

Liliana Marina dos Santos Nisa

# Validação de um método analítico para determinação de anti-hipertensores em amostras de sangue por LC-MS/MS

Mestrado em Química Forense

Departamento de Química

FCTUC

Junho 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



Liliana Marina dos Santos Nisa

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

**Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química Forense**

Mestre João Miguel Franco

Dra. Paula Proença e Cunha

Professora Doutora Teresa M. V. D. Pinho e Melo

**Junho de 2017**

**Universidade de Coimbra**



# Agradecimentos

À Dra. Paula Proença pelo apoio, supervisão, transmissão de conhecimentos, orientação e amizade incansáveis durante todo o trabalho. Obrigada pela confiança em mim depositada, pela disponibilidade e paciência em esclarecer todas as minhas dúvidas, pela abertura em ouvir as minhas sugestões, pelas palavras de incentivo que nunca me deixaram desistir e me permitiram ultrapassar os momentos mais difíceis da realização do trabalho. A sua ajuda foi sem dúvida essencial. Muito obrigada!

Ao Mestre João Miguel Franco por me possibilitar a realização desta dissertação no Serviço de Química e Toxicologia Forenses do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses e por toda a disponibilidade demonstrada.

À Professora Doutora Teresa Pinho e Melo por toda a orientação prestada, esclarecimento de dúvidas e sugestões para melhoramento do trabalho.

À Professora Doutora Cláudia Margalho pela disponibilidade e prontidão em esclarecer todas as minhas dúvidas, pela simpatia e por todas as palavras de incentivo.

A todas as pessoas do Serviço de Química e Toxicologia Forenses da Delegação do Centro por me terem recebido tão bem, pela boa disposição, bom ambiente e simpatia proporcionados todos os dias. O meu agradecimento à Dra. Paula Monsanto, Dra. Carla Mostra, Dra. Carla Monteiro, Eugénia Frias, Alda Claro, Alice Castanheira, Fernando Castanheira, Cristina Tavares, Catarina Oliveira e D. Helena Arede. Foi um ano inesquecível, que passou até depressa demais, e terei sempre memória de todos vocês, em especial da Equipa III (LC-MS), com a qual tive o prazer de trabalhar.

Ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, em particular à Professora Doutora Ermelinda Eusébio, pela oportunidade de desenvolver a minha dissertação no lugar que desde o primeiro dia em que entrei no mestrado foi o meu objetivo.

Por último, mas não menos importante, aos meus pais, ao meu irmão, aos meus avós e a toda a minha família, por todo o suporte, incentivo, carinho e força que me deram não só ao longo deste ano mas em todo o meu percurso académico. Ao meu namorado que sempre me acompanhou, compreendeu e incentivou nos momentos mais difíceis.

A todos que, direta ou indiretamente, me apoiaram e contribuíram para a realização deste trabalho o meu muito obrigado.



# Índice

Abreviaturas .....	v
Resumo.....	ix
Abstract.....	xi
Capítulo 1 – Introdução .....	1
1.1 Hipertensão arterial.....	1
1.1.1 Definição .....	2
1.1.2 Classificação .....	2
1.1.2.1 Hipertensão maligna.....	3
1.1.2.2 Hipertensão resistente.....	4
1.1.3 Etiologia .....	4
1.1.4 Objetivos terapêuticos .....	5
1.1.5 Terapêutica não farmacológica .....	5
1.1.6 Terapêutica farmacológica.....	5
1.1.6.1 Classes farmacológicas .....	6
1.2 Toxicologia Forense .....	9
1.3 O Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. e o Serviço de Química e Toxicologia Forenses, delegação do Centro.....	11
1.4 Importância médico-legal do estudo dos anti-hipertensores .....	12
1.5 Conceitos básicos de farmacocinética e farmacodinâmica.....	12
1.5.1 Absorção .....	13
1.5.2 Distribuição.....	14
1.5.3 Metabolismo .....	15
1.5.4 Eliminação .....	16
1.6 Fármacos anti-hipertensores .....	17
1.6.1 Amlodipina.....	19
1.6.2 Hidroclorotiazida .....	21
1.6.3 Indapamida .....	23
1.6.4 Lercanidipina .....	25
1.6.5 Nifedipina.....	27
1.6.6 Telmisartan.....	28
1.7 O sangue como matriz biológica.....	31
1.8 Revisão da literatura.....	32
1.9 Metodologia analítica.....	36
1.9.1 Preparação da amostra .....	36

1.9.2 Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massa sequencial .....	37
1.9.2.1 Cromatografia líquida .....	37
1.9.2.2 Espectrometria de massa.....	39
1.10 Validação de métodos analíticos .....	42
1.11 Objetivos.....	44
Capítulo 2 - Experimental.....	45
2.1 Padrões e reagentes .....	45
2.2 Material e equipamento.....	45
2.3 Preparação de padrões, solventes e soluções .....	46
2.4 Preparação das amostras.....	48
2.5 Extração em fase sólida .....	48
2.6 Cromatografia líquida.....	49
2.7 Espectrometria de massa.....	50
2.8 Quantificação.....	51
2.9 Validação do método .....	52
2.9.1 Estabilidade .....	52
2.9.2 Especificidade/Seletividade .....	54
2.9.3 Capacidade de identificação .....	56
2.9.4 Linearidade e modelo de calibração.....	56
2.9.5 Efeito matriz.....	57
2.9.6 Eficiência da extração .....	58
2.9.7 <i>Carryover</i> .....	58
2.9.8 Limiares analíticos .....	58
2.9.9 Precisão .....	60
2.9.10 Exatidão .....	62
2.9.11 Integridade da diluição.....	62
2.9.12 Robustez .....	63
Capítulo 3 – Resultados e Discussão .....	65
3.1 Estudo do padrão de fragmentação dos anti-hipertensores .....	65
3.2 Validação preliminar.....	69
3.2.1 Comparação de colunas de extração .....	69
3.3 Parâmetros de validação .....	73
3.3.1 Estabilidade .....	73
3.3.2 Seletividade .....	75
3.3.2.1 Critério de tempo de retenção relativo .....	75
3.3.2.2 Critério das relações iônicas das transições .....	77
3.3.3 Capacidade de identificação .....	80
3.3.4 Linearidade e modelo de calibração.....	80



3.3.5 Efeito matriz.....	84
3.3.6 Eficiência da extração.....	86
3.3.7 <i>Carryover</i> .....	88
3.3.8 Limiares analíticos.....	89
3.3.8.1 Teste dos limites .....	90
3.3.9 Precisão.....	94
3.3.9.1 Repetibilidade.....	94
3.3.9.2 Precisão intermédia.....	95
3.3.10 Exatidão .....	98
3.3.11 Integridade da diluição.....	100
3.3.12 Robustez.....	102
3.4 Aplicação do método a casos forenses .....	102
Capítulo 4 – Conclusão .....	109
Bibliografia.....	111
Apêndice .....	117
A. Comparação de colunas de extração .....	119
B. Especificidade/Seletividade .....	123
C. Linearidade e modelo de calibração .....	127
D. Efeito matriz.....	141
E. Eficiência da extração .....	147
F. Limiares analíticos.....	151
G. Repetibilidade.....	159
H. Precisão intermédia.....	165
I. Exatidão .....	173



# Abreviaturas

µg – micrograma

µl – microlitro

µm – micrómetro

AHT – Anti-hipertensor

AML – Amlodipina

APCI – Ionização Química à Pressão Atmosférica (do inglês, *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*)

APPI – Fotoionização à Pressão Atmosférica (do inglês, *Atmospheric Pressure Photon Ionization*)

ARA – Antagonistas dos Recetores de Angiotensina II

A<sub>rel</sub> – Área relativa (área do analito/área do padrão interno)

AVC – Acidente Vascular Cerebral

BB – Bloqueadores β

BCC – Bloqueadores dos Canais de Cálcio

Cl – *Clearance*

CV – Coeficiente de Variação

DC – Débito Cardíaco

DCV – Doenças Cardiovasculares

ECA – Enzima de Conversão da Angiotensina

EM – Efeito Matriz

ER – Erro Relativo

ESC – Sociedade Europeia de Cardiologia (do inglês, *European Society of Cardiology*)

ESI – Ionização por *Electrospray* (do inglês, *Electrospray Ionization*)

ESH – Sociedade Europeia de Hipertensão (do inglês, *European Society of Hypertension*)

F – Biodisponibilidade

h – Horas

H<sub>2</sub>O – Água

HCTZ – Hidroclorotiazida

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*)

HTA – Hipertensão Arterial

IECA – Inibidores da Enzima de Conversão da Angiotensina

IND – Indapamida

INFARMED, I.P. – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, Instituto Público

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

IPS – Instituto Português do Sangue

GC-FID – Cromatografia Gasosa com Detetor de Ionização de Chama (do inglês, *Gas Chromatography-Flame Ionization Detector*)

GC- MS – Cromatografia Gasosa acoplada a Espetrometria de Massa (do inglês, *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*)

L – Litro

LC – Cromatografia Líquida (do inglês, *Liquid Chromatography*)

LC-DAD – Cromatografia Líquida acoplada a Detetor de Fotodíodos (do inglês, *Liquid Chromatography-Diode Array Detector*)

LC-MS – Cromatografia Líquida acoplada a Espetrometria de Massa (do inglês, *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*)

LC-MS/MS – Cromatografia Líquida acoplada a Espetrometria de Massa Sequencial (do inglês, *Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*)

LC-UV – Cromatografia Líquida acoplada a Detetor de Ultravioleta (do inglês, *Liquid Chromatography-Ultraviolet Detector*)

LD – Limite de Detecção

LER – Lercanidipina

L/h – Litro por hora

L/kg – Litro por quilograma

LLE – Extração Líquido-Líquido (do inglês, *Liquid-Liquid Extraction*)

LQ – Limite de Quantificação

MeOH – Metanol

mg – Miligrama

mL – Mililitro

mL/min – Mililitro por minuto

mmHg – Milímetros de Mercúrio

MP – Mistura Padrão

MRM – Monotorização de Reações Múltiplas (do inglês, *Multiple Reaction Monitoring*)

MS – Espetrometria de Massa (do inglês, *Mass Spectrometry*)

MS/MS – Espetrometria de Massa Sequencial

m/z – Razão massa/carga

NIF – Nifedipina

ng – Nanograma

OMS – Organização Mundial de Saúde

PA – Pressão Arterial

PHYSA – do inglês, Portuguese Hypertension and Salt Study

PI – Padrão Interno  
PMR – Redistribuição *Postmortem* (do inglês, *Postmortem Redistribution*)  
RAAS – Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (do inglês, *Renin-Angiotensin-Aldosterone System*)  
RVP – Resistência Vascular Periférica  
s – Desvio Padrão  
SNS – Serviço Nacional de Saúde  
SPE – Extração em Fase Sólida (do inglês, *Solid Phase Extraction*)  
SPH – Sociedade Portuguesa de Hipertensão  
SQTF – Serviço de Química e Toxicologia Forense  
SQTF-C – Serviço de Química e Toxicologia Forense, Delegação do Centro  
SWGTOX – do inglês, *Scientific Working Group for Forensic Toxicology*  
 $t_{1/2}$  – Tempo de Semivida  
TA – Tensão Arterial  
TAD – Tensão Arterial Diastólica  
TAS – Tensão Arterial Sistólica  
TEL – Telmisartan  
TIC – Cromatograma de Iões Totais (do inglês, *Total Ion Chromatogram*)  
TR – Tempo de Retenção  
TRR – Tempo de Retenção Relativo  
 $\Delta$ TRR – Diferença relativa do tempo de retenção relativo  
UHPLC – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (do inglês, *Ultra High Performance Liquid Chromatography*)  
UPLC-MS/MS – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massa Sequencial (do inglês, *Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*)  
 $V_d$  – Volume Aparente de Distribuição



# Resumo

A hipertensão arterial constitui um dos principais fatores de risco cardiovascular, o que associado à sua elevada prevalência na população portuguesa, é responsável pela elevada morbidade e mortalidade associadas às doenças cardiovasculares. Deste modo, os fármacos anti-hipertensores (AHTs) representam um importante grupo de substâncias utilizadas para o controlo dos valores de tensão arterial. Ainda assim, a adesão a esta terapêutica farmacológica é reduzida e a maior parte dos doentes medicados apresenta valores acima dos objetivos terapêuticos estabelecidos, o que em ambos os casos pode resultar em complicações e inclusive na morte.

Este trabalho teve como objetivo a validação de um método analítico para determinação simultânea de seis AHTs (amlodipina, hidroclorotiazida, indapamida, lercanidipina, nifedipina e telmisartan). A metodologia analítica consistiu na fortificação de amostras de sangue branco (0,5 mL), com adição de padrão interno (zolpidem-d6), seguida de extração em fase sólida (SPE) com recurso a colunas Oasis HLB (Waters). A análise foi feita através da injeção de 10  $\mu$ L do extrato num sistema LC-MS/MS (Waters), com ionização por *electrospray* (ESI) em modo positivo para todos os AHTs, com exceção da hidroclorotiazida, e analisador de massa do tipo triplo quadrupolo operando no modo de monitorização de reações múltiplas (MRM). A separação cromatográfica foi efetuada com uma coluna ACQUITY UPLC<sup>®</sup> HSS T3 (2,1 x 100 mm I.D., 1,8  $\mu$ m) (Waters), utilizando uma fase móvel composta por acetonitrilo e ácido fórmico a 0,1 %, em gradiente, com um fluxo de 0,5 mL/min. O método foi validado de acordo com o procedimento em vigor no Serviço de Química e Toxicologia Forenses da Delegação do Centro (SQTF-C) do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. (INMLCF, I.P.). Os parâmetros de validação estudados incluíram: seletividade, linearidade, eficiência da extração, efeito matriz, limites de deteção e quantificação, precisão e exatidão, entre outros.

O método demonstrou ser seletivo na determinação dos seis AHTs, obtendo-se também um desempenho linear para a gama de trabalho compreendida entre 5 e 500 ng/mL, considerando um fator de ponderação de 1/x, sempre com um coeficiente de correlação superior a 0,99. Não foi detetado nenhum fenómeno de arrastamento ou efeito matriz relevante. Os limites de deteção e quantificação obtidos são adequados tendo em conta a gama de trabalho estudada. A eficiência da extração foi superior a 40% para todas as substâncias, com exceção do telmisartan. Portanto, o método validado demonstrou ser capaz de detetar, identificar e quantificar simultaneamente os seis AHTs em amostras de sangue por LC-MS/MS.

Por fim, de modo a demonstrar a aplicabilidade do método, foram analisadas amostras de 12 casos forenses, sendo que para cada um deles se determinou, sempre que possível, a concentração destas substâncias em sangue periférico e sangue cardíaco, com o objetivo de avaliar as possíveis diferenças entre ambos. Verificou-se que, de facto, existem diferenças nas concentrações determinadas em ambas as matrizes em consequência do fenómeno de redistribuição *postmortem*, mais evidente em sangue cardíaco, pelo que é recomendado que a quantificação destas substâncias seja realizada em sangue periférico.

**Palavras-chave:** anti-hipertensores, sangue, LC-MS/MS, SPE.



# Abstract

Arterial hypertension is one of the major cardiovascular risk factors, which associated with her high prevalence in Portuguese population, is responsible by the high morbidity and mortality associated with cardiovascular diseases. Accordingly, antihypertensive drugs represent an important group of substances used to control arterial tension values. Even so, compliance to this therapy is reduced and the most part of medicated patients present values over the established therapeutic objectives, which in both cases can result in complications, including death.

The main objective of this work was the validation of an analytical method for simultaneous determination of six antihypertensives (amlodipine, hydrochlorothiazide, indapamide, lercanidipine, nifedipine and telmisartan). The analytical methodology consisted in spiking blood samples (0.5 mL), with addition of internal standard (zolpidem-d6), followed by solid phase extraction (SPE) with Oasis HLB columns (Waters). The analysis was made through the injection of 10  $\mu$ L of the extract in a LC-MS/MS system (Waters), with electrospray ionization (ESI) in positive mode, except for hydrochlorothiazide, and triple quadrupole mass analyzer operating under the multiple reaction monitoring mode (MRM). Chromatographic separation was carried out by an ACQUITY UPLC<sup>®</sup> HSS T3 (2.1 $\times$ 100  $\mu$ m I.D., 1.8  $\mu$ m) column (Waters), using a mobile phase constituted by acetonitrile and formic acid 0.1% gradient, at a flow rate of 0.5 mL/min. The method was validated according to the procedure of Laboratory of Forensic Chemistry and Toxicology, Center Delegation of National Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences. The validation parameters studied included: selectivity, linearity, extraction efficiency, matrix effect, limits of detection and quantification, precision, bias, between others.

The method showed to be selective in determination of six antihypertensives, achieving a linear performance to the working range between 5 and 500 ng/ml, considering a weight factor of 1/x, always with a correlation coefficient higher than 0.99. It was not detected carryover or significant matrix effect. The limits of detection and quantification obtained are adequate, taking into account the working range studied. The extraction efficiency was above 40% for all substances, with the exception of telmisartan. Therefore, the validated method proved to be able to detect, identify and quantify the six antihypertensives simultaneously in blood samples by LC-MS/MS.

Finally, in order to demonstrate the applicability of the method, samples of 12 forensic cases were analyzed, by determining the concentration of these substances, whenever possible, in peripheral blood and cardiac blood, with the goal to evaluate the possible differences between both. It was observed that its concentration in both matrices were different, which results from *postmortem* redistribution. The difference was more pronounced in cardiac blood, then it is recommended that quantification of these substances be performed in peripheral blood.

**Keywords:** antihypertensives, blood, LC-MS/MS, SPE.



# Capítulo 1

## Introdução

### 1.1 Hipertensão arterial

As doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de morbilidade e mortalidade a nível mundial sendo, em 2005, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), responsáveis por 17,5 milhões de mortes, o que representa 34% de todas as causas de morte <sup>1,2</sup>. Em 2008, a nível nacional, as DCV foram responsáveis por cerca de 32% das mortes <sup>2</sup>.

As principais causas das DCV são o tabagismo, o sedentarismo, a diabetes, a hipertensão arterial (HTA) e a obesidade, bem como outros fatores intrínsecos que aumentam o risco cardiovascular, nomeadamente a idade, o género e a hereditariedade <sup>2,3</sup>.

De acordo com a Sociedade Portuguesa de Hipertensão (SPH), a HTA é considerada o principal fator de risco para o desenvolvimento de diversas patologias cardiovasculares, nomeadamente Acidente Vascular Cerebral (AVC) e enfarte agudo do miocárdio, o que associado à sua elevada prevalência na população, torna a HTA num problema de saúde pública emergente <sup>1,3-6</sup>.

Mundialmente, estima-se que existam cerca de 1 bilião de pessoas com HTA <sup>5</sup>. Segundo a OMS, das aproximadamente 17 milhões de mortes por ano, 9,4 milhões resultam de complicações da HTA, afetando cerca de 40% dos adultos com mais de 25 anos e sendo responsável por cerca de 45% das mortes por doença cardíaca e 51% das mortes por AVC <sup>1</sup>. De facto, o aumento da esperança média de vida, aliado às modificações dos estilos de vida da população, têm levado ao aumento da prevalência das DCV e, conseqüentemente, da HTA <sup>1,3</sup>.

Em Portugal, segundo o estudo PHYSA (do inglês, Portuguese Hypertension and Salt Study), estima-se que a HTA afete aproximadamente 42% da população adulta, valor que se enquadra no intervalo das prevalências dos restantes países europeus (33-56%) <sup>1,3-6</sup>. Mais alarmante, é o facto de, do total de hipertensos adultos, apenas 39% estarem a ser medicados e destes, aproximadamente, 89% não terem a HTA controlada que, como no caso dos doentes hipertensos não medicados, pode resultar em complicações da HTA e, numa última instância, na morte <sup>4,5</sup>.

O estudo PHYSA demonstrou que na última década houve um aumento nas taxas de tratamento da HTA, melhoria que se deve, em parte, ao aumento da utilização de fármacos mais eficazes e melhor tolerados <sup>1,7</sup>. No entanto, mesmo sendo conhecida a eficácia das várias medidas preventivas e de controlo disponíveis, a HTA continuará, durante décadas, a representar um dos maiores desafios para a saúde pública <sup>1</sup>.

### 1.1.1 Definição

A pressão arterial (PA) é uma medida da força exercida pelo sangue nos vasos sanguíneos como resultado do batimento cardíaco <sup>5</sup>. Os valores de PA, expressos em milímetros de mercúrio (mmHg), são obtidos pelo produto do débito cardíaco (DC) com a resistência vascular periférica (RVP) <sup>4,5</sup>. O DC corresponde à quantidade de sangue bombeada pelo ventrículo esquerdo para as artérias por minuto e a RVP diz respeito à resistência que os vasos sanguíneos oferecem à passagem do sangue <sup>2,4</sup>.

Os valores de PA, ou mais corretamente, de tensão arterial (TA), sofrem oscilações ao longo do ciclo cardíaco. Daí que, para fazer referência aos valores de TA, se registem dois parâmetros: a tensão arterial sistólica (TAS), que diz respeito ao valor de TA registado quando o ventrículo esquerdo bombeia o sangue para a aorta (sístole), e a tensão arterial diastólica (TAD), que corresponde ao valor de TA registado quando o ventrículo esquerdo se está a encher de sangue (diástole) <sup>2</sup>.

A OMS definiu a HTA como o aumento persistente da TAS e/ou da TAD, acima dos valores considerados normais <sup>1,2,5</sup>.

### 1.1.2 Classificação

Apesar de simples, a definição de HTA torna-se um pouco mais complexa pelo facto de não existir uma clara separação entre os valores considerados normais e os considerados como HTA. Embora existam diversas *guidelines*, a classificação atualmente aceite estabelece que a HTA nas pessoas adultas se define para valores de TAS e/ou TAD iguais ou superiores a 140 e 90 mmHg, respetivamente <sup>5</sup>.

Apresentam-se, de seguida, duas normas de orientação para a classificação dos valores de TA registados, uma de acordo com a SPH e outra segundo a Sociedade Europeia de Hipertensão (ESH, do inglês *European Society of Hypertension*) e a Sociedade Europeia de Cardiologia (ESC, do inglês *European Society of Cardiology*).

A SPH classifica os doentes hipertensos em dois estádios, hipertensão estadio 1 e hipertensão estadio 2, definidos, respetivamente, por valores de TAS entre 140-159 mmHg e  $\geq 160$  mmHg ou por valores de TAD entre 90-99 mmHg e  $\geq 100$  mmHg (tabela 1.1). Os doentes com valores de TAS e TAD, respetivamente, entre 130-139 mmHg e 80-89 mmHg têm elevado risco de desenvolver HTA sendo, por isso, considerados pré-hipertensos.

Segundo a ESH/ESC (tabela 1.2), considera-se que os valores ideais de TA nos adultos se situam abaixo de 120 mmHg para a TAS e de 80 mmHg para a TAD. Os indivíduos com valores entre 130-139 mmHg de TAS e 85-89 mmHg de TAD são considerados pré-hipertensos. Além desta categoria, estabelecem-se três graus de hipertensão, em que valores de TAS e TAD, respetivamente, entre 140-159 mmHg e 90-99 mmHg correspondem a hipertensão ligeira (grau 1), entre 160-179 mmHg e 100-109 mmHg a hipertensão moderada (grau 2) e acima de 180 mmHg e 110 mmHg a hipertensão grave (grau 3). Por outro lado, existe ainda a hipertensão sistólica isolada onde apenas a TAS se encontra elevada (TAS  $\geq 140$  mmHg e TAD  $< 90$  mmHg).

**Tabela 1.1.** Classificação dos valores de tensão arterial de acordo com a SPH <sup>8</sup>.

Categoria	Tensão Arterial Sistólica	Tensão Arterial Diastólica	
	(TAS, mmHg)		(TAD, mmHg)
Normal	120 – 129	e	80 – 84
Normal alto	130 – 139	ou	85 – 89
Hipertensão estadio 1	140 – 159	ou	90 – 99
Hipertensão estadio 2	160	ou	100

**Tabela 1.2.** Classificação dos valores de tensão arterial segundo a ESH/ESC <sup>9</sup>.

Categoria	Tensão Arterial Sistólica	Tensão Arterial Diastólica	
	(TAS, mmHg)		(TAD, mmHg)
Ideal	< 120	e	< 80
Normal	120 – 129	e/ou	80 – 84
Normal alto	130 – 139	e/ou	85 – 89
Hipertensão de grau 1	140 – 159	e/ou	90 – 99
Hipertensão de grau 2	160 – 179	e/ou	100 – 109
Hipertensão de grau 3	≥ 180	e/ou	≥ 110
Hipertensão sistólica isolada	≥140	e	< 90

De referir que, para qualquer das classificações anteriormente mencionadas, quando a TAS e a TAD pertencem a categorias diferentes, para a classificação da TA prevalece a mais elevada <sup>5</sup>.

A HTA é uma patologia, a maior parte do tempo, assintomática e, por isso, considerada por muitos autores como o “assassino silencioso”, facto que faz com que muitas pessoas não se reconheçam como doentes <sup>2,6</sup>. Por este motivo, torna-se vital a correta determinação dos valores de TA para que estes valores possam ser controlados ao longo do tempo e, assim, identificar precocemente indivíduos com risco de vir a desenvolver HTA e prevenir ou retardar as complicações desta <sup>4</sup>.

### 1.1.2.1 Hipertensão maligna

A hipertensão maligna caracteriza-se por um aumento grave da TA (TAD geralmente acima de 140 mmHg), que se não for tratado pode levar à morte em 3 a 6 meses <sup>2,10</sup>. Por outro lado, uma crise hipertensiva caracteriza-se por um aumento abrupto e sintomático da TA (geralmente TAS e/ou TAD, respetivamente, iguais ou superiores a 180 e 110 mmHg), na qual o controlo da TA tem de ser efetuado em menos de 24 horas <sup>2,10</sup>.

### 1.1.2.2 Hipertensão resistente

A hipertensão resistente define-se quando um plano terapêutico, que inclui a administração, em doses máximas, de pelo menos três fármacos AHTs (incluindo obrigatoriamente um diurético), não é eficiente no controlo de TA <sup>2,4,8</sup>. As principais causas da hipertensão resistente são a baixa adesão ao tratamento farmacológico, a prescrição ineficaz, o consumo de fármacos que interferem com a terapêutica antihipertensiva e a hipertensão secundária <sup>2,4,8</sup>.

Existe, ainda, a hipertensão resistente espontânea, cuja principal causa é a chamada hipertensão da “bata branca” que se caracteriza pela TA persistentemente elevada apenas em ambiente de consultório ou hospitalar (TAS e/ou TAD igual ou superior a 140 e 90 mmHg, respetivamente) <sup>2,5</sup>. Isto é, nos indivíduos que sofrem deste tipo de hipertensão, o stress e a ansiedade causados pela ida ao médico fazem com que os seus valores de TA aumentem e lhes seja diagnosticada HTA, quando, fora deste local, não seriam considerados hipertensos <sup>2</sup>. Assim, a hipertensão da “bata branca” pode constituir uma fração considerável dos indivíduos diagnosticados como hipertensos, estimando-se que a sua prevalência na população em geral seja de cerca de 15% <sup>5</sup>. O paciente diagnosticado com este tipo de HTA, em princípio, não necessita de tratamento farmacológico <sup>5</sup>.

Por outro lado, a hipertensão mascarada corresponde ao inverso da hipertensão da “bata branca”, uma vez que os valores de TA medidos em consultório são normais (TAS e TAD inferior a 140 e 90 mmHg, respetivamente) mas fora deste encontram-se elevados <sup>5</sup>. É provável que 1 em cada 7 ou 8 indivíduos com valores de TA normais em consultório tenha hipertensão mascarada, sendo que esta incidência é maior nos grupos etários mais jovens <sup>5</sup>.

### 1.1.3 Etiologia

No que diz respeito à etiologia da HTA, é possível distinguir a hipertensão primária ou essencial e a hipertensão secundária.

Na maioria dos casos (cerca de 90 a 95%), a causa da HTA é desconhecida (idiopática) e, por isso, designada de hipertensão primária ou essencial <sup>2,4,5</sup>. Contudo, existem diversos fatores que podem contribuir para o desenvolvimento deste tipo de HTA. Entre eles, destacam-se fatores não modificáveis (intrínsecos ao indivíduo) como, por exemplo, a hereditariedade, a idade, o sexo e a raça <sup>2,5</sup>. Outros fatores, neste caso, modificáveis são, por exemplo, o excesso de peso, o consumo excessivo de sal e de álcool, o stress, o tabagismo e o sedentarismo <sup>2,5</sup>. De referir, que estes fatores modificáveis, por si só, não são suficientes para desenvolver HTA, mas esta probabilidade encontra-se aumentada quando conjugados com outros fatores, nomeadamente a predisposição genética <sup>2,5</sup>.

A hipertensão secundária, cerca de 5 a 10% dos casos, corresponde à forma de HTA na qual é possível estabelecer e diagnosticar a(s) sua(s) causa(s) <sup>2,4,5</sup>. Entre as principais causas identificáveis de hipertensão secundária estão incluídas as patologias renais, uma vez que interferem com os mecanismos reguladores da TA,

além de perturbações hormonais como o hiperaldosteronismo primário (secreção excessiva de aldosterona) e o feocromocitoma (presença de um tumor na glândula supra-renal que leva à libertação de renina e ao aumento dos níveis de angiotensina II) – ver mecanismo de ação do telmisartan (1.6.6) <sup>2</sup>.

### **1.1.4 Objetivos terapêuticos**

Para os doentes hipertensos em geral, o objetivo é a redução dos valores de TAS e TAD para valores inferiores a 140 e 90 mmHg, respetivamente, parâmetros que diferem para os doentes hipertensos que têm outras condições patológicas associadas, como diabetes e insuficiência renal, ou com hipertensão normal alta e três ou mais fatores de risco, lesão nos órgãos-alvo ou DCV, para os quais se recomenda valores de TAS e TAD inferiores a 130 e 80 mmHg, respetivamente <sup>4,6</sup>.

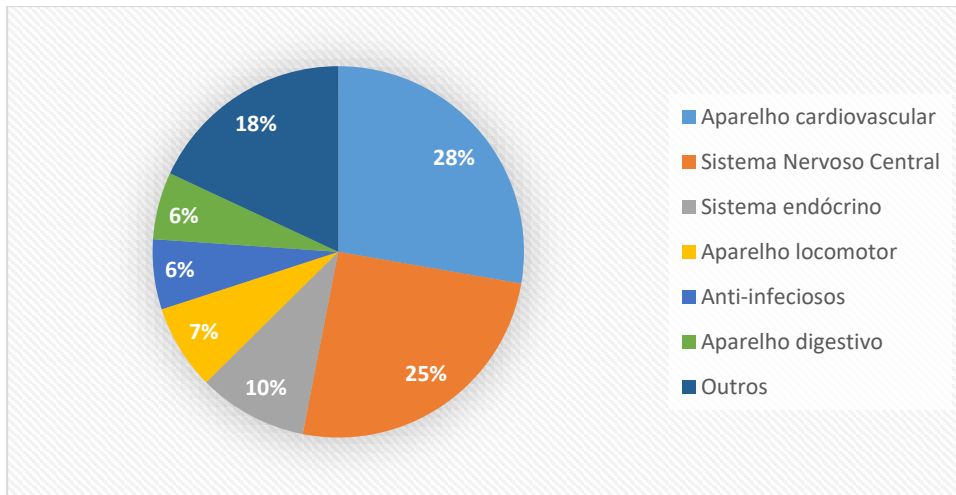
### **1.1.5 Terapêutica não farmacológica**

O tratamento da HTA tem como principal objetivo a diminuição dos valores de TA e, conseqüentemente, a prevenção a longo prazo dos eventos cardiovasculares e a redução da taxas de morbilidade e mortalidade associadas <sup>1,11</sup>. A primeira abordagem deve ser uma terapêutica não farmacológica que passa por modificações no estilo de vida, nomeadamente redução do peso corporal em indivíduos com excesso de peso, redução da ingestão de sal, adoção de hábitos alimentares saudáveis, cessação tabágica, moderação no consumo de álcool e realização de atividade física regular <sup>2,5,11</sup>.

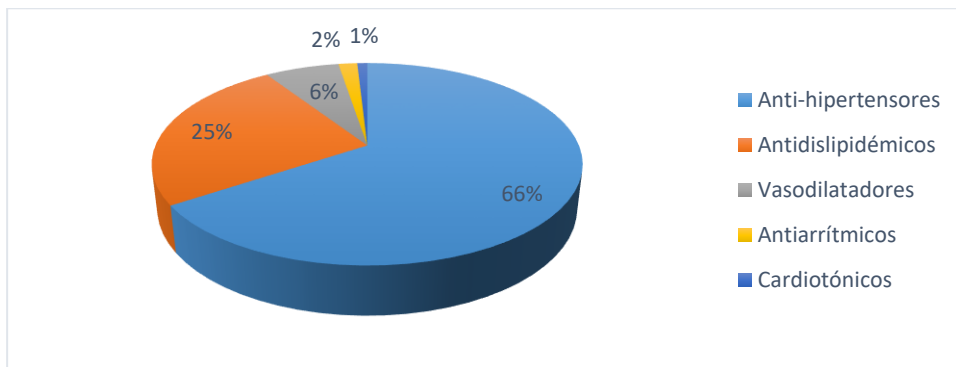
### **1.1.6 Terapêutica farmacológica**

Dado que a adesão a longo prazo às medidas anteriormente mencionadas é manifestamente baixa e que estas apresentam uma grande variabilidade inter-individual na redução da TA, é frequentemente necessário recorrer ao tratamento farmacológico, com recurso a fármacos AHTs, que tem como objetivo principal o controlo da TA com o menor número de fármacos e na menor dose possível <sup>5</sup>. Portanto, as medidas farmacológicas apenas devem ser adotadas em doentes hipertensos quando a terapêutica não farmacológica, por si só, não é suficiente para atingir os objetivos terapêuticos estabelecidos.

Segundo a estatística do medicamento de 2014 publicada pela INFARMED, I.P. <sup>12</sup> (Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.), cerca de 28% do total de medicamentos vendidos corresponde a fármacos que atuam no aparelho cardiovascular (figura 1.1), dos quais uma fração considerável, 66%, corresponde aos AHTs, os fármacos sobre os quais incide este estudo (figura 1.2).



**Figura 1.1.** Distribuição das vendas de medicamentos no Serviço Nacional de Saúde (SNS) em função dos grupos farmacoterapêuticos <sup>12</sup>.



**Figura 1.2.** Distribuição das vendas de medicamentos no SNS por subgrupos farmacoterapêuticos <sup>12</sup>.

### 1.1.6.1 Classes farmacológicas

Os AHTs podem ser classificados, de acordo com o seu mecanismo de ação, basicamente em seis grupos <sup>2</sup>:

- ⇒ Diuréticos: tiazidas e análogos, diuréticos de ansa, diuréticos poupadores de potássio, inibidores da anidrase carbónica e diuréticos osmóticos;
- ⇒ Modificadores do eixo renina-angiotensina: Inibidores da Enzima de Conversão da Angiotensina (IECA), Antagonistas dos Recetores da Angiotensina II (ARA) e inibidores diretos da renina;
- ⇒ Bloqueadores dos Canais de Cálcio (BCC);
- ⇒ Depressores da atividade adrenérgica: Bloqueadores  $\alpha$ , Bloqueadores  $\beta$  (BB), Agonistas  $\alpha_2$  centrais;
- ⇒ Vasodilatadores diretos;
- ⇒ Outros.

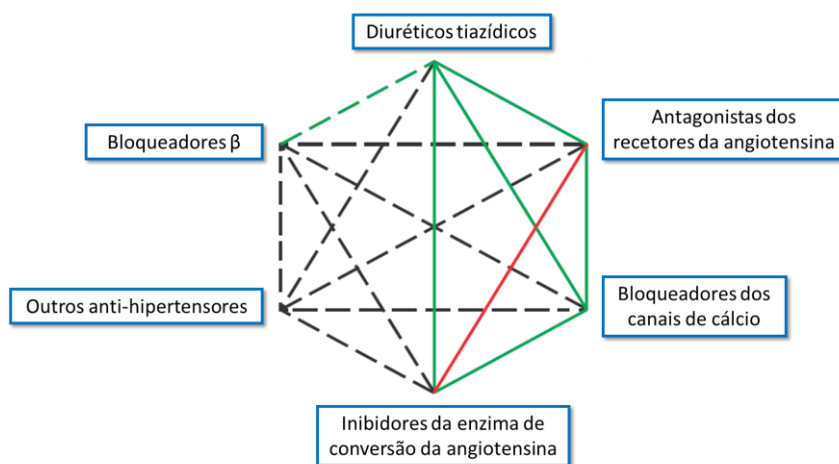


Os diuréticos tiazídicos, os IECA, os ARA, os BCC e os BB são considerados AHTs de primeira linha e, por isso, devem constituir a primeira escolha no tratamento da HTA, enquanto os restantes são AHTs de segunda linha <sup>2</sup>.

O tratamento deve ser iniciado em regime de monoterapia com doses baixas de um AHT de primeira linha, preferencialmente um diurético tiazídico <sup>5,11</sup>. No entanto, estima-se que em 2/3 dos casos não é possível obter o controlo desejável dos valores de TA apenas com um fármaco AHT, pelo que é frequentemente necessário associar dois AHTs de diferentes classes farmacológicas, devendo-se, neste caso, optar pela associação de dois AHTs de primeira linha, em que um deles seja preferencialmente um diurético tiazídico <sup>2,5</sup>.

As possíveis combinações de AHTs estão representadas esquematicamente na figura 1.3. De acordo com esta, as combinações preferenciais são: diurético/ARA, diurético/BCC, diurético/IECA, ARA/BCC e IECA/BCC. Geralmente, os dois AHTs usados em associação possuem mecanismos de ação complementares e o efeito da associação no controlo da HTA é substancialmente maior do que quando cada um deles é administrado de forma isolada, possibilitando, assim, a redução das doses utilizadas e, conseqüentemente, dos seus efeitos adversos <sup>5</sup>. É frequente optar-se por formulações em que uma única toma diária assegure o controlo da TA durante cerca de 24 horas <sup>1,5</sup>.

A associação diurético/BB, apesar de ser eficaz na redução dos valores de TA, deve ser utilizada com limitações, uma vez que favorece o desenvolvimento da diabetes. De salientar ainda que a associação ARA/IECA não é recomendada, por ambos os fármacos atuarem no sistema renina-angiotensina-aldosterona (ver ponto 1.6.6 – mecanismo de ação), ainda que a diferentes níveis, aumentando os efeitos adversos <sup>5</sup>.



**Figura 1.3.** Possíveis combinações de classes de fármacos AHTs. Linhas verdes contínuas: combinações preferenciais; linha verde tracejada: combinação útil, mas com algumas limitações; linhas pretas tracejadas: combinações possíveis, mas menos bem testadas; linha contínua vermelha: combinação não recomendada <sup>9</sup>.

Em cerca de 15-20% dos casos, não é possível obter o controlo desejável dos valores de TA com a associação de dois AHTs, pelo que pode ser necessário associar três ou mais AHTs, devendo então optar-se

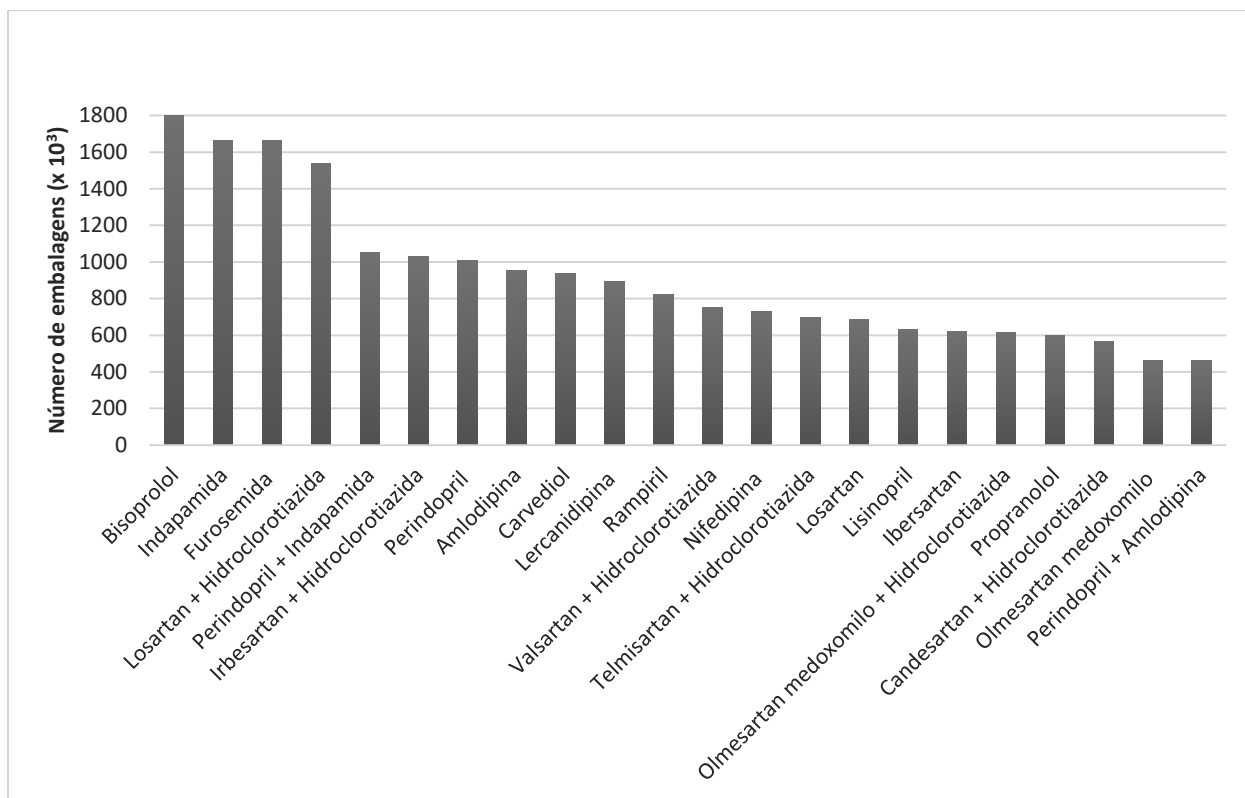
por um AHT de segunda linha <sup>2,5</sup>. Assim sendo, como na maioria dos casos é necessária a associação de dois ou mais fármacos AHTs para se obter o controlo desejável dos valores de TA <sup>13</sup>, é expetável que nas análises toxicológicas sejam detetados mais do que um AHT.

Os AHTs apenas permitem controlar a HTA, não constituem um tratamento etiológico desta, pois uma vez interrompido o tratamento com estes fármacos, os valores de TA retornam praticamente aos valores iniciais <sup>5</sup>.

Na tabela 1.3 estão apresentados alguns fármacos pertencentes às diferentes classes e subclasses farmacológicas, com destaque para os que foram alvo deste estudo. Na figura 1.4, o histograma representa as substâncias ativas da classe dos AHTs mais vendidas, em 2014, segundo a estatística do medicamento publicada pela INFARMED, I.P. <sup>12</sup>.

**Tabela 1.3.** Exemplos de fármacos pertencentes às várias classes e subclasses de AHTs <sup>4,14</sup>. Os AHTs selecionados para o desenvolvimento deste trabalho encontram-se sublinhados.

<i>Classe farmacológica</i>	<i>Subclasse</i>	<i>Exemplos de fármacos</i>
<i>Diuréticos</i>	Tiazídicos e análogos	Altizida, Clorotalidona, <u>Hidroclorotiazida</u> , <u>Indapamida</u> , Metolazona, Xipamida
	De Ansa	Furosemida, Torasemida
	Poupadores de potássio	Espironolactona
<i>Modificadores do eixo renina-angiotensina</i>	Inibidores da enzima de conversão da angiotensina	Captopril, Cilazapril, Enalapril, Fosinopril, Imidapril, Lisinopril, Perindopril, Quinapril, Ramipril, Trandolapril, Zofenopril
	Antagonistas dos recetores de angiotensina II	Azilsartan medoxomilo, Candesartan, Eprosartan, Irbesartan, Losartan, Olmesartan medoxomilo, <u>Telmisartan</u> , Valsartan,
	Inibidores da renina	Aliscireno
<i>Bloqueadores dos canais de cálcio</i>	-	<u>Amlodipina</u> , Diltiazem, Enalapril, Isradipina, Felodipina, <u>Lercanidipina</u> , <u>Lacidipina</u> <u>Nifedipina</u> , Nilvadipina, Nimodipina, Nitrendipina, Verapamilo
<i>Depressores da atividade adrenérgica</i>	Bloqueadores $\alpha$	Doxazosina, Ifenprodil, Terazosina, Urapidilo
	Bloqueadores $\beta$	Atenolol, Bisoprolol, Carvediol, Nebivolol, Metoprolol, Propranolol, Tertatolol
	Agonistas $\alpha_2$ centrais	Clonidina, Metildopa, Moxonidina, Rilmenidina
<i>Vasodilatadores diretos</i>	-	Naftidofurilo, Nicergolina, Pentoxifilina, Vinburnina



**Figura 1.4.** Substâncias ativas com propriedades anti-hipertensoras e respectivos números de embalagens vendidas presentes na lista das 100 substâncias ativas com maior número de embalagens no SNS, em 2014 <sup>12</sup>.

## 1.2 Toxicologia Forense

A toxicologia forense é o ramo da toxicologia que auxilia no esclarecimento de questões judiciais relacionadas com intoxicações e suas possíveis consequências, no âmbito das diversas áreas do Direito <sup>15</sup>. Esta é uma ciência multidisciplinar que envolve o conhecimento de áreas como química, bioquímica, farmacologia, fisiologia, biologia molecular, entre outras.

O pai da toxicologia foi, sem dúvida, Paracelso que no século XVI afirmou de um modo simplista que “todas as substâncias são venenos” e que “a dose distingue o veneno do remédio” <sup>15</sup>. Importa, então, esclarecer alguns conceitos utilizados no âmbito da toxicologia forense, nomeadamente, intoxicação, intoxicação aguda e crónica, tóxico e veneno (tabela 1.4).

No âmbito de uma investigação criminal ou um procedimento judicial podem ser requeridas análises toxicológicas com o objetivo de, por exemplo, determinar a presença de substâncias que possam afetar o comportamento de um indivíduo e/ou a sua capacidade de decisão (eg. álcool e drogas no âmbito do código da estrada) e, sempre que possível, auxiliar o patologista forense na determinação da causa da morte <sup>16,17</sup>. Não é da competência do toxicologista forense concluir sobre a intenção de matar ou sobre a etiologia da morte, mas sim auxiliar o magistrado na decisão final <sup>16</sup>.

