se a percentagem de falsos negativos é igual ou inferior a 10%, considera-se que o método é apropriado.

2.7.3. Eficiência da extração

O estudo da eficiência da extração permite determinar a quantidade real de analito que é possível recuperar de uma matriz biológica, após aplicação de um procedimento extrativo, conhecendo a quantidade de analito que está, de facto, presente na amostra. (Peters et al., 2007)

A eficiência da extração é estudada em duas concentrações distintas (gama alta e gama baixa) e em triplicado, pelo que foi necessário preparar quatro conjuntos de três alíquotas de 100 µL de sangue branco.

Dois dos conjuntos de triplicados foram fortificados com 100 µL de uma mistura-padrão que continha todos os analitos em estudo numa concentração de 100 ng/mL (gama baixa). Num conjunto, a fortificação foi realizada diretamente no sangue branco, ou seja, previamente à aplicação do procedimento extrativo. No outro conjunto, foi primeiramente aplicado o procedimento extrativo às alíquotas de sangue branco e a fortificação foi feita nos extratos obtidos. O mesmo procedimento foi aplicado aos dois restantes conjuntos de triplicados, mas estes foram fortificados com 100 µL de uma mistura-padrão que continha todos os analitos em estudo numa concentração de 1000 ng/mL (gama alta).

Foi adicionada a mesma quantidade de padrão interno a todas as 12 alíquotas, apenas após o procedimento extrativo. Após aplicado o procedimento extrativo como descrito, as amostras foram analisadas.

A eficiência da extração, para cada uma das concentrações estudadas, é determinada através do cálculo da percentagem de analito recuperado (%R), dada por:

$$\%R = \left(\frac{A_{\text{Rel}_{\text{com extração}}}}{A_{\text{Rel}_{\text{sem extração}}}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 2.4}$$

Onde:

A $Rel_{\text{com extração}}$ é a razão das áreas do analito/padrão interno das alíquotas que foram fortificadas antes da extração;

A $Rel_{\text{sem extração}}$ é a razão das áreas do analito/padrão interno das alíquotas que foram fortificadas após a extração.

A percentagem de analito recuperado deve ser superior a 40%, mas não existe um valor ótimo para a mesma. Este parâmetro deve ser estudado de forma holística, juntamente com os restantes parâmetros de validação e tendo em conta a tecnologia analítica que está a ser utilizada, uma vez que, em métodos de preparação de amostras muito complexos, é expectável que a recuperação seja baixa dada a quantidade de etapas a que as amostras estão sujeitas, no entanto, a quantidade de interferentes é mínima. Já num método mais simplificado, a recuperação de analito poderá ser bastante alta, mas poderão existir mais interferências.

2.7.4. Arrastamento

A análise de amostras em que os analitos estudados estão presentes em elevadas concentrações é bastante comum nos laboratórios de Toxicologia Forense e, por esse motivo, pode ocorrer arrastamento de uma substância muito concentrada para amostras analisadas em seguida, uma vez que podem ficar retidos vestígios da mesma no injetor e/ou na coluna cromatográfica, podendo induzir o aparecimento de um sinal cromatográfico dessa substância numa amostra na qual essa não está presente ou aumento do sinal numa amostra onde essa substância esteja presente em concentração inferior. Assim, o estudo deste parâmetro é fundamental, sobretudo por se utilizar um método instrumental tão sensível como a UPLC-MS/MS. (SQTF INMLCF I.P., 2011) (Hughes et al., 2007)

A avaliação do arrastamento foi efetuada em conjunto com o estudo da eficiência da extração, uma vez que nesta segunda foi utilizada uma gama de concentração alta, essencial ao estudo do arrastamento. Assim, em paralelo com a preparação das alíquotas para o estudo da recuperação, prepararam-se também duas alíquotas de 100 µL de sangue branco que não foram fortificadas com qualquer substância, tendo sido aplicado igualmente o procedimento extrativo. As duas amostras brancas foram analisadas no equipamento, alternadamente, entre as três amostras do ensaio da eficiência da recuperação fortificadas após a extração com 1000 ng/mL de mistura-padrão com todos os analitos em estudo.

2.7.5. Efeito de matriz

O sangue é uma matriz biológica complexa que possui elementos endógenos e exógenos (nomeadamente, outras substâncias, metabolitos, impurezas, produtos de degradação, etc). A coeluição destes com o analito, pode afetar a sua ionização, podendo resultar na supressão ou intensificação do seu sinal, e conseqüentemente ter impacto na exatidão, precisão e robustez do método. (SQTF INMLCF I.P., 2011) (Chiu et al., 2010) Estes fenómenos são observados com frequência em análises por LC-MS/MS e dependem, entre outros, do tipo de ionização (sendo verificado sobretudo em ESI), da matriz, da preparação da amostra e da eficiência da separação cromatográfica. (Peters et al., 2007)

O estudo do efeito de matriz pode ser realizado pelo método de infusão ou pelo método de fortificação pós-extração, tendo sido realizado o segundo. (Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX), 2013) (Peters et al., 2007) (SQTF INMLCF I.P., 2011)

Na validação deste método, o efeito de matriz foi avaliado de duas formas: estudo do efeito de matriz para uma mesma concentração (1000 ng/mL) em amostras diversificadas (10 *pools* de sangue) e estudo do efeito de matriz em duas concentrações distintas (gama baixa e gama alta, 100 e 1000 ng/mL respetivamente) numa única amostra (uma *pool* de sangue), com o objetivo de estudar este fenómeno em função de diversas matrizes e em função da concentração.

Para o primeiro estudo, prepararam-se duas alíquotas de 100 µL de cada *pool*. A todas as alíquotas foi aplicado o procedimento extrativo e, após este, procedeu-se à fortificação das mesmas com 100 µL de uma mistura-padrão que continha todos os analitos em estudo numa concentração de 1000 ng/mL. Paralelamente, aplicou-se o mesmo procedimento a duas alíquotas de 100 µL de amostras brancas (sem matriz biológica), às quais foi adicionada a mesma quantidade de mistura-padrão utilizada nas alíquotas de cada *pool*, na mesma concentração.

No segundo estudo, prepararam-se dois conjuntos de três alíquotas de 100 µL de uma única *pool* (*Pool* 5). A todas as alíquotas foi aplicado o procedimento extrativo e, após este, procedeu-se à fortificação do primeiro conjunto de três com 100 µL de uma mistura-padrão que continha todos os analitos em estudo numa concentração de 100 ng/mL e do segundo conjunto de três com 100 µL de uma mistura-padrão numa concentração de 1000 ng/mL. Paralelamente, aplicou-se o mesmo procedimento a dois conjuntos de três alíquotas de 100 µL de amostras brancas (sem matriz biológica), aos quais foi adicionada a mesma quantidade de mistura-padrão utilizada nas alíquotas de cada *pool*, nas mesmas concentrações. Uma vez preparadas as amostras foram analisadas no equipamento.

Uma vez que o efeito de matriz é definido como a diferença entre o resultado que se obtém para determinado analito numa solução-padrão e o resultado obtido num extrato proveniente de uma matriz biológica, para o mesmo analito, nas mesmas condições, a percentagem de efeito de matriz é calculada através de:

$$\% \text{ EM} = \left[\left(\frac{\bar{A}_{c/\text{matriz}}}{\bar{A}_{s/\text{matriz}}} \right) - 1 \right] \times 100 \quad \text{Equação 2.5}$$

Onde:

$\bar{A}_{c/\text{matriz}}$ é a média das áreas absolutas obtidas (ião pico base) nas amostras de sangue fortificadas após extração;

$\bar{A}_{s/\text{matriz}}$ é a média das áreas absolutas obtidas (ião pico base) nas amostras isentas de matriz.

Não é adicionado padrão interno no estudo do efeito de matriz, uma vez que neste se avaliam as áreas absolutas, não sendo necessária a correção destas para áreas relativas.

2.7.6. Limite de deteção

O limite de deteção (LD) é definido como a menor concentração de analito que pode ser detetada numa amostra por um procedimento analítico, cumprindo os critérios de positividade para a identificação de uma substância (TRR, áreas relativas dos iões e razão S/R), mas não necessariamente quantificada com um valor exato. (Armbruster and Pry, 2008) (Peters et al., 2007)

Para avaliar este parâmetro recorreu-se ao estudo da regressão de curvas de calibração. Para cada analito foram construídas curvas de calibração de 10 pontos, com intervalos de concentração relativamente equidistantes e na região do valor estimado, sendo o limite de deteção dado por:

$$\text{LD} = \frac{(3,3 \times S_{y/x})}{b} \quad \text{Equação 2.6}$$

Onde:

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

b é o declive da reta

Para a obtenção das curvas de calibração com 10 pontos a diferentes concentrações, é necessário fortificar amostras de sangue branco com os analitos em estudo nas concentrações pretendidas. As concentrações selecionadas para a construção da curva de calibração de cada analito estão identificadas na tabela 2.5.

Tabela 2.5. Preparação das curvas de calibração dos 25 fármacos em estudo: pontos da curva de calibração e respetivas concentrações (ng/mL).

Analito	Pontos da curva de calibração									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
LEV, TRA, MIRT, TRZ, TPM, VLF, MNS, CLZ, QUET, HPD, CBZ, CMZ, PRX, LVM, NRT, CLP	0,5	1	2	4	6	8	10	15	20	25
OLZ, KET, CTL, MTD, AMT	0,5	1	2	4	6	8	10	15	20	30
FXT, SRT	1	2	4	6	8	10	15	20	25	30
PB	80	100	120	150	200	250	300	350	450	500
PHT	6	8	10	15	20	25	30	35	50	70

LEV – levetiracetam; TRA – tramadol; MIRT – mirtazapina; TRZ – trazodona; TPM – topiramato; VLF – venlafaxina; MNS – mianserina; CLZ – clozapina; QUET – quetiapina; HPD – haloperidol; CBZ – carbamazepina; CMZ – ciamemazina; PRX – paroxetina; LVM – levomepromazina; NRT – nortriptilina; CLP – clomipramina; OLZ – olanzapina; KET – cetamina; CTL – citalopram; MTD – metadona; AMT – amitriptilina; FXT – fluoxetina; SRT – sertralina; PB – fenobarbital; PHT – fenitoína.

Para a preparação das curvas de calibração foi utilizado o método das diluições sucessivas com recurso às misturas-padrão contendo todos os analitos de interesse, preparadas no início do desenvolvimento do trabalho experimental, ou seja, a mistura-padrão de gama alta (1000 ng/mL) e a mistura-padrão de gama baixa (100 ng/mL).

Para o estudo do limite de deteção dos diferentes analitos, foram preparadas 24 alíquotas de 100 μ L do sangue branco, sendo que cada uma foi fortificada com 100 μ L de uma solução com uma concentração distinta das misturas-padrão anteriormente preparadas a 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 50, 70, 80, 100, 120, 150, 200, 250, 300, 350, 450 e 500 ng/mL. Adicionou-se 50 μ L de padrão interno a todas as alíquotas e foi aplicado o procedimento extrativo. Uma vez que todos os analitos estão presentes em todas as alíquotas, foi após obtenção dos resultados instrumentais que, para cada analito, se selecionaram os pontos com a concentração de interesse.

Após determinação do limite de deteção de cada analito, foi necessário verificar a veracidade do mesmo através do teste deste limiar analítico, que permite determinar se estão em cumprimento os critérios de positividade para a identificação de uma substância (TRR, áreas relativas dos iões e S/R). Para este teste é necessário preparar amostras controlo com concentrações idênticas às estimadas no cálculo dos limites de deteção através das curvas de calibração, tendo ficado estabelecidas as concentrações de 2, 3, 4 e 80 ng/mL.

Para a preparação das amostras controlo, selecionaram-se cinco *pools* aleatoriamente (*pools* 3, 4, 6, 7 e 8). Prepararam-se quatro alíquotas de 100 µL de cada *pool*, que foram fortificadas com 100 µL de mistura-padrão contendo todos os analitos em estudo, nas diferentes concentrações anteriormente referidas. A estas amostras foi aplicado o procedimento extrativo.

Após a análise instrumental, o objetivo foi aplicar os critérios de positividade utilizados na avaliação do parâmetro da seletividade/especificidade, para determinar se a positividade se confirma em pelo menos 90% das amostras estudadas, pois só assim se considera válido o limite de deteção.

2.7.7. Robustez

A robustez é a capacidade que um método analítico possui em permanecer inalterado, perante ligeiras alterações das condições experimentais que possam ocorrer numa análise de rotina. (Peters et al., 2007) (Comissão Europeia, 2002)

A avaliação deste parâmetro é realizada ao longo de todo o procedimento de validação do método, uma vez que vão sendo introduzidas algumas alterações no mesmo. Parte dessas alterações são propositadas, com o objetivo de melhorar a metodologia, por exemplo, o tempo de agitação, tempo de centrifugação e adição de alguns passos de preparação de amostras. Outras alterações devem-se ao próprio desenvolvimento do método e ao modo de trabalho no laboratório, como a utilização de reagentes de diferentes lotes, a temperatura ambiente, utilização de diferente material na preparação de amostras e desgaste do equipamento e da coluna cromatográfica.

2.8. Aplicação do método a amostras reais

Uma vez validada esta metodologia, é necessário aplicá-la a amostras reais, com o objetivo de verificar a sua aplicabilidade em análises de rotina. Para o efeito, foram selecionadas 47 amostras de sangue periférico recolhidas em autópsias na Delegação do Sul do INMLCF, I.P. ou nos Gabinetes Médico-Legais que desta dependem, entre os anos de 2020 e 2021, que já tinham sido analisadas anteriormente pelo método atualmente utilizado para a confirmação de medicamentos no SQTF do INMLCF, I.P. (GC-MS) e para o qual os resultados obtidos foram positivos para as substâncias que estão a ser estudadas neste método. Também foi aplicado o método a 11 amostras de soro provenientes da Arvecon GmbH para a realização dos testes interlaboratoriais aos quais o Serviço de Química e Toxicologia Forenses dá resposta e que contribuem para comprovar a qualidade do trabalho realizado pelo laboratório.

Assim, foi preparada uma série de amostras constituída por um branco de reagentes e um branco de sangue, quatro controlos positivos (a 10, 100, 500 e 1000 ng/mL) e 58 amostras. As amostras foram preparadas de acordo com o procedimento de amostras desenvolvido e anteriormente descrito.

A série foi analisada pelo equipamento de UPLC-MS/MS na seguinte ordem: branco de reagentes, controlos positivos por ordem crescente de concentração (10, 100, 500 e 1000 ng/mL), branco de sangue e amostras de sangue e soro.

Capítulo 3 – Resultados e Discussão

3.1. Desenvolvimento da metodologia

3.1.1. Escolha do solvente de extração

Os solventes orgânicos, referidos em vários estudos, que podem ser utilizados para extrair os analitos (nomeadamente, antidepressivos, antipsicóticos, anticonvulsivantes e analgésicos) das proteínas do sangue são o acetonitrilo, acetonitrilo acidificado, metanol, mistura metanol/acetonitrilo em diferentes proporções e acetato de etilo. (Sistik et al., 2016) (Matsuta et al., 2013) (Alves et al., 2017)

Em 2003 foi introduzido um novo método para a análise de resíduos de pesticidas em vegetais e frutas, o método de QuEChERS (do inglês *quick, easy, cheap, effective, rugged e safe*). Este método baseia-se na adição de sais (os sais de QuEChERS) após extração da amostra com um solvente orgânico, sendo que existem diferentes *kits* de sais de QuEChERS. Logo após o seu aparecimento, começou a ser estudada a aplicabilidade deste método na análise de xenobióticos em matrizes biológicas, como o sangue. (Matsuta et al., 2013) (Alves et al., 2017) (Dulaurent et al., 2016)

Assim, inicialmente, estudaram-se as percentagens de analito recuperado obtidas com os diferentes solventes orgânicos e com cinco diferentes *kits* de sais de QuEChERS, a fim de determinar qual ou quais os mais adequados a utilizar neste método para a precipitação de proteínas.

Para este estudo, e para cada um dos solventes e sais, realizaram-se ensaios de recuperação, preparando-se quatro conjuntos de três alíquotas de 100 µL de sangue branco. Fortificaram-se dois dos conjuntos de triplicados com 100 µL de uma mistura-padrão que continha todos os analitos em estudo numa concentração de 100 ng/mL (gama baixa). Num conjunto, a fortificação foi realizada previamente à adição de solvente, no outro foi primeiramente adicionado o solvente às alíquotas de sangue branco e a fortificação foi feita nos extratos obtidos. Foi aplicado o mesmo procedimento aos dois restantes conjuntos de triplicados, mas a fortificação destes foi efetuada com uma mistura-padrão que continha todos os analitos em estudo numa concentração de 1000 ng/mL (gama alta). Para o estudo dos sais de QuEChERS, o procedimento foi igual, mas foi ainda feita a adição dos sais imediatamente após a adição de solvente, com recurso a uma pequena espátula (com capacidade de aproximadamente 10 mg), sem necessidade de pesar. Foi adicionada a mesma quantidade de padrão interno a todas as alíquotas, após o procedimento extrativo. Após secagem e redissolução com 100 µL de solução de fase móvel inicial, as amostras foram analisadas.

Os solventes estudados foram: acetato de etilo, acetonitrilo, acetonitrilo acidificado (ácido fórmico 1% e 0,1%) e misturas de metanol/acetonitrilo em diferentes proporções (3:1, 1:3 e 1:9 v/v). O acetonitrilo foi o solvente orgânico que apresentou não só os melhores valores de percentagem de analito recuperado (o menor valor de recuperação foi de 77%) como também o extrato aparentemente mais limpo enquanto os restantes solventes apresentaram valores de recuperação mais baixos e, alguns deles, extratos sujos. Tendo sido o acetonitrilo considerado o solvente mais adequado, a adição dos sais de QuEChERS foi levada a cabo com o mesmo. Os sais testados foram: 5982-6550 (4 g MgSO₄, 1 g NaCl), 5982-5650 (4 g MgSO₄, 1 g NaCl, 1 g NaCitrate, 0,5 g disodium citrate sesquihydrate), 5982-7755 (6 g MgSO₄, 1,5 g NaAcetate), K₂CO₃ e 5982-6550/K₂CO₃ (4:1 m/m).

Com a adição dos sais de QuEChERS a percentagem de analito recuperado manteve-se idêntica à obtida apenas para o acetonitrilo. Uma vez que esta adição não acrescentou vantagens ao método e é um passo adicional que implica maior tempo de preparação de amostras (e o objetivo é o desenvolvimento de uma metodologia simples), optou-se por descartar a utilização dos sais de QuEChERS, ficando estabelecida a precipitação de proteínas apenas com solvente orgânico, sendo este o acetonitrilo.

3.2. Validação do método

3.2.1. Seletividade/especificidade e capacidade de identificação

Como referido no capítulo 2.7.1, é necessário calcular a percentagem de falsos negativos e positivos no estudo da seletividade e da capacidade de identificação, através da análise de três conjuntos de amostras, sendo que o conjunto fortificado com os analitos em estudo corresponde aos verdadeiros positivos e os dois restantes conjuntos, um sem fortificação, outro fortificado com outro grupo de substâncias que não as de interesse para este estudo, representam os verdadeiros negativos. Para verificar os verdadeiros positivos, têm de ser aplicados os critérios de positividade estabelecidos para os métodos de confirmação qualitativa, sendo estes o tempo de retenção relativo, a área relativa dos iões e uma razão S/R superior a três. (IDCR Working Group (WADA Science), 2021) (SQTF INMLCF I.P., 2020)

3.2.1.1. Critério da diferença do tempo de retenção relativo

Com base nas equações 2.1 e 2.2 foi possível calcular o tempo de retenção relativo (TRR) e as diferenças dos tempos de retenção relativos (Δ TRR) para cada analito em cada amostra. Nas tabelas 3.1 e 3.2 é possível observar os resultados dos TRR e das Δ TRR, respetivamente, para a amostra controlo e para as dez *pools* de amostras analisadas, nas alíquotas que foram preparadas através de fortificação com mistura-padrão a 100 ng/mL com todos os analitos em estudo. No estudo do fenobarbital, foi utilizada uma concentração de 1000 ng/mL dos analitos em estudo, tanto para a amostra controlo como para as amostras em estudo, uma vez que este apresentou picos de áreas muito reduzidas para uma concentração de 100 ng/mL.

Tabela 3.1. TRR de cada analito em cada *pool* e na amostra controlo a 100 ng/mL.

Substância	Amostra										
	Controlo 100 ng/mL	<i>Pool</i> 1	<i>Pool</i> 2	<i>Pool</i> 3	<i>Pool</i> 4	<i>Pool</i> 5	<i>Pool</i> 6	<i>Pool</i> 7	<i>Pool</i> 8	<i>Pool</i> 9	<i>Pool</i> 10
LEV	0,267	0,267	0,267	0,267	0,266	0,266	0,267	0,267	0,267	0,266	0,267
OLZ	0,305	0,305	0,307	0,307	0,306	0,304	0,305	0,305	0,306	0,300	0,306
KET	0,448	0,448	0,448	0,448	0,447	0,447	0,448	0,448	0,449	0,445	0,449
TRA	0,496	0,498	0,496	0,496	0,494	0,494	0,496	0,496	0,497	0,492	0,494
MIRT	0,507	0,509	0,507	0,509	0,508	0,508	0,507	0,507	0,508	0,503	0,508

* para o fenobarbital, tanto a amostra controlo como as *pools* foram fortificadas com mistura-padrão de concentração a 1000 ng/mL.

Tabela 3.1. (continuação)

Substância	Amostra										
	Controlo 100 ng/mL	Pool 1	Pool 2	Pool 3	Pool 4	Pool 5	Pool 6	Pool 7	Pool 8	Pool 9	Pool 10
TRZ	0,614	0,614	0,614	0,614	0,611	0,611	0,614	0,612	0,614	0,611	0,614
PB*	0,619	0,617	0,619	0,615	0,615	0,617	0,617	0,617	0,619	0,617	0,617
TPM	1,014	1,014	1,017	1,014	1,014	1,017	1,017	1,017	1,017	1,017	1,014
VLF	0,675	0,675	0,675	0,675	0,673	0,673	0,675	0,675	0,676	0,671	0,676
CTL	0,729	0,729	0,729	0,729	0,727	0,727	0,729	0,729	0,730	0,727	0,728
MNS	0,738	0,735	0,735	0,735	0,736	0,736	0,738	0,735	0,735	0,732	0,735
CLZ	0,738	0,740	0,738	0,740	0,738	0,736	0,738	0,738	0,739	0,734	0,739
QUET	0,767	0,767	0,767	0,767	0,765	0,765	0,767	0,765	0,766	0,763	0,766
HPD	0,794	0,796	0,796	0,796	0,792	0,794	0,796	0,796	0,796	0,794	0,796
PHT	1,217	1,217	1,221	1,217	1,217	1,217	1,221	1,217	1,217	1,217	1,217
CBZ	1,293	1,293	1,301	1,293	1,293	1,293	1,293	1,293	1,293	1,293	1,293
CMZ	0,848	0,852	0,850	0,848	0,848	0,848	0,850	0,850	0,849	0,848	0,852
PRX	0,859	0,859	0,859	0,861	0,857	0,857	0,859	0,859	0,858	0,857	0,858
MTD	0,904	0,906	0,906	0,906	0,904	0,904	0,906	0,904	0,908	0,904	0,906
LVM	0,910	0,913	0,913	0,913	0,911	0,911	0,913	0,910	0,912	0,908	0,912
AMT	0,913	0,915	0,913	0,915	0,913	0,911	0,915	0,913	0,915	0,913	0,915
NRT	0,930	0,933	0,930	0,930	0,928	0,928	0,930	0,930	0,933	0,926	0,930
FXT	0,939	0,939	0,939	0,939	0,937	0,940	0,939	0,939	0,942	0,937	0,942
SRT	0,984	0,984	0,982	0,984	0,982	0,982	0,984	0,982	0,984	0,982	0,984
CLP	1,002	1,002	1,002	1,000	0,998	1,000	1,000	1,000	1,002	1,000	1,002

* para o fenobarbital, tanto a amostra controlo como as pools foram fortificadas com mistura-padrão de concentração a 1000 ng/mL.

Tabela 3.2. Diferença entre o TRR de cada analito em cada pool e na amostra controlo (100 ng/mL).

Substância	Amostra									
	Pool 1	Pool 2	Pool 3	Pool 4	Pool 5	Pool 6	Pool 7	Pool 8	Pool 9	Pool 10
LEV	0,000	0,000	0,000	-0,002	-0,002	0,000	0,000	0,002	-0,002	0,002
OLZ	0,000	0,007	0,007	0,005	-0,002	0,000	0,000	0,002	-0,032	0,002
KET	0,000	0,000	0,000	-0,002	-0,002	0,000	0,000	0,002	-0,007	0,002
TRA	0,004	0,000	0,000	-0,002	-0,002	0,000	0,000	0,002	-0,007	-0,002
MIRT	0,004	0,000	0,004	0,002	0,002	0,000	0,000	0,002	-0,007	0,002
TRZ	0,000	0,000	0,000	-0,006	-0,006	0,000	-0,004	-0,001	-0,006	-0,001
PB*	-0,004	0,000	-0,006	-0,006	-0,004	-0,002	-0,004	0,000	-0,002	-0,002
TPM	0,000	0,004	0,000	0,000	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,000
VLF	0,000	0,000	0,000	-0,002	-0,002	0,000	0,000	0,002	-0,006	0,002
CTL	0,000	0,000	0,000	-0,002	-0,002	0,000	0,000	0,002	-0,002	-0,001

* para o fenobarbital, os resultados obtidos foram para uma concentração de 1000 ng/mL.

Tabela 3.2. (continuação)

Substância	Amostra									
	<i>Pool 1</i>	<i>Pool 2</i>	<i>Pool 3</i>	<i>Pool 4</i>	<i>Pool 5</i>	<i>Pool 6</i>	<i>Pool 7</i>	<i>Pool 8</i>	<i>Pool 9</i>	<i>Pool 10</i>
MNS	-0,003	-0,003	-0,003	-0,002	-0,003	0,000	-0,003	-0,004	-0,008	-0,004
CLZ	0,003	0,000	0,003	0,001	-0,002	0,000	0,000	0,002	-0,005	0,002
QUET	0,000	0,000	0,000	-0,002	-0,002	0,000	-0,003	-0,001	-0,005	-0,001
HPD	0,003	0,003	0,003	-0,002	0,001	0,003	0,003	0,002	0,001	0,002
PHT	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000
CBZ	0,000	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
CMZ	0,005	0,003	0,000	0,000	0,000	0,003	0,003	0,002	0,000	0,005
PRX	0,000	0,000	0,003	-0,002	-0,002	0,000	0,000	0,000	-0,002	0,000
MTD	0,002	0,002	0,002	0,000	0,000	0,002	0,000	0,005	0,000	0,002
LVM	0,002	0,002	0,002	0,000	0,000	0,002	0,000	0,002	-0,002	0,002
AMT	0,002	0,000	0,002	0,000	-0,002	0,002	0,000	0,002	0,000	0,000
NRT	0,002	0,000	0,000	-0,002	-0,002	0,000	0,000	0,002	-0,005	0,000
FXT	0,000	0,000	0,000	-0,002	0,000	0,000	0,000	0,002	-0,002	0,002
SRT	0,000	-0,002	0,000	-0,002	-0,002	0,000	-0,002	0,000	-0,002	0,000
CLP	0,000	0,000	-0,002	-0,004	-0,002	-0,002	-0,002	0,000	-0,002	0,000

* para o fenobarbital, os resultados obtidos foram para uma concentração de 1000 ng/mL.

Na *pool 9*, para a olanzapina, o critério do tempo de retenção relativo não foi cumprido, uma vez que a diferença entre o TRR da olanzapina na *pool 9* e o mesmo na amostra controlo obtido foi de -3,2%, sendo este valor superior ao indicado nos critérios estabelecidos ($\pm 1\%$). Como é possível observar na tabela 3.2, o critério do tempo de retenção relativo foi cumprido para todos os restantes analitos em estudo, em todas as amostras, uma vez que a ΔTRR é inferior a 1% em todos os casos.

3.2.1.2. Critério das intensidades relativas

As áreas relativas dos iões monitorizados para cada analito em estudo, tanto na amostra controlo como nas amostras em estudo, foram calculadas pela razão entre a área do ião diagnóstico de menor intensidade e a do ião diagnóstico de maior intensidade. Na tabela 3.3 está descrita a área relativa dos iões para cada um dos analitos na amostra controlo e as respetivas tolerâncias mínima e máxima admitidas para as amostras em estudo, com base nas abundâncias obtidas para o controlo e nos critérios definidos pela World Anti-Doping Agency (WADA), demonstrados na tabela 3.4.

Tabela 3.3. Áreas relativas dos íões, em percentagem, dos analitos em estudo na amostra controlo e respetivo intervalo de tolerância.

Substância	Área relativa controlo 100 ng/mL (%)	Tolerância (%)	
		Mínima	Máxima
LEV	83	73	93
OLZ	86	76	96
KET	72	62	82
TRA	84	74	94
MIRT	12	7,1	17
TRZ	64	54	74
PB*	53	43	63
TPM	35	28	42
VLF	31	25	37
CTL	31	25	37
MNS	20	16	26
CLZ	9,4	4,4	14
QUET	24	19	29
HPD	11	5,6	16
PHT	26	21	31
CBZ	3,2	0	8,2
CMZ	11	6,4	16
PRX	19	14	24
MTD	93	83	103
LVM	67	57	77
AMT	58	48	68
NRT	77	67	87
FXT	6,4	1,4	11
SRT	55	45	65
CLP	34	28	41

* para o fenobarbital, os resultados obtidos foram para uma concentração de 1000 ng/mL.

Na tabela 3.4 encontram-se as áreas relativas dos íões monitorizados obtidas para cada analito nas diferentes *pools* em estudo, que foram preparadas através de fortificação com uma solução de mistura-padrão com todos os analitos em estudo.

Tabela 3.4. Áreas relativas dos íões, em percentagem, dos fármacos em estudo, em amostras de sangue complexas.

Substância	Área relativa (%)										Intervalo de tolerância (%)
	<i>Pool 1</i>	<i>Pool 2</i>	<i>Pool 3</i>	<i>Pool 4</i>	<i>Pool 5</i>	<i>Pool 6</i>	<i>Pool 7</i>	<i>Pool 8</i>	<i>Pool 9</i>	<i>Pool 10</i>	
LEV	80	81	78	78	82	79	78	80	74	79	73 – 93
OLZ	79	90	79	85	96	82	95	83	89	83	76 – 96

* para o fenobarbital, os resultados obtidos foram para uma concentração de 1000 ng/mL.

Tabela 3.4. (continuação)

Substância	Área relativa (%)										Intervalo de tolerância (%)
	<i>Pool 1</i>	<i>Pool 2</i>	<i>Pool 3</i>	<i>Pool 4</i>	<i>Pool 5</i>	<i>Pool 6</i>	<i>Pool 7</i>	<i>Pool 8</i>	<i>Pool 9</i>	<i>Pool 10</i>	
KET	73	68	72	78	69	77	69	78	70	72	62 – 82
TRA	86	84	88	94	93	91	91	91	90	93	74 – 94
MIRT	12	12	13	12	12	12	12	12	12	12	7,1 – 17
TRZ	69	70	74	73	73	70	70	62	67	73	54 – 74
PB*	51	54	60	49	54	47	44	49	55	53	43 – 63
TPM	36	41	36	39	34	33	33	35	42	40	28 – 42
VLF	31	33	33	33	33	32	32	32	29	30	25 – 37
CTL	34	33	30	34	34	34	35	34	32	32	25 – 37
MNS	22	20	18	22	22	21	21	20	21	21	16 – 26
CLZ	9,0	9,9	9,4	9,8	9,6	9,3	9,9	9,3	9,7	9,6	4,4 – 14
QUET	29	22	23	23	23	24	24	24	25	25	19 – 29
HPD	10	10	9,9	11	12	10	9,3	10	10	10	5,6 – 16
PHT	23	24	26	30	22	28	23	22	31	26	21 – 31
CBZ	3,7	3,5	3,5	3,7	3,5	3,4	2,7	3,6	3,8	3,7	0 – 8,2
CMZ	11	11	10	12	11	11	9,0	11	11	10	6,4 – 16
PRX	19	19	19	20	19	19	21	20	18	19	14 – 24
MTD	97	96	86	94	91	94	92	84	85	91	83 – 103
LVM	62	61	70	70	61	65	61	71	64	67	57 – 77
AMT	66	63	55	58	60	65	58	55	57	63	48 – 68
NRT	71	72	72	73	80	75	72	75	74	86	67 – 87
FXT	6,2	6,6	6,0	6,7	6,1	6,1	6,8	6,1	6,0	6,4	1,4 – 11
SRT	56	52	52	55	53	53	47	52	52	53	45 – 65
CLP	36	32	32	34	35	36	40	35	32	33	28 – 41

* para o fenobarbital, os resultados obtidos foram para uma concentração de 1000 ng/mL.

Com base nos intervalos de tolerância calculados para cada um dos analitos em estudo (discriminados na tabela 3.3), é possível verificar que o critério das áreas relativas dos picos foi cumprido para todos os analitos em todas as *pools*, uma vez que, nas amostras em estudo, a percentagem correspondente à área relativa obtida para cada analito se encontrava dentro do intervalo estabelecido para o mesmo.

Uma vez que tanto o critério do tempo de retenção relativo como o das áreas relativas têm de estar cumpridos para que as amostras sejam consideradas como verdadeiros positivos, é possível afirmar que uma das amostras estudadas, a *pool 9*, representa um falso negativo, pois não cumpre o critério do tempo de retenção para a olanzapina. Assim, num universo de 10 amostras e 25 analitos em estudo, apenas uma se verificou como falso negativo para um dos analitos, traduzindo-se numa percentagem de 0,4% de falsos negativos. Encontra-se também cumprido o critério da razão sinal/ruído, que foi sempre superior a 3, como demonstrado no Anexo B.

Tanto nas alíquotas não fortificadas, como nas alíquotas fortificadas com mistura-padrão de benzodiazepinas, observou-se um ligeiro sinal cromatográfico para a trazodona na amostra P2 (figura

C2) e para a paroxetina na P9 (figura C8). Estes sinais são sinais residuais, tendo em conta a comparação das áreas obtidas para estas mesmas substâncias nas amostras fortificadas com 100 ng/mL: para a trazodona na P2 sem fortificação a área do sinal obtido foi cerca de 160 vezes menor que aquele obtido para a mesma na amostra controlo fortificada a 100 ng/mL, traduzindo-se numa concentração inferior a 1 ng/mL; para a paroxetina na P9 a área do sinal obtido foi cerca de 17 vezes inferior ao obtido para a mesma substância na amostra controlo fortificada com 100 ng/mL, o que se traduz numa concentração inferior a 10 ng/mL. As amostras selecionadas para a constituição das *pools* são amostras para as quais se obteve previamente um resultado negativo por GC-MS para os 25 fármacos em estudo, contudo, e uma vez que o método desenvolvido por ULPC-MS/MS é mais sensível, muito provavelmente com a nova metodologia foram detetadas substâncias em concentrações pequenas que o método anterior por GC-MS não conseguiu confirmar.

A título de exemplo, na figura 3.1 estão representados os resultados cromatográficos obtidos para a *pool* 3, na alíquota não fortificada (à esquerda) e na alíquota fortificada com benzodiazepinas (à direita), confirmando que não se detetou qualquer um dos fármacos em estudo.

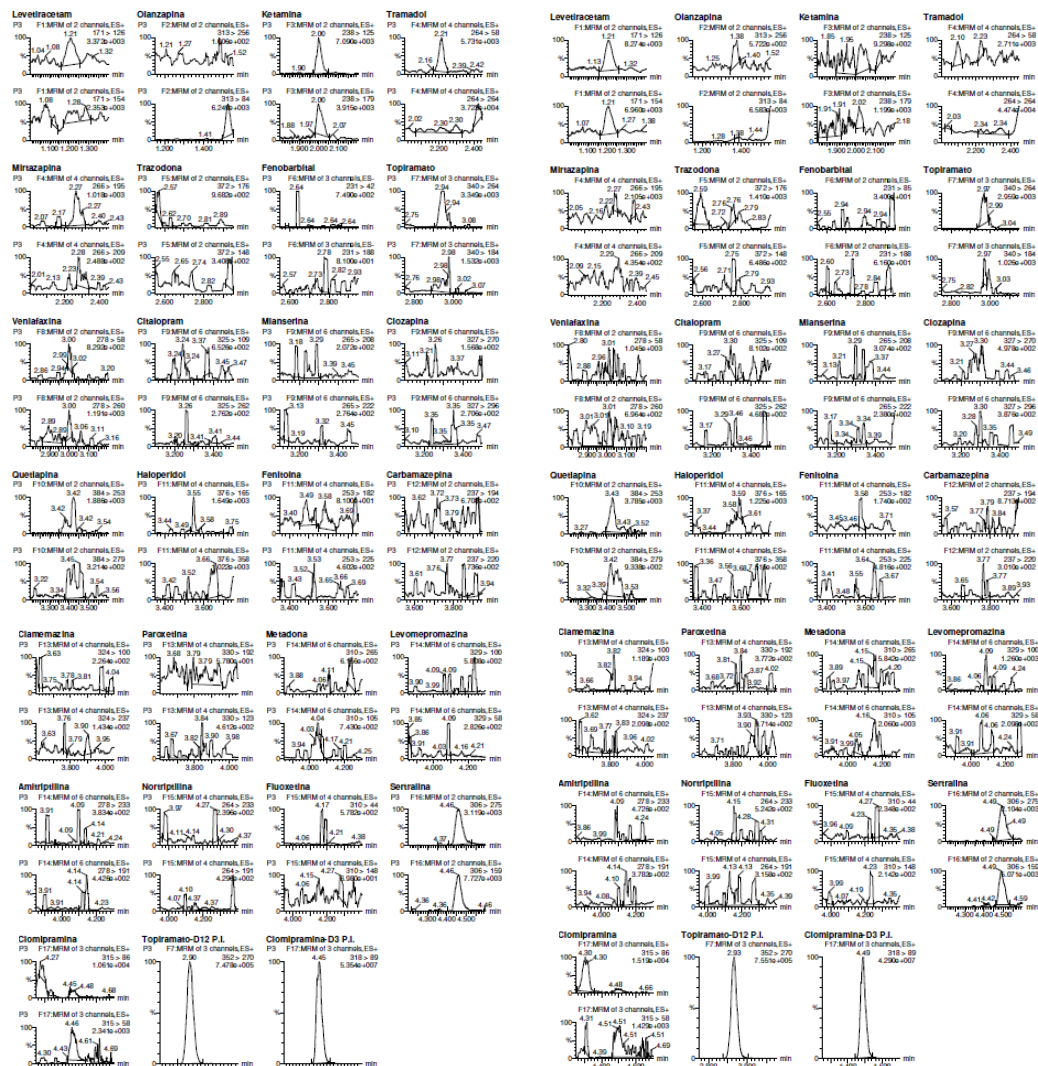


Figura 3.1. Cromatogramas da *pool* 3, sem fortificação (à esquerda) e com fortificação com mistura-padrão de 100 ng/mL de benzodiazepinas (à direita).

Os resultados das alíquotas sem fortificação e com fortificação de benzodiazepinas das restantes *pools* encontram-se no Anexo C, sendo possível comprovar a inexistência de qualquer sinal cromatográfico significativo, descartando a existência de falsos positivos.

Reunindo os resultados obtidos para as alíquotas fortificadas com uma mistura-padrão com todos os analitos em estudo, para as alíquotas fortificadas com uma mistura-padrão de benzodiazepinas e para as que não foram fortificadas com qualquer substância, é possível afirmar que o método é seletivo, uma vez que a percentagem de falsos negativos observada é bastante inferior a 10% (0,4%) e não se verificou a existência de falsos positivos.