**Tabela 1.4.** Conceitos importantes em toxicologia forense e respectivas definições <sup>15</sup>.

<b>Conceito</b>	<b>Definição</b>
<b>Intoxicação</b>	Quando se ultrapassa a dose máxima de segurança de uma determinada substância
<b>Intoxicação aguda</b>	Exposição a uma única dose (normalmente elevada) ou várias doses num curto espaço de tempo
<b>Intoxicação crónica</b>	Exposições repetidas durante um longo período de tempo
<b>Tóxico</b>	Qualquer composto que em quantidades suficientemente elevadas pode produzir efeitos tóxicos
<b>Veneno</b>	Qualquer composto que em doses muito baixas pode causar toxicidade

A existência de um elevado número de substâncias potencialmente tóxicas constitui uma dificuldade acrescida na realização das perícias toxicológicas, uma vez que, na maioria das vezes, o tipo de substância cuja pesquisa é pretendida não está especificado no pedido de análise <sup>16,17</sup>. Deste modo, é fundamental que o toxicologista forense tenha acesso a toda a informação sobre o caso, para que assim possa selecionar as substâncias a pesquisar sem prejuízo da qualidade da perícia <sup>17</sup>.

Em toxicologia forense, não existe um método universal para a determinação de todas as substâncias tóxicas e, por isso, estes são específicos e limitados a apenas um grupo de substâncias como, por exemplo, medicamentos, drogas de abuso, pesticidas, entre outros <sup>16</sup>.

As metodologias analíticas incluem uma primeira fase de triagem, que permite detetar substâncias possivelmente tóxicas e selecionar os casos positivos, devendo, por isso, ser o mais abrangente possível relativamente ao tipo de substâncias analisadas <sup>16</sup>. Seguem-se métodos de confirmação específicos para os compostos detetados que permitem confirmar a sua presença, bem como identificá-los e/ou quantificá-los <sup>16,17</sup>. Por fim, o último passo consiste na interpretação dos resultados obtidos, no contexto do caso, para tentar responder aos quesitos da perícia toxicológica <sup>16</sup>.

Uma questão crucial no âmbito de uma perícia é a manutenção da cadeia de custódia que é o processo que permite documentar a história cronológica das amostras, uma vez que nele estão registadas todas as movimentações e ações efetuadas pelos vários peritos, externos e internos ao laboratório, desde a recolha, o transporte, o manuseio até à sua análise no laboratório e armazenamento <sup>18,19</sup>.

### **1.3 O Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. e o Serviço de Química e Toxicologia Forenses, delegação do Centro**

A componente prática desta dissertação de mestrado foi desenvolvida no Serviço de Química e Toxicologia Forenses, Delegação do Centro (SQTF-C) do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. (INMLCF, I.P.), mais concretamente na Equipa III que tem como responsável a Dra. Paula Proença e Cunha.

Fazendo uma breve abordagem histórica, em 1918 foram criados os Institutos de Medicina Legal de Coimbra, Lisboa e Porto que trabalharam de modo independente até 2000, ano em que se criou o Instituto Nacional de Medicina Legal (INML), uma estrutura única com delegações em Coimbra (sede), Lisboa e Porto (respetivamente, delegações do Centro, Sul e Norte) e 27 Gabinetes Médico-Legais (definidos em 1998), que atuam na sua dependência. Atualmente, a designação INML foi alterada para INMLCF, devido ao crescimento das ciências forenses e à introdução de novas competências nestes domínios.

Cada delegação do INMLCF, I.P. é constituída por três serviços técnicos:

- Serviço de Clínica e Patologia Forenses, o qual é responsável pela realização de autópsias médico-legais, embalsamentos, identificação de cadáveres, exames de anatomia patológica forense, avaliação de danos provocados na integridade psicofísica no âmbito do direito penal, civil e do trabalho, exames de psiquiatria e psicologia forenses;

- Serviço de Genética e Biologia Forenses, no qual se realizam perícias e exames de identificação genética, nomeadamente, testes de paternidade, identificação individual e criminalística biológica;

- Serviço de Química e Toxicologia Forenses (SQTF) ao qual compete a realização de perícias e exames laboratoriais químicos e toxicológicos, no âmbito das atividades da delegação e dos Gabinetes Médico-Legais que se encontram na sua dependência, bem como a solicitação das autoridades e entidades para o efeito competentes ou do presidente do conselho diretivo.

O SQTF-C está dividido em três sectores: administrativo; receção, registo e armazenamento de amostras; e análises químicas e toxicológicas. Ao último compete o desenvolvimento, validação e execução de procedimentos de ensaio e o desenvolvimento de projetos científicos com interesse para o serviço ou para os seus clientes ou parceiros. Por sua vez, o setor das análises químicas e toxicológicas está dividido em cinco equipas, cada uma liderada por um responsável técnico e cuja individualização se baseia no tipo de tecnologia e conhecimentos necessários à execução dos procedimentos de ensaio:

- ⇒ Equipa I – auto analisadores (reações imuno-enzimáticas)
- ⇒ Equipa II – Cromatografia Gasosa acoplada a Espetrometria de Massa (GC-MS)
- ⇒ Equipa III – Cromatografia Líquida acoplada a Espetrometria de Massa (LC-MS)
- ⇒ Equipa IV – Cromatografia Gasosa com Detetor de Ionização de Chama (GC-FID)
- ⇒ Equipa V – Espectrofotometria (Ultravioleta/Visível e Absorção Atómica)

As análises toxicológicas desenvolvidas neste serviço permitem a determinação de álcool, medicamentos, drogas de abuso e substâncias psicotrópicas, pesticidas, monóxido de carbono, metais pesados, entre outros.

## 1.4 Importância médico-legal do estudo dos anti-hipertensores

Como já foi mencionado anteriormente, a prevalência da HTA é muito elevada na população adulta portuguesa (cerca de 42%), sendo que os AHTs fazem parte da terapêutica farmacológica, indicada na maioria dos casos. No entanto, mesmo com a administração destes fármacos, a maioria das pessoas não consegue obter o controlo desejado dos valores de TA, o que pode resultar em complicações e inclusive na morte. Deste modo, é fundamental, no âmbito da toxicologia clínica e forense, a existência de métodos analíticos validados para a determinação de AHTs.

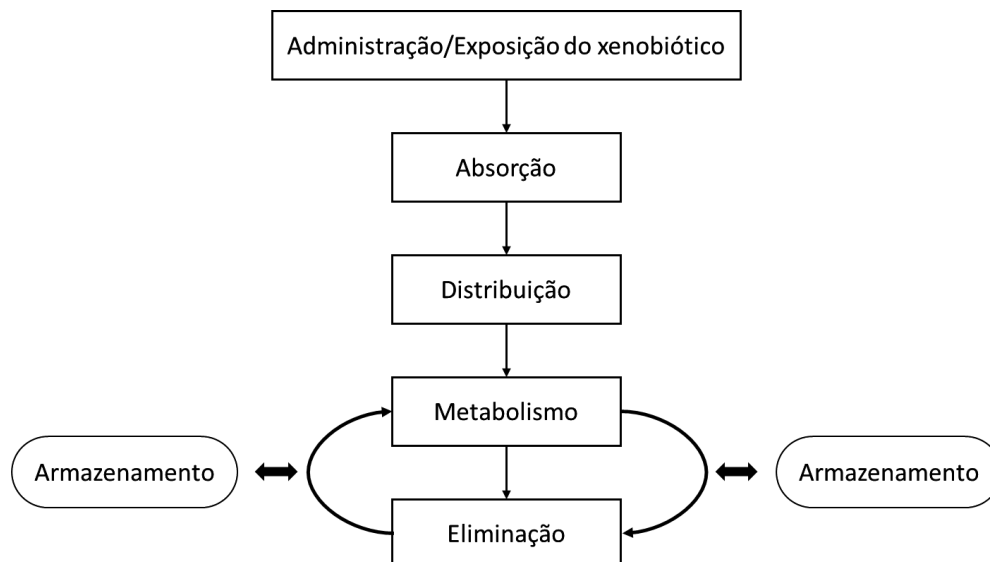
Além disto, a pesquisa destas substâncias é muitas vezes negligenciada por não se esperar que sejam a causa da morte, uma vez que são fármacos e a sua função é “fazer bem à saúde”, mas, de facto, podem estar envolvidos. Deste modo, as perícias toxicológicas podem ajudar no esclarecimento da causa da morte, pois não só a presença, mas também a ausência destes fármacos em amostras recolhidas de uma vítima pode, muitas vezes, ser uma informação vital na determinação das circunstâncias da morte. Por exemplo, se não se detetam nas análises toxicológicas *postmortem* AHTs e na verdade a pessoa sofria de HTA, cabe depois à investigação criminal averiguar se o doente estava medicado e, nesse caso, se foi ele que não tomou a medicação ou se foi um terceiro que não lha deu, com a intenção que daí resultassem complicações e, possivelmente, a morte.

É, por isso, importante compreender o efeito que cada fármaco, particularmente os presentes no mercado português, pode ter sobre um determinado indivíduo, incluindo em casos *postmortem*, ajudando assim, através da toxicologia clínica ou forense, a esclarecer a causa da morte ou o grau de influência, em situações relacionadas com a terapêutica da HTA.

## 1.5 Conceitos básicos de farmacocinética e farmacodinâmica

Antes de mais é necessário clarificar dois conceitos importantes em toxicologia: farmacocinética e farmacodinâmica. De uma forma muito simplificada, a farmacocinética é genericamente definida como o que o nosso organismo é capaz de fazer ao xenobiótico (substância exógena), enquanto a farmacodinâmica diz respeito ao que o xenobiótico faz ao nosso organismo.

A farmacocinética corresponde ao conjunto de processos a que uma substância é submetida ao longo do seu percurso pelo organismo e inclui: absorção, distribuição, metabolismo e eliminação/excreção (vulgarmente conhecida pelo acrónimo ADME), como esquematizado na figura 1.5. Estes processos controlam o grau de acesso da substância ao seu local de ação específico e determinam a extensão da sua ação. Por outro lado, a farmacodinâmica estuda a interação dos xenobióticos com os órgãos/tecidos-alvo e os respetivos efeitos biológicos ao longo do tempo <sup>20,21</sup>.



**Figura 1.5.** Processos envolvidos no movimento do xenobiótico através do organismo: absorção, distribuição, metabolismo e eliminação, para além do passo inicial de administração do xenobiótico. O último passo diz respeito à eliminação, armazenamento ou uma combinação dos dois <sup>20</sup>.

As vias de administração de fármacos ou outros xenobióticos podem ser classificadas em parentéricas e entéricas. Dentro das primeiras podemos distinguir as vias intravenosa, intramuscular, subcutânea, intradérmica, inalatória, ocular e vaginal, entre outras. Estas vias exibem, em geral, uma ação mais rápida, pois não estão dependentes do efeito da primeira passagem hepática. As entéricas, cuja administração ou absorção é feita pelo tubo digestivo, incluem as vias oral, sublingual e retal, sendo a via oral a via de administração mais utilizada na administração de xenobióticos e, por sua vez, também as intoxicações por esta via são as mais frequentes <sup>20,21</sup>. No caso dos AHTs, a via de administração mais comum é a oral, mas estes também podem ser administrados por via intravenosa ou sublingual, principalmente em casos de emergências hipertensivas, uma vez que a absorção é mais rápida e, conseqüentemente, os seus efeitos farmacológicos podem ser desencadeados num curto período de tempo.

Portanto, o modo de administração/exposição influencia o perfil farmacocinético do xenobiótico, com conseqüências diretas na sua ação biológica. De seguida, são abordados individualmente os processos envolvidos na farmacocinética, assim como alguns dos conceitos importantes inerentes a cada um deles.

### 1.5.1 Absorção

A absorção corresponde à passagem dos xenobióticos para a circulação sanguínea, sendo que uma das principais vias de absorção é a gastrointestinal, ainda que alguns compostos possam ser absorvidos na cavidade oral e no estômago. No que diz respeito à absorção gastrointestinal, a absorção dos xenobióticos ocorre preferencialmente ao nível do intestino delgado, mais especificamente no duodeno, jejuno e íleo, devido à

grande área de superfície disponível e ao tempo relativamente longo de contacto <sup>21,22</sup>. Como existe um gradiente de concentração o transporte efetua-se essencialmente por difusão passiva <sup>20</sup>.

A velocidade de absorção vai condicionar o tempo necessário para se atingir o pico máximo de concentração a nível plasmático, ou seja, uma velocidade de absorção maior vai originar um valor de concentração máxima num tempo menor <sup>21</sup>. A via de administração influencia o grau e a extensão da absorção, na medida em que, se o xenobiótico for administrado intravenosamente, a sua absorção é praticamente instantânea e o pico plasmático atinge-se mais rapidamente do que se for ingerido, uma vez que ao ser introduzido diretamente na corrente sanguínea, não necessita de atravessar as membranas lipídicas <sup>20</sup>.

Além disso, os xenobióticos administrados oralmente passam pelo fígado antes de entrarem na circulação sistémica e, por isso, estão sujeitos ao primeiro passo de metabolismo hepático, processo que altera o efeito biológico destas substâncias pois ocorre antes de estas serem distribuídas pelo organismo e de exercerem os seus efeitos farmacológicos <sup>20,22</sup>. Nesse sentido, a biodisponibilidade (F) de um xenobiótico, expressa em percentagem, corresponde à fração que, após uma administração oral, chega à circulação sistémica e pode exercer um determinado efeito biológico, comparado com o que ficaria disponível após uma injeção intravenosa <sup>20-22</sup>. Portanto, os xenobióticos que, numa primeira fase, são rapidamente metabolizados pelas enzimas hepáticas geralmente apresentam menores valores de F <sup>20,22</sup>.

A absorção do xenobiótico pode ser afetada por diversos fatores como, por exemplo, a presença de alimentos que retarda a sua absorção ou a própria formulação dos medicamentos <sup>21</sup>.

## 1.5.2 Distribuição

Após a absorção, os xenobióticos são geralmente distribuídos por diversos órgãos, nomeadamente o fígado e os rins, podendo circular dissolvidos no sangue, ligados a proteínas plasmáticas, às membranas ou aos eritrócitos, sendo que as proteínas plasmáticas constituem o principal mecanismo de ligação a xenobióticos e até de constituintes endógenos com destaque para a albumina, à qual se ligam a maioria dos xenobióticos ácidos, mas também, em menor escala, à globulina e à  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida (particularmente os básicos) <sup>21,22</sup>.

No entanto, apenas a fração livre do xenobiótico (biologicamente ativa) é capaz de atravessar as membranas por difusão passiva, acumulando-se em determinados tecidos que funcionarão como reservatórios. Por este motivo, a concentração total do xenobiótico é geralmente superior à sua concentração livre, podendo esta última ser aumentada substancialmente pela saturação das proteínas plasmáticas ou pela substituição do xenobiótico ligado por outro que tenha maior afinidade pelo local de ligação das proteínas plasmáticas <sup>21,22</sup>. Portanto, a ligação às proteínas plasmáticas depende de diversos fatores, nomeadamente, da concentração do xenobiótico, das afinidades relativas do xenobiótico e das proteínas e da afinidade do xenobiótico para outros compostos que possam estar presentes no plasma <sup>20</sup>.

O volume aparente de distribuição ( $V_d$ ), expresso em litros (L) ou litros por quilograma (L/Kg) de peso corporal, relaciona a quantidade do xenobiótico no organismo com a sua concentração plasmática, dando uma



indicação do volume de fluido no qual uma certa quantidade de xenobiótico tem de ser dissolvida para, em equilíbrio, se obter uma determinada concentração plasmática <sup>20,21</sup>. De um modo genérico, os compostos com grande ligação às proteínas plasmáticas têm baixo  $V_d$ , pois se a fração disponível para difundir para os tecidos é pequena, então é necessário menor volume de fluido para se atingir a correspondente concentração plasmática <sup>20,21</sup>.

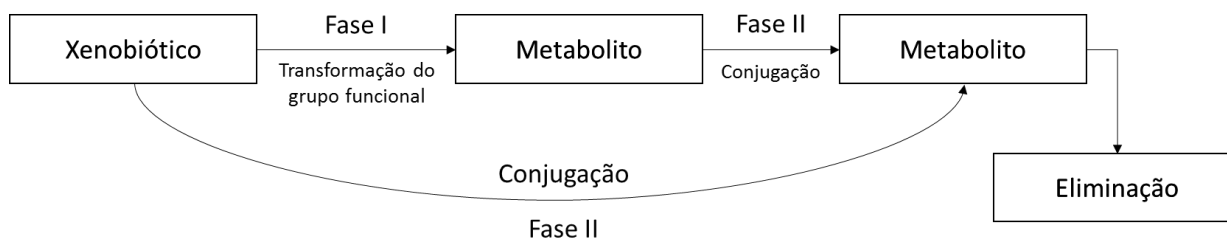
A distribuição dos xenobióticos é condicionada por diversos fatores, entre eles: as vias de administração, o coeficiente de partição do xenobiótico entre o sangue e o tecido, o grau de ionização ao pH plasmático, o tamanho molecular, a extensão da ligação a proteínas plasmáticas, os mecanismos de transporte através das membranas e o fluxo sanguíneo <sup>20-22</sup>.

### 1.5.3 Metabolismo

O processo metabólico também designado por biotransformação ocorre, para a maioria dos xenobióticos, ao nível do fígado <sup>22</sup>. Este é caracterizado por reações químicas que transformam os xenobióticos lipófilos, facilmente absorvidos, em compostos mais hidrófilos que, por apresentarem maior solubilidade em água, serão mais facilmente eliminados <sup>21</sup>.

As transformações metabólicas podem ser divididas essencialmente em duas fases, como esquematizado na figura 1.6: a fase I, onde ocorre a adição ou ativação de grupos funcionais através de reações de oxidação, redução, hidroxilação e hidrólise, e a fase II, caracterizada pela conjugação do xenobiótico ou do(s) metabolito(s) resultante(s) da fase I com compostos endógenos, onde se incluem as reações de conjugação com o ácido glucurónico (glucuronidação), sulfonação, acetilação, metilação, conjugação com a glutatona na forma reduzida ou aminoácidos <sup>21,22</sup>. As reações que ocorrem em ambas as fases são catalisadas por enzimas, com destaque, na fase I, para a família citocromo P450, expressa sobretudo no fígado (a subfamília CYP3A4 é responsável por cerca de 40% das reações de oxidação dos xenobióticos) e, na fase II, para a glucuronidação que constitui a principal via metabólica de conjugação <sup>20,21</sup>. Para a maioria dos xenobióticos as transformações metabólicas resultam de uma combinação das reações de fase I e fase II, originando metabolitos geralmente mais polares do que o xenobiótico inicial sendo, por isso, mais facilmente excretados do organismo <sup>22</sup>. Os metabolitos resultantes de ambas as fases podem ou não ser farmacologicamente ativos sendo que, em caso afirmativo, o perfil de ação do xenobiótico é alterado, no entanto, para a maioria dos xenobióticos, a sua forma glucoronada é farmacologicamente inativa <sup>20,22</sup>.

Portanto, a partir da administração de uma única substância, esta pode ser metabolizada por diferentes enzimas e dar origem a vários metabolitos, pelo que perceber o mecanismo de biotransformação das substâncias xenobióticas é essencial no âmbito da toxicologia forense <sup>20,21</sup>.



**Figura 1.6.** Fluxo geral do metabolismo, tendo em atenção que nem todas as vias metabólicas passam obrigatoriamente pela fase I <sup>20</sup>.

## 1.5.4 Eliminação

O último passo diz respeito à excreção do xenobiótico e/ou dos seus metabolitos do organismo que ocorre preferencialmente pela via renal através da urina, seguida pelas fezes, que inclui a via biliar <sup>20,21</sup>. Geralmente são utilizados dois termos para quantificar a taxa e a extensão da eliminação do xenobiótico do organismo: tempo de semivida e *clearance*.

O tempo de semivida ( $t_{1/2}$ ) corresponde ao tempo necessário para que a concentração sanguínea inicial do xenobiótico passe para metade, considerando um processo de primeira ordem, em que o ritmo de eliminação é, em cada momento, proporcional à quantidade de xenobiótico <sup>21</sup>. Por exemplo, se a dose ingerida for conhecida, o tempo de semivida pode ser usado juntamente com o volume de distribuição e biodisponibilidade para estimar o tempo decorrido desde a sua administração e vice-versa <sup>22</sup>.

A *clearance* (Cl), expressa geralmente em mL/min ou L/h, descreve o ritmo de eliminação de um xenobiótico do organismo em função da sua concentração plasmática <sup>21</sup>. No entanto, no contexto forense, este termo tem algumas limitações, uma vez que não fornece uma indicação imediata da permanência do xenobiótico no organismo pois está dependente do volume de distribuição, ou seja, se este for maior, o volume de fluido do qual o xenobiótico tem de ser eliminado é maior <sup>22</sup>.

Um dos fatores fisiológicos que mais influencia a taxa de excreção renal do xenobiótico é o pH da urina. Este é geralmente ácido (6-6,5), sendo que as substâncias básicas são mais facilmente excretadas a pH baixo e vice-versa <sup>21,22</sup>.

Os xenobióticos e os seus metabolitos presentes no fígado podem ser excretados para a biliar e, posteriormente, para o jejuno onde, por sua vez, podem ser reabsorvidos ou passar para as fezes <sup>21,22</sup>. Este processo de reciclagem dos xenobióticos e que prolonga a sua persistência no organismo é designado de circulação entero-hepática <sup>22</sup>. Deste modo, pela via fecal apenas são excretados os compostos não absorvidos por via gastrointestinal, segregados pelo lúmen e/ou excretados pela biliar <sup>21</sup>. Além deste processo, os xenobióticos podem acumular-se no plasma ou nos tecidos se for administrada mais do que uma dose em simultâneo ou se o intervalo entre elas for inferior ao tempo necessário para que ocorra a sua eliminação. Este

problema de acumulação tem um interesse particular para os toxicologistas porque as concentrações elevadas resultantes deste processo podem induzir toxicidade <sup>22</sup>.

O conhecimento dos parâmetros farmacocinéticos de um xenobiótico no organismo são importantes no âmbito da toxicologia, pois quando há suspeita de intoxicação, fatal ou não, é crucial a caracterização inequívoca do xenobiótico, bem como a sua quantificação nas amostras biológicas e uma correta interpretação dos resultados da análise toxicológica <sup>21</sup>. Assim, conhecer os processos de biotransformação do xenobiótico, a sua distribuição no organismo ou redistribuição no cadáver, bem como os órgãos reservatório de alguns xenobióticos, são determinantes para a obtenção de resultados fiáveis e robustos <sup>21</sup>.

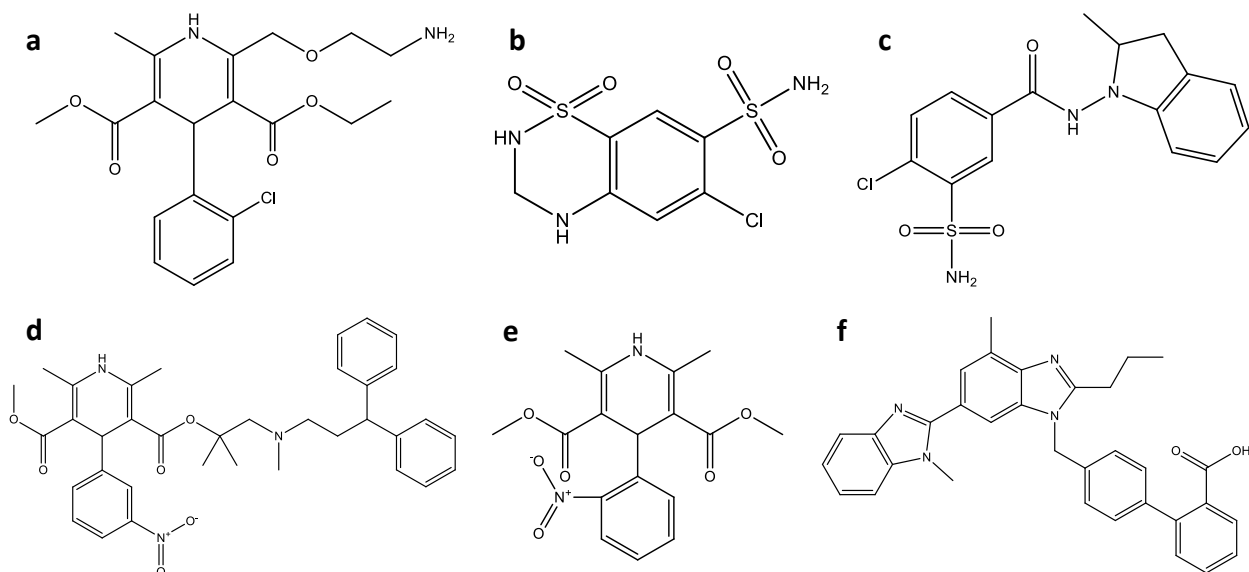
Portanto, o trabalho do toxicologista forense é obter os resultados analíticos sobre o xenobiótico e/ou os seus metabolitos a partir das amostras biológicas disponíveis e com base no metabolismo e mecanismos do xenobiótico responder a questões forenses relevantes <sup>20</sup>.

No entanto, é importante ter em atenção que a farmacocinética dos xenobióticos varia em função do estado patológico, do grupo etário e do sexo, entre outros fatores. Por exemplo, as doenças hepáticas levam a um enfraquecimento dos processos metabólicos, uma vez que o fígado é o principal órgão de metabolização, assim como as doenças renais causam uma diminuição da capacidade de excreção dos xenobióticos e/ou dos seus metabolitos, provocando alterações significativas na farmacocinética destes compostos. Do mesmo modo, as crianças e os idosos têm uma capacidade diminuída de metabolização e excreção dos xenobióticos comparada com os adultos, como consequência da não completa maturação destes órgãos e do envelhecimento fisiológico do corpo, respetivamente <sup>22</sup>. Por este motivo na interpretação dos resultados analíticos há que ter sempre em conta a variabilidade intra e interindividual.

## 1.6 Fármacos anti-hipertensores

De entre os fármacos AHTs mais comercializados em Portugal, os selecionados para a realização deste estudo foram a amlodipina (AML), a hidroclorotiazida (HCTZ), a indapamida (IND), a lercanidipina (LER), a nifedipina (NIF) e o telmisartan (TEL), cujas estruturas químicas estão apresentadas na figura 1.7, uma vez que também correspondem aos padrões existentes no SQTIF-C.

Na tabela 1.5 encontram-se listados os nomes comerciais dos AHTs anteriormente referidos de acordo com o Índice Nacional Terapêutico (2016) <sup>23</sup> e a INFARMED, I.P. <sup>24</sup>, sendo de notar que para cada um deles existem ainda diversos fármacos genéricos que não estão contemplados.



**Figura 1.7.** Estruturas químicas dos seis AHTs estudados: (a) amlodipina; (b) hidroclorotiazida; (c) indapamida; (d) lercanidipina; (e) nifedipina; (f) telmisartan.

**Tabela 1.5.** Nomes comerciais disponíveis em Portugal para os AHTs selecionados para este estudo.

Anti-hipertensor	Nome comercial
<b>Amlodipina</b>	Norvasc®
<b>Hidroclorotiazida</b>	- <sup>1</sup>
<b>Indapamida</b>	Fludex®, Fluidema®, Tandix®
<b>Lercanidipina</b>	Zanikor®, Zanidip®
<b>Nifedipina</b>	Adalat®
<b>Telmisartan</b>	Micardis®, Pritor®

<sup>1</sup> Só está disponível em associação com outro AHT (ex: MicardisPlus®, PritorPlus® - telmisartan + hidroclorotiazida).

Algumas propriedades físico-químicas dos AHTs selecionados estão sumariadas na tabela 1.6, enquanto as doses terapêuticas, concentrações terapêuticas, tóxicas e fatais em plasma estão apresentadas na tabela 1.7. De referir que não foram encontrados dados referentes às respetivas concentrações em sangue, uma vez que a maioria dos estudos realizados e disponíveis são em plasma.

**Tabela 1.6.** Propriedades físico-químicas (fórmula química, massa molar, constante de dissociação a 25°C, coeficiente de partição óleo/água) dos AHTs em estudo <sup>25</sup>.

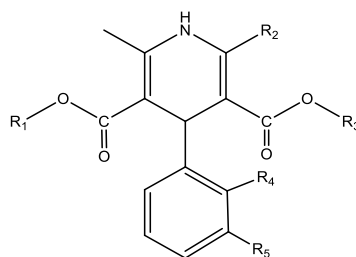
<i>Anti-hipertensor</i>	<i>Fórmula Química</i>	<i>Massa Molar (g/mol)</i>	<i>Constante de dissociação (pKa)</i>	<i>Coeficiente de partição (logP)</i>
<i>Amlodipina</i>	C <sub>20</sub> H <sub>25</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	408,876	9,45	1,64
<i>Hidroclorotiazida</i>	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	297,739	-2,70; 9,09	0,58
<i>Indapamida</i>	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	365,835	0,01; 8,85	2,64
<i>Lercanidipina</i>	C <sub>36</sub> H <sub>41</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	611,727	9,36	6,41
<i>Nifedipina</i>	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	346,335	5,33	1,82
<i>Telmisartan</i>	C <sub>33</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	514,610	3,65; 6,13	6,04

**Tabela 1.7.** Doses terapêuticas, concentrações terapêuticas, tóxicas e fatais em plasma para cada um dos AHTs <sup>11,26-30</sup>.

<b>Anti-hipertensor</b>	<b>Dose terapêutica (mg/dia)</b>	<b>Concentrações em sangue-plasma (ng/mL)</b>		
		Terapêuticas	Tóxicas	Fatais
<b>Amlodipina</b>	10	5-15	88	100-200
<b>Hidroclorotiazida</b>	25-200	40-2000	-	-
<b>Indapamida</b>	2,5-5	140-263	-	-
<b>Lercanidipina</b>	10-20	1,2-13,6	-	-
<b>Nifedipina</b>	15-60	25-100	150-200	1200-5400
<b>Telmisartan</b>	40-80	-	-	-

## 1.6.1 Amlodipina

A amlodipina é um bloqueador dos canais de cálcio (BCC) pertencente à classe das 1,4-di-hidropiridinas (figura 1.8) e é usada no controlo da HTA e no tratamento da angina de peito <sup>31,32</sup>. Terapeuticamente, é administrada na forma de mistura racémica, no entanto, apenas o enantiómero S possui efeito vasodilatador <sup>33</sup>.

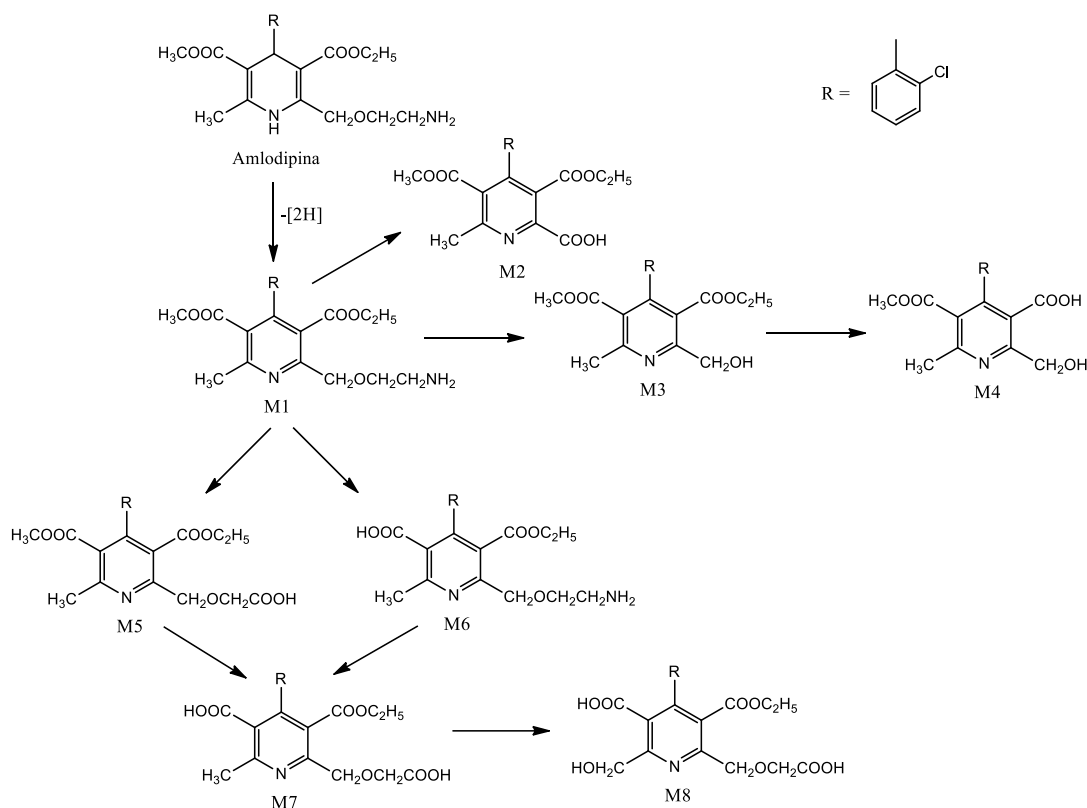


**Figura 1.8.** Estrutura química geral dos bloqueadores dos canais de cálcio da classe das 1,4-di-hidropiridinas <sup>28</sup>.

## Farmacocinética

Após administração oral, a amlodipina é lentamente absorvida, atingindo-se o pico plasmático em 6 a 12 h<sup>31</sup>. No entanto, a sua absorção é quase completa, não sendo afetada pela presença de alimentos<sup>31</sup>. A sua biodisponibilidade após administração oral é relativamente elevada, variando entre 60 e 65%<sup>34</sup>.

Possui uma elevada afinidade para as proteínas plasmáticas com uma percentagem de ligação a estas superior a 95% e apresenta um volume de distribuição de 21 L/kg<sup>32</sup>. É extensivamente metabolizada no fígado, sem um primeiro passo de metabolismo significativo<sup>34</sup>. A biotransformação da amlodipina, esquematizada na figura 1.9, envolve, numa primeira fase, a sua oxidação e formação do seu derivado piridínico (M1) com subsequente desaminação oxidativa do grupo 2-aminoetoximetilo, hidrólise do grupo 5-metoxicarbonilo e hidroxilação alifática do grupo metilo, sendo que os seus metabolitos não possuem atividade farmacológica<sup>35-38</sup>.



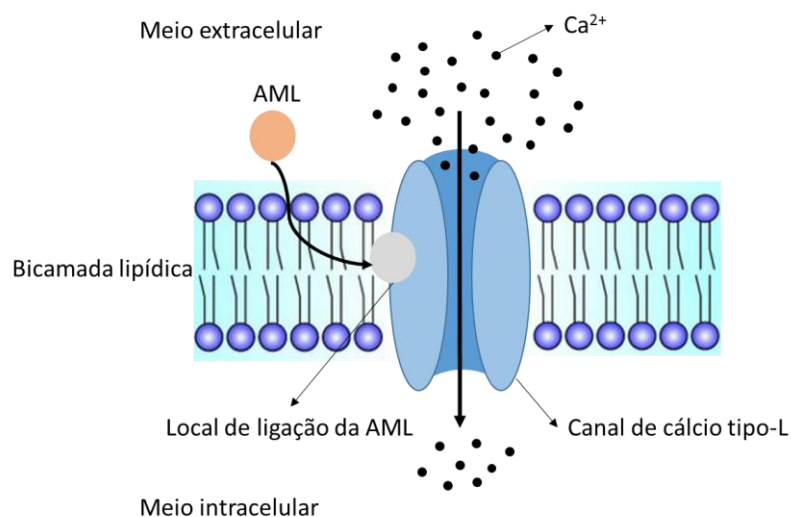
**Figura 1.9.** Processo de biotransformação proposto para a amlodipina no homem com base nos metabolitos (M1 a M8) encontrados na urina após administração oral<sup>37,38</sup>.

A amlodipina tem um longo tempo de semivida variando entre 34 e 45 h, valores estes que aumentam para 56 e 65 h em indivíduos com doenças hepáticas e idosos, respetivamente.<sup>30,32</sup> A *clearance* é de 18,5 L/h nos idosos e 24,6 L/h nos indivíduos mais jovens, também referida globalmente como sendo 7 mL/min/kg<sup>29</sup>. Os seus metabolitos são predominantemente excretados na urina (cerca de 60%), no entanto, aproximadamente,

20 a 25% são eliminados pela bÍlis e apenas 10% da dose de amlodipina é excretada na sua forma inalterada <sup>29,37</sup>. Se tomada de forma continuada não há evidências de fenômenos de acumulação <sup>31</sup>.

## Mecanismo de Ação

Os BCC, de que é exemplo a amlodipina, atuam ao nível dos canais de cálcio dependentes da voltagem do tipo L (de longa duração) localizados nas células do tecido muscular liso, inibindo o influxo transmembranar dos iões cálcio para o meio intracelular por bloqueio destes canais, como ilustrado na figura 1.10 <sup>34,39-42</sup>. Deste modo, há uma redução da concentração de cálcio intracelular que resulta no relaxamento do tecido muscular liso dado que os iões cálcio são responsáveis pela contração da musculatura lisa, na diminuição da resistência vascular periférica e, conseqüentemente, no decréscimo desejado dos valores de TA <sup>40,43-45</sup>.



**Figura 1.10.** Local de ação da amlodipina: atuação ao nível dos canais de cálcio dependentes da voltagem do tipo L e inibição do influxo de cálcio para o meio intracelular.

### 1.6.2 Hidroclorotiazida

A hidroclorotiazida é um diurético tiazídico prescrito, desde os anos 60, para o tratamento da HTA ligeira a moderada <sup>46</sup>. Em Portugal, é prescrita em combinação com outros fármacos AHTs com diferentes mecanismos de ação, nomeadamente, BCC, bloqueadores  $\beta$ , inibidores da enzima de conversão da angiotensina e antagonistas dos recetores de angiotensina II <sup>31,47</sup>.

## Farmacocinética

Quando administrada por via oral, a sua absorção é rápida e ocorre preferencialmente ao nível do duodeno e jejuno, atingindo o pico plasmático em 2 a 4 h <sup>29,48</sup>. No entanto, a sua absorção é incompleta, uma vez que apenas 65% do fármaco administrado é absorvido, valor que aumenta para 75% se este for administrado na presença de alimentos no trato gastrointestinal <sup>48</sup>. A biodisponibilidade varia entre 65 e 70% <sup>29</sup>.

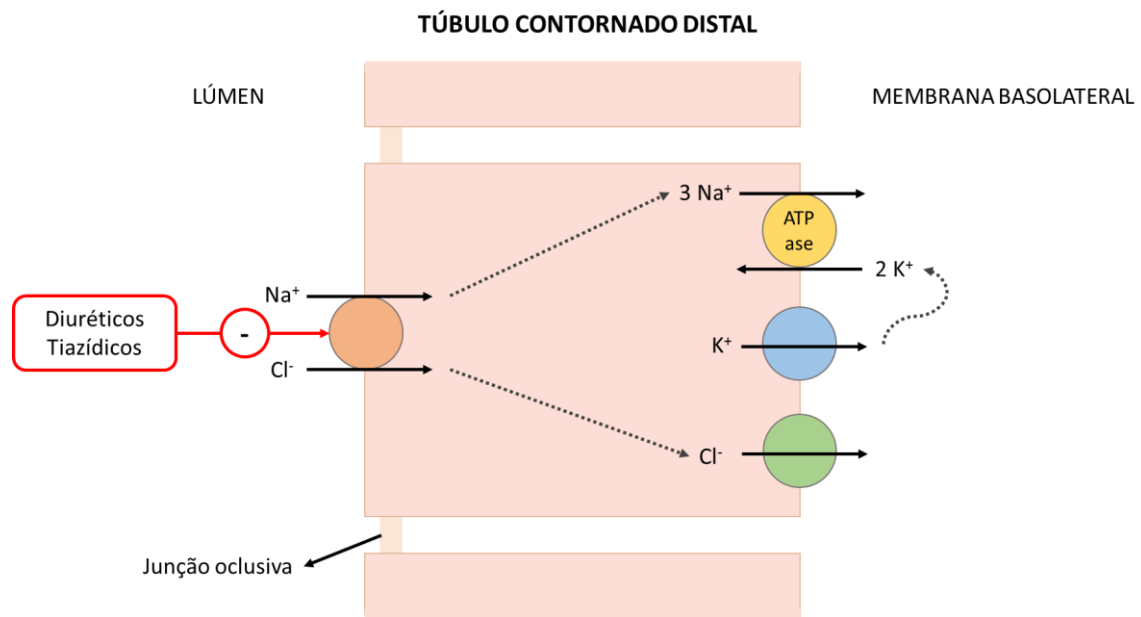
A fração ligada a proteínas plasmáticas corresponde a cerca de 60% da dose administrada e apresenta um volume de distribuição de, aproximadamente, 0,8 L/kg <sup>29</sup>. De referir que, no caso das mulheres, durante a gravidez e amamentação, é necessário ter em atenção que a hidroclorotiazida é capaz de atravessar a membrana placentária e é distribuída para o leite materno, respetivamente <sup>29</sup>.

A hidroclorotiazida acumula-se nos eritrócitos, sendo que a razão entre estas células e o plasma é de 3,5:1 <sup>48</sup>. Este fármaco não sofre metabolização, uma vez que mais de 95% da dose administrada é excretada na sua forma inalterada na urina <sup>46,48</sup>. O tempo de semivida é relativamente pequeno, variando entre 10 e 12 h e a *clearance* renal é de, aproximadamente, 335 mL/min <sup>30,48</sup>.

## Mecanismo de Ação

Os diuréticos tiazídicos, classe farmacológica onde está incluída a hidroclorotiazida, atuam ao nível do rim, mais propriamente no túbulo contornado distal por inibição do transportador de sódio/cloro <sup>49</sup>. Este é responsável pelo transporte de sódio e cloro do lúmen para o túbulo contornado distal, iões que posteriormente são transportados para a membrana basolateral, respetivamente, através de uma bomba de sódio-potássio ATPase e de um canal iónico permeável a cloro. O gradiente assim gerado conduz à reabsorção de água por osmose para a membrana basolateral. Deste modo, quando o transporte de Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> é inibido, há um aumento da concentração destes iões no lúmen, que resulta no aumento do volume urinário por inibição da reabsorção de água. Deste modo, o volume do fluido extracelular é menor e, conseqüentemente, há uma redução do débito cardíaco que se traduz na diminuição dos valores de TA <sup>49</sup>. O mecanismo de ação dos diuréticos tiazídicos está ilustrado na figura 1.11.





**Figura 1.11.** Processo de reabsorção de  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  no túbulo contornado distal e local de ação dos diuréticos tiazídicos. Os círculos azul e verde representam canais iônicos permeáveis, respectivamente, a  $\text{K}^+$  e a  $\text{Cl}^-$ , o laranja o transportador  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  e o amarelo a bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  dependente de ATP.

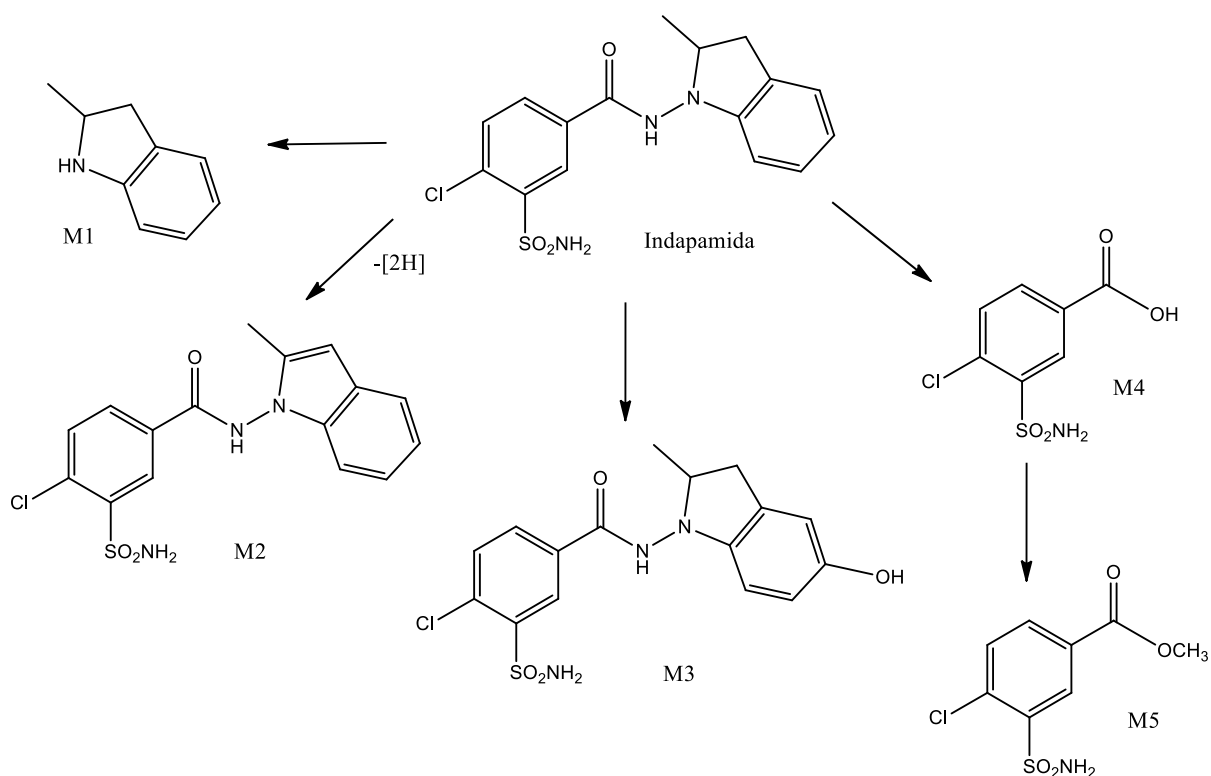
### 1.6.3 Indapamida

A indapamida pertence à classe dos diuréticos tiazídicos e análogos e foi desenvolvida no início dos anos 70 para o tratamento da HTA ligeira a moderada e edema<sup>50,51</sup>. Diferencia-se quimicamente dos diuréticos tiazídicos por não apresentar o anel tiazídico, ter apenas um grupo sulfonamida e possuir um anel 2-metil-indol que lhe confere propriedades lipofílicas<sup>27,51,52</sup>.

### Farmacocinética

A indapamida é rápida e completamente absorvida no trato gastrointestinal após uma administração oral, sendo o pico plasmático atingido em apenas 2-3 h, o que pode estar relacionado com a sua lipofilicidade<sup>26,27,50,53</sup>. Uma vez absorvida, a indapamida é amplamente distribuída pelo organismo ligando-se em grande extensão, no sangue, aos eritrócitos (80%) e, no plasma, às proteínas plasmáticas (76-79%)<sup>53</sup>. A razão entre o sangue total e o plasma é de, aproximadamente, 6:1 por volta do pico plasmático, reduzindo para cerca de 4:1 após 8 h, pelo que a concentração de indapamida em sangue total é muito superior à em plasma<sup>26,51,54</sup>. O volume aparente de distribuição é de, aproximadamente, 25 L<sup>50</sup>. A sua biodisponibilidade não é afetada pela presença de alimentos e não existem evidências de estar sujeita ao efeito de primeira passagem<sup>27,50</sup>.

É extensivamente metabolizada no fígado em 19 metabolitos pelo citocromo P450, nomeadamente pelas isoenzimas CYP3A4 e CYP2C19, sendo que menos de 5% da dose total administrada é recuperada na urina na sua forma inalterada <sup>26,55</sup>. Na figura 1.12 encontram-se os principais metabolitos da indapamida encontrados na urina, com destaque para a didesidroindapamida (M2) que resulta da desidrogenação ou oxidação do composto inicial e para a hidroxilo-indapamida (M3) originada a partir da introdução de um grupo hidroxilo (-OH) no anel indol da indapamida <sup>55</sup>. Segundo Caruso *et al.* (1983) <sup>50</sup>, o metabolito principal (M3), em animais, apresenta menor atividade anti-hipertensora do que o composto inicial, nada se sabendo acerca da atividade farmacológica dos restantes metabolitos.



**Figura 1.12.** Metabolismo da indapamida no homem após administração oral <sup>26,55</sup>.

A eliminação é bifásica com uma eliminação inicial rápida, seguida de uma fase mais longa, sendo o tempo de semivida de, aproximadamente, 16 h <sup>26</sup>. Cerca de 60% da dose administrada é eliminada através da urina, enquanto 20% é excretada nas fezes através da biliar <sup>26</sup>. Os compostos conjugados representam, aproximadamente, 18% dos compostos excretados, dos quais 14% são compostos glucuronados <sup>50</sup>. Ao nível dos rins ocorre uma extensa reabsorção do fármaco, pois a *clearance* renal é de apenas 5 mL/min, representando menos do que 10% da *clearance* sistêmica total, o que mostra a importância da *clearance* hepática (1,58 L/min) <sup>26,27,50</sup>. Não se observa acumulação de indapamida quando tomada de forma continuada <sup>26,50</sup>.

## Mecanismo de Ação

Dado que a indapamida pertence à mesma classe farmacológica da hidroclorotiazida (diuréticos tiazídicos e análogos), o seu mecanismo de ação é equivalente. No entanto, a indapamida tem um efeito diurético limitado a baixas concentrações, uma vez que a maioria do composto ativo é reabsorvido no túbulo proximal do rim antes de alcançar a área onde exerce a sua atividade diurética, o que sugere que a sua atividade anti-hipertensora pode também estar relacionada com as suas propriedades de agente vasodilatador <sup>26,51</sup>. Também segundo Caruso *et al.* (1983) <sup>50</sup>, a indapamida exerce a sua ação anti-hipertensora através de um duplo mecanismo – diurético (diminuição do débito cardíaco) e vasodilatador direto (diminuição da resistência vascular periférica) – com a consequente redução dos valores de TA.

### 1.6.4 Lercanidipina

A lercanidipina é um BCC, pertencente à classe das 1,4-di-hidropiridinas de terceira geração, utilizada no tratamento da HTA ligeira a moderada <sup>41,56,57</sup>. Os fármacos da primeira geração, de que é exemplo a nifedipina, são caracterizados por ter um início de ação rápido mas baixa seletividade, duração de ação e tempo de semivida pequenos <sup>58,59</sup>. Uma vez que se pretendia que os BCC tivessem maior seletividade, para diminuir os efeitos colaterais, e início de ação gradual e duração de ação longa que pudesse permitir uma única toma diária, surgiram os fármacos de segunda geração, como a amlodipina, que apesar de terem uma duração de ação mais longa possuem um tempo de semivida muito grande <sup>58-60</sup>. Deste modo, a lercanidipina, sendo uma di-hidropiridina de terceira geração, possui modificações estruturais que permitiram aumentar as suas propriedades lipofílicas e, consequentemente, aumentar a seletividade, possuir um início de ação gradual e a duração de ação longa, associados a um tempo de semivida relativamente pequeno que permite uma única toma diária <sup>57,58,60</sup>. De facto, a lercanidipina tem um dos maiores logP no que se refere aos BCC <sup>58,61</sup>. Esta é administrada na forma de mistura racémica, no entanto, está demonstrado que o enantiómero S é o que possui maior efeito anti-hipertensor <sup>13,56,61</sup>.

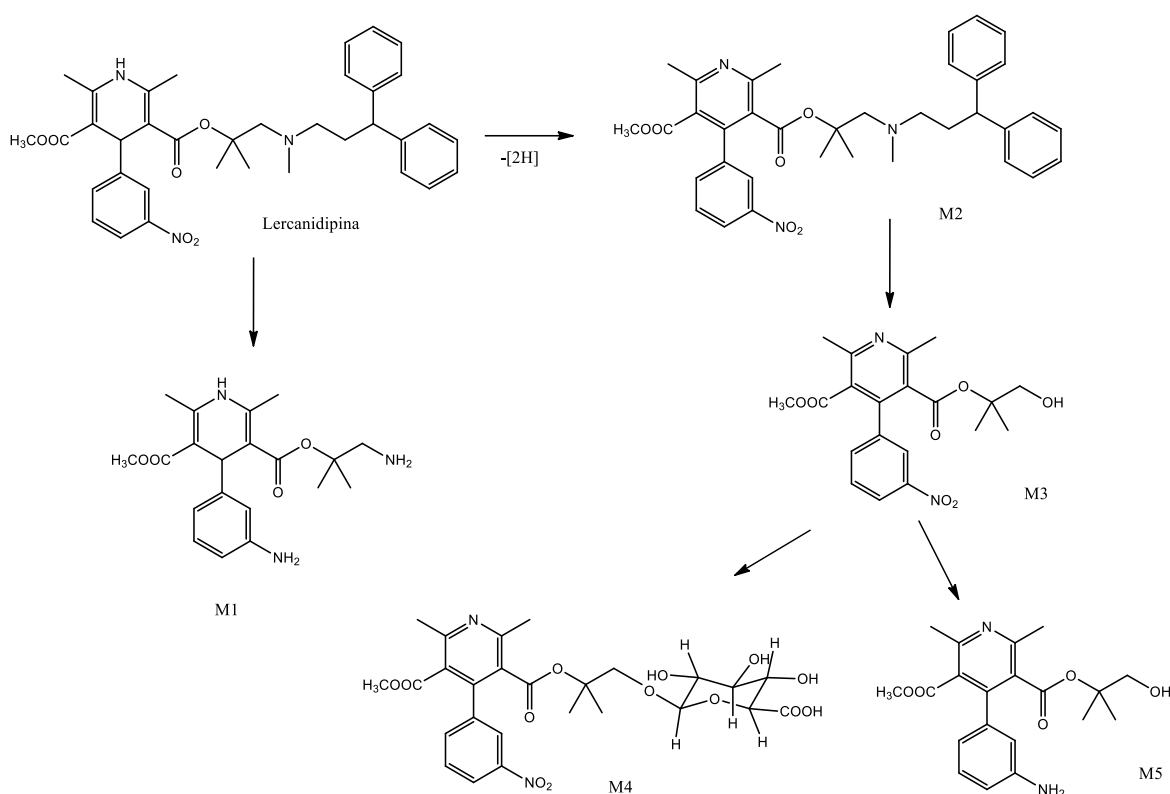
### Farmacocinética

Após administração oral, a absorção a partir do trato gastrointestinal é rápida e praticamente completa, sendo o pico plasmático atingido em 2 a 3 h <sup>11,61</sup>. A biodisponibilidade da lercanidipina é relativamente baixa em consequência do extenso metabolismo de primeira passagem <sup>59,61</sup>. A presença de alimentos aumenta a sua absorção e a biodisponibilidade, pelo que se recomenda que esta seja tomada antes das refeições <sup>11,59,61</sup>.

Mais do que 98% do fármaco encontra-se ligado a proteínas plasmáticas, não se ligando em grande extensão aos eritrócitos <sup>59,61</sup>. A distribuição para os tecidos e órgãos é rápida e extensa e o volume aparente de distribuição está compreendido entre 2 e 2,5 L/kg <sup>11,61</sup>. Devido à sua lipofilicidade, a lercanidipina é rapidamente eliminada

do plasma e acumula-se na bicamada fosfolipídica das membranas celulares das artérias, onde interage gradualmente com os canais de cálcio tipo L, o que explica o seu lento início de ação e o efeito de relaxamento muscular persistente <sup>11,59,60,62</sup>.

A lercanidipina, quando administrada oralmente, é extensivamente metabolizada pelo citocromo P450 (CYP3A4), sendo que a sua principal via de biotransformação em humanos envolve a aromatização do anel heterocíclico (M2) e reações de hidroxilação (M3), nitroredução (M1 e M5), N-desalquilação (M1) e O-glucuronidação (M4), como esquematizado na figura 1.13 <sup>13,59,61</sup>. O principal metabolito encontrado em plasma é M3, seguido de M4 que, no entanto, não possuem atividade farmacológica <sup>11,61</sup>.



**Figura 1.13.** Principais vias de biotransformação para a lercanidipina no homem após administração oral <sup>59,61</sup>.

Cerca de 50% da dose administrada é eliminada nas fezes e 44% na urina, essencialmente na forma de metabolitos, em consequência do extenso metabolismo sofrido pela lercanidipina <sup>11,59,61</sup>. O tempo de semivida plasmática é de 2-5 h <sup>59,61</sup>. O perfil farmacocinético não é alterado em pacientes mais idosos, com insuficiência hepática ligeira ou com insuficiência renal ligeira a moderada, o mesmo não se verificando em indivíduos com disfunção hepática ou renal severas, nos quais ocorre acumulação de lercanidipina após administração continuada <sup>11,13,61</sup>. Esta não deve ser administrada durante a gravidez ou lactação, nem conjuntamente com outros fármacos que atuem ao nível do CYP3A4 <sup>11,13</sup>.

## Mecanismo de Ação

O mecanismo de ação da lercanidipina é equivalente ao já descrito para a amlodipina, uma vez que pertencem à mesma classe farmacológica (BCC).

### 1.6.5 Nifedipina

A nifedipina é um BCC, pertencente à classe das 1,4-di-hidropiridinas, principalmente usada para o tratamento da HTA, angina de peito, aterosclerose e outras doenças vasculares<sup>39,42,63</sup>. Está também indicada para o tratamento da HTA durante a gravidez<sup>64</sup>. Quimicamente, a nifedipina possui uma característica indesejável que é a sua elevada fotossensibilidade<sup>42,65</sup>.

### Farmacocinética

A nifedipina é um fármaco lipofílico que é rápida e completamente absorvido após administração oral ou sublingual, atingindo-se o pico plasmático em 1 a 2 h<sup>29,63,64,66</sup>. Após administração oral, a sua biodisponibilidade é relativamente baixa (40-60%), uma vez que está sujeita ao metabolismo pré-sistémico<sup>42,64,67</sup>.

Encontra-se extensivamente ligada a proteínas plasmáticas com uma percentagem de ligação a estas que varia entre 92 e 98% e apresenta um volume de distribuição de, aproximadamente, 0,8 L/kg<sup>29</sup>. É extensivamente metabolizada no fígado por ação do citocromo P450, nomeadamente pela isoenzima CYP3A4, em metabolitos farmacologicamente inativos<sup>39,64,66</sup>. A biotransformação da nifedipina, esquematizada na figura 1.14, envolve, numa fase inicial, a oxidação do anel di-hidropiridínico e a formação do seu derivado piridínico (M1 – didesidronifedipina) que é o principal metabolito encontrado no plasma<sup>66-68</sup>. Posteriormente, ocorre a hidrólise de um dos grupos éster e a formação do ácido carboxílico correspondente (M2), a hidroxilação do grupo metilo adjacente ao grupo carboxílico (M3-a) e a consequente formação da lactona correspondente (M3-b), metabolitos estes que são depois excretados na urina<sup>66-68</sup>.

O tempo de semivida da nifedipina é pequeno (2-5 h), pelo que é necessário que esta seja administrada duas a três vezes ao dia<sup>63,64</sup>. A *clearance* é de aproximadamente 7 mL/min/kg<sup>29,66</sup>. Os seus metabolitos são predominantemente excretados na urina (70 a 90% da dose administrada), embora uma pequena fração seja eliminada nas fezes (cerca de 15%)<sup>29</sup>. De referir que existe uma grande variabilidade interindividual na farmacocinética e resposta farmacológica à nifedipina<sup>39,66</sup>.

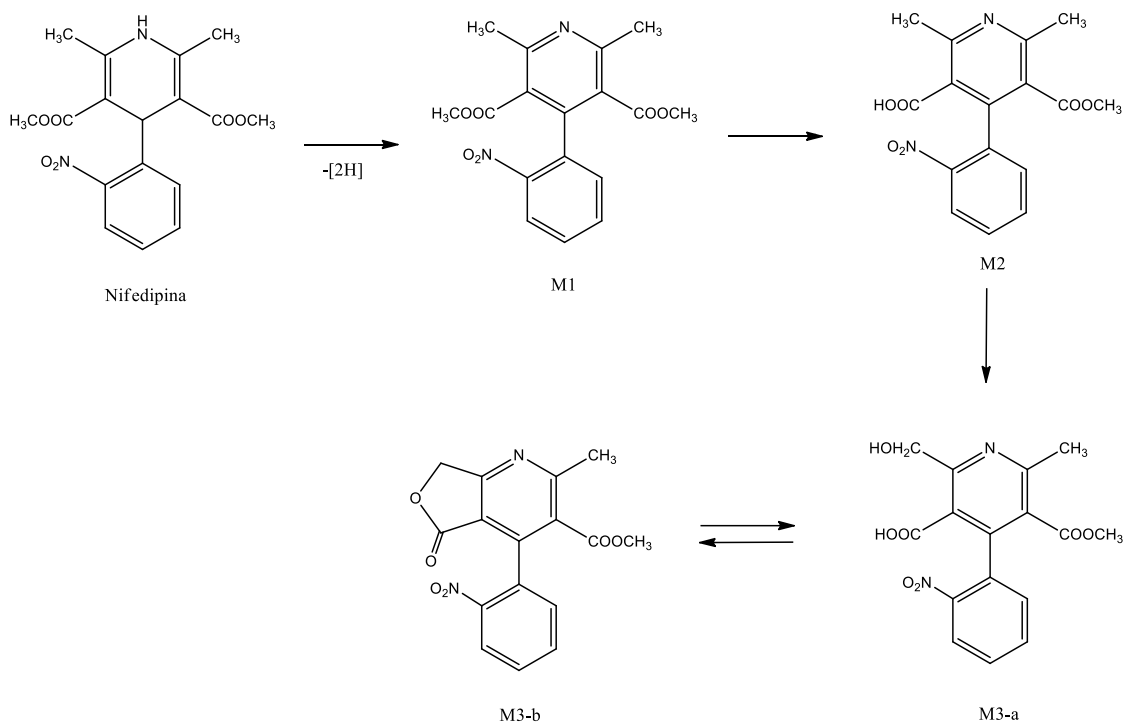


Figura 1.14. Biotransformação da nifedipina no homem <sup>66-68</sup>.

## Mecanismo de Ação

Uma vez que a nifedipina pertence à mesma classe farmacológica da amlodipina e da lercanidipina (BCC), é caracterizada pelo mesmo tipo de mecanismo de ação.

### 1.6.6 Telmisartan

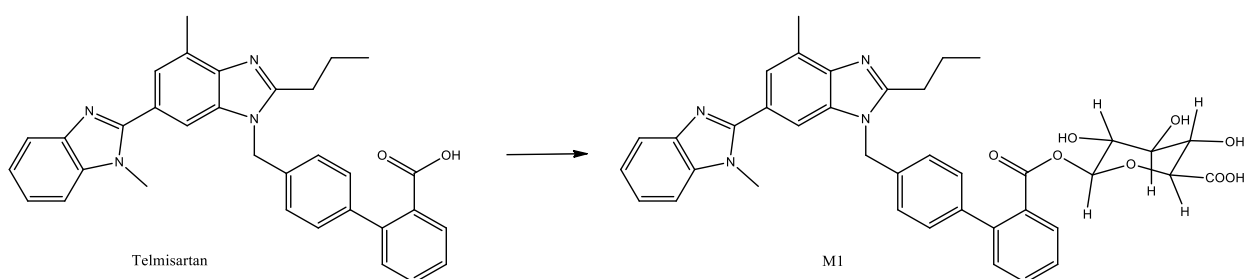
O telmisartan pertence à classe dos antagonistas dos recetores de angiotensina II (ARA), vulgarmente designados de “sartans”, sendo largamente utilizado para o tratamento da HTA e insuficiência cardíaca, uma vez que permite obter o controlo dos valores de TA durante 24 h com a toma de uma única dose diária <sup>69-71</sup>.

### Farmacocinética

Após administração oral, o telmisartan é rapidamente absorvido, devido à sua elevada lipofilicidade, sendo o pico plasmático atingido em 0,5 a 1 h <sup>71-74</sup>. No entanto, a sua absorção não é completa, correspondendo apenas a cerca de 50% da dose administrada <sup>72,74</sup>. A sua biodisponibilidade após administração é relativamente baixa (aproximadamente, 43%), não sendo afetada pela presença de alimentos <sup>71,72</sup>.

Possui uma elevada afinidade para as proteínas plasmáticas, principalmente para a albumina, mas também para outras proteínas como a  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida e lipoproteínas, com uma ligação a estas superior a 99,5% e apresenta um volume de distribuição de 500 L <sup>71,72,74,75</sup>.

O telmisartan é exclusivamente metabolizado por conjugação com o ácido glucurónico (glucoronidação) em humanos no intestino delgado e fígado com a formação da correspondente forma acilglucoronada (figura 1.15), farmacologicamente inativa, que corresponde a apenas 11% da concentração plasmática <sup>71,76,77</sup>. Este é o único metabolito do telmisartan detetado em humanos, não tendo sido identificado nenhum metabolito de fase I, o que demonstra que este AHT não é metabolizado pelo citocromo P450 <sup>71,72</sup>.



**Figura 1.15.** Metabolismo do telmisartan em humanos <sup>76</sup>.

Após uma fase de distribuição rápida, segue-se uma fase longa de eliminação, uma vez que o telmisartan apresenta um tempo de semivida de, aproximadamente, 24 h, compatível com a toma de apenas uma dose diária, e a *clearance* é superior a 800 mL/min <sup>71,75,78</sup>. A maior parte da dose administrada oralmente é quase exclusivamente excretada através da biliar nas fezes (>98%), sendo a excreção urinária insignificante (1-2%) <sup>71,72</sup>. Nas fezes, praticamente todo o fármaco encontra-se na sua forma inalterada, enquanto na pequena fração excretada pelos rins, a forma acilglucoronada é a predominante <sup>71,72,74</sup>. Não há evidências de circulação enterohepática ou de acumulação do telmisartan ou do seu metabolito no organismo <sup>72</sup>.

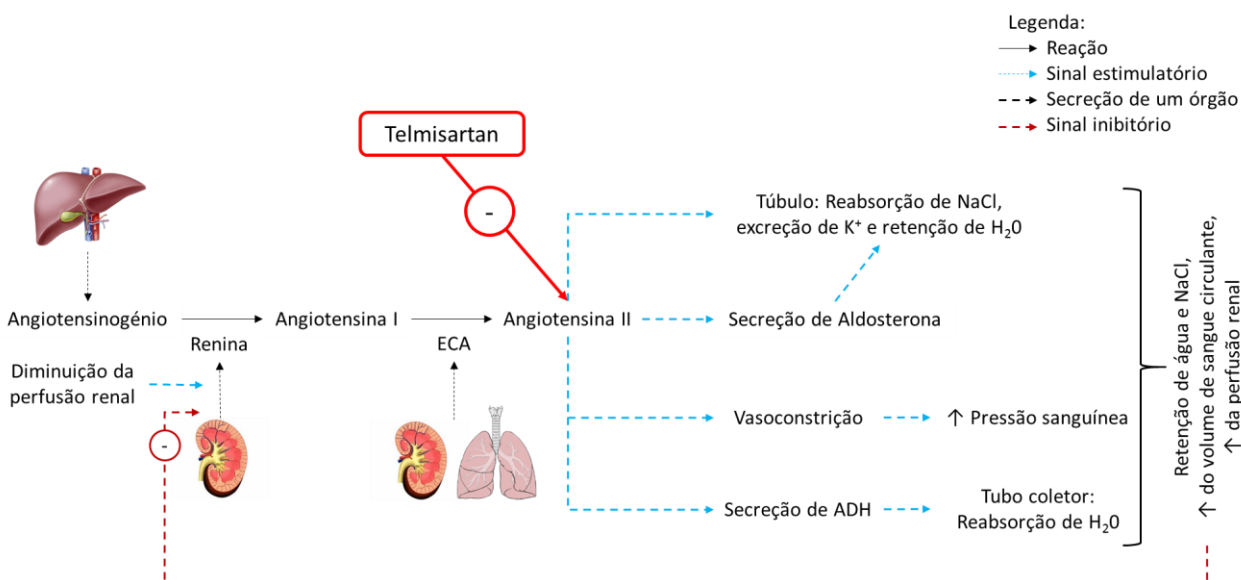
A farmacocinética do telmisartan apresenta uma variabilidade interindividual elevada, no entanto, os parâmetros anteriormente mencionados não são alterados em pacientes mais idosos com insuficiência renal suave a moderada, o mesmo não acontecendo em indivíduos com doenças hepáticas, nos quais se verifica um aumento das concentrações plasmáticas do fármaco em consequência do aumento da biodisponibilidade e uma diminuição da *clearance* <sup>71,77</sup>.

## Mecanismo de Ação

No Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (RAAS, do inglês *Renin-Angiotensin-Aldosterone System*), o angiotensinogénio, sintetizado no fígado, é convertido em angiotensina I, um peptídeo fisiologicamente inativo, na presença da renina, uma enzima produzida pelos rins. Por sua vez, a angiotensina I é convertida em angiotensina II, fisiologicamente ativa, por ação da Enzima de Conversão da Angiotensina (ECA) <sup>74,75</sup>. A

angiotensina II exerce os seus efeitos diretamente, ao atuar no tecido muscular liso das artérias, promovendo a vasoconstrição, e indiretamente, ao estimular a produção de aldosterona que, por sua vez, promove a retenção de sódio, cloro e água ao nível dos rins <sup>74</sup>.

Com a descoberta do papel do RAAS na regulação dos níveis de TA nos anos 70 do século XX, como esquematizado na figura 1.16, desenvolveram-se dois tipos de fármacos que atuam nesta via: inicialmente os IECA e mais tarde os ARA, de que é exemplo o telmisartan <sup>72</sup>. Os IECA interferem com a produção de angiotensina II uma vez que inibem a ECA e, conseqüentemente, diminuem os valores de TA <sup>75</sup>. No entanto, os IECA apresentam duas desvantagens: a produção de angiotensina II não é completamente inibida, uma vez que há outras enzimas capazes de catalisar esta reação e formar angiotensina II, e pode ocorrer a inibição da clivagem de outros compostos como a bradicinina, devido à baixa seletividade da enzima, que resulta em tosse persistente em indivíduos que tomem IECA <sup>74,75</sup>. Por outro lado, os ARA possuem uma elevada afinidade para os recetores de angiotensina II do tipo 1 (AT<sub>1</sub>) e, por isso, quando administrados oralmente, competem com a angiotensina II e bloqueiam seletivamente a ligação desta ao seu recetor <sup>71,78,79</sup>. Deste modo, o telmisartan impede a angiotensina II de exercer os seus efeitos ao nível dos vasos sanguíneos (vasoconstrição), para além de inibir a produção de aldosterona e, conseqüentemente, os seus principais efeitos fisiológicos, o que resulta na relaxação da musculatura lisa, na diminuição da reabsorção de sal e água, na redução do volume de plasma e na diminuição da hipertrofia celular, conseguindo-se, assim, a diminuição desejada dos valores de TA <sup>71,79</sup>. Portanto, o telmisartan exerce o seu efeito anti-hipertensor principalmente através da diminuição da resistência vascular periférica <sup>71</sup>. Atuando a este nível, a clivagem de bradicinina não é afetada, como acontecia no caso dos IECA <sup>71,72,75</sup>. O telmisartan apresenta um efeito de longa duração e a sua ligação a estes recetores é competitiva e reversível, dissociando-se lentamente com um tempo de semivida de 5,9 h <sup>73,78</sup>.



**Figura 1.16.** Mecanismo envolvido na regulação dos níveis de TA (RAAS) e local de ação do telmisartan.



Para sistematizar e ser mais fácil uma comparação visual, na tabela 1.8 encontram-se resumidas algumas das propriedades farmacocinéticas dos AHTs em estudo.

**Tabela 1.8.** Resumo das propriedades farmacocinéticas dos AHTs em estudo: pico plasmático, biodisponibilidade (F), ligação a proteínas plasmáticas, volume aparente de distribuição ( $V_d$ ), principal local de metabolismo, *clearance* (Cl), tempo de semivida ( $t_{1/2}$ ) e principal via de excreção.

AHT	Pico plasmático (h)	F (%)	Ligação a proteínas (%)	$V_d$	Metabolismo	$t_{1/2}$ (h)	Cl	Excreção
<b>AML</b>	6-12	60-65	> 95	21 L/kg	Hepático	34-45	7 mL/min/kg	Renal
<b>HCTZ</b>	2-4	65-70	60	0,8 L/kg	n.m.	10-12	335 mL/min	Renal
<b>IND</b>	2-3	-	76-79	25 L	Hepático	16	5 mL/min	Renal
<b>LER</b>	2-3	-	> 98	2-2,5 L/kg	Hepático	2-5	-	Fecal e Renal
<b>NIF</b>	1-2	40-60	92-98	0,8 L/kg	Hepático	2-5	7 mL/min/kg	Renal
<b>TEL</b>	0,5-1	43	> 99,5	500 L	Hepático	24	800 mL/min	Fecal

Nota: n.m. – não metabolizado.

## 1.7 O sangue como matriz biológica

Ao laboratório de química e toxicologia forenses podem chegar diversas matrizes biológicas para a pesquisa de etanol, drogas de abuso, substâncias medicamentosas, pesticidas, etc., nomeadamente, sangue cardíaco e/ou periférico, urina, conteúdo gástrico, fígado, humor vítreo, cabelo, saliva, entre outras. No que diz respeito às substâncias medicamentosas, estas podem ser pesquisadas em diversas matrizes biológicas sendo, no entanto, o sangue a matriz de eleição em toxicologia forense, uma vez que é a única matriz que nos fornece uma correlação entre a concentração do analito e o estado clínico do indivíduo.

No entanto, quando nos referimos ao sangue *postmortem* é necessário ter em consideração que as concentrações obtidas podem não refletir necessariamente as concentrações no momento da morte devido ao fenómeno de redistribuição *postmortem* (PMR, do inglês, *Postmortem Redistribution*)<sup>80</sup>. Isto ocorre porque, após a morte, as células perdem a sua integridade e as substâncias armazenadas em determinados órgãos, como o fígado, coração e pulmões, são libertadas<sup>21</sup>. Os xenobióticos com um  $V_d$  superior a 3-4 L/Kg são mais suscetíveis à PMR<sup>21</sup>. Assim, durante as autópsias é recomendado recolher sangue de dois locais diferentes,

sangue cardíaco e periférico, uma vez que as concentrações podem variar de um local para outro <sup>80</sup>. As amostras de sangue são recolhidas para tubos, aos quais foi previamente adicionado anticoagulante (fluoreto de sódio), e são armazenadas a -10°C <sup>81</sup>.

O sangue cardíaco possui a vantagem de ser geralmente mais abundante e, por isso, é frequentemente utilizado na triagem de substâncias, como é o caso dos medicamentos. É recolhido da cavidade cardíaca com uma seringa, no entanto, esta aspiração pode recolher fluido do pericárdio ou da cavidade pleural, contaminado assim a amostra. Além disso, este sangue é mais afetado pela PMR, já que está localizado na região central, próximo de órgãos que costumam acumular grandes quantidades de substâncias durante a vida e, por isso, os resultados obtidos em sangue cardíaco podem representar uma grande fonte de erros e falsas interpretações <sup>80</sup>.

O sangue periférico, obtido de veias femorais ou subclávias, está usualmente menos sujeito a fenómenos de PMR, pois encontra-se mais afastado da região central do corpo <sup>21</sup>. No entanto, apesar de apresentar menor fonte de erros do que o sangue cardíaco, existe em muito menor quantidade e, por isso, é principalmente utilizado para quantificação de substâncias depois de ter sido previamente realizada uma triagem com sangue cardíaco <sup>80</sup>.

Portanto, a PMR deve ser considerada na interpretação dos resultados analíticos, bem como possíveis processos de putrefação do cadáver, de modo a evitar conclusões erróneas decorrentes de uma simples comparação com valores tabelados de concentrações tóxicas ou fatais <sup>21</sup>.

Os xenobióticos, mas precisamente os AHTs, podem ser determinados em plasma ou em sangue total. No entanto, revela-se mais conveniente e preciso estimar a sua concentração em sangue total, uma vez que, como alguns dos AHTs se podem encontrar em grande extensão ligados aos eritrócitos, durante a colheita do sangue pode ocorrer a lise dos eritrócitos que irá afetar a sua concentração efetiva no plasma <sup>51,53</sup>.

## 1.8 Revisão da literatura

Os estudos encontrados na literatura no que diz respeito à determinação de ATHs em amostras de sangue baseiam-se principalmente em técnicas cromatográficas hífenadas, nomeadamente, Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (GC-MS, do inglês *Gas Chromatography–Mass Spectrometry*) <sup>82,83</sup>, Cromatografia Líquida acoplada a detetor de Ultravioleta (LC-UV, do inglês *Liquid Chromatography–UltraViolet*) <sup>40,70,84–89</sup>, Cromatografia Líquida acoplada a detetor de Fotodíodos (LC-DAD, do inglês *Liquid Chromatography–Diode Array Detector*) <sup>90–92</sup>, Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa (LC-MS, do inglês *Liquid Chromatography–Mass Spectrometry*) e Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa Sequencial (LC-MS/MS, do inglês *Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry*).

Na tabela 1.9 encontra-se um resumo da literatura no que diz respeito à validação de métodos para determinação de AHTs em plasma, soro e sangue total por LC-MS e LC-MS/MS, bem como informação relativa à técnica de extração e interface utilizadas, às transições monitorizadas, gama de trabalho estudada e limite de quantificação obtido. Podemos verificar que existem vários trabalhos publicados no que diz respeito

aos AHTs, mas nenhum deles engloba simultaneamente mais do que quatro dos AHTs selecionados neste trabalho.

Além disso, os estudos realizados para determinação destes AHTs em sangue *postmortem* são bastante reduzidos, uma vez que apenas foram encontrados na literatura sete artigos em que se utilizava sangue *postmortem*: quatro para a amlodipina <sup>36,93-95</sup>, dois para a nifedipina <sup>96,97</sup> e um simultaneamente para a amlodipina e telmisartan <sup>98</sup>, não existindo nenhum para a hidroclorotiazida, indapamida e lercanidipina.

**Tabela 1.9.** Revisão da literatura sobre a validação de métodos para determinação de AHTs em plasma, soro e sangue total por LC-MS e LC-MS/MS, bem como informação relativa à técnica de extração e interface utilizadas, às transições monitorizadas, gama de trabalho estudada e limite de quantificação obtido.

Substância	Tipo de amostra	Técnica de extração	Técnica analítica	Interface	Transições monitorizadas (m/z)	Gama de trabalho	Limite de quantificação	Referência
Amlodipina	Plasma	SPE	LC-MS/MS	APCI (+)	409 > 238	0,1 – 5 ng/mL	0,1 ng/mL	33
Amlodipina	Plasma	LLE	LC-MS/MS	ESI (+)	409 > 238	0,2 – 20 ng/mL	n.d.	34
Amlodipina	Plasma	LLE	LC-MS/MS	ESI (+)	409 > 238	50 – 10000 pg/mL	50 pg/mL	32
Amlodipina	Plasma	LLE	LC-MS/MS	ESI (+)	409,1 > 238,14	0,1 – 5 ng/mL	0,1 ng/mL	99
Amlodipina					409,2 > 237,9	0,156 – 20 ng/mL	0,156 ng/mL	
Hidroclorotiazida				ESI (+)	295,9 > 268,9	0,312 – 40 ng/mL	0,312 ng/mL	100
Nifedipina	Plasma	PP	LC-MS/MS	ESI (-) para HCTZ	347,1 > 314,9	0,781 – 100 ng/mL	0,781 ng/mL	
Telmisartan					515,2 > 275,9	0,781 – 100 ng/mL	0,781 ng/mL	
Amlodipina					409 > 238			
Lercanidipina	Plasma	SPE	LC-MS/MS	ESI (+)	612 > 280	n.d.	n.d.	28
Nifedipina					347 > 254			
Amlodipina	Plasma	SPE	LC-MS/MS	APCI (+)	409,3 > 238,2	0,05 – 10 ng/mL	n.d.	44
Telmisartan					515,2 > 276,2	2 – 400 ng/mL		
Hidroclorotiazida	Plasma	PP	LC-MS/MS	ESI (-)	295,9 > 268,9	1 – 900 ng/mL	1 ng/mL	47
Hidroclorotiazida	Plasma	LLE	LC-MS/MS	ESI (-)	296,1 > 205,0	8 – 680 ng/mL	n.d.	49
Hidroclorotiazida	Plasma	LLE	LC-MS/MS	ESI (-)	295,9 > 268,9	1 – 600 ng/mL	1 ng/mL	69
Telmisartan					513,0 > 469,4			

**Tabela 1.9 (continuação).** Revisão da literatura sobre a validação de métodos para determinação de AHTs em plasma, soro e sangue total por LC-MS e LC-MS/MS, bem como informação relativa à técnica de extração e interface utilizadas, às transições monitorizadas, gama de trabalho estudada e limite de quantificação obtido.

Substância	Tipo de amostra	Técnica de extração	Técnica analítica	Interface	Transições monitorizadas (m/z)	Gama de trabalho	Limite de quantificação	Referência
Indapamida	Plasma	LLE	LC-MS/MS	ESI (+)	366 > 132	0,25 -50ng/mL	1 ng/mL	101
Indapamida	Plasma	LLE	LC-MS	ESI (-)	364	0,5 – 100 ng/mL	0,2 ng/mL	102
Indapamida	Plasma	LLE	LC-MS/MS	ESI (+)	366,1 > 132,2	0,5 – 80 ng/mL	0,5 ng/mL	51
Indapamida	Plasma	LLE	LC-MS	ESI (-)	364,3	0,1 – 100 ng/mL	0,1 ng/mL	54
Indapamida	Soro	SPE	LC-MS/MS	ESI (+)	366 > 132	0,2 – 20 ng/mL	0,2 ng/mL	103
Indapamida	Sangue total	SPE	LC-MS/MS	ESI (+)	366,1 > 132,15	1 – 50 ng/mL	1 ng/mL	53
Indapamida	Sangue total	LLE	LC-MS/MS	ESI (-)	364 > 188,9	0,25 – 50 ng/mL	0,25 ng/mL	52
Lercanidipina	Plasma	LLE	LC-MS/MS	ESI (+)	612 > 280 e 298	0,1 – 16 ng/mL	0,1 ng/mL	56
Lercanidipina	Plasma	SPE	LC-MS/MS	ESI (+)	612,3 > 280,2	1-2000 ng/mL	1 ng/mL	57
Lercanidipina	Plasma	PP	LC-MS/MS	ESI (+)	612,3 > 280,2	0,015 - 8 ng/mL	0,015 ng/mL	41
Nifedipina	Plasma	SPE	LC-MS/MS	APCI (+)	347 > 315	0,5 – 100 ng/mL	0,24 ng/mL	104
Nifedipina	Plasma	LLE	LC-MS	APCI (+)	347	1 – 100 ng/mL	1 ng/mL	65
Nifedipina	Plasma	LLE	LC-MS/MS	ESI (+)	347,1 > 315,0	0,5 – 100 ng/mL	0,5 ng/mL	39
Nifedipina	Plasma	LLE	LC-MS/MS	ESI (+)	347 > 315	0,1 – 100 ng/mL	0,1 ng/mL	64
Nifedipina	Plasma	LLE	LC-MS/MS	ESI (+)	347,1 > 315,0	0,1 – 52 ng/mL	0,1 ng/mL	42

Nota: (+) – em modo positivo; (-) – em modo negativo; APCI – Ionização Química à Pressão Atmosférica; ESI – Ionização por *Electrospray*; LC-MS – Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa; LC-MS/MS – Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa Sequencial; LLE – Extração Líquido-Líquido; n.d. – Não Definido; PP – Precipitação de Proteínas; SPE – Extração em Fase Sólida;

## 1.9 Metodologia analítica

### 1.9.1 Preparação da amostra

Uma vez que o sangue é uma matriz complexa, a técnica cromatográfica exige um passo prévio de tratamento da amostra que tem como objetivos isolar os analitos de interesse da matriz e remover, tanto quanto possível, os compostos interferentes que podem estar presentes na matriz (como proteínas e lípidos) e pré-concentrar os analitos, normalmente em baixas concentrações, de modo a que a concentração final seja adequada para a sua deteção <sup>105-107</sup>.

Neste caso optou-se pela extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*) que surgiu, em 1976, da necessidade de suprimir ou minimizar as desvantagens apresentadas pela extração líquido-líquido (LLE, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*), nomeadamente, o tempo necessário, o volume relativamente grande de amostra e de solventes orgânicos tóxicos e a formação de emulsões <sup>106,108</sup>. Atualmente, a SPE é uma das técnicas de extração mais utilizadas devido às vantagens que apresenta: rapidez, menor consumo de solventes, utilização de pequenos volumes de amostra (o volume de sangue periférico *postmortem* disponível é pequeno), não formação de emulsões, possibilidade de automação, maior eficiência, extração simultânea de várias amostras, entre outras <sup>105-107</sup>.

A SPE baseia-se numa partição sólido-líquido, na qual a capacidade de separação está relacionada com a afinidade preferencial do analito pela fase estacionária (sólida) em comparação com a matriz da amostra <sup>107</sup>. A extração é realizada num cartucho de polipropileno, que contém cerca de 50 a 500 mg de fase estacionária com 40 a 60 µm de tamanho de partícula imobilizada entre duas membranas de retenção, e as fases líquidas são passadas através do cartucho <sup>106-108</sup>.

O procedimento experimental da SPE pode ser dividido em quatro passos (figura 1.17) <sup>106-108</sup>:

- Acondicionamento ou ativação da fase estacionária;
- Aplicação da amostra, sendo que os analitos vão ser retidos pela fase estacionária;
- Lavagem para eliminar interferentes da matriz que possam ter ficado retidos no passo anterior;
- Eluição dos analitos da fase estacionária e recolha dos analitos para posterior análise.

Sempre que possível, no último passo deve-se utilizar um volume pequeno de solvente, de modo a concentrar o analito, caso contrário, usar um solvente volátil para que possa ser facilmente evaporado e o extrato reconstituído num volume pequeno de fase móvel <sup>106</sup>.

A seleção da fase estacionária tem de ter em conta a estrutura química do analito e a composição da matriz da amostra <sup>106</sup>. As fases estacionárias podem ser de fase normal, quando esta é mais polar do que a amostra, ou de fase reversa, quando a fase estacionária é mais apolar do que a amostra <sup>107</sup>. A retenção do analito ocorre, no primeiro caso, por interações hidrofílicas (ligação hidrogénio e interação dipolo-dipolo) e, no segundo, por interações hidrofóbicas do tipo Van der Waals <sup>107</sup>. As fases estacionárias ainda podem ser iónicas, principalmente utilizadas para o isolamento de analitos de carácter ácido ou básico, ou mistas, quando contêm

dois ou mais materiais <sup>107</sup>. Os avanços mais recentes neste contexto são no sentido de reduzir o tempo de análise, o volume de solventes e de amostra <sup>106</sup>.

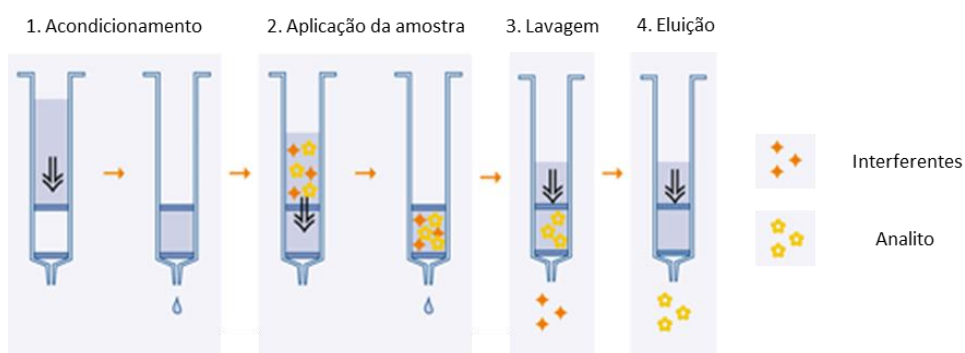


Figura 1.17. Etapas do procedimento experimental da SPE.

## 1.9.2 Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massa sequencial

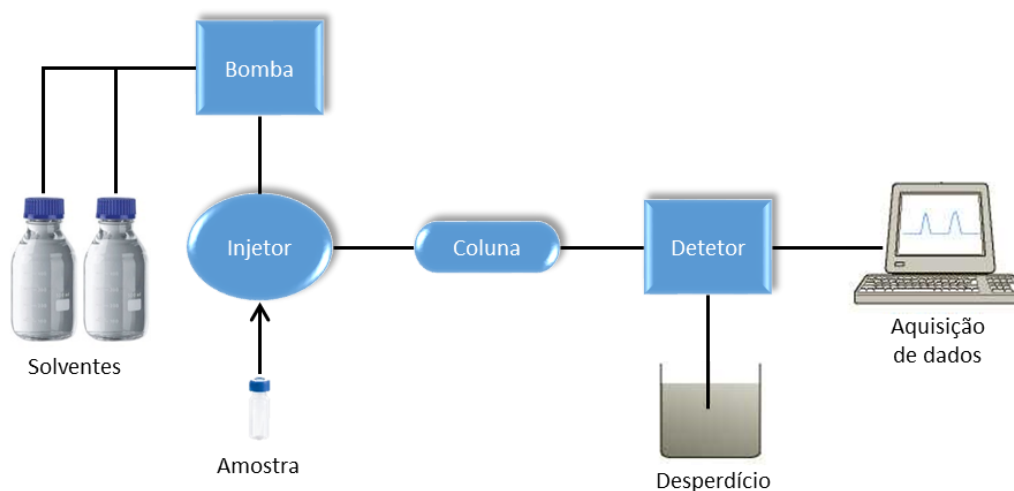
### 1.9.2.1 Cromatografia líquida

A cromatografia líquida (LC) é um método de separação de componentes de uma mistura complexa que teve a sua origem no início no século XX, por volta de 1903, pelo botânico russo Mikhail Tswett <sup>109,110</sup>. A separação tem por base a distribuição das diferentes moléculas entre duas fases: uma móvel fase (líquida) e uma fase estacionária (líquida ou sólida), sendo que na LC clássica a fase móvel é arrastada através da fase estacionária apenas pela ação da gravidade <sup>110,111</sup>. No final dos anos 60, foi introduzida a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*), uma extensão da LC clássica, que se caracteriza pelo tamanho reduzido das partículas que constituem a fase estacionária (3-10  $\mu\text{m}$ ), sendo necessária uma bomba de alta pressão para a eluição da fase móvel <sup>110-112</sup>. Estas características permitiram aumentar a eficiência da separação e reduzir o tempo de análise, bem como a utilização de volumes de injeção mais pequenos e a deteção de quantidades menores <sup>110,111</sup>. A HPLC é adequada para compostos não voláteis e/ou termicamente instáveis, sendo, atualmente, uma das principais técnicas de separação utilizadas, uma vez que permite separar uma grande variedade de compostos e em vários tipos de matrizes complexas, em poucos minutos, com elevada eficiência, sensibilidade e reprodutibilidade de dados <sup>109-112</sup>.

Na HPLC, os analitos movem-se através da fase estacionária, por ação da fase móvel, sendo a interação entre estas que determina a separação dos compostos <sup>110-112</sup>. Deste modo, os compostos fracamente retidos pela fase estacionária são eluídos mais rapidamente, enquanto os que estabelecem interações mais fortes com a fase estacionária, são mais retidos por esta e são eluídos mais lentamente <sup>110,112</sup>. A HPLC pode ser dividida em

cromatografia de fase normal ou cromatografia de fase reversa. Na primeira, a fase estacionária é mais polar do que a fase móvel, enquanto na segunda, a fase estacionária é mais apolar do que a fase móvel, sendo esta última a mais usada, devido ao seu maior campo de aplicação, uma vez que é adequada para analitos polares, de polaridade média e alguns analitos apolares <sup>110,112</sup>. Desta forma, na cromatografia de fase reversa, os compostos apolares ou fracamente polares, são mais fortemente retidos pela fase estacionária do que os compostos polares, pelo que o componente mais polar irá ser eluído em primeiro lugar <sup>110</sup>. A maioria das fases estacionárias baseiam-se em grupos orgânicos, tais como grupos octadecilo (C18), ligados quimicamente à sílica <sup>111</sup>. É a combinação de uma fase estacionária com uma fase móvel adequadas que permite a separação dos componentes de uma mistura.

O equipamento de HPLC é constituído por um ou mais reservatórios de fases móveis, uma bomba a alta pressão para bombear a fase móvel, um sistema de injeção da amostra, a coluna analítica, um ou mais detetores e um sistema de registo e processamento de dados, como ilustrado na figura 1.18 <sup>110-113</sup>. Pode utilizar-se uma pré-coluna, introduzida antes da coluna analítica, com o objetivo de evitar que impurezas da amostra contaminem a coluna, aumentando assim a sua durabilidade <sup>111,112</sup>. A fase móvel, que se encontra num reservatório adequado, é bombeada por uma bomba de alta pressão até ao injetor, onde a amostra é introduzida e arrastada para a coluna cromatográfica, onde se efetua a separação dos componentes da mistura de acordo com a natureza da fase móvel, fase estacionária e dos analitos <sup>109,112</sup>. O fluxo que sai da coluna é, então, direcionado para um detetor que mede de forma contínua propriedades físicas da amostra, que são registadas e tratadas num *software* apropriado, obtendo-se no final um cromatograma que é a representação gráfica da intensidade relativa dos analitos eluídos em função do tempo <sup>109,112</sup>.