3.2.2. Eficiência da extração

A percentagem de cada analito que foi possível recuperar de cada amostra de sangue, fortificada com uma mistura-padrão contendo cada um dos analitos numa concentração de 100 e de 1000 ng/mL, após o procedimento extrativo, foi estudada de acordo com o procedimento descrito em 2.7.3 e verificou-se ser igual ou superior a 77% (resultado mais baixo foi obtido para a cetamina a 100 ng/mL), como é possível verificar pelos resultados apresentados na tabela 3.5.

Tabela 3.5. Percentagem de recuperação obtida para cada analito à concentração de 100 e 1000 ng/mL.

Substância	Recuperação (%)	
	100 ng/mL	1000 ng/mL
LEV	78	93
OLZ	81	88
KET	77	87
TRA	81	94
MIRT	81	93
TRZ	79	94
PB	94	85
TPM	87	88
VLF	81	95
CTL	80	93
MNS	84	92
CLZ	83	92
QUET	82	92
HPD	83	94
PHT	84	79
CBZ	89	95
CMZ	86	93
PRX	88	88
MTD	79	94
LVM	86	90
AMT	82	95
NRT	85	89
FXT	87	88
SRT	94	85
CLP	85	91

Tendo em conta que a percentagem de analito recuperado se considera favorável a partir de 40%, é possível afirmar que a extração aplicada neste método é eficiente, uma vez que a recuperação se encontra entre 77 e 94% para todos os analitos a 100 ng/mL e entre 79 e 95% numa concentração de 1000 ng/mL.

Como referido no ponto 2.7.3, a percentagem de analito recuperado deve ser tida em conta de forma holística, considerando a generalidade do método. Para métodos de preparação de amostras mais simplificados, no caso deste, é esperado que se obtenha uma alta percentagem de analito recuperado, no entanto, podem existir mais interferências nas amostras, por existirem menos etapas que permitam a limpeza das mesmas. Uma vez que a tecnologia utilizada neste método constitui um bom suporte analítico (espectrometria massa/massa) essas interferências, mesmo que existentes, acabam por não afetar de forma significativa a identificação e confirmação dos analitos, o que é comprovado pelo parâmetro da seletividade/especificidade. Ou seja, é possível existir um procedimento extrativo simples, com ótima recuperação e fracamente afetado por interferências, utilizando a tecnologia de UPLC-MS/MS.

3.2.3. Arrastamento

O estudo de fenómenos de arrastamento foi realizado concomitantemente com o teste da eficiência da extração, como referido no procedimento em 2.7.4, tendo sido analisadas duas amostras brancas entre três amostras de sangue fortificadas com 25 analitos, cada uma com concentração de 1000 ng/mL, após o procedimento extrativo.

Na figura 3.2 encontram-se os cromatogramas obtidos para as amostras brancas estudadas. De todos os analitos em estudo, apenas se verificou um sinal correspondente à olanzapina, uma vez que foram detetados picos cromatográficos correspondentes à mesma nas amostras brancas, compatíveis com uma possível contaminação.

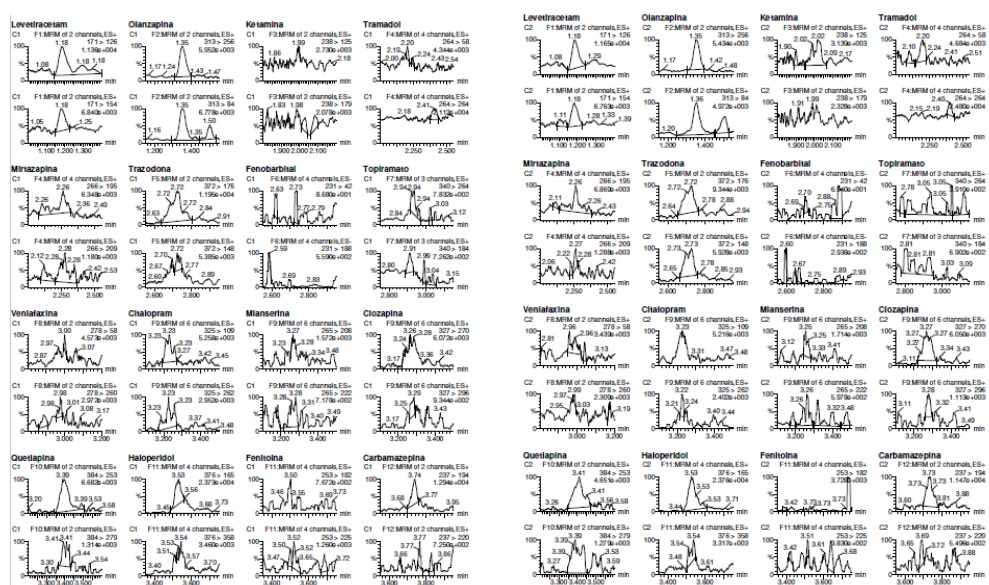


Figura 3.2. Cromatogramas das amostras brancas A (à esquerda) e B (à direita) do estudo do fenómeno de arrastamento (carryover).

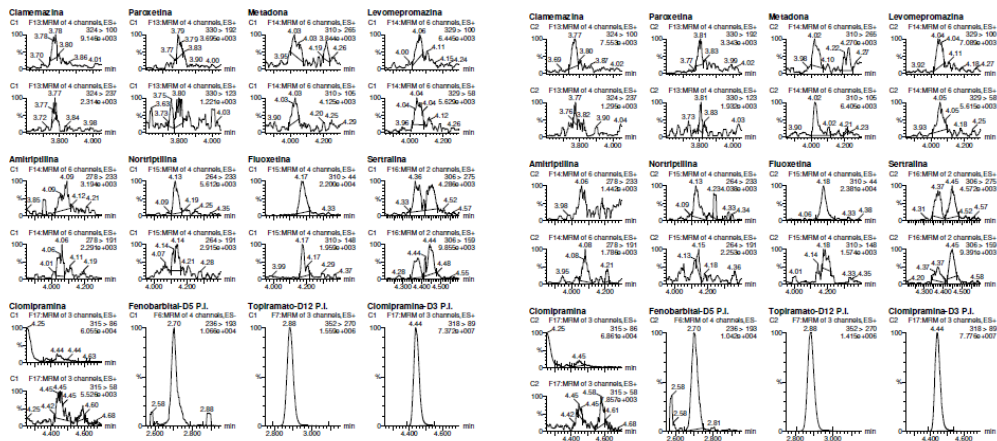


Figura 3.2. (continuação)

Após estudo das áreas relativas dos iões monitorizados para a olanzapina, concluiu-se que não estava cumprido o critério de positividade nas amostras brancas A e B para a olanzapina, uma vez que as áreas relativas não respeitavam o intervalo de tolerância estabelecido. Deste modo, não é considerada a existência do fenómeno de arrastamento, mas sim alguma possível interferência, embora mínima.

De qualquer modo, a fim de minimizar possíveis contaminações e interferências, um procedimento a ter em consideração de futuro poderá passar pela modificação do procedimento de lavagem do injetor ou a corrida de amostras brancas entre análises.

3.2.4. Efeito de matriz

A ionização das moléculas pode sofrer alterações quando ocorre a coeluição de outros componentes presentes na matriz biológica com os analitos em estudo, podendo originar intensificação ou supressão do sinal cromatográfico. (Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX), 2013) Este fenómeno, denominado **efeito de matriz (EM)**, foi estudado através do método de fortificação pós-extração, de duas formas (descrito em 2.7.5), na validação deste procedimento, tendo-se obtido os resultados com base na fórmula 2.5. Estes resultados, para o primeiro estudo, em que o EM foi avaliado numa única amostra de sangue, mas em duas concentrações distintas de analito (100 e 1000 ng/mL), com o objetivo de verificar a variabilidade do efeito de matriz em função da concentração de analito, encontram-se resumidos na tabela 3.6. Na segunda experiência, o EM foi estudado em dez amostras de sangue diversificadas com a mesma concentração de analito e os resultados obtidos estão apresentados na tabela 3.7. Adicionalmente, foi também calculada a percentagem do coeficiente de variação (CV) do EM, através da fórmula:

$$\%CV = \frac{s}{\bar{X}} \quad \text{Equação 3.1}$$

Onde:

s é o desvio padrão

\bar{X} é a média

Segundo as práticas padrão para a validação de métodos em toxicologia forense, o efeito de matriz não deve exceder $\pm 25\%$ e o coeficiente de variação não deve exceder os 15% e, caso se verifique, é necessário comprovar que esse efeito não afeta outros parâmetros de validação. (Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX), 2013)

Tabela 3.6. Percentagem de efeito de matriz observada, numa única amostra, para cada analito em estudo em duas concentrações distintas e respetivo coeficiente de variação.

Substância	Sangue periférico (<i>Pool 5</i>)			
	EM (%)			
	100 ng/mL	CV (%)	1000 ng/mL	CV (%)
LEV	7,6	1,9	-13	1,0
OLZ	14	5,4	-3,8	1,9
KET	6,3	0,80	2,6	0,61
TRA	12	1,9	1,8	1,1
MIRT	1,7	4,6	2,0	0,36
TRZ	-0,31	2,2	-0,39	1,7
PB	-58	3,4	-26	6,1
TPM	32	3,5	5,0	5,8
VLF	14	2,3	4,6	0,54
CTL	0,84	2,7	1,6	0,58
MNS	-14	2,0	-4,6	2,8
CLZ	-12	4,5	-3,6	3,9
QUET	2,9	3,3	0,41	1,5
HPD	-3,5	2,7	-2,5	1,7
PHT	33	3,7	5,8	14
CBZ	1,5	0,6	9,8	4,2
CMZ	-10	3,6	-2,2	2,8
PRX	-25	6,6	-18	8,6
MTD	19	1,7	3,1	1,4
LVM	-15	9,0	-4,8	3,3
AMT	-9,1	5,1	-2,6	5,2
NRT	-14	1,8	-10	7,0
FXT	-18	8,4	-19	6,9
SRT	-41	15	-38	17
CLP	-16	7,6	-9,3	7,2

Na avaliação do efeito de matriz em função da concentração (tabela 3.6), não foram observados fenómenos significativos para a maioria dos analitos estudados, exceto para o fenobarbital a 100 ng/mL, para o qual se verificou uma grande percentagem de supressão iónica (-58%), e para a sertralina em ambas as concentrações, para a qual também se verificou considerável supressão iónica (-41 e -38%, para 100 e 1000 ng/mL, respetivamente).

Tabela 3.7. Percentagem de efeito de matriz observada, em diversas amostras, para cada analito em estudo a uma concentração de 1000 ng/mL.

Substância	Efeito de matriz (%)										CV (%)
	Pool 1	Pool 2	Pool 3	Pool 4	Pool 5	Pool 6	Pool 7	Pool 8	Pool 9	Pool 10	
LEV	-9,0	0,42	-4,7	-9,8	-6,2	2,7	-8,9	9,5	-34	2,7	12
OLZ	12	17	22	20	13	24	17	27	-6,6	19	8,7
KET	81	97	104	105	90	86	90	108	56	93	8,8
TRA	47	50	52	52	48	51	52	53	52	52	2,0
MIRT	9,8	9,2	13	12	7,7	11	12	15	7,6	11	2,9
TRZ	-5,5	-3,6	-2,1	-3,1	-1,4	0,12	-3,8	0,43	-8,1	-0,11	4,3
PB	0,04	-19	11	14	-7,7	2,2	-4,9	4,1	-29	-1,5	15
TPM	14	14	19	12	6,0	15	28	12	44	10	11
VLF	15	18	18	18	16	19	20	22	24	18	2,9
CTL	-10	-5,7	-6,2	-8,6	-10	-2,1	-7,2	-6,5	-4,6	-5,8	3,1
MNS	-0,79	7,8	9,6	5,0	5,3	16	6,2	12	-25	7,8	11
CLZ	-1,8	1,0	3,9	1,4	-2,9	4,7	7,9	7,5	-9,4	1,0	6,9
QUET	-2,1	-2,5	1,6	3,8	-0,7	6,9	14	7,0	-1,1	3,8	6,0
HPD	-12	-3,4	-1,7	-8,7	-7,8	-0,57	-3,2	-3,0	-45	-4,4	15
PHT	1,2	-11	-7,3	6,8	-9,7	-6,6	9,4	3,4	-15	-5,0	15
CBZ	5,6	6,0	6,8	8,0	2,2	3,8	25	5,3	6,0	3,0	6,2
CMZ	-6,3	-2,4	-2,2	-4,3	-4,6	1,5	12	3,3	-19	-1,9	8,8
PRX	-21	-18	-8,0	-26	-17	1,8	18	-0,06	-58	-8,8	20
MTD	36	38	40	38	38	37	54	43	15	36	8,5
LVM	-15	-14	-3,2	-14	-15	-5,9	-3,4	-3,5	-39	-9,3	13
AMT	6,1	12	14	14	18	29	27	19	-24	20	14
NRT	-16	-5,8	-0,45	-14	-10	-0,56	-1,5	3,7	-65	-8,0	22
FXT	-8,1	4,7	8,9	-7,7	-2,0	24	22	14	-66	8,0	23
SRT	-44	-35	-28	-56	-38	-35	-34	-25	-87	-36	20
CLP	-8,0	-9,2	-7,3	-9,0	-14	3,3	-13	-3,3	-65	-8,4	21

Nesta segunda análise (tabela 3.7), confirma-se que não existem efeitos matriz significativos para a maioria dos analitos. No entanto, verificou-se uma intensificação considerável do sinal para a cetamina, tramadol e metadona e observou-se, novamente, considerável supressão iónica para a sertralina.

Embora existam os fenómenos de supressão e intensificação iónica anteriormente referidos, estes não apresentam consideráveis oscilações para o mesmo analito em diferentes amostras de sangue, o que pode ser comprovado pelos valores de CV obtidos. Mais importante do que existir um efeito de matriz reduzido, é necessário que este seja estável, pois demonstra a estabilidade do analito em diferentes matrizes biológicas do mesmo tipo, tendo esta sido verificada pelas percentagens do coeficiente de variação obtidas. No entanto, verificou-se um coeficiente de variação superior ao recomendado ($CV \leq 15\%$) para a paroxetina (20%), nortriptilina (22%), fluoxetina (23%), sertralina (20%) e clomipramina (21%), uma vez que estes analitos possuem valores de EM para todas as *pools* dentro do intervalo de percentagem recomendado ($\pm 25\%$), exceto para a *pool* 9, na qual se verificou uma supressão iónica bastante considerável, sobretudo para estas substâncias. De um modo geral, a *pool* 9 apresentou

valores muito elevados de supressão iônica para uma considerável quantidade de analitos, o que pode levar a concluir que, provavelmente, esta amostra complexa (constituída pelo sangue periférico de quatro cadáveres distintos) poderá conter algum componente que interfere com a ionização dos analitos, e em particular mais no caso dos analitos supramencionados, tanto mais que, se os valores obtidos para esta amostra não fossem incluídos no cálculo dos CV, todos os analitos apresentariam um CV bastante inferior a 15%.

Para compensar nestes casos as oscilações existentes, poder-se-á avaliar no futuro a vantagem em se utilizar padrões internos deuterados correspondentes aos analitos que sofrem mais os efeitos de matriz, uma vez que estes permitem uma melhor correção das variações existentes.

3.2.5. Limite de deteção (LD)

A avaliação do limite de deteção foi realizada de acordo com o procedimento descrito em 2.7.6 sendo que, para o cálculo do mesmo para cada analito, utilizou-se o modelo de regressão linear ponderada com fator de $1/x$. Após construção das curvas de calibração de cada analito e cálculos estatísticos (presentes no Anexo D), foi possível calcular os respetivos limites de deteção através da fórmula 2.6, tendo por base a equação da reta e o erro-padrão obtidos.

Os resultados apresentados na tabela 3.8 foram obtidos com base nos dados apresentados no Anexo D, onde estão representadas as concentrações utilizadas para a construção das curvas de calibração, áreas obtidas, curvas de calibração e o tratamento de dados para cada um dos analitos em estudo.

Tabela 3.8. Equação resultante da curva de calibração de 10 pontos obtida para cada analito, respetivo coeficiente de determinação (R^2) e erro-padrão e limite de deteção calculado e real (ng/mL).

Substância	Equação	R^2	Erro-padrão ($S_{y/x}$)	Limite de deteção (ng/mL)	Limite de deteção final (ng/mL)
LEV	$y = 0,0014x - 0,00004$	0,9946	0,00092	2,2	3
OLZ	$y = 0,0019x - 0,0015$	0,9920	0,00172	3,0	3
KET	$y = 0,0015x - 0,0004$	0,9953	0,00107	2,3	4
TRA	$y = 0,0079x - 0,0007$	0,9941	0,00543	2,3	3
MIRT	$y = 0,007x - 0,0012$	0,9936	0,00501	2,4	3
TRZ	$y = 0,0037x - 0,0004$	0,9944	0,00245	2,2	2
PB	$y = 0,0038x - 0,0433$	0,9918	0,05427	47	80
TPM	$y = 0,0027x - 0,0005$	0,9954	0,00164	2,0	2
VLF	$y = 0,0067x - 0,001$	0,9928	0,00506	2,5	3
CTL	$y = 0,0035x - 0,0002$	0,9970	0,00193	1,8	2
MNS	$y = 0,0006x - 0,0004$	0,9947	0,00037	2,2	3
CLZ	$y = 0,0024x - 0,0011$	0,9956	0,00141	2,0	2
QUET	$y = 0,0037x - 0,0015$	0,9968	0,00185	1,7	2
HPD	$y = 0,0051x - 0,0021$	0,9952	0,00315	2,0	2
PHT	$y = 0,0014x - 0,0004$	0,9979	0,00134	3,2	4
CBZ	$y = 0,1222x - 0,0527$	0,9939	0,08550	2,3	3
CMZ	$y = 0,0031x - 0,0008$	0,9964	0,00166	1,8	2
PRX	$y = 0,0004x - 0,0001$	0,9986	0,00015	1,1	2

Tabela 3.8. (continuação)

Substância	Equação	R ²	Erro-padrão (S _{y/x})	Limite de detecção (ng/mL)	Limite de detecção final (ng/mL)
MTD	$y = 0,0023x - 0,00002$	0,9962	0,00140	2,0	2
LVM	$y = 0,0025x - 0,0016$	0,9955	0,00150	2,0	3
AMT	$y = 0,0005x - 0,000009$	0,9977	0,00026	1,6	3
NRT	$y = 0,0006x - 0,00002$	0,9982	0,00022	1,3	3
FXT	$y = 0,0011x - 0,0001$	0,9965	0,00068	2,1	3
SRT	$y = 0,0003x - 0,0002$	0,9963	0,00020	2,1	3
CLP	$y = 0,0023x - 0,0006$	0,9986	0,00076	1,1	3

Para os analitos em estudo, os limites de detecção obtidos situam-se entre 1,1 e 3,2 ng/mL, exceto para o fenobarbital, para o qual se obteve um limite de detecção de 47 ng/mL. A diferença do fenobarbital em relação às restantes substâncias pode dever-se a este ser o único analito a sofrer ionização negativa no espectrómetro de massa, existindo assim menor resposta ao detetor nas condições estabelecidas para esta metodologia. De qualquer forma, os limites de detecção obtidos de um modo geral são muito bons, dadas as concentrações que têm vindo a ser estudadas.

Tendo em conta as concentrações terapêuticas dos fármacos em estudo, é possível concluir que estas substâncias podem ser detetadas mesmo que a sua concentração no sangue esteja muito abaixo da dose terapêutica recomendada, ou seja, numa concentração subterapêutica, uma vez que os limites de detecção obtidos são bastante baixos, incluindo o do fenobarbital. Embora este analito tenha um limite de detecção um pouco elevado (47 ng/mL), este está muito abaixo da concentração terapêutica recomendada no tratamento com este fármaco (6000-30000 ng/mL), não sendo um obstáculo relevante, sobretudo pelo objetivo desta nova metodologia ser que a mesma seja simplificada e abrangente para um grande conjunto de substâncias, pelo que seria expectável que, para algum dos analitos, os resultados obtidos não fossem ótimos.

Após estabelecido o limite de detecção de cada analito, foi realizado o teste do limite, a fim de se verificar a sua veracidade, avaliando o cumprimento dos critérios do TRR, das áreas relativas dos iões e da razão S/R.

A concentração da amostra controlo utilizada no teste do limite de detecção de cada um dos analitos é aquela que mais se aproxima à obtida no cálculo do limite de detecção, mas com valor superior a este. Assim, a concentração de cada analito utilizada para a fortificação das amostras controlo é aquela que se considera como limite de detecção para cada um dos mesmos (“limite de detecção final” da tabela 3.8). Na tabela 3.9 estão sumariados, para cada analito, os resultados obtidos para o teste do limite de detecção (tempos de retenção e áreas correspondentes às transições iónicas monitorizadas), bem como a comparação dos resultados obtidos em cada *pool* com os resultados obtidos para o respetivo controlo (tempo de retenção relativo, diferença do tempo de retenção relativo, área relativa dos iões e intervalo de tolerância admitido), o que permitiu averiguar se cumprem os critérios de positividade.

Tabela 3.9. Resultados obtidos para o controle (C) e *pools* em estudo no teste do limite de detecção de cada analito: TR do analito (s) e do padrão interno (PI) em segundos, TRR, Δ TRR, área dos dois íões monitorizados para cada analito, abundâncias relativas e intervalo de tolerância das abundâncias relativas.

	Amostra	TR _s	TR _{PI}	TRR	Δ TRR	A ₁₂₆	A ₁₅₄	A relativa (%)	Tolerância (%)
		(s)	(s)						
Levetiracetam	C 3 ng/mL	1,19	4,44	0,268		7875	6086	77	67-87
	Pool 3	1,19	4,45	0,267	-0,002	5045	3863	77	
	Pool 4	1,19	4,45	0,267	-0,002	4856	3660	75	
	Pool 6	1,19	4,45	0,267	-0,002	5492	4164	76	
	Pool 7	1,19	4,44	0,268	0	4436	3352	76	
	Pool 8	1,19	4,45	0,268	0	5252	4150	79	
Olanzapina	Amostra	TR _s	TR _{PI}	TRR	Δ TRR	A ₂₅₆	A ₈₄	A relativa (%)	Tolerância (%)
		(s)	(s)						
	C 3 ng/mL	1,36	4,44	0,306		8550	8226	96	86-106
	Pool 3	1,37	4,45	0,308	0,005	5452	4954	91	
	Pool 4	1,37	4,45	0,308	0,005	5724	5794	101	
	Pool 6	1,35	4,45	0,303	-0,009	7246	6400	88	
	Pool 7	1,36	4,44	0,306	0	3752	3413	91	
Pool 8	1,36	4,44	0,306	0	4873	4792	98		
Cetamina	Amostra	TR _s	TR _{PI}	TRR	Δ TRR	A ₁₂₅	A ₁₇₉	A relativa (%)	Tolerância (%)
		(s)	(s)						
	C 4 ng/mL	1,99	4,44	0,306		8612	5651	66	56-76
	Pool 3	1,99	4,45	0,308	0,005	7292	5037	69	
	Pool 4	1,99	4,44	0,308	0,005	6780	4836	71	
	Pool 6	1,99	4,45	0,303	-0,009	6493	4665	72	
	Pool 7	1,99	4,44	0,306	0	6601	4809	73	
Pool 8	1,99	4,44	0,306	0	7443	5041	68		
Tramadol	Amostra	TR _s	TR _{PI}	TRR	Δ TRR	A ₅₈	A ₂₆₄	A relativa (%)	Tolerância (%)
		(s)	(s)						
	C 3 ng/mL	2,21	4,44	0,498		34320	32904	96	86-106
	Pool 3	2,21	4,45	0,497	-0,002	27844	27786	100	
	Pool 4	2,21	4,45	0,497	-0,002	29674	27910	94	
	Pool 6	2,2	4,45	0,494	-0,007	32702	29212	89	
	Pool 7	2,2	4,44	0,496	-0,004	28354	25034	88	
Pool 8	2,2	4,44	0,496	-0,004	26391	25525	97		
Mirtazapina	Amostra	TR _s	TR _{PI}	TRR	Δ TRR	A ₁₉₅	A ₂₀₉	A relativa (%)	Tolerância (%)
		(s)	(s)						
	C 3 ng/mL	2,27	4,44	0,511		31274	3642	12	7,0-17
	Pool 3	2,27	4,45	0,510	-0,002	21898	2632	12	
	Pool 4	2,27	4,45	0,510	-0,002	22440	2854	13	
	Pool 6	2,27	4,45	0,510	-0,002	25597	2889	11	
	Pool 7	2,27	4,44	0,511	0	19927	2478	12	
Pool 8	2,26	4,44	0,509	0,004	19813	2483	12		
Trazodona	Amostra	TR _s	TR _{PI}	TRR	Δ TRR	A ₁₇₆	A ₁₄₈	A relativa (%)	Tolerância (%)
		(s)	(s)						
	C 2 ng/mL	2,74	4,45	0,616		17330	8310	48	38-58
	Pool 3	2,73	4,45	0,614	-0,004	12890	5971	46	
	Pool 4	2,73	4,45	0,614	-0,004	14873	6838	46	
	Pool 6	2,73	4,45	0,614	-0,004	14689	7211	49	
	Pool 7	2,73	4,45	0,614	-0,004	12630	7040	56	
Pool 8	2,73	4,44	0,615	-0,001	11925	5735	48		

Tabela 3.9. (continuação)

Fenobarbital	Amostra	TR_s (s)	TR_{PI} (s)	TRR	ΔTRR	A₄₂	A₁₈₈	A relativa (%)	Tolerância (%)
	C 80 ng/mL	2,73	2,71	1,007		68,829	33,783	49	39-59
	<i>Pool 3</i>	2,73	2,71	1,007	0	45,205	25,096	56	
	<i>Pool 4</i>	2,73	2,71	1,007	0	64,387	27,597	43	
	<i>Pool 6</i>	2,73	2,70	1,011	0,004	67,229	34,08	51	
	<i>Pool 7</i>	2,73	2,70	1,011	0,004	46,319	27,169	59	
	<i>Pool 8</i>	2,74	2,70	1,015	0,007	65,724	32,99	50	
Topiramato	Amostra	TR_s (s)	TR_{PI} (s)	TRR	ΔTRR	A₂₆₄	A₁₈₄	A relativa (%)	Tolerância (%)
	C 2 ng/mL	2,96	2,91	1,017		335,70	155,52	46	37-56
	<i>Pool 3</i>	2,94	2,9	1,014	-0,003	411,91	192,89	47	
	<i>Pool 4</i>	2,95	2,9	1,017	0,000	301,49	134,06	44	
	<i>Pool 6</i>	2,95	2,9	1,017	0,000	264,70	120,92	46	
	<i>Pool 7</i>	2,95	2,9	1,017	0,000	310,50	169,71	55	
	<i>Pool 8</i>	2,94	2,9	1,014	-0,003	229,13	86,40	38	
Venlafaxina	Amostra	TR_s (s)	TR_{PI} (s)	TRR	ΔTRR	A₅₈	A₂₆₀	A relativa (%)	Tolerância (%)
	C 3 ng/mL	3	4,44	0,676		33455	9750	29	23-35
	<i>Pool 3</i>	3	4,45	0,674	-0,002	20624	6690	32	
	<i>Pool 4</i>	3	4,45	0,674	-0,002	22844	6889	30	
	<i>Pool 6</i>	3	4,45	0,674	-0,002	25870	8040	31	
	<i>Pool 7</i>	3	4,44	0,676	0	24234	7402	30	
	<i>Pool 8</i>	3	4,44	0,676	0	18819	6220	33	
Citalopram	Amostra	TR_s (s)	TR_{PI} (s)	TRR	ΔTRR	A₁₀₉	A₂₆₂	A relativa (%)	Tolerância (%)
	C 2 ng/mL	3,25	4,45	0,730		14552	4758	33	26-39
	<i>Pool 3</i>	3,24	4,45	0,728	-0,003	8498	2887	34	
	<i>Pool 4</i>	3,24	4,45	0,728	-0,003	10455	3436	33	
	<i>Pool 6</i>	3,23	4,45	0,726	-0,006	10381	3340	32	
	<i>Pool 7</i>	3,24	4,45	0,728	-0,003	12404	4062	33	
	<i>Pool 8</i>	3,24	4,44	0,730	-0,001	8049	2697	34	
Mianserina	Amostra	TR_s (s)	TR_{PI} (s)	TRR	ΔTRR	A₂₀₈	A₂₂₂	A relativa (%)	Tolerância (%)
	C 3 ng/mL	3,27	4,44	0,736		2639	610	23	18-28
	<i>Pool 3</i>	3,28	4,45	0,737	0,001	1545	354	23	
	<i>Pool 4</i>	3,27	4,45	0,735	-0,002	1805	409	23	
	<i>Pool 6</i>	3,27	4,45	0,735	-0,002	2022	445	22	
	<i>Pool 7</i>	3,27	4,44	0,736	0	2233	428	19	
	<i>Pool 8</i>	3,27	4,44	0,736	0	1502	360	24	
Clozapina	Amostra	TR_s (s)	TR_{PI} (s)	TRR	ΔTRR	A₂₇₀	A₂₉₆	A relativa (%)	Tolerância (%)
	C 2 ng/mL	3,3	4,45	0,742		9557	982	10	5.3-15
	<i>Pool 3</i>	3,29	4,45	0,739	-0,003	5378	541	10	
	<i>Pool 4</i>	3,29	4,45	0,739	-0,003	6776	658	9,7	
	<i>Pool 6</i>	3,29	4,45	0,739	-0,003	5754	546	9,5	
	<i>Pool 7</i>	3,29	4,45	0,739	-0,003	7442	775	10	
	<i>Pool 8</i>	3,29	4,44	0,741	-0,001	4935	459	9,3	

Tabela 3.9. (continuação)

Quetiapina	Amostra	TR_s (s)	TR_{PI} (s)	TRR	ΔTRR	A₂₅₃	A₂₇₉	A relativa (%)	Tolerância (%)
	C 2 ng/mL	3,42	4,45	0,768		14547	2963	20	15-25
	<i>Pool 3</i>	3,41	4,45	0,766	-0,003	8401	2026	24	
	<i>Pool 4</i>	3,41	4,45	0,766	-0,003	10124	2176	22	
	<i>Pool 6</i>	3,41	4,45	0,766	-0,003	9458	2000	21	
	<i>Pool 7</i>	3,41	4,45	0,766	-0,003	13268	2815	21	
	<i>Pool 8</i>	3,41	4,44	0,768	-0,001	8187	1638	20	
Haloperidol	Amostra	TR_s (s)	TR_{PI} (s)	TRR	ΔTRR	A₁₆₅	A₃₅₈	A relativa (%)	Tolerância (%)
	C 2 ng/mL	3,54	4,45	0,796		20498	2032	9,9	4.9-15
	<i>Pool 3</i>	3,53	4,45	0,793	-0,003	12760	1301	10	
	<i>Pool 4</i>	3,53	4,45	0,793	-0,003	14503	1518	10	
	<i>Pool 6</i>	3,53	4,45	0,793	-0,003	13984	1417	10	
	<i>Pool 7</i>	3,53	4,45	0,793	-0,003	15965	1591	10	
	<i>Pool 8</i>	3,53	4,44	0,795	-0,001	10664	1167	11	
Fenitoína	Amostra	TR_s (s)	TR_{PI} (s)	TRR	ΔTRR	A₁₈₂	A₂₂₅	A relativa (%)	Tolerância (%)
	C 4 ng/mL	3,52	2,89	1,218		324	97	30	24-36
	<i>Pool 3</i>	3,51	2,89	1,214	-0,003	202	56	28	
	<i>Pool 4</i>	3,52	2,89	1,218	0	271	67	25	
	<i>Pool 6</i>	3,52	2,89	1,218	0	205	73	36	
	<i>Pool 7</i>	3,52	2,89	1,218	0	367	123	33	
	<i>Pool 8</i>	3,52	2,89	1,218	0	180	46	26	
Carbamazepina	Amostra	TR_s (s)	TR_{PI} (s)	TRR	ΔTRR	A₁₉₄	A₂₂₀	A relativa (%)	Tolerância (%)
	C 3 ng/mL	3,75	2,9	1,293		19961	734	3,7	0-8.7
	<i>Pool 3</i>	3,74	2,89	1,294	0,001	13968	445	3,2	
	<i>Pool 4</i>	3,75	2,9	1,293	0	16520	522	3,2	
	<i>Pool 6</i>	3,75	2,89	1,298	0,003	14676	447	3,0	
	<i>Pool 7</i>	3,75	2,89	1,298	0,003	29180	720	2,5	
	<i>Pool 8</i>	3,74	2,89	1,294	0,001	11603	408	3,5	
Ciamemazina	Amostra	TR_s (s)	TR_{PI} (s)	TRR	ΔTRR	A₁₀₀	A₂₃₇	A relativa (%)	Tolerância (%)
	C 2 ng/mL	3,78	4,45	0,849		14846	1501	10	5.1-15
	<i>Pool 3</i>	3,77	4,45	0,847	-0,003	7623	784	10	
	<i>Pool 4</i>	3,77	4,45	0,847	-0,003	9073	948	10	
	<i>Pool 6</i>	3,77	4,45	0,847	-0,003	7572	812	11	
	<i>Pool 7</i>	3,77	4,45	0,847	-0,003	11235	936	8,3	
	<i>Pool 8</i>	3,77	4,44	0,849	0,000	6725	676	10	
Paroxetina	Amostra	TR_s (s)	TR_{PI} (s)	TRR	ΔTRR	A₁₉₂	A₁₂₃	A relativa (%)	Tolerância (%)
	C 2 ng/mL	3,81	4,45	0,856		2010	418	21	16-26
	<i>Pool 3</i>	3,81	4,45	0,856	0	971	187	19	
	<i>Pool 4</i>	3,81	4,45	0,856	0	1408	248	18	
	<i>Pool 6</i>	3,8	4,45	0,854	-0,003	932	172	18	
	<i>Pool 7</i>	3,81	4,45	0,856	0	1130	209	18	
	<i>Pool 8</i>	3,8	4,44	0,856	0,000	812	170	21	

Tabela 3.9. (continuação)

Metadona	Amostra	TR_s (s)	TR_{PI} (s)	TRR	ΔTRR	A₂₆₅	A₁₀₅	A relativa (%)	Tolerância (%)
	C 2 ng/mL	4,03	4,45	0,906		13097	10960	84	74-94
	<i>Pool 3</i>	4,03	4,45	0,906	0	6027	5090	84	
	<i>Pool 4</i>	4,03	4,45	0,906	0	7101	6561	92	
	<i>Pool 6</i>	4,03	4,45	0,906	0	6633	5901	89	
	<i>Pool 7</i>	4,02	4,45	0,903	-0,002	15275	12512	82	
	<i>Pool 8</i>	4,02	4,44	0,905	0,000	5239	4250	81	
Levonpromazina	Amostra	TR_s (s)	TR_{PI} (s)	TRR	ΔTRR	A₁₀₀	A₅₈	A relativa (%)	Tolerância (%)
	C 3 ng/mL	4,05	4,44	0,912		12631	7354	58	48-68
	<i>Pool 3</i>	4,05	4,45	0,910	-0,002	5123	3264	64	
	<i>Pool 4</i>	4,06	4,45	0,912	0,000	7619	4874	64	
	<i>Pool 6</i>	4,05	4,45	0,910	-0,002	5602	3510	63	
	<i>Pool 7</i>	4,05	4,44	0,912	0	9596	4941	52	
	<i>Pool 8</i>	4,05	4,44	0,912	0	4682	2880	62	
Amitriptilina	Amostra	TR_s (s)	TR_{PI} (s)	TRR	ΔTRR	A₂₃₃	A₁₉₁	A relativa (%)	Tolerância (%)
	C 3 ng/mL	4,07	4,44	0,917		3251	1678	52	42-62
	<i>Pool 3</i>	4,07	4,45	0,915	-0,002	1880	960	51	
	<i>Pool 4</i>	4,07	4,45	0,915	-0,002	2209	1242	56	
	<i>Pool 6</i>	4,06	4,45	0,912	-0,005	1945	999	51	
	<i>Pool 7</i>	4,06	4,44	0,914	-0,002	2952	1319	45	
	<i>Pool 8</i>	4,06	4,44	0,914	-0,002	1632	946	58	
Nortriptilina	Amostra	TR_s (s)	TR_{PI} (s)	TRR	ΔTRR	A₂₃₃	A₁₉₁	A relativa (%)	Tolerância (%)
	C 3 ng/mL	4,14	4,44	0,932		3514	2174	62	52-72
	<i>Pool 3</i>	4,14	4,45	0,930	-0,002	1422	785	55	
	<i>Pool 4</i>	4,14	4,45	0,930	-0,002	1866	1102	59	
	<i>Pool 6</i>	4,14	4,45	0,930	-0,002	1842	1240	67	
	<i>Pool 7</i>	4,13	4,44	0,930	-0,002	3019	1574	52	
	<i>Pool 8</i>	4,14	4,44	0,932	0	1434	990	69	
Fluoxetina	Amostra	TR_s (s)	TR_{PI} (s)	TRR	ΔTRR	A₄₄	A₁₄₈	A relativa (%)	Tolerância (%)
	C 3 ng/mL	4,18	4,44	0,941		7964	504	6,3	1.3-11
	<i>Pool 3</i>	4,18	4,45	0,939	-0,002	3600	225	6,3	
	<i>Pool 4</i>	4,18	4,45	0,939	-0,002	4725	283	6,0	
	<i>Pool 6</i>	4,18	4,45	0,939	-0,002	4145	214	5,2	
	<i>Pool 7</i>	4,18	4,44	0,941	0	6568	395	6,0	
	<i>Pool 8</i>	4,17	4,44	0,939	-0,002	3374	224	6,6	
Sertralina	Amostra	TR_s (s)	TR_{PI} (s)	TRR	ΔTRR	A₂₇₅	A₁₅₉	A relativa (%)	Tolerância (%)
	C 3 ng/mL	4,37	4,44	0,984		1893	2900	65	55-75
	<i>Pool 3</i>	4,36	4,45	0,980	-0,004	262	472	56	
	<i>Pool 4</i>	4,37	4,45	0,982	-0,002	734	1300	56	
	<i>Pool 6</i>	4,36	4,45	0,980	-0,004	264	420	63	
	<i>Pool 7</i>	4,36	4,44	0,982	-0,002	344	611	56	
	<i>Pool 8</i>	4,36	4,44	0,982	-0,002	343	573	60	

Tabela 3.9. (continuação)

Clomipramina	Amostra	TR _s (s)	TR _{PI} (s)	TRR	ΔTRR	A ₈₆	A ₅₈	A relativa (%)	Tolerância (%)
	C 3 ng/mL	4,45	4,44	1,002		14426	3996	28	22-33
	Pool 3	4,45	4,45	1	-0,002	5766	1691	29	
	Pool 4	4,45	4,45	1	-0,002	8338	2394	29	
	Pool 6	4,44	4,45	0,998	-0,004	6206	1764	28	
	Pool 7	4,44	4,44	1	-0,002	6281	1825	29	
	Pool 8	4,44	4,44	1	-0,002	5805	1904	33	

Como é possível verificar pelos resultados obtidos, todas as amostras (*pool* 3, 4, 6, 7 e 8) obedecem aos critérios de positividade para todos os analitos, quando comparadas com os respetivos controlos positivos. Assim, estão validados todos os limites de deteção estabelecidos, uma vez que foi possível detetar todas as substâncias de interesse, com concentrações aproximadas às obtidas para o limite de deteção, em cinco amostras de sangue muito complexas, estando cumpridos o critério do tempo de retenção relativo, o critério das áreas relativas dos íões e o critério da razão sinal/ruído. Os resultados da relação S/R obtidos estão apresentados no Anexo E.

3.2.6. Robustez

Após introdução de diversas alterações, propositadas ou não, ao longo de todo o procedimento de validação deste novo método (por exemplo, utilização de diferentes lotes de solventes, modificações que foram sendo efetuadas ao método, etc.), este demonstrou-se robusto, uma vez que não foram verificadas alterações significativas no mesmo e foram sempre obtidos bons resultados, estáveis e reproduzíveis ao longo de todo o procedimento de validação do método.