**Figura 1.18.** Principais componentes de um sistema de cromatografia líquida.

Na eluição em gradiente, a composição da fase móvel varia gradualmente ao longo da eluição, ao contrário da eluição isocrática, em que a composição da fase móvel se mantém constante <sup>110,111</sup>. As colunas devem ser constituídas por um material inerte e capaz de resistir às pressões usadas <sup>111,112</sup>. Assim, as colunas, geralmente,



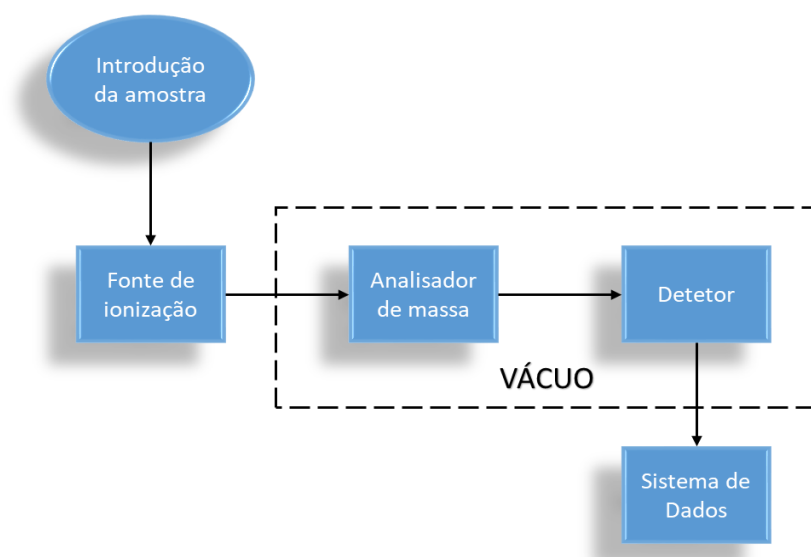
são de aço inoxidável e revestidas internamente com vidro, para evitar possíveis reações que possam ocorrer entre o metal e os solventes, com 10-25 cm de comprimento e 2,1-4,6 mm de diâmetro interno <sup>110</sup>. Todos os solventes devem ter um grau de pureza elevado e estarem livres de oxigênio ou outros gases dissolvidos <sup>111</sup>.

Nos últimos anos foi introduzida a Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UHPLC, do inglês *Ultra High Performance Liquid Chromatography*), cujo princípio é o mesmo da HPLC, mas na qual o tamanho das partículas constituintes da fase estacionária é inferior a 2  $\mu\text{m}$  <sup>114</sup>. O menor tamanho das partículas traduz-se numa maior superfície de interação e, conseqüentemente, numa separação cromatográfica mais eficiente, reduzindo também o consumo de solventes <sup>114</sup>. Deste modo, a UHPLC permitiu o desenvolvimento de métodos quantitativos para determinar analitos em concentrações mais baixas e em matrizes mais complexas <sup>114</sup>.

### 1.9.2.2 Espetrometria de massa

A espectrometria de massa (MS, do inglês *mass spectrometry*), inicialmente descrita por J.J. Thomson em 1897, é uma técnica analítica utilizada para identificar compostos desconhecidos, quantificar compostos conhecidos e obter informações estruturais de diversas moléculas <sup>109,114,115</sup>.

Os componentes principais de um espectrômetro de massa são: o sistema de introdução da amostra, a fonte de ionização, o(s) analisador(es) de massa, o detetor e o sistema de dados (figura 1.19). A amostra é introduzida através do sistema de introdução da amostra e direcionada para a fonte de ionização, onde se geram os iões que, por sua vez, vão ser separados pelo(s) analisador(es) de acordo com a sua razão massa/carga ( $m/z$ ) e, posteriormente, encaminhados para o detetor, responsável pela sua deteção e quantificação <sup>109,115</sup>. O resultado é um espectro de massa, cuja abcissa corresponde à razão  $m/z$  e a ordenada à sua abundância relativa <sup>114</sup>.



**Figura 1.19.** Esquema simplificado de um espectrômetro de massa.

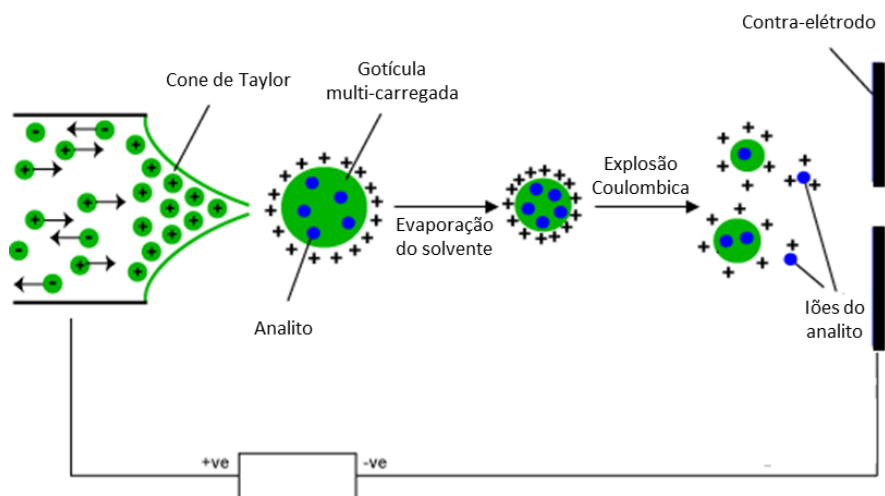
Com o desenvolvimento de interfaces e de fontes de ionização adequadas que permitam remover toda ou grande parte da fase móvel e ionizar o analito, foi possível, nos últimos anos, o acoplamento entre a cromatografia líquida e a espectrometria de massa (LC-MS), uma poderosa ferramenta analítica, uma vez que combina as vantagens de ambas as técnicas, nomeadamente elevada seletividade, sensibilidade, precisão e robustez <sup>109,114,116</sup>. Nesta técnica, o cromatógrafo é o sistema de introdução da amostra no espectrómetro de massa, dado que os analitos, à medida que vão sendo eluídos da coluna, são introduzidos na fonte de ionização, onde ocorre a sua ionização, pré-requisito para que um analito possa ser analisado por MS <sup>109,114</sup>.

A ionização pode ocorrer no modo positivo ou negativo através de uma das formas: ejeção ou captura de eletrões, originando o ião molecular ( $M^+$  ou  $M^-$ ), ou adição ou remoção de um  $H^+$ , formando moléculas protonadas ou desprotonadas <sup>114</sup>. As fontes de ionização mais utilizadas em LC-MS, as quais operam à pressão atmosférica são: a ionização por *Electrospray* (ESI, do inglês *Electrospray Ionization*), a Ionização Química à Pressão Atmosférica (APCI, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) e, mais recentemente, a Fotoionização à Pressão Atmosférica (APPI, do inglês *Atmospheric Pressure Photon Ionization*) <sup>109,116</sup>.

A ESI, fonte de ionização mais utilizada em LC-MS e inclusive neste trabalho, é uma técnica de ionização suave, preferencialmente aplicada na análise de moléculas mais polares, termolábeis e de massa molecular elevada <sup>109,114,116</sup>. Nesta técnica, no modo positivo (figura 1.20), o analito dissolvido em solução flui através de um tubo capilar de aço inox, ao qual é aplicada uma voltagem geralmente entre 3 e 5 kV <sup>109</sup>. Os iões positivos migram em direção à ponta do capilar e, devido às forças eletrostáticas que atuam sobre eles, há a formação do “cone de Taylor” e a libertação de pequenas gotas com excesso de iões positivos <sup>114,115</sup>. Estas gotículas, à medida que se deslocam em direção ao contra-elétrodo, são dessolvatadas, com o auxílio de um gás de dessolvatação, com alto fluxo e temperatura (geralmente  $N_2$ , com fluxos superiores a 500 L/h e temperaturas superiores a 350 °C) que, para além de facilitar a eliminação do solvente, diminui os aglomerados de iões indesejáveis que se formam <sup>109,114,116</sup>. Deste modo, o tamanho das gotículas formadas vai diminuindo até ao ponto em que as forças de repulsão entre as cargas positivas superam as forças de coesão da fase líquida (tensão superficial), momento em que ocorre a “explosão coulombica” e formação de microgotas que, com a secagem, originam iões positivos do analito que, por sua vez, são direcionados para o cone de amostragem e, posteriormente, para o analisador de massa <sup>107,109,114,116</sup>. Como já referido, o ESI também pode ser operado no modo negativo, dependendo do sinal da tensão aplicada, no qual o processo ocorre de forma análoga, mas as polaridades são invertidas <sup>109</sup>.

Após a ionização, os iões são direcionados para o analisador de massa, onde são separados de acordo com a sua razão  $m/z$  <sup>109</sup>. Existem diversos tipos de analisadores de massa, embora o quadrupolo seja o mais utilizado. O quadrupolo é constituído por quatro barras cilíndricas dispostas em dois pares, sendo que as barras opostas estão conectadas ao mesmo potencial elétrico <sup>109,114</sup>. Uma combinação de corrente contínua e radiofrequência é aplicada a estas barras, o que resulta na transmissão seletiva dos iões de acordo com a sua razão  $m/z$ , ou seja, apenas os iões que apresentam uma determinada razão  $m/z$  irão chegar ao detetor, enquanto os restantes, por possuírem uma trajetória instável, atingirão as barras e serão eliminados pela bomba de vácuo <sup>109,114</sup>. Portanto,

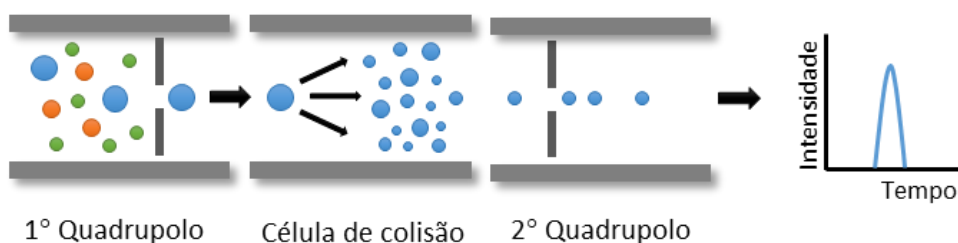
por um lado, o par de barras positivo atua como um filtro para massas mais elevadas e, por outro, o par negativo funciona como um filtro para massas mais pequenas <sup>109</sup>.



**Figura 1.20.** Esquema do processo de ionização por *eletrospray*.

É possível, atualmente, um espectrómetro de massa possuir mais do que um analisador de massa (MS/MS) tendo, neste trabalho, sido utilizado um triplo quadrupolo. Este é constituído por dois analisadores de massa separados por uma célula de colisão, onde ocorre a fragmentação dos iões seleccionados no primeiro quadrupolo <sup>109,116</sup>. De referir que ambos os quadrupolos podem ser programados para seleccionar apenas iões de uma determinada razão  $m/z$  (modo de selecção) ou iões dentro de um intervalo de razões  $m/z$  (modo de varrimento) <sup>109,114,116</sup>. No entanto, para análises quantitativas é utilizado o modo de aquisição por Monotorização de Reações Múltiplas (MRM, do inglês *Multiple Reaction Monitoring*), cujo princípio está ilustrado na figura 1.21.

No primeiro quadrupolo, os iões do analito formados são seleccionados de acordo com a sua razão  $m/z$  e, portanto, apenas os iões que apresentam um determinado valor de  $m/z$  (ião precursor) entram na célula de colisão <sup>115</sup>. Nesta ocorre a fragmentação do ião precursor por colisão com um gás inerte (geralmente Ar ou N<sub>2</sub>), originando os iões produto que, por sua vez, entram no terceiro quadrupolo e são seleccionados consoante a sua razão  $m/z$  <sup>109,114,116</sup>. Para uma correcta identificação dos analitos, é necessário estudar pelo menos duas transições para cada, uma para quantificação e a segunda para confirmação qualitativa <sup>114</sup>.



**Figura 1.21.** Esquema de um analisador do tipo triplo quadrupolo e processo de selecção e fragmentação dos iões em modo MRM.

Ao contrário do que acontece na cromatografia, em que vários compostos podem ter o mesmo tempo de retenção nas condições cromatográficas usadas, na MS a probabilidade de dois analitos diferentes originarem o mesmo íon precursor e íões produto é bastante reduzida, o que demonstra a elevada seletividade desta técnica <sup>109</sup>. Por fim, os íões selecionados anteriormente chegam ao detetor, onde o feixe de íões é convertido num sinal elétrico que é, posteriormente, processado pelo computador na forma de um espectro de massa <sup>114</sup>.

## 1.10 Validação de métodos analíticos

A validação de um método analítico consiste em demonstrar, através de evidências objetivas, que ele é adequado para o fim a que se destina, isto é, o principal objetivo da validação de um método analítico é demonstrar a sua fiabilidade na determinação de uma concentração do analito numa matriz específica <sup>117</sup>. Um laboratório deve validar métodos não normalizados, métodos criados ou desenvolvidos pelo próprio laboratório, métodos normalizados utilizados fora do seu âmbito de utilização e extensões ou modificações de métodos normalizados, a fim de confirmar a sua adequabilidade <sup>117</sup>. De referir que o processo de validação de um método não pode ser separado do seu desenvolvimento, isto é, os resultados da validação podem tornar necessária uma alteração no procedimento que, por sua vez, necessita de nova validação.

A validação de um método analítico deve ser efetuada em amostras similares às amostras analisadas na rotina do laboratório, pelo que são usadas amostras brancas da matriz em estudo fortificadas com os analitos de interesse.

Por vezes, em toxicologia forense, a análise qualitativa não é suficiente para uma adequada interpretação dos resultados, pelo que pode ser necessário realizar ensaios quantitativos de modo a distinguir concentrações terapêuticas e tóxicas e, conseqüentemente, retirar conclusões médico-legais apropriadas. Os parâmetros a estudar dependem das características do ensaio, do tipo e complexidade da amostra e da experiência do laboratório na utilização do método. Embora exista algum consenso quanto ao tipo de estudos a realizar no decorrer da validação, persiste uma grande diversidade de opiniões quanto à forma de os abordar. Os parâmetros de validação a estudar consoante o tipo de ensaio estão apresentados na tabela 1.10.

**Tabela 1.10.** Parâmetros de validação a estudar de acordo com o tipo de ensaio <sup>118</sup>.

<i>Parâmetro</i>	<b>Triagem</b>		<b>Confirmação</b>	
	Imuno-enzimática	GC-MS; GC-FID, LC-MS	Qualitativa	Quantitativa
<i>Especificidade/sensibilidade</i>	✓			
<i>Desvio percentual de absorvância</i>	✓			
<i>Especificidade/seletividade</i>		✓	✓	✓
<i>Capacidade de identificação</i>		✓	✓	✓
<i>Eficiência da extração</i>		✓	✓	✓
<i>Efeito matriz</i> <sup>1</sup>		✓	✓	✓
<i>Limite de detecção</i>	✓	✓	✓	✓
<i>Limite de quantificação</i>				✓
<i>Carryover</i>			✓	✓
<i>Linearidade e modelo de calibração</i>				✓
<i>Precisão intermédia</i>				✓
<i>Repetibilidade</i>				✓
<i>Reprodutibilidade</i> <sup>2</sup>				✓
<i>Exatidão</i>				✓
<i>Robustez</i>			✓	✓

Portanto, de acordo com o procedimento operacional em vigor no SQTf-C <sup>118</sup>, e como queremos validar um método de confirmação quantitativo, os parâmetros de validação a serem avaliados são:

- ↪ Especificidade/seletividade;
- ↪ Capacidade de identificação;
- ↪ Eficiência da extração;
- ↪ Efeito matriz;
- ↪ Limiares analíticos (limite de detecção e limite de quantificação);
- ↪ *Carryover*;
- ↪ Linearidade e modelo de calibração;
- ↪ Precisão (repetibilidade e precisão intermédia);
- ↪ Exatidão;
- ↪ Robustez.

Não foi possível avaliar a reprodutibilidade do método, uma vez que este parâmetro só pode ser estimado com base em ensaios interlaboratoriais. No entanto, além dos parâmetros referidos anteriormente, foram ainda avaliados mais dois parâmetros, a estabilidade dos AHTs nas amostras padrão e na matriz em questão e a integridade na diluição das amostras, considerados por algumas *guidelines* <sup>117,118</sup> como opcionais, no entanto, do meu ponto de vista, fundamentais.

<sup>1</sup> Aplicável à metodologia LC-MS/MS

<sup>2</sup> Quando aplicável, uma vez que pressupõe o envolvimento de vários laboratórios

## 1.11 Objetivos

O principal objetivo deste trabalho é a validação de um método analítico para determinar AHTs em amostras de sangue usando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa sequencial (LC-MS/MS).

Objetivos Específicos:

- Revisão da literatura sobre a HTA (definição, classificação, etiologia, objetivos terapêuticos, terapêutica não farmacológica), os fármacos AHTs (classes farmacológicas, farmacocinética e mecanismo de ação dos AHTs selecionados) e estudos de validação realizados com vista à determinação destas substâncias em diferentes matrizes biológicas e por diferentes técnicas analíticas;

- Estudo dos parâmetros de validação, nomeadamente, estabilidade, especificidade/seletividade, eficiência da extração, efeito matriz, limiares analíticos (limites de deteção e de quantificação), *carryover*, linearidade e modelo de calibração, precisão (repetibilidade e precisão intermédia) exatidão, integridade da diluição e robustez;

- Comparar a eficiência da extração usando diferentes colunas e/ou condições de extração;

- Aplicar o método validado a casos forenses;

- Estudar as eventuais diferenças encontradas entre sangue cardíaco e sangue periférico.

# Capítulo 2

## Experimental

### 2.1 Padrões e reagentes

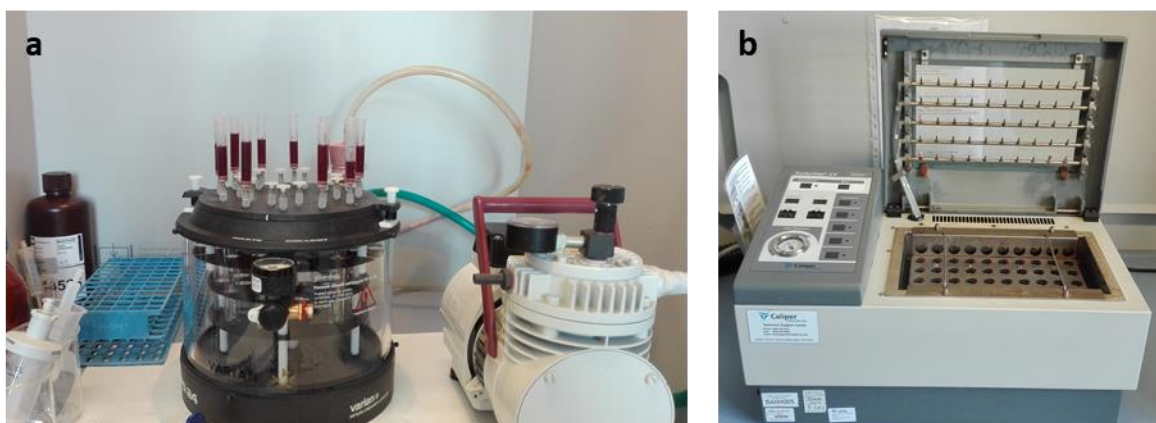
Para a realização deste trabalho foram utilizados os seguintes padrões de referência: amlodipina (Sigma-Aldrich, 10 mg, em pó), hidroclorotiazida (Cerilliant, 1 mg/mL, em metanol), indapamida (Sigma-Aldrich, 250 mg, em pó), lercanidipina (Sigma-Aldrich, 10 mg, em pó), nifedipina (Sigma-Aldrich, 1 g, em pó), telmisartan (Sigma-Aldrich, 10 mg, em pó) e zolpidem-d6 (Cerilliant, 100 µg/mL, em metanol). Foram preparados 10 mL de cada padrão a 1 mg/mL, em metanol Lichrosolv (Merck), com exceção da hidroclorotiazida e do zolpidem-d6, que já foram adquiridos na forma de solução metanólica.

O acetonitrilo Lichrosolv e o ácido fórmico (98-100%) foram adquiridos à Merck. A água LC-MS e o acetonitrilo LC-MS foram fornecidos pela Fluka. A água ultrapura MilliQ foi obtida através de um sistema da Millipore.

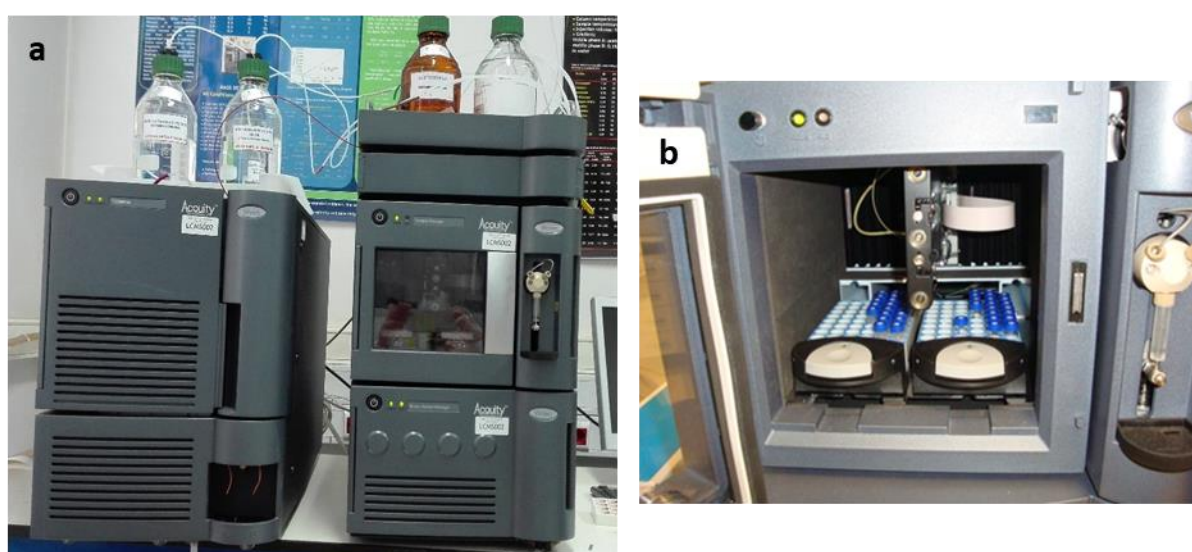
### 2.2 Material e equipamento

O agitador mecânico utilizado é um 3015 da GFL, o agitador vórtex é um Reax 2000 da Heidolph, a centrífuga é uma 5400 da Kubota, o extrator é um Vac Elut SPS24 da Varian, as bombas de vácuo são da KNF, o evaporador de amostras é um Turbo Vap LV da Caliper LifeSciences (figura 2.1) e o equipamento de ultrasons é um Sonorex Super RK 510H da Bandelin. O sistema de UPLC-MS/MS é um ACQUITY TQD da Waters (figura 2.2), bem como as colunas Oasis® HLB Cartridge (3cc, 60 mg) usadas na SPE e os *vials* de 300 µL com tampa de rosca cortada próprios para o sistema LC-MS/MS. A coluna analítica utilizada é uma coluna de fase reversa ACQUITY UPLC® HSS T3 (2,1 x 100 mm id, 1,8µm) igualmente da Waters. O fornecimento de azoto para o evaporador de amostras e para o equipamento de LC-MS/MS foi realizado através de um gerador de azoto N2MID 600 da Domnick Hunter, associado a um compressor de ar comprimido da Rollair. A designação UPLC é exclusiva da Waters, uma vez que foi patenteada por esta para sistemas de UHPLC.

Os tubos de polipropileno de 10 mL, com tampas de rosca, utilizados são da Statedt, enquanto os tubos de vidro de 12 mL (16x100 mm) são da Schott. Todas as micropipetas de volume variável e respectivas pontas utilizadas são da Gilson, enquanto as micropipetas de volume fixo e respectivas pontas, doseadores e combitips são da Eppendorf. Para além do material anteriormente referido, outros materiais de vidro do laboratório foram usados, como pipetas, provetas, balões de diluição, copos, entre outros.



**Figura 2.1.** a) Sistema de extração: extrator Vac Elut SPS24 (Varian), com colunas Oasis<sup>®</sup> HLB (Waters) e bomba de vácuo (KNF); b) Evaporador de amostras Turbo Vap LV (Caliper LifeSciences).



**Figura 2.2.** Sistema de UPLC-MS/MS ACQUITY TQD (Waters), com destaque para o local onde as amostras são colocadas (sample manager), que permite a refrigeração das amostras (b).

## 2.3 Preparação de padrões, solventes e soluções

⇒ Mistura padrão de AHTs a 10 µg/mL: para um balão volumétrico de 10 mL, contendo já algum volume de metanol, pipetou-se 100 µL das soluções padrão de referência dos seis AHTs a 1 mg/mL e dissolveu-se com metanol Lichrosolv até perfazer 10 mL. Agitou-se até homogeneizar e armazenou-se entre 2 a 8°C ao abrigo da luz.

⇒ Mistura padrão de AHTs a 1 µg/mL: para um balão volumétrico de 10 mL pipetou-se 1 mL da mistura padrão anteriormente preparada e dissolveu-se com metanol Lichrosolv até perfazer 10 mL. Agitou-se até homogeneizar e armazenou-se entre 2 a 8°C ao abrigo da luz.



⇒ Mistura padrão de AHTs a 0,1 µg/mL: para um balão volumétrico de 10 mL pipetou-se 1 mL da mistura padrão anteriormente preparada e dissolveu-se com metanol Lichrosolv até perfazer 10 mL. Agitou-se até homogeneizar e armazenou-se entre 2 a 8°C ao abrigo da luz.

⇒ Solução padrão de zolpidem-d6 a 1 µg/mL: para um balão volumétrico de 10 mL pipetou-se 1 mL de zolpidem-d6 10 µg/mL e dissolveu-se com metanol Lichrosolv até perfazer 10 mL. Agitou-se até homogeneizar e armazenou-se entre 2 a 8°C ao abrigo da luz.

⇒ Solução aquosa de metanol a 5%: de uma garrafa de 1 L de água LC-MS retirou-se 50 mL e adicionou-se o volume em falta de metanol Lichrosolv. Homogeneizou-se por inversão e armazenou-se entre 2 a 8°C.

⇒ Solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% (em água LC-MS): do frasco de 1 L de água LC-MS retirou-se 1 mL e adicionou-se 1 mL de ácido fórmico a 98-100%. Procedeu-se à homogeneização por inversão e levou-se ao ultra-sons durante 15 min antes de colocar no sistema LC-MS/MS. Armazenou-se entre 2 a 8°C até à sua utilização.

⇒ Solução de reconstituição – acetonitrilo/solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% (25:75): num balão de diluição de 200 mL adicionou-se 50 mL de acetonitrilo Lichrosolv e perpez-se o volume com a solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% anteriormente preparada. Homogeneizou-se por inversão e armazenou-se entre 2 a 8°C.

⇒ Solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% (em água MilliQ): num balão de diluição de 2 L adicionou-se mais de metade do volume de água MilliQ, juntou-se 2 mL de ácido fórmico a 98-100% e perpez-se o seu volume com água MilliQ. Procedeu-se à homogeneização por inversão e levou-se ao ultra-sons durante 15 min antes de colocar no sistema LC-MS/MS. Armazenou-se entre 2 a 8°C até à sua utilização.

⇒ Solução Weak Needle Wash In – acetonitrilo/solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% (30:70): num balão de diluição de 2 L adicionou-se 600 mL de acetonitrilo Lichrosolv e perpez-se o volume com a solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% anteriormente preparada. Procedeu-se à homogeneização por inversão e levou-se ao ultra-sons durante 15 min antes de colocar no sistema LC-MS/MS. Armazenou-se entre 2 a 8°C até à sua utilização.

⇒ Solução Strong Needle Wash In – acetonitrilo/solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% (90:10): num balão de diluição de 1 L adicionou-se 900 mL de acetonitrilo Lichrosolv e perpez-se o volume com a solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% anteriormente preparada. Procedeu-se à homogeneização por inversão e levou-se ao ultra-sons durante 15 min antes de colocar no sistema LC-MS/MS. Armazenou-se entre 2 a 8°C até à sua utilização.

⇒ Solução Seal Wash In – acetonitrilo/água MilliQ (10:90): num balão de diluição de 1 L adicionou-se 100 mL de acetonitrilo Lichrosolv e perpez-se o volume com água MilliQ. Procedeu-se à homogeneização por inversão e levou-se ao ultra-sons durante 15 min antes de colocar no sistema LC-MS/MS. Armazenou-se entre 2 a 8°C até à sua utilização.

## 2.4 Preparação das amostras

Durante o procedimento de validação foi utilizado sangue branco, proveniente do Instituto Português do Sangue (IPS), bem como *pools* de sangue *postmortem* preparadas a partir de sangues da cavidade cardíaca recolhidos nas autópsias médico-legais efetuadas no Serviço de Patologia Forense da Delegação do Centro do INMLCF, I.P. ou nos Gabinetes Médico-Legais que atuam na sua dependência. Estes correspondem a sangues cujo resultado da triagem por LC-MS/MS para a presença de medicamentos foi negativo.

Estas amostras foram armazenadas a  $-10^{\circ}\text{C}$  até à sua utilização, onde se procedeu à sua descongelação e homogeneização através de movimentos de rotação e inversão suaves, com recurso a um agitador mecânico. Os calibradores e os controlos foram preparados utilizando 0,5 mL de sangue branco fortificado com o volume correspondente de uma mistura padrão dos seis AHTs em estudo (10, 1 ou 0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), de acordo com a concentração pretendida, e 50  $\mu\text{L}$  de padrão interno (zolpidem-d6) a 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , diluído com 3 mL de água LC-MS. Para o estudo de alguns parâmetros, efetuou-se o mesmo procedimento usando *pools* de sangue *postmortem*.

Para demonstrar a aplicabilidade do método, recorreu-se a amostras de sangue periférico e cardíaco recolhidas nas autópsias médico-legais e cujo resultado da triagem por LC-MS/MS foi positivo para os AHTs selecionados. Na preparação das amostras utilizou-se 0,5 mL de sangue, ao qual se adicionou 50  $\mu\text{L}$  de zolpidem-d6 a 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 3 mL de água LC-MS.

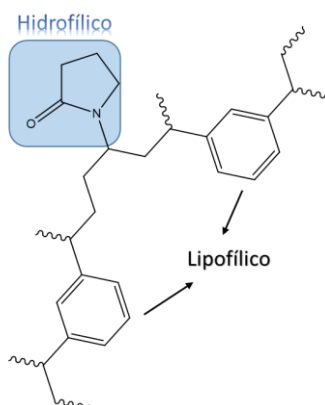
Em ambos os casos, os tubos foram posteriormente agitados no vórtex e centrifugados a 3000 rpm durante 5 minutos. Além dos calibradores, controlos e amostras (quando aplicável), para validar os resultados obtidos, foram preparados, em todas as análises, uma amostra branca e um branco de reagentes, que permitiram despistar qualquer tipo de contaminação da matriz ou dos reagentes, respetivamente. Assim, à amostra branca adicionou-se 0,5 mL de sangue branco e no branco de reagentes este volume de sangue foi substituído por um volume equivalente de água LC-MS, sendo que ambos apenas foram fortificados com 50  $\mu\text{L}$  de zolpidem-d6 a 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

## 2.5 Extração em fase sólida

O procedimento analítico para a determinação de AHTs em amostras de sangue envolveu uma SPE com recurso a colunas Oasis<sup>®</sup> HLB (3cc, 60 mg) e a sua posterior análise por LC-MS/MS. O enchimento destas colunas, apresentado na figura 2.1, possui propriedades hidrofílicas e lipofílicas, sendo adequado para a extração de uma vasta gama de substâncias.

As colunas foram acondicionadas com 2 mL de metanol Lichrosolv, seguido de 2 mL de água LC-MS. Posteriormente, foram adicionadas as amostras e depois feita a lavagem com 2 mL de metanol a 5%, com o cuidado de não deixar secar o material contido na coluna em nenhum dos passos anteriores. De seguida, procedeu-se a um passo de secagem das colunas sob vácuo (15 min) e, finalmente, à eluição com 2 mL de metanol Lichrosolv. As amostras recolhidas foram evaporadas num banho a  $40^{\circ}\text{C}$  e sob corrente de azoto até

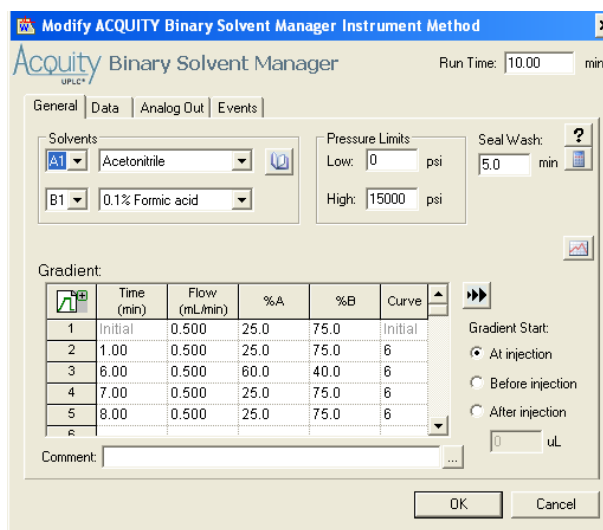
à secagem completa dos extratos. Os extratos foram então reconstituídos em 150  $\mu$ L de fase móvel (acetonitrilo: solução aquosa de ácido fórmico 0,1% - 25:75), sendo o seu volume transferido para *vials* de 300  $\mu$ L e injetados 10  $\mu$ L no sistema de LC-MS/MS.



**Figura 2.1.** Estrutura química do enchimento das colunas Oasis<sup>®</sup> HLB (3cc, 60 mg) da Waters utilizadas na SPE.

## 2.6 Cromatografia líquida

Os analitos foram separados usando uma coluna ACQUITY UPLC<sup>®</sup> HSS T3 (2,1 x 100 mm id, 1,8 $\mu$ m) e uma fase móvel, em gradiente, constituída por acetonitrilo LC-MS e solução aquosa de ácido fórmico 0,1% (figura 2.3), com um fluxo de 0,5 mL/min e um tempo de corrida de 10 minutos. A temperatura da coluna foi de 35°C e as amostras estavam refrigeradas a 15°C. Na figura 2.4 encontra-se um esquema geral dos componentes do sistema de cromatografia líquida, evidenciado o percurso da fase móvel e da amostra antes de chegar ao espectrômetro de massa do equipamento de UPLC-MS/MS da Waters.



**Figura 2.3.** Gradiente utilizado para a fase móvel (acetonitrilo:solução aquosa de ácido fórmico a 0,1%).

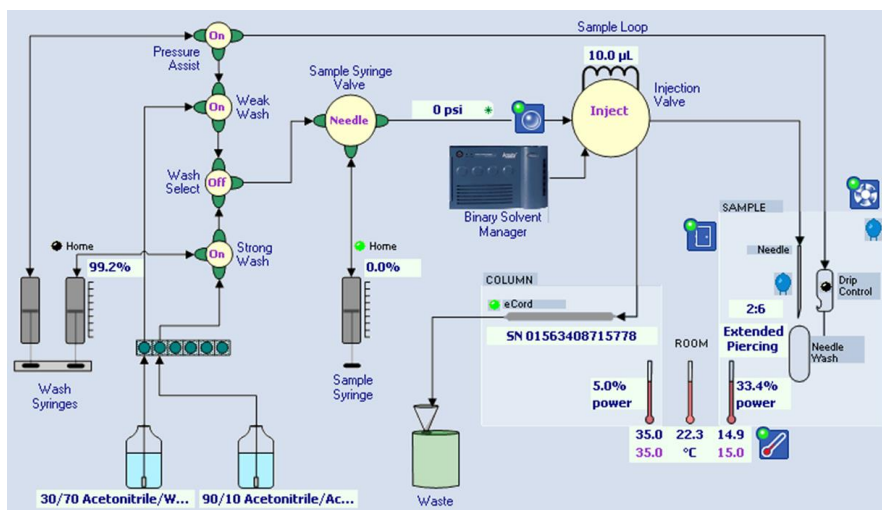


Figura 2.4. Esquema dos componentes do sistema de cromatografia líquida do UPLC-MS/MS da Waters extraído do MassLynx v4.1.

## 2.7 Espetrometria de massa

A fonte de ionização utilizada foi o *electrospray*, em modo positivo ou negativo, consoante o AHT em questão, com um potencial capilar de 1,50 kV. O analisador de massa do tipo triplo quadrupolo operou em MRM de acordo com as condições estabelecidas na tabela 2.1. As temperaturas da fonte e fluxos de gás do cone e de dessolvatação foram 150°C e 0 L/hora e 450°C e 900 L/hora, respetivamente. O gás de colisão utilizado foi o árgon com um fluxo de 0,20 mL/min. Todas as condições definidas para o espectrómetro de massa estão apresentadas na figura 2.5.

A aquisição e o tratamento de dados foi realizado com recurso ao *software* MassLynx v4.1 e TargetLynx.

Tabela 2.1. Condições experimentais utilizadas na determinação dos AHTs selecionados e do padrão interno: valores da primeira e segunda transições, voltagem do cone (CV), energia de colisão 1 e 2 (CE1 e CE2, respetivamente) e modo de ionização.

AHT	1ª Transição	2ª Transição	CV (V)	CE1 (eV)	CE2 (eV)	Modo ESI
Amlodipina	409,2 > 238,0	409,2 > 294,0	30	20	15	+
Hidroclorotiazida	296,0 > 269,0	296,0 > 205,0	50	20	25	-
Indapamida	366,3 > 132,1	366,3 > 91,0	40	20	35	+
Lercanidipina	612,2 > 280,0	612,2 > 315,0	50	25	30	+
Nifedipina	347,1 > 315,0	347,1 > 254,0	30	8	25	+
Telmisartan	515,3 > 276,3	515,3 > 497,1	50	40	25	+
Zolpidem-d6	314,5 > 235,6	-	56	38	-	+

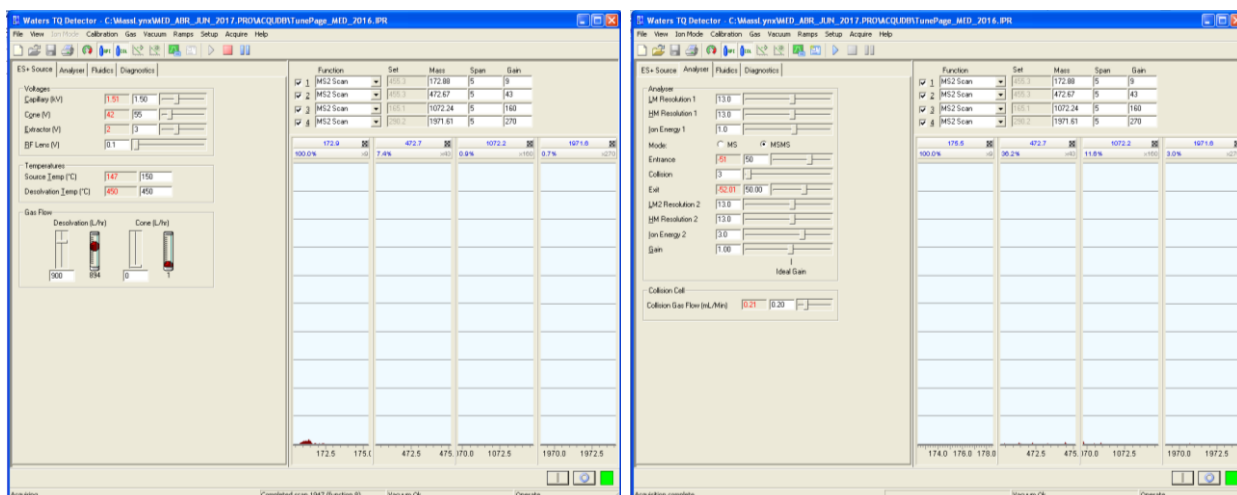


Figura 2.5. Condições do espectrômetro de massa.

Na figura 2.6 encontra-se um esquema geral dos componentes do espectrômetro de massa do sistema UPLC-MS/MS da Waters, no qual são formados os iões dos analitos por *electrospray* que, posteriormente, são separados pelos analisadores de massa de acordo com a sua razão  $m/z$  e chegam ao detetor.

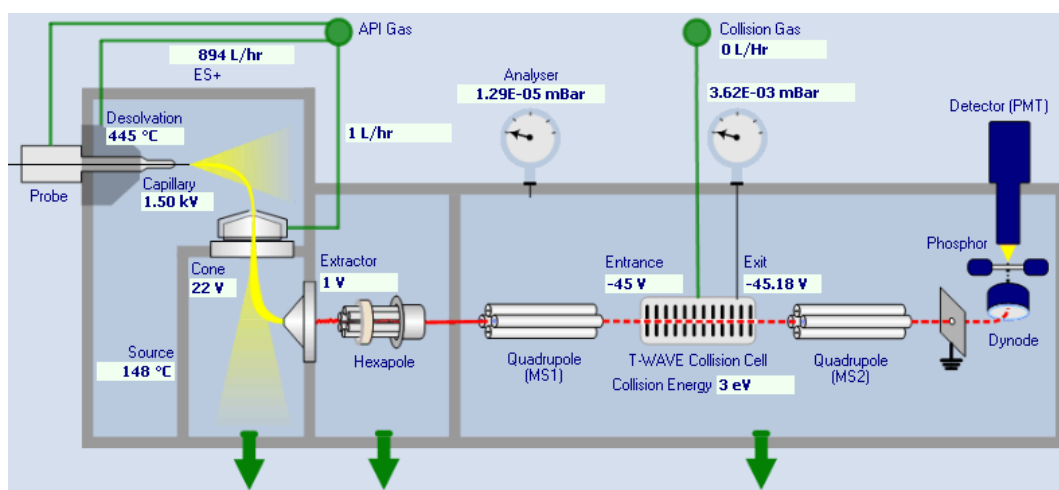


Figura 2.6. Esquema dos componentes do espectrômetro de massa do sistema UPLC-MS/MS da Waters, com ionização por *electrospray*, extraído do MassLynx v4.1.

## 2.8 Quantificação

Na quantificação dos analitos foi utilizado o método do padrão interno, no qual um padrão interno é adicionado a todas as alíquotas, a uma concentração conhecida, antes de realizar a extração com o objetivo de minimizar as variações introduzidas ao longo do procedimento de ensaio. O composto utilizado como padrão interno deve ser estruturalmente semelhante aos analitos em estudo, não reagir com estes ou outro componente

da matriz e não existir na amostra, pelo que, é frequente a utilização de padrões deuterados dos analitos em estudo <sup>119</sup>. No entanto, como estes padrões deuterados são bastante caros, utilizou-se zolpidem-d6, um padrão deuterado, já utilizado no SQTf-C para a quantificação de outros medicamentos e que demonstrou ser adequado para a quantificação destes AHTs.

Deste modo, a curva de calibração é construída através da área relativa (razão entre a área do pico do ião de quantificação do analito e a área do pico do padrão interno) em função da concentração do analito <sup>119</sup>. Para uma amostra, tendo-se obtido a área relativa, a quantificação é feita por interpolação da curva de calibração. Caso a concentração seja superior ao limite superior da curva de calibração, a amostra deve ser diluída e a análise repetida.

## 2.9 Validação do método

### 2.9.1 Estabilidade

O termo estabilidade é definido como a não alteração de uma propriedade específica de uma substância ao longo do tempo ou quando sujeita a fatores extrínsecos, nomeadamente, luz e temperatura, entre outros <sup>120</sup>. Apesar da estabilidade ser considerada um parâmetro opcional na validação de um método analítico, como já referido anteriormente, no presente trabalho torna-se crucial a sua avaliação, na medida em que é necessário garantir as condições laboratoriais para que o analito seja estável durante todo o procedimento (desde o armazenamento, preparação e extração das amostras até à injeção no equipamento de LC-MS/MS e após injeção, caso seja necessário a sua reinjeção) para que se possa fazer uma correta interpretação dos resultados obtidos <sup>120</sup>.

A avaliação deste parâmetro deve incluir o estudo da fotoestabilidade dos analitos nas soluções orgânicas e nas amostras biológicas, para verificar se a exposição à luz ambiente causa alterações na sua estrutura química <sup>120</sup>. Paralelamente, deve ser também avaliada a sua estabilidade quando sujeitas a diferentes condições de temperatura e tempo de armazenamento, de modo a simular as condições a que os padrões e as amostras possam estar sujeitos na rotina do laboratório. Assim recomenda-se o estudo da estabilidade das soluções padrão à temperatura ambiente, a estabilidade das amostras a curto prazo quando deixadas à temperatura ambiente durante um período de tempo superior ao tempo normal de processamento das amostras, a estabilidade dos analitos após a extração da amostra, a estabilidade das amostras após um número definido de ciclos de congelação e descongelação<sup>3</sup> e, por último, a estabilidade das amostras a longo prazo após a sua congelação durante um período de tempo maior <sup>120</sup>.

---

<sup>3</sup> Um ciclo consiste em descongelar a amostra, mantê-la 1 h à temperatura ambiente e congelá-la novamente durante pelo menos 24 h.

A fotoestabilidade dos AHTs foi estudada comparando os resultados obtidos para uma mistura padrão metanólica (100 ng/ml), preparada em triplicado, exposta à luz ambiente durante 2, 4, 6 e 24 h com os da mistura de referência mantida no escuro e o mesmo foi efetuado com as amostras de sangue fortificadas a 50 e a 200 ng/mL <sup>120</sup>.

Paralelamente, os estudos de estabilidade destes analitos foram desenvolvidos a dois níveis de concentração (baixa e alta, respetivamente, 50 e 200 ng/ml), em triplicado, sob diferentes condições de armazenamento e protegidas da luz para evitar a possível fotodegradação. Para as amostras, estes estudos incluíram: a) estabilidade a curto prazo (à temperatura ambiente durante 24 h); b) estabilidade a médio prazo (a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 7 dias); c) estabilidade após ciclos de congelação/descongelação (desde  $-20^{\circ}\text{C}$  até à temperatura ambiente em dois ciclos de congelação/descongelação em dias consecutivos); e d) a estabilidade após preparação da amostra (a  $15^{\circ}\text{C}$  durante 24 h) <sup>120</sup>. Além disto, também a estabilidade da mistura padrão dos analitos foi avaliada após 7 dias no congelador ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) e 24 h à temperatura ambiente <sup>120</sup>. Os pontos da curva de calibração e os controlos dos padrões e das amostras de sangue foram preparados de acordo com as tabelas 2.2 e 2.3, respetivamente. A todas as alíquotas foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de zolpidem-d6 a 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (concentração final de 100 ng/mL).