A robustez do método também foi comprovada pelo subcapítulo 3.3 que se segue, a “análise de amostras reais”, uma vez que esta foi executada não só em amostras de sangue periférico *postmortem* (finalidade para a qual o método foi desenvolvido), como também em amostras de soro, demonstrando resultados bastante satisfatórios.

3.3. Análise de amostras reais

Por fim, de modo a demonstrar a validade e aplicabilidade do método desenvolvido em análises de rotina, o mesmo foi aplicado a 47 amostras reais, isto é, amostras recolhidas em autópsias médico-legais realizadas na Delegação do Sul do INMLCF, I.P. ou nos Gabinetes Médico-Legais dependentes da mesma. O método foi aplicado também a 11 amostras de soro utilizadas para a realização dos testes interlaboratoriais, tendo sido seguidas as diretrizes descritas no capítulo 2.8. da aplicação do método a amostras reais.

Todas as amostras analisadas por este novo método tinham sido previamente analisadas pelo método de GC-MS para a confirmação qualitativa de medicamentos, para as quais foi obtido resultado positivo para os analitos em estudo. Como demonstrado na tabela 3.10, foi possível, através do novo método de UPLC-MS/MS, detetar todas as substâncias medicamentosas previamente detetadas pelo método de GC-MS em todas as amostras.

Tabela 3.10. Resultados obtidos (substância detetada) para as amostras reais e amostras de soro dos testes interlaboratoriais com o método desenvolvido de UPLC-MS/MS e respetiva comparação com o método de GC-MS.

Amostra	UPLC-MS/MS	GC-MS
2020/000582/LX-T-PF	Mianserina Sertralina	Mianserina Sertralina
2020/001194/LX-T-PF	Mianserina Ciamemazina	Mianserina Ciamemazina
2020/002278/LX-T-PF	Mianserina	Mianserina
2020/003359/LX-T-PF	Fenitoína	Fenitoína
2020/003502/LX-T-PF	Amitriptilina Metadona Nortriptilina	Amitriptilina Metadona Nortriptilina
2020/003534/LX-T-OT	Fluoxetina Olanzapina Topiramato	Fluoxetina Olanzapina Topiramato
2020/003555/LX-T-PF	Metadona	Metadona
2020/003601/LX-T-PF	Clozapina	Clozapina
2020/003761/LX-T-PF	Mianserina	Mianserina
2020/003772/LX-T-PF	Topiramato	Topiramato
2020/003859/LX-T-PF	Fluoxetina	Fluoxetina
2020/003893/LX-T-PF	Levetiracetam	Levetiracetam
2020/003977/LX-T-PF	Metadona	Metadona
2021/000026/LX-T-PF	Citalopram Quetiapina	Citalopram Quetiapina
2021/000075/LX-T-OT	Olanzapina Sertralina	Olanzapina Sertralina
2021/000079/LX-T-PF	Levetiracetam	Levetiracetam
2021/000081/LX-T-PF	Mirtazapina	Mirtazapina
2021/000090/LX-T-PF	Fenobarbital	Fenobarbital
2021/000116/LX-T-PF	Levomepromazina Olanzapina Sertralina	Levomepromazina Olanzapina Sertralina
2021/000119/LX-T-PF	Cetamina Tramadol	Cetamina Tramadol
2021/000120/LX-T-PF	Clozapina Haloperidol Topiramato	Clozapina Haloperidol Topiramato
2021/000136/LX-T-PF	Venlafaxina	Venlafaxina
2021/000148/LX-T-PF	Fenobarbital	Fenobarbital
2021/000164/LX-T-PF	Tramadol	Tramadol
2021/000188/LX-T-PF	Clomipramina	Clomipramina
2021/000190/LX-T-PF	Ciamemazina	Ciamemazina
2021/000191/LX-T-PF	Venlafaxina	Venlafaxina
2021/000209/LX-T-PF	Mirtazapina Paroxetina	Mirtazapina Paroxetina

Tabela 3.10. (continuação)

2021/000212/LX-T-PF	Quetiapina Sertralina Trazodona	Quetiapina Sertralina Trazodona
2021/000215/LX-T-PF	Ciamemazina Venlafaxina	Ciamemazina Venlafaxina
2021/000228/LX-T-PF	Quetiapina Trazodona	Quetiapina Trazodona
2021/000233/LX-T-PF	Ciamemazina Haloperidol Sertralina	Ciamemazina Haloperidol Sertralina
2021/000234/LX-T-PF	Citalopram	Citalopram
2021/000248/LX-T-PF	Quetiapina	Quetiapina
2021/000256/LX-T-PF	Amitriptilina Nortriptilina	Amitriptilina Nortriptilina
2021/000281/LX-T-PF	Levomepromazina	Levomepromazina
2021/000317/LX-T-PF	Mirtazapina	Mirtazapina
2021/000339/LX-T-PF	Paroxetina	Paroxetina
2021/000365/LX-T-PF	Tramadol	Tramadol
2021/000395/LX-T-PF	Trazodona	Trazodona
2021/000425/LX-T-PF	Ciamemazina Mirtazapina Quetiapina	Ciamemazina Mirtazapina Quetiapina
2021/000433/LX-T-PF	Citalopram	Citalopram
2021/000479/LX-T-PF	Tramadol	Tramadol
2021/000480/LX-T-PF	Carbamazepina	Carbamazepina
2021/001135/LX-T-PF	Carbamazepina	Carbamazepina
2021/001637/LX-T-PF	Carbamazepina	Carbamazepina
2021/001844/LX-T-PF	Carbamazepina	Carbamazepina
TCA_001192	Amitriptilina Nortriptilina	Amitriptilina Nortriptilina
TCA_001193	Amitriptilina Nortriptilina	Amitriptilina Nortriptilina
TCA_001194	Clomipramina	Clomipramina
TCA_001195	Clomipramina	Clomipramina
TDMA_000359	Olanzapina Clozapina Quetiapina	Olanzapina Clozapina Quetiapina
TDMA_000360	Olanzapina Clozapina Quetiapina	Olanzapina Clozapina Quetiapina
TDMA_000361	Levomepromazina	Levomepromazina
TDMA_000362	Levomepromazina	Levomepromazina
TAB	Fenobarbital	Fenobarbital

Tabela 3.10. (continuação)

TDMD_751	Sertralina Mianserina Mirtazapina Venlafaxina Citalopram Paroxetina Fluoxetina	Sertralina Mianserina Mirtazapina Venlafaxina Citalopram Paroxetina Fluoxetina
TDMD_752	Sertralina Mianserina Mirtazapina Venlafaxina Citalopram Paroxetina Fluoxetina	Sertralina Mianserina Mirtazapina Venlafaxina Citalopram Paroxetina Fluoxetina

Os resultados obtidos são bastante satisfatórios, uma vez que foi possível detetar todos os analitos que se sabia previamente que estariam presentes em cada uma das amostras, tanto no caso das 47 amostras recolhidas em autópsias médico-legais, como nas 11 amostras de soro utilizadas para a realização dos testes interlaboratoriais. Mais, os resultados obtidos apresentam-se em conformidade no que respeita aos critérios de aceitação (positividade) – o tempo de retenção relativo e a abundância relativa.

Capítulo 4 – Conclusões

O objetivo deste trabalho laboratorial foi desenvolver e validar uma metodologia analítica simples, rápida, mas ao mesmo tempo abrangente que fosse aplicável a um grande grupo de substâncias. Neste caso, foi selecionado um conjunto de medicamentos representativos num total de 25 substâncias pertencentes ao grupo dos antidepressivos, antipsicóticos, anticonvulsivantes e analgésicos. Foi escolhido um pré-tratamento de amostras mais simples e, por consequência, mais rápido, bem como uma análise instrumental mais sensível, seletiva, e simultaneamente rápida, dada a variedade de compostos a ser estudada.

Os resultados obtidos permitem concluir que o método desenvolvido comparativamente à maioria dos métodos existentes, inclusive o atualmente utilizado pelo SQTf INMLCF, I.P. para a confirmação de medicamentos, por GC-MS, requer apenas uma pequena quantidade de amostra (100 µL) e a técnica de precipitação de proteínas é um método de pré-tratamento de amostras adequado ao trabalho que se pretendia desenvolver, uma vez que apenas com a adição de um solvente orgânico (acetonitrilo), em poucos segundos, precipitam as proteínas da matriz biológica, isolando o analito. Seguem-se etapas simples e rápidas de agitação em ultrassons e centrifugação, seguidos de secagem e reconstituição da amostra, ao contrário da SPE utilizada no pré-tratamento de amostras para a análise por GC-MS, que requer mais etapas e mais demoradas. Adicionalmente, a tecnologia UPLC-MS/MS utilizada permitiu obter resultados sensíveis e seletivos para cada substância de interesse e com boa resolução dos picos cromatográficos.

No ensaio da eficiência da extração, as percentagens obtidas foram bastante satisfatórias, encontrando-se sempre acima dos 77% de analito recuperado, para qualquer analito. Assim, é possível concluir que se pode desenvolver uma metodologia simples e com boa percentagem de analito recuperado e, mesmo que existam interferências por se tratar de um método simplificado, estas podem ser ultrapassadas pelo tipo de tecnologia muito seletiva utilizada: a UPLC-MS/MS.

Não se obtiveram sinais cromatográficos de arrastamento, exceto para a olanzapina que apresentou sinais cromatográficos em duas amostras brancas, injetadas e analisadas no equipamento entre três amostras com uma concentração de 1000 ng/mL desse mesmo analito. No entanto, estes sinais cromatográficos não cumprem os critérios de positividade para a olanzapina, não podendo ser considerados como arrastamento, mas sim como possíveis interferências.

Conclui-se também que o método desenvolvido não apresenta efeitos matriz significativos para a grande maioria dos analitos em estudo, exceto para a cetamina, metadona, sertralina e tramadol, tendo sido observada supressão iónica para a sertralina e intensificação iónica para os restantes fármacos, contudo, esta situação pode ser corrigida através da utilização dos respetivos deuterados como padrões internos. Uma vez que os fenómenos observados são estáveis (verificado pelo coeficiente de variação) e não afetaram os resultados obtidos nos restantes parâmetros de validação do método, nomeadamente, no limite de deteção, sendo este o mais suscetível quando são observados fenómenos de efeito de matriz, pode considerar-se que o efeito de matriz existente é de um modo geral pouco significativo.

É possível concluir que se consegue detetar estes fármacos antidepressivos, antipsicóticos, anticonvulsivantes e analgésicos, em concentrações subterapêuticas, por apresentarem um baixo limite de deteção.

Por tudo o que foi referido anteriormente, pode-se concluir que foi desenvolvido e validado um método seletivo, eficiente, simples e rápido para detetar e identificar os medicamentos estudados, bem como estimar as suas concentrações, que futuramente poderá ser ampliado para a análise de outros medicamentos e grupos de substâncias, nomeadamente, drogas de abuso, como opiáceos, anfetaminas e cocaína, baseado num procedimento de preparação de amostras simples, utilizando um volume reduzido de amostra associado a uma técnica analítica sensível e seletiva como é o UPLC-MS/MS.

Capítulo 5 – Bibliografia

- Altamura, A.C., Moro, A.R., Percudani, M., 1994. Clinical Pharmacokinetics of Fluoxetine. *Clin. Pharmacokinet.* 26, 201–214. <https://doi.org/10.2165/00003088-199426030-00004>
- Alvano, S.A., Zieher, L.M., 2019. An updated classification of antidepressants: A proposal to simplify treatment. *Pers. Med. Psychiatry* 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.pmip.2019.04.002>
- Alves, V., Conceição, C., Gonçalves, J., Teixeira, H.M., Câmara, J.S., 2017. Improved Analytical Approach based on QuEChERS/UHPLC-PDA for Quantification of Fluoxetine, Clomipramine and their Active Metabolites in Human Urine Samples. *J. Anal. Toxicol.* 41, 45–53. <https://doi.org/10.1093/jat/bkw077>
- Andrade de Carvalho, Á., Mateus, P., Xavier, M., 2014. Portugal: Saúde Mental em Números - 2014, Direção-Geral da Saúde (DGS). <https://doi.org/10.1016/j.mechatronics.2018.06.006>
- Argoti, D., 2008. Liquid chromatography-mass spectrometry for detection and characterization of DNA biomarkers and reactive metabolites. *Chem. Biol. Northeastern University*. <https://doi.org/10.17760/d10016740>
- Armbruster, D.A., Pry, T., 2008. Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation. *Clin. Biochem. Rev.* 29, S49-52
- Bakken, G.V., Molden, E., Knutsen, K., Lunder, N., Hermann, M., 2012. Metabolism of the Active Metabolite of Quetiapine, N-Desalkylquetiapine In Vitro. *Drug Metab. Dispos.* 40, 1778–1784. <https://doi.org/10.1124/dmd.112.045237>
- Banerjee, S., Mazumdar, S., 2011. Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. *Int. J. Anal. Chem.* 2012, 1–40. <https://doi.org/10.1155/2012/282574>
- Bezchlibnyk-Butler, K., Aleksic, I., Kennedy, S.H., 2000. Citalopram - a review of pharmacological and clinical effects. *J. Psychiatry Neurosci.* 25, 241–254
- Botea, M., 2020. Analgesics, in: Yashasvi Waisundara, V., Banjari, I., Balkić, J. (Eds.), *Pain Management - Practices, Novel Therapies and Bioactives*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.94319>
- Bourin, M., Dailly, E., Hascöet, M., 2006. Preclinical and Clinical Pharmacology of Cyamemazine: Anxiolytic Effects and Prevention of Alcohol and Benzodiazepine Withdrawal Syndrome. *CNS Drug Rev.* 10, 219–229. <https://doi.org/10.1111/j.1527-3458.2004.tb00023.x>
- C. Moffat, A., Widdop, B., Osselton, D. (Eds.), 2011. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material*, Fourth ed. ed. Pharmaceutical Press. https://doi.org/10.1300/J123v27n02_07
- C. Watson, J., 2020. Tratamento da dor [WWW Document]. Man. MSD. URL <https://www.msmanuals.com/pt-pt/profissional/distúrbios-neurológicos/dor/tratamento-da-dor> (accessed 8.20.21)
- Caccia, S., 1998. Metabolism of the Newer Antidepressants. *Clin. Pharmacokinet.* 34, 281–302. <https://doi.org/10.2165/00003088-199834040-00002>
- Calabuig, G., 2004. *Medicina legal y toxicología*, 6ª edición. ed. Elsevier
- Caldas de Almeida, J.M., Xavier, M., Cardoso, G., Gonçalves Pereira, M., Gusmão, R., Corrêa, B., Gago, J., Talina, M., Silva, J., Magalhães, P., Cerol, J., Costa, L., Correia, T., António, J., Maia, M., 2013. Estudo epidemiológico nacional de saúde mental: 1º relatório. Lisboa.

- Caldas de Almeida, T., Heitor, M.J., Santos, O., Costa, A., Virgolino, A., Rasga, C., Martiniano, H., Vicente, A., Lima, B., Carreiras, J., Fialho, M., Mourão, S., 2020. Relatório final: SM-COVID - Saúde mental em tempos de pandemia. Lisboa.
- Caldwell, G.W., Wu, W.N., Masucci, J.A., Mckown, L.A., Gauthier, D., Jones, W.J., Leo, G.C., Maryanoff, B.E., 2005. Metabolism and excretion of the antiepileptic/antimigraine drug, topiramate in animals and humans. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 30, 151–164. <https://doi.org/10.1007/BF03190614>
- Carvalho, Á., 2018. Depressão e outras perturbações mentais comuns: enquadramento global e nacional e referência de recurso em casos emergentes, Direção-Geral da Saúde (DGS).
- Cheng, P.-S., Lee, C.-H., Liu, C., Chien, C.-S., 2008. Simultaneous determination of ketamine, tramadol, methadone, and their metabolites in urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* 32, 253–259. <https://doi.org/10.1093/jat/32.3.253>
- Chiu, M.L., Lawi, W., Snyder, S.T., Wong, P.K., Liao, J.C., Gau, V., 2010. Matrix Effects—A Challenge Toward Automation of Molecular Analysis. *J. Assoc. Lab. Autom.* 15, 233–242. <https://doi.org/10.1016/j.jala.2010.02.001>
- Chokhwalala, K., Stevens, L., 2021. Antipsychotic Medications [WWW Document]. StatPearls Publ. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519503/> (accessed 12.1.21).
- Chong, D.J., Lerman, A.M., 2016. Practice Update: Review of Anticonvulsant Therapy. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 16, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s11910-016-0640-y>
- Cipriani, A., Furukawa, T.A., Salanti, G., Chaimani, A., Atkinson, L.Z., Ogawa, Y., Leucht, S., Ruhe, H.G., Turner, E.H., Higgins, J.P.T., Egger, M., Takeshima, N., Hayasaka, Y., Imai, H., Shinohara, K., Tajika, A., Ioannidis, J.P.A., Geddes, J.R., 2018. Comparative efficacy and acceptability of 21 antidepressant drugs for the acute treatment of adults with major depressive disorder: a systematic review and network meta-analysis. *Lancet* 391, 1357–1366. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32802-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32802-7)
- Comissão Europeia, 2002. Diretiva 96/23/CE de 12 de agosto de 2002. *J. Of. da Comunidade Eur.* 1–29.
- Conselho Nacional da Saúde, 2019. Sem mais tempo a perder - Saúde mental em Portugal: um desafio para a próxima década. Lisboa.
- D.R. I Série. Nº 14, 2013. Portaria nº 19/2013 de 21 de janeiro de 2013. 427-431.
- D.R. I Série. Nº 147, 2012. Decreto-Lei nº 166/2012 de 31 de julho de 2012. 3951-3957.
- D.R. I Série. Nº 20, 1998. Decreto-Lei nº 11/98 de 24 de janeiro de 1998. 274-291.
- Dean, L., 2012. Imipramine Therapy and CYP2D6 and CYP2C19 Genotype, in: *Medical Genetics Summaries*. National Center for Biotechnology Information (US); Bethesda (MD), pp. 1–13.
- Dean, L., Kane, M., 2012. Clozapine Therapy and CYP Genotype, in: *Medical Genetics Summaries*. National Center for Biotechnology Information (US); Bethesda (MD), pp. 1–22.
- Dinis-Oliveira, R.J., 2017. Metabolism and metabolomics of ketamine: a toxicological approach. *Forensic Sci. Res.* 2, 2–10. <https://doi.org/10.1080/20961790.2017.1285219>
- Drummer, O.H., 2010. Forensic toxicology, in: Luch, A. (Ed.), *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*. Birkhauser Verlag/Switzerland, pp. 579–603. <https://doi.org/10.4324/9781420058116-30>
- Dulaurent, S., El Balkhi, S., Poncelet, L., Gaulier, J.-M., Marquet, P., Saint-Marcoux, F., 2016. QuEChERS sample preparation prior to LC-MS/MS determination of opiates, amphetamines, and cocaine metabolites in whole blood. *Anal. Bioanal. Chem.* 408, 1467–1474.

<https://doi.org/10.1007/s00216-015-9248-3>

- Ereshefsky, L., Riesenman, C., Lam, Y.W.F., 1995. Antidepressant Drug Interactions and the Cytochrome P450 System. *Clin. Pharmacokinet.* 29, 10–19. <https://doi.org/10.2165/00003088-199500291-00004>
- Erickson-Ridout, K.K., Sun, D., Lazarus, P., 2012. Glucuronidation of the second-generation antipsychotic clozapine and its active metabolite N-desmethylclozapine. Potential importance of the UGT1A1 A(TA)7TAA and UGT1A4 L48V polymorphisms. *Pharmacogenet. Genomics* 22, 561–576. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e328354026b>
- FDA, 2017. FDA Approved Drug Products: Effexor XR® extended-release capsules. Interactions.
- FDA, 2016. FDA Approved Drug Products: Zoloft (sertraline hydrochloride) for oral use.
- Friedrichsdorf, S.J., 2019. From Tramadol to Methadone: Opioids in the Treatment of Pain and Dyspnea in Pediatric Palliative Care. *Clin. J. Pain* 35, 501–508. <https://doi.org/10.1097/AJP.0000000000000704>
- Gardner, D.M., 2005. Modern antipsychotic drugs: a critical overview. *Can. Med. Assoc. J.* 172, 1703–1711. <https://doi.org/10.1503/cmaj.1041064>
- GlaxoSmithKline Inc., 2021. Product Monograph Including Patient Medication Information: PAXIL CR (paroxetine).
- Gumustas, M., Kurbanoglu, S., Uslu, B., Ozkan, S.A., 2013. UPLC versus HPLC on Drug Analysis: Advantageous, Applications and Their Validation Parameters. *Chromatographia* 76, 1365–1427. <https://doi.org/10.1007/s10337-013-2477-8>
- Hairston, S., 2021. Psychosis & Psychotic Disorders [WWW Document]. Recover. Village. URL <https://www.therecoveryvillage.com/mental-health/psychosis/> (accessed 5.20.21).
- Hals, P.A., Dahl, S.G., 1995. Metabolism of levomepromazine in man. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 20, 61–71. <https://doi.org/10.1007/BF03192290>
- Hodé, Y., Benyamina, A., Arbus, C., Reimold, M., 2011. Active cyamemazine metabolites in patients treated with cyamemazine (Tercian®): influence on cerebral dopamine D2 and serotonin 5-HT2A receptor occupancy as measured by positron emission tomography (PET). *Psychopharmacology (Berl.)* 217, 315–321. <https://doi.org/10.1007/s00213-011-2289-1>
- Hughes, N.C., Wong, E.Y.K., Fan, J., Bajaj, N., 2007. Determination of Carryover and Contamination for Mass Spectrometry-Based Chromatographic Assays. *AAPS* 9, 353–360.
- IDCR Working Group (WADA Science), 2021. WADA Technical Document TD2021IDCR - Technical Document on the Minimum Criteria for Chromatographic-Mass Spectrometric Confirmation of the Identity of Analytes for Doping Control Purposes 1–6.
- Infarmed, 2019. Meio ambulatório: monitorização do consumo de medicamentos.
- INMLCF, 2015. Serviços Técnicos - Serviço de Química e Toxicologia Forenses [WWW Document]. URL https://www.inmlcf.mj.pt/index.php?option=com_content&view=article&id=129:servico-de-quimica-e-toxicologia-forenses&catid=37&Itemid=292 (accessed 12.3.21).
- Jann, M.W., Grimsley, S.R., Gray, E.C., Chang, W.-H., 1993. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of clozapine. *Clin. Pharmacokinet.* 24, 161–176. <https://doi.org/10.2165/00003088-199324020-00005>
- Joint Committee for Guides in Metrology, 2021. International Vocabulary of Metrology (No. Fourth edition – Committee Draft (VIM4 CD)).
- Jonnakuty, C., Gragnoli, C., 2008. What do we know about serotonin? *J. Cell. Physiol.* 217, 301–306.

<https://doi.org/10.1002/jcp.21533>

- Kadi, A., Hefnawy, M., Julkhuf, S., Abounassif, M., Mostafa, G., Kassem, M.G., Attia, S., Al-Ghamdi, A., 2011. Sample stacking microemulsion electrokinetic capillary chromatography induced by reverse migrating pseudostationary phase for the quantification of phenobarbital and its p-hydroxyphenobarbital metabolite in rat urine. *Analyst* 136, 2858–2865. <https://doi.org/10.1039/c0an00768d>
- Kano, T., Miyagawa, Y., 2006. Clinical Pharmacology, in: *Evoked Spinal Cord Potentials*. Springer Japan, Tokyo, pp. 90–102. https://doi.org/10.1007/4-431-30901-2_9
- Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., Li, Q., Shoemaker, B.A., Thiessen, P.A., Yu, B., Zaslavsky, L., Zhang, J., Bolton, E.E., 2021. PubChem in 2021: new data content and improved web interfaces. *Nucleic Acids Res.* 49, D1388–D1395. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa971>
- Koyama, E., Chiba, K., Tani, M., Ishizaki, T., 1996. Identification of human cytochrome P450 isoforms involved in the stereoselective metabolism of mianserin enantiomers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 278, 21–30.
- Kudo, S., Ishizaki, T., 1999. Pharmacokinetics of Haloperidol. An Update. *Clin. Pharmacokinet.* 37, 435–456. <https://doi.org/10.2165/00003088-199937060-00001>
- Lanças, F.M., 2009. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente “compatíveis”? *Sci. Chromatogr.* 5, 27–46.
- Landmark, C.J., Johannessen, S.I., 2020. Therapeutic monitoring of antiepileptic drugs, in: *Handbook of Analytical Separations*. pp. 225–256. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64066-6.00010-1>
- Lee, R., Roberts, M., Paccou, A., Wood, M., Corporation, W., Europe, U.K.W., T, A.R.A.C., 2009. Development of a new UPLC/MS method for systematic toxicological analysis.
- Lyseng-Williamson, K.A., 2011. Levetiracetam: a review of its use in epilepsy. *Drugs* 71, 489–514. <https://doi.org/10.2165/11204490-000000000-00000>
- M. Pacifici, G., 2016. Clinical Pharmacology of Phenobarbital in Neonates: Effects, Metabolism and Pharmacokinetics. *Curr. Pediatr. Rev.* 12, 48–54. <https://doi.org/10.2174/1573397111666151026223914>
- Mahadik, S.P., Laev, H., Korenovsky, A., Karpiak, S.E., 1988. Haloperidol alters rat CNS cholinergic system: Enzymatic and morphological analyses. *Biol. Psychiatry* 24, 199–217. [https://doi.org/10.1016/0006-3223\(88\)90275-2](https://doi.org/10.1016/0006-3223(88)90275-2)
- Majors, R.E., 2013. *Sample preparation fundamentals for chromatography*. ed. Agilent Technologies
- Malawska, B., 2012. New Anticonvulsant Agents, in: *Frontiers in Medicinal Chemistry*. Bentham Science Publishers, pp. 805–841. <https://doi.org/10.2174/978160805207310904010805>
- Maldaner, L., Jardim, I.C.S.F., 2009. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. *Química Nov.* [online] 32, 214–222. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000100036>
- Margolis, J.M., O'Donnell, J.P., Mankowski, D.C., Ekins, S., Obach, R.S., 2000. (R)-, (S)-, and racemic fluoxetine N-demethylation by human cytochrome P450 enzymes. *Drug Metab. Dispos.* 28, 1187–1191.
- Matias, J.F.P., 2015. Estudo da toxicidade da ciamemazina e do hipericão nas células hepáticas HepG2 e Caco2: Experiência Profissionalizante na Vertente de Farmácia Comunitária e Investigação. Dissertação de Mestrado - Ciências Farmacêuticas, Universidade da Beira Interior. <http://hdl.handle.net/10400.6/5251>
- Matsuta, S., Nakanishi, K., Miki, A., Zaitso, K., Shima, N., Kamata, T., Nishioka, H., Katagi, M., Tatsuno, M., Tsuboi, K., Tsuchihashi, H., Suzuki, K., 2013. Development of a simple one-pot

- extraction method for various drugs and metabolites of forensic interest in blood by modifying the QuEChERS method. *Forensic Sci. Int.* 232, 40–45. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.06.015>
- Mehrotra, N., Gupta, M., Kovar, A., Meibohm, B., 2007. The role of pharmacokinetics and pharmacodynamics in phosphodiesterase-5 inhibitor therapy. *Int. J. Impot. Res.* 19, 253–264. <https://doi.org/10.1038/sj.ijir.3901522>
- Michopoulos, F., Lai, L., Gika, H., Theodoridis, G., Wilson, I., 2009. UPLC-MS-Based Analysis of Human Plasma for Metabonomics Using Solvent Precipitation or Solid Phase Extraction. *J. Proteome Res.* 8, 2114–2121. <https://doi.org/10.1021/pr801045q>
- Moreno, R.A., Moreno, D.H., Soares, M.B. de M., 1999. Psicofarmacologia de antidepressivos. *Rev. Bras. Psiquiatr.* 21, 24–40. <https://doi.org/10.1590/S1516-44461999000500006>
- National Center for Biotechnology Information, 2022a. PubChem Compound Summary for CID 3386, Fluoxetine [WWW Document]. URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fluoxetine> (accessed 7.29.22).
- National Center for Biotechnology Information, 2022b. PubChem Compound Summary for CID 43815, Paroxetine [WWW Document]. URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/43815> (accessed 7.29.22).
- National Center for Biotechnology Information, 2022c. PubChem Compound Summary for CID 5656, Venlafaxine [WWW Document]. URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5656> (accessed 7.29.22).
- National Center for Biotechnology Information, 2022d. PubChem Compound Summary for CID 4205, Mirtazapine [WWW Document]. URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Mirtazapine> (accessed 7.29.22).
- National Center for Biotechnology Information, 2022e. PubChem Compound Summary for CID 5533, Trazodone [WWW Document]. URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Trazodone> (accessed 7.29.22).
- National Center for Biotechnology Information, 2022f. PubChem Compound Summary for CID 4184, Mianserin [WWW Document]. URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Mianserin> (accessed 7.29.22).
- National Center for Biotechnology Information, 2022g. PubChem Compound Summary for CID 4543, Nortriptyline [WWW Document]. URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4543> (accessed 7.30.22).
- National Center for Biotechnology Information, 2022h. PubChem Compound Summary for CID 2801, Clomipramine [WWW Document]. URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2801> (accessed 7.29.22).
- National Center for Biotechnology Information, 2022i. PubChem Compound Summary for CID 72287, Levomepromazine [WWW Document]. URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/72287> (accessed 7.30.22).
- Nielsen, K.K., Flinois, J.P., Beaune, P., Brøsen, K., 1996. The biotransformation of clomipramine in vitro, identification of the cytochrome P450s responsible for the separate metabolic pathways. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277, 1659–64.
- OECD/European Union, 2020. Health at a Glance: Europe 2020: State of Health in the EU Cycle, OECD Publishing. Paris. <https://doi.org/https://doi.org/10.1787/82129230-en>
- Patsalos, P.N., 2004. Clinical pharmacokinetics of Levetiracetam. *Clin. Pharmacokinet.* 43, 707–724. <https://doi.org/10.2165/00003088-200443110-00002>
- Perez-Caballero, L., Torres-Sanchez, S., Bravo, L., Mico, J.A., Berrocoso, E., 2014. Fluoxetine: a case

- history of its discovery and preclinical development. *Expert Opin. Drug Discov.* 9, 567–578. <https://doi.org/10.1517/17460441.2014.907790>
- Peters, F.T., Drummer, O.H., Musshoff, F., 2007. Validation of new methods. *Forensic Sci. Int.* 165, 216–224. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.05.021>
- Piatkov, I., Jones, T., 2011. Pharmacogenetics and Gender Association with Psychotic Episodes on Nortriptyline Lower Doses: Patient Cases. *ISRN Pharm.* 2011, 1–6. <https://doi.org/10.5402/2011/805983>
- Pimenta, D.M.F., 2013. Determinação de Catecolaminas e dos Metabolitos por HPLC com Detecção Eletroquímica. Dissertação de Mestrado - Tecnologia Química. Escola Superior de Tecnologia de Tomar, Instituto Politécnico de Tomar.
- Repetto, MR, Repetto, M, 2015. Tabla de concentraciones de xenobióticos en fluidos biológicos humanos como referencia para el diagnóstico toxicológico, in: Repetto, M. (Ed.), *Ampliación de Toxicología de Postgrado 15*. Ilustre Colegio Oficial de Químicos, Sevilla.
- Ribani, M., Bottoli, C.B.G., Collins, C.H., Jardim, I.C.S.F., Melo, L.F.C., 2004. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim. Nova* 27, 771–780. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000500017>
- Rotzinger, S., Fang, J., Baker, G.B., 1998. Trazodone is metabolized to m-chlorophenylpiperazine by CYP3A4 from human sources. *Drug Metab. Dispos.* 26, 572–5.
- Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX), 2013. Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. *J. Anal. Toxicol.* 37, 452–474. <https://doi.org/10.1093/jat/bkt054>
- Seeman, P., 2004. Atypical Antipsychotics: Mechanism of Action. *Focus J. lifelong Learn. psychiatry* II, 48–58.
- Serretti, A., Calati, R., Goracci, A., Di Simplicio, M., Castrogiovanni, P., De Ronchi, D., 2010. Antidepressants in healthy subjects: What are the psychotropic/psychological effects? *Eur. Neuropsychopharmacol.* 20, 433–453. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2009.11.009>
- Sherwood, C.A., Eastham, A., Lee, L.W., Risler, J., Mirzaei, H., Falkner, J.A., Martin, D.B., 2009. Rapid Optimization of MRM-MS Instrument Parameters by Subtle Alteration of Precursor and Product m/z Targets. *J. Proteome Res.* 8, 3746–3751. <https://doi.org/10.1021/pr801122b>
- Sistik, P., Turjap, M., Iordache, A.M., Saldanha, H.M.E.B., Lemr, K., Bednar, P., 2016. Quantification of selected antidepressants and antipsychotics in clinical samples using chromatographic methods combined with mass spectrometry: A review (2006-2015). *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky, Olomouc, Czech Repub* 160, 39–53. <https://doi.org/10.5507/bp.2015.065>
- Smith, M.P., Bluth, M.H., 2016. Forensic Toxicology: An Introduction. *Clin. Lab. Med.* 36, 753–759. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2016.07.002>
- Söderberg, M.M., Dahl, M.-L., 2013. Pharmacogenetics of olanzapine metabolism. *Pharmacogenomics* 14, 1319–1336. <https://doi.org/10.2217/pgs.13.120>
- SQTF INMLCF I.P., 2020. Procedimento Operacional PO-SQTF-002: Avaliação, cálculo e expressão de resultados.
- SQTF INMLCF I.P., 2011. Procedimento Operacional PO-STF-S-012: Validação de procedimentos de ensaio.
- Telles-Correia, D., Guerreiro, D.F., Oliveira, S., Figueira, M.L., 2007. Diferenças farmacodinâmicas e farmacocinéticas entre os SSRI: Implicações na Prática Clínica. *Acta Med. Port.* 20, 167–174.
- Thorn, C.F., Whirl-Carrillo, M., Leeder, J.S., Klein, T.E., Altman, R.B., 2012. PharmGKB summary:

- phenytoin pathway. *Pharmacogenet. Genomics* 22, 466–470. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32834aeedb>
- Timmer, C.J., Ad Sitsen, J.M., Delbressine, L.P., 2000. Clinical Pharmacokinetics of Mirtazapine. *Clin. Pharmacokinet.* 38, 461–474. <https://doi.org/10.2165/00003088-200038060-00001>
- Twycross, R.G., 1978. Pain and analgesics. *Curr. Med. Res. Opin.* 5, 497–505. <https://doi.org/10.1185/03007997809108992>
- U.S. Department of Health and Human Services, 2018. Drugs@FDA: FDA-Approved Drugs [WWW Document]. URL <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/>
- Urichuk, L., Prior, T.I., Dursun, S., Baker, G., 2008. Metabolism of Atypical Antipsychotics: Involvement of Cytochrome P450 Enzymes and Relevance for Drug-Drug Interactions. *Curr. Drug Metab.* 9, 410–418. <https://doi.org/10.2174/138920008784746373>
- Vieira, D.N., Muñoz-Barús, J.I., 2009. El sistema médico-legal y forense portugués. *Cuad. Med. Forense* 15, 185–198.
- Vogeser, M., Parhofer, K.G., 2007. Liquid Chromatography Tandem-mass Spectrometry (LC-MS/MS) - Technique and Applications in Endocrinology. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 115, 559–570. <https://doi.org/10.1055/s-2007-981458>
- Volpe, D.A., Xu, Y., Sahajwalla, C.G., Younis, I.R., Patel, V., 2018. Methadone Metabolism and Drug-Drug Interactions: In Vitro and In Vivo Literature Review. *J. Pharm. Sci.* 107, 2983–2991. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.08.025>
- Warot, D., Krebs, M.O., Bensimon, G., Payan, C., Danjou, P., Lacomblez, L., Puech, A.J., 1988. Dose-Effect Study of Levomepromazine on Psychomotor and Memory Tasks in Healthy Volunteers. *Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp.* 3, 127–132. <https://doi.org/10.1002/hup.470030209>
- WebMD Medical Reference, 2021. Anticonvulsant Medications for Bipolar Disorder [WWW Document]. WebMD. URL <https://www.webmd.com/bipolar-disorder/guide/anticonvulsant-medication> (accessed 12.1.21).
- World Health Organization (WHO), 2021. Suicide worldwide in 2019: global health estimates. Geneva.
- World Health Organization (WHO), 1946. Constitution of the World Health Organization. *Am. J. Public Heal. Nations Heal.* 36, 1315–1323. <https://doi.org/10.2105/AJPH.36.11.1315>
- Yang, C., Yang, J., Luo, A., Hashimoto, K., 2019. Molecular and cellular mechanisms underlying the antidepressant effects of ketamine enantiomers and its metabolites. *Transl. Psychiatry* 9, 280. <https://doi.org/10.1038/s41398-019-0624-1>
- Yoshimura, R., Yanagihara, N., Terao, T., Minami, K., Toyohira, Y., Ueno, S., Uezono, Y., Abe, K., Izumi, F., 1998. An active metabolite of carbamazepine, carbamazepine-10,11-epoxide, inhibits ion channel-mediated catecholamine secretion in cultured bovine adrenal medullary cells. *Psychopharmacology (Berl)*. 135, 368–373. <https://doi.org/10.1007/s002130050524>
- Zarate, C.A., Niciu, M.J., 2015. Ketamine for depression: evidence, challenges and promise. *World Psychiatry* 14, 348–350. <https://doi.org/10.1002/wps.20269>

Capítulo 6 – Anexos

Anexo A – Análise do padrão de fragmentação dos fármacos antidepressivos, anticonvulsivantes, antipsicóticos, e analgésicos em estudo.

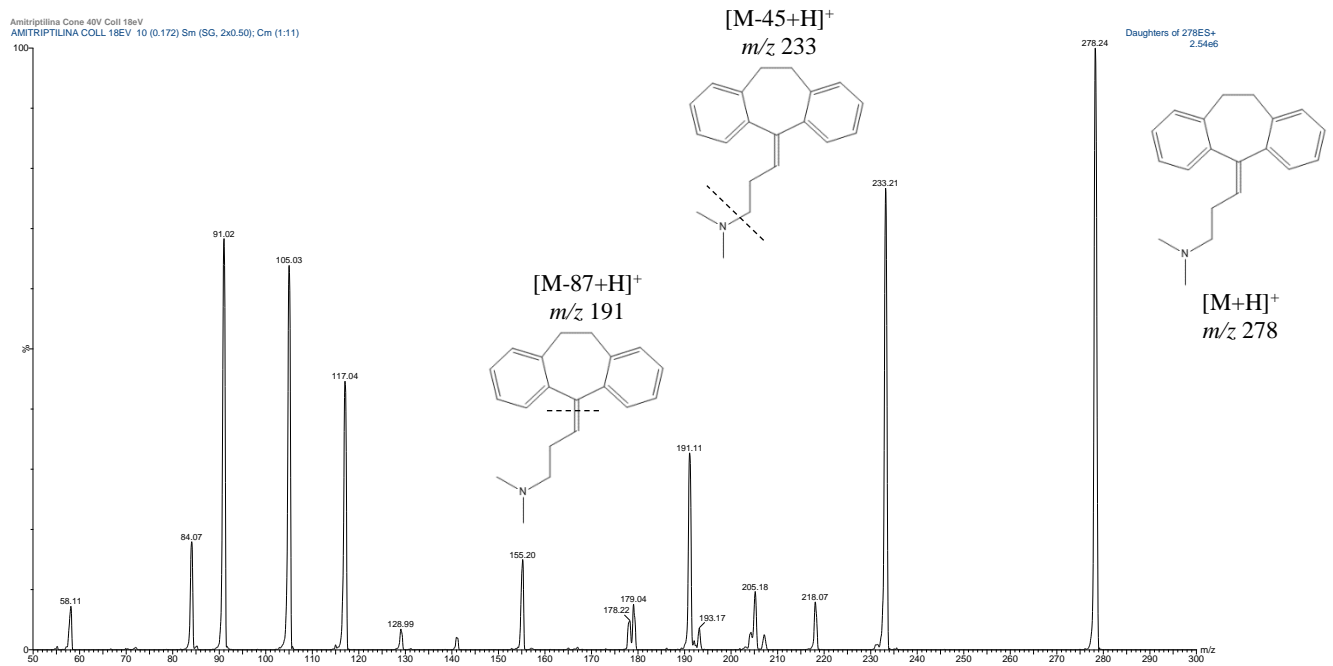


Figura A1. Espectro de massa da amitriptilina (EC 18 eV).

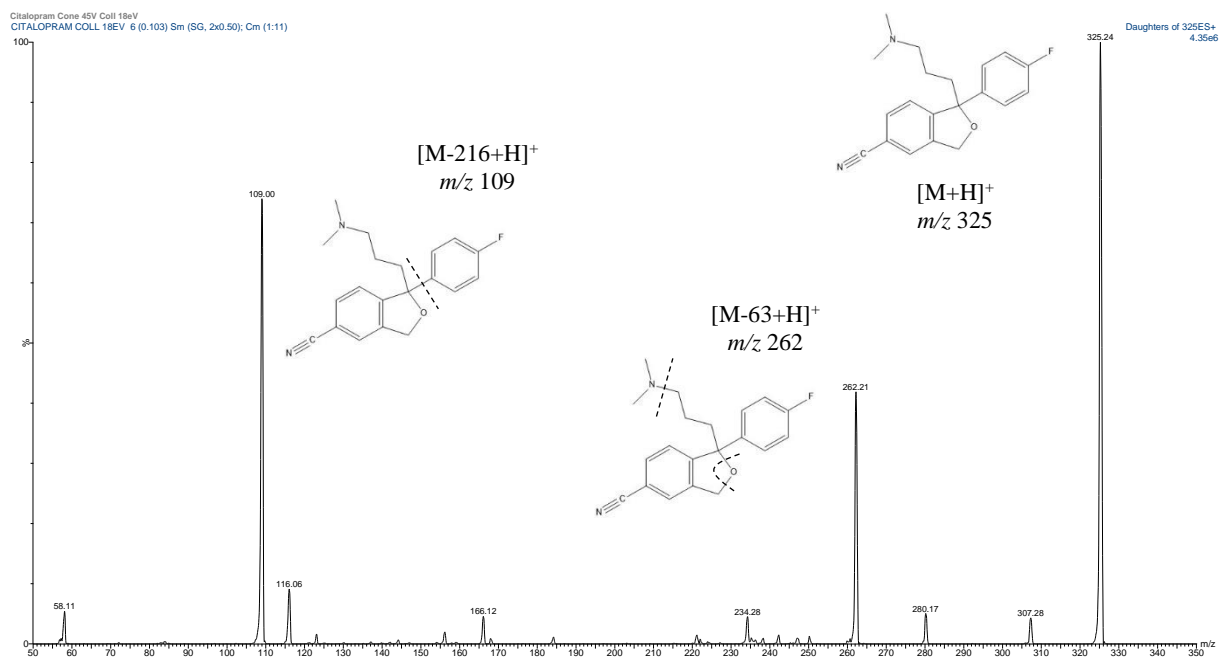


Figura A2. Espectro de massa do citalopram (EC 18 eV).

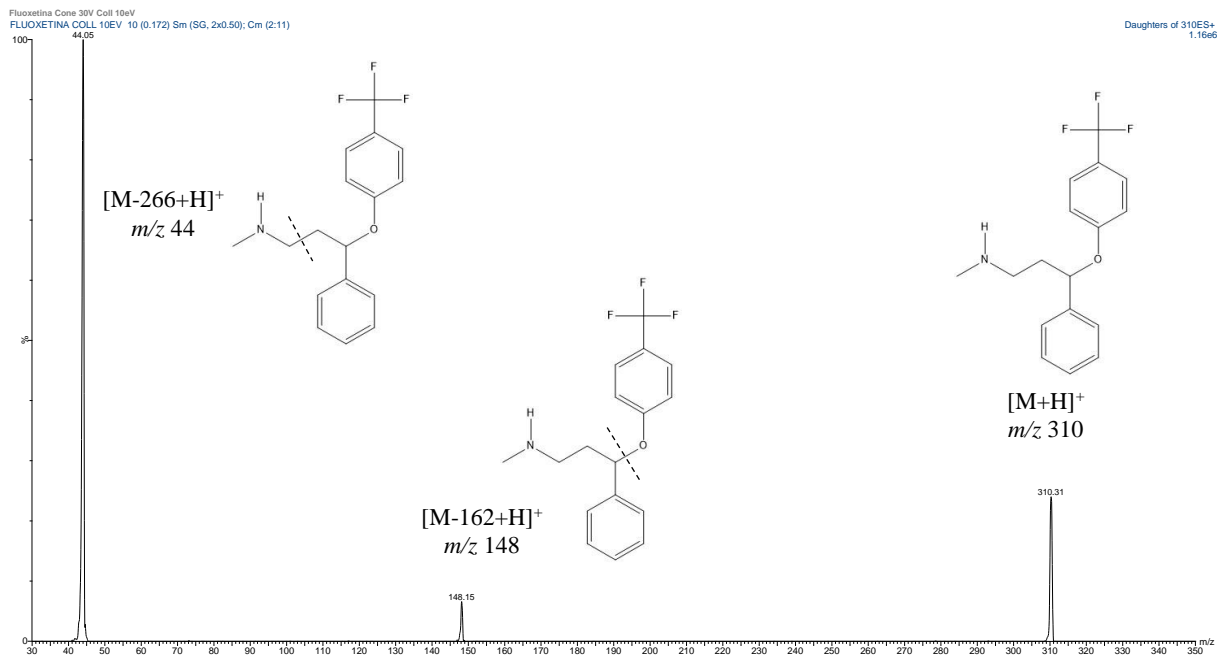


Figura A3. Espetro de massa da fluoxetina (EC 10 eV).

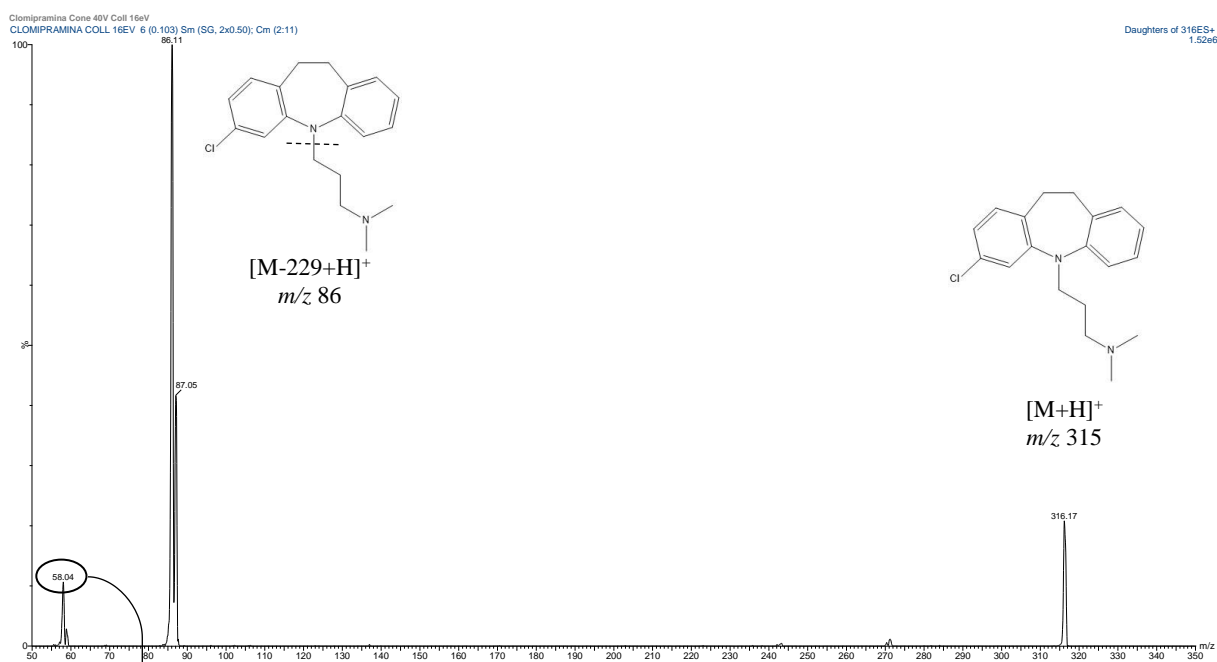
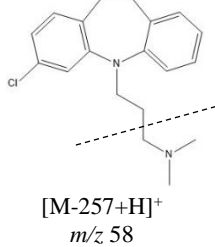


Figura A4. Espetro de massa da clomipramina (EC 16 eV).



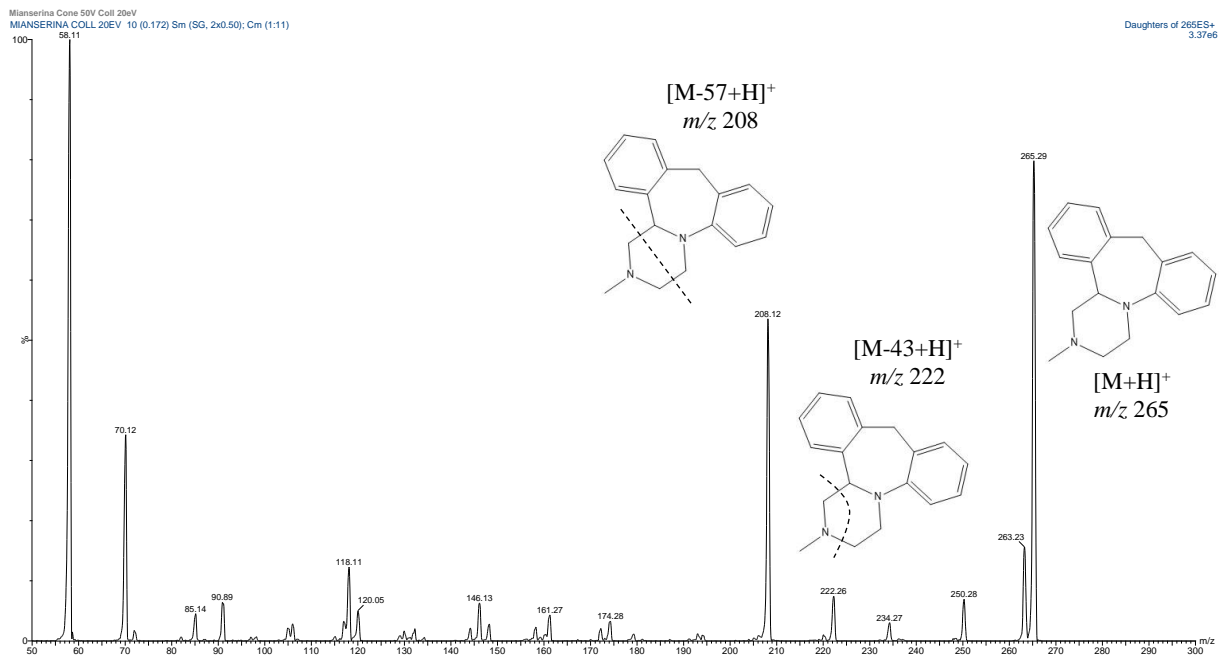


Figura A5. Espectro de massa da mianserina (EC 20 eV).

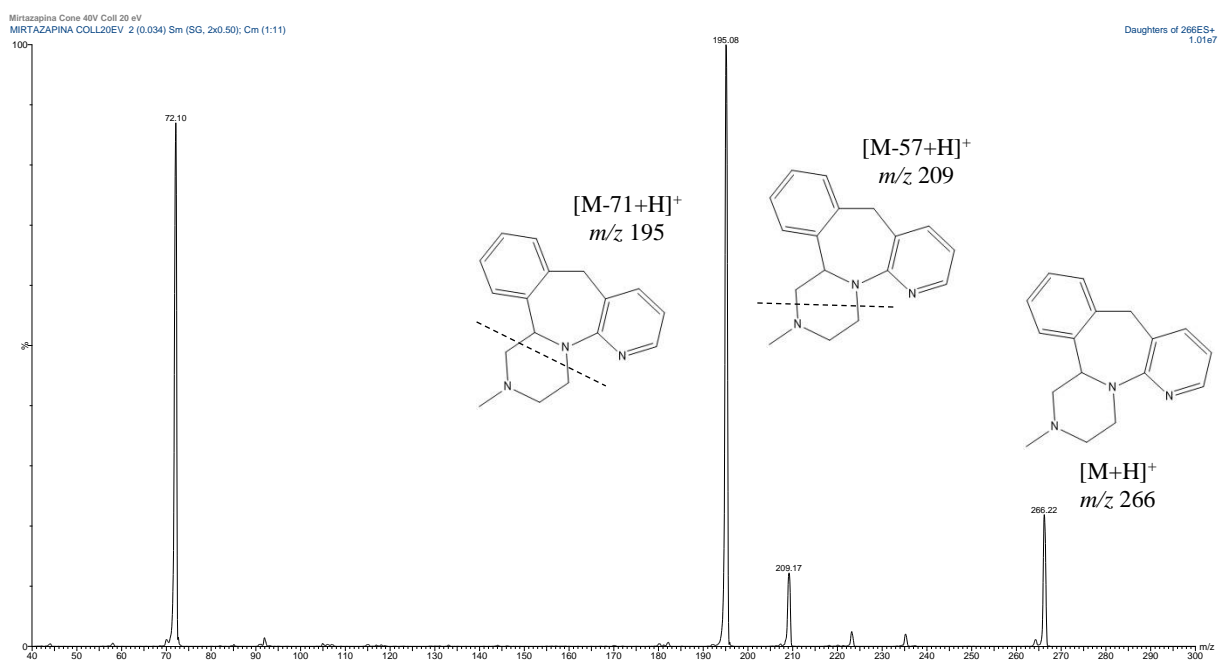


Figura A6. Espectro de massa da mirtazapina (EC 20 eV).

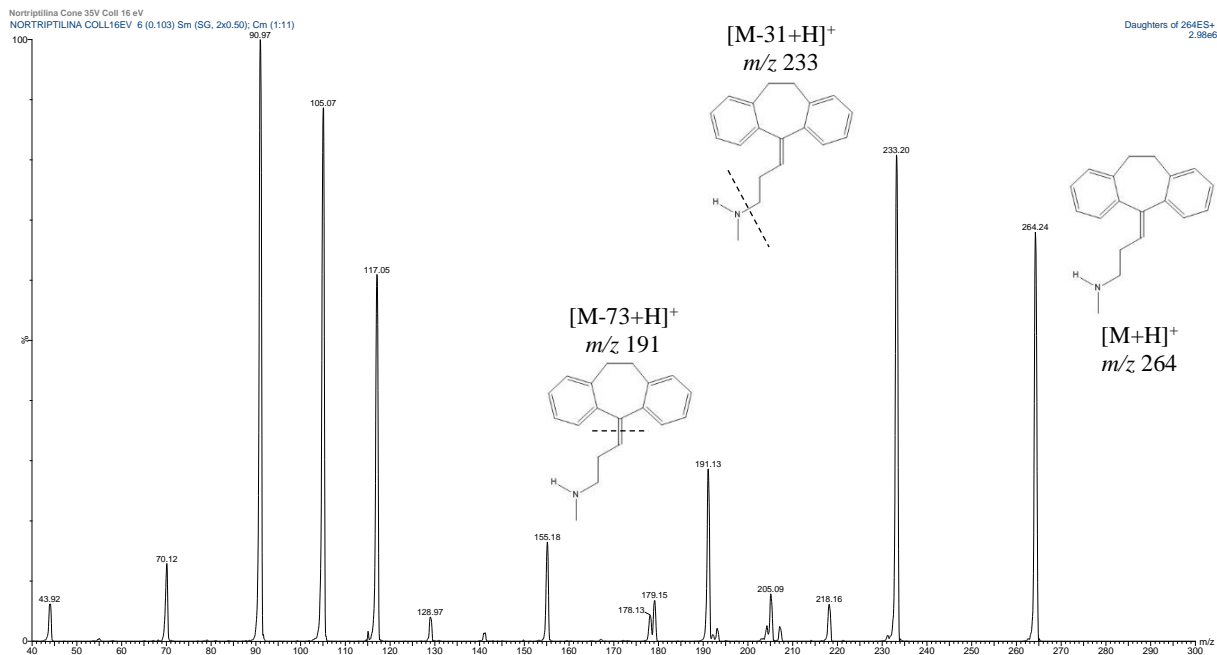


Figura A7. Espectro de massa da nortriptilina (EC 16 eV).

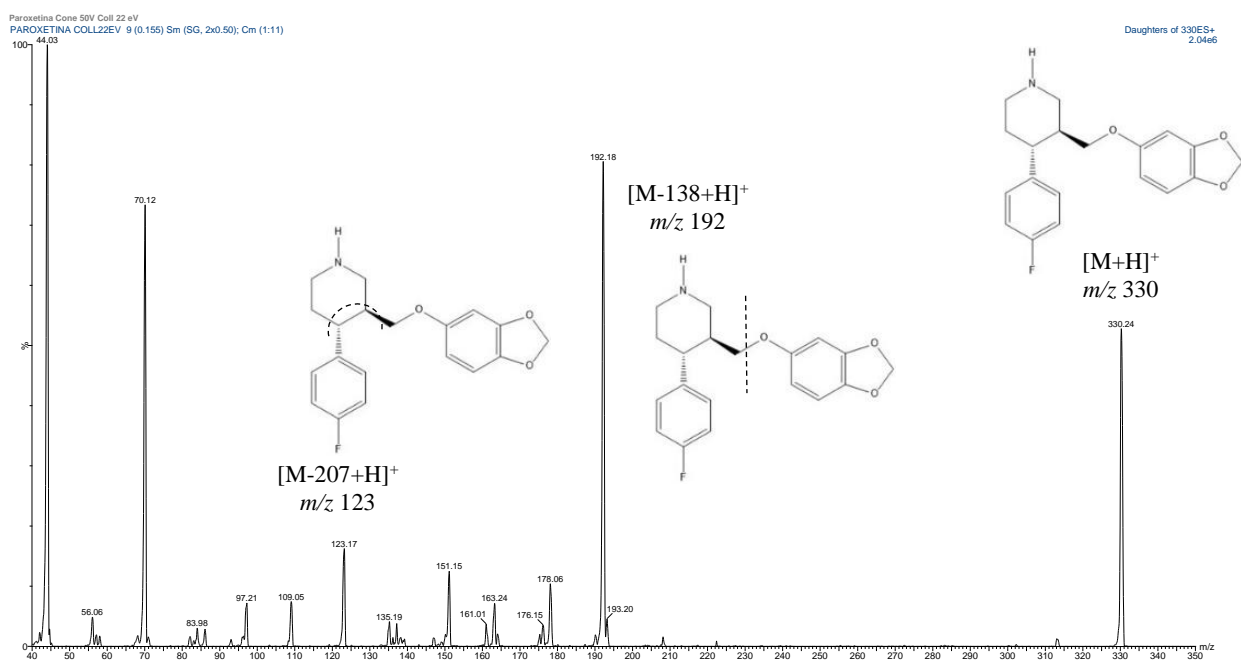


Figura A8. Espectro de massa da paroxetina (EC 22 eV).

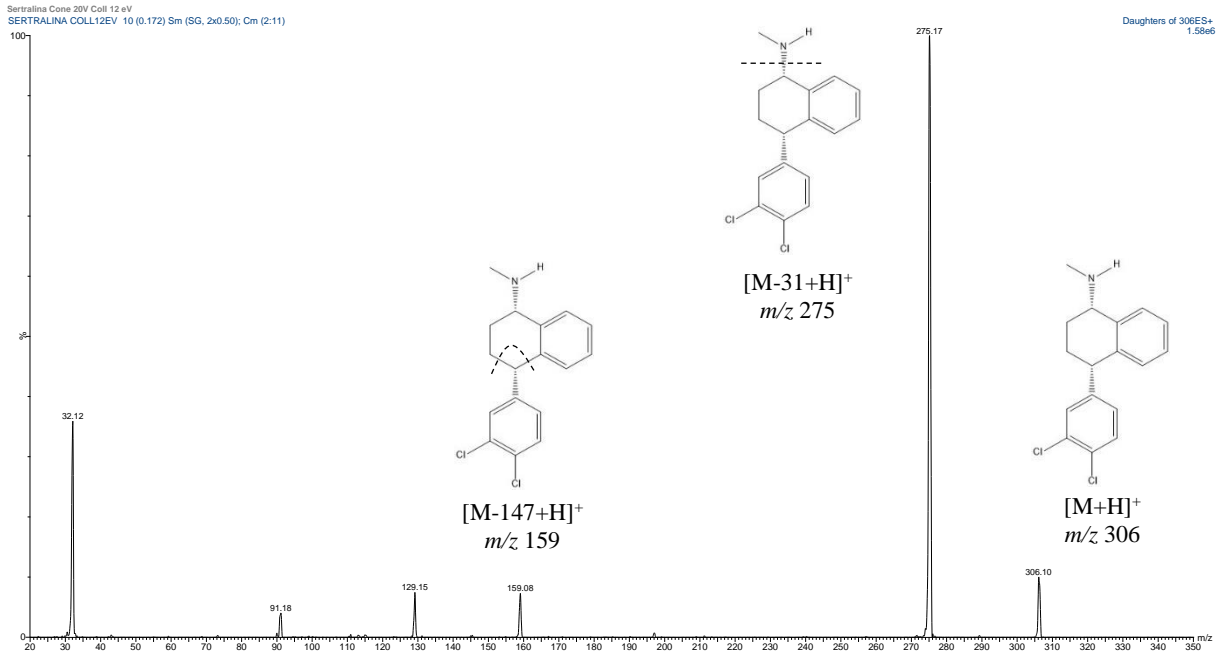


Figura A9. Espectro de massa da sertralina (EC 12 eV).

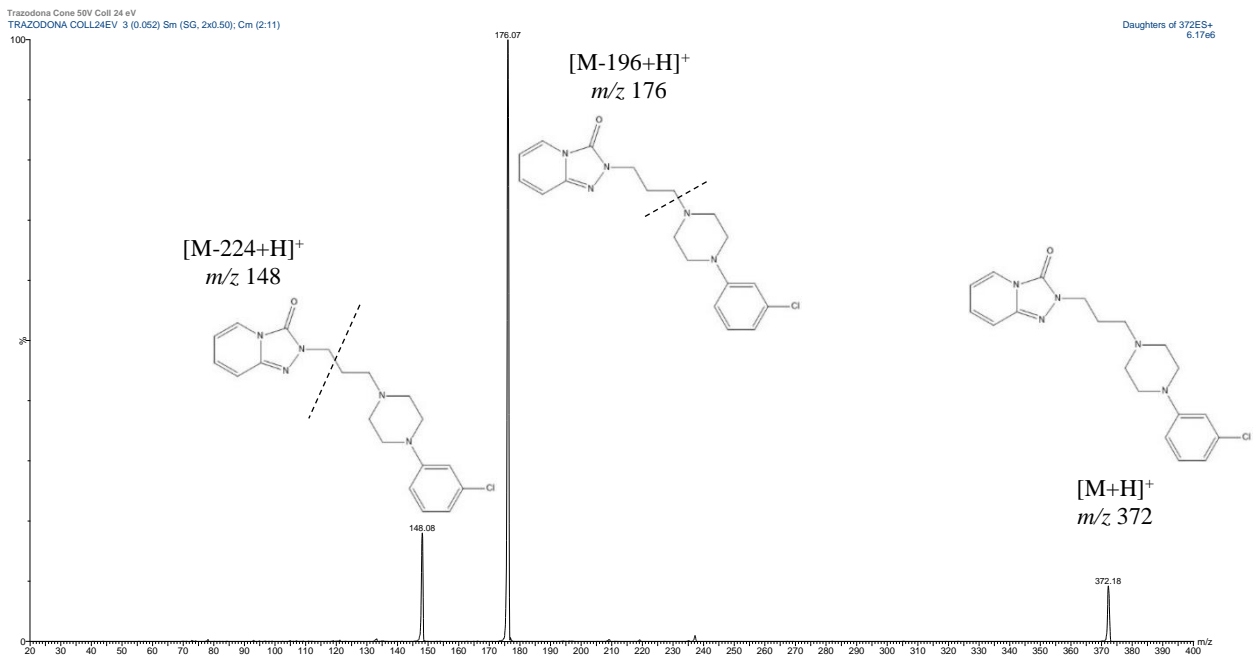


Figura A10. Espectro de massa da trazodona (EC 24 eV).

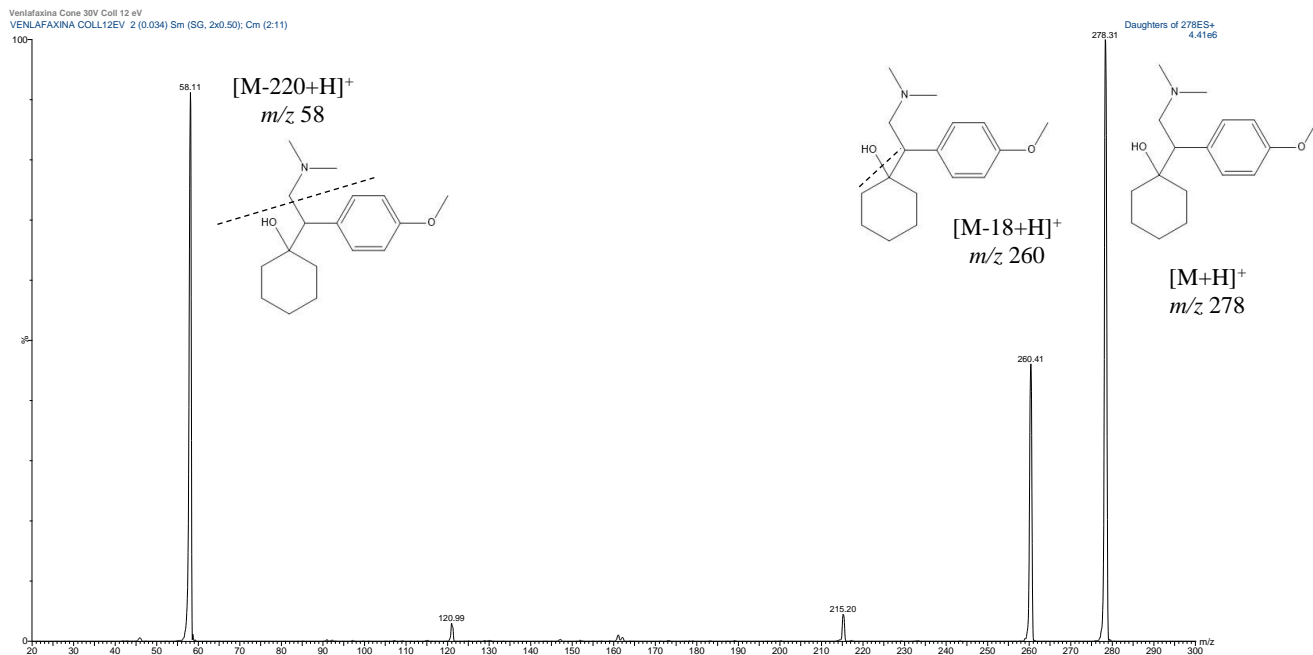


Figura A11. Espectro de massa da venlafaxina (EC 12 eV).

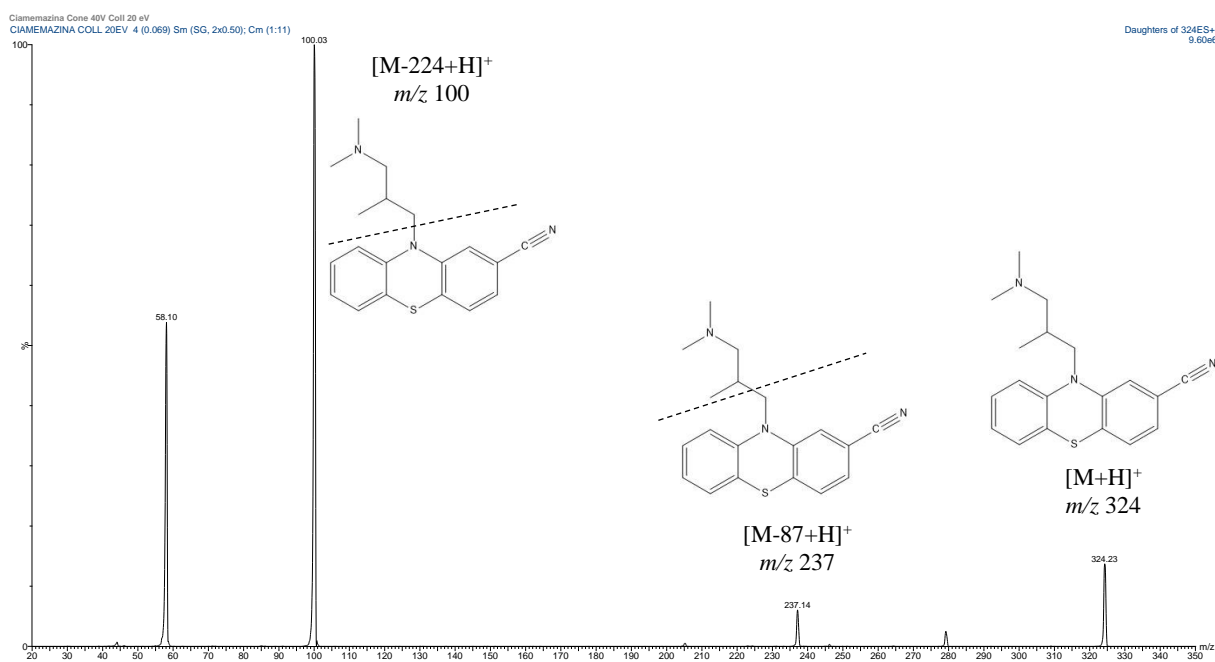


Figura A12. Espectro de massa da ciamemazina (EC 20 eV).

Clozapina Cone 45V Coll 20 eV
CLOZAPINA COLL 20EV 3 (0.052) Sm (SG, 2x0.50); Cm (2:11)

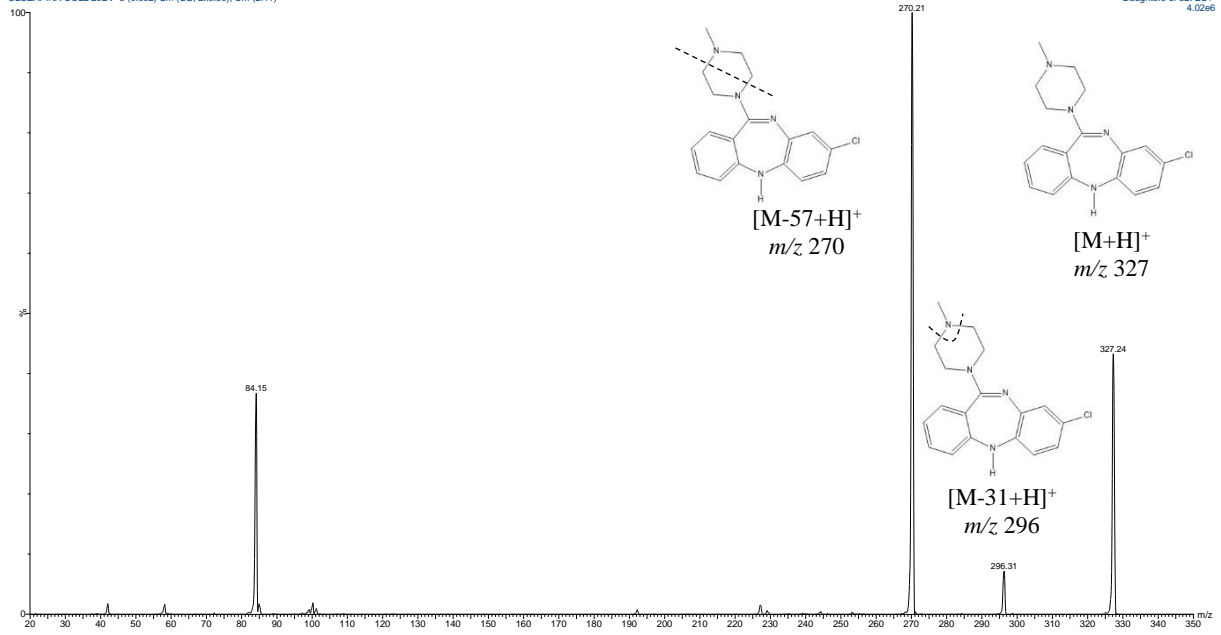


Figura A13. Espectro de massa da clozapina (EC 20 eV).

Haloperidol Cone 45V Coll 20 eV
HALOPERIDOL COLL 20EV 3 (0.052) Sm (SG, 2x0.50); Cm (1:11)

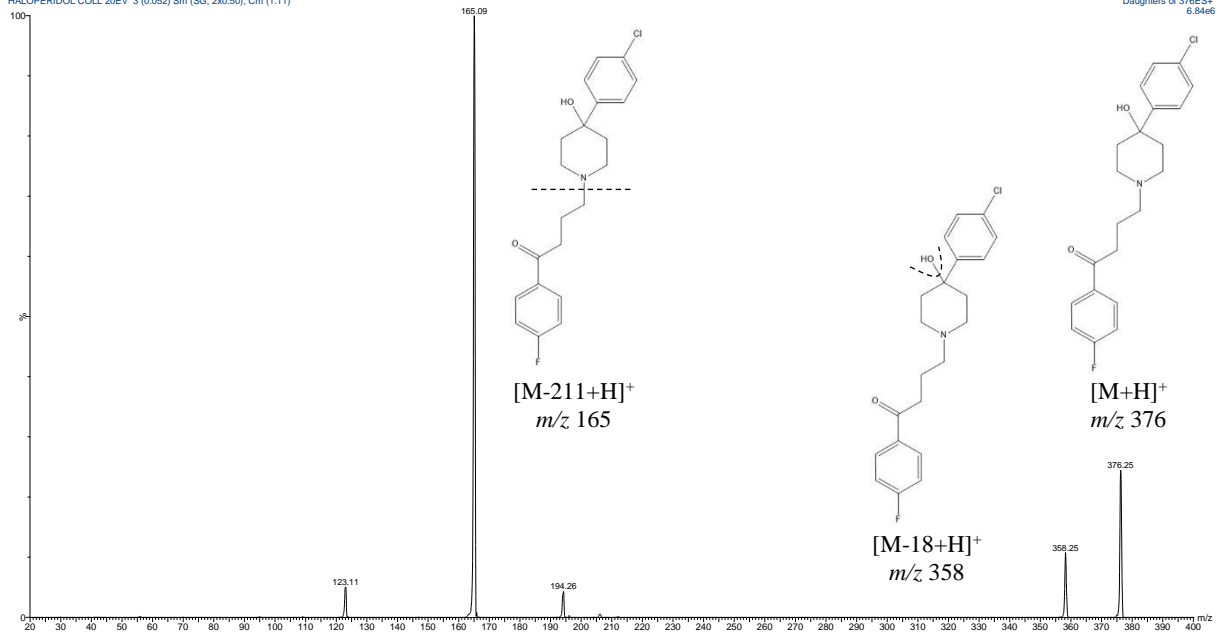


Figura A14. Espectro de massa do haloperidol (EC 20 eV).

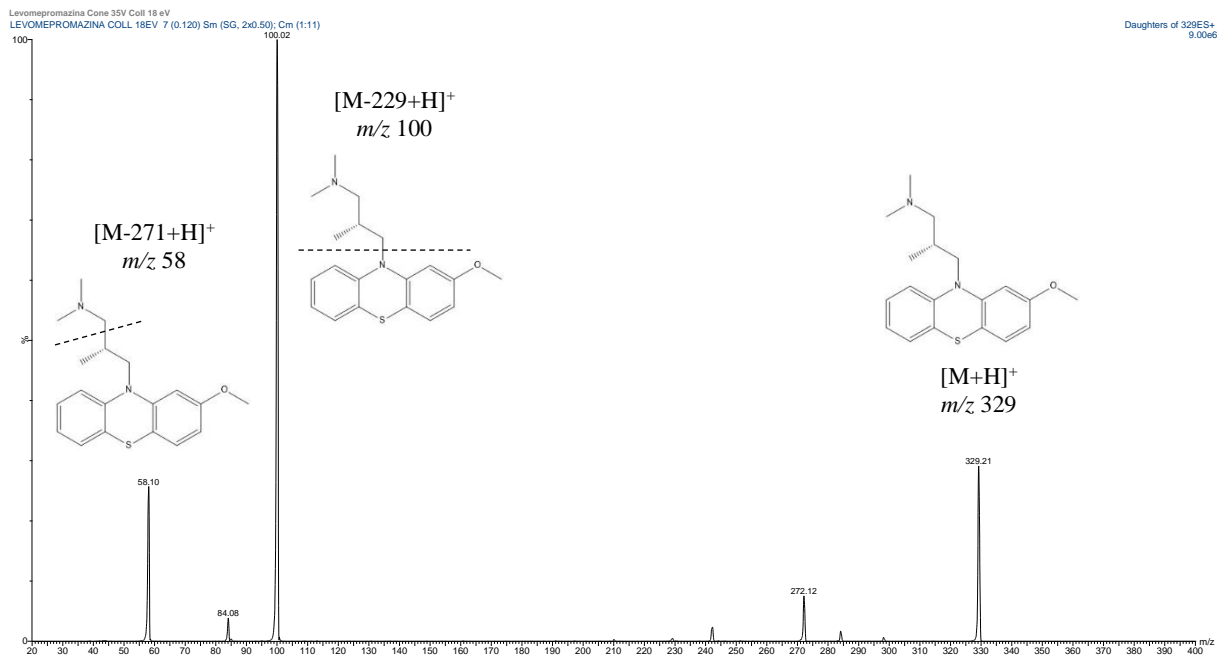


Figura A15. Espectro de massa da levomepromazina (EC 18 eV).

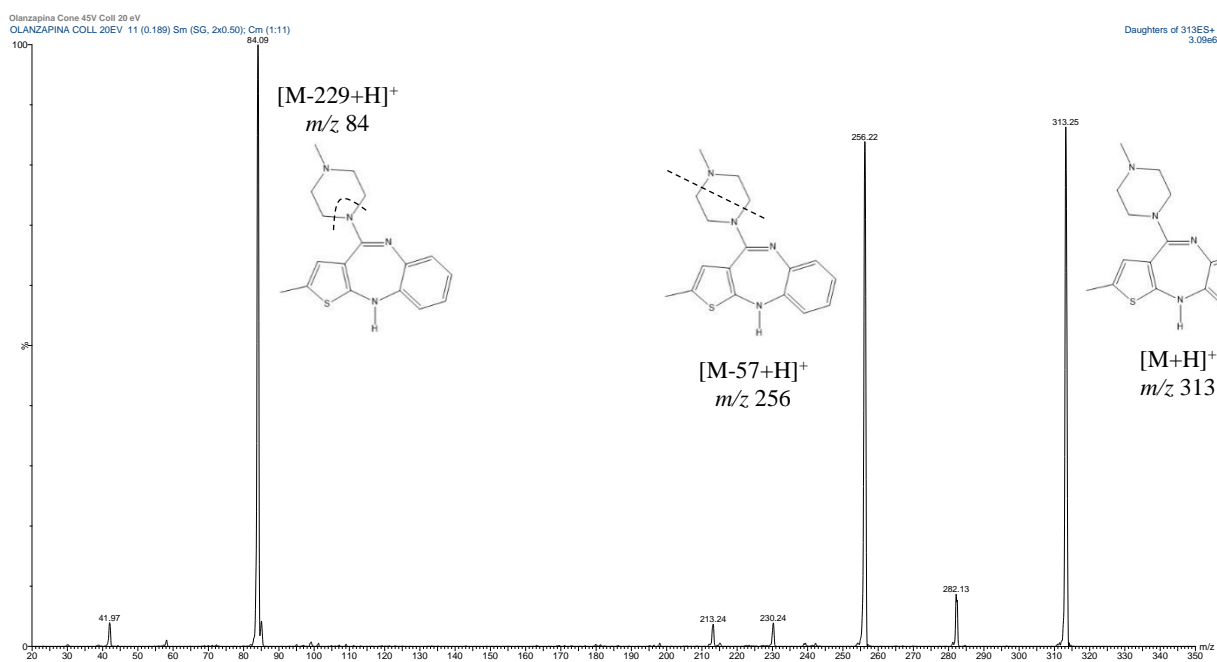


Figura A16. Espectro de massa da olanzapina (EC 20 eV).