**Tabela 2.2.** Preparação da curva de calibração e dos controlos para o estudo da estabilidade dos padrões dos AHTs.

<b>Pontos da curva de calibração</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>
Conc (ng/mL)	10	20	50	100	200	500	1000
Volume ( $\mu\text{L}$ )	50	100	25	50	100	25	10
Conc. MP ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	0,1		1			10	
Volume de fase móvel ( $\mu\text{L}$ )	400	350	425	400	350	425	400
<b>Controlos</b>	<b>1</b>		<b>2</b>			<b>3</b>	
Controlo (100 ng/mL)	100		100			100	
Volume ( $\mu\text{L}$ )	50		50			50	
Conc. MP ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	1						

Nota: MP (mistura padrão).

**Tabela 2.3.** Preparação da curva de calibração e dos controlos para o estudo da estabilidade das amostras de sangue fortificadas com os AHTs selecionados.

<b>Pontos da curva de calibração</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>
Concentração (ng/mL)	10	20	50	100	200	500	1000
Volume (µL)	50	100	25	50	100	25	10
Concentração MP (µg/mL)	0,1		1			10	
<b>Controlos</b>	<b>1</b>		<b>2</b>			<b>3</b>	
Controlo baixo (50 ng/mL)	50		50			50	
Volume (µL)	25		25			25	
Concentração MP (µg/mL)	1						
<b>Controlos</b>	<b>1</b>		<b>2</b>			<b>3</b>	
Controlo alto (200 ng/mL)	200		200			200	
Volume (µL)	100		100			100	
Concentração MP (µg/mL)	1						

## 2.9.2 Especificidade/Seletividade

Os termos especificidade e seletividade são muitas vezes considerados de forma errónea como conceitos sobreponíveis. A especificidade de um método traduz a sua capacidade de determinar inequivocamente um analito na presença de outros componentes, nomeadamente, impurezas, produtos de degradação, constituintes da matriz, entre outros, sem influência significativa destas. Por outro lado, a seletividade diz respeito à capacidade de um método separar fisicamente as substâncias de uma mistura, recorrendo, por exemplo, a técnicas cromatográficas <sup>118,121</sup>. Portanto, um método é específico quando responde apenas a uma substância e seletivo quando é capaz de produzir uma resposta para diversas substâncias em simultâneo, sendo, no entanto, possível distinguir a resposta de cada uma delas <sup>119,122</sup>. Posto isto, e uma vez que, no âmbito deste estudo, recorreremos a uma técnica cromatográfica hifenada, o termo mais adequado é seletividade.

A seletividade de um método analítico pode ser avaliada através da demonstração de resultados positivos em amostras fortificadas com os analitos de interesse e da ausência de sinais analíticos interferentes (resultados negativos) num conjunto de amostras brancas, que não deve ser inferior a 6 amostras brancas de diferentes fontes <sup>123,124</sup>.



Para avaliar este parâmetro foram preparadas dez misturas (*pools*) de sangues diferentes, cada uma constituída por várias amostras previamente analisadas por ensaios imuno-enzimáticos e triagem por LC-MS/MS, cujo resultado foi negativo para benzodiazepinas, drogas de abuso e medicamentos. Para realizar este ensaio foram selecionados sangues da cavidade cardíaca (*postmortem*) e feitas misturas a partir destes (POOL01 a POOL09) e o mesmo foi efetuado com sangues periféricos vivos (POOL10), de acordo com a tabela 2.4. Deveriam ter também sido selecionados sangues periféricos *postmortem*, uma vez que esta é a matriz preferencial para a quantificação de substâncias, no entanto, devido à pouca quantidade recolhida durante a autópsia e, consequentemente, existente no SQTf-C não foi possível a sua utilização.

Foram utilizadas duas alíquotas de 0,5 mL de cada uma das misturas, sendo que a uma das alíquotas foi aplicado diretamente o procedimento de ensaio, enquanto a segunda foi previamente fortificada com 50 ng/mL de cada um dos AHTs em estudo, a partir de uma mistura padrão a 1 µg/mL. Preparou-se ainda uma terceira alíquota da POOL10, à qual se adicionou 25 µL de uma mistura padrão de 38 medicamentos a 1 µg/mL, que podem ser encontrados na rotina do SQTf-C, entre os quais antidepressivos, antipsicóticos, anticoagulantes, ansiolíticos/hipnóticos, medicamentos para a disfunção erétil, bloqueadores da entrada de cálcio, bloqueadores β e outros AHTs, para averiguar se estes interferem de alguma forma com a determinação dos AHTs em estudo. Adicionaram-se a todas as alíquotas 50 µL de padrão interno a 1 µg/mL.

**Tabela 2.4.** Misturas de sangue utilizadas no estudo da especificidade/seletividade.

<b>Código (amostras de sangue)</b>	<b>Nº dos processos</b>
POOL01	60/08; 63/08; 94/08; 97/08;
POOL02	733/08; 882/08; 941/08; 1067/08
POOL03	2147/08; 2169/08; 2175/08; 2178/08
POOL04	364/08; 506/08; 547/08; 792/08
POOL05	1847/16; 2142/16; 2144/16; 2161/16
POOL06	1866/16; 2167/16; 2169/16; 2191/16
POOL07	2192/16; 2206/16; 2216/16; 2233/16
POOL08	2235/16; 2238/16; 2239/16; 2244/16
POOL09	2430/16; 2523/16; 2529/16; 2530/16
POOL10	SV119 + SV121 (Sangue + Plasma (50:50))

### 2.9.3 Capacidade de identificação

A capacidade de identificação consiste em demonstrar que o método possibilita inequivocamente a identificação dos analitos em estudo. O estudo deste parâmetro foi efetuado utilizando as amostras fortificadas preparadas para avaliação do parâmetro anterior (especificidade/seletividade).

### 2.9.4 Linearidade e modelo de calibração

O estudo da linearidade tem como objetivo avaliar o intervalo de concentrações (gama de trabalho) no qual os sinais analíticos são diretamente proporcionais às concentrações do analito na amostra <sup>118,119</sup>. Esta análise é geralmente realizada com recurso à ferramenta estatística de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, onde é frequente assumir que a dispersão medida em termos de variância das diferenças entre os valores teóricos e valores experimentais observados é constante em toda a gama de trabalho (homocedasticidade), isto é, que os diferentes calibradores utilizados na elaboração da curva de calibração contribuem de igual forma para o estudo da regressão <sup>118,122</sup>.

Contudo, quando a gama de trabalho difere em mais do que uma ordem de grandeza, é frequente observar que a variância não é constante em toda a gama de trabalho (heterocedasticidade), sendo, geralmente, a contribuição dos calibradores de maior concentração superior à dos calibradores de menor concentração, o que pode ter efeitos negativos na exatidão das quantificações realizadas na gama inferior da curva de calibração <sup>125</sup>. Nestes casos, é necessário introduzir um fator de ponderação que minimize a contribuição dos calibradores de maior concentração <sup>118</sup>.

É recomendado a utilização de pelo menos cinco pontos de calibração, preparados na matriz em estudo, e as suas concentrações devem estar uniformemente distribuídas ao longo da gama de trabalho <sup>119,122</sup>. Portanto, para avaliar a linearidade foi preparada uma curva de calibração com quinze pontos para cada um dos AHTs, distribuídos entre as concentrações de 5 a 500 ng/mL, por fortificação de alíquotas de 0,5 mL de sangue branco, a partir de misturas padrão preparadas em metanol a 0,1 µg/mL, 1 µg/mL e 10 µg/mL. As concentrações escolhidas para os pontos da curva de calibração e os respetivos volumes utilizados das misturas padrão encontram-se resumidos na tabela 2.5. Paralelamente, para avaliar a homocedasticidade, foram preparados dois conjuntos de alíquotas, em quintuplicado, em que o primeiro foi fortificado com uma concentração igual ao limite inferior da curva de calibração (5 ng/mL) e o segundo com uma concentração de 500 ng/mL, correspondente ao limite superior da curva de calibração. A todas as alíquotas foram adicionados 50 µL de uma solução metanólica de zolpidem-d6 a 1 µg/mL.

**Tabela 2.5.** Preparação da curva de calibração para o estudo de linearidade e gama de trabalho.

Pontos da curva de calibração	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Concentração (ng/mL)	5	10	15	20	50	80	100	150	200	360	300	360	400	460	500
Volume (µL)	25	50	75	100	25	40	50	75	100	13	15	18	20	23	25
Concentração MP (µg/mL)	0,1				1					10					

### 2.9.5 Efeito matriz

A técnica de LC-MS/MS, devido à complexidade das matrizes biológicas, é suscetível ao efeito matriz, que pode ter impacto na exatidão, precisão e robustez do método. É definido como a diferença entre a resposta obtida pelo espectrómetro de massa para um dado analito numa solução padrão e a resposta dada para o mesmo analito num extrato resultante de uma matriz biológica, nas mesmas condições analíticas <sup>118</sup>. O efeito matriz resulta da co-eluição de componentes da matriz (como, por exemplo, metabolitos, componentes endógenos, impurezas, produtos de degradação) com os analitos de interesse, que se traduz na supressão iónica ou, em alguns casos, na intensificação iónica <sup>117,118</sup>. O efeito matriz é específico do analito, uma vez que depende das suas propriedades físico-químicas, no entanto, pode ser muito variável e difícil de controlar e/ou prever. Uma forma de avaliar o efeito matriz é através do método de fortificação pós-extração, método utilizado neste trabalho, uma vez que permite uma avaliação quantitativa do efeito matriz <sup>117</sup>.

Para avaliar este parâmetro, prepararam-se, em quintuplicado, dois conjuntos de alíquotas de 0,5 mL de sangue branco (SV119), aos quais foi aplicado diretamente o procedimento extrativo. Após a eluição foram adicionados 25 µL da mistura padrão dos AHTs a 1 µg/mL ao primeiro conjunto e 100 µL da mistura padrão dos AHTs a 1 µg/mL ao segundo que correspondem, respetivamente, ao controlo baixo (50 ng/mL) e ao controlo alto (200 ng/mL). Este procedimento foi repetido usando como amostra branca uma *pool* de sangues cardíacos utilizada anteriormente na avaliação da seletividade (POOL08). Paralelamente, preparam-se dois conjuntos de tubos de ensaio, em quintuplicado, aos quais se adicionou 2 mL de metanol (solvente de eluição) e, como anteriormente, 25 µL e 100 µL da mistura padrão dos AHT a 1 µg/mL ao primeiro e segundo conjuntos, respetivamente. Somente após a fortificação foram adicionados a todas as alíquotas 50 µL de zolpidem-d6 a 1 µg/mL. Todas as amostras foram levadas à secura, reconstituídas em fase móvel e injetadas no equipamento de LC-MS/MS.

## 2.9.6 Eficiência da extração

As amostras biológicas, devido à sua complexidade, são submetidas a processos de extração que visam extrair os analitos da matriz e eliminar possíveis interferências. No entanto, este procedimento está inevitavelmente associado a perdas de analitos, pelo que a eficiência da extração deve ser avaliada através de ensaios de recuperação. A recuperação é definida como a resposta do detetor a uma quantidade de analito adicionada e extraída da matriz comparada à resposta obtida para essa mesma quantidade adicionada à matriz após a extração <sup>123</sup>.

Para o estudo da eficiência da extração selecionaram-se três níveis de concentração: baixa (50 ng/mL), intermédia (200 ng/mL) e alta (500 ng/mL). Para cada uma das gamas foram preparados dois conjuntos de amostras de sangue branco (SV119) em triplicado. Um destes conjuntos foi fortificado no início do procedimento de preparação de amostras, enquanto o outro foi fortificado imediatamente antes do passo de secagem do extrato recolhido durante o passo de eluição. O volume de sangue utilizado foi de 0,5 mL. As fortificações foram feitas a partir de misturas padrão dos AHTs preparadas em metanol a 1 µg/mL (gamas baixa e intermédia) e 10 µg/mL (gama alta). O zolpidem-d6 a 1 µg/mL (50 µL) só foi adicionado a todas as alíquotas imediatamente antes do passo de evaporação.

## 2.9.7 Carryover

Em toxicologia forense é frequente os analitos de interesse estarem presentes nas amostras em concentrações elevadas, pelo que durante a análise cromatográfica estes podem ser detetados em amostras posteriores às quais não pertencem originando, deste modo, falsos positivos. O estudo da existência de fenómenos de arrastamento foi efetuado em conjunto com o parâmetro anterior. Juntamente com as amostras do estudo da eficiência da extração foram preparados duas amostras de sangue branco (SV119), que foram injetados entre as amostras correspondentes à gama alta (500 ng/mL), para detetar uma possível contaminação.

## 2.9.8 Limiares analíticos

O limite de deteção (LD) é definido como a menor quantidade de um analito presente numa amostra que pode ser detetada mas não necessariamente quantificada como um valor exato, sob determinadas condições experimentais. Por sua vez, o limite de quantificação (LQ) corresponde à menor quantidade de um analito presente numa amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão aceitáveis, sob determinadas condições experimentais <sup>119,122</sup>.

Existem essencialmente duas metodologias para a determinação de LD e LQ: uma baseada na razão sinal-ruído e outra nos parâmetros obtidos a partir da curva de calibração, sendo esta última a utilizada neste trabalho,

uma vez que a primeira abordagem apenas deve ser utilizada caso o ensaio não exiba um grau de linearidade que permita usar a segunda abordagem <sup>117,119,124</sup>.

Para estabelecer os LD e LQ das substâncias em estudo, foi preparada uma curva de calibração com dez pontos para cada um dos AHTs, distribuídos o mais uniformemente possível e perto do limite de detecção esperado, por fortificação de um branco de sangue (SV119) a partir de uma mistura padrão dos AHTs preparada em metanol com uma concentração de 0,1 µg/mL. As concentrações escolhidas para os pontos da curva de calibração e os respetivos volumes utilizados das misturas padrão encontram-se na tabela 2.6. O volume de sangue utilizado foi de 0,5 mL. Utilizou-se como padrão interno uma solução metanólica de zolpidem-d6 a 1 µg/mL, tendo-se usado um volume de 50 µL.

**Tabela 2.6.** Preparação das curvas de calibração para o estudo LD e LQ.

<b>Pontos da curva de calibração</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
<b>Concentração (ng/mL)</b>	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15
<b>Volume (µL)</b>	15	20	25	30	35	40	45	50	60	75
<b>Concentração MP (µg/mL)</b>	0,1									

Uma vez obtidos os valores dos limites, é necessário testá-los para ter confiança nos valores que foram obtidos. Portanto, tendo em conta a gama de valores obtidos a partir das curvas de calibração para os limites dos AHTs em estudo decidiu-se testar o LQ a duas concentrações: 3 ng/mL e 4 ng/mL. Para tal, prepararam-se dois conjuntos de cinco replicados independentes, um para cada concentração, por fortificação de amostras brancas a partir de uma mistura padrão dos AHTs a 0,1 µg/mL. Em paralelo, preparou-se uma curva de calibração com dez pontos para cada uma das substâncias, equivalente à preparada anteriormente para a determinação dos limites. As concentrações dos pontos das curvas de calibração e dos controlos e os respetivos volumes utilizados das misturas padrão encontram-se na tabela 2.7. O volume de sangue utilizado foi de 0,5 mL, tendo-se adicionado a todas as amostras 50 µL de uma solução metanólica de zolpidem-d6 a 1 µg/mL.

**Tabela 2.7.** Preparação das curvas de calibração e dos controlos para o teste do limite de quantificação.

<b>Pontos da curva de calibração</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
Concentração (ng/mL)	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15
Volume (µL)	15	20	25	30	35	40	45	50	60	75
Concentração MP (µg/mL)	0,1									
<b>Controlo (3 ng/mL)</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>					
Volume (µL)	15	15	15	15	15					
Concentração MP (µg/mL)	0,1									
<b>Controlo (4 ng/mL)</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>					
Volume (µL)	20	20	20	20	20					
Concentração MP (µg/mL)	0,1									

## 2.9.9 Precisão

A precisão avalia o grau de proximidade relativa dos resultados obtidos por aplicação repetida do mesmo procedimento de ensaio sobre uma mesma amostra ou amostras semelhantes em condições pré-definidas <sup>119,122</sup>. Existem duas medidas extremas para avaliar a precisão, designadas por repetibilidade e reprodutibilidade.

A repetibilidade refere-se à precisão de um método realizado nas mesmas condições, isto é, efetuado sobre uma mesma amostra, em condições tão estáveis quanto possível, tais como: mesmo laboratório, mesmo analista, mesmo equipamento, mesmo tipo de reagentes <sup>119,122</sup>. A única variável que pode variar é o tempo, mas para se estar a avaliar a repetibilidade de um método, os ensaios têm de ser realizados no menor intervalo de tempo possível.

A repetibilidade do método foi estudada através da injeção de cinco replicados independentes, preparados por fortificação de 0,5 mL de sangue branco a duas gamas de concentração (50 ng/mL e 200 ng/mL), a partir de uma mistura padrão dos AHTs a 0,1 µg/mL, em condições de repetibilidade. Utilizou-se como padrão interno 50 µL de uma solução metanólica de zolpidem-d6 a 1 µg/mL. Na tabela 2.8 estão apresentadas as concentrações escolhidas para os pontos da curva de calibração e dos controlos, bem como os respetivos volumes das misturas padrão utilizados.

**Tabela 2.8.** Preparação da curva de calibração e dos controlos para o estudo da repetibilidade.

<b>Pontos da curva de calibração</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>
Concentração (ng/mL)	5	10	20	50	100	200	500
Volume (µL)	25	50	100	25	50	100	25
Concentração MP (µg/mL)	0,1		1			10	
<b>Controlos</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>		
Controlo <b>baixo (50 ng/mL)</b>	50	50	50	50	50		
Volume (µL)	25	25	25	25	25		
Concentração MP (µg/mL)	1						
Controlo <b>alto (200 ng/mL)</b>	200	200	200	200	200		
Volume (µL)	100	100	100	100	100		
Concentração MP (µg/mL)	1						

A reprodutibilidade exprime a precisão de um método realizado sobre uma mesma amostra, em condições diferentes, nomeadamente, diferentes laboratórios, analistas, equipamentos e/ou tempos diferentes <sup>119,122</sup>. A reprodutibilidade de um método apenas pode ser avaliada através de ensaios interlaboratoriais, refletindo assim a amplitude de erros aleatórios de quantificação à escala global <sup>122</sup>. Posto isto, neste trabalho, a reprodutibilidade não foi avaliada, uma vez que não foi possível a realização ensaios interlaboratoriais.

A repetibilidade e a reprodutibilidade representam, respetivamente, a variabilidade mínima e máxima dos resultados <sup>122</sup>. Entre estas, encontra-se a precisão intermédia, que se refere à concordância dos resultados obtidos para um conjunto de amostras, aplicando um determinado método analítico, mas variando uma ou mais condições de análise como, por exemplo, diferentes analistas, equipamentos e períodos de tempo, pressupondo que as características da amostra não variam durante o intervalo de tempo considerado <sup>119,122</sup>. Esta medida de precisão é a mais usada, uma vez que é a mais representativa da variabilidade dos resultados a longo prazo num laboratório <sup>122</sup>.

Na avaliação da precisão intermédia foram contempladas as fontes de variabilidade que simulam o normal funcionamento do laboratório (tempo, reagentes, curva de calibração, temperatura e operacionalidade do equipamento). A precisão intermédia foi estudada através da preparação de curvas de calibração ao longo de cinco dias consecutivos. Juntamente com cada curva foram preparados dois controlos (50 e 200 ng/mL, em triplicado), como descrito anteriormente para a repetibilidade (ver as concentrações utilizadas para os pontos da

curva de calibração e para os controlos, bem como os respetivos volumes utilizados das misturas padrão na tabela 2.8).

### **2.9.10 Exatidão**

A exatidão do método analítico mede a concordância entre o valor obtido num ensaio e o valor de referência convencionalmente aceite como verdadeiro. Pode ser avaliada através de materiais de referência certificados, ensaios interlaboratoriais, comparação de métodos ou ensaios de recuperação <sup>119,122</sup>. No presente trabalho, a avaliação deste parâmetro foi efetuada em simultâneo com a precisão intermédia.

### **2.9.11 Integridade da diluição**

Uma vez que em toxicologia forense é frequente a análise de amostras nas quais os analitos se encontram em concentrações elevadas, sempre que estas ultrapassem o limite superior da curva de calibração, é necessário proceder à diluição das amostras, de modo que as suas concentrações se insiram dentro da gama de trabalho definida. A integridade da diluição deve ser demonstrada pela fortificação de uma amostra branca com os analitos de interesse a uma concentração acima do último nível de calibração e posterior diluição, devendo-se efetuar pelo menos cinco determinações por cada fator de diluição estudado <sup>44,99</sup>.

Deste modo, para o estudo deste parâmetro, foram preparados, em quintuplicado, três conjuntos de alíquotas de uma amostra de sangue branco, fortificados com concentrações distintas dos analitos de interesse (800 ng/mL, 1500 ng/mL e 2000 ng/mL) a partir de uma mistura padrão dos AHTs com uma concentração de 10 µg/mL. Estas amostras foram diluídas de modo a estudar os fatores de diluição em estudo (respetivamente, 2, 5 e 10 vezes), sendo o volume final de sangue de 0,5 mL. Após as diferentes diluições, adicionaram-se 50 µL de uma solução metanólica de zolpidem-d6 a 1 µg/mL. Na tabela 2.9 estão apresentados os pontos utilizados na preparação da curva de calibração e das amostras fortificadas, bem como os respetivos volumes das misturas padrão utilizados.



**Tabela 2.9.** Preparação da curva de calibração e das amostras utilizadas no estudo da integridade da diluição.

<b>Pontos da curva de calibração</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>
Concentração (ng/mL)	5	10	20	50	100	200	500
Volume (µL)	25	50	100	25	50	100	25
Concentração MP (µg/mL)	0,1			1			10
<b>Fatores de diluição</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>		
Concentração inicial (ng/mL)	800	800	800	800	800		
Volume (µL)	40	40	40	40	40		
Concentração MP (µg/mL)	10						
<b>Diluição 2x<sup>4</sup> - concentração final (ng/mL)</b>	400	400	400	400	400		
Concentração inicial (ng/mL)	1500	1500	1500	1500	1500		
Volume (µL)	75	75	75	75	75		
Concentração MP (µg/mL)	10						
<b>Diluição 5x<sup>5</sup> - concentração final (ng/mL)</b>	300	300	300	300	300		
Concentração inicial (ng/mL)	2000	2000	2000	2000	2000		
Volume (µL)	100	100	100	100	100		
Concentração MP (µg/mL)	10						
<b>Diluição 10x<sup>6</sup> - concentração final (ng/mL)</b>	200	200	200	200	200		

## 2.9.12 Robustez

A robustez de um método corresponde à capacidade deste se manter inalterado após a introdução deliberada de pequenas alterações nos seus parâmetros, fornecendo informação sobre o comportamento do método em condições normais de utilização <sup>119,122</sup>.

<sup>4</sup> 0,25 mL da amostra inicial + 0,25 mL de sangue branco

<sup>5</sup> 0,1 mL da amostra inicial + 0,4 mL de sangue branco

<sup>6</sup> 0,1 mL da amostra inicial + 0,9 mL de sangue branco (deste volume apenas foi usado na fortificação 0,5 mL, como anteriormente)



# Capítulo 3

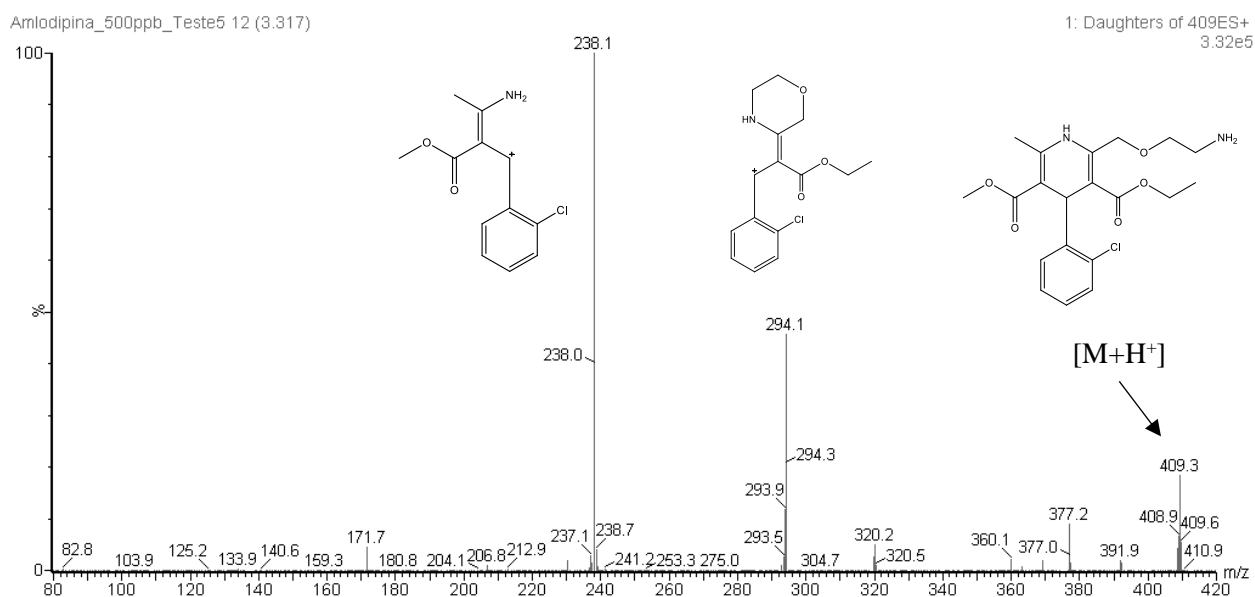
## Resultados e Discussão

### 3.1 Estudo do padrão de fragmentação dos anti-hipertensores

De seguida são apresentados os espectros de massa obtidos para cada um dos AHTs, nos quais estão identificados os fragmentos monitorizados neste estudo.

#### AMLODIPINA

Na figura 3.1 encontra-se apresentado o espectro de massa da amlodipina, sendo os fragmentos  $m/z$  238 (fragmento principal) e  $m/z$  294 os selecionados, o que está de acordo com os dados da literatura<sup>126,127</sup>.



**Figura 3.1.** Espectro de massa da amlodipina. Fragmento principal  $m/z$  238 e fragmento  $m/z$  294.

Na figura 3.2 está esquematizado o possível mecanismo de formação dos fragmentos mencionados anteriormente.

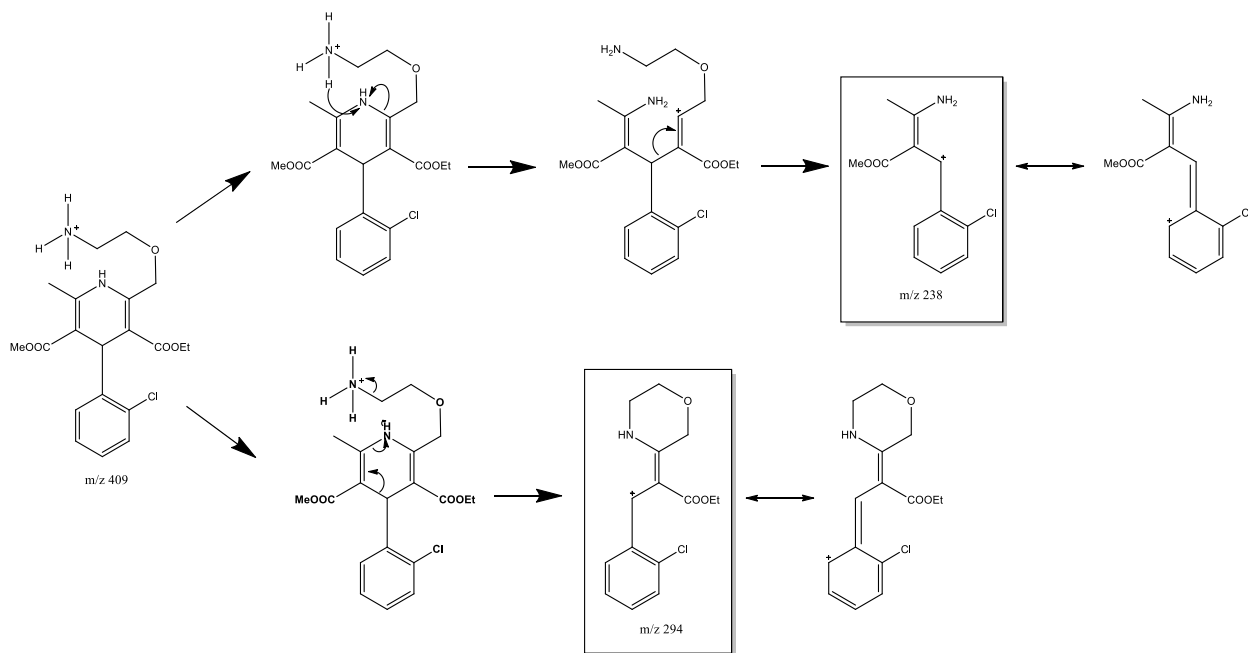


Figura 3.2. Mecanismo de formação dos íons com m/z 238 e m/z 294 <sup>127</sup>.

### HIDROCLOROTIAZIDA

Os fragmentos selecionados para o estudo da hidroclorotiazida foram m/z 269 e m/z 205, de acordo com o espectro de massa apresentado na figura 3.3 e também de acordo com os dados recolhidos da literatura <sup>47,49,69</sup>.

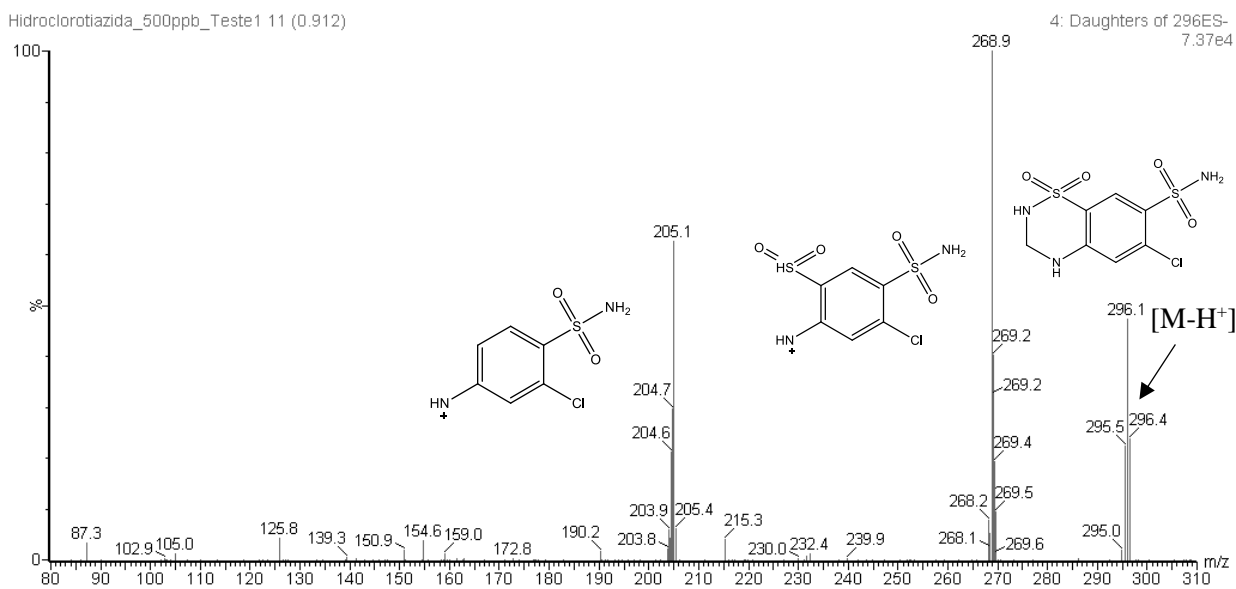


Figura 3.3. Fragmentação da hidroclorotiazida. Fragmento principal m/z 269 e fragmento m/z 205.

## INDAPAMIDA

A figura 3.4 diz respeito ao espectro de massa obtido para a indapamida, sendo o fragmento  $m/z$  132,1 correspondente ao fragmento principal, o que vai de encontro ao referido na literatura <sup>51,53,101</sup>. Além deste, foi ainda escolhido o fragmento com  $m/z$  91, que apesar de não ser referenciado na literatura, provavelmente corresponde ao carbocatião benzilo, que por sua vez, pode ser rearranjar e dar origem ao carbocatião tropílio, como ilustrado na figura 3.5.

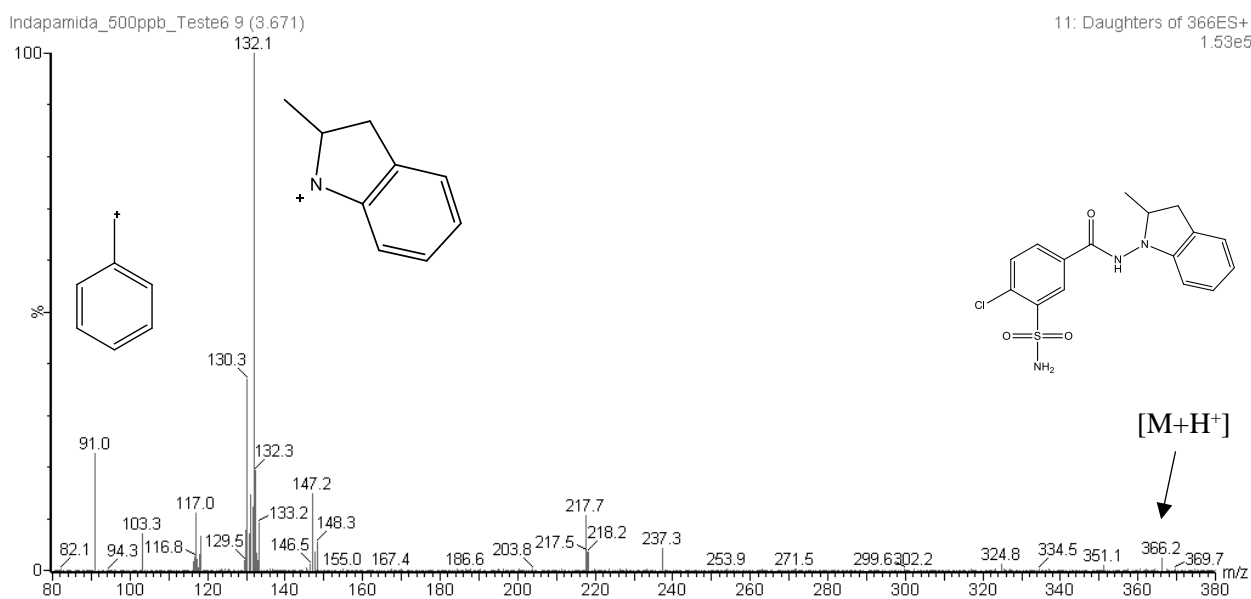


Figura 3.4. Fragmentação da indapamida. Fragmento principal  $m/z$  132,1 e fragmento  $m/z$  91.

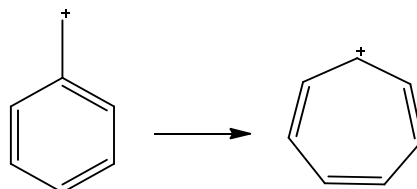
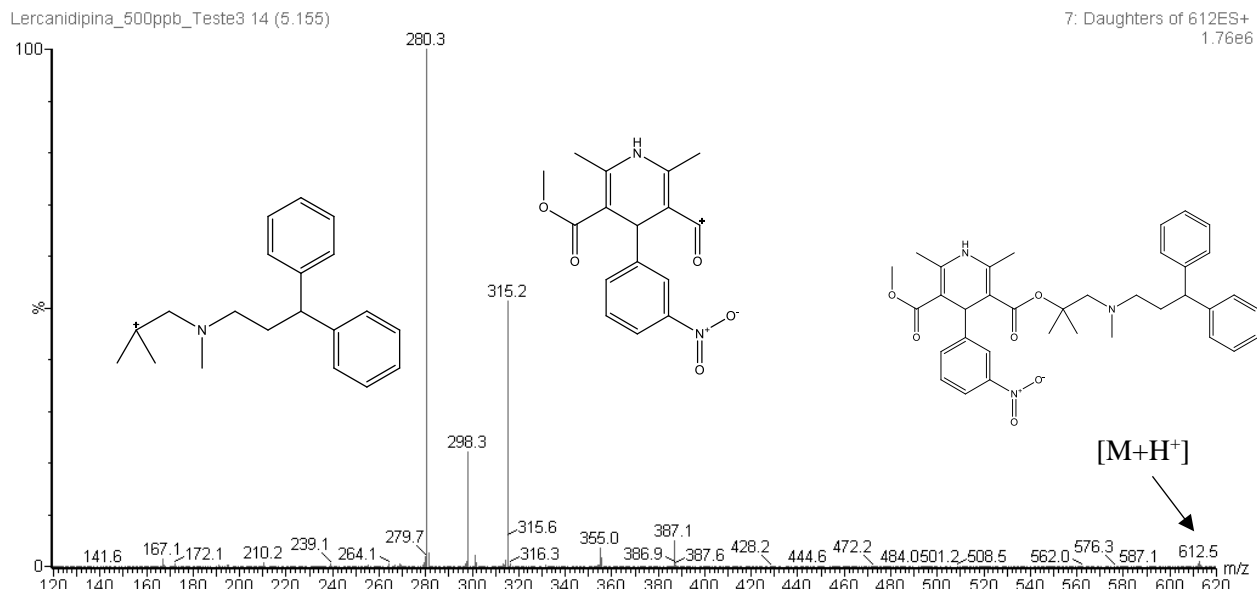


Figura 3.5. Rearranjo do carbocatião benzilo ( $m/z$  91).

## LERCANIDIPINA

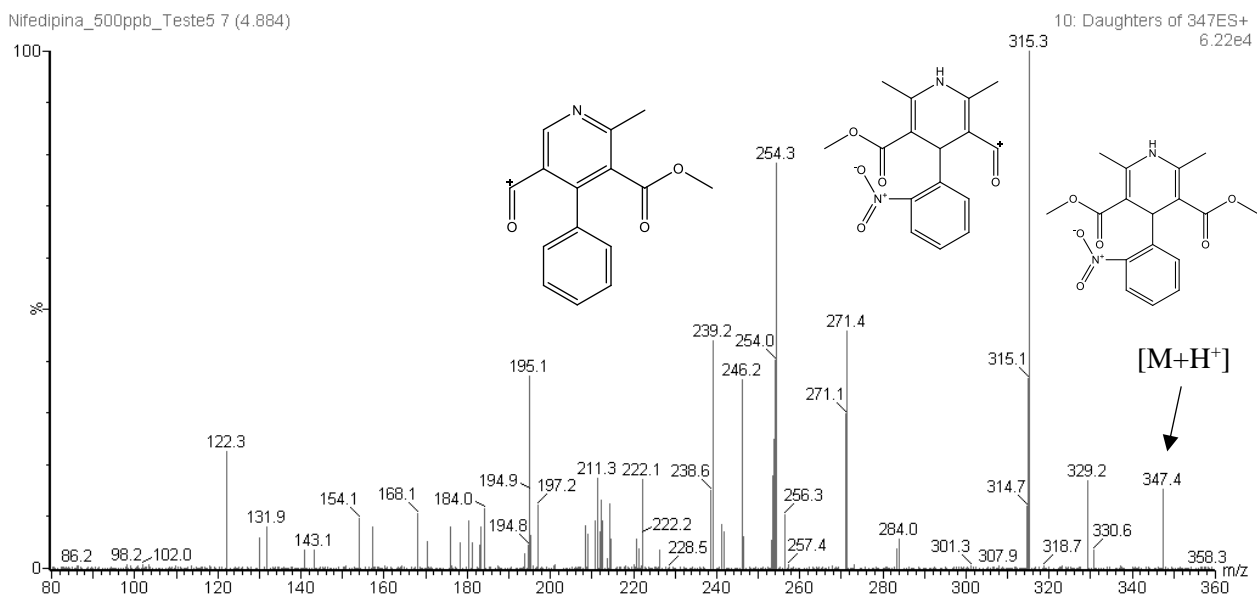
O espectro de massa obtido para a lercanidipina está apresentado na figura 3.6. Os fragmentos selecionados foram  $m/z$  280 e  $m/z$  315, como também referido na literatura <sup>41,56,128</sup>.



**Figura 3.6.** Fragmentação da lercanidipina. Fragmento principal  $m/z$  280 e fragmento  $m/z$  315.

### NIFEDIPINA

O espectro de massa da nifedipina está apresentado na figura 3.7. Diversos autores<sup>39,63,64,100,129,130</sup> selecionam como fragmento principal  $m/z$  315. Para além deste, foi ainda escolhido o fragmento com  $m/z$  254, o que também está de acordo com a literatura<sup>28</sup>.



**Figura 3.7.** Fragmentação da nifedipina. Fragmento principal  $m/z$  315 e fragmento  $m/z$  254.

## TELMISARTAN

Na figura 3.8 encontra-se o espectro de massa obtido para o telmisartan, sendo que os fragmentos selecionados foram  $m/z$  276,3 e  $m/z$  497,3, o que está de acordo com os dados da literatura <sup>69,78</sup>.

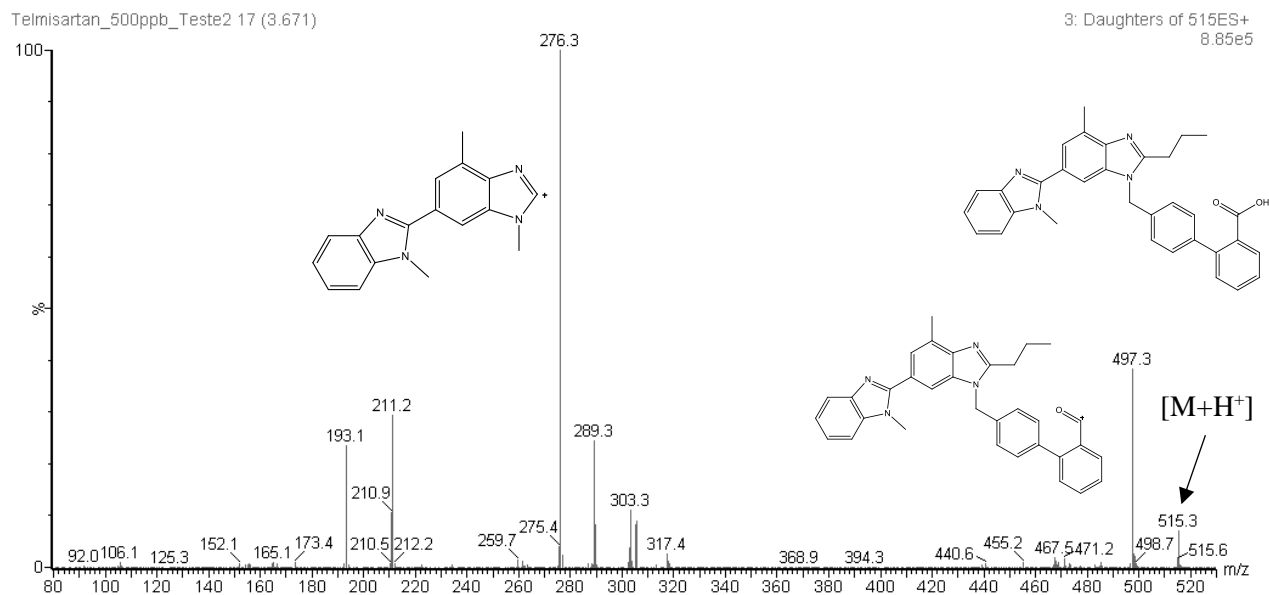


Figura 3.8. Fragmentação do telmisartan. Fragmento principal  $m/z$  276,3 e fragmento  $m/z$  497,3.

## 3.2 Validação preliminar

### 3.2.1 Comparação de colunas de extração

Numa primeira fase, pretendeu-se estudar a eficiência da extração utilizando diferentes colunas e/ ou condições experimentais. Assim, foram testados três tipos de extração: (A) a extração utilizando colunas Oasis<sup>®</sup> HLB (Waters), um procedimento já implementado na rotina do SQTf-C para a extração de medicamentos; (B) a extração usando as colunas usadas na rotina do laboratório, mas omitindo o passo de acondicionamento da coluna e (C) a extração usando colunas Oasis<sup>®</sup> Prime HLB (Waters), na qual não é necessário a execução do passo de acondicionamento da coluna. A tabela 3.1 resume o protocolo de extração realizado para cada estudo. Para cada extração foram testados sete calibradores (5, 10, 20, 50, 100, 200 e 500 ng/mL), como indicado na tabela 3.2, para além de um controlo baixo (50 ng/mL) e um controlo alto (200 ng/mL), em duplicado.

**Tabela 3.1** Diferentes protocolos de extração utilizados para a determinação de AHTs em amostras de sangue.

<b>(A) Colunas Oasis® HLB (Waters)</b>	<b>(B) Colunas Oasis® HLB (Waters)</b> <b>(C) Colunas Oasis® Prime HLB (Waters)</b>
0,5 mL de sangue + 50 µL de PI a 1 µg/mL + fortificação das amostras <sup>7</sup> + 3 mL de H <sub>2</sub> O Centrifugar 3000 rpm, 5 minutos  <p style="text-align: center;"><b>SPE</b></p> Acondicionamento – 2 mL de MeOH + 2 mL de H <sub>2</sub> O Aplicação das Amostras Lavagem – 2 mL de MeOH 5% Secagem em vácuo, 15 minutos Eluição – 2 mL de MeOH Evaporação sob corrente de azoto (40°C) Adição de 150 µL de solução de reconstituição	0,5 mL de sangue + 50 µL de PI a 1 µg/mL + fortificação das amostras <sup>7</sup> + 3 mL de H <sub>2</sub> O Centrifugar 3000 rpm, 5 minutos  <p style="text-align: center;"><b>SPE</b></p> - Aplicação das Amostras Lavagem – 2 mL de MeOH 5% Secagem em vácuo, 15 minutos Eluição – 2 mL de MeOH Evaporação sob corrente de azoto (40°C) Adição de 150 µL de solução de reconstituição

**Tabela 3.2.** Preparação da curva de calibração.

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

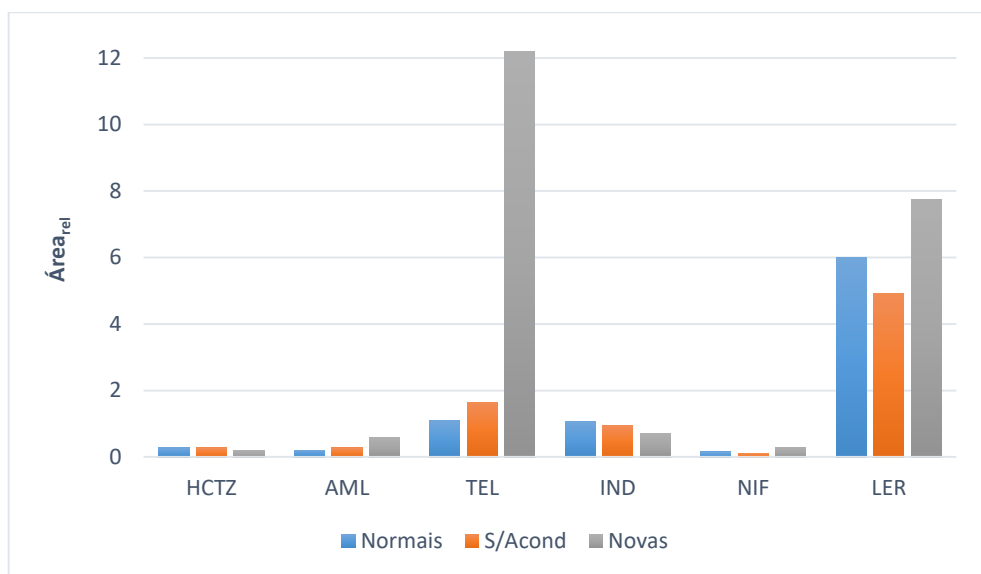
Os resultados obtidos no estudo da eficiência da extração usando diferentes colunas e/ou condições de extração para um dos calibradores (calibrador intermédio - 50 ng/mL) estão apresentados na figura 3.9. Nas figuras A.1 e A.2, incluídas nos anexos, encontram-se mais detalhadamente os resultados para os sete calibradores utilizados e para cada um dos AHTs em estudo. Podemos verificar que as colunas Oasis® Prime HLB apresentam melhores resultados no caso da amlodipina, telmisartan, nifedipina e lercanidipina, com claro destaque para o telmisartan, enquanto as colunas Oasis® HLB e o procedimento utilizados na perícia toxicológica do laboratório apresentam respostas superiores no caso da hidroclorotiazida e indapamida. Uma vez que as colunas Oasis® Prime HLB foram recentemente desenvolvidas pela Waters e que aguardam a

<sup>7</sup> Adicionar às amostras o volume correspondente à concentração pretendida para cada um dos calibradores e controlos a partir de misturas padrão dos AHTs selecionados a 0,1 µg/mL, 1 µg/mL ou 10 µg/mL.



aprovação da patente, não está disponível informação sobre o tipo de enchimento da coluna para que possa ser feita uma correta interpretação dos resultados obtidos. Ainda de referir que as colunas utilizadas na rotina do laboratório, com a omissão do passo de acondicionamento destas não evidenciam melhores resultados em nenhum dos casos.

Assim sendo, com base nestes resultados, as colunas que deveriam ser utilizadas para este estudo deveriam ser as colunas novas (Oasis® Prime HLB), uma vez que apresentam melhores resultados para mais AHTs do que as usadas na rotina do laboratório. No entanto, o laboratório não possuía a quantidade necessária destas colunas para a realização deste projeto, pelo que optámos pelas colunas já utilizadas na rotina do laboratório, pois à exceção do telmisartan as diferenças entre as duas colunas não são significativas.



**Figura 3.9.** Área relativa (área analito/área do padrão interno) dos seis AHTs consoante as colunas e/ou condições utilizadas na extração para o calibrador intermédio (calibrador 4 – 50 ng/mL). Normais – colunas Oasis® HLB; S/Acond – colunas Oasis® HLB sem acondicionamento; Novas – colunas Oasis® Prime HLB.

Na figura 3.10 estão apresentados os cromatogramas obtidos para os seis AHTs em estudo, assim como para o padrão interno (zolpidem-d6) para o calibrador a 400 ng/mL utilizado no estudo da linearidade.

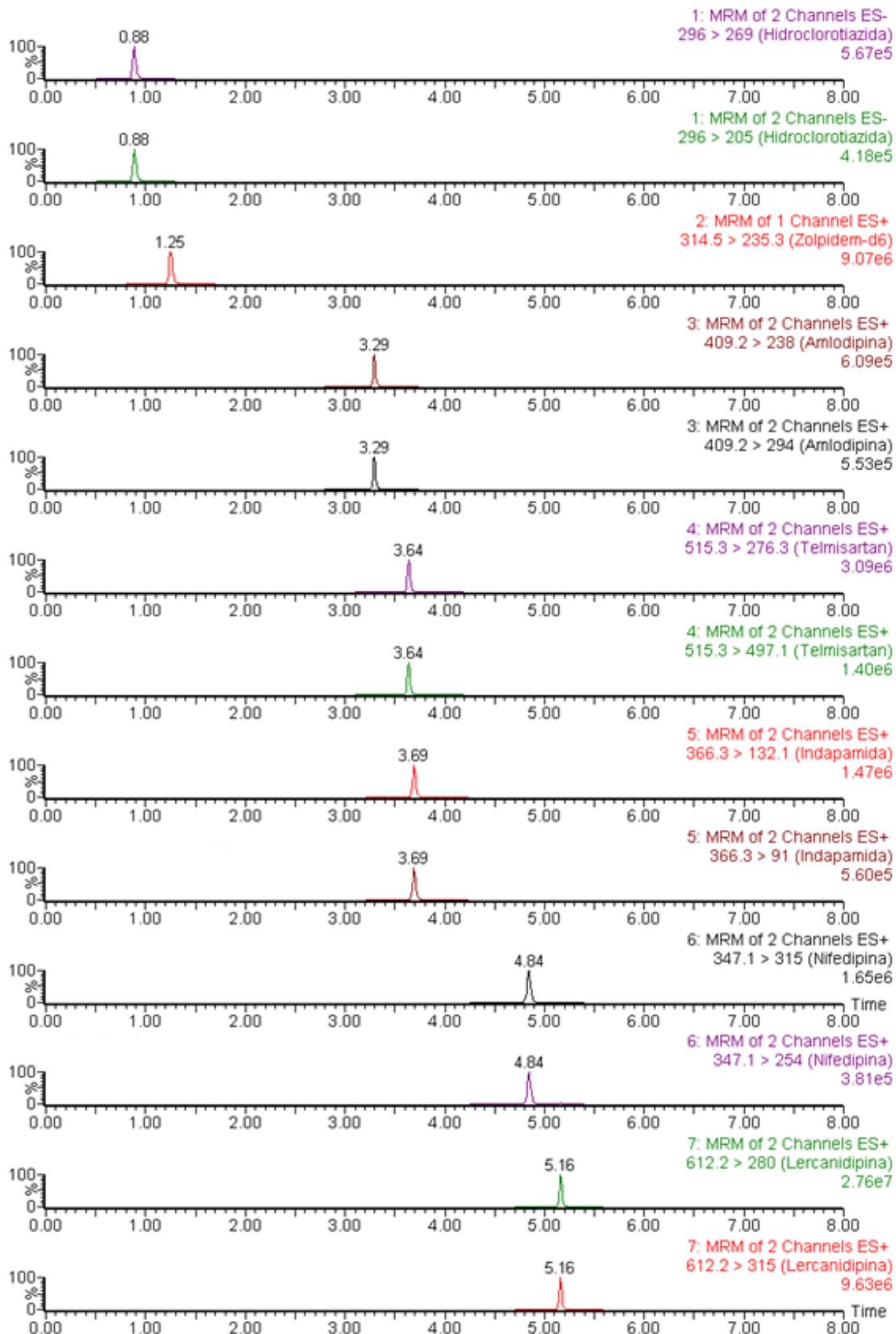


Figura 3.10. Cromatogramas obtidos para os seis AHTs em estudo e para o zolpidem-d6 para o calibrador a 400 ng/mL no estudo da linearidade. Para todos os AHTs estão apresentadas as duas transições monitorizadas.

### 3.3 Parâmetros de validação

#### 3.3.1 Estabilidade

Os resultados obtidos no estudo da fotoestabilidade dos AHTs nas misturas padrão e nas amostras de sangue fortificadas estão apresentados nas figuras 3.11 e 3.12, respectivamente. A análise foi efetuada através da comparação entre as áreas obtidas para cada analito às diferentes horas de exposição à luz e as áreas obtidas para as amostras de referência (tempo 0 h e protegidas da luz) e considerou-se que a amostra é fotossensível quando a variação das áreas obtidas foi superior a 20% das áreas de referência, ou seja, nos casos em que a percentagem de analito foi inferior a 80%.

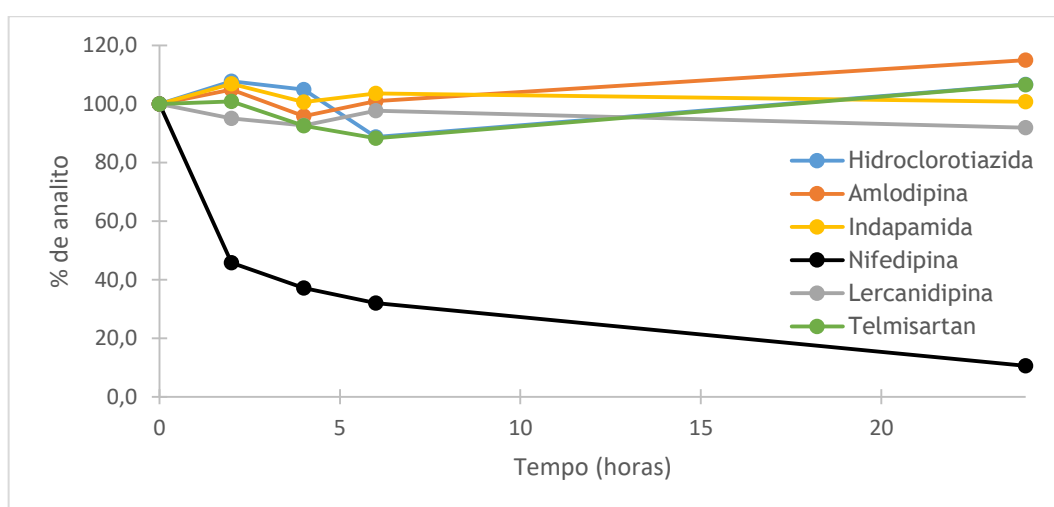


Figura 3.11. Estudo da estabilidade dos AHTs nas misturas padrão a 100 ng/mL quando expostos à luz ambiente.

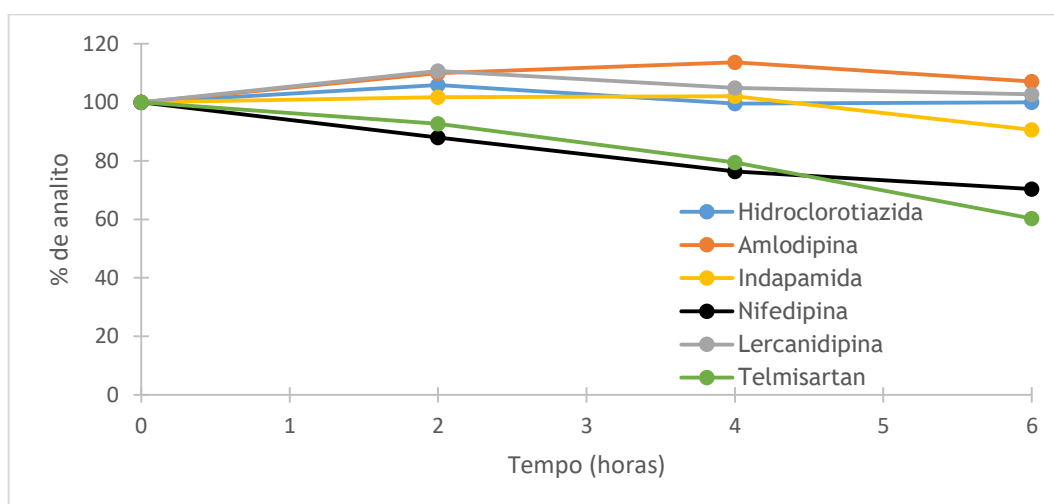


Figura 3.12. Estudo da estabilidade dos AHTs nas amostras de sangue fortificadas a 200 ng/mL quando expostos à luz ambiente.

Assim, verificamos que no caso das misturas padrão apenas a nifedipina apresenta fotossensibilidade, uma vez que em apenas 2 h a concentração inicial passou para 46%, o que está de acordo com outros estudos realizados <sup>104,120</sup>. Quando exposta à luz ambiente forma-se um derivado nitroso-piridínico da nifedipina em solução <sup>39</sup>. No que se refere às amostras de sangue fortificadas, verificamos que ocorre degradação da nifedipina, ainda que não tão acentuada como no caso anterior, uma vez que em 6 h a percentagem de degradação desta foi de 30%. Também o telmisartan apresentou fotossensibilidade nas amostras de sangue fortificadas após 4 horas expostas à luz ambiente com uma degradação de 21%, o que não se verificou nas misturas padrão, sendo que após 6 h a degradação foi de 40%.

Portanto, estes resultados indicam que a nifedipina é fotossensível quer nas misturas padrão quer nas amostras fortificadas, embora o telmisartan também apresente degradação quando exposto à luz nas amostras de sangue fortificadas.

No estudo da estabilidade dos AHTs sob diferentes condições de armazenamento, as concentrações obtidas foram comparadas com a concentração inicial da amostra (equação 3.1) e considerou-se que a amostra é estável quando a variação da concentração foi inferior a 20% da concentração inicial. Os resultados obtidos neste estudo sumariados na tabela 3.3.

$$ER (\%) = \frac{(\text{média da concentração} - \text{concentração inicial})}{\text{concentração inicial}} \times 100 \quad (\text{Equação 3.1})$$

Onde:

ER é o erro relativo, em percentagem.

**Tabela 3.3.** Resultados obtidos no estudo da estabilidade dos AHTs selecionados, quando sujeitos a diferentes condições de temperatura e tempo de armazenamento (n=3) nas amostras fortificadas e nas misturas padrão (MP).

Condições de armazenamento	Concentração (ng/ml)	AML		HCT		IND		LER		NIF		TEL		
		Média ± s (ng/ml)	ER (%)	Média ± s (ng/ml)	ER (%)	Média ± s (ng/ml)	ER (%)	Média ± s (ng/ml)	ER (%)	Média ± s (ng/ml)	ER (%)	Média ± s (ng/ml)	ER (%)	
Amostras fortificadas	24h a 23 °C	50	54,2 ± 8,9	8,4	52,2 ± 3,0	4,3	28,0 ± 1,3	-43,9	54,4 ± 1,8	8,7	59,0 ± 2,6	18,0	49,7 ± 2,5	-0,7
		200	186 ± 11	-7,0	212 ± 14	6,0	111 ± 13	-44,5	165 ± 16	-17,5	215 ± 24	7,5	185 ± 21	-7,5
	7 dias a -20 °C	50	52,70 ± 0,86	5,4	53,0 ± 1,2	6,0	36,3 ± 3,5	-27,4	49,6 ± 4,1	-0,9	39,2 ± 6,4	-21,5	42,4 ± 6,3	-15,3
		200	155 ± 18	-22,5	213 ± 17	6,5	120 ± 16	-40,0	220,8 ± 9,9	10,4	167 ± 21	-16,5	107 ± 12	-46,5
	2 ciclos de (des)congelamento	50	49,9 ± 4,3	-0,3	52,5 ± 2,8	4,9	50,6 ± 1,4	1,1	47,9 ± 3,2	-4,2	45,3 ± 4,2	-9,4	47,6 ± 8,3	-4,8
		200	207 ± 25	3,5	196,6 ± 1,6	-1,7	186,2 ± 8,7	-6,9	206,0 ± 7,7	3,0	210,2 ± 8,9	5,1	176 ± 42	-12,0
24 h a 15 °C	50	52,3 ± 4,1	4,5	51,0 ± 2,3	2,0	47,7 ± 3,5	-4,7	54,3 ± 4,0	8,6	49 ± 12	-2,0	52,9 ± 3,7	5,8	
	200	188 ± 25	-6,0	202,4 ± 5,8	1,2	186 ± 14	-7,0	168 ± 30	-16,0	209 ± 17	4,5	193 ± 22	-3,5	
MP	24h a 23 °C	100	108,2 ± 3,7	8,2	102,0 ± 1,0	2,0	90,6 ± 5,9	-9,4	105,4 ± 3,9	5,4	104 ± 14	4,0	102,5 ± 3,2	2,5
	7 dias a -20 °C	100	81,1 ± 5,0	-18,9	104,1 ± 1,4	4,1	71,7 ± 2,3	-28,3	106,07 ± 0,90	6,1	106,9 ± 1,8	6,9	106,7 ± 1,9	6,7

NOTA: s – desvio padrão.

Segundo este critério as amostras fortificadas são estáveis 24 h à temperatura ambiente (com exceção da indapamida), 7 dias a -20°C (com exceção da amlodipina, da indapamida, da nifedipina e do telmisartan), após 2 ciclos de congelação/descongelação e 24 h depois de preparada a amostra. Por outro lado, as misturas padrão são estáveis 24 h à temperatura ambiente e após 7 dias a -20°C (com exceção da indapamida). A hidroclorotiazida e a lercanidipina são os únicos AHT's estáveis sob todas as condições experimentais estudadas.

Portanto, é fundamental garantir as condições laboratoriais necessárias para que estes analitos não sofram degradação, nomeadamente usar sempre frascos âmbar na preparação dos padrões analíticos para os proteger da luz e reduzir o tempo de espera entre a preparação das amostras, a extração e a injeção no equipamento de LC-MS/MS.

### 3.3.2 Seletividade

Para avaliar a positividade/negatividade das amostras foram utilizados dois critérios de identificação de substâncias: o critério do tempo de retenção relativo (TRR), dado pela equação 3.2, e o critério das relações iónicas das transições analisadas. Para que o resultado seja considerado positivo ambos os critérios têm de ser cumpridos. Foi utilizado como controlo positivo a alíquota preparada a partir da fortificação do branco de sangue com o código POOL06.

$$TRR = \frac{Tr_{Substância}}{Tr_{PI}} \quad (\text{Equação 3.2})$$

Onde:

$Tr_{Substância}$  é o tempo de retenção da substância;

$Tr_{PI}$  é o tempo de retenção do padrão interno.

#### 3.3.2.1 Critério de tempo de retenção relativo

Segundo este critério, a diferença entre o TRR de uma dada substância na amostra e o TRR dessa mesma substância no controlo deve ser inferior a 1%. A diferença relativa de TRR ( $\Delta TRR$ ) é dada pela equação 3.3.

$$\Delta TRR = \frac{TRR_{Suspeito} - TRR_{Controlo}}{TRR_{Controlo}} \quad (\text{Equação 3.3})$$

Onde:

$TRR_{Suspeito}$  é o tempo de retenção relativo da substância na amostra;

$TRR_{Controlo}$  é o tempo de retenção relativo da substância no controlo.

Os resultados do estudo da especificidade/seletividade relativos ao critério de tempo de retenção relativo encontram-se nas tabelas 3.4 e 3.5. O critério de tempo de retenção relativo foi cumprido para todas as substâncias nas diferentes amostras de sangue, com exceção da POOL05 para a amlodipina (assinalada a vermelho) que corresponde a uma falso negativo.

**Tabela 3.4.** Tempos de retenção relativos (TRR) das substâncias em cada uma das amostras de sangue.

Substância	Código das amostras de sangue									
	POOL01	POOL02	POOL03	POOL04	POOL05	POOL06	POOL07	POOL08	POOL09	POOL10
Amlodipina	2,645	2,632	2,637	2,645	2,616	2,645	2,637	2,645	2,659	2,624
Hidroclorotiazida	0,718	0,712	0,718	0,718	0,712	0,718	0,718	0,718	0,724	0,712
Indapamida	2,976	2,960	2,976	2,976	2,960	2,976	2,976	2,976	3,000	2,952
Lercanidipina	4,145	4,128	4,145	4,145	4,104	4,145	4,145	4,145	4,179	4,112
Nifedipina	3,903	3,872	3,903	3,903	3,872	3,903	3,903	3,903	3,935	3,872
Telmisartan	2,919	2,904	2,919	2,919	2,896	2,919	2,919	2,919	2,943	2,904
Zolpidem-d6	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

**Tabela 3.5.** Diferença relativa entre o TRR de uma dada substância na amostra e no controlo (POOL06).

Substância	Código das amostras de sangue									
	POOL01	POOL02	POOL03	POOL04	POOL05	POOL07	POOL08	POOL09	POOL10	
Amlodipina	0,000	-0,005	-0,003	0,000	-0,011	-0,003	0,000	0,005	-0,008	
Hidroclorotiazida	0,000	-0,008	0,000	0,000	-0,008	0,000	0,000	0,008	-0,008	
Indapamida	0,000	-0,005	0,000	0,000	-0,005	0,000	0,000	0,008	-0,008	
Lercanidipina	0,000	-0,004	0,000	0,000	-0,010	0,000	0,000	0,008	-0,008	
Nifedipina	0,000	-0,008	0,000	0,000	-0,008	0,000	0,000	0,008	-0,008	
Telmisartan	0,000	-0,005	0,000	0,000	-0,008	0,000	0,000	0,008	-0,005	

### 3.3.2.2 Critério das relações iônicas das transições

Com base neste critério, as áreas relativas das transições de uma dada substância na amostra, considerando que a primeira transição tem maior área do que a segunda, não devem diferir mais do que o valor apresentado na tabela 3.6, relativamente às áreas relativas das mesmas transições na amostra controle.

**Tabela 3.6.** Tolerância máxima para as áreas relativas das transições iônicas.

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

Os resultados do estudo da especificidade/seletividade relativos ao critério das relações iônicas das transições encontram-se na tabela 3.7. A vermelho encontra-se assinalada a única amostra que não cumpre o este critério, uma vez que a segunda transição tem maior intensidade do que a primeira. De referir que as primeiras quatro *pools* (POOL01 a POOL04) correspondem a misturas de sangue provenientes de casos mais antigos, ano de 2008, preparadas em 2012 e congeladas deste então, enquanto as restantes misturas correspondem a sangues mais recentes, ano de 2016, e preparadas no ano corrente. O longo período de tempo de congelação das primeiras misturas pode ser o motivo pelo qual a amostra com o código POOL02 demonstrou para a indapamida esta não conformidade no que diz respeito ao critério das relações iônicas das transições, uma vez que esta mesma amostra fora conforme segundo o critério de tempo de retenção relativo.

Na tabela 3.8 encontram-se as transições iônicas selecionadas para cada substância e o respetivo intervalo de tolerância tendo por base a tabela 3.6 e as áreas relativas obtidas para o controlo positivo (amostra com o código POOL06).

**Tabela 3.7.** Áreas relativas das transições iônicas, em percentagem, das respectivas substâncias.

Substância	Transição	Código das amostras de sangue									
		POOL01	POOL02	POOL03	POOL04	POOL05	POOL06	POOL07	POOL08	POOL09	POOL10
Amlodipina	409,2 > 294	98,5	98,7	97,8	98,4	99,5	95,5	94,8	99,6	92,5	94,9
Hidroclorotiazida	296 > 205	78,7	79,2	74,4	75,8	79,8	75,7	80,3	80,0	76,5	78,2
Indapamida	366,3 > 91	37,3	-	41,9	42,1	40,9	40,1	34,5	38,3	38,6	38,2
Lercanidipina	612,2 > 315	35,1	34,9	34,7	34,1	34,1	34,8	34,6	34,2	35,0	34,8
Nifedipina	347,1 > 254	21,4	24,3	22,4	22,8	22,6	22,3	23,0	22,5	21,7	22,6
Telmisartan	515,3 > 497,1	46,4	48,1	44,4	45,6	44,3	42,7	51,1	46,6	40,8	46,2

**Tabela 3.8.** Transições iônicas selecionadas para cada substância e respetivo intervalo de tolerância.

Substância	Transições iônicas		Tolerância (%)	
	1ª Transição	2ª Transição	Mínima	Máxima
Amlodipina	409,2 > 238	409,2 > 294	85,5	105,5
Hidroclorotiazida	296 > 269	296 > 205	65,7	85,7
Indapamida	366,3 > 132,1	366,3 > 91	32,1	48,1
Lercanidipina	612,2 > 280	612,2 > 315	27,9	41,8
Nifedipina	347,1 > 315	347,1 > 254	17,3	27,3
Telmisartan	515,3 > 276,3	515,3 > 497,1	34,2	51,3

A tabela 3.9 reúne os resultados obtidos no estudo da especificidade/seletividade.



**Tabela 3.9.** Resultados obtidos no estudo da especificidade/seletividade.

Amostras não fortificadas

Código da amostra	Resultado	Observações
POOL01	Negativo	_____
POOL02	Negativo	_____
POOL03	Negativo	_____
POOL04	Negativo	_____
POOL05	Negativo	_____
POOL06	Negativo	_____
POOL07	Negativo	_____
POOL08	Negativo	_____
POOL09	Negativo	_____
POOL10	Negativo	_____
Percentagem de Falsos Positivos		0 %

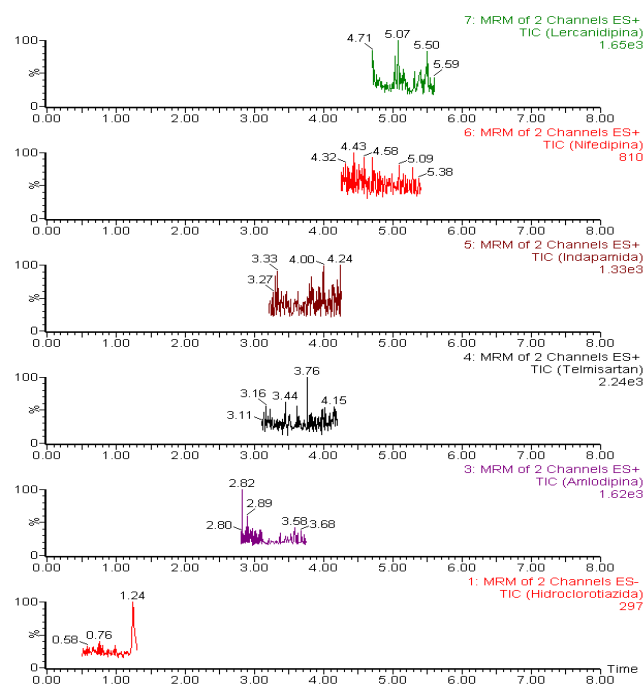
Amostras fortificadas

Código da amostra	Resultado	Observações
POOL01	Positivo	_____
POOL02	Positivo/Negativo	A indapamida não cumpre o critério das relações iónicas das transições
POOL03	Positivo	_____
POOL04	Positivo	_____
POOL05	Positivo/Negativo	A amlodipina não cumpre o critério do tempo de retenção relativo
POOL06	Positivo	_____
POOL07	Positivo	_____
POOL08	Positivo	_____
POOL09	Positivo	_____
POOL10	Positivo	_____
Percentagem de Falsos Negativos		3,3 %

De acordo com os critérios de aceitação estabelecidos pelo laboratório, a percentagem de falsos resultados positivos deve ser 0% e a percentagem de falsos resultados negativos deve ser inferior a 10%. Neste estudo, a

percentagem de falsos positivos foi de 0% e a percentagem de falsos negativos foi de 3,3% (n=2), cumprindo, portanto, os critérios estabelecidos pelo laboratório.

Na figura 3.13 estão apresentados os cromatogramas obtidos para a amostra de sangue branco SV119 fortificada com uma mistura padrão de 38 medicamentos. Podemos verificar que a presença destes medicamentos numa amostra de sangue não interfere com as transições monitorizadas para estes seis AHT's.



**Figura 3.13.** Cromatogramas obtidos, em modo TIC (do inglês, *total ion chromatogram*), para a amostra de sangue branco SV119 fortificada com 38 medicamentos a 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

### 3.3.3 Capacidade de identificação

A avaliação da capacidade de identificação foi efetuada simultaneamente com o estudo da especificidade/seletividade, tendo-se verificado que o método cumpre o critério de aceitação estabelecido pelo laboratório (percentagem de falsos negativos igual ou inferior a 10%).

### 3.3.4 Linearidade e modelo de calibração

Antes de estudar a linearidade, deve-se avaliar a homocedasticidade das variâncias para decidir qual o modelo de calibração que se deve utilizar. Para tal, recorreu-se a um teste de Fisher (F), no qual o valor experimental ( $F_{\text{Exp}}$ ) é calculado através da equação 3.4.

$$F_{Exp} = \frac{S_2^2}{S_1^2} \quad (\text{Equação 3.4})$$

Onde:

$S_1^2$  é a variância das alíquotas fortificadas com concentração igual ao calibrador de menor concentração;

$S_2^2$  é a variância das alíquotas fortificadas com concentração igual ao calibrador de maior concentração.

Este valor deve então ser comparado com o valor teórico de F ( $F_{Crit}$ ), dado pela equação 3.5, e se  $F_{Exp} \leq F_{Crit}$ , então a hipótese de homocedasticidade é verdadeira, isto é, pode-se usar o modelo de regressão linear simples. Por outro lado, se  $F_{Exp} > F_{Crit}$ , a função de calibração apresenta heterocedasticidade e deve-se optar por um modelo de regressão linear ponderada <sup>125</sup>.

$$F_{Crit} = (f_1; f_2; 0,99) \quad (\text{Equação 3.5})$$

Onde:

$f_1$  são os graus de liberdade (n-1) correspondentes ao primeiro conjunto de alíquotas;

$f_2$  são os graus de liberdade (n-1) correspondentes ao segundo conjunto de alíquotas;

0,99 corresponde a um nível de confiança de 99%.

Na tabela 3.10 encontram-se resumidos os valores de  $F_{exp}$  obtidos para cada AHT, bem como o valor tabelado da distribuição de Fisher para n-1 graus de liberdade a um nível de confiança de 99% ( $p=0,01$ ). Verifica-se que para todas as substâncias  $F_{Exp} > F_{Crit}$ , pelo que se conclui que há heterocedasticidade. Os resultados obtidos no estudo da homocedasticidade das variâncias de forma mais detalhada podem ser consultados na tabela C.1 em anexo. Com base nesta, é de notar que, usando o modelo de regressão linear simples, a concentração calculada para os controlos a 5 ng/mL para algumas substâncias é menor, com destaque para a hidroclorotiazida em que as concentrações calculadas são negativas. Este facto reforça a ideia de que a regressão linear simples não é o modelo adequado para proceder à quantificação destas substâncias.

Uma vez que a função de calibração evidencia heterocedasticidade e não se pretende reduzir a gama de trabalho, é necessário introduzir um fator de ponderação (w) que minimize os efeitos da contribuição dos calibradores de maior concentração. Os principais fatores de ponderação a estudar são:  $w=1/x$ ;  $w=1/x^2$ ;  $w=1/x^{1/2}$ ,  $w=1/y$ ,  $w=1/y^2$  e  $w=1/y^{1/2}$  <sup>125</sup>.

**Tabela 3.10.** Valores de  $F_{exp}$  para cada AHT.

Substância	$F_{exp}$	$F_{crit (4;4,0,99)}$
Amlodipina	394,18	
Hidroclorotiazida	187,65	
Indapamida	714,57	
Lercanidipina	808,00	15,98
Nifedipina	758,16	
Telmisartan	1074,35	

Considerando um modelo de regressão linear ponderada, o declive da reta (b) e a ordenada na origem (a), para os diferentes fatores de ponderação, são calculados através das equações 3.6 e 3.7, respetivamente <sup>118,125</sup>.

$$b = \frac{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i y_i - \sum w_i x_i \cdot \sum w_i y_i}{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i^2 - (\sum w_i x_i)^2} \quad (\text{Equação 3.6})$$

$$a = \frac{\sum w_i x_i^2 \cdot \sum w_i y_i - \sum w_i x_i \cdot \sum w_i x_i y_i}{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i^2 - (\sum w_i x_i)^2} \quad (\text{Equação 3.7})$$

Onde:

$(x_i, y_i)$  é o par de valores  $i$  de um total de  $n$  pares de valores.

Neste estudo, deve-se analisar simultaneamente dois parâmetros para cada curva de calibração e para cada fator de ponderação: o somatório dos resíduos ( $\sum res$ ), em percentagem, calculado através da soma dos erros relativos associados a cada calibrador (equação 3.8), e o coeficiente de correlação ( $r^2$ ), dado pela equação 3.9 <sup>118,131</sup>. Por um lado, quanto menor o valor de  $\sum res$  melhor será o ajuste, mas por outro lado, um valor de  $r^2$  mais próximo da unidade revela-se indicador de um modelo de regressão mais adequado. Deste modo, o melhor fator de ponderação é aquele que tiver associado o menor valor do somatório de resíduos e o maior  $r^2$  <sup>131</sup>.

$$ER (\%) = \frac{C_{Exp} - C_{Teor}}{C_{Teor}} \times 100 \quad (\text{Equação 3.8})$$

Onde:

ER é o erro relativo, em percentagem;

$C_{Exp}$  é a concentração experimental;

$C_{Teor}$  é a concentração nominal.

$$r = \frac{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i y_i - \sum w_i x_i \cdot \sum w_i y_i}{\sqrt{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i^2 - (\sum w_i x_i)^2} \cdot \sqrt{\sum w_i \cdot \sum w_i y_i^2 - (\sum w_i y_i)^2}} \quad (\text{Equação 3.9})$$

Os fatores de ponderação foram estudados utilizando as curvas de calibração obtidas no estudo da precisão intermédia, ou seja, cinco curvas de calibração com sete pontos para todas as substâncias e preparadas em cinco dias diferentes (ver 3.3.9.2). Uma vez injetadas as amostras, procedeu-se à análise das curvas de calibração por aplicação dos diferentes fatores de ponderação, a partir das quais se calculou  $\Sigma$  res e  $r^2$  para cada curva e para cada substância. Os resultados deste estudo encontram-se em anexo (C. Linearidade e modelo de calibração, tabelas C2 a C4).

No entanto, como estes parâmetros se revelam independentes entre si, foi necessário normalizar os valores de cada parâmetro, pela aplicação da equação 3.10, de modo a eliminar os problemas oriundos do uso de unidades e dispersões distintas entre as variáveis <sup>131</sup>.

$$Z = \frac{x-\mu}{\sigma} \quad \text{(Equação 3.10)}$$

Onde:

$\sigma$  é o desvio padrão;

$\mu$  é a média aritmética.

Deste modo, para cada substância, o menor valor da soma do valor normalizado do somatório dos resíduos com o valor normalizado de  $1-r^2$  corresponde ao melhor fator de ponderação <sup>131</sup>. Na tabela 3.11 encontram-se os fatores de ponderação escolhidos para cada AHT com base no estudo realizado. Verificamos, portanto, que para todos os AHTs, o fator de ponderação que minimiza os efeitos da contribuição dos calibradores de maior concentração é  $w=1/x$ .

**Tabela 3.11.** Fator de ponderação selecionado para cada AHT.

Substância	Fator de ponderação
Amlodipina	1/x
Hidroclorotiazida	1/x
Indapamida	1/x
Lercanidipina	1/x
Nifedipina	1/x
Telmisartan	1/x

Tendo-se avaliado a homogeneidade da variância e realizado o estudo sobre o fator de ponderação mais adequado para cada AHT, avaliou-se, por último, a linearidade. Os critérios de aceitação da curva de calibração no que diz respeito à linearidade foram: a inclusão do valor zero na intersecção da curva com o eixo das ordenadas, tendo em consideração um intervalo de confiança de 95%,  $r^2$  superior a 0,99 e a análise dos gráficos

dos valores residuais, considerando pontos aberrantes aqueles cujo desvio residual seja superior ao dobro do erro padrão estimado no estudo da regressão para as curvas de calibração <sup>118</sup>.

Na tabela 3.12 estão sumariados os resultados obtidos para o estudo da linearidade e gama de trabalho dos AHTs em estudo. Em anexo (tabelas C.5 a C.10), apresentam-se, sob a forma de tabelas e gráficos, os valores obtidos para as áreas, a curva de calibração e o tratamento estatístico para cada uma das substâncias individualmente.

**Tabela 3.12.** Resumo dos resultados do estudo da linearidade e gama de trabalho.

Substância	Equação	r <sup>2</sup>	Erro padrão (S <sub>y/x</sub> )	Intervalo de interceção da ordenada na origem		Nº de pontos
				95% inf.	95% sup.	
Amlodipina	y = 0,00018x + 0,00090	0,9953	0,00171	-0,00038	0,00219	14
Hidroclorotiazida	y = 0,00019x - 0,00008	0,9952	0,00218	-0,00114	0,00098	15
Indapamida	y = 0,00045x - 0,00070	0,9985	0,00264	-0,00234	0,00093	14
Lercanidipina	y = 0,00827x + 0,01784	0,9948	0,10676	-0,04513	0,08082	15
Nifedipina	y = 0,00062x + 0,00231	0,9985	0,00545	-0,00091	0,00553	15
Telmisartan	y = 0,00097x - 0,00115	0,9953	0,00848	-0,00666	0,00436	13

O estudo da gama de trabalho e da linearidade permitiu concluir que, considerando um fator de ponderação de 1/x, o método é linear na gama de trabalho testada (5-500 ng/mL). Todas as curvas de calibração cumprem os critérios de aceitação anteriormente referidos, nomeadamente, apresentam valores de r<sup>2</sup> superior a 0,99 e a ordenada na origem não é estatisticamente diferente do ponto zero. De referir que a gama de trabalho definida mostrou ser adequada para a determinação destes AHTs, uma vez que a maior parte das doses terapêuticas, tóxicas e fatais disponíveis para estas substâncias se encontram dentro destes extremos.

### 3.3.5 Efeito matriz

O efeito matriz (EM) baseia-se, como já foi referido anteriormente, na comparação entre as respostas obtidas nas amostras fortificadas e nas soluções padrão. Esta definição pode ser traduzida matematicamente pela equação 3.11, sendo que valores negativos indicam a presença de supressão iónica e valores positivos significam a presença de intensificação iónica.

$$\% EM = \left[ \left( \frac{\bar{A}_{C/Matriz}}{\bar{A}_{S/Matriz}} \right) - 1 \right] \times 100 \quad (\text{Equação 3.11})$$

Onde:

$\bar{A}_{C/Matriz}$  é a média das áreas absolutas obtidas para o íão pico base das amostras fortificadas após a utilização do procedimento extrativo;

$\bar{A}_{S/Matriz}$  é a média das áreas absolutas obtidas para o íão pico base das amostras preparadas a partir da fortificação dos tubos onde foram adicionados diretamente os solventes de eluição.

Os resultados obtidos no estudo do efeito matriz para sangue vivo e para sangue cardíaco (*postmortem*) para os AHTs em estudo, bem como para o padrão interno (zolpidem-d6) encontram-se resumidos na tabela 3.13. Em anexo, tabela D1, estão apresentados, de forma detalhada, os resultados obtidos na avaliação deste parâmetro. O coeficiente de variação (CV) é dado, em percentagem, pelo quociente entre o desvio padrão (s) e a concentração média da amostra ( $\bar{x}$ ) (equação 3.12).

$$CV(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (\text{Equação 3.12})$$

**Tabela 3.13.** Resumo dos resultados obtidos no estudo do efeito matriz.

Substância	Sangue Vivo (SV119)			Sangue Cardíaco (POOL08)		
	Efeito Matriz (EM, %)		$\Delta EM$ (%)	Efeito Matriz (EM, %)		$\Delta EM$ (%)
	50 ng/mL	200 ng/mL		50 ng/mL	200 ng/mL	
Amlodipina	-46,1	-52,5	-6,4	-58,4	-63,6	-5,2
Hidroclorotiazida	11,9	4,5	-7,4	-25,1	-19,4	5,7
Indapamida	-23,3	-24,3	-1,0	-15,0	-25,0	-10,0
Lercanidipina	-6,2	-18,9	-12,7	-1,6	-22,2	-20,6
Nifedipina	-24,8	-15,5	9,3	14,0	18,8	4,8
Telmisartan	-33,6	-27,8	5,8	-39,7	-37,8	1,9
Zolpidem-d6	6,2	5,3	-0,9	0,6	-3,5	-4,1

Da análise dos resultados é possível verificar que é mais frequente a presença de supressão iónica, sendo o valor mais alto registado para a amlodipina em sangue cardíaco na concentração mais elevada (-63,6%) verificando-se apenas fenómenos de intensificação iónica no caso da hidroclorotiazida em sangue vivo e da nifedipina em sangue cardíaco, para além do padrão interno. O valor mais elevado de intensificação iónica verificou-se para a nifedipina em sangue cardíaco na concentração mais alta (18,8%). Para a concentração mais baixa é possível constatar que os valores de supressão ou intensificação iónicas para as duas amostras foram iguais ou inferiores, em valor absoluto, a 25,1%, com exceção da amlodipina (-46,1% e -58,4%, respetivamente para a amostra de sangue vivo e sangue cardíaco) e o telmisartan (-33,6% para o sangue vivo e -37,8% para o

sangue cardíaco). Para a concentração mais alta, verificou-se que os valores do efeito matriz foram iguais ou inferiores a 25%, com exceção da amlodipina (-52,5% e -63,6%, respetivamente para a amostra de sangue vivo e sangue cardíaco) e o telmisartan (-27,8% para o sangue vivo e -37,8% para o sangue cardíaco). Verificamos ainda que apenas no caso da lercanidipina, para a amostra de sangue cardíaco, o efeito matriz é moderadamente dependente da concentração, uma vez que se registaram valores absolutos de  $\Delta EM$  superiores a 20% <sup>131</sup>. Para além disto, o zolpidem-d6 apresenta valores reduzidos de supressão ou intensificação iónicas em ambas as matrizes, pelo que se mostra adequado como padrão interno para a determinação de uma vasto leque de medicamentos, incluindo os AHTs.

Segundo o Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX), 2013 <sup>117</sup>, os critérios de aceitação para este parâmetro incluem valores de CV inferiores a 15%, o que se pôde comprovar para todas as substâncias, para além de que os valores de supressão e intensificação iónicas devem ser inferiores a 25%, o que se verifica para a maioria dos AHTs com exceção da amlodipina e do telmisartan, em que de facto se conclui que para estas duas substâncias há efeito matriz. O efeito matriz verificado para a amlodipina e para o telmisartan pode estar associado à sua elevada ligação a proteínas plasmáticas (superior a 95% e 99,5%, respetivamente) que, por este motivo, são eluídas juntamente com os analitos de interesse e são responsáveis, neste caso, pela supressão iónica verificada.

Ainda segundo esta *guideline* <sup>117</sup>, é possível que o efeito matriz seja superior aos valores estabelecidos, desde que se avalie o seu impacto na exatidão do método e nos limites de deteção e quantificação.

Para complementar este estudo teria sido interessante ter avaliado também o efeito matriz em sangue periférico *postmortem* e comparar os resultados obtidos com os das outras matrizes biológicas, no entanto, como já foi referido, face à pequena quantidade recolhida durante as autópsias não foi possível o seu estudo.

### 3.3.6 Eficiência da extração

A eficiência da extração foi avaliada em termos de recuperação por aplicação da equação 3.13.

$$\% \text{ recuperação do método} = \frac{Arel_{Ensaio}}{Arel_{SemExtração}} \times 100 \quad (\text{Equação 3.13})$$

Onde:

$Arel_{Ensaio}$  é a razão das áreas (analito/padrão interno) obtidas após a aplicação do procedimento extrativo;

$Arel_{SemExtração}$  é a razão das áreas (analito/padrão interno) obtidas sem a aplicação do procedimento extrativo.

Na tabela 3.14 encontram-se os resultados obtidos no estudo da eficiência da extração, expressa em percentagem de recuperação, para os três níveis de concentração avaliados e para os seis AHTs. Em anexo (E. Eficiência da extração) encontram-se as tabelas das áreas obtidas para as amostras fortificadas antes e após a extração, assim como as respetivas médias e CV para cada uma das substâncias em estudo.



**Tabela 3.14.** Resumo dos resultados obtidos no estudo da eficiência da extração para cada um dos AHTs a três níveis de concentração.

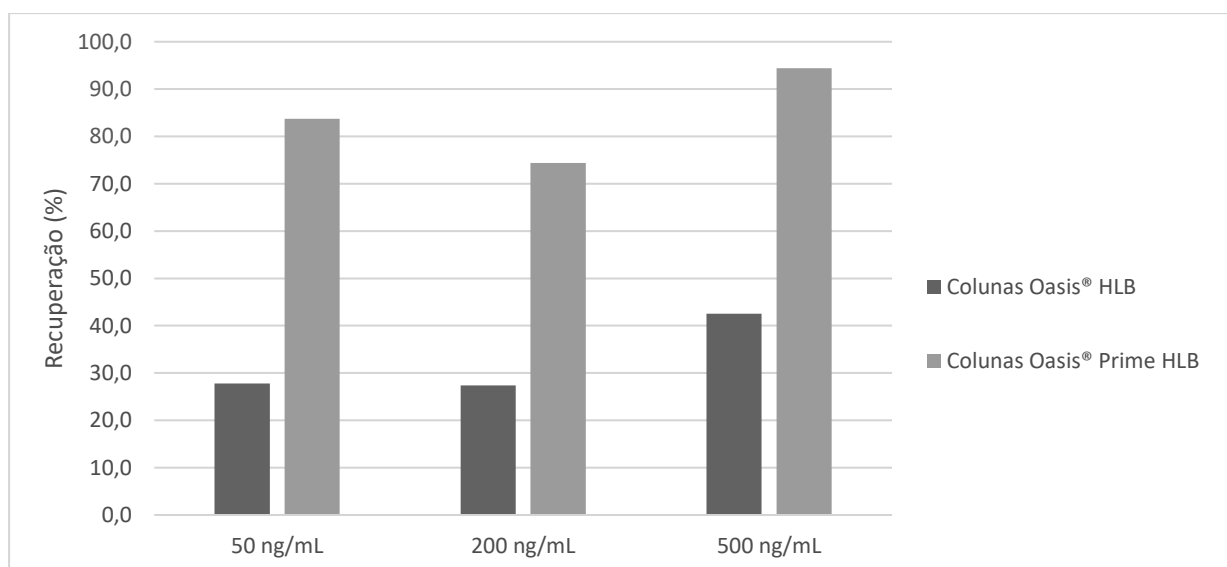
Substância	Recuperação (%)		
	50 ng/mL	200 ng/mL	500 ng/mL
Amlodipina	46,5	44,4	57,6
Hidroclorotiazida	85,0	79,5	77,7
Indapamida	73,0	75,1	77,8
Lercanidipina	51,5	42,4	62,3
Nifedipina	68,0	67,1	74,7
Telmisartan	27,8	27,4	42,5

Os valores de recuperação obtidos variam entre os 42,4% e os 85,0%, com exceção do telmisartan que apresenta valores de 27,4% e 27,8%, respetivamente, para os controlos intermédio e baixo. De notar ainda que, para todas as substâncias, a recuperação verificada para o controlo alto (500 ng/mL) é superior ao dos restantes, com exceção da hidroclorotiazida em que este é o que apresenta a menor eficiência da extração.