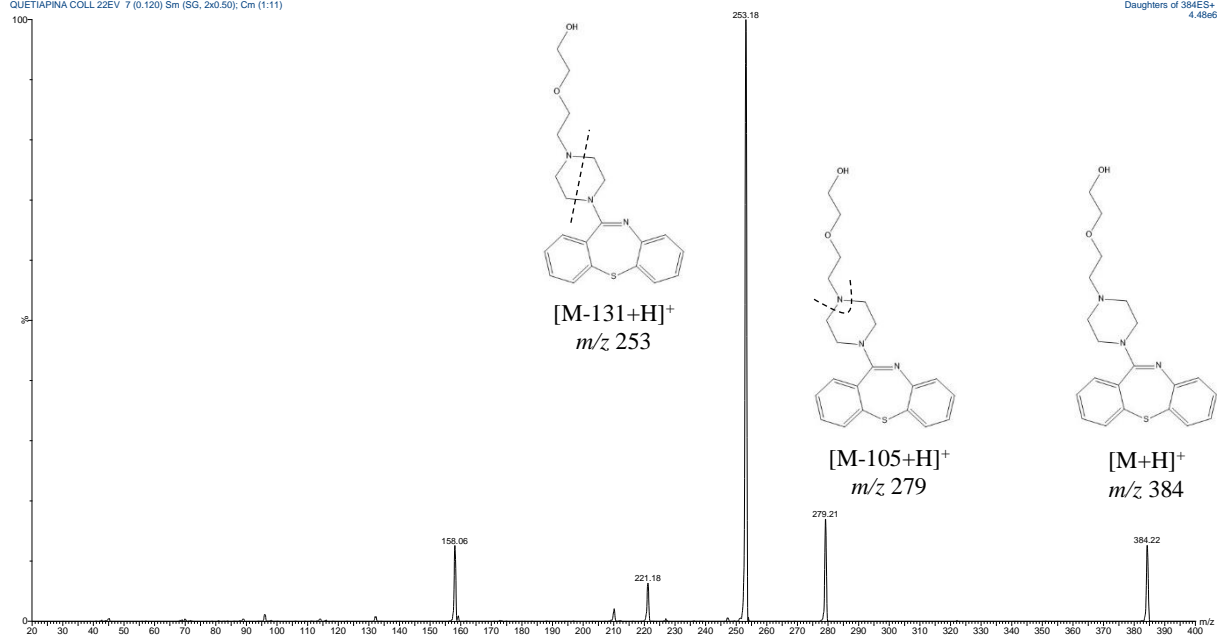


Figura A17. Espectro de massa da quetiapina (EC 22 eV).

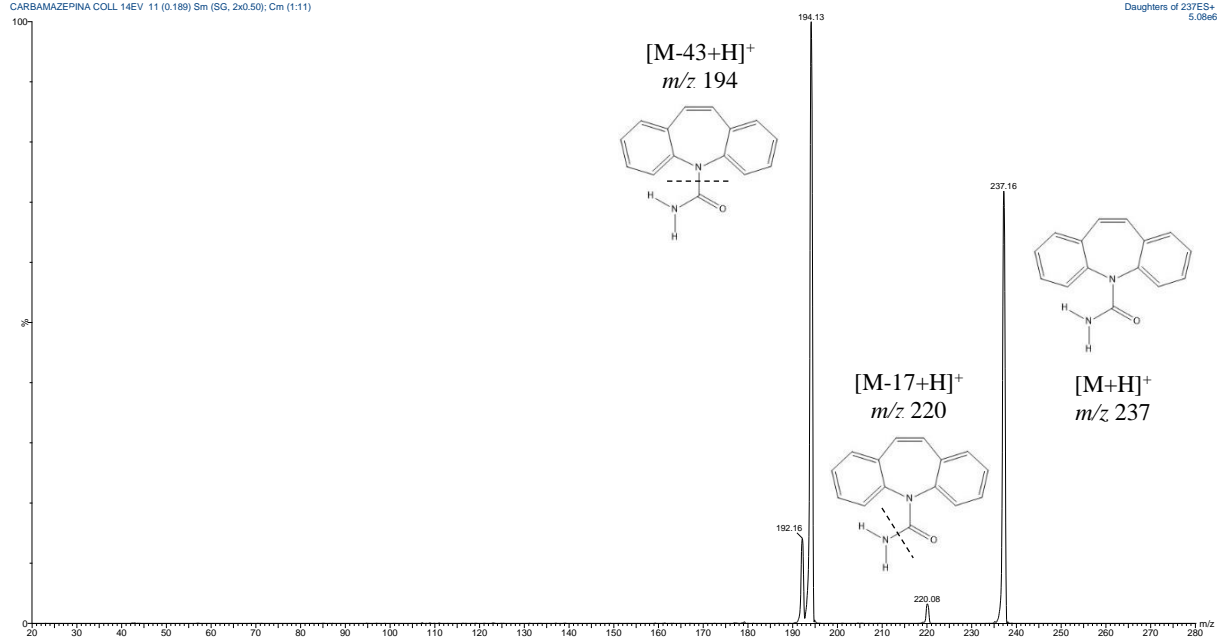


Figura A18. Espectro de massa da carbamazepina (EC 14 eV).

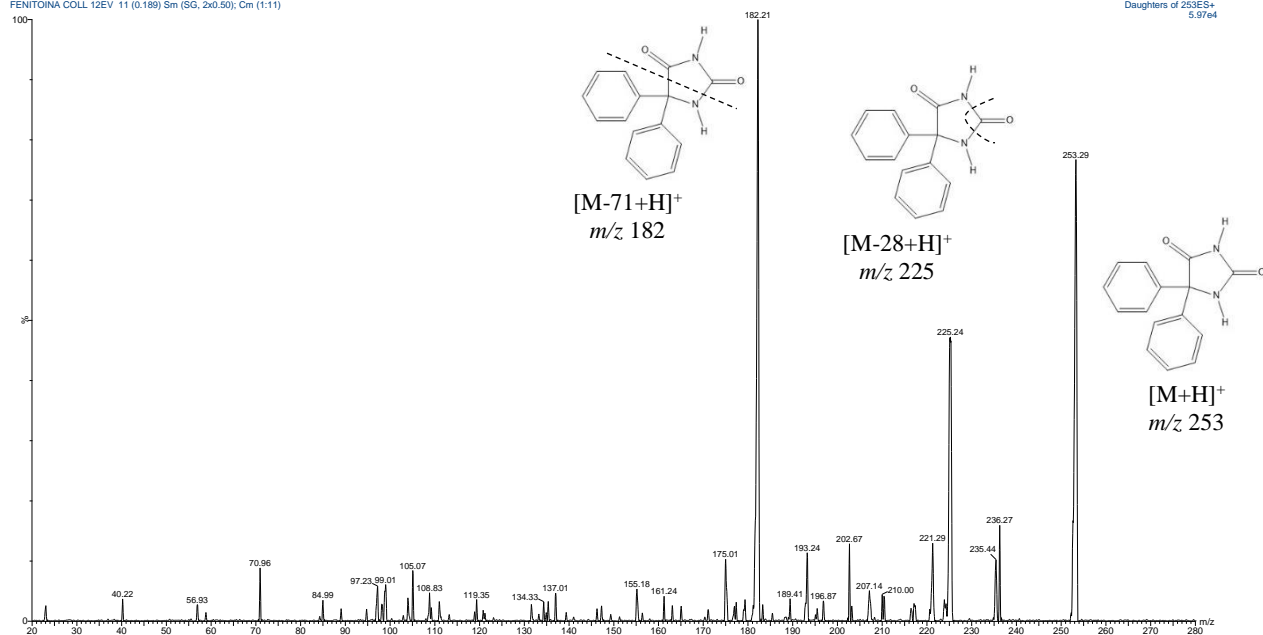


Figura A19. Espectro de massa da fenitoína (EC 12 eV).

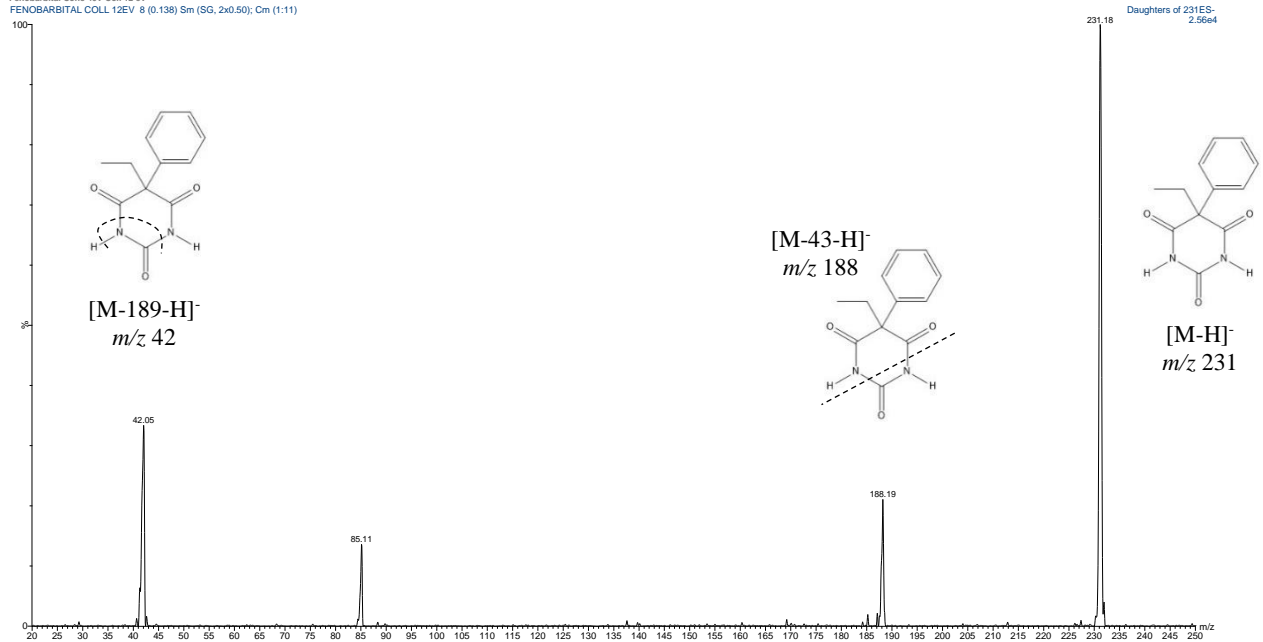


Figura A20. Espectro de massa do fenobarbital (EC 12 eV).

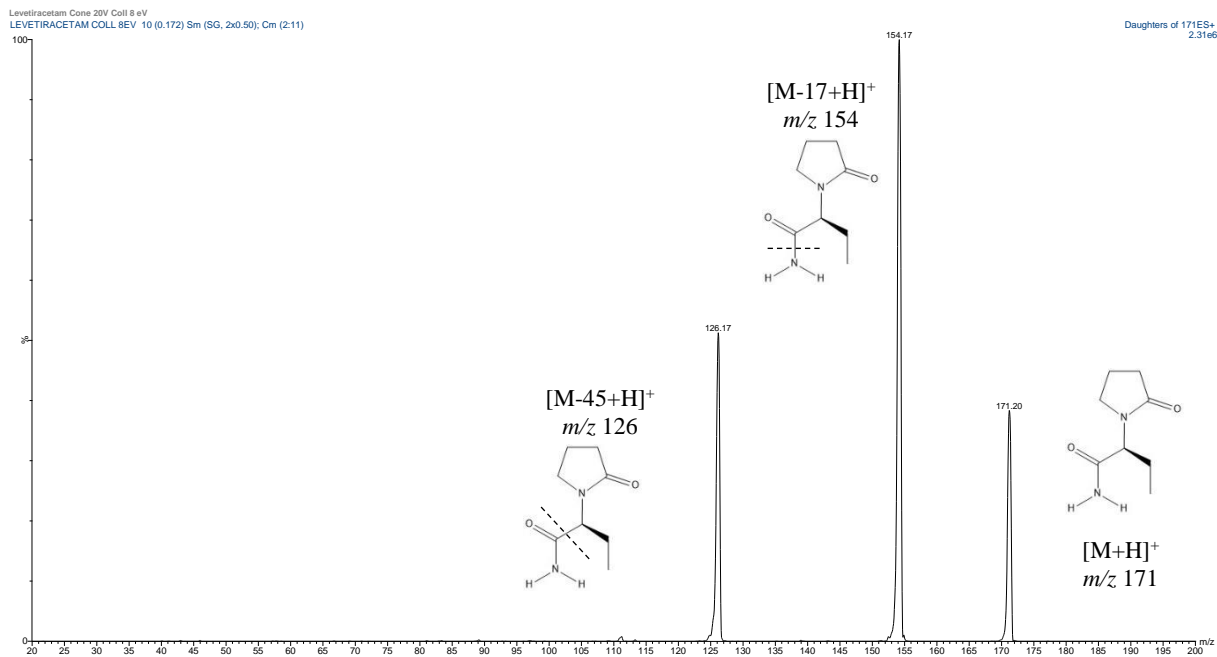


Figura A21. Espectro de massa do levetiracetam (EC 8 eV).

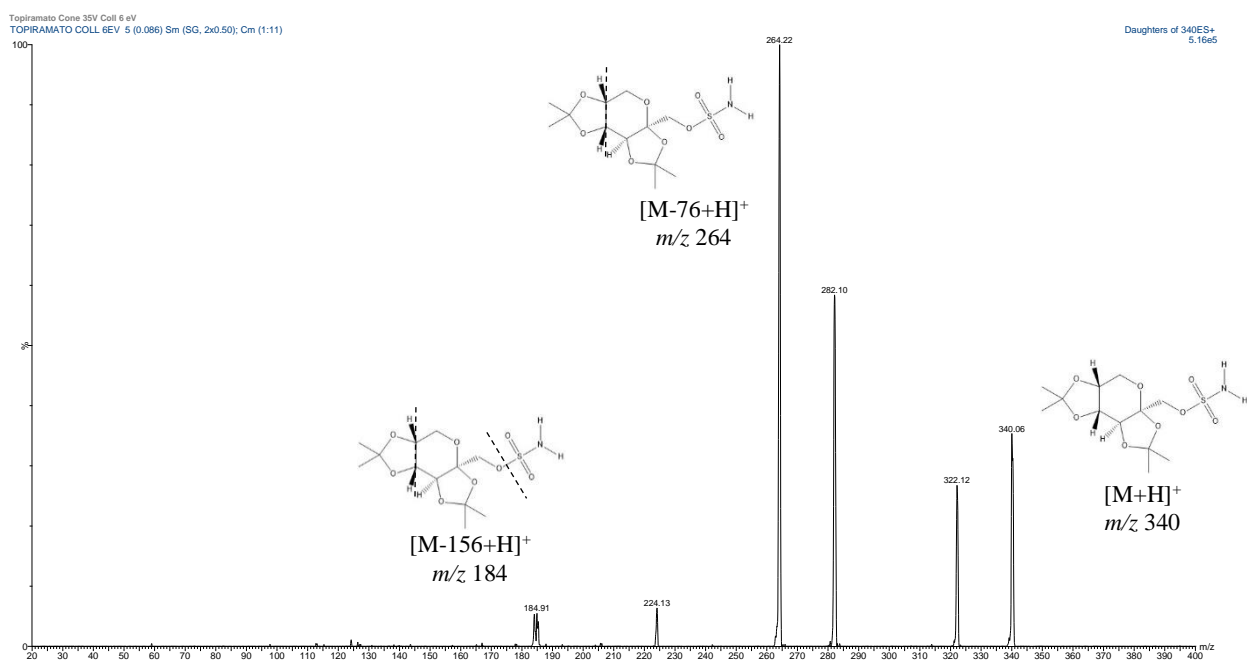


Figura A22.1. Espectro de massa do topiramato (EC 6 eV).

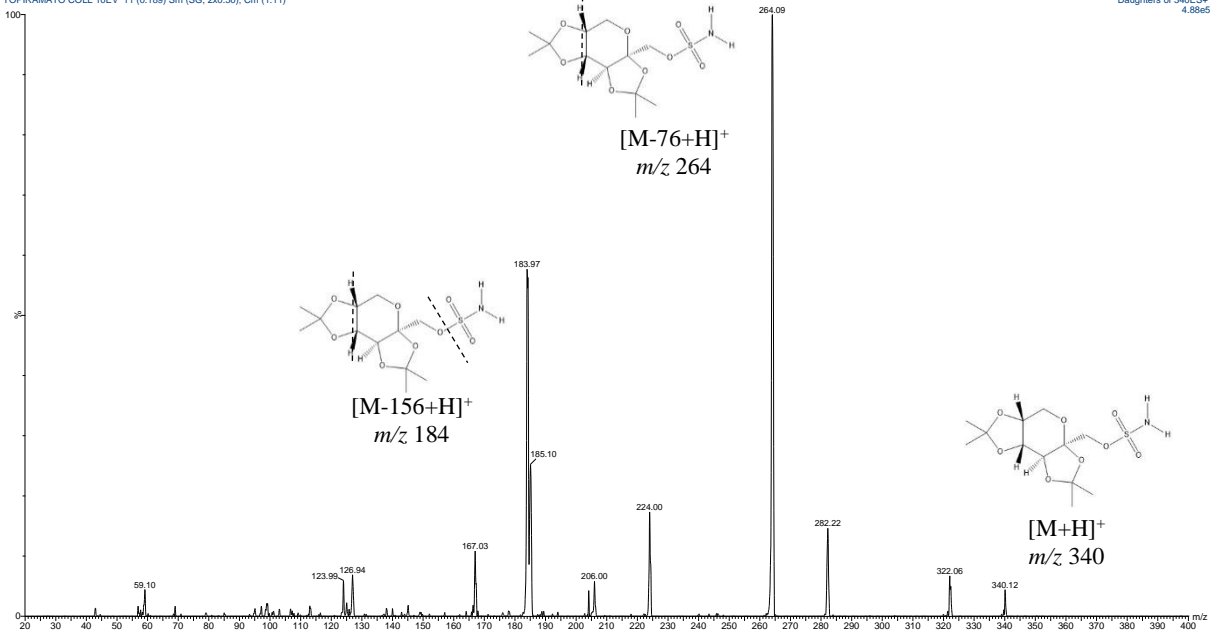


Figura A22.2. Espectro de massa do topiramato (EC 10 eV).

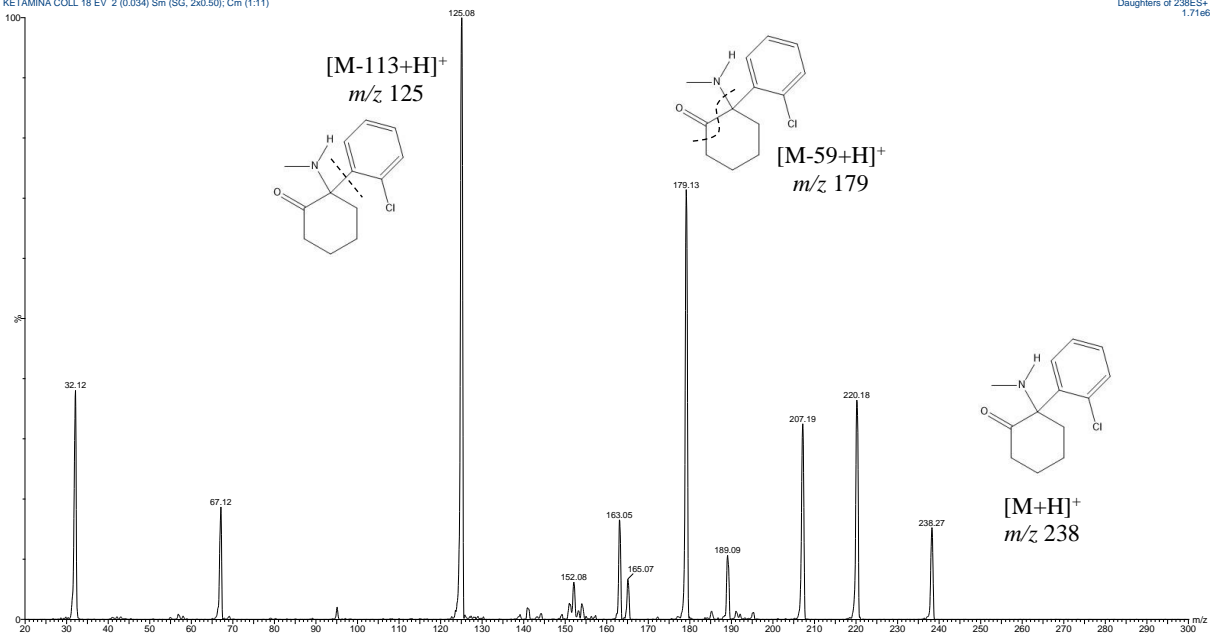


Figura A23. Espectro de massa da cetamina (EC 18 eV).

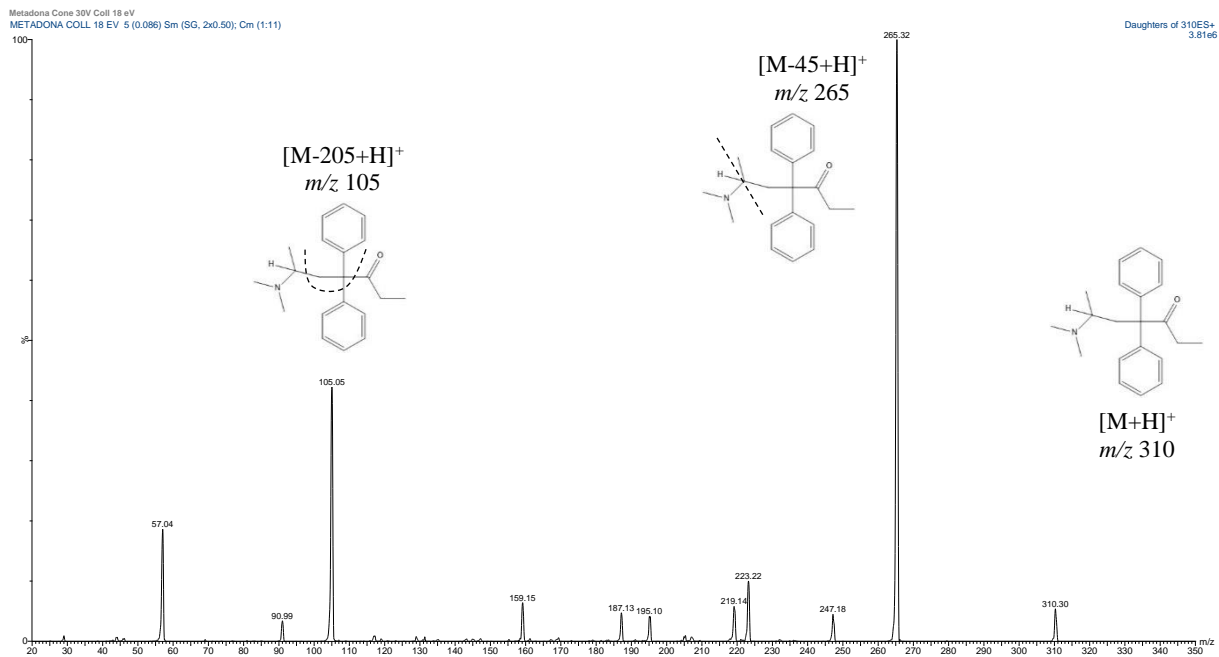


Figura A24. Espetro de massa da metadona (EC 18 eV).

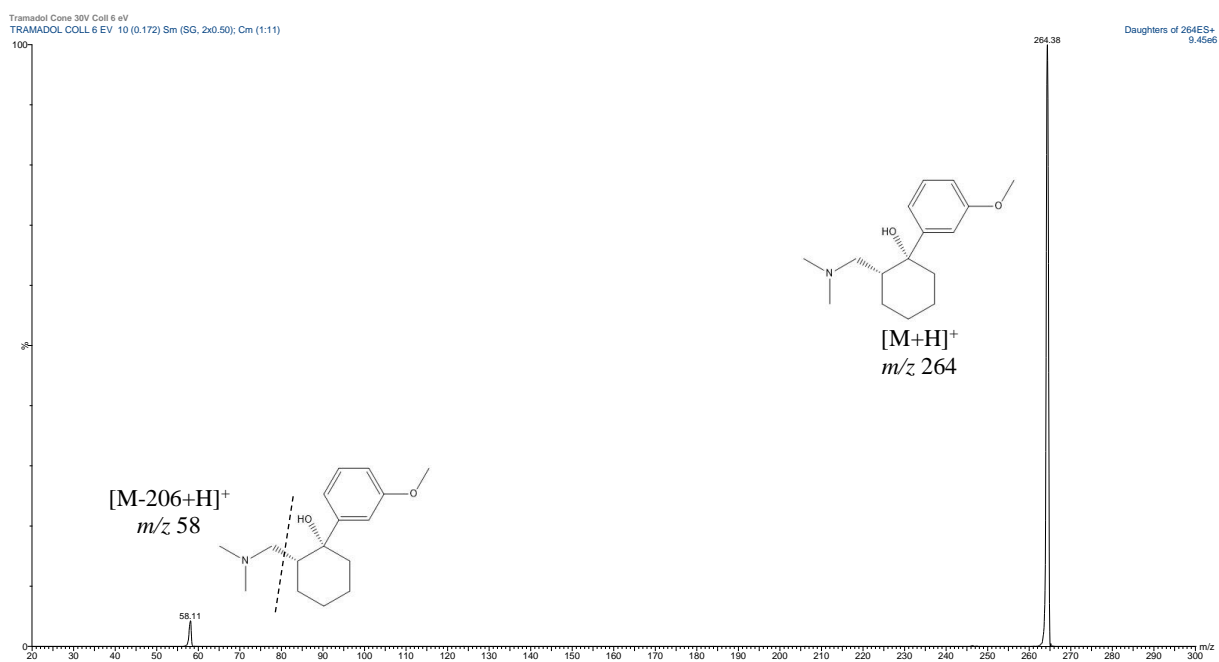


Figura A25. Espetro de massa do tramadol (EC 6 eV).

Anexo B – Razão S/R para cada um dos analitos em cada uma das *pools* analisadas, na confirmação da positividade no estudo da seletividade/especificidade.

Tabela B1. Tabela com relações S/R obtidas para cada analito em cada transição iônica, em cada amostra.

	Levetiracetam		Olanzapina		Cetamina	
	S/R (171 > 126)	S/R (171 > 154)	S/R (313 > 256)	S/R (313 > 84)	S/R (238 > 125)	S/R (238 > 179)
C100	2456,794	1364,055	43771,8	38471,24	33355,11	7071,8
P1	1964,541	2064,601	75857,18	40268,79	30116,48	10987,29
P2	2103,749	1252,014	160253,6	65950	34280,08	17291,78
P3	4956,178	4747,958	213921,4	38497,32	25263,35	7833,122
P4	5047,282	1962,92	132296,1	61695,11	20184,11	14446,16
P5	3598,164	3636,804	74612,3	38017,9	31896,25	10182,68
P6	2817,035	2644,374	30145,29	60618,12	23603,53	9159,297
P7	5954,539	4799,174	29793,76	52619,85	21806,51	11240,99
P8	2365,506	1589,964	22249,24	34766,51	26799,51	16877,25
P9	5538,626	1744,848	4,881	5,928	7496,419	4290,07
P10	2462,152	1548,102	70422,68	28638,61	19412,77	7884,199
	Tramadol		Mirtazapina		Trazodona	
	S/R (264 > 58)	S/R (264 > 264)	S/R (266 > 195)	S/R (266 > 209)	S/R (372 > 176)	S/R (372 > 148)
C100	23214,6	5578,99	13402,62	6169,697	97269,23	222576,5
P1	29915,29	3909,289	27702,17	5893,803	135681,1	54590,71
P2	14944,93	1740,723	13171,5	6141,351	50942,15	45503,72
P3	16399,32	5082,769	16305,22	6300,487	82018,19	112306,9
P4	32113,26	6269,523	16193,13	7793,224	40475,41	10488,2
P5	20795,55	3773,66	10959,04	6071,566	39850,29	87029
P6	29369,31	3988,977	11808,52	3917,112	83386,77	59415,96
P7	9956,629	2742,686	14855,25	3268,489	251350,8	72119,76
P8	12745,85	9123,611	9536,463	3120,1	140564,9	49611,34
P9	2261,372	626,016	2858,551	1590,447	8073,506	12471,4
P10	9934,431	5774,409	8102,673	3848,12	73586,05	153359,3
	Fenobarbital*		Topiramato		Venlafaxina	
	S/R (231 > 42)	S/R (231 > 188)	S/R (340 > 264)	S/R (340 > 184)	S/R (278 > 58)	S/R (278 > 260)
C100	152,919	365,098	894,166	1224,692	35008,95	16409,36
P1	82,049	70,219	1062,596	62,085	69647,77	12932,7
P2	34,794	24,449	566,523	438,213	29931,35	3712,771
P3	68,515	66,261	918,394	510,972	48801,18	12200
P4	87,866	24,03	1143,547	161,615	36643,29	19067,35
P5	30,123	31,255	790,05	1157,487	57726,96	8731,309
P6	274,392	225,206	5244,256	709,461	60261	10884,22
P7	217,801	31,438	976,173	668,453	34048,06	15729,49
P8	306,625	86,277	1470,359	327,011	58562,12	54513,32
P9	156,081	31,305	716,223	959,06	8864,557	8427,487
P10	42,148	36,369	1342,999	322,987	92573,79	13004,39

* para o fenobarbital, os resultados obtidos foram para uma concentração de 1000 ng/mL.

Tabela B1. (continuação)

	Citalopram		Mianserina		Clozapina	
	S/R (325 > 109)	S/R (325 > 262)	S/R (265 > 208)	S/R (265 > 222)	S/R (327 > 270)	S/R (327 > 296)
C100	22535,4	21699,7	59709,29	16400,6	9416,625	14837,7
P1	12001,45	15994,44	6887,223	7060,246	24115,85	3993,131
P2	23310,25	114748,6	94156,53	10818,83	41168,27	12880,97
P3	12941,96	13870,99	35556	7665,372	31317,6	4168,285
P4	19990,82	8422,974	42981,39	5746,017	20437,7	3999,117
P5	12227,55	132289,2	11918,6	2840,202	18447,47	15226,05
P6	16235,15	18138,77	13387,74	5798,875	10294,47	6212,788
P7	14480,95	11027,1	8779,72	10534,97	9883,207	24803,81
P8	7603,494	13132,13	12144,08	11445,88	4675,475	5990,373
P9	17306,19	10329,11	3102,124	1279,552	3803,532	2134,039
P10	14208,62	18587,66	15104,67	2051,718	4884,97	7126,985
	Quetiapina		Haloperidol		Fenitoína	
	S/R (384 > 253)	S/R (384 > 279)	S/R (376 > 165)	S/R (376 > 358)	S/R (253 > 182)	S/R (253 > 225)
C100	48823	9096,946	8685,3	10120,81	332,801	47,4
P1	46495,65	19227,81	11638,67	3141,708	847,432	114,745
P2	75050,86	21907,14	5954,454	1038,266	693,014	54,957
P3	25785,08	5925,673	30419,74	3637,664	373,999	48,962
P4	30769,64	7212,104	6755,26	4105,227	700,302	64,117
P5	58651,37	9302,093	10412,27	4576,905	337,375	56,033
P6	23005,26	10302,5	10318,76	4530,518	514,892	93,073
P7	82145,49	18171,78	2979,277	2547,961	1107,914	35,985
P8	27017,46	4848,077	2491,82	3038,185	508,29	118,788
P9	17062,79	10890,52	3140,068	1474,946	537,34	10,336
P10	24539,93	10889,99	1289,74	1020,555	676,753	72,718
	Carbamazepina		Ciamemazina		Paroxetina	
	S/R (237 > 194)	S/R (237 > 220)	S/R (324 > 100)	S/R (324 > 237)	S/R (330 > 192)	S/R (330 > 123)
C100	50349,51	11224,19	156710,3	18105,46	8096,534	2519,483
P1	19307,07	10758,11	39209,1	5179,934	2981,788	1101,241
P2	12040,61	1771,239	19808,57	13998,48	3829,646	690,108
P3	15641,47	2527,071	65902,25	35073,97	7501,935	679,07
P4	15638,05	2251,594	26858,84	20235,82	6041,277	439,539
P5	19673,44	2592,068	16745,95	3732,018	3514,878	366,477
P6	27712,71	4072,335	27757,31	48958,61	7865,05	414,454
P7	19866,71	4279,111	35433,87	3403,285	3123,206	684,795
P8	24642,08	6020,902	12184,02	27546,73	2773,055	1604,697
P9	7868,426	1383,541	13607,04	10986,96	1377,869	142,771
P10	11363,87	8664,672	11738,68	4404,614	2687,358	538,742

* para o fenobarbital, os resultados obtidos foram para uma concentração de 1000 ng/mL.

Tabela B1. (continuação)

	Metadona		Levomepromazina		Amitriptilina	
	S/R (310 > 265)	S/R (310 > 105)	S/R (329 > 100)	S/R (329 > 58)	S/R (278 > 233)	S/R (278 > 191)
C100	43195	83646,63	4412,316	6397,61	7036,075	3419,506
P1	171038,2	6426,596	15536,38	69177,32	14861,24	2220,418
P2	28406,89	47719,04	10148,12	10420,76	5287,627	5974,179
P3	12871,02	17843,24	8610,871	7170,195	7734,844	43333,89
P4	31170,96	10524,99	25697,09	9009,233	3771,473	2128,491
P5	38494,02	97954,74	7934,461	45888,89	30158,21	22060,25
P6	13788,74	47107,96	12080,52	6531,26	8571,565	2790,898
P7	21260,87	3990,219	4341,904	4169,825	3397,62	2184,132
P8	115611,8	24492,55	2844,213	2063,135	2348,109	7429,931
P9	34437,66	5916,913	5385,998	9814,138	908,53	1704,384
P10	12108,15	26184,5	1355,415	1733,739	88608,72	4345,423
	Nortriptilina		Fluoxetina		Sertralina	
	S/R (264 > 233)	S/R (264 > 191)	S/R (310 > 44)	S/R (310 > 148)	S/R (306 > 159)	S/R (306 > 275)
C100	2002,076	1539,837	2671,806	1543,156	2285,819	2891,615
P1	4049,258	1461,276	15113,67	684,77	8230,773	1838,102
P2	4211,697	919,394	1784,951	708,293	4030,04	1730,589
P3	4469,821	1098,753	3768,661	1219,854	9845,017	2610,76
P4	4180,844	563,894	12252,28	343,64	3559,314	528,805
P5	2632,624	918,246	1774,042	1166,694	5256,711	1121,557
P6	3438,198	1150,736	2076,975	1040,559	956,568	1279,4
P7	3079,597	2529,155	3345,661	1391,679	924,99	2538,453
P8	1083,99	745,786	1916,892	1243,513	412,533	340,38
P9	1580,259	1267,448	2125,098	549,64	2387,701	794,746
P10	562,373	892,229	1335,475	675,599	280,796	392,931
	Clomipramina					
	S/R (315 > 86)	S/R (315 > 58)				
C100	1322,308	2050,866				
P1	6268,252	3482,603				
P2	3541,549	3924,228				
P3	2644,699	1970,889				
P4	2969,088	3680,722				
P5	2559,1	2133,485				
P6	2143,456	4899,718				
P7	1138,048	1076,428				
P8	335,103	285,287				
P9	1329,824	1244,713				
P10	220,676	206,316				

* para o fenobarbital, os resultados obtidos foram para uma concentração de 1000 ng/mL.

Anexo C – Resultados obtidos para as amostras brancas e amostras fortificadas com benzodiazepinas a 100 ng/mL, no estudo da seletividade/especificidade.

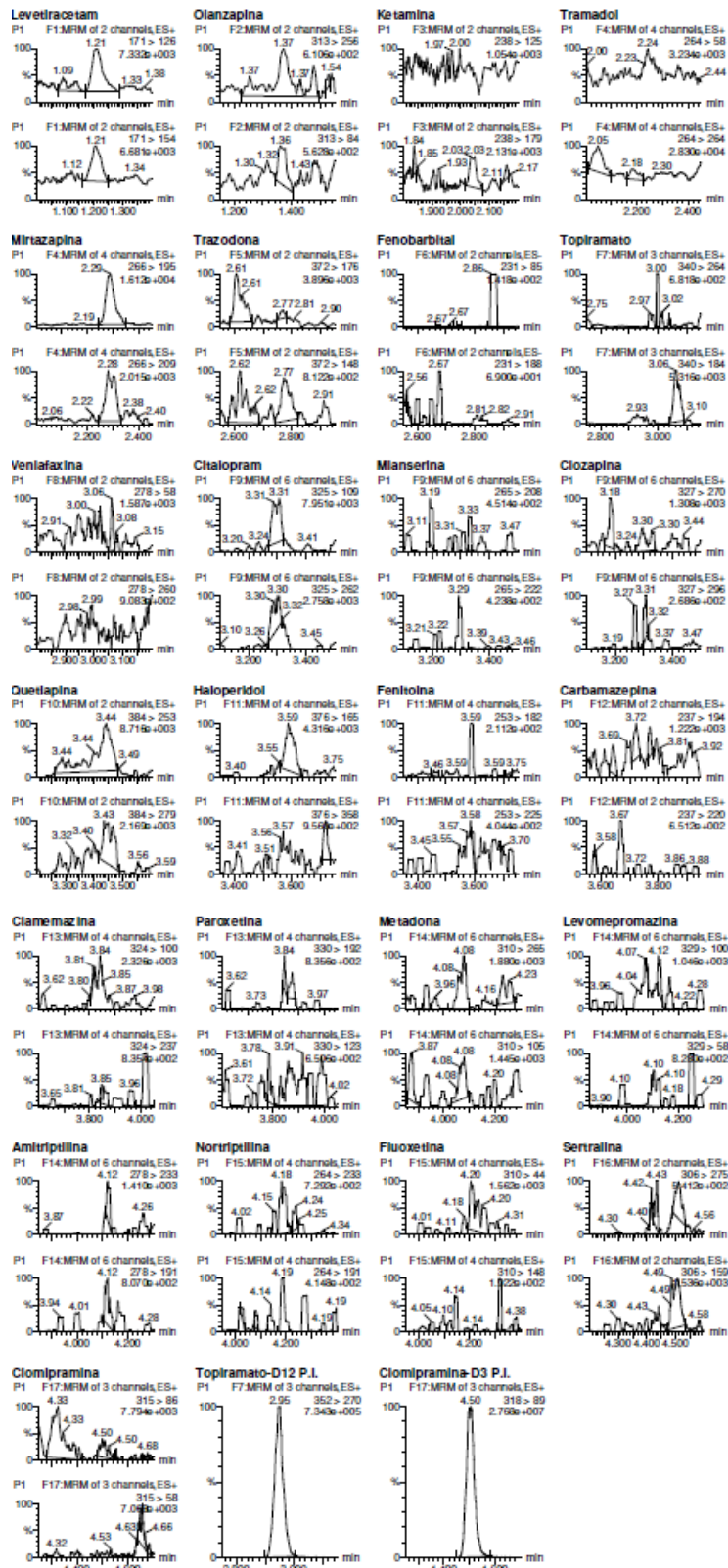


Figura C1. Cromatograma obtido no estudo da seletividade para a amostra branca *pool* 1.