Segundo o procedimento em vigor no SQTF-C <sup>118</sup>, a eficiência da extração deve ser superior a 40% para métodos quantitativos, o que se verifica para todos os AHTs, com exceção do telmisartan. Segundo este mesmo procedimento de validação, para um método qualitativo a eficiência de extração deve ser superior a 20%, ou seja, numa fase de triagem é possível utilizar este método para confirmar a presença inequívoca do telmisartan, mas para proceder à sua quantificação é necessário demonstrar que os valores de recuperação obtidos não têm impacto na exatidão do método e nos limites de deteção e quantificação.

Neste caso, decidimos testar a eficiência da extração do telmisartan usando as colunas Oasis® Prime HLB, que já tinham demonstrado melhores resultados para esta substância comparando com as colunas Oasis® HLB normalmente utilizadas na rotina do laboratório. Os resultados obtidos com as novas colunas estão apresentados na figura 3.14, assim como os obtidos com as colunas Oasis® HLB, para facilitar a análise comparativa. Podemos verificar que a recuperação no caso das colunas Oasis® Prime HLB é de 83,7%, 74,4% e 94,4%, respetivamente, para os controlos baixo, intermédio e alto, valores significativamente superiores aos obtidos anteriormente e acima do critério estabelecido pelo laboratório (40%), o que nos leva a crer que para a quantificação do telmisartan estas colunas sejam mais adequadas.

No entanto, como já foi referido anteriormente, as colunas mencionadas não estavam disponíveis em grande escala no SQTF-C para que fosse possível efetuar um estudo mais aprofundado. Há, portanto, uma necessidade de avaliar o impacto da extração com as colunas Oasis® Prime HLB na determinação dos AHTs estudados, principalmente do telmisartan, e, caso se verifique uma melhoria em relação ao método desenvolvido, este poderá ser utilizado para a sua determinação.



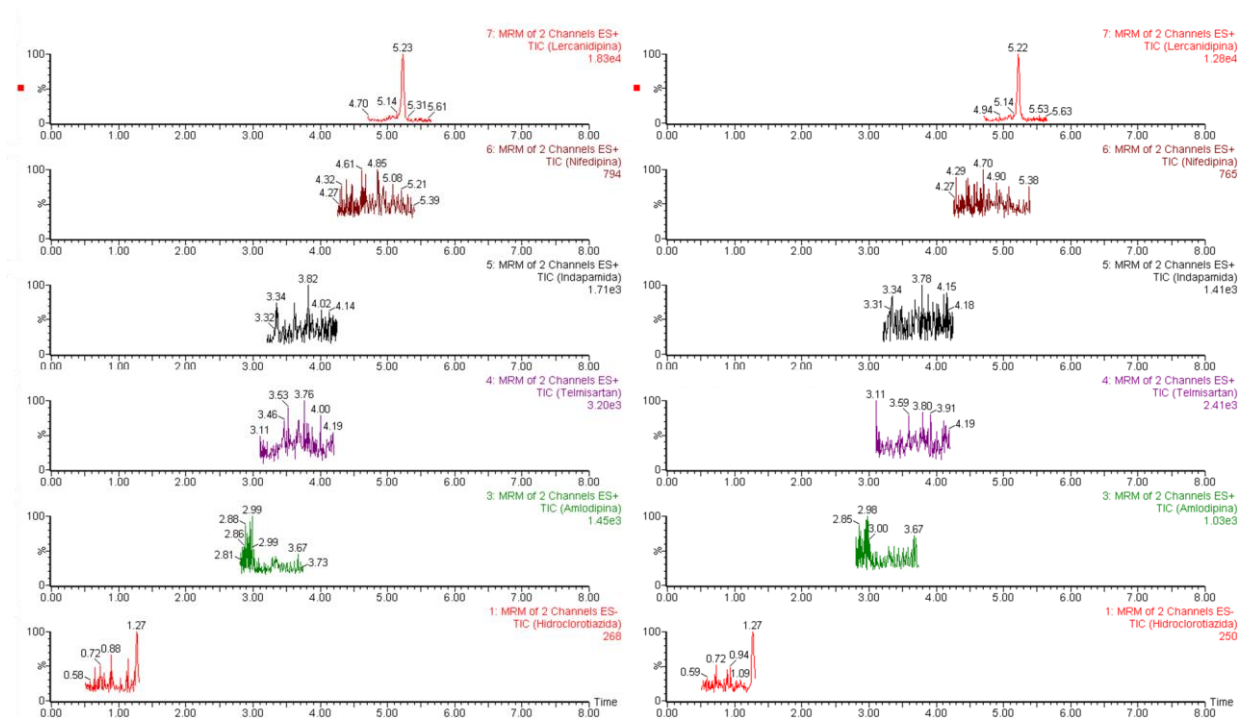
**Figura 3.14.** Eficiência da extração para o telmisartan para os diferentes níveis de concentração utilizando na extração as colunas Oasis® HLB e as colunas Oasis® Prime HLB.

### 3.3.7 Carryover

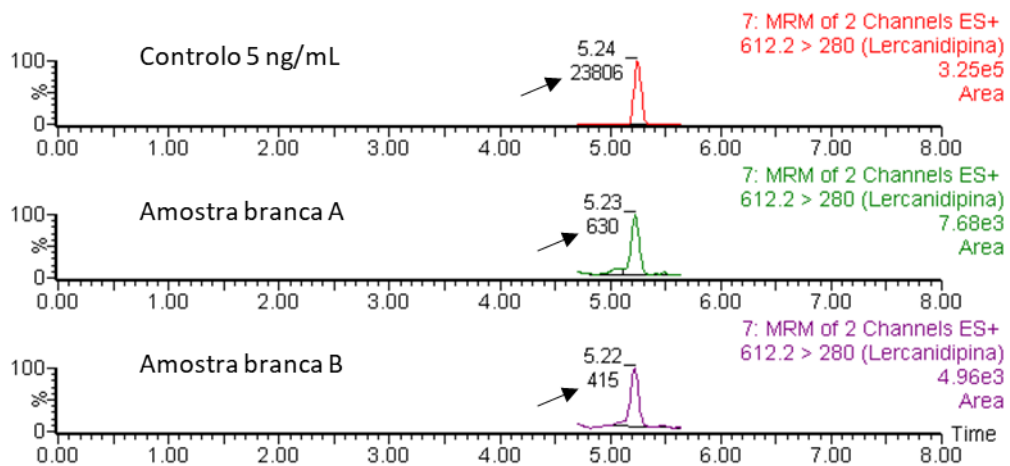
Os cromatogramas das amostras brancas obtidos no estudo de fenómenos de arrastamento (*carryover*) estão apresentados na figura 3.15. Visualmente, a análise destes cromatogramas demonstra que não há contaminação das amostras brancas dentro da gama de trabalho estudada para todas as substâncias, com exceção da lercanidipina.

Segundo o SWGTOX (2013)<sup>117</sup>, para que se conclua sobre a ausência de fenómenos de arrastamento é necessário que as amostras brancas injetadas a seguir ao controlo de maior concentração (500 ng/mL) tenham um sinal inferior a 10% do sinal obtido para o calibrador de menor concentração (5 ng/mL). Deste modo, juntamente com as duas alíquotas de sangue branco, foi preparado um calibrador a 5 ng/mL através da fortificação de 0,5 mL de sangue branco (SV119) com 25 µL de uma mistura padrão metanólica a 0,1 µg/mL.

As amostras brancas A e B apresentam, respetivamente, áreas para a transição de quantificação da lercanidipina (612,2 > 280) de 630 e 415, enquanto o calibrador a 5 ng/mL, injetado simultaneamente, para a mesma transição, apresentou uma área de 23806, como está evidenciado na figura 3.16. O mesmo raciocínio pode ser efetuado em termos de intensidade do pico obtido. Portanto, como o sinal obtido para as amostras brancas foi inferior a 10% do sinal obtido para o calibrador a 5 ng/mL, podemos concluir que não há evidências de fenómenos de arrastamento na gama de trabalho utilizada.



**Figura 3.15.** Cromatogramas, adquiridos em modo TIC, para a amostra branca A (esquerda) e para a amostra branca B (direita) injetadas a seguir a um controlo alto a 500 ng/mL.



**Figura 3.16.** Cromatogramas obtidos para a transição de quantificação da lercanidipina no controlo a 5 ng/mL, na amostra branca A e na amostra branca B. As áreas de cada pico estão assinaladas na figura.

### 3.3.8 Limiares analíticos

Segundo a abordagem baseada nos parâmetros da curva de calibração, o LD e o LQ podem ser calculados através da equação 3.14 e 3.15, respetivamente:

$$LD = \frac{3,3 \times S_{y/x}}{b} \quad (\text{Equação 3.14})$$

$$LQ = \frac{10 \times S_{y/x}}{b} \quad (\text{Equação 3.15})$$

Onde:

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

$b$  é o declive da reta.

Uma vez obtidas as curvas de calibração, usando  $1/x$  como fator de ponderação, LD e LQ foram calculados através das equações anteriormente mencionadas e os resultados estão sumariados na tabela 3.15. Em anexo (F. Limiares analíticos), apresentam-se, sob a forma de tabelas e gráficos, os valores obtidos para as áreas, a curva de calibração, o tratamento estatístico efetuado para cada uma das substâncias individualmente, bem como os valores de LD e LQ.

**Tabela 3.15.** Resumo dos resultados obtidos no estudo dos limites de detecção e quantificação.

Substância	Equação	$r^2$	Erro padrão ( $S_{y/x}$ )	LD (ng/mL)	LQ (ng/mL)
Amlodipina	$y = 0,00013x - 0,00005$	0,9957	0,00003	0,88	2,67
Hidroclorotiazida	$y = 0,00014x + 0,00004$	0,9916	0,00004	1,06	3,22
Indapamida	$y = 0,00024x - 0,00003$	0,9938	0,00007	1,00	3,04
Lercanidipina	$y = 0,00706x + 0,00458$	0,9927	0,00284	1,33	4,02
Nifedipina	$y = 0,00070x + 0,00030$	0,9952	0,00034	1,04	3,15
Telmisartan	$y = 0,00096x - 0,00040$	0,9952	0,00034	1,17	3,53

Tendo em conta a gama de trabalho definida para o método (5-500 ng/mL) e as doses terapêuticas recomendadas para os vários AHTs, os limites calculados são adequados.

### 3.3.8.1 Teste dos limites

Uma vez aplicado o procedimento de ensaio verificou-se se os replicados correspondentes ao teste do LQ cumpriam os critérios de identificação de substâncias, nomeadamente, o tempo de retenção relativo (TRR) e as relações iónicas das transições estudadas (tabelas 3.16 e 3.17). Foi utilizado como controlo positivo o calibrador com a concentração mais aproximada do valor do replicado.

**Tabela 3.16.** Resultados do teste do limite de quantificação para a amlodipina, hidroclorotiazida e indapamida, no que diz respeito aos critérios de identificação de substâncias.

Amostra	Tr (s)	Tr (PI)	TRR	$\Delta$ TRR	A <sub>238</sub>	A <sub>294</sub>	A <sub>relativa</sub> (%)	Tolerância (%)
Cal 3 ng/mL	3,34	1,28	2,609		131	113	86,4	76,4 - 96,4
Réplica A	3,34	1,28	2,609	0,000	225	175	77,6	
Réplica B	3,33	1,28	2,602	-0,003	149	140	93,7	
Réplica C	3,34	1,28	2,609	0,000	164	128	78,1	
Réplica D	3,33	1,28	2,602	-0,003	192	179	93,0	
Réplica E	3,34	1,28	2,609	0,000	211	186	88,1	
Cal 4 ng/mL	3,34	1,28	2,609		202	184	90,8	80,8 - 100,8
Réplica A	3,33	1,28	2,602	-0,003	197	192	97,4	
Réplica B	3,34	1,28	2,609	0,000	213	207	97,2	
Réplica C	3,34	1,28	2,609	0,000	255	242	94,6	
Réplica D	3,34	1,28	2,609	0,000	229	224	97,7	
Réplica E	3,33	1,28	2,602	-0,003	274	256	93,4	

Amostra	Tr (s)	Tr (PI)	TRR	$\Delta$ TRR	A <sub>269</sub>	A <sub>205</sub>	A <sub>relativa</sub> (%)	Tolerância (%)
Cal 3 ng/mL	0,91	1,28	0,711		78	62	79,9	69,9 - 89,9
Réplica A	0,91	1,28	0,711	0,000	78	60	77,3	
Réplica B	0,91	1,28	0,711	0,000	92	73	79,0	
Réplica C	0,91	1,28	0,711	0,000	78	68	87,4	
Réplica D	0,91	1,28	0,711	0,000	78	59	75,3	
Réplica E	0,91	1,28	0,711	0,000	88	66	74,8	
Cal 4 ng/mL	0,91	1,28	0,711		118	89	75,8	65,8 - 85,8
Réplica A	0,91	1,28	0,711	0,000	95	77	81,2	
Réplica B	0,91	1,28	0,711	0,000	111	87	78,9	
Réplica C	0,91	1,28	0,711	0,000	113	88	77,7	
Réplica D	0,91	1,28	0,711	0,000	121	103	84,6	
Réplica E	0,91	1,28	0,711	0,000	113	88	78,1	

Amostra	Tr (s)	Tr (PI)	TRR	$\Delta$ TRR	A <sub>132,1</sub>	A <sub>91</sub>	A <sub>relativa</sub> (%)	Tolerância (%)
Cal 3 ng/mL	3,74	1,28	2,922		577	217	37,7	30,2 - 45,2
Réplica A	3,74	1,28	2,922	0,000	585	219	37,5	
Réplica B	3,74	1,28	2,922	0,000	688	238	34,7	
Réplica C	3,74	1,28	2,922	0,000	685	256	37,4	
Réplica D	3,74	1,28	2,922	0,000	593	253	42,6	
Réplica E	3,74	1,28	2,922	0,000	643	277	43,1	
Cal 4 ng/mL	3,74	1,28	2,922		940	331	35,2	28,2 - 42,3
Réplica A	3,73	1,28	2,914	-0,003	782	302	38,6	
Réplica B	3,73	1,28	2,914	-0,003	845	327	38,7	
Réplica C	3,73	1,28	2,914	-0,003	810	322	39,8	
Réplica D	3,73	1,28	2,914	-0,003	920	353	38,3	
Réplica E	3,73	1,28	2,914	-0,003	879	332	37,7	

**Tabela 3.17.** Resultados do teste do limite de quantificação para a lercanidipina, nifedipina e telmisartan, no que diz respeito aos critérios de identificação de substâncias.

Amostra	Tr (s)	Tr (PI)	TRR	$\Delta$ TRR	A <sub>280</sub>	A <sub>315</sub>	A <sub>relativa</sub> (%)	Tolerância (%)
Cal 3 ng/mL	5,25	1,28	4,102		10930	3717	34,0	27,2 - 40,8
Réplica A	5,25	1,28	4,102	0,000	12615	4361	34,6	
Réplica B	5,25	1,28	4,102	0,000	11105	3910	35,2	
Réplica C	5,25	1,28	4,102	0,000	13086	4485	34,3	
Réplica D	5,25	1,28	4,102	0,000	12002	4310	35,9	
Réplica E	5,25	1,28	4,102	0,000	10977	3782	34,5	
Cal 4 ng/mL	5,25	1,28	4,102		16882	5876	34,8	27,8 - 41,8
Réplica A	5,25	1,28	4,102	0,000	14704	5104	34,7	
Réplica B	5,25	1,28	4,102	0,000	14116	4912	34,8	
Réplica C	5,25	1,28	4,102	0,000	15743	5345	34,0	
Réplica D	5,25	1,28	4,102	0,000	15992	5771	36,1	
Réplica E	5,25	1,28	4,102	0,000	15658	5510	35,2	

Amostra	Tr (s)	Tr (PI)	TRR	$\Delta$ TRR	A <sub>315</sub>	A <sub>254</sub>	A <sub>relativa</sub> (%)	Tolerância (%)
Cal 3 ng/mL	4,89	1,28	3,820		798	199	25,0	20,0 - 30,0
Réplica A	4,89	1,28	3,820	0,000	909	200	22,0	
Réplica B	4,89	1,28	3,820	0,000	857	198	23,2	
Réplica C	4,89	1,28	3,820	0,000	978	221	22,6	
Réplica D	4,89	1,28	3,820	0,000	969	199	20,6	
Réplica E	4,89	1,28	3,820	0,000	905	187	20,6	
Cal 4 ng/mL	4,89	1,28	3,820		1090	229	21,0	16,0 - 26,0
Réplica A	4,89	1,28	3,820	0,000	1190	284	23,9	
Réplica B	4,89	1,28	3,820	0,000	1157	253	21,8	
Réplica C	4,89	1,28	3,820	0,000	1322	318	24,1	
Réplica D	4,89	1,28	3,820	0,000	1389	322	23,1	
Réplica E	4,89	1,28	3,820	0,000	1339	334	25,0	

Amostra	Tr (s)	Tr (PI)	TRR	$\Delta$ TRR	A <sub>276,3</sub>	A <sub>497,1</sub>	A <sub>relativa</sub> (%)	Tolerância (%)
Cal 3 ng/mL	3,69	1,28	2,883		1147	576	50,2	40,2 - 60,2
Réplica A	3,69	1,28	2,883	0,000	1556	820	52,7	
Réplica B	3,69	1,28	2,883	0,000	1439	697	48,4	
Réplica C	3,69	1,28	2,883	0,000	1381	664	48,0	
Réplica D	3,69	1,28	2,883	0,000	1632	881	54,0	
Réplica E	3,69	1,28	2,883	0,000	1734	893	51,5	
Cal 4 ng/mL	3,69	1,28	2,883		1698	839	49,4	39,5 - 59,3
Réplica A	3,69	1,28	2,883	0,000	2141	1115	52,1	
Réplica B	3,69	1,28	2,883	0,000	1667	951	57,0	
Réplica C	3,69	1,28	2,883	0,000	2140	1254	58,6	
Réplica D	3,69	1,28	2,883	0,000	2276	1180	51,9	
Réplica E	3,69	1,28	2,883	0,000	2222	1212	54,6	

Além disso, para a verificação dos limites de quantificação, determinou-se para cada AHT e para cada concentração o CV e o erro em relação ao valor teórico dos replicados. Segundo o procedimento de validação em vigor no SQTFC<sup>118</sup>, estes valores devem ser inferiores a 20% para que os resultados obtidos possam ser aceites. Na tabela 3.18 encontram-se os resultados obtidos no teste do LQ para cada uma das substâncias e para as duas concentrações testadas.

**Tabela 3.18.** Resultados obtidos no teste do limite de quantificação para os AHT's em estudo.

<b>Amlodipina</b>	LQ teste		<b>Hidroclorotiazida</b>	LQ teste	
	3,0 ng/mL	4,0 ng/mL		3,0 ng/mL	4,0 ng/mL
LQest= 2,11 ng/mL	3,91	3,52	LQest= 2,76 ng/mL	2,50	3,07
	2,87	3,86		3,19	3,61
	3,06	4,62		2,67	3,70
	3,48	4,17		2,60	3,96
	3,73	5,03		2,86	3,74
Média (ng/mL)	3,41	4,24	Média (ng/mL)	2,76	3,62
Desvio padrão (ng/mL)	0,44	0,60	Desvio padrão (ng/mL)	0,27	0,33
CV (%)	12,8	14,2	CV (%)	9,9	9,2
Erro (%)	13,6	6,0	Erro (%)	7,9	9,6

<b>Indapamida</b>	LQ teste		<b>Lercanidipina</b>	LQ teste	
	3,0 ng/mL	4,0 ng/mL		3,0 ng/mL	4,0 ng/mL
LQest= 3,68 ng/mL	2,68	3,52	LQest= 3,54 ng/mL	2,55	3,16
	3,34	3,82		2,46	3,07
	3,24	3,68		2,89	3,50
	2,81	4,15		2,53	3,58
	2,95	4,02		2,20	3,54
Média (ng/mL)	3,00	3,84	Média (ng/mL)	2,53	3,37
Desvio padrão (ng/mL)	0,28	0,25	Desvio padrão (ng/mL)	0,24	0,24
CV (%)	9,4	6,6	CV (%)	9,7	7,0
Erro (%)	0,1	4,1	Erro (%)	15,8	15,8

<b>Nifedipina</b>	LQ teste		<b>Telmisartan</b>	LQ teste	
	3,0 ng/mL	4,0 ng/mL		3,0 ng/mL	4,0 ng/mL
LQest= 3,86 ng/mL	2,93	4,11	LQest= 3,29 ng/mL	3,25	4,58
	3,07	4,06		3,32	3,63
	3,44	4,72		3,09	4,66
	3,31	5,01		3,55	4,98
	2,98	4,87		3,69	4,91
Média (ng/mL)	3,15	4,55	Média (ng/mL)	3,38	4,55
Desvio padrão (ng/mL)	0,22	0,44	Desvio padrão (ng/mL)	0,24	0,54
CV (%)	7,1	9,7	CV (%)	7,1	11,9
Erro (%)	4,9	13,8	Erro (%)	12,7	13,8

Podemos verificar que todas as substâncias cumprem os critérios de identificação e apresentam valores para o CV e para o erro em relação ao valor teórico inferiores a 20%, pelo que os valores obtidos para o LQ estão validados.

### 3.3.9 Precisão

#### 3.3.9.1 Repetibilidade

Uma vez aplicado o método obtiveram-se as áreas relativas e os tempos de retenção relativos (TRR) para cada substância em cada replicado e para cada gama de concentração e calculou-se a média, o desvio padrão (s) e o coeficiente de variação (CV), valores que estão sumariados nas tabelas 3.19 e 3.20. Em anexo (G. Repetibilidade) encontram-se os resultados obtidos, de forma mais detalhada, para cada uma das substâncias.

**Tabela 3.19.** Resumo dos resultados obtidos no estudo da repetibilidade para o controlo baixo (50 ng/mL).

Substância	TRR			Áreas relativas		
	Média	s	CV (%)	Média	s	CV (%)
Amlodipina	2,602	0,000	<b>0,0</b>	0,005	0,000	<b>2,2</b>
Hidroclorotiazida	0,703	0,000	<b>0,0</b>	0,004	0,000	<b>4,2</b>
Indapamida	2,916	0,003	<b>0,1</b>	0,022	0,001	<b>2,8</b>
Lercanidipina	4,097	0,004	<b>0,1</b>	0,469	0,016	<b>3,4</b>
Nifedipina	3,820	0,000	<b>0,0</b>	0,028	0,001	<b>2,5</b>
Telmisartan	2,883	0,000	<b>0,0</b>	0,037	0,001	<b>2,1</b>

**Tabela 3.20.** Resumo dos resultados obtidos no estudo da repetibilidade para o controlo alto (200 ng/mL).

Substância	TRR			Áreas relativas		
	Média	s	CV (%)	Média	s	CV (%)
Amlodipina	2,614	0,011	<b>0,4</b>	0,019	0,001	<b>6,0</b>
Hidroclorotiazida	0,706	0,003	<b>0,4</b>	0,014	0,001	<b>4,2</b>
Indapamida	2,928	0,013	<b>0,4</b>	0,086	0,002	<b>2,0</b>
Lercanidipina	4,113	0,018	<b>0,4</b>	0,458	0,017	<b>3,8</b>
Nifedipina	3,838	0,016	<b>0,4</b>	0,101	0,002	<b>1,7</b>
Telmisartan	2,892	0,008	<b>0,3</b>	0,131	0,012	<b>9,3</b>



As especificações em vigor para a repetibilidade do método indicam que, no que diz respeito ao TRR, o CV deve ser inferior a 1%. Já para as áreas relativas, para a gama baixa, o CV deve ser inferior a 20%, enquanto para a gama alta este valor deve ser inferior a 10% <sup>118</sup>. Verifica-se, portanto, que todas as substâncias cumprem os critérios de aceitação anteriormente referidos tanto para o TRR como para as áreas relativas.

### 3.3.9.2 Precisão intermédia

Uma vez aplicado o procedimento de ensaio, os resultados deste estudo foram tratados recorrendo à ferramenta estatística ANOVA (fator único), através da qual podem ser efetuadas estimativas da repetibilidade e da precisão intermédia. As expressões utilizadas estão sumariadas nas tabelas 3.21 e 3.22.

**Tabela 3.21.** Tabela ANOVA (fator único) <sup>118</sup>.

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

Onde:

$p$  é o número de sequências de análises para cada nível de concentração;

$n$  é o número de replicados em cada sequência;

$x_{ij}$  representa a concentração um replicado individual (replicado  $j$ ) obtido na sequência  $i$ ;

$\bar{x}_i$  representa a média da concentração de  $n$  replicados obtidos na sequência  $i$ ;

$\bar{\bar{x}}$  é a média das médias de  $p$  sequências.

**Tabela 3.22.** Cálculo das estimativas da precisão <sup>118</sup>.

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

O limite de repetibilidade absoluto (LR) pode ser calculado através da equação 3.16, enquanto o limite de repetibilidade relativo (LR\*) é calculado a partir da equação 3.17, em que  $m$  é a concentração <sup>118</sup>. O LR é o valor abaixo do qual se deve situar, com uma probabilidade de 95%, a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio ( $X_i, X_{i-1}$ ), isto é, na prática aceitam-se os resultados de duas determinações se  $|X_i - X_{i-1}| \leq LR$  <sup>122</sup>.

$$LR = S_r \times 3,3 \quad (\text{Equação 3.16})$$

$$LR^* = \frac{S_r \times 3,3}{m} \quad (\text{Equação 3.17})$$

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

- Se o desvio padrão for aproximadamente constante ao longo da gama de concentração, pode ser estimado o desvio padrão como o valor calculado por análise de todos os resultados obtidos ao longo da gama de trabalho. É aplicado o teste F para testar a homogeneidade de variâncias.

- Se o coeficiente de variação for aproximadamente constante ao longo da gama de trabalho, é aplicada a equação 3.18 para calcular um coeficiente de variação ponderado ( $CV_{pool}$ ).

$$CV_{pool} = \sqrt{\frac{(n_1-1) \times CV_1^2 + (n_2-1) \times CV_2^2 + \dots}{(n_1-1) + (n_2-1) + \dots}} \quad (\text{Equação 3.18})$$

- Se, simultaneamente, o desvio padrão e o coeficiente de variação não forem constantes ao longo da gama de trabalho, deve ser reportado, para cada gama de trabalho, o respetivo desvio padrão.

Na tabela 3.23 encontram-se resumidos os resultados obtidos no estudo da precisão intermédia para as duas concentrações estudadas (50 e 200 ng/mL) e para cada AHT. A concentração obtida e a recuperação são valores médios dos cinco dias avaliados. Em anexo (H. Precisão intermédia) encontram-se os resultados obtidos, de forma mais detalhada, no estudo da precisão intermédia para cada uma das substâncias.

**Tabela 3.23.** Resumo dos resultados obtidos no estudo da precisão intermédia para cada AHT.

Substância	Concentração (ng/mL)		CV (%)	Recuperação (%)	Repetibilidade ( $S_r$ )	Limite de repetibilidade* (%)	Precisão entre sequências ( $S_{run}$ )	Precisão intermédia ( $S_i$ )	CV <sub>pool</sub> (%)
	Esperada	Obtida							
Amlodipina	50	50,7	1,4	101,4	1,1	7,2	0,3	1,2	4,9
	200	196,0	4,4	98,0	12,0	19,9	5,3	13,1	
Hidroclorotiazida	50	51,7	2,9	103,4	1,7	11,0	1,1	2,0	3,4
	200	200,9	1,1	100,5	3,1	5,2	1,3	3,4	
Indapamida	50	51,1	2,0	102,2	1,4	9,1	0,8	1,6	4,1
	200	200,2	3,2	100,1	5,0	8,2	5,7	7,5	
Lercanidipina	50	51,1	2,3	102,1	1,2	7,8	0,9	1,5	5,2
	200	191,3	4,5	95,6	7,8	12,8	7,2	10,6	
Nifedipina	50	51,0	2,0	102,1	1,2	8,1	0,7	1,4	2,8
	200	202,8	1,4	101,4	3,8	6,3	1,7	4,2	
Telmisartan	50	50,9	1,7	101,9	1,0	6,8	0,7	1,2	4,5
	200	191,0	3,9	95,5	12,2	20,2	2,5	12,5	

Segundo o SWGTOX (2013)<sup>117</sup>, para que o método seja considerado preciso é necessário que os coeficientes de variação associados à repetibilidade e à precisão entre sequências, dados pelas equações 3.19 e 3.20, respetivamente, para cada concentração, sejam inferiores a 20%.

$$CV_{S_r} (\%) = \frac{\sqrt{MS_r}}{\bar{x}} \times 100 \quad (\text{Equação 3.19})$$

$$CV_{S_{run}} (\%) = \frac{\sqrt{\frac{MS_{run} + (n-1) \cdot MS_r}{n}}}{\bar{x}} \times 100 \quad (\text{Equação 3.20})$$

Estes resultados estão apresentados na tabela 3.24. Podemos verificar que estes critérios são cumpridos para todas as substâncias, pelo que este parâmetro se encontra validado.

**Tabela 3.24.** Resultados obtidos para os coeficientes de variação associados à repetibilidade e à precisão entre sequências.

Substância	Concentração (ng/mL)	CV <sub>Sr</sub> (%)	CV <sub>Srun</sub> (%)
Amlodipina	50	2,2	2,3
	200	6,1	6,7
Hidroclorotiazida	50	3,2	3,9
	200	1,6	1,7
Indapamida	50	2,7	3,1
	200	2,5	3,8
Lercanidipina	50	2,3	3,0
	200	4,1	5,6
Nifedipina	50	2,4	2,8
	200	1,9	2,1
Telmisartan	50	2,0	2,4
	200	6,4	6,5

### 3.3.10 Exatidão

Este parâmetro foi avaliado através da recuperação do método (razão entre o valor observado e o valor esperado), com o objetivo de averiguar a existência de erros sistemáticos, definir fatores de correção e, se relevante, estimar a incerteza associada à recuperação do método ( $U_{\bar{R}}$ ).

Através dos resultados obtidos para a precisão intermédia, calculou-se, para cada nível de concentração, a recuperação para cada dia ( $R_i$ ) (equação 3.21) e a recuperação média ( $\bar{R}$ ) (equação 3.22). Posteriormente, para avaliar se esta era significativamente diferente de 100%, aplicou-se, a cada nível, um teste t de student, no qual o valor experimental é calculado através das equações 3.23 e 3.24 e o valor crítico ( $t_{crit}$ ) é dado por esta mesma distribuição bilateral para p-1 graus de liberdade num intervalo de confiança a 95%

Se  $t_{Exp} < t_{crit}$  então  $\bar{R}$  não é significativamente diferente de 100% e  $U_{\bar{R}}$  é calculado com base na equação 3.25; por outro lado, se  $t_{Exp} > t_{crit}$   $\bar{R}$  é significativamente diferente 100% e  $U_{\bar{R}}$  é calculado através da equação 3.26, de modo a contemplar este fator adicional de incerteza.

$$R_i = \frac{C_{Obsi}}{C_{Fortf}} \quad (\text{Equação 3.21}) \quad \bar{R} = \frac{\sum_{i=1}^p R_i}{p} \quad (\text{Equação 3.22}) \quad t_{Exp} = \frac{|1-\bar{R}|}{U_{\% \bar{R}}} \quad (\text{Equação 3.23})$$

$$U_{\% \bar{R}} = \frac{S_{Obs}}{\sqrt{p}} \quad (\text{Equação 3.24}) \quad U_{\bar{R}} = \frac{U_{\% \bar{R}}}{\bar{R}} \quad (\text{Equação 3.25}) \quad U_{\bar{R}} = \frac{\sqrt{(U_{\% \bar{R}})^2 + \left(\frac{1-\bar{R}}{K}\right)^2}}{\bar{R}} \quad (\text{Equação 3.26})$$

Onde:

$S_{Obs}$  é o desvio padrão de  $p$  valores de  $R_i$  obtidos em condições de precisão intermédia;

$R_i$  é a recuperação média de  $n$  replicados obtidos em condições de repetibilidade;

$K$  é o fator de expansão da incerteza expandida.

Na tabela 3.25 encontram-se resumidos os resultados obtidos no estudo da exatidão. Em anexo (I. Exatidão) encontram-se os resultados obtidos, de forma mais detalhada, no estudo da exatidão para cada uma das substâncias.

**Tabela 3.25.** Resumo dos resultados obtidos no estudo da exatidão para cada AHT.

Substância	Concentração (ng/mL)	Recuperação (%)	CV (%)	$t_{Exp}$	Incerteza de R (%)	Incerteza padrão relativa
Amlodipina	50	101,4	1,4	2,21	0,6	0,006
	200	98,0	4,4	1,02	2,0	0,020
Hidroclorotiazida	50	103,4	2,9	2,55	1,3	0,013
	200	100,5	1,1	0,94	0,5	0,005
Indapamida	50	102,2	2,2	2,11	1,0	0,010
	200	100,1	3,2	0,06	1,4	0,014
Lercanidipina	50	102,1	2,3	2,04	1,0	0,010
	200	95,6	4,5	2,28	1,9	0,019
Nifedipina	50	102,1	2,0	2,25	0,9	0,009
	200	101,4	1,4	2,22	0,6	0,006
Telmisartan	50	101,9	1,7	2,35	0,8	0,008
	200	95,5	3,9	2,70	1,7	0,017

Considerando um intervalo de confiança a 95%, o valor de  $t$  de student bilateral tabelado para 4 graus de liberdade é de 2,78, valor que é superior a todos os  $t_{Exp}$  calculados. Portanto, verificamos que todas as substâncias em estudo não apresentam recuperações médias estatisticamente diferentes de 100%, pelo que não há evidências de erros sistemáticos no método.

Fazendo uma análise retrospectiva sobre o efeito matriz estudado no ponto 3.3.5 e em que verificámos que de facto este existia para duas substâncias (amlodipina e telmisartan), podemos concluir que o efeito matriz não tem impacto na exatidão do método, bem como nos limites analíticos anteriormente estudados, porque os critérios de aceitação para ambos os casos foram cumpridos. A mesma conclusão pode ser retirada para os valores de eficiência de extração inferiores a 40% obtidos para o telmisartan.

### 3.3.11 Integridade da diluição

O tratamento de resultados foi semelhante ao realizado para o teste dos limites de quantificação, em que pretendeu avaliar o CV e o erro associado a cada diluição e a cada substância. Os resultados obtidos neste estudo estão sumariados nas tabelas 3.26 e 3.27. Tanto os valores de CV como do erro para cada diluição são inferiores a 20%, pelo que podemos concluir que, no caso de ser necessário, é possível diluir as amostras pelo menos até 10 vezes sem que esta diluição tenha influência nos resultados obtidos.

**Tabela 3.26.** Resultados obtidos no estudo da integridade da diluição para a amlodipina e a hidroclorotiazida.

Amlodipina	800 ng/mL	Fator Diluição	
		1500 ng/mL	2000 ng/mL
Diluição: 2x, 5x e 10x	868	1463	2348
	841	1425	1933
	694	1353	2195
	751	1420	1993
	818	1393	2007
Média (ng/mL)	794	1411	2095
Desvio padrão (ng/mL)	71	41	172
CV (%)	8,9	2,9	8,2
Erro (%)	0,7	6,0	4,8

Hidroclorotiazida	800 ng/mL	Fator Diluição	
		1500 ng/mL	2000 ng/mL
Diluição: 2x, 5x e 10x	865	1616	2160
	766	1498	2094
	771	1459	1916
	739	1349	2077
	771	1479	1909
Média (ng/mL)	782	1480	2031
Desvio padrão (ng/mL)	48	95	113
CV (%)	6,1	6,4	5,6
Erro (%)	2,2	1,3	1,6

**Tabela 3.27.** Resultados obtidos no estudo da integridade da diluição para a indapamida, a lercanidipina, a nifedipina e o telmisartan.

	800 ng/mL	Fator Diluição	
		1500 ng/mL	2000 ng/mL
<b>Indapamida</b>			
Diluição: 2x, 5x e 10x	759	1630	1798
	714	1399	1986
	697	1460	1806
	748	1399	1715
	777	1329	1696
Média (ng/mL)	739	1443	1800
Desvio padrão (ng/mL)	33	114	115
CV (%)	4,4	7,9	6,4
Erro (%)	7,6	3,8	10,0
<hr/>			
	800 ng/mL	Fator Diluição	
		1500 ng/mL	2000 ng/mL
<b>Lercanidipina</b>			
Diluição: 2x, 5x e 10x	893	1635	2256
	822	1578	2074
	762	1505	2263
	753	1423	2017
	764	1446	1951
Média (ng/mL)	799	1517	2112
Desvio padrão (ng/mL)	59	89	141
CV (%)	7,4	5,9	6,7
Erro (%)	0,2	1,2	5,6
<hr/>			
	800 ng/mL	Fator Diluição	
		1500 ng/mL	2000 ng/mL
<b>Nifedipina</b>			
Diluição: 2x, 5x e 10x	761	1374	2286
	725	1251	1667
	613	1302	1800
	639	1065	1757
	651	1057	1632
Média (ng/mL)	678	1210	1828
Desvio padrão (ng/mL)	63	143	265
CV (%)	9,2	11,8	14,5
Erro (%)	15,3	19,4	8,6
<hr/>			
	800 ng/mL	Fator Diluição	
		1500 ng/mL	2000 ng/mL
<b>Telmisartan</b>			
Diluição: 2x, 5x e 10x	718	1394	2191
	899	1647	2268
	791	1441	2367
	859	1493	2248
	775	1685	1831
Média (ng/mL)	808	1532	2181
Desvio padrão (ng/mL)	71	128	206
CV (%)	8,8	8,3	9,4
Erro (%)	1,1	2,1	9,1

De notar que os valores de erro mais elevados encontrados foram para a nifedipina, com concentrações obtidas para todas as diluições inferiores às esperadas. Efetivamente, neste caso pode ter ocorrido alguma perda do analito devido à sua fotossensibilidade, apesar de se ter tentado garantir todas as condições para que isso não acontecesse. A verdade é que para a preparação das amostras diluídas utilizadas neste estudo foi necessário mais tempo do que no estudo dos restantes parâmetros pelo que de facto pode ter alguma degradação da nifedipina.

### 3.3.12 Robustez

Ao longo de todo o processo de validação foram introduzidas pequenas variações, quer de forma propositada, quer decorrentes do normal funcionamento dos equipamentos, de modo a avaliar a robustez do método, nomeadamente pequenas alterações de pH, temperatura ambiental, composição da fase móvel, diferentes soluções de trabalho (de analitos e de padrões internos), desgaste das colunas analíticas, diferentes amostras brancas, diferentes lotes de reagentes e solventes para todos os passos de preparação das amostras, utilização de pipetas diferentes, entre outros parâmetros. Não se tendo verificado diferenças nos resultados analíticos, estas variações permitiram concluir sobre a robustez do método.

## 3.4 Aplicação do método a casos forenses

De modo a demonstrar a utilidade do método desenvolvido e validado na rotina do laboratório do SQTFC, este foi aplicado a amostras de sangue *postmortem* de casos forenses, recolhidas entre 2016 e 2017 nas autópsias médico-legais efetuadas no Serviço de Patologia Forense da Delegação do Centro do INMLCF, I.P. ou nos Gabinetes Médico-Legais que atuam na sua dependência. Na tabela 3.28 encontram-se sumariados os casos selecionados, alguma informação complementar sobre estes, bem como as substâncias encontradas. Os casos foram escolhidos com base nas informações disponíveis sobre estes, na associação de AHTs encontrados ou nas elevadas concentrações determinadas.

Foi efetuado, em simultâneo, a quantificação dos AHTs detetados em sangue periférico e sangue cardíaco, de modo a avaliar as possíveis diferenças encontradas na concentração destas substâncias em ambas as matrizes. A preparação destas amostras foi realizada de acordo com o procedimento descrito no ponto 2.4. Tendo em conta a gama de trabalho definida (5-500 ng/mL), em alguns casos, foi necessário usar fatores de diluição. De referir que 50% dos casos correspondem a uma etiologia médico-legal suicida e que, na maioria dos casos, para além dos AHTs, foram detetadas outras substâncias medicamentosas, como benzodiazepinas, antidepressivos, antipsicóticos, analgésicos e anestésicos e, ainda, etanol. No entanto, estas amostras foram negativas para drogas de abuso e pesticidas.



**Tabela 3.28.** Lista de casos forenses selecionados para aplicação do método e respectivas informações disponíveis nomeadamente sexo, idade, etiologia médico-legal da morte, AHT's encontrados, bem como outras substâncias encontradas.

<b>Caso</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade</b>	<b>Etiologia médico-legal</b>	<b>Outras informações</b>	<b>AHT(s) encontrado(s)</b>	<b>Outras substâncias encontradas</b>
1	F	67	Desconhecida	Medicação: salazopirina, venlafaxina, lisinopril, HCTZ, carvedilol, tramadol, paracetamol	HCTZ e LER	Carvedilol e venlafaxina
2	M	79	Suicídio (enforcamento)		IND e NIF	Citalopram e alprazolam
3	M	60	Morte natural	HTA; medicação: alopurinol, atorvastatina, rampiril + HCTZ, LER, tromalyt, brufen	HCTZ e LER	-
4	M	66	Suicídio (enforcamento)	-	AML e HCTZ	Setralina, propanolol e trazadona
5	M	77	Acidental (engasgamento)	Restos alimentares nas vias áreas superiores (carne); medicação: folicil, HCTZ, cloreto trospio, risperidona, AML, omeprazol	AML e HCTZ	Etanol
6	M	60	Desconhecida	Internamento; morte súbita após fratura da vértebra L1	AML e IND	Clorpromazina, tiaprida, haloperidol, tramadol, lidocaína, oxazepam, paracetamol e diazepam
7	M	66	Desconhecida	Morte em lar particular; antecedentes de doença de Alzheimer	HCTZ e TEL	Citalopram

**Tabela 3.28 (continuação).** Lista de casos forenses selecionados para aplicação do método e respectivas informações disponíveis nomeadamente sexo, idade, etiologia médico-legal da morte, AHTs encontrados, bem como outras substâncias encontradas.

<b>Caso</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade</b>	<b>Etiologia médico-legal</b>	<b>Outras informações</b>	<b>AHT(s) encontrado(s)</b>	<b>Outras substâncias encontradas</b>
8	M	77	Morte natural	Cardiopatía (?) patologia renal e cardiovascular	AML e HCTZ	-
9	M	73	Suicídio (asfixia mecânica)	-	AML, HCTZ e TEL	Bisoprolol e etanol
10	M	82	Suicídio (enforcamento)	-	TEL	Bisoprolol
11	M	61	Suicídio (asfixia mecânica)	-	IND	Etanol
12	F	88	Suicídio (asfixia mecânica)	-	AML	Diazepam, nordiazepam, oxazepam, temazepam

Na tabela 3.29 estão apresentados os resultados obtidos na quantificação dos diversos AHTs estudados em sangue periférico e em sangue cardíaco para os casos apresentados. A discussão destes resultados não tem um carácter vinculativo, uma vez que a informação disponível sobre os casos é, na sua maioria, limitada.

**Tabela 3.29.** Concentrações obtidas em sangue periférico e sangue cardíaco dos AHTs encontrados em cada caso.

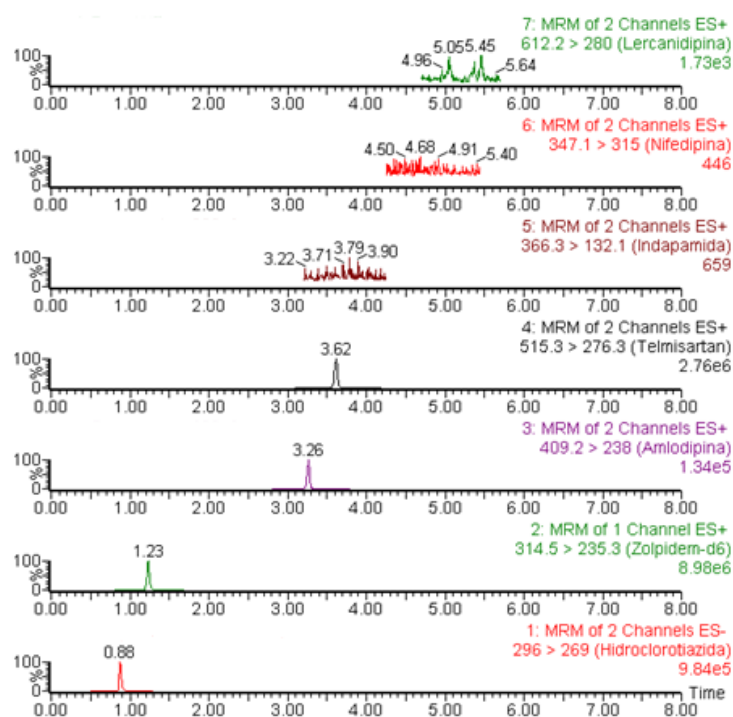
Caso	AHT(s) encontrado(s)	Concentração (ng/mL)	
		Sangue periférico	Sangue cardíaco
1	HCTZ	485	442
	LER	< 5	5,0
2	IND	- <sup>8</sup>	45
	NIF		42
3	HCTZ	152	190
	LER	< 5	5,9
4	AML	17	135
	HCTZ	127	566
5	AML	< 5	6,3
	HCTZ	339	495
6	AML	153	493
	IND	44	33
7	HCTZ	331	168
	TEL	282	251
8	AML	445	137
	HCTZ	137	187
9	AML	76	55
	HCTZ	833	492
	TEL	107	497
10	TEL	7260	6801
11	IND	84	128
12	AML	1321	2613

Tendo em conta os casos recebidos no SQTf-C, os AHTs mais frequentemente encontrados em sangue são, em primeiro lugar, a hidroclorotiazida e depois a amlodipina e o telmisartan. De notar que, em quase todos os casos apresentados, existe a associação de dois ou mais AHTs, sendo um deles sempre um diurético como

<sup>8</sup> Não foi possível realizar a quantificação em sangue periférico porque o volume disponível era insuficiente.

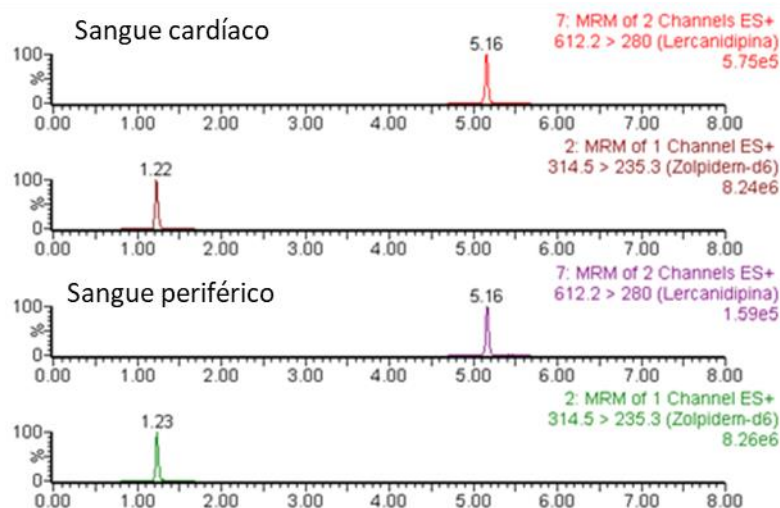
a hidroclorotiazida e a indapamida, com destaque para o caso 9 em que se detetou a presença de três dos AHTs em estudo (figura 3.17) e ainda um outro fármaco AHT (bisoprolol). Muito provavelmente este indivíduo apresentava valores de TA tão elevados que não era possível obter o seu controlo apenas com a associação de dois ou três AHTs.