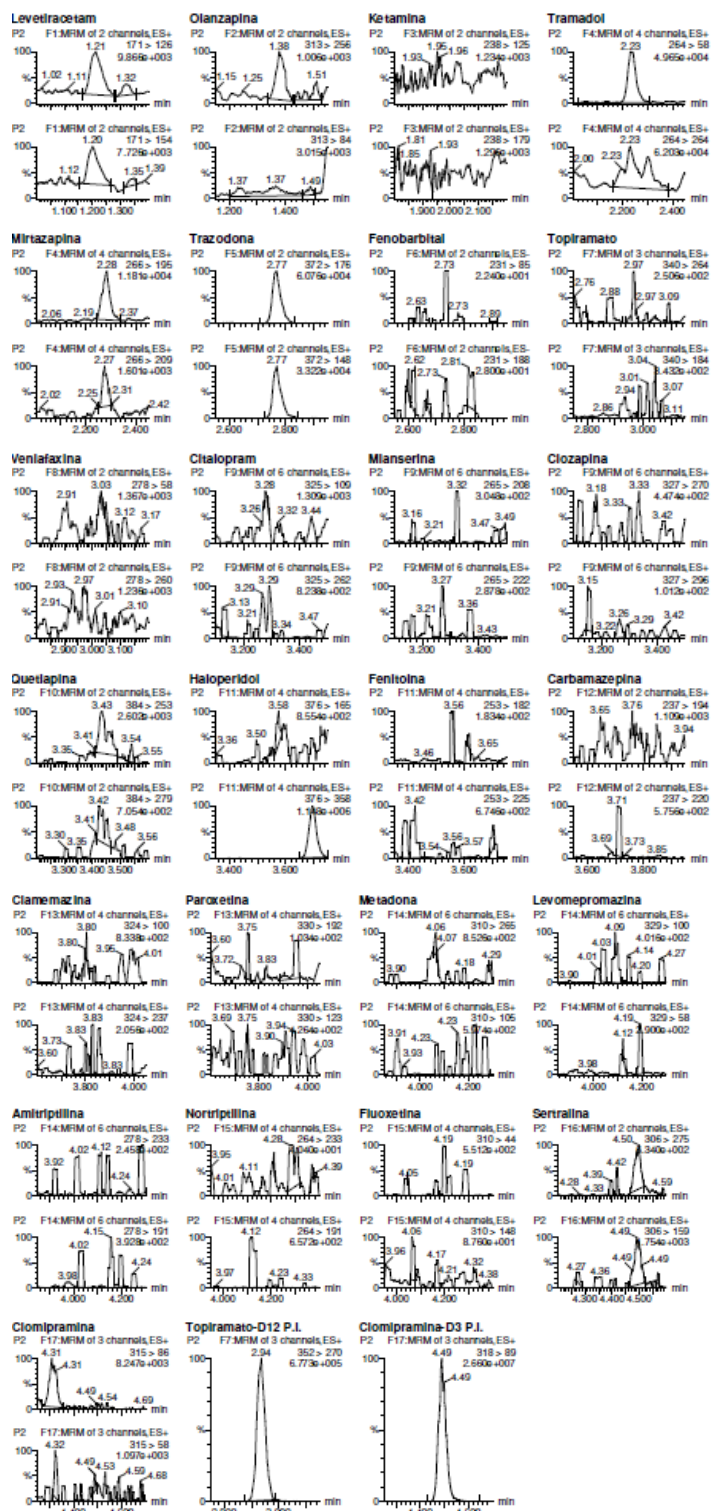


Figura C2. Cromatograma obtido no estudo da seletividade para a amostra branca *pool 2*.

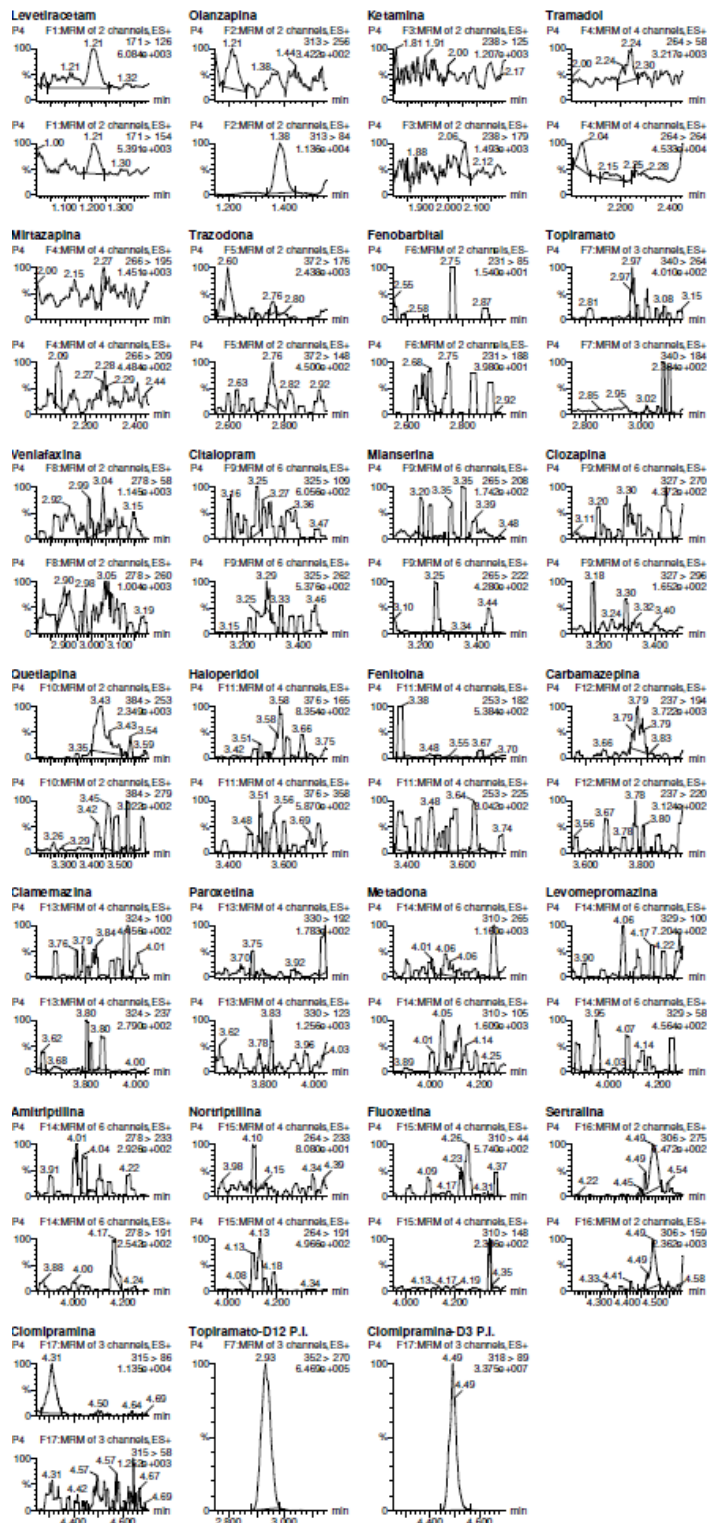


Figura C3. Cromatograma obtido no estudo da seletividade para a amostra branca *pool* 4.

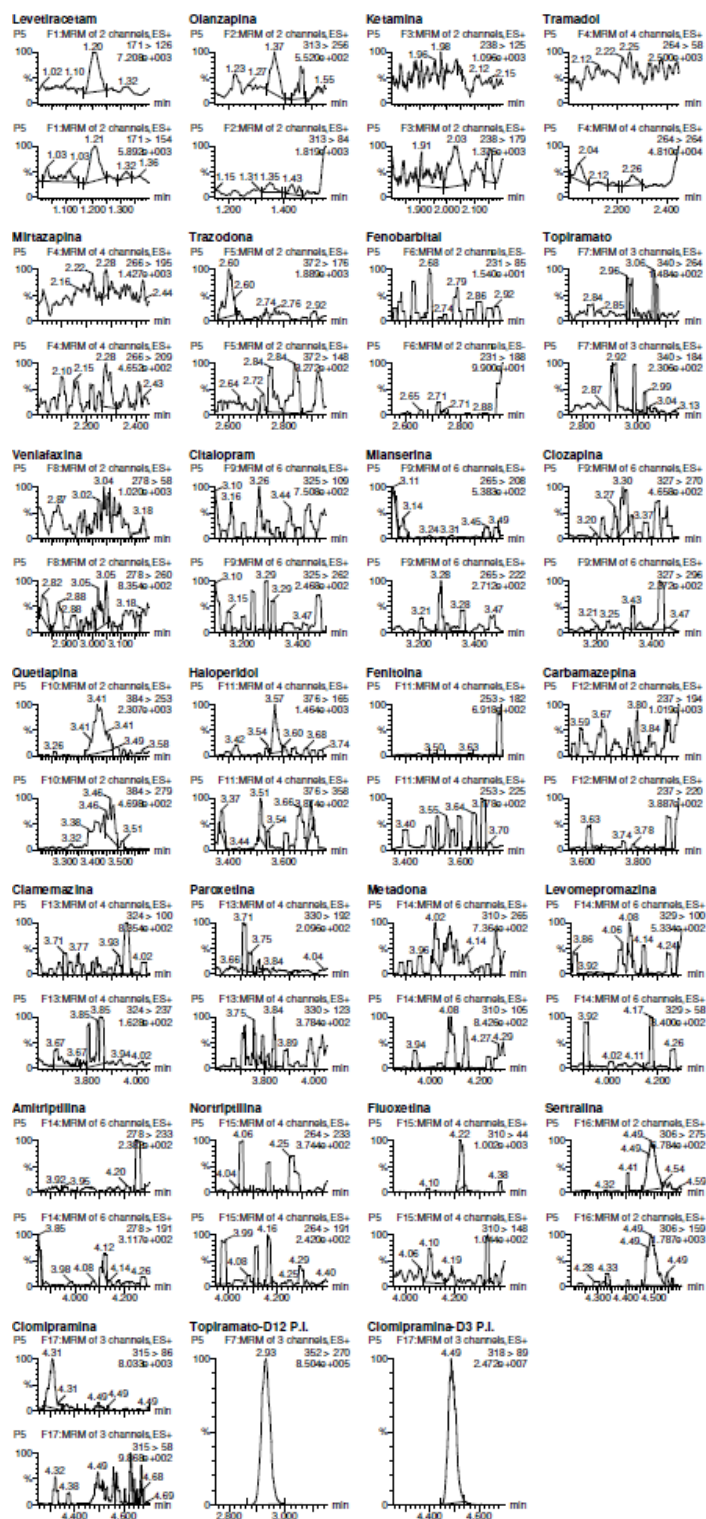


Figura C4. Cromatograma obtido no estudo da seletividade para a amostra branca *pool 5*.

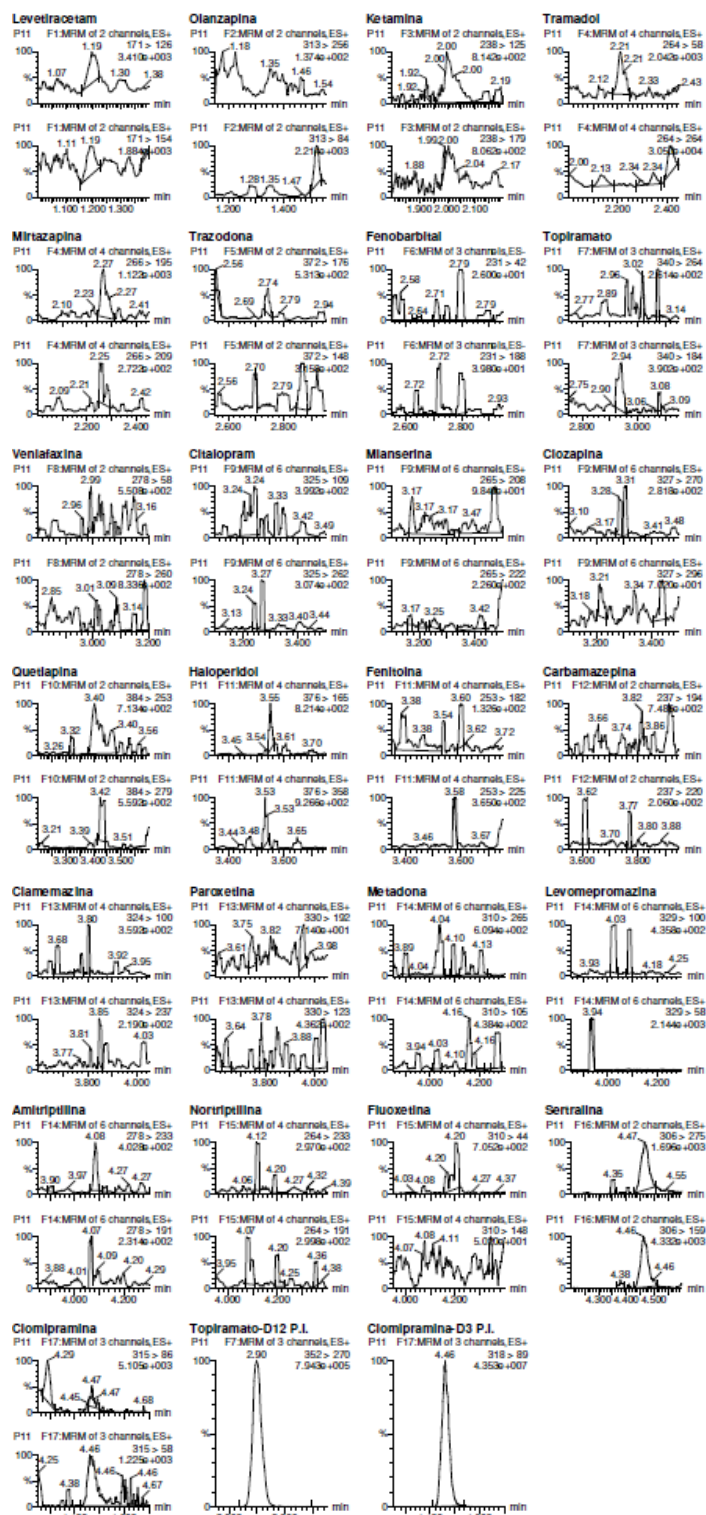


Figura C5. Cromatograma obtido no estudo da seletividade para a amostra branca *pool 6*.

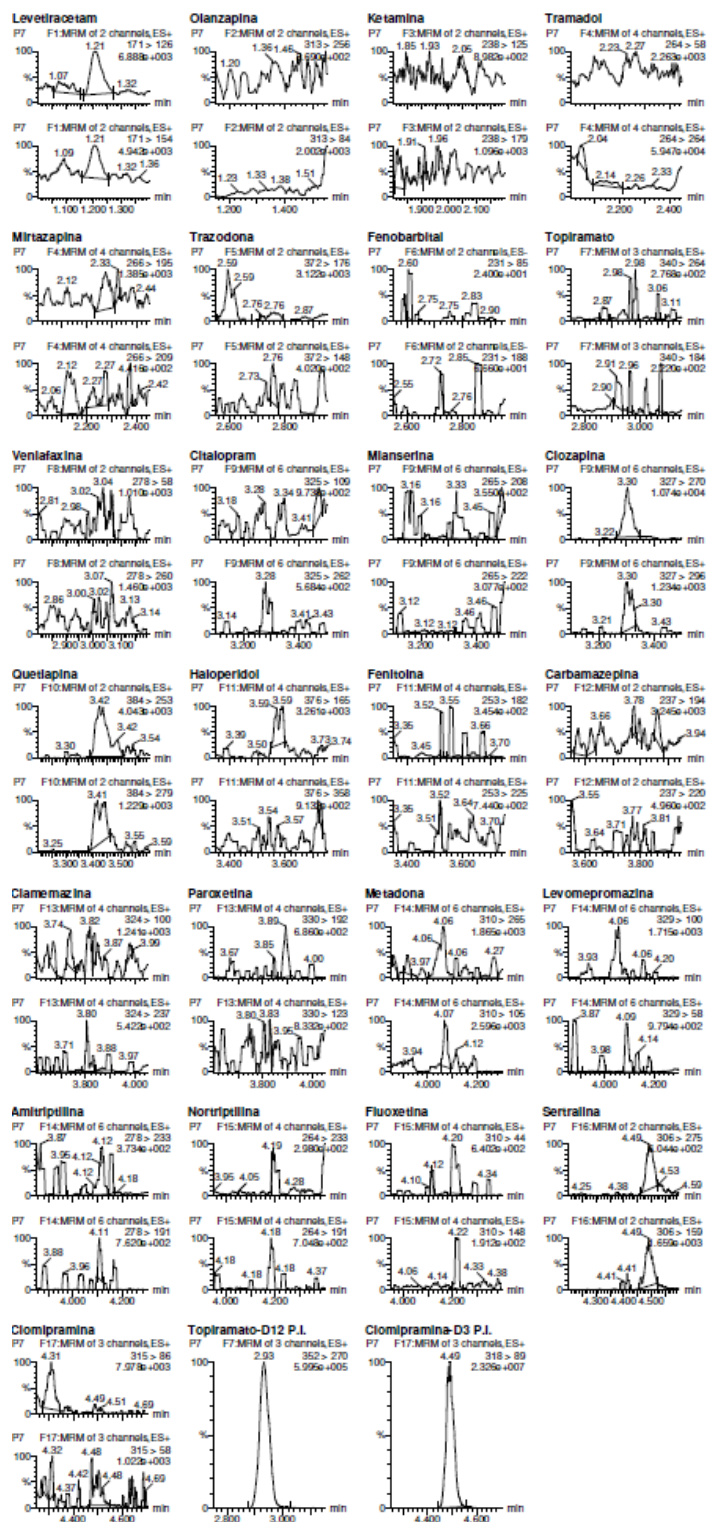


Figura C6. Cromatograma obtido no estudo da seletividade para a amostra branca *pool 7*.

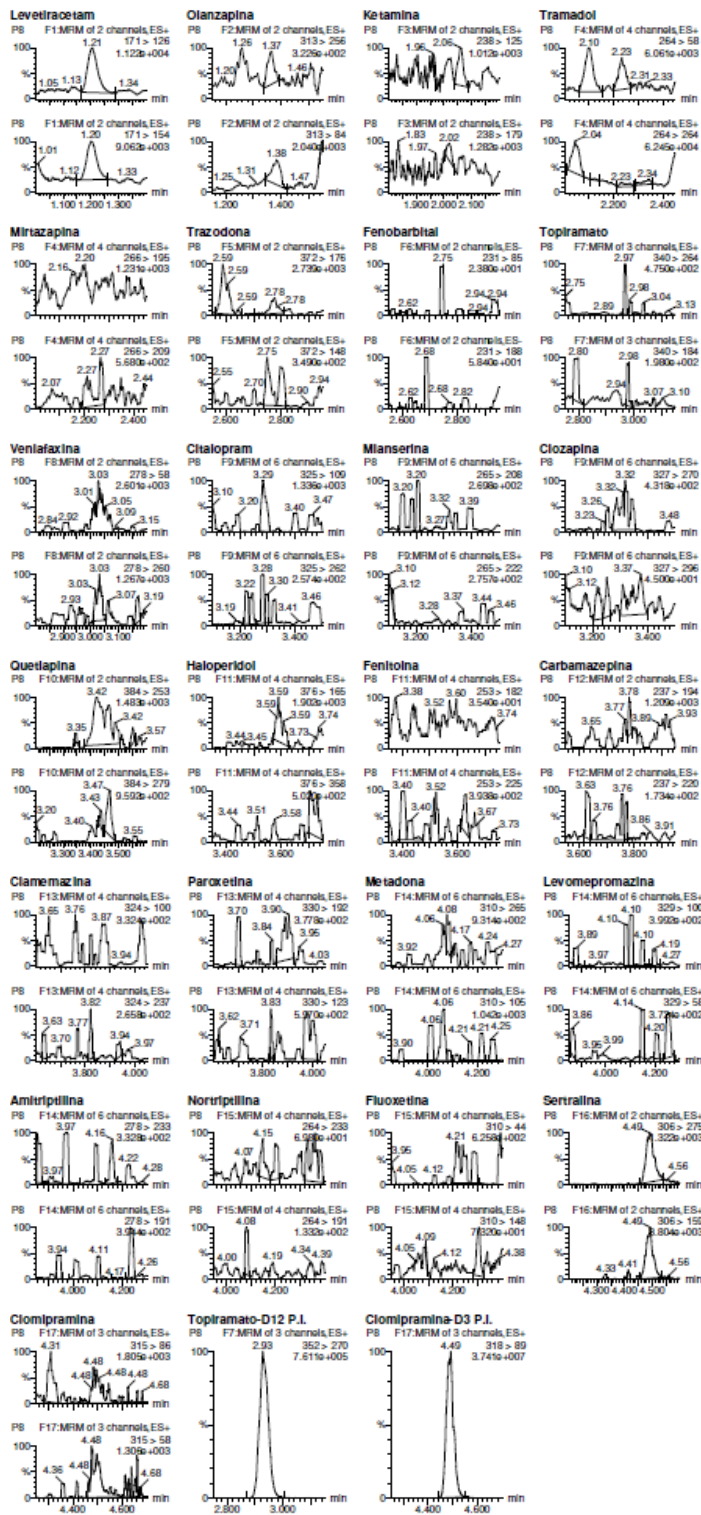


Figura C7. Cromatograma obtido no estudo da seletividade para a amostra branca *pool 8*.

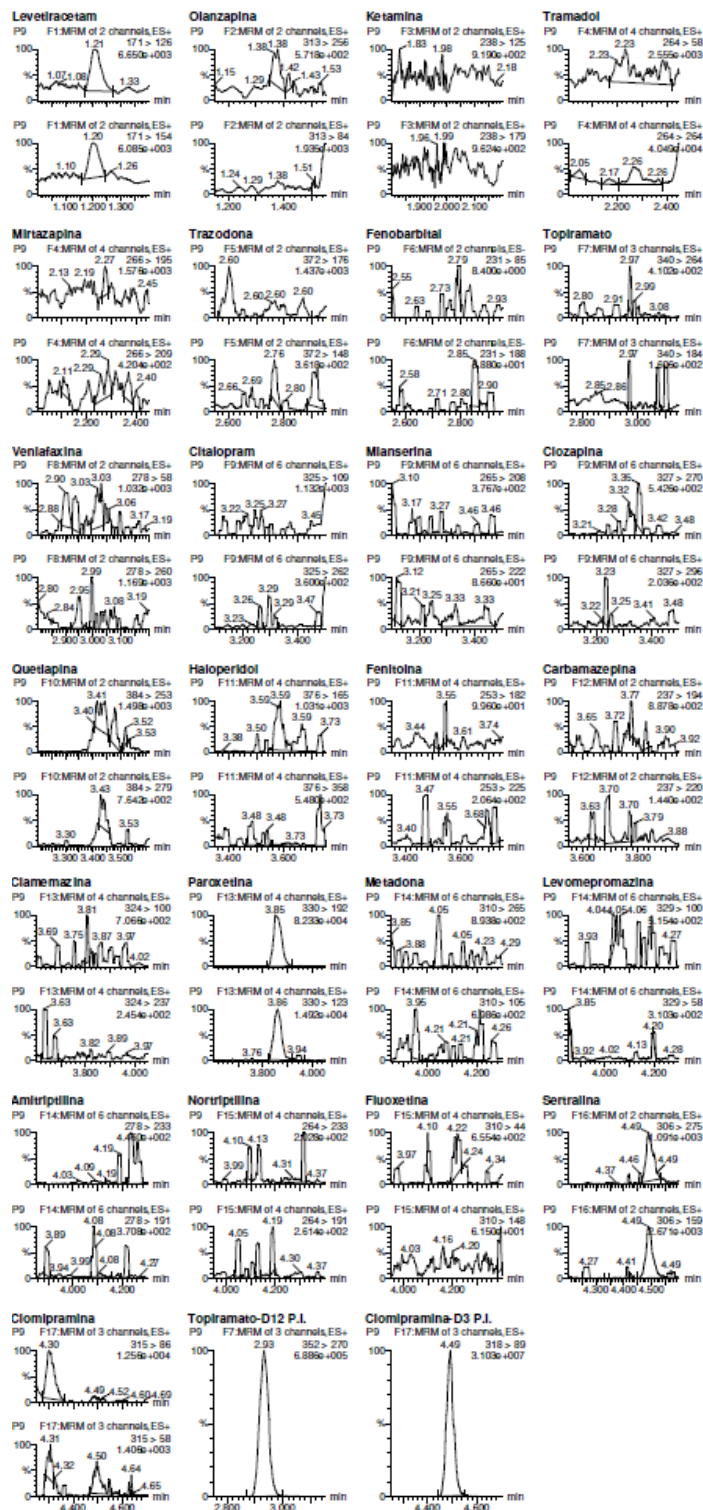


Figura C8. Cromatograma obtido no estudo da seletividade para a amostra branca *pool 9*.

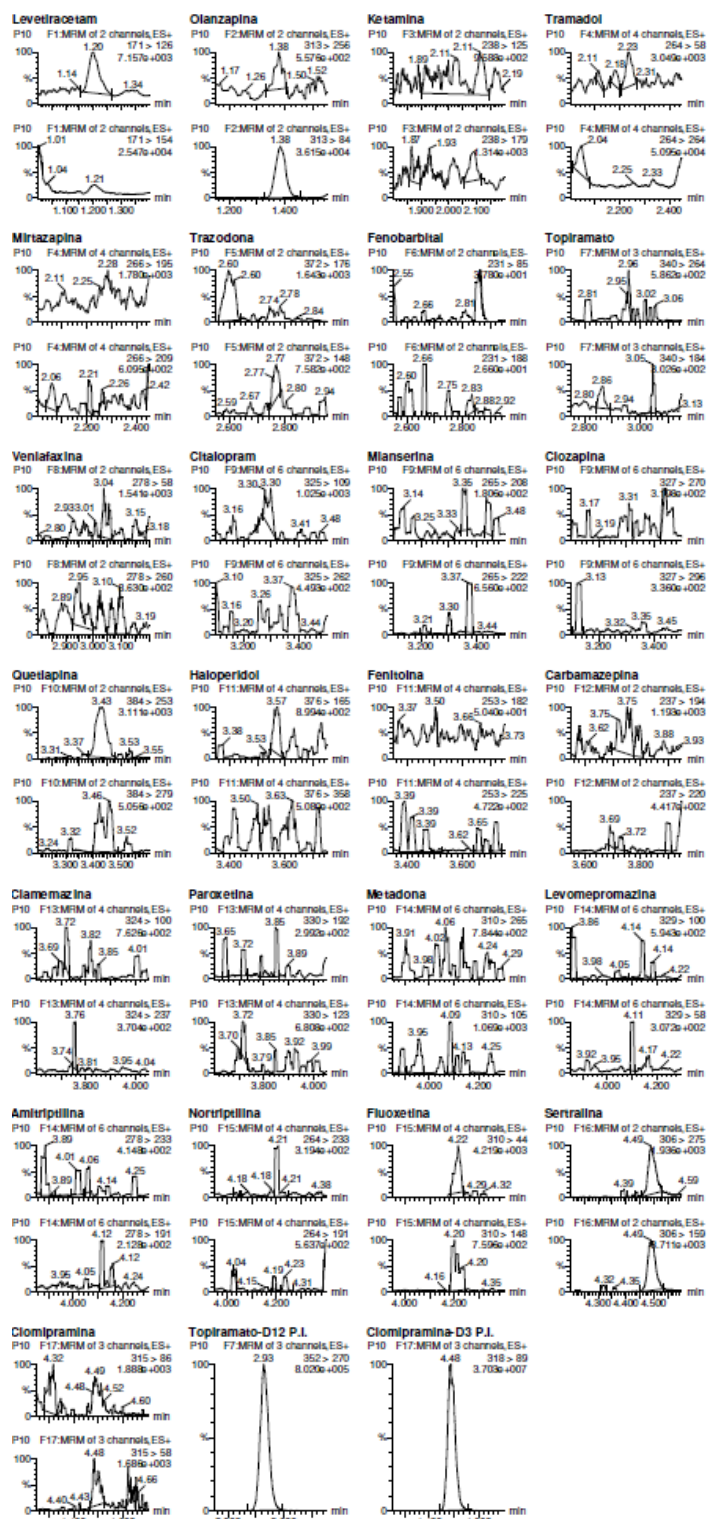


Figura C9. Cromatograma obtido no estudo da seletividade para a amostra branca *pool* 10.

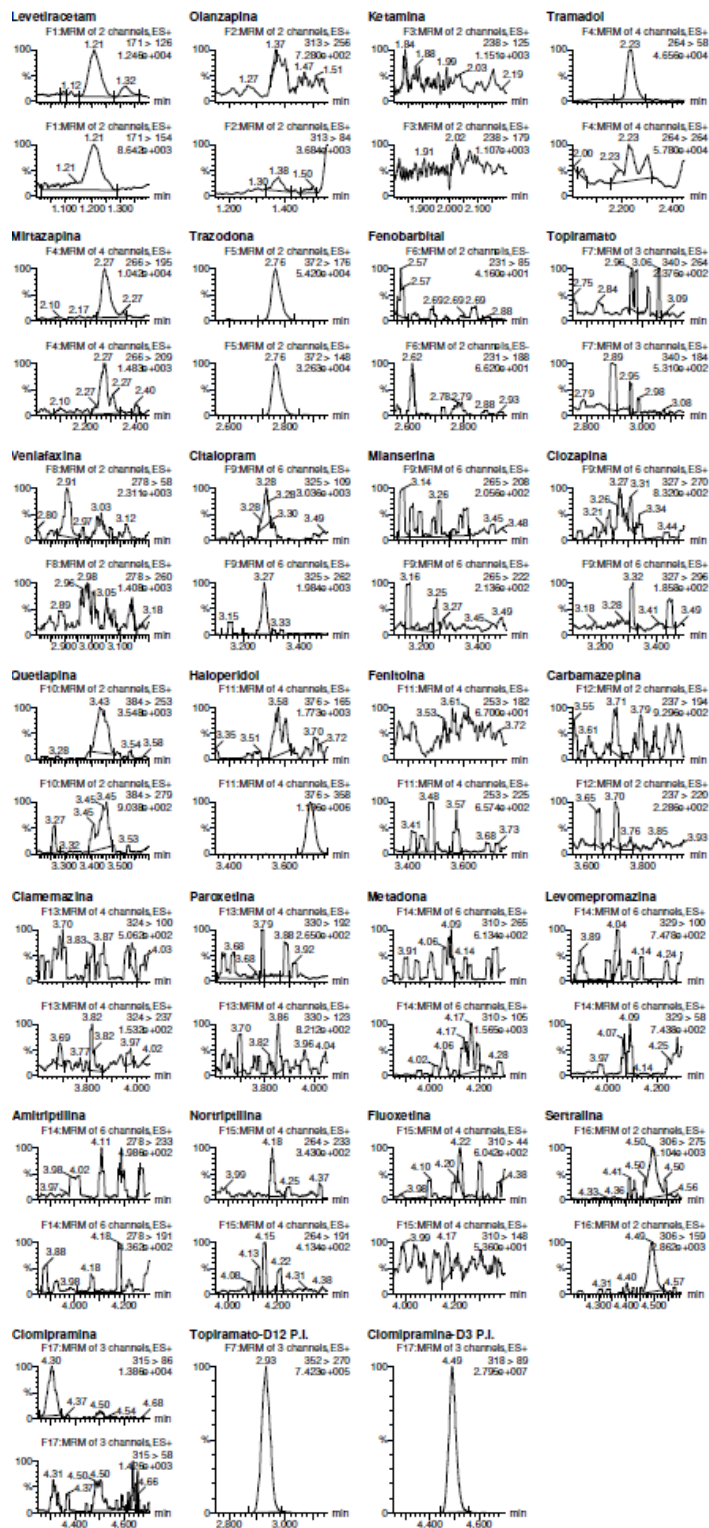


Figura C11. Cromatograma obtido no estudo da seletividade para a *pool 2* fortificada com benzodiazepinas a 100 ng/mL.

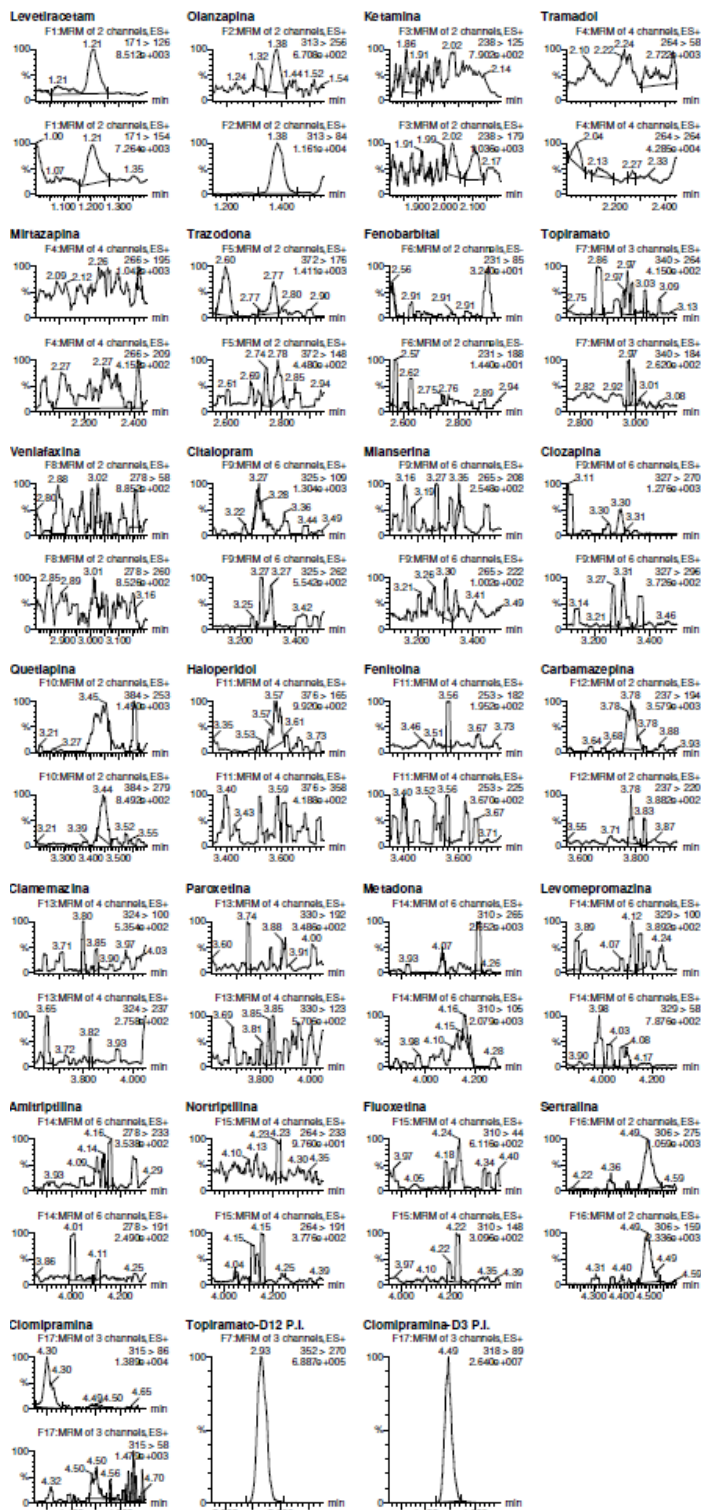


Figura C12. Cromatograma obtido no estudo da seletividade para a *pool 4* fortificada com benzodiazepinas a 100 ng/mL.

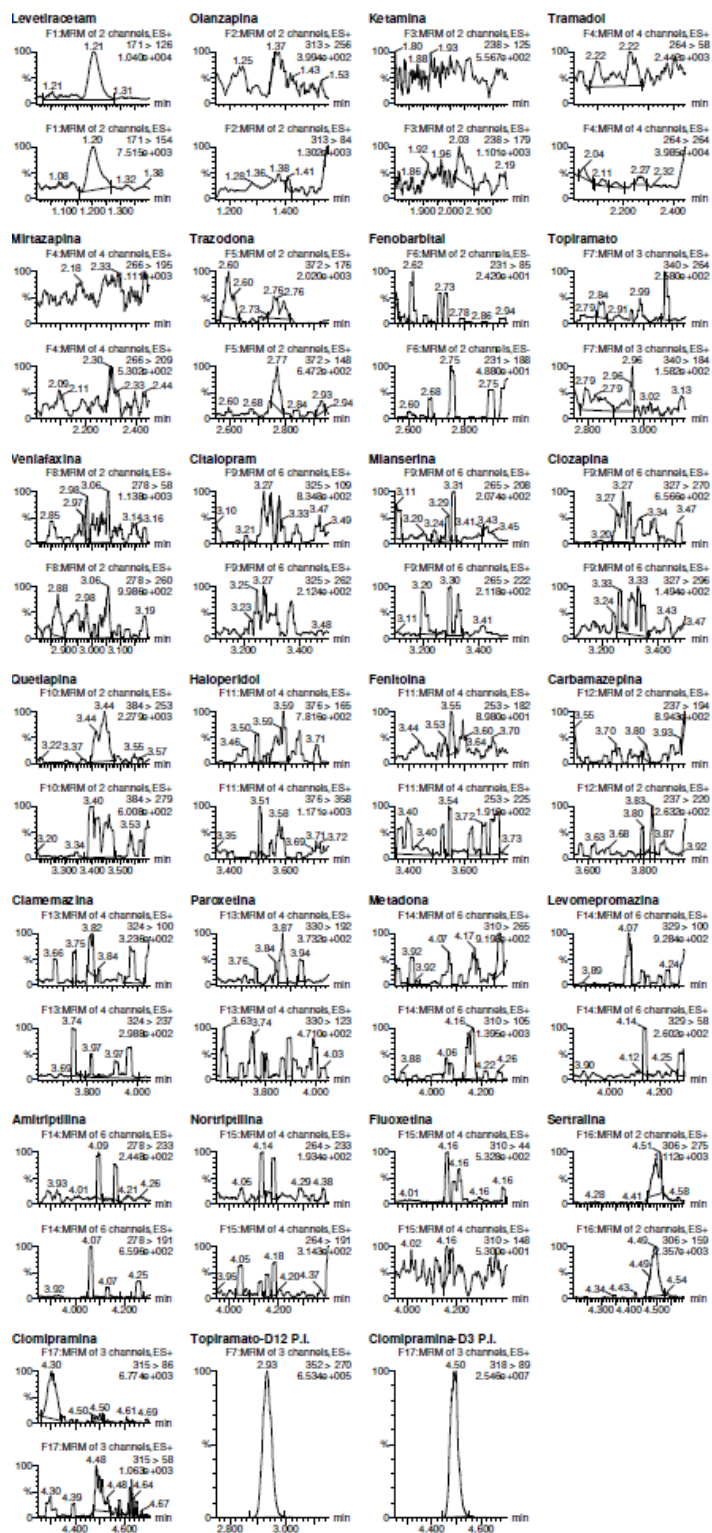


Figura C13. Cromatograma obtido no estudo da seletividade para a *pool 5* fortificada com benzodiazepinas a 100 ng/mL.

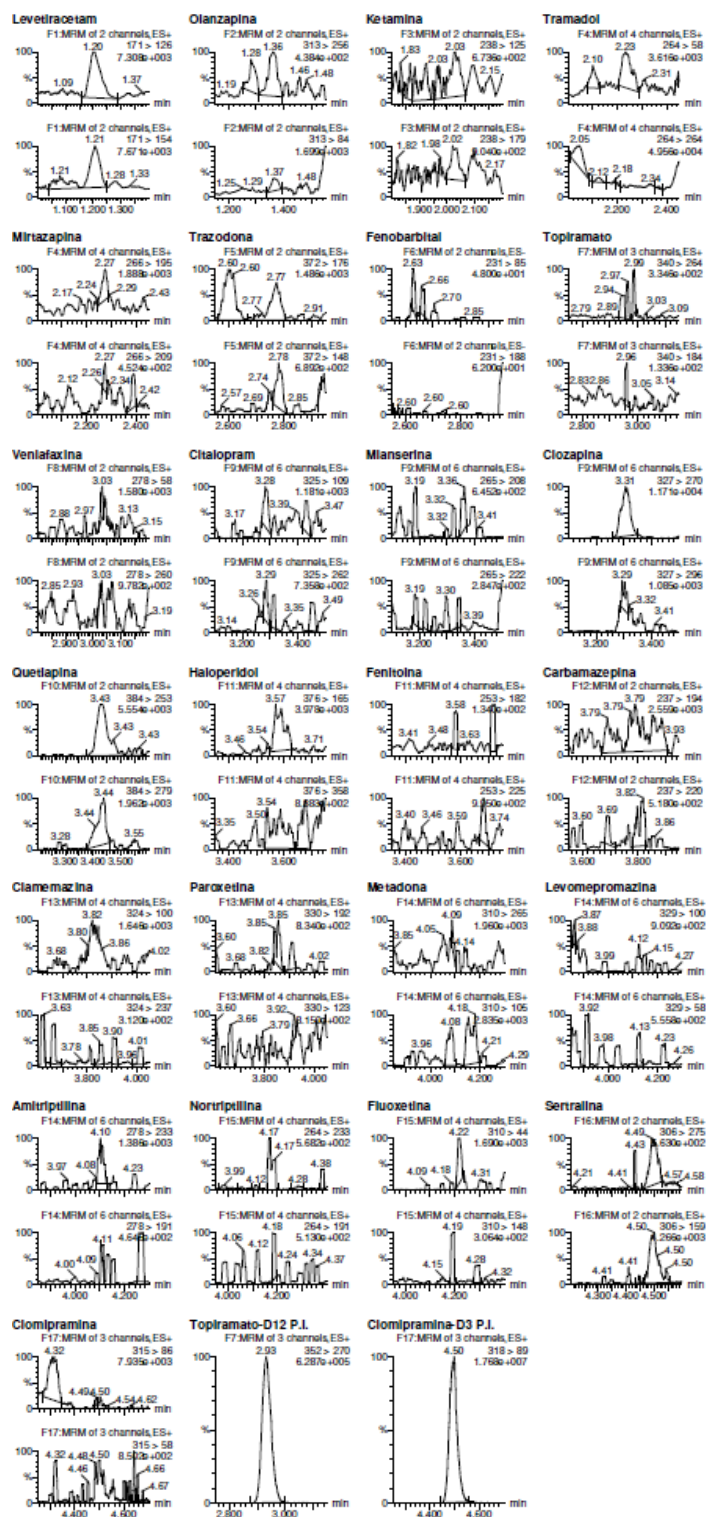


Figura C14. Cromatograma obtido no estudo da seletividade para a *pool 7* fortificada com benzodiazepinas a 100 ng/mL.

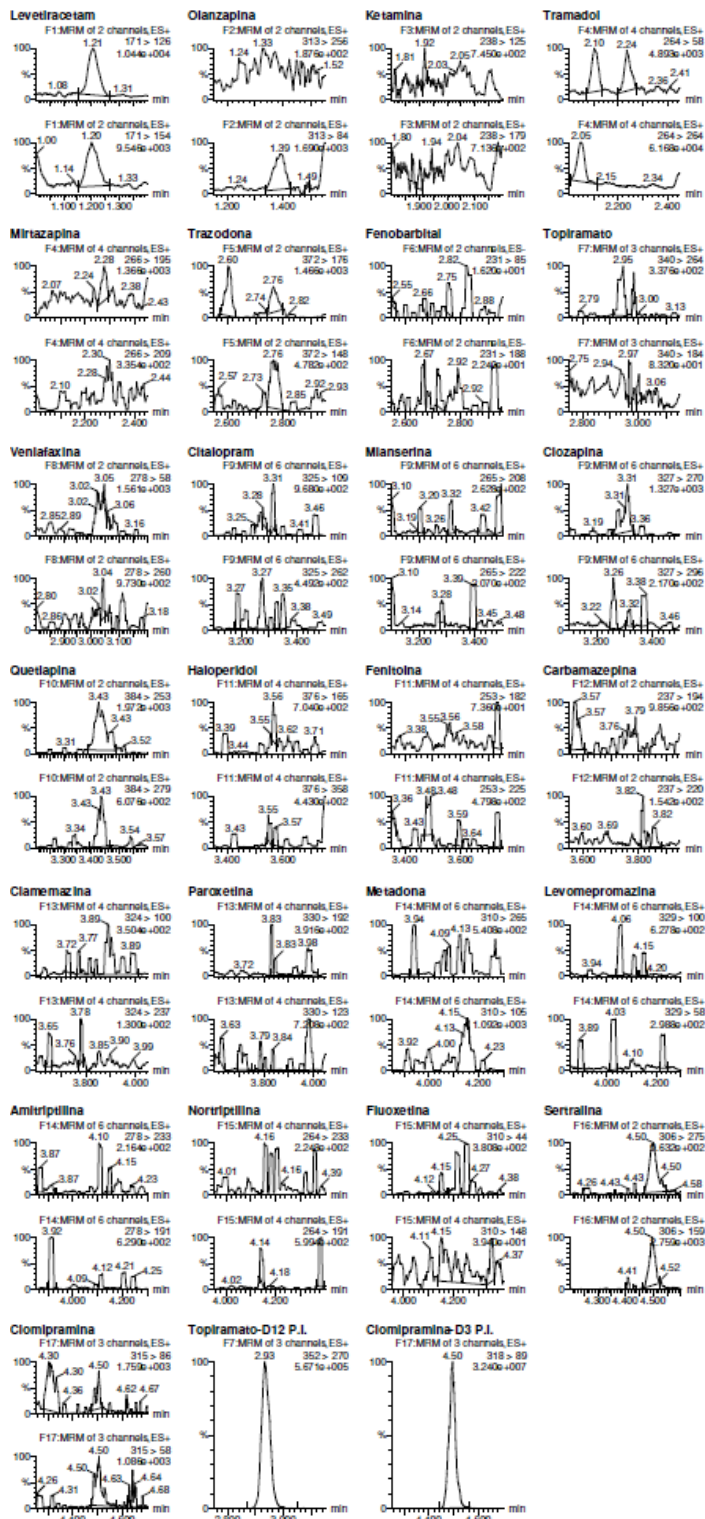


Figura C15. Cromatograma obtido no estudo da seletividade para a *pool 8* fortificada com benzodiazepinas a 100 ng/mL.

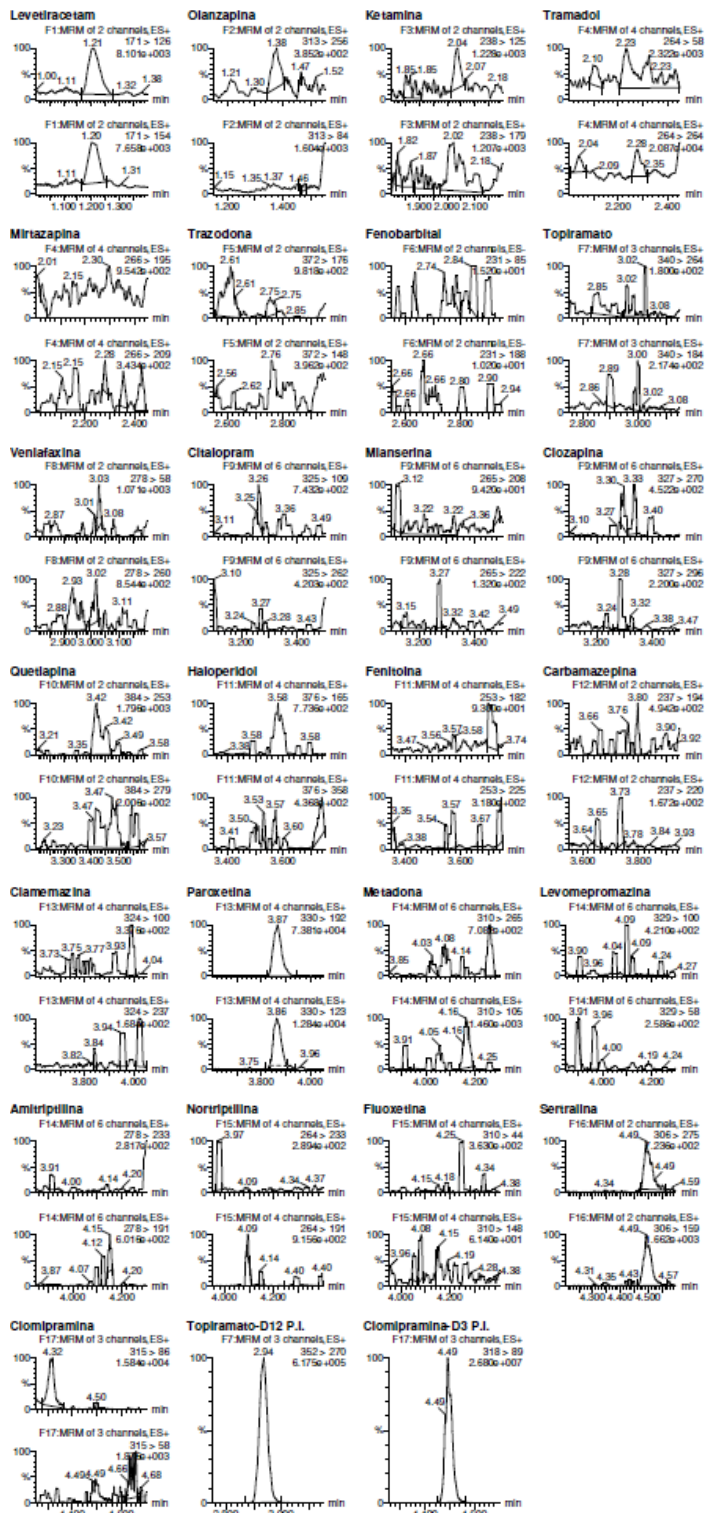


Figura C16. Cromatograma obtido no estudo da seletividade para a *pool 9* fortificada com benzodiazepinas a 100 ng/mL.

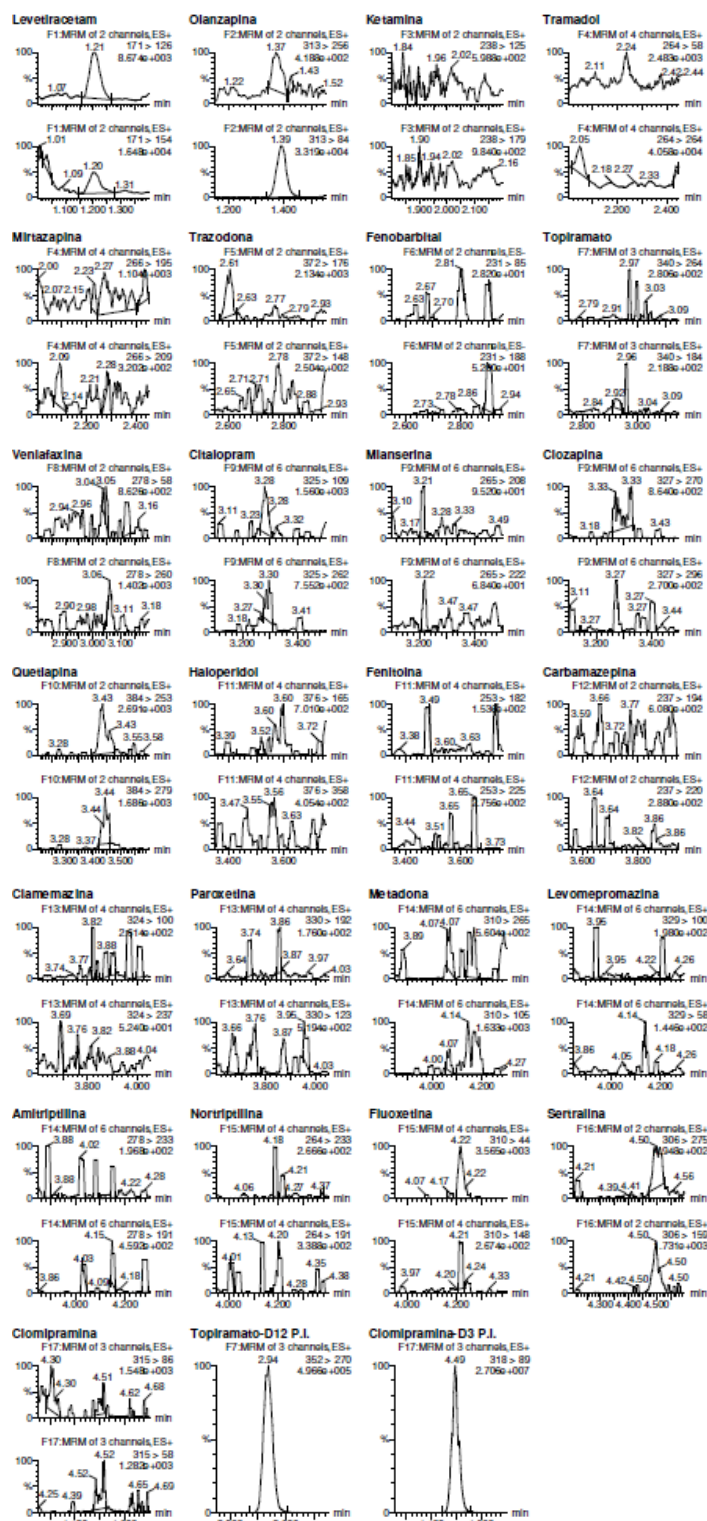


Figura C17. Cromatograma obtido no estudo da seletividade para a *pool* 10 fortificada com benzodiazepinas a 100 ng/mL.

Anexo D – Resultados obtidos para o estudo do limite de detecção.

Levetiracetam

Tabela D1. Áreas obtidas no estudo do limite de detecção do levetiracetam.

Concentração (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	A _{relativa}
0,5	1258,071	2101299	0,000598711
1	2500,686	1499547	0,001667628
2	4816,763	1544208	0,003119246
4	8691,52	1850680	0,004696392
6	12250,86	1220342	0,01003888
8	16205,37	1496268	0,010830522
10	21360,1	1649795	0,012947124
15	32609,56	1594750	0,020448074
20	43229,69	1590628	0,027177744
25	55407,07	1541899	0,035934312

s – Substância

PI – Padrão interno

Tabela D2. Estatística de regressão e coeficientes obtidos para o levetiracetam.

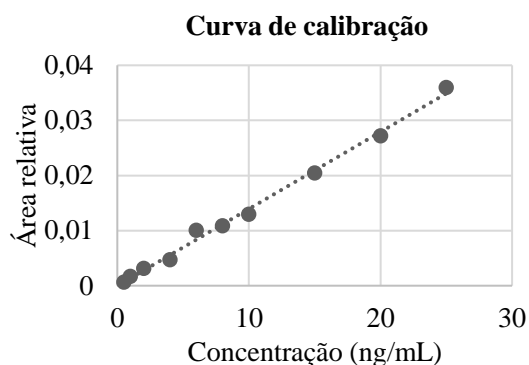


Figura D1. Curva de calibração do levetiracetam.

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,997288
Quadrado de R	0,994584
Erro-padrão	0,000918
Observações	10
Coeficientes	
Declive	0,001397
Ordenada na origem	-3,7E-05

Tabela D3. Resultado de residuais obtidos para o levetiracetam.

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,000662	-6,3E-05
2	0,00136	0,000307
3	0,002757	0,000362
4	0,005551	-0,00085
5	0,008345	0,001694
6	0,011139	-0,00031
7	0,013933	-0,00099
8	0,020918	-0,00047
9	0,027903	-0,00073
10	0,034888	0,001046



Figura D2. Gráfico do desenho de residuais do levetiracetam.

Olanzapina

Tabela D4. Áreas obtidas no estudo do limite de detecção da olanzapina.

Concentração (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	A _{relativa}
0,5	795,915	2101299	0,000378773
1	2060,895	1499547	0,001374345
2	4351,604	1544208	0,002818017
4	6862,1	1850680	0,00370788
6	13330,16	1220342	0,010923299
8	23048,03	1496268	0,015403674
10	23855,81	1649795	0,014459859
15	43171,47	1594750	0,027070994
20	56249,03	1590628	0,035362776
30	86889,34	1532595	0,056694268

s – Substância

PI – Padrão interno

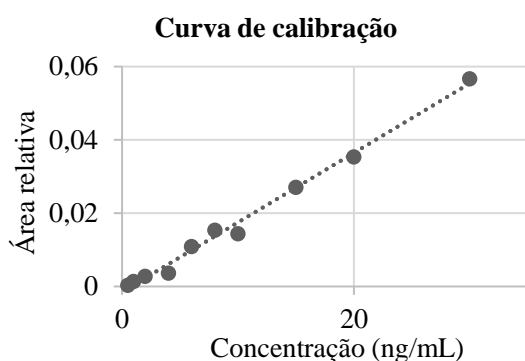


Figura D3. Curva de calibração da olanzapina.

Tabela D5. Estatística de regressão e coeficientes obtidos para a olanzapina.

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,995984
Quadrado de R	0,991984
Erro-padrão	0,001722
Observações	10
Coeficientes	
Declive	0,001897
Ordenada na origem	-0,00149

Tabela D6. Resultado de residuais obtidos para a olanzapina.

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,000662	-6,3E-05
2	0,00136	0,000307
3	0,002757	0,000362
4	0,005551	-0,00085
5	0,008345	0,001694
6	0,011139	-0,00031
7	0,013933	-0,00099
8	0,020918	-0,00047
9	0,027903	-0,00073
10	0,034888	0,001046

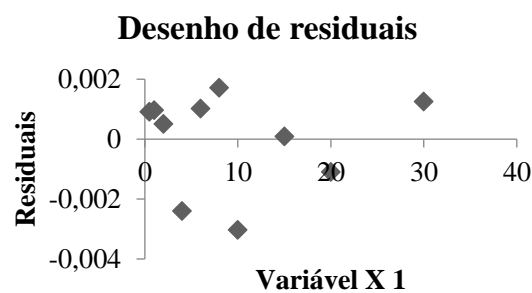


Figura D4. Gráfico do desenho de residuais da olanzapina.

Cetamina

Tabela D7. Áreas obtidas no estudo do limite de detecção da cetamina.

Concentração (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	A _{relativa}
0,5	1254,993	2101299	0,000597246
1	2415,576	1499547	0,001610871
2	5324,814	1544208	0,00344825
4	10528,02	1850680	0,005688727
6	14553,98	1220342	0,011926154
8	18276,95	1496268	0,012215022
10	25705,31	1649795	0,015580912
15	39536,29	1594750	0,024791532
20	48165,25	1590628	0,030280645
30	71584,13	1532595	0,046707799

s – Substância

PI – Padrão interno

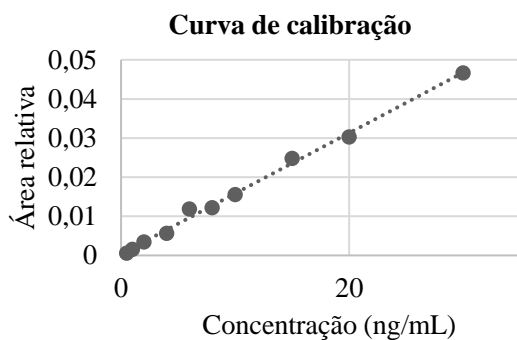


Figura D5. Curva de calibração da cetamina.

Tabela D8. Estatística de regressão e coeficientes obtidos para a cetamina.

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,997645
Quadrado de R	0,995296
Erro-padrão	0,001073
Observações	10
Coeficientes	
Declive	0,001546
Ordenada na origem	0,000362

Tabela D9. Resultado de residuais obtidos para a cetamina.

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,001135	-0,00054
2	0,001908	-0,0003
3	0,003454	-6,2E-06
4	0,006547	-0,00086
5	0,00964	0,002286
6	0,012733	-0,00052
7	0,015826	-0,00025
8	0,023558	0,001233
9	0,03129	-0,00101
10	0,046755	-4,7E-05

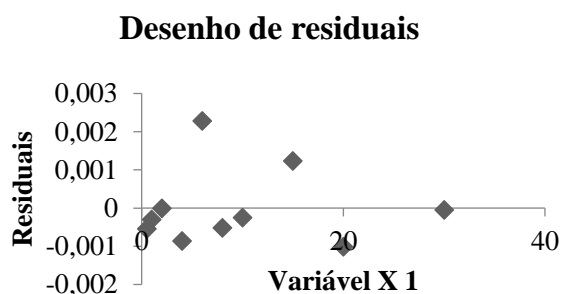


Figura D6. Gráfico do desenho de residuais da cetamina.

Tramadol

Tabela D10. Áreas obtidas no estudo do limite de detecção do tramadol.

Concentração (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	A _{relativa}
0,5	5898,067	2101299	0,002806867
1	12414,46	1499547	0,00827881
2	25969,06	1544208	0,01681708
4	48289,45	1850680	0,026092807
6	67854,36	1220342	0,055602757
8	90712,16	1496268	0,060625592
10	124086,2	1649795	0,075213098
15	189404,2	1594750	0,118767322
20	237710,4	1590628	0,149444361
25	314766,4	1541899	0,204142052

s – Substância

PI – Padrão interno

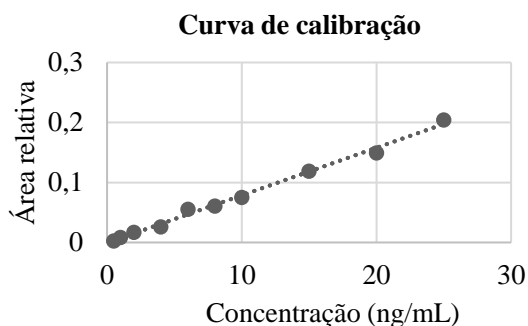


Figura D7. Curva de calibração do tramadol.

Tabela D11. Estatística de regressão e coeficientes obtidos para o tramadol.

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,997056
Quadrado de R	0,994121
Erro-padrão	0,005426
Observações	10
Coeficientes	
Declive	0,007925
Ordenada na origem	-0,00073

Tabela D12. Resultado de residuais obtidos para o tramadol.

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,003228	-0,00042
2	0,007191	0,001088
3	0,015116	0,001701
4	0,030966	-0,00487
5	0,046816	0,008787
6	0,062665	-0,00204
7	0,078515	-0,0033
8	0,11814	0,000627
9	0,157765	-0,00832
10	0,197389	0,006753

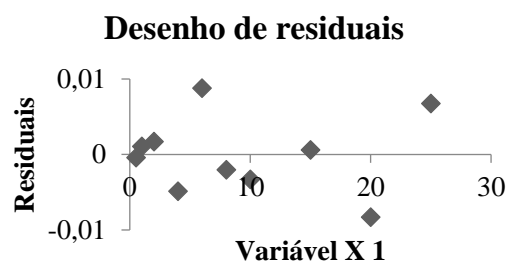


Figura D8. Gráfico do desenho de residuais do tramadol.

Mirtazapina

Tabela D13. Áreas obtidas no estudo do limite de detecção da mirtazapina.

Concentração (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	A _{relativa}
0,5	5140,491	2101299	0,00244634
1	10344,05	1499547	0,006898117
2	21687,43	1544208	0,014044376
4	42397,82	1850680	0,022909315
6	60531,26	1220342	0,049601899
8	78202,21	1496268	0,052264829
10	112449,9	1649795	0,068159893
15	159061,5	1594750	0,09974072
20	213049,7	1590628	0,133940581
25	279919,2	1541899	0,181541853

s – Substância

PI – Padrão interno

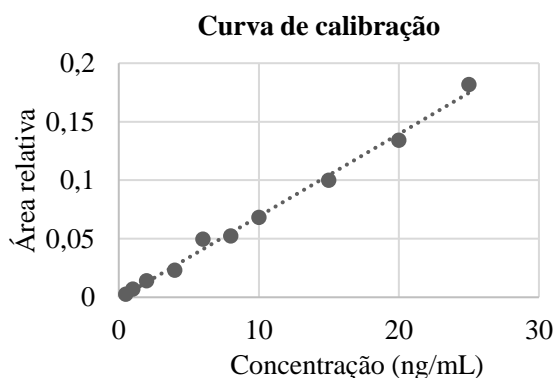


Figura D9. Curva de calibração da mirtazapina.

Tabela D14. Estatística de regressão e coeficientes obtidos para a mirtazapina.

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,996819
Quadrado de R	0,993648
Erro-padrão	0,005007
Observações	10
Coeficientes	
Declive	0,007034
Ordenada na origem	-0,00121

Tabela D15. Resultado de residuais obtidos para a mirtazapina.

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,002307	0,000139
2	0,005824	0,001074
3	0,012859	0,001185
4	0,026928	-0,00402
5	0,040996	0,008605
6	0,055065	-0,0028
7	0,069134	-0,00097
8	0,104306	-0,00457
9	0,139478	-0,00554
10	0,17465	0,006892

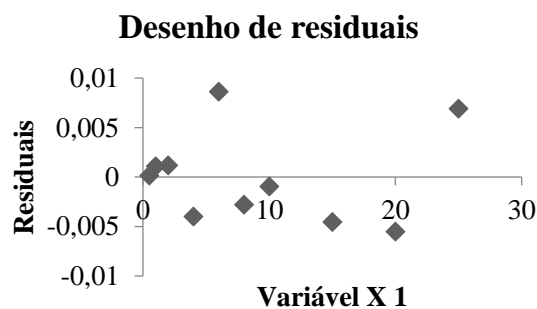


Figura D10. Gráfico do desenho de residuais da mirtazapina.

Trazodona

Tabela D16. Áreas obtidas no estudo do limite de detecção da trazodona.

Concentração (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	A _{relativa}
0,5	3163,752	2101299	0,001505617
1	5281,692	1499547	0,003522192
2	10532,11	1544208	0,006820395
4	21430,22	1850680	0,011579641
6	31988,41	1220342	0,02621267
8	42263,86	1496268	0,028246175
10	57585,11	1649795	0,034904402
15	89683,38	1594750	0,05623664
20	110838,9	1590628	0,069682451
25	143812,3	1541899	0,093269631

s – Substância

PI – Padrão interno

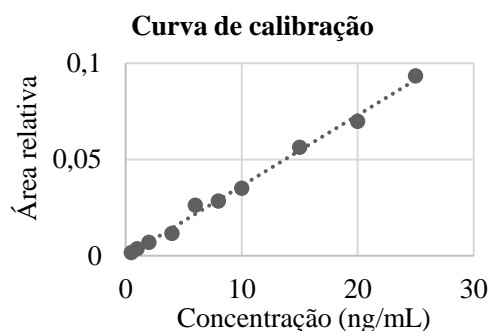


Figura D11. Curva de calibração da trazodona.

Tabela D17. Estatística de regressão e coeficientes obtidos para a trazodona.

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,997196235
Quadrado de R	0,994400332
Erro-padrão	0,002452771
Observações	10
Coeficientes	
Declive	0,00367154
Ordenada na origem	-0,000396606

Tabela D18. Resultado de residuais obtidos para a trazodona.

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,001439164	6,64532E-05
2	0,003274934	0,000247258
3	0,006946473	-0,000126078
4	0,014289553	-0,002709911
5	0,021632632	0,004580038
6	0,028975711	-0,000729536
7	0,03631879	-0,001414388
8	0,054676488	0,001560152
9	0,073034186	-0,003351735
10	0,091391884	0,001877747

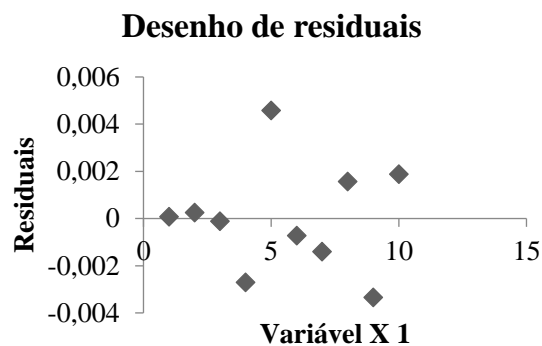


Figura D12. Gráfico do desenho de residuais da trazodona.

Fenobarbital

Tabela D19. Áreas obtidas no estudo do limite de detecção do fenobarbital.

Concentração (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	A _{relativa}
80	112,004	365,354	0,306563
100	155,627	314,02	0,495596
120	189,986	348,225	0,545584
150	207,54	336,099	0,617497
200	302,784	373,811	0,809992
250	373,809	381,56	0,979686
300	472,906	423,215	1,117413
350	514,301	392,535	1,310204
450	700,744	385,595	1,817306
500	730,632	366,899	1,991371

s – Substância

PI – Padrão interno

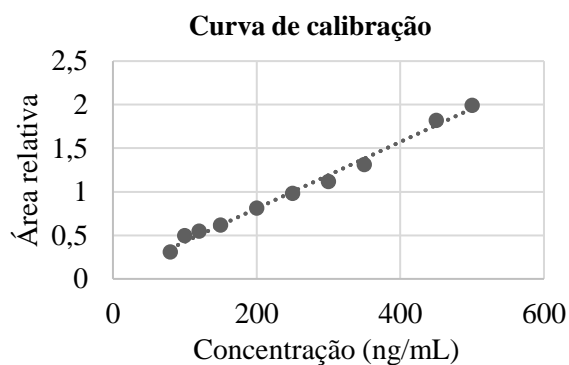


Figura D13. Curva de calibração do fenobarbital.

Tabela D20. Estatística de regressão e coeficientes obtidos para o fenobarbital.

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,995909
Quadrado de R	0,991834
Erro-padrão	0,054271
Observações	10
Coeficientes	
Declive	0,003823
Ordenada na origem	0,043344

Tabela D21. Resultado de residuais obtidos para o fenobarbital.

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,349193	-0,04263
2	0,425655	0,069941
3	0,502117	0,043467
4	0,61681	0,000686
5	0,807966	0,002026
6	0,999121	-0,01944
7	1,190277	-0,07286
8	1,381432	-0,07123
9	1,763743	0,053563
10	1,954898	0,036473

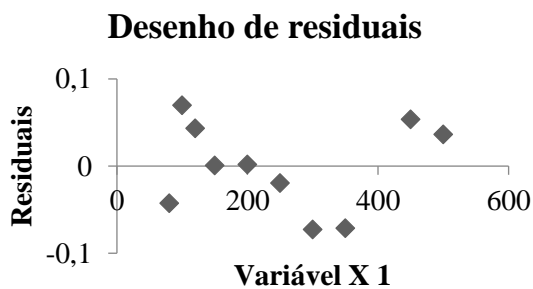


Figura D14. Gráfico do desenho de residuais do fenobarbital.

Topiramato

Tabela D22. Áreas obtidas no estudo do limite de detecção do topiramato.

Concentração (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	A _{relativa}
0,5	72,943	51810	0,001407894
1	99,099	49654,12	0,001995786
2	291,177	45111,93	0,006454546
4	554,38	53822,85	0,010300086
6	731,823	46331,96	0,01579521
8	847,362	49432,81	0,017141692
10	1273,697	47161,43	0,027007177
15	2060,627	49472,72	0,041651787
20	2353,12	43812,56	0,053708806
25	3409,549	50588,57	0,067397616

s – Substância

PI – Padrão interno

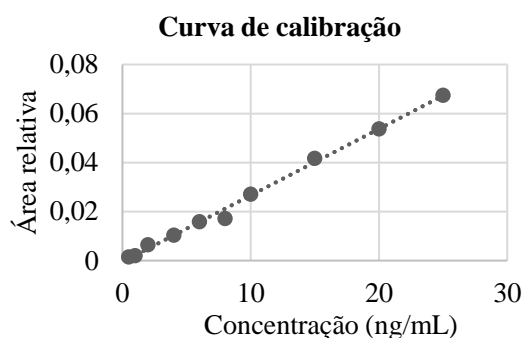


Figura D15. Curva de calibração do topiramato.

Tabela D23. Estatística de regressão e coeficientes obtidos para o topiramato.

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,997711
Quadrado de R	0,995427
Erro-padrão	0,001637
Observações	10
Coeficientes	
Declive	0,002714
Ordenada na origem	-0,00054

Tabela D24. Resultado de residuais obtidos para o topiramato.

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,000813	0,000595
2	0,00217	-0,00017
3	0,004884	0,001571
4	0,010311	-1,1E-05
5	0,015738	5,71E-05
6	0,021165	-0,00402
7	0,026593	0,000415
8	0,040161	0,001491
9	0,053729	-2E-05
10	0,067297	0,000101

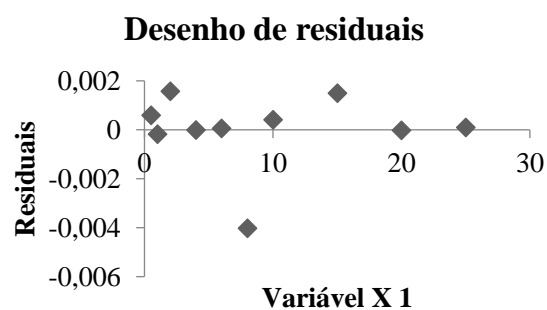


Figura D16. Gráfico do desenho de residuais do topiramato.

Venlafaxina

Tabela D25. Áreas obtidas no estudo do limite de detecção da venlafaxina.

Concentração (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	A _{relativa}
0,5	5758,306	2101299	0,002740355
1	9823,366	1499547	0,00655089
2	19776,98	1544208	0,012807199
4	42021,7	1850680	0,022706083
6	58497,29	1220342	0,047935171
8	73833,75	1496268	0,049345259
10	104080,8	1649795	0,063087128
15	154773,4	1594750	0,097051848
20	200357	1590628	0,125960902
25	266899,4	1541899	0,173097902

s – Substância

PI – Padrão interno

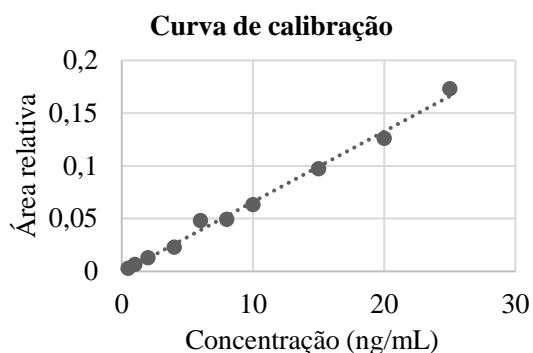


Figura D17. Curva de calibração da venlafaxina.

Tabela D26. Estatística de regressão e coeficientes obtidos para a venlafaxina.

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,996409
Quadrado de R	0,99283
Erro-padrão	0,005057
Observações	10
Coeficientes	
Declive	0,006685
Ordenada na origem	-0,00104

Tabela D27. Resultado de residuais obtidos para a venlafaxina.

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,002305	0,000435
2	0,005647	0,000903
3	0,012332	0,000475
4	0,025702	-0,003
5	0,039071	0,008864
6	0,052441	-0,0031
7	0,06581	-0,00272
8	0,099234	-0,00218
9	0,132658	-0,0067
10	0,166082	0,007016

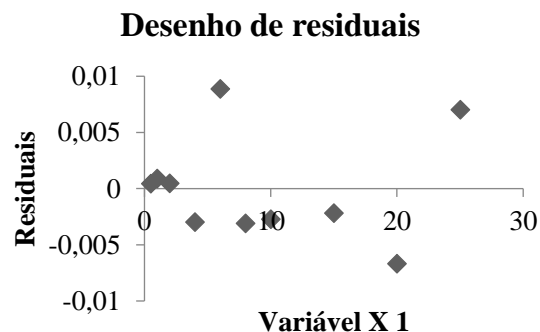


Figura D18. Gráfico do desenho de residuais da venlafaxina.

Citalopram

Tabela D28. Áreas obtidas no estudo do limite de detecção do citalopram.

Concentração (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	A _{relativa}
0,5	3058,065	2101299	0,001455321
1	4986,651	1499547	0,003325439
2	10796,82	1544208	0,006991819
4	21910,89	1850680	0,011839367
6	31412,98	1220342	0,025741138
8	41145,43	1496268	0,027498694
10	56672,9	1649795	0,034351479
15	85511,38	1594750	0,053620556
20	112901	1590628	0,070978853
30	159710,5	1541899	0,10449923

s – Substância

PI – Padrão interno

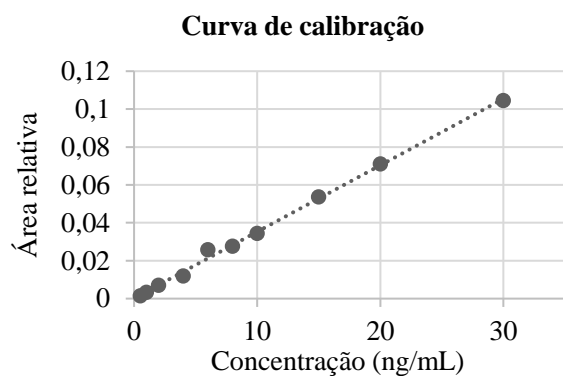


Figura D19. Curva de calibração do citalopram.

Tabela D29. Estatística de regressão e coeficientes obtidos para o citalopram.

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,998521
Quadrado de R	0,997045
Erro-padrão	0,001927
Observações	10
Coeficientes	
Declive	0,003507
Ordenada na origem	0,000188

Tabela D30. Resultado de residuais obtidos para o citalopram.

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,001941	-0,00049
2	0,003695	-0,00037
3	0,007202	-0,00021
4	0,014216	-0,00238
5	0,02123	0,004512
6	0,028244	-0,00074
7	0,035258	-0,00091
8	0,052793	0,000828
9	0,070328	0,000651
10	0,105398	-0,0009

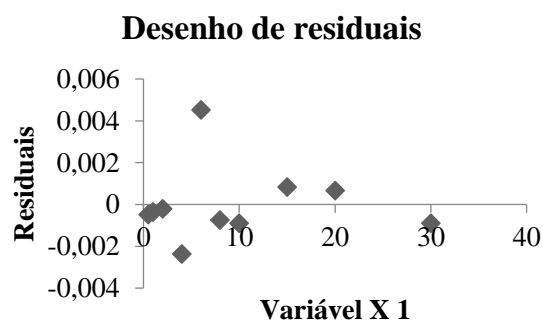


Figura D20. Gráfico do desenho de residuais do citalopram.

Mianserina

Tabela D31. Áreas obtidas no estudo do limite de detecção da mianserina.

Concentração (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	A _{relativa}
0,5	452,59	2101299	0,000215386
1	718,85	1499547	0,000479378
2	1637,601	1544208	0,00106048
4	3200,823	1850680	0,001729539
6	3709,948	1220342	0,00304009
8	5444,435	1496268	0,003638675
10	8130,529	1649795	0,004928205
15	12664,87	1594750	0,007941602
20	17279,87	1590628	0,010863548
25	22200,62	1541899	0,014398231

s – Substância

PI – Padrão interno

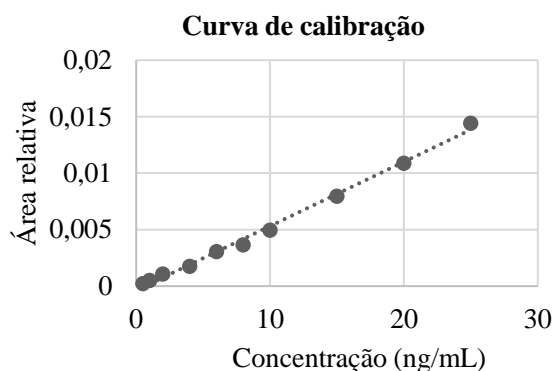


Figura D21. Curva de calibração da mianserina.

Tabela D32. Estatística de regressão e coeficientes obtidos para a mianserina.

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,997329
Quadrado de R	0,994666
Erro-padrão	0,000371
Observações	10
Coeficientes	
Declive	0,000569
Ordenada na origem	-0,00038

Tabela D33. Resultado de residuais obtidos para a mianserina.

Observação	Y previsto	Residuais
1	-9,2E-05	0,000307
2	0,000193	0,000287
3	0,000762	0,000299
4	0,0019	-0,00017
5	0,003037	2,67E-06
6	0,004175	-0,00054
7	0,005313	-0,00038
8	0,008158	-0,00022
9	0,011002	-0,00014
10	0,013847	0,000551

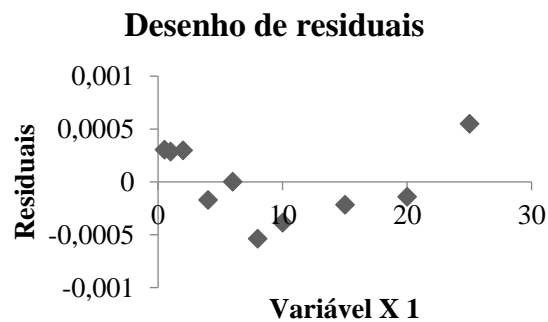


Figura D22. Gráfico do desenho de residuais do mianserina.

Clozapina

Tabela D34. Áreas obtidas no estudo do limite de detecção da clozapina.

Concentração (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	A _{relativa}
0,5	1940,725	2101299	0,000923583
1	2894,793	1499547	0,001930445
2	6653,194	1544208	0,004308484
4	13022,12	1850680	0,007036395
6	17959,94	1220342	0,014717144
8	23966,1	1496268	0,016017248
10	37116,57	1649795	0,022497687
15	53288,74	1594750	0,03341511
20	71947,82	1590628	0,045232329
25	92873,09	1541899	0,060232939

s – Substância

PI – Padrão interno

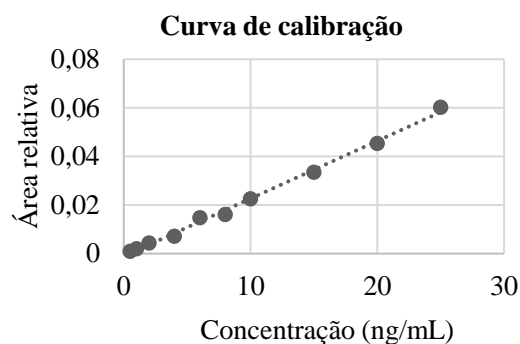


Figura D23. Curva de calibração da clozapina.

Tabela D35. Estatística de regressão e coeficientes obtidos para a clozapina.

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,997785
Quadrado de R	0,995574
Erro-padrão	0,001409
Observações	10
Coeficientes	
Declive	0,002373
Ordenada na origem	-0,00108

Tabela D36. Resultado de residuais obtidos para a clozapina.

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,000105	0,000819
2	0,001291	0,000639
3	0,003664	0,000644
4	0,00841	-0,00137
5	0,013156	0,001561
6	0,017902	-0,00188
7	0,022648	-0,00015
8	0,034513	-0,0011
9	0,046378	-0,00115
10	0,058243	0,00199

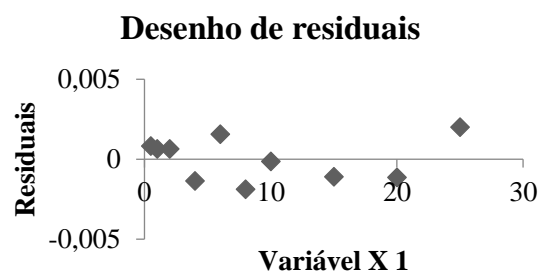


Figura D24. Gráfico do desenho de residuais da clozapina.

Quetiapina

Tabela D37. Áreas obtidas no estudo do limite de detecção da quetiapina.

Concentração (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	A _{relativa}
0,5	3054,408	2101299	0,001453581
1	4975,127	1499547	0,003317754
2	10089,9	1544208	0,006534029
4	20409,65	1850680	0,011028186
6	27924,82	1220342	0,022882791
8	37763,81	1496268	0,025238663
10	57595,95	1649795	0,034910973
15	83686,16	1594750	0,052476039
20	112832,6	1590628	0,070935862
25	142609,2	1541899	0,092489354

s – Substância

PI – Padrão interno

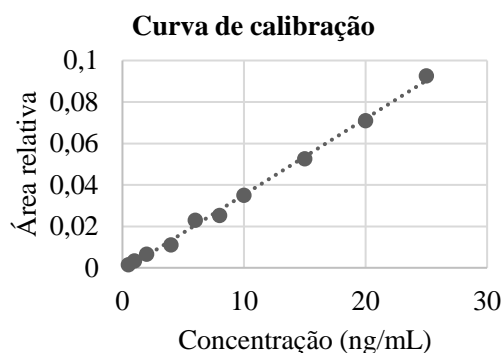


Figura D25. Curva de calibração da quetiapina.

Tabela D38. Estatística de regressão e coeficientes obtidos para a quetiapina.

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,998407
Quadrado de R	0,996817
Erro-padrão	0,001847
Observações	10
Coeficientes	
Declive	0,003672
Ordenada na origem	-0,00147

Tabela D39. Resultado de residuais obtidos para a quetiapina.

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,000365	0,001088
2	0,002201	0,001117
3	0,005873	0,000661
4	0,013217	-0,00219
5	0,02056	0,002322
6	0,027904	-0,00267
7	0,035248	-0,00034
8	0,053607	-0,00113
9	0,071966	-0,00103
10	0,090325	0,002164



Figura D26. Gráfico do desenho de residuais da quetiapina.

Haloperidol

Tabela D40. Áreas obtidas no estudo do limite de detecção do haloperidol.

Concentração (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	A _{relativa}
0,5	4817,746	2101299	0,002292747
1	6622,48	1499547	0,004416321
2	15410,9	1544208	0,009979811
4	29966,23	1850680	0,016192007
6	38443,13	1220342	0,031501937
8	51771,07	1496268	0,03460012
10	77565,18	1649795	0,047015038
15	115212,8	1594750	0,072245082
20	154814,8	1590628	0,097329359
25	201096,9	1541899	0,130421603

s – Substância

PI – Padrão interno

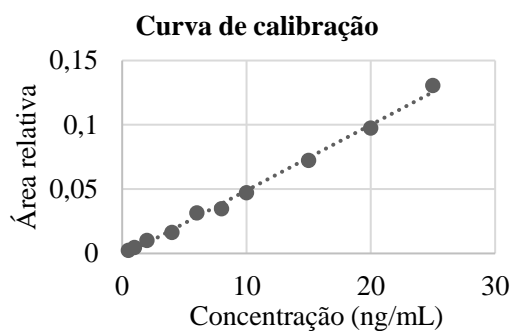


Figura D27. Curva de calibração do haloperidol.

Tabela D41. Estatística de regressão e coeficientes obtidos para o haloperidol.

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,997611
Quadrado de R	0,995228
Erro-padrão	0,003146
Observações	10
Coeficientes	
Declive	0,005104
Ordenada na origem	-0,0021

Tabela D42. Resultado de residuais obtidos para o haloperidol.

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,000448	0,001845
2	0,003	0,001416
3	0,008104	0,001876
4	0,018313	-0,00212
5	0,028521	0,002981
6	0,03873	-0,00413
7	0,048938	-0,00192
8	0,074459	-0,00221
9	0,09998	-0,00265
10	0,125501	0,00492

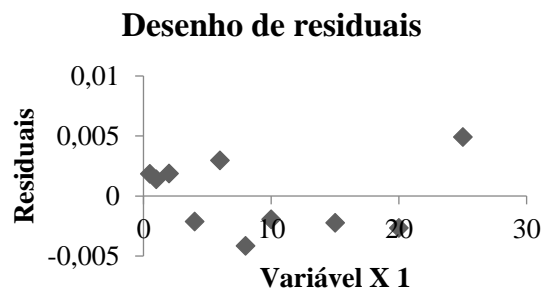


Figura D28. Gráfico do desenho de residuais do haloperidol.

Fenitoína

Tabela D43. Áreas obtidas no estudo do limite de detecção da fenitoína.

Concentração (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	A _{relativa}
6	385,617	46331,96	0,008322916
8	480,884	49432,81	0,009728033
10	650,995	47161,43	0,013803548
15	1036,129	49472,72	0,020943443
20	1130,725	43812,56	0,025808241
25	1739,8	50588,57	0,034391168
30	1798,196	47851,09	0,037579001
35	2386,985	49195,53	0,048520363
50	3290,622	47940,76	0,06863934
70	4347,998	45799,7	0,094935086

s – Substância

PI – Padrão interno

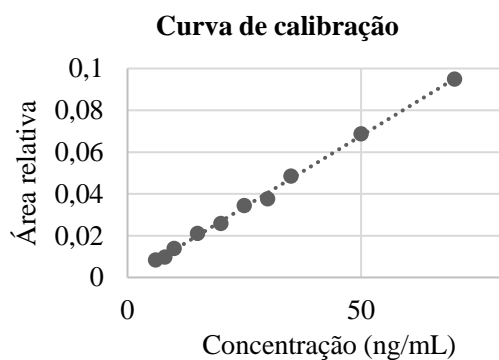


Figura D29. Curva de calibração da fenitoína.

Tabela D44. Estatística de regressão e coeficientes obtidos para a fenitoína.

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,998969
Quadrado de R	0,997938
Erro-padrão	0,001341
Observações	10
Coeficientes	
Declive	0,001365
Ordenada na origem	-0,00045

Tabela D45. Resultado de residuais obtidos para a fenitoína.

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,007742	0,000581
2	0,010471	-0,00074
3	0,013201	0,000602
4	0,020025	0,000918
5	0,02685	-0,00104
6	0,033674	0,000717
7	0,040498	-0,00292
8	0,047322	0,001198
9	0,027903	-0,00073
10	0,034888	0,001046

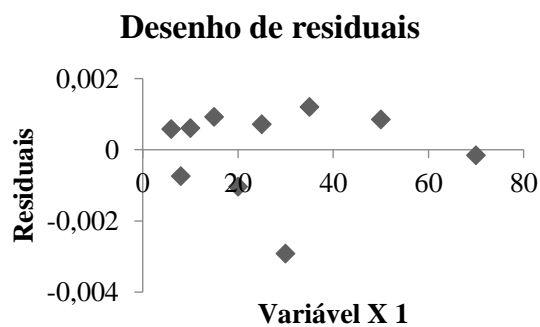


Figura D30. Gráfico do desenho de residuais da fenitoína.

Carbamazepina

Tabela D46. Áreas obtidas no estudo do limite de detecção da carbamazepina.

Concentração (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	A _{relativa}
0,5	3530,827	51810	0,068149522
1	5201,682	49654,12	0,104758314
2	10523,68	45111,93	0,233279222
4	21563,37	53822,85	0,400635979
6	29983,28	46331,96	0,647140396
8	38884,07	49432,81	0,786604419
10	54890,32	47161,43	1,163881601
15	86797,75	49472,72	1,754456977
20	111864,6	43812,56	2,55325429
25	148879,7	50588,57	2,942951105

s – Substância

PI – Padrão interno

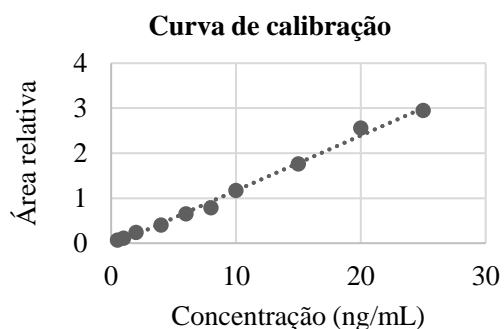


Figura D31. Curva de calibração da carbamazepina.

Tabela D47. Estatística de regressão e coeficientes obtidos para a carbamazepina.

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,996926
Quadrado de R	0,993861
Erro-padrão	0,085504
Observações	10
Coeficientes	
Declive	0,122209
Ordenada na origem	-0,05271

Tabela D48. Resultado de residuais obtidos para a carbamazepina.

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,008399	0,05975
2	0,069504	0,035255
3	0,191713	0,041566
4	0,436132	-0,0355
5	0,680551	-0,03341
6	0,92497	-0,13837
7	1,169389	-0,00551
8	1,780437	-0,02598
9	2,391484	0,16177
10	3,002532	-0,05958

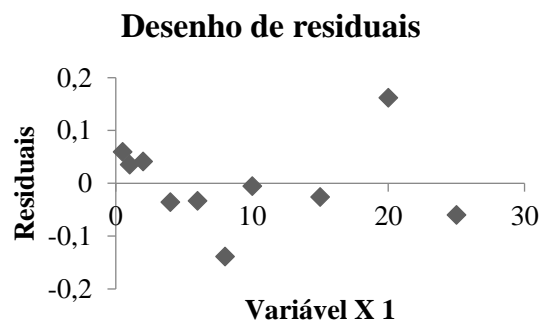


Figura D32. Gráfico do desenho de residuais da carbamazepina.

Ciamemazina

Tabela D49. Áreas obtidas no estudo do limite de detecção da ciamemazina.

Concentração (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	A _{relativa}
0,5	3235,519	2101299	0,001539771
1	4524,366	1499547	0,003017155
2	9204,435	1544208	0,00596062
4	18648,4	1850680	0,010076509
6	23656,09	1220342	0,019384813
8	32308,61	1496268	0,021592793
10	50599,92	1649795	0,030670428
15	72994,29	1594750	0,045771622
20	93894,41	1590628	0,059029766
25	121720,6	1541899	0,07894205

s – Substância

PI – Padrão interno

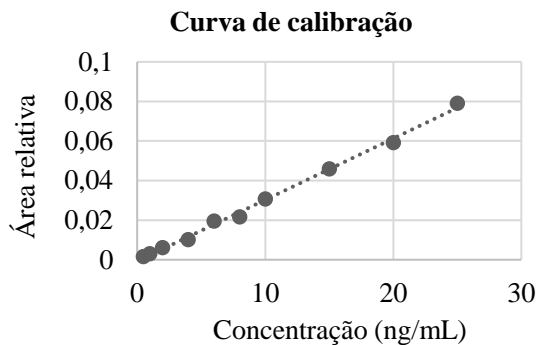


Figura D33. Curva de calibração da ciamemazina.

Tabela D50. Estatística de regressão e coeficientes obtidos para a ciamemazina.

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,998201
Quadrado de R	0,996404
Erro-padrão	0,001659
Observações	10
Coeficientes	
Declive	0,003103
Ordenada na origem	-0,00079

Tabela D51. Resultado de residuais obtidos para a ciamemazina.

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,00076	0,00078
2	0,002311	0,000706
3	0,005414	0,000547
4	0,011619	-0,00154
5	0,017825	0,00156
6	0,02403	-0,00244
7	0,030236	0,000435
8	0,04575	2,2E-05
9	0,061263	-0,00223
10	0,076777	0,002165

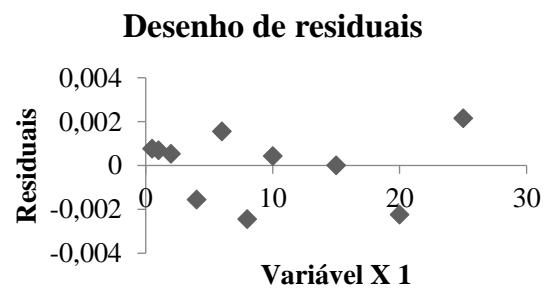


Figura D34. Gráfico do desenho de residuais da ciamemazina.

Paroxetina

Tabela D52. Áreas obtidas no estudo do limite de detecção da paroxetina.

Concentração (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	A _{relativa}
0,5	455,947	2101299	0,000216983
1	653,544	1499547	0,000435828
2	1324,774	1544208	0,000857899
4	2873,14	1850680	0,001552478
6	2878,933	1220342	0,002359121
8	4701,908	1496268	0,003142423
10	7102,875	1649795	0,004305307
15	10055,34	1594750	0,006305278
20	13900,72	1590628	0,008739136
25	16877,34	1541899	0,010945819

s – Substância

PI – Padrão interno

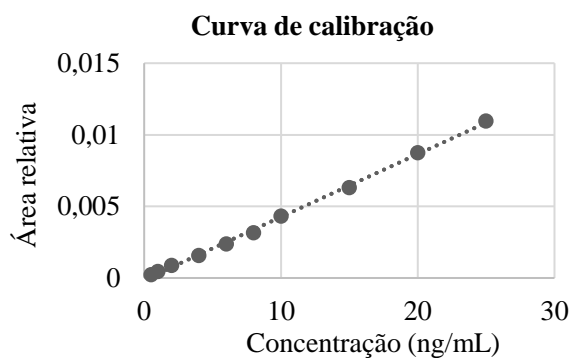


Figura D35. Curva de calibração da paroxetina.

Tabela D53. Estatística de regressão e coeficientes obtidos para a paroxetina.

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,999302
Quadrado de R	0,998604
Erro-padrão	0,000146
Observações	10
Coeficientes	
Declive	0,000439
Ordenada na origem	-0,00013

Tabela D54. Resultado de residuais obtidos para a paroxetina.

Observação	Y previsto	Residuais
1	8,98E-05	0,000127
2	0,000309	0,000127
3	0,000748	0,00011
4	0,001626	-7,3E-05
5	0,002504	-0,00014
6	0,003381	-0,00024
7	0,004259	4,62E-05
8	0,006453	-0,00015
9	0,008648	9,14E-05
10	0,010842	0,000104

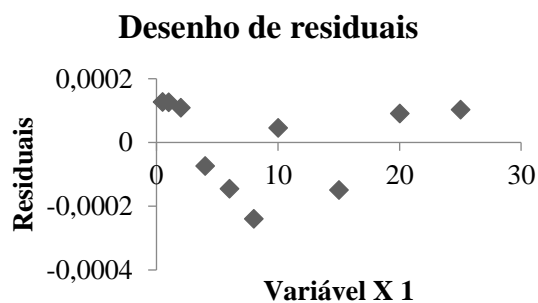


Figura D36. Gráfico do desenho de residuais da paroxetina.

Metadona

Tabela D55. Áreas obtidas no estudo do limite de detecção da metadona.

Concentração (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	A _{relativa}
0,5	2610,278	2101299	0,001242221
1	3394,42	1499547	0,00226363
2	6750,306	1544208	0,004371372
4	13069,9	1850680	0,007062213
6	19579,28	1220342	0,016044095
8	25009,01	1496268	0,016714253
10	37241,25	1649795	0,02257326
15	56088,46	1594750	0,035170692
20	73635,74	1590628	0,046293496
30	102369,7	1532595	0,066795039

s – Substância

PI – Padrão interno

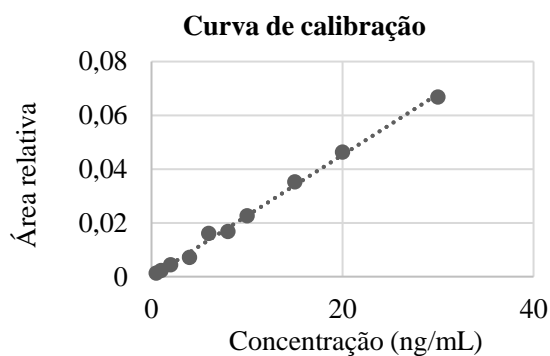


Figura D37. Curva de calibração da metadona.

Tabela D56. Estatística de regressão e coeficientes obtidos para a metadona.

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,998114468
Quadrado de R	0,996232492
Erro-padrão	0,001404396
Observações	10
Coeficientes	
Declive	0,002262571
Ordenada na origem	1,92176E-05

Tabela D57. Resultado de residuais obtidos para a metadona.

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,001150503	9,1718E-05
2	0,002281789	-1,81581E-05
3	0,004544359	-0,000172987
4	0,009069501	-0,002007288
5	0,013594643	0,002449452
6	0,018119785	-0,001405532
7	0,022644927	-7,16671E-05
8	0,033957782	0,001212911
9	0,045270636	0,001022859
10	0,067896346	-0,001101307

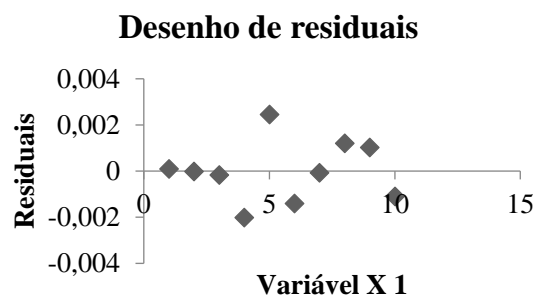


Figura D38. Gráfico do desenho de residuais da metadona.

Levomepromazina

Tabela D58. Áreas obtidas no estudo do limite de detecção da levomepromazina.

Concentração (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	A _{relativa}
0,5	2509,562	2101299	0,001194291
1	2943,088	1499547	0,001962652
2	6152,83	1544208	0,003984458
4	14062,65	1850680	0,007598637
6	16480,3	1220342	0,01350466
8	24696,89	1496268	0,016505653
10	37572,19	1649795	0,022773853
15	57771,4	1594750	0,036225993
20	74793,84	1590628	0,047021574
25	98265,4	1541899	0,063730124

s – Substância

PI – Padrão interno

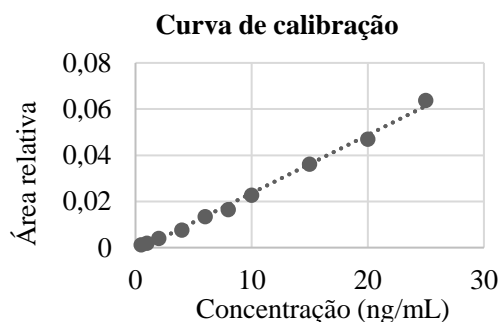


Figura D39. Curva de calibração da levomepromazina.

Tabela D59. Estatística de regressão e coeficientes obtidos para a levomepromazina.

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,997767
Quadrado de R	0,995539
Erro-padrão	0,0015
Observações	10
Coeficientes	
Declive	0,002517
Ordenada na origem	-0,00158

Tabela D60. Resultado de residuais obtidos para a levomepromazina.

Observação	Y previsto	Residuais
1	-0,00033	0,00152
2	0,000933	0,00103
3	0,003451	0,000534
4	0,008485	-0,00089
5	0,01352	-1,6E-05
6	0,018555	-0,00205
7	0,02359	-0,00082
8	0,036177	4,88E-05
9	0,048764	-0,00174
10	0,061352	0,002379

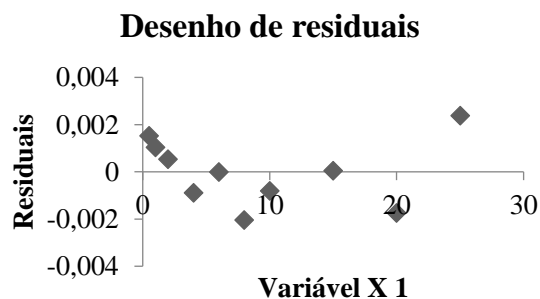


Figura D40. Gráfico do desenho de residuais da levomepromazina.

Amitriptilina

Tabela D61. Áreas obtidas no estudo do limite de detecção da amitriptilina.

Concentração (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	A _{relativa}
0,5	551,879	2101299	0,000262637
1	858,45	1499547	0,000572473
2	1648,089	1544208	0,001067272
4	3353,255	1850680	0,001811904
6	4280,229	1220342	0,003507402
8	6320,35	1496268	0,004224075
10	9386,178	1649795	0,005689299
15	13933,71	1594750	0,008737241
20	17497,65	1590628	0,011000463
30	24920,55	1532595	0,01626036

s – Substância

PI – Padrão interno

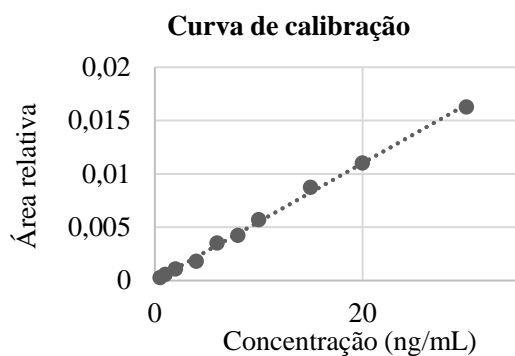


Figura D41. Curva de calibração da amitriptilina.

Tabela D62. Estatística de regressão e coeficientes obtidos para a amitriptilina.

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,998872
Quadrado de R	0,997745
Erro-padrão	0,000264
Observações	10
Coeficientes	
Declive	0,00055
Ordenada na origem	9,41E-06

Tabela D63. Resultado de residuais obtidos para a amitriptilina.

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,000284	-2,2E-05
2	0,000559	1,34E-05
3	0,001109	-4,1E-05
4	0,002208	-0,0004
5	0,003307	0,0002
6	0,004406	-0,00018
7	0,005506	0,000184
8	0,008254	0,000483
9	0,011002	-1,5E-06
10	0,016498	-0,00024

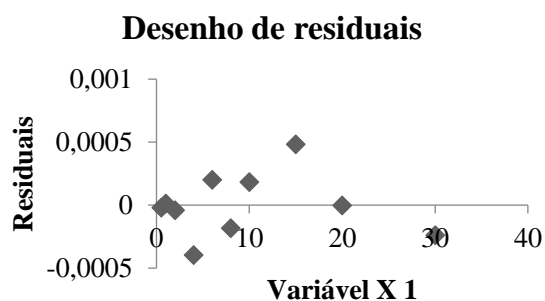


Figura D42. Gráfico do desenho de residuais da amitriptilina.

Nortriptilina

Tabela D64. Áreas obtidas no estudo do limite de detecção da nortriptilina.

Concentração (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	A _{relativa}
0,5	838,33	2101299	0,000398958
1	878,109	1499547	0,000585583
2	1971,058	1544208	0,00127642
4	3784,077	1850680	0,002044695
6	4686,776	1220342	0,003840544
8	6817,747	1496268	0,0045565
10	9457,312	1649795	0,005732416
15	14419,12	1594750	0,009041619
20	19062,55	1590628	0,011984289
25	22332,13	1541899	0,014483528

s – Substância

PI – Padrão interno

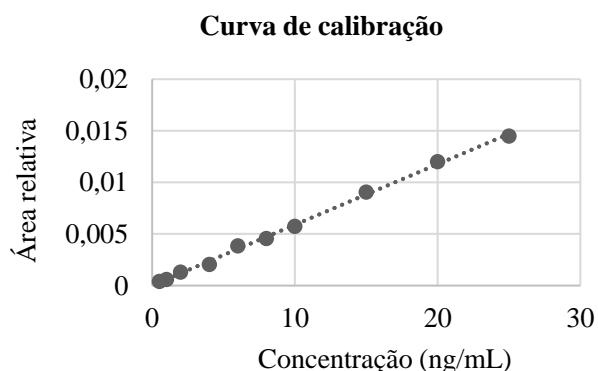


Figura D43. Curva de calibração da nortriptilina.

Tabela D65. Estatística de regressão e coeficientes obtidos para a nortriptilina.

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,999085
Quadrado de R	0,998171
Erro-padrão	0,000224
Observações	10
Coeficientes	
Declive	0,000587
Ordenada na origem	2,39E-05

Tabela D66. Resultado de residuais obtidos para a nortriptilina.

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,000317	8,16E-05
2	0,000611	-2,5E-05
3	0,001198	7,87E-05
4	0,002372	-0,00033
5	0,003546	0,000295
6	0,004719	-0,00016
7	0,005893	-0,00016
8	0,008828	0,000213
9	0,011763	0,000221
10	0,014698	-0,00021

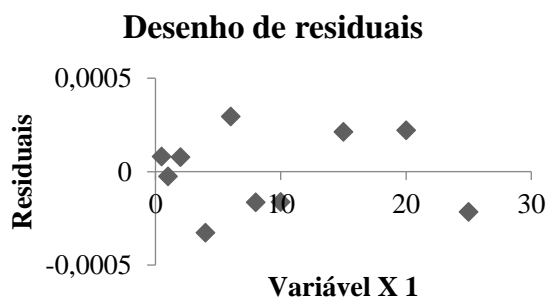


Figura D44. Gráfico do desenho de residuais da nortriptilina.

Fluoxetina

Tabela D67. Áreas obtidas no estudo do limite de detecção da fluoxetina.

Concentração (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	A _{relativa}
1	1831,769	1499547	0,001221548
2	3419	1544208	0,002214081
4	7913,386	1850680	0,004275933
6	8252,418	1220342	0,006762383
8	11438,26	1496268	0,007644524
10	18034,7	1649795	0,01093148
15	26232,05	1594750	0,016449004
20	36231,48	1590628	0,022778094
25	40882,78	1541899	0,026514569
30	48027,67	1532595	0,031337484

s – Substância

PI – Padrão interno

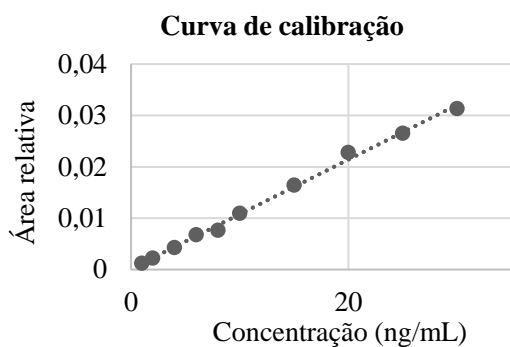


Figura D45. Curva de calibração da fluoxetina.

Tabela D68. Estatística de regressão e coeficientes obtidos para a fluoxetina.

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,998225
Quadrado de R	0,996453
Erro-padrão	0,000676
Observações	10
Coeficientes	
Declive	0,001064
Ordenada na origem	0,000144

Tabela D69. Resultado de residuais obtidos para a fluoxetina.

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,001208	1,39E-05
2	0,002271	-5,7E-05
3	0,004398	-0,00012
4	0,006525	0,000237
5	0,008652	-0,00101
6	0,010779	0,000152
7	0,016097	0,000352
8	0,021415	0,001363
9	0,026733	-0,00022
10	0,03205	-0,00071

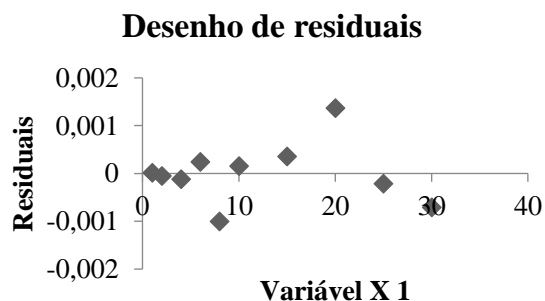


Figura D46. Gráfico do desenho de residuais da fluoxetina.

Sertralina

Tabela D70. Áreas obtidas no estudo do limite de detecção da sertralina.

Concentração (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	A _{relativa}
1	371,021	1499547	0,000247422
2	850,068	1544208	0,000550488
4	2049,053	1850680	0,001107189
6	1829,959	1220342	0,001499546
8	3095,36	1496268	0,00206872
10	4767,249	1649795	0,002889601
15	6816,495	1594750	0,004274335
20	9638,136	1590628	0,006059327
25	11231,34	1541899	0,007284097
30	14461,66	1532595	0,00943606

s – Substância

PI – Padrão interno

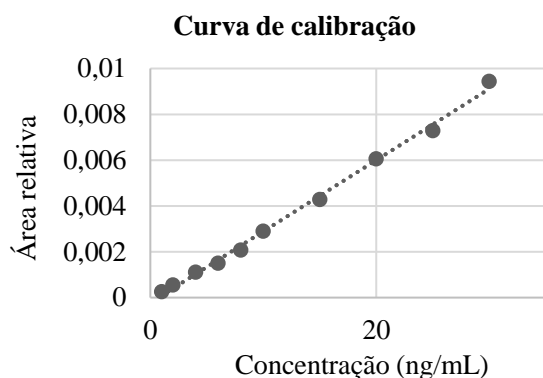


Figura D47. Curva de calibração da sertralina.

Tabela D71. Estatística de regressão e coeficientes obtidos para a sertralina.

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,998143
Quadrado de R	0,99629
Erro-padrão	0,000202
Observações	10
Coeficientes	
Declive	0,000311
Ordenada na origem	-0,00022

Tabela D72. Resultado de residuais obtidos para a sertralina.

Observação	Y previsto	Residuais
1	8,81E-05	0,000159
2	0,000399	0,000151
3	0,001022	8,57E-05
4	0,001644	-0,00014
5	0,002266	-0,0002
6	0,002888	1,29E-06
7	0,004444	-0,00017
8	0,006	5,97E-05
9	0,007555	-0,00027
10	0,009111	0,000325

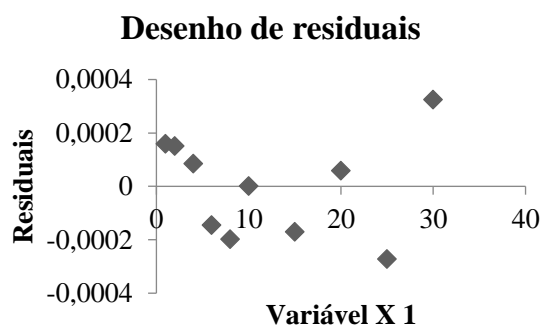


Figura D48. Gráfico do desenho de residuais da sertralina.

Clomipramina

Tabela D73. Áreas obtidas no estudo do limite de detecção da clomipramina.

Concentração (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	A _{relativa}
0,5	2535,54	2101299	0,001206654
1	3041,658	1499547	0,002028385
2	6930,115	1544208	0,004487813
4	15834,76	1850680	0,008556184
6	15232,76	1220342	0,012482373
8	23885,55	1496268	0,015963415
10	37248,72	1649795	0,022577782
15	53843,61	1594750	0,033763043
20	72628,44	1590628	0,045660221
25	87157,89	1541899	0,056526339

s – Substância

PI – Padrão interno

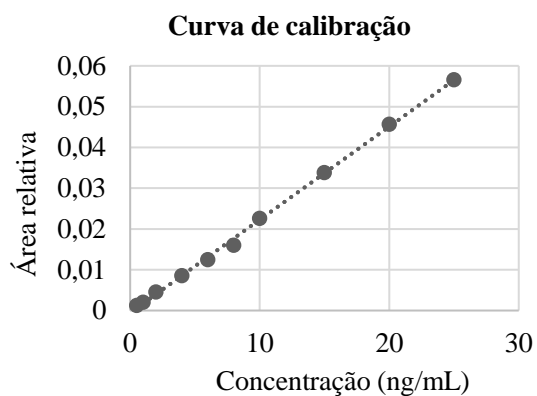


Figura D49. Curva de calibração da clomipramina.

Tabela D74. Estatística de regressão e coeficientes obtidos para a clomipramina.

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,999306
Quadrado de R	0,998612
Erro-padrão	0,000758
Observações	10
Coefficientes	
Declive	0,002283
Ordenada na origem	-0,00056

Tabela D75. Resultado de residuais obtidos para a clomipramina.

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,00058	0,000626
2	0,001722	0,000307
3	0,004004	0,000484
4	0,00857	-1,3E-05
5	0,013135	-0,00065
6	0,0177	-0,00174
7	0,022265	0,000312
8	0,033679	8,43E-05
9	0,045092	0,000568
10	0,034888	0,001046

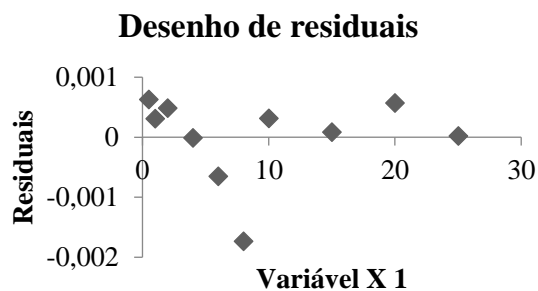


Figura D50. Gráfico do desenho de residuais da clomipramina.

Anexo E – Razão S/R para cada um dos analitos em cada uma das *pools* analisadas, na confirmação da positividade no estudo do limite de detecção.

Tabela E1. Tabela com relações S/R obtidas para cada analito em cada transição iônica, em cada amostra.

	Levetiracetam		Olanzapina		Cetamina	
	S/R (171 > 126)	S/R (171 > 154)	S/R (313 > 256)	S/R (313 > 84)	S/R (238 > 125)	S/R (238 > 179)
P3	117,403	97,537	7215,803	528,501	1513,838	247,42
P4	168,116	26,111	2184,599	673,961	1155,533	313,529
P6	260,722	93,393	3596,023	2083,134	829,452	280,717
P7	239,311	26,345	1841,357	102,824	1636,398	255,28
P8	481,713	82,581	1421,131	1478,378	2369,203	258,953
	Tramadol		Mirtazapina		Trazodona	
	S/R (264 > 58)	S/R (264 > 264)	S/R (266 > 195)	S/R (266 > 209)	S/R (372 > 176)	S/R (372 > 148)
P3	4418,174	183,519	3070,333	525,497	1109,232	1404,028
P4	3644,39	64,392	10311,765	354,939	1113,897	791,223
P6	2590,94	499,954	3354,822	1713,18	1314,773	1672,746
P7	1030,871	54,033	903,252	389,862	2204,695	847,417
P8	121,267	139,359	2999,041	670,253	879,381	1208,942
	Fenobarbital		Topiramato		Venlafaxina	
	S/R (231 > 42)	S/R (231 > 188)	S/R (340 > 264)	S/R (340 > 184)	S/R (278 > 58)	S/R (278 > 260)
P3	87,445	35,559	23,729	92,684	3222,95	234,01
P4	51,26	10,296	348,758	32,798	856,649	271,184
P6	357,696	143,49	35,915	20,859	1948,729	468,564
P7	62,229	22,599	63,675	84,445	2298,964	345,922
P8	51,691	95,23	257,49	40,021	1315,038	319,644
	Citalopram		Mianserina		Clozapina	
	S/R (325 > 109)	S/R (325 > 262)	S/R (265 > 208)	S/R (265 > 222)	S/R (327 > 270)	S/R (327 > 296)
P3	710,275	3276,583	1556,766	32,198	589,921	509,419
P4	242,118	1396,778	133,505	83,901	3805,497	528,879
P6	556,303	419,672	3799,828	68,874	3208,484	635,968
P7	758,1	742,718	1421,288	101,778	657,076	396,823
P8	287,804	2224,626	186,608	52,65	731,176	204,495
	Quetiapina		Haloperidol		Fenitoína	
	S/R (384 > 253)	S/R (384 > 279)	S/R (376 > 165)	S/R (376 > 358)	S/R (253 > 182)	S/R (253 > 225)
P3	5585,936	292,165	1099,48	126,423	23,56	10,611
P4	8511,303	153,816	854,96	80,685	17,024	6,073
P6	1292,36	865,77	1242,676	138,565	215,53	2,302
P7	1341,588	881,291	1321,346	87,748	75,485	2,89
P8	6336,552	821,044	689,726	47,779	81,962	5,447

Tabela E1. (continuação)

	Carbamazepina		Ciamemazina		Paroxetina	
	S/R (237 > 194)	S/R (237 > 220)	S/R (324 > 100)	S/R (324 > 237)	S/R (330 > 192)	S/R (330 > 123)
P3	603,575	155,712	699,228	98,474	381,279	11,933
P4	676,561	52,933	2399,709	68,657	621,578	10,825
P6	1563,724	47,464	787,345	539,456	93,651	23,926
P7	990,531	61,153	526,577	143,898	163,777	10,195
P8	2077,782	267,802	8262,64	999,495	921,719	28,094
	Metadona		Levomepromazina		Amitriptilina	
	S/R (310 > 265)	S/R (310 > 105)	S/R (329 > 100)	S/R (329 > 58)	S/R (278 > 233)	S/R (278 > 191)
P3	2464,171	380,137	6385,833	232,72	450,075	849,56
P4	3087,616	109,45	1023,887	324,341	286,655	96,054
P6	1835,02	471,63	601,193	3577,511	1163,697	1503,052
P7	1285,637	830,033	569,622	146,414	264,773	171,459
P8	4395,085	404,962	798,677	1761,408	414,494	647,46
	Nortriptilina		Fluoxetina		Sertralina	
	S/R (264 > 233)	S/R (264 > 191)	S/R (310 > 44)	S/R (310 > 148)	S/R (306 > 159)	S/R (306 > 275)
P3	1302,225	742,047	2395,019	173,86	136,669	111,385
P4	2012,286	114,272	479,373	60,824	689,093	126,519
P6	953,816	118,684	1933,377	84,758	248,687	69,216
P7	385,999	180,898	391,003	455,602	269,198	154,572
P8	379,016	171,547	307,102	268,882	296,534	63,099
	Clomipramina					
	S/R (315 > 86)	S/R (315 > 58)				
P3	67,096	74,946				
P4	59,947	110,537				
P6	127,064	76,007				
P7	84,153	57,946				
P8	241,978	187,907				