Destaque também para o caso 10 em que se determinou uma quantidade de telmisartan significativamente elevada, provavelmente superior à concentração terapêutica recomendada, tendo em conta a informação disponível para os restantes AHTs, e possivelmente tomada pouco antes de cometer o suicídio. Salientar, ainda, o caso 12, no qual se determinou uma concentração de amlodipina significativamente superior à concentração terapêutica recomendada (5-15 ng/mL), incluindo à fatal (100-200 ng/mL), provavelmente já tomada com a intenção de cometer o suicídio a seguir. A concentração deste AHT também se encontrava acima da concentração terapêutica estabelecida para os casos 6, 8 e 9, no entanto, sem um conhecimento mais aprofundado dos casos, não podemos concluir imediatamente sobre a causa da morte, apenas com base nas concentrações determinadas.



**Figura 3.17.** Cromatogramas obtidos para a amostra referente ao caso 9, com identificação dos picos correspondentes à transição de quantificação dos AHTs hidroclorotiazida, amlodipina e telmisartan e padrão interno em sangue periférico.

No caso da lercanidipina não foi possível, para ambos os casos, quantificá-la em sangue periférico, apesar de ter sido detetada inequivocamente (figura 3.18), uma vez que os valores encontrados se encontravam abaixo do limite inferior da curva de calibração (5 ng/mL). No entanto, o facto de não podermos quantificar abaixo de 5 ng/mL não tem implicações forenses, uma vez que a gama terapêutica deste AHT pode ir até 12,5 ng/mL. O mesmo se verificou para o caso 5, no que diz respeito à amlodipina.



**Figura 3.18.** Cromatogramas obtidos para a amostra referente ao caso 3, com identificação dos picos correspondentes à transição de quantificação da lercanidipina e padrão interno em sangue cardíaco e sangue periférico.

Avaliando as concentrações obtidas em sangue periférico e sangue cardíaco, verificamos que, de facto, existem diferenças entre ambos, nomeadamente para a amlodipina, hidroclorotiazida e telmisartan. Isto é, podemos concluir que estes AHT's são afetados pelo fenómeno de redistribuição *postmortem*, como se pode comprovar para a amlodipina nos casos 4, 6, 8 e 12, para hidroclorotiazida nos casos 4, 5, 7 e 9 e para o telmisartan no caso 9. Nos casos em que se detetam estas substâncias e não se verificam diferenças entre sangue periférico e cardíaco (nomeadamente, 5 e 9 para a amlodipina, 1 e 3 para a hidroclorotiazida, 7 e 10 para o telmisartan), este facto pode estar relacionado com o curto espaço de tempo decorrido entre a morte e a recolha do sangue que minimizou os fenómenos de redistribuição *postmortem* para algumas das substâncias.

Deste modo, é de extrema importância, para a correta interpretação dos resultados obtidos, que a quantificação seja feita em sangue periférico por ser menos suscetível ao efeito da redistribuição *postmortem*. No entanto, quando a quantidade deste não é suficiente, pode ser sempre feita a quantificação em sangue cardíaco, sendo que, neste caso, temos que ter uma especial atenção na interpretação dos resultados, pois a concentração dada pode estar sobrestimada como resultado da redistribuição *postmortem*. Ainda assim, o sangue cardíaco é bastante útil para se efetuar uma triagem inicial dos AHT's presentes na amostra, dado o volume disponível no cadáver ser geralmente bastante superior ao periférico.

Para a indapamida e a lercanidipina parece não haver diferenças entre as concentrações determinadas em ambas as matrizes. No entanto, são poucos os casos analisados para se poder concluir que estes AHT's não são afetados pela redistribuição *postmortem*, daí que seja necessário estudar mais casos que sejam positivos para estas substâncias. No caso da nifedipina não foi possível efetuar esta comparação, por apenas termos um caso positivo para este AHT e não haver sangue periférico em quantidade suficiente para fazer a quantificação. Como anteriormente, é necessário realizar mais estudos para que se possa inferir sobre a redistribuição *postmortem* destas substâncias.



# Capítulo 4

## Conclusão

O objetivo principal desta dissertação era validar um método analítico para determinar seis AHTs (amlodipina, hidroclorotiazida, indapamida, lercanidipina, nifedipina e telmisartan) em amostras de sangue por LC-MS/MS. O procedimento de ensaio incluiu a preparação das amostras baseada numa extração em fase sólida e a sua posterior injeção no equipamento de LC-MS/MS com ionização por *electrospray* e analisador de massa do tipo triplo quadrupolo.

Dado que os AHTs se encontram entre os medicamentos mais vendidos em Portugal, torna-se essencial a existência de métodos validados para a determinação destas substâncias, quer no âmbito da toxicologia forense quer da toxicologia clínica. Torna-se também fundamental a determinação de vários AHTs no mesmo método, uma vez que, estes fármacos são administrados, na maioria das vezes, em associação, pelo que é muito provável nas análises toxicológicas encontrar mais do que um AHT de classes farmacológicas diferentes.

O método desenvolvido é rápido, uma vez que é possível separar cromatograficamente os seis AHTs e o padrão interno em menos de 6 min. A validação do método incluiu o estudo de diversos parâmetros, nomeadamente, estabilidade, seletividade, linearidade, efeito matriz, eficiência da extração, limites de deteção e de quantificação, precisão, exatidão, integridade da diluição e robustez.

No estudo da estabilidade verificou-se a fotossensibilidade da nifedipina nas misturas padrão e na matriz de sangue e a instabilidade das amostras fortificadas para alguns AHTs, designadamente, 24h à temperatura ambiente e 7 dias a -20°C, sendo que apenas a hidroclorotiazida e a lercanidipina são estáveis sob todas as condições experimentais estudadas. Deste modo, é necessário garantir o menor tempo de espera entre a preparação das amostras, extração e injeção no equipamento de LC-MS/MS.

No que diz respeito à seletividade, a percentagem de falsos positivos foi de 0% e a percentagem de falsos negativos foi de 3,3%, o que demonstra que o método é seletivo para os AHTs estudados, não se verificando também interferentes relevantes, permitindo a identificação inequívoca dos analitos.

Inicialmente, no estudo da linearidade, foi avaliada a homocedasticidade das variâncias e como se verificou a presença de heterocedasticidade ao longo da curva de calibração, o estudo dos fatores de ponderação permitiu concluir que  $1/x$  era o fator de ponderação mais adequado para todos os AHTs. Usando este fator, o método demonstrou ser linear na gama de trabalho estudada (5-500 ng/mL).

Verificou-se a presença de efeito matriz para a amlodipina e para o telmisartan, com valores de efeito matriz superiores a 25% que, no entanto, não são significativos, uma vez que os limiares analíticos e a exatidão do método não são afetados.

O estudo da eficiência da extração apresentou percentagens de recuperação entre 42,4% e os 85,0%, com exceção do telmisartan, o que permitiu concluir que a extração é adequada para estes AHTs, uma vez que não há perdas significativas do analito no passo extrativo (recuperação > 40%). Além disso, o método não é afetado por fenómenos de arrastamento.

Os limites de deteção e de quantificação foram, respetivamente, próximos de 1 ng/mL e 3 ng/mL, com exceção do limite de quantificação da lercanidipina que foi de 4 ng/mL. Estes valores são compatíveis com a gama de trabalho estudada, bem como com os intervalos de valores de referência na interpretação toxicológica.

O método desenvolvido é preciso, dado que os coeficientes de variação associados à repetibilidade e à precisão entre sequências foram inferiores a 20%, e exato, isto é, o método não é afetado por erros sistemáticos, uma vez que a recuperação média não foi para nenhuma substância significativamente diferente de 100%.

O estudo da integridade da diluição permitiu concluir que, caso seja necessário, as amostras podem ser diluídas pelo menos até 10 vezes, sem que este fator tenha impacto nos resultados obtidos.

Foi considerado que o método é robusto, uma vez que não é afetado pela introdução de pequenas ou intencionais modificações analíticas.

Tendo-se cumprido todos os parâmetros de validação, de modo a demonstrar a utilidade do método validado, este foi aplicado a 12 casos forenses. O método demonstrou ser adequado para detetar, identificar e quantificar estes AHTs em amostras de sangue e pode, deste modo, ser integrado na rotina do laboratório do SQTFC.

Foi possível ainda verificar que os resultados obtidos na quantificação destes AHTs são influenciados pelo tipo de sangue (cardíaco ou periférico) em que esta determinação foi efetuada, pelo que numa fase de triagem poderá utilizar-se sangue cardíaco para identificação dos casos positivos, sendo recomendado que a sua quantificação seja realizada em sangue periférico, uma vez que este é menos influenciado pelo fenómeno de redistribuição *postmortem*.

Posto isto, todos os objetivos inicialmente propostos foram cumpridos.

Futuramente, poderá ser realizado um estudo mais aprofundado sobre a utilização das colunas Oasis Prime HLB® (Waters) no processo de extração, dado que demonstraram uma eficiência da extração significativamente superior para o caso do telmisartan comparativamente às colunas Oasis HLB® (Waters), assim como seria interessante avaliar se o efeito matriz seria inferior utilizando estas colunas. Além disso, poderão ser realizados mais estudos para concluir sobre a redistribuição *postmortem* destas substâncias.

O método desenvolvido poderá ainda ser validado para a determinação dos metabolitos destes AHTs ou outros AHTs ainda não monitorizados pelo SQTFC e presentes nas 100 substâncias ativas mais vendidas em Portugal, de acordo com a INFARMED, I.P.. Outra sugestão será a validação deste método para determinação de AHTs em outras matrizes, nomeadamente, urina ou tecidos e órgãos que funcionem como reservatórios destas substâncias, como o fígado, combinada com um processo de extração eficiente.



# Bibliografia

A bibliografia foi inserida com recurso ao programa *Mendeley* de acordo com o estilo pré-definido *Nature*.

1. Madeira, T. R. Conhecimento dos Portugueses sobre a Hipertensão arterial. (Dissertação de Mestrado em Gestão e Economia da Saúde, Faculdade de Economia da Universidade de Coimbra, 2015).
2. Godinho, A. L. M. Farmacologia da Hipertensão. (Dissertação de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade do Algarve, 2011).
3. Martins, A. F. P. A. Tratamento farmacológico da hipertensão arterial no idoso. (Trabalho final do Mestrado Integrado em Medicina, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, 2016).
4. Barardo, S. G. Intervenção Farmacêutica no Tratamento da Hipertensão Arterial – Nova classe. (Dissertação de Mestrado Integrado em Ciências e Tecnologias da Saúde, Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, 2014).
5. Morgado, M. A. N. V. P. Desenvolvimento e avaliação de estratégias para aumentar a adesão à terapêutica farmacológica - Estudo da intervenção do farmacêutico hospitalar no controlo da pressão arterial. (Tese de Doutoramento em Biomedicina, Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior, 2011).
6. Silva, J. M. Estudo da adesão à terapêutica farmacológica anti-hipertensora. (Dissertação de Mestrado em Medicina, Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior, 2013).
7. Polónia, J., Martins, L., Pinto, F. & Nazare, J. Prevalence, awareness, treatment and control of hypertension and salt intake in Portugal. *J. Hypertens.* **32**, 1211–1221 (2014).
8. Polónia, J., Ramalhinho, V., Luís, M. & Saavedra, J. Normas sobre Detecção, Avaliação e Tratamento da Hipertensão Arterial da Sociedade Portuguesa de Hipertensão. *Rev Port Cardiol* **25**, 649–660 (2006).
9. Sociedade Portuguesa de Hipertensão. Tradução portuguesa das guidelines de 2013 da ESH/ESC para o tratamento da hipertensão arterial. *Revista Portuguesa de Hipertensão e Risco Cardiovascular* **39**, 1–42 (2014).
10. Almeida, F. A. De. Emergências hipertensivas: bases fisiopatológicas para o tratamento. *Rev Bras Hipertens* **9**, 346–352 (2002).
11. McClellan, K. J. & Jarvis, B. Lercanidipine: a review of its use in hypertension. *Drugs* **60**, 1123–1140 (2001).
12. INFARMED. Estatística do Medicamento e Produtos de saúde. (2014).
13. Bang, L. M., Chapman, T. M. & Goa, K. L. Lercanidipine: a review of its efficacy in the management of hypertension. *Drugs* **63**, 2249–2472 (2003).
14. INFARMED. Base de dados de medicamentos - Infomed. Available at: <http://app7.infarmed.pt/infomed/pesquisa.php>. (Accessed: 30th November 2016)
15. Dinis-Oliveira, R. J., Magalhães, T. & Carvalho, F. D. in *Toxicologia Forense* (eds. Dinis-Oliveira, R. J., Carvalho, F. D. & Bastos, M. de L.) 1–7 (Pactor, 2015).
16. Marcos, M. Determinação de Medicamentos Antiepilépticos e Anticonvulsivantes por UPLC-MS/MS. (Dissertação de Mestrado em Química Forense, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, 2011).
17. Alves, S. R. Toxicologia forense e saúde pública: desenvolvimento e avaliação de um sistema de informações como ferramenta para a vigilância de agravos decorrentes da utilização de substâncias químicas. (Dissertação de Doutoramento em Ciências, Escola Nacional de Saúde Pública, 2005).
18. Marinho, G. V. Cadeia de custódia da prova pericial. (Dissertação de Mestrado em Administração pública, Escola Brasileira de Administração Pública e de Empresa, 2011).
19. Lopes, M., Gabriel, M. M. & Baretta, G. M. S. Cadeia de custódia: uma abordagem preliminar. *Visão Acadêmica* **7**, (2006).
20. Bell, S. in *Forensic chemistry* (ed. Bell, S.) 257–306 (Pearson, 2014).
21. Remião, F. & Bastos, M. de L. in *Toxicologia Forense* (eds. Dinis-Oliveira, R. J., Carvalho, F. D. & Bastos,

- M. de L.) 9–57 (Pactor, 2015).
22. Drummer, O. H. in *Clarke's analysis of drugs and poison* (eds. Moffat, A., Osselton, M. & Widdop, B.) **1**, 172–187 (Pharmaceutical Press, 2004).
  23. Lopes, S. M. *Índice Nacional Terapêutico*. **136**, (Tupam, 2016).
  24. INFARMED. Pesquisa do medicamento. Available at: <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/servicos-on-line/pesquisa-do-medicamento>. (Accessed: 30th November 2016)
  25. DrugBank. Amlodipine, Hydrochlorothiazide, Indapamide, Lercanidipine, Nifedipine or Telmisartan. Available at: <https://www.drugbank.ca/>. (Accessed: 30th November 2016)
  26. Campbell, D. B., Taylor, A. R., Hopkins, Y. W. & Williams, J. R. B. Pharmacokinetics and metabolism of indapamide: a review. *Curr. Med. Res. Opin.* **5**, 13–24 (1977).
  27. Grebow, P. E. *et al.* Pharmacokinetics and bioavailability of indapamide—a new antihypertensive drug. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **22**, 295–9 (1982).
  28. Mueller, C. A., Baranda González, A. B. & Weinmann, W. Screening for dihydropyridine calcium channel blockers in plasma by automated solid-phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **39**, 639–646 (2004).
  29. Moffat, A., Osselton, M. & Widdop, B. *Clarke's analysis of drugs and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material*. (Pharmaceutical Press, 2004).
  30. Schulz, M. & Schmoldt, A. Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 800 drugs and other xenobiotics. *Pharmazie* **58**, 447–474 (2003).
  31. Gadepalli, S. G., Deme, P., Kuncha, M. & Sistla, R. Simultaneous determination of amlodipine, valsartan and hydrochlorothiazide by LC-ESI-MS/MS and its application to pharmacokinetics in rats. *J. Pharm. Anal.* **4**, 399–406 (2014).
  32. Nirogi, R. V. S., Kandikere, V. N., Mudigonda, K., Shukla, M. & Maurya, S. Sensitive and rapid liquid chromatography/tandem mass spectrometry assay for the quantification of amlodipine in human plasma. *Biomed. Chromatogr.* **20**, 833–842 (2006).
  33. Streel, B., Lainé, C., Zimmer, C., Sibener, R. & Ceccato, A. Enantiomeric determination of amlodipine in human plasma by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J. Biochem. Biophys. Methods* **54**, 357–368 (2002).
  34. Massaroti, P. *et al.* Development and validation of a selective and robust LC-MS/MS method for quantifying amlodipine in human plasma. **382**, 1049–1054 (2005).
  35. Suchanova, B., Sispara, L. & Wsol, V. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry in chiral study of amlodipine biotransformation in rat hepatocytes. *Anal. Chim. Acta* **573–574**, 273–283 (2006).
  36. Sklerov, J. H., Levine, B., Ingwersen, K. M., Aronica-Pollack, P. a & Fowler, D. Two cases of fatal amlodipine overdose. *J. Anal. Toxicol.* **30**, 346–51 (2006).
  37. Stopher, D. A., Beresford, A. P., Macrae, P. V. & Humphrey, M. J. The Metabolism and Pharmacokinetics of Amlodipine in Humans and Animals. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **12**, S55–S59 (1988).
  38. Beresford, A. P., McGibney, D., Humphrey, M. J., Macrae, P. V & Stopher, D. A. Metabolism and kinetics of amlodipine in man. *Xenobiotica*. **18**, 245–254 (1988).
  39. Wang, X.-D. *et al.* Rapid and simultaneous determination of nifedipine and dehydronifedipine in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Application to a clinical herb-drug interaction study. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **852**, 534–544 (2007).
  40. Vojta, J., Jedlička, A., Coufal, P. & Janečková, L. A new, rapid, stability-indicating UPLC method for separation and determination of impurities in amlodipine besylate, valsartan and hydrochlorothiazide in their combined tablet dosage form. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **109**, 36–44 (2015).
  41. Li, X., Shi, F., He, X., Jian, L. & Ding, L. A rapid and sensitive LC-MS/MS method for determination of lercanidipine in human plasma and its application in a bioequivalence study in Chinese healthy volunteers. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **128**, 67–72 (2016).
  42. Wang, D. *et al.* Determination of nifedipine in human plasma by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application in a pharmacokinetic study. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **879**, 1827–1832 (2011).
  43. Sharma, R. N. & Pancholi, S. S. Simple RP-HPLC method for determination of triple drug combination of valsartan, amlodipine and hydrochlorothiazide in human plasma. *Acta Pharm.* **62**, 45–58 (2012).

44. Ravi, V. B., Inamadugu, J. K., Pilli, N. R., Sreenivasulu, V. & Ponneri, V. Simultaneous determination of telmisartan and amlodipine in human plasma by LC-MS/MS and its application in a human pharmacokinetic study. *J. Pharm. Anal.* **2**, 319–326 (2012).
45. Wang, B., Sheng, L. & Li, Y. Simultaneous Determination of Telmisartan and Amlodipine in Dog Plasma by LC-MS-MS. *J. Chromatogr. Sci.* **53**, 1708–1713 (2015).
46. Beermann, B., Groschinsky-Grind, M. & Rosén, A. Absorption, metabolism, and excretion of hydrochlorothiazide. *Clin. Pharmacol. Ther.* **19**, 531–7 (1976).
47. Li, H. *et al.* A liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification of valsartan and hydrochlorothiazide in human plasma. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **852**, 436–442 (2007).
48. Beermann, B. & Groschinsky-Grind, M. Clinical Pharmacokinetics of Diuretics. *Clin. Pharmacokinet.* **5**, 221–245 (1980).
49. Patel, J. R., Pethani, T. M., Vachhani, A. N., Sheth, N. R. & Dudhrejiya, A. V. Development and validation of bioanalytical method for simultaneous estimation of ramipril and hydrochlorothiazide in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **970**, 53–59 (2014).
50. Caruso, F. S., Szabadi, R. & Vukovich, A. Pharmacokinetics indapamide and clinical pharmacology of. *Am. Heart J.* **106**, 212–220 (1983).
51. Jain, D. S., Subbaiah, G., Sanyal, M., Pande, U. C. & Shrivastav, P. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry validated method for the estimation of indapamide in human whole blood. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **834**, 149–154 (2006).
52. Pinto, G. A. *et al.* An improved LC-MS/MS method for quantitation of indapamide in whole blood: Application for a bioequivalence study. *Biomed. Chromatogr.* **28**, 1212–1218 (2014).
53. Nakov, N. *et al.* Development and validation of automated SPE-LC-MS/MS method for determination of indapamide in human whole blood and its application to real study samples. *Biomed. Chromatogr.* **27**, 1540–1546 (2013).
54. Ding, L., Yang, L., Liu, F., Ju, W. & Xiong, N. A sensitive LC-ESI-MS method for the determination of indapamide in human plasma: Method and clinical applications. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **42**, 213–217 (2006).
55. Yan, F., Hu, Y., Di, B., He, P. L. & Sun, G. Effects of some antihypertensive drugs on the metabolism and pharmacokinetics of Indapamide in rats. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **15**, 208–220 (2012).
56. Salem, I. I., Idrees, J., Al Tamimi, J. I. & Farina, P. Selective and rapid liquid chromatography-mass spectrometry method for the determination of lercanidipine in human plasma. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **803**, 201–207 (2004).
57. Chen, K. *et al.* Simultaneous determination of lercanidipine, benazepril and benazeprilat in plasma by LC-MS/MS and its application to a toxicokinetics study. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **899**, 1–7 (2012).
58. Herbette, L. G., Vecchiarelli, M., Sartani, A. & Leonardi, A. Lercanidipine: short plasma half-life, long duration of action and high cholesterol tolerance. Updated molecular model to rationalize its pharmacokinetic properties. *Blood Press Suppl* **2**, 10–17 (1998).
59. Testa, R. *et al.* Lercanidipine (Rec 15/2375): A Novel 1,4-Dihydropyridine Calcium Antagonist for Hypertension. **15**, 187–219 (1997).
60. Gasser, R., Köppel, H. & Kleins, W. Lercanidipine, a new third generation Ca-antagonist in the treatment of hypertension. *J. Clin. Basic Cardiol.* **2**, 169–174 (1999).
61. Barchielli, M. *et al.* Clinical Pharmacokinetics of Lercanidipine. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **29**, S1–S15 (1997).
62. Borghi, C. Lercanidipine in hypertension. *Vasc. Health Risk Manag.* **1**, 173–182 (2005).
63. Pan, X. *et al.* Determination of nifedipine in dog plasma by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *Biomed. Chromatogr.* **28**, 1036–1040 (2014).
64. Filgueira, G. C. de O. *et al.* Analysis of nifedipine in human plasma and amniotic fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application to clinical pharmacokinetics in hypertensive pregnant women. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **993–994**, 20–25 (2015).
65. Guo, Y. *et al.* Determination of nifedipine in human plasma and its use in bioequivalence study. *Int. J. Pharm.* **341**, 91–96 (2007).

66. Rämisch, K. D., Graefe, K. H., Scherling, D., Sommer, J. & Ziegler, R. Pharmacokinetics and Metabolism of Calcium-Blocking Agents Nifedipine, Nitrendipine and Nimodipine. *Am. J. Nephrol* **6**, 73–80 (1986).
67. Renwick, A. *et al.* The pharmacokinetics of oral nifedipine - a population study. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **25**, 701–708 (1988).
68. Kondo, S. *et al.* Identification of nifedipine metabolites and their determination by gas chromatography. *Chem. Pharm. Bull.* **28**, 1–7 (1980).
69. Yan, T. *et al.* Liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for the simultaneous quantitation of telmisartan and hydrochlorothiazide in human plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **48**, 1225–1229 (2008).
70. Salama, I. Simultaneous HPLC–UV analysis of telmisartan and hydrochlorothiazide in human plasma. *Bull. Fac. Pharmacy, Cairo Univ.* **49**, 19–24 (2011).
71. Israili, Z. H. Clinical pharmacokinetics of angiotensin II (AT1) receptor blockers in hypertension. *J. Hum. Hypertens.* **14 Suppl 1**, S73–S86 (2000).
72. Stangier, J. *et al.* Absorption, metabolism, and excretion of intravenously and orally administered [<sup>14</sup>C]telmisartan in healthy volunteers. *JCPH J. Clin. Pharmacol.* **40**, 1312–1322 (2000).
73. Yong, C. L., Dias, V. C. & Stangier, J. Multiple-dose pharmacokinetics of telmisartan and of hydrochlorothiazide following concurrent administration in healthy subjects. *J. Clin. Pharmacol.* **40**, 1323–1330 (2000).
74. Stangier, J., Su, C. & Roth, W. Pharmacokinetics of orally and intravenously administered telmisartan in healthy young and elderly volunteers and in hypertensive patients. *J. Int. Med. Res.* **28**, 149–167 (2000).
75. Stangier, J., Su, C., Schöndorfer, G. & Roth, W. Pharmacokinetics and safety of intravenous and oral telmisartan 20 mg and 120 mg in subjects with hepatic impairment compared with healthy volunteers. *J. Clin. Pharmacol.* **40**, 1355–1364 (2000).
76. Ebner, T. *et al.* Disposition and chemical stability of telmisartan 1- O -acylglucuronide. *Drug Metab. Dispos.* **27**, 1143–1149 (1999).
77. Miura, M. *et al.* Telmisartan pharmacokinetics in Japanese renal transplant recipients. *Clin. Chim. Acta* **399**, 83–87 (2009).
78. Chen, X. *et al.* Simultaneous determination of telmisartan and pitavastatin in rat plasma by UPLC–MS/MS: Application to pharmacokinetic interaction study. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **131**, 373–379 (2016).
79. Benson, S. C. *et al.* Identification of telmisartan as a unique angiotensin II receptor antagonist with selective PPAR $\gamma$ -modulating activity. *Hypertension* **43**, 993–1002 (2004).
80. Sanches, L. R. Avaliação da redistribuição postmortem de opiáceos através de determinação em humor vítreo e sangue cardíaco e periférico humanos. (Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2011).
81. PG-SQTF-C-001. Procedimento geral: manuseamento de amostras. *SQTF-C, INMLCF, I.P.* (2012).
82. Martens, J., Banditt, P. & Meyer, F. P. Determination of nifedipine in human serum by gas chromatography-mass spectrometry: validation of the method and its use in bioavailability studies. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **660**, 297–302 (1994).
83. Patrick, K. S., Jarvi, E. J., Straughn, A. B. & Meyer, M. C. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of plasma nifedipine. *J. Chromatogr.* **495**, 123–130 (1989).
84. Zarghi, A., Foroutan, S. M., Shafaati, A. & Khoddam, A. Validated HPLC method for determination of amlodipine in human plasma and its application to pharmacokinetic studies. *Farmaco* **60**, 789–792 (2005).
85. Zendelovska, D., Stafilov, T. & Milosevski, P. Development of solid-phase extraction method and its application for determination of hydrochlorothiazide in human plasma using HPLC. *Biomed. Chromatogr.* **18**, 71–76 (2004).
86. Zendelovska, D., Stafilov, T. & Stefova, M. Optimization of a solid-phase extraction method for determination of indapamide in biological fluids using high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **788**, 199–206 (2003).
87. Abou-Auda, H. S. *et al.* Liquid chromatographic assay of nifedipine in human plasma and its application to pharmacokinetic studies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **22**, 241–9 (2000).
88. Zendelovska, D. *et al.* Development of an HPLC method for the determination of nifedipine in human plasma by solid-phase extraction. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **839**, 85–88 (2006).
89. Niopas, I. & Daftsios, A. C. Determination of nifedipine in human plasma by solid-phase extraction and

- high-performance liquid chromatography: Validation and application to pharmacokinetic studies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **32**, 1213–1218 (2003).
90. Kasawar, G. & Farooqui, M. Simultaneous determination of amlodipine besylate and benazepril hydrochloride in pharmaceutical dosage form by LC. *Anal. Sci.* **25**, 1–4 (2009).
  91. Naidu, K. R., Kale, U. N. & Shingare, M. S. Stability indicating RP-HPLC method for simultaneous determination of amlodipine and benazepril hydrochloride from their combination drug product. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **39**, 147–155 (2005).
  92. Gumustas, M., Şanlı, S., Şanlı, N. & Ozkan, S. A. Determination of pKa values of some antihypertensive drugs by liquid chromatography and simultaneous assay of lercanidipine and enalapril in their binary mixtures. *Talanta* **82**, 1528–1537 (2010).
  93. Johansen, S. S. & Genner, J. A fatal case of amlodipine poisoning. *J. Clin. Forensic Med.* **10**, 169–172 (2003).
  94. Linnert, K., Lang, L. M. & Johansen, S. S. Postmortem femoral blood concentrations of amlodipine. *J. Anal. Toxicol.* **35**, 227–231 (2011).
  95. Spiller, H. A., Milliner, B. A. & Bosse, G. M. Amlodipine fatality in an infant with postmortem blood levels. *J. Med. Toxicol.* **8**, 179–182 (2012).
  96. Purdue, B. N., Fernando, G. C. & Busuttill, a. Two deaths from intravenous nifedipine abuse. *Int J Leg. Med* **104**, 289–91 (1991).
  97. Yamamoto, H. *et al.* Fatal acute intoxication of accidentally ingested nifedipine in an infant – A case report. *Leg. Med.* **24**, 12–18 (2017).
  98. Kristoffersen, L. *et al.* Simultaneous determination of 6 beta-blockers, 3 calcium-channel antagonists, 4 angiotensin-II antagonists and 1 antiarrhythmic drug in post-mortem whole blood by automated solid phase extraction and liquid chromatography mass spectrometry. Method developm. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **850**, 147–160 (2007).
  99. Rezk, M. R. & Badr, K. A. Development, optimization and validation of a highly sensitive UPLC-ESI-MS/MS method for simultaneous quantification of amlodipine, benazeprile and benazeprilat in human plasma: Application to a bioequivalence study. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **98**, 1–8 (2014).
  100. De Nicolò, A. *et al.* UHPLC-MS/MS method with protein precipitation extraction for the simultaneous quantification of ten antihypertensive drugs in human plasma from resistant hypertensive patients. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **129**, 535–541 (2016).
  101. Albu, F., Georgiță, C., David, V. & Medvedovici, A. Liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry method for determination of indapamide in serum for single/multiple dose bioequivalence studies of sustained release formulations. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **816**, 35–40 (2005).
  102. Chen, W. D. *et al.* Simple, sensitive and rapid LC-MS method for the quantitation of indapamide in human plasma-application to pharmacokinetic studies. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **842**, 58–63 (2006).
  103. Morihisa, H., Fukata, F., Muro, H., Nishimura, K. & Makino, T. Determination of indapamide in human serum using 96-well solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **870**, 126–30 (2008).
  104. Streel, B., Zimmer, C., Sibenaler, R. & Ceccato, a. Simultaneous determination of nifedipine and dehydronifedipine in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* **720**, 119–128 (1998).
  105. Barrionuevo, W. R. & Lanças, F. M. Extração em fase sólida (SPE) e micro extração em fase sólida (SPME) de piretróides em água. *Quim. Nova* **24**, 172–175 (2001).
  106. Jardim, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida : Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. *Sci. Chromatogr.* **2**, 13–25 (2010).
  107. Mariotti, K. de C., Ortiz, R. S. & Limberger, R. P. in *Toxicologia Forense* (eds. Dinis-Oliveira, R. J., Carvalho, F. D. & Bastos, M. de L.) 109–130 (Pactor, 2015).
  108. Berrueta, L., Gallo, B. & Vicente, F. A review of solid phase extraction: basic principles and new developments. *Chromatographia* **40**, 474–483 (1995).
  109. Lanças, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente ‘compatíveis’? *Sci. Chromatogr.* **5**, 27–46 (2009).
  110. Pimenta, D. M. F. Determinação de catecolaminas e dos metabolitos por HPLC com detecção

- eletroquímica. (Instituto Politécnico de Tomar, 2013).
111. Pais, T. A. Drug Profiling: o caso da heroína. (Universidade de Coimbra, 2011).
  112. Silva, P. Determinação de compostos fenólicos por HPLC. (Universidade da Beira Interior, 2012).
  113. de la Torre, C. A. Utilização da cromatografia líquida de alta eficiência na determinação de aminas biogênicas como ferramenta para a avaliação da qualidade carne de aves. (Universidade Federal Fluminense, 2013). doi:10.1007/s13398-014-0173-7.2
  114. Iglesias, A. H. Introdução ao Acoplamento Cromatografia Líquida - Espectrometria de massas. *Waters Technologies* 1–13 Available at: [http://www.cnpsa.embrapa.br/met/images/arquivos/17MET/minicursos/introducao\\_acoplamento\\_cromatografia\\_liquida\\_-\\_espectrometria\\_de\\_massas.pdf](http://www.cnpsa.embrapa.br/met/images/arquivos/17MET/minicursos/introducao_acoplamento_cromatografia_liquida_-_espectrometria_de_massas.pdf). (Accessed: 27th September 2016)
  115. Grebe, S. K. G. & Singh, R. J. LC-MS/MS in the clinical laboratory - Where to from here? *Clin. Biochem. Rev.* **32**, 5–31 (2011).
  116. Chiaradia, M. C., Collins, C. H. & Jardim, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. *Quim. Nova* **31**, 623–636 (2008).
  117. Scientific Working Group for Forensic Toxicology. Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. 1–52 (2013).
  118. PO-SQTF-C-006. Procedimento operacional: Validação de procedimentos de ensaio. *SQTF-C, INMLCF, I.P.* (2012).
  119. Ribani, M., Bottoli, C. B. G., Collins, C. H., Jardim, I. C. S. F. & Melo, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim. Nova* **27**, 771–780 (2004).
  120. Baranda, A. B., Alonso, R. M., Jiménez, R. M. & Weinmann, W. Instability of calcium channel antagonists during sample preparation for LC-MS-MS analysis of serum samples. *Forensic Sci. Int.* **156**, 23–34 (2006).
  121. Ermer, J. Validation in pharmaceutical analysis. Part I: an integrated approach. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **24**, 755–767 (2001).
  122. Relacre. *Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química. Guia Relacre 13* (2000).
  123. Causon, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: viewpoint and discussion. *J. Chromatogr. B* **689**, 175–180 (1997).
  124. International Conference on Harmonisation. Guidance for industry - Q2B validation of analytical procedures: Methodology. (1996).
  125. Almeida, A. M., Castel-Branco, M. M. & Falcão, A. C. Linear regression for calibration lines revisited: Weighting schemes for bioanalytical methods. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **774**, 215–222 (2002).
  126. Jangala, H., Vats, P., Khuroo, A. H. & Monif, T. Development and validation of a LC-MS/MS method for the simultaneous estimation of amlodipine and valsartan in human plasma: application to a bioequivalence study. *Sci. Pharm.* **82**, 585–600 (2014).
  127. Gibbons, J., Pugh, J., Dimopoulos-italiano, G. & Pike, R. A qualitative study of amlodipine and its related compounds by electrospray ionization tandem mass spectrometry. 1715–1723 (2006). doi:10.1002/rcm
  128. Fiori, J., Gotti, R., Bertucci, C. & Cavrini, V. Investigation on the photochemical stability of lercanidipine and its determination in tablets by HPLC-UV and LC-ESI-MS/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41**, 176–181 (2006).
  129. Ezzeldin, E., Abo-Talib, N. F., Tammam, M. H. & Shahat, A. a. Development and validation of LC/MS/MS method for the simultaneous determination of montelukast, gliclazide, and nifedipine and its application to a pharmacokinetic study. *Chem. Cent. J.* **8**, 17 (2014).
  130. Kallem, R. R., Inamadugu, J. K., Ramesh, M. & Seshagirirao, J. V. L. N. Sensitive LC-MS/MS-ESI method for simultaneous determination of nifedipine and atenolol in human plasma and its application to a human pharmacokinetic study. *Biomed. Chromatogr.* **27**, 349–355 (2013).
  131. RV-SQTF-N-606. Relatório de validação: Confirmação qualitativa e quantificação de benzodiazepinas por LC-MS/MS (UPLC-TQD). *SQTF-N, INMLCF, I.P.* (2013).

# Apêndice

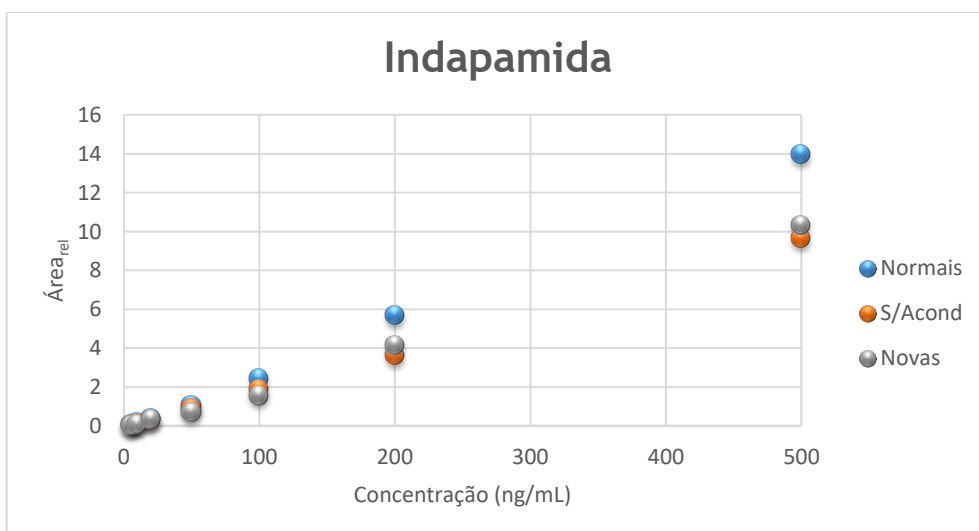
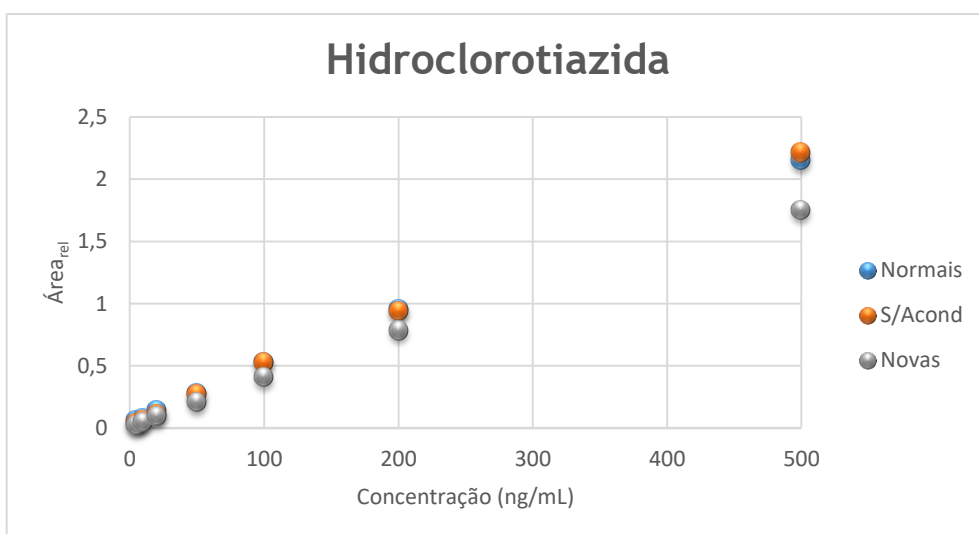
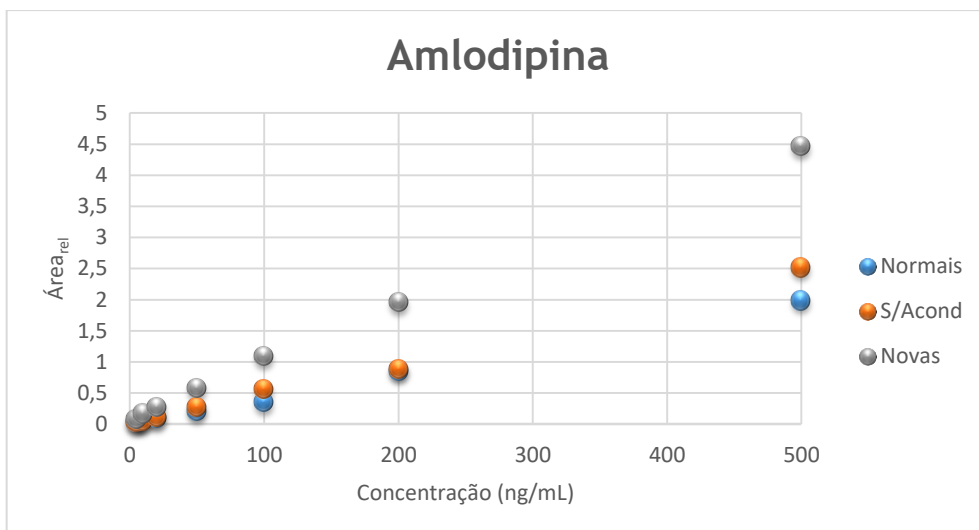
- A. Comparação de colunas de extração
- B. Especificidade/Seletividade
- C. Linearidade e modelo de calibração
- D. Efeito matriz
- E. Eficiência da extração
- F. Limiares analíticos
- G. Repetibilidade
- H. Precisão intermédia
- I. Exatidão





## A. Comparação de colunas de extração





**Figura A.1.** Áreas relativas em função da concentração do calibrador para a amlodipina, a hidroclorotiazida e a indapamida.

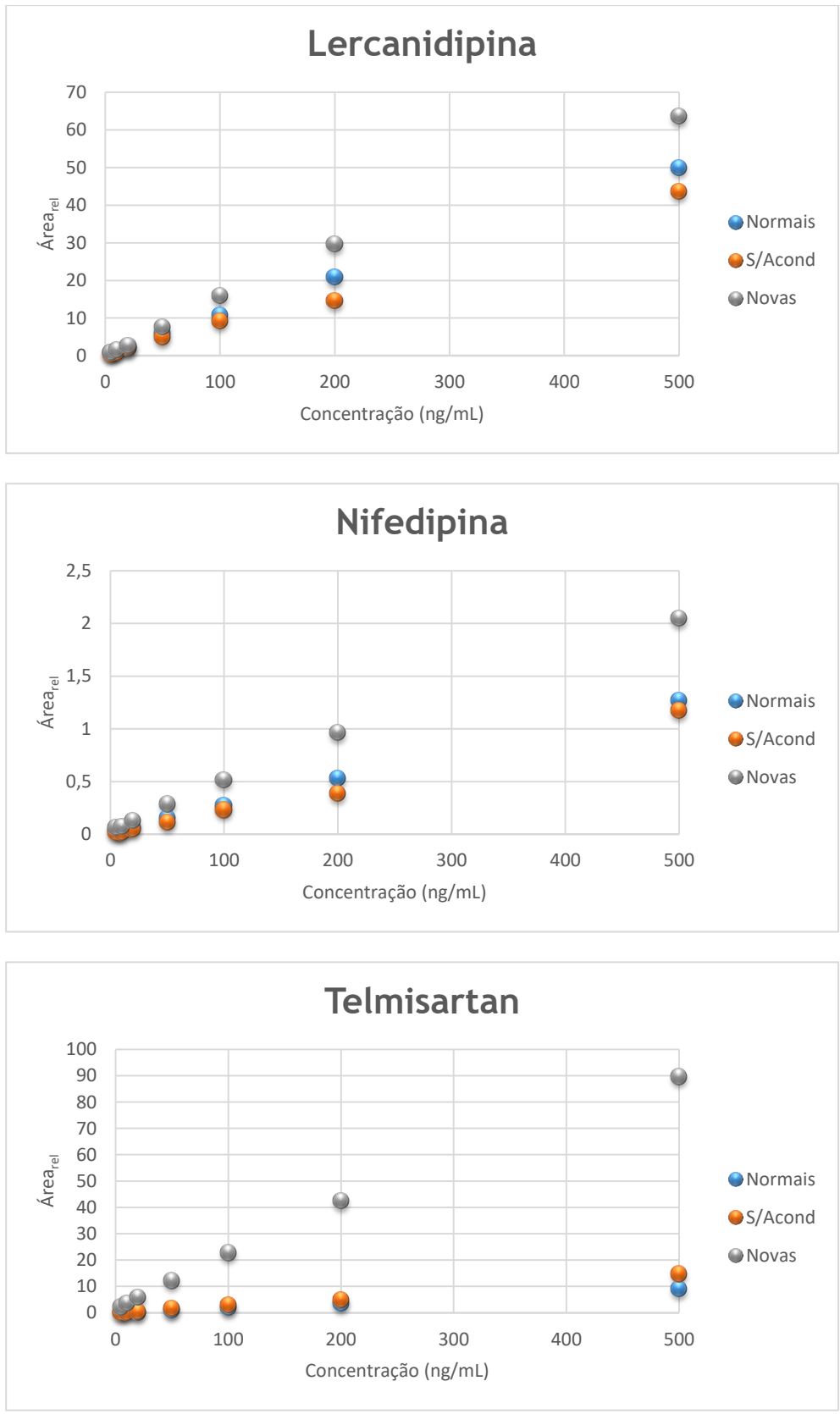


Figura A.2. Áreas relativas em função da concentração do calibrador para a lercanidipina, a nifedipina e o telmisartan.

## B. Especificidade/Seletividade



**Tabela B1.** Resultados obtidos na avaliação dos critérios de positividade para os seis AHTs. Tempos de retenção (TR), tempos de retenção relativos (TRR), diferença relativa de TRR ( $\Delta$ TRR), áreas obtidas para cada uma das transições estudadas e áreas relativas para cada uma das substâncias e cada amostra de sangue com fortificação analisada, bem como os critérios de aceitação de resultados utilizados. O controle foi a amostra com o código POOL06. A vermelho estão assinaladas as amostras que não cumprem os critérios estabelecidos.

Substância		Código das amostras de sangue										Tolerância
		POOL01	POOL02	POOL03	POOL04	POOL05	POOL06	POOL07	POOL08	POOL09	SV119	
Amlodipina	Tr	3,28	3,29	3,27	3,28	3,27	3,28	3,27	3,28	3,27	3,28	< 2% ou 0,1 min 1%
	TRR	2,645	2,632	2,637	2,645	2,616	2,645	2,637	2,645	2,659	2,624	
	$\Delta$ TRR	0,000	-0,005	-0,003	0,000	-0,011	-	-0,003	0,000	0,005	-0,008	
	A <sub>238</sub>	1074	2727	952	1072	586	1363	1198	1281	845	2033	85,5 - 105,5
	A <sub>294</sub>	1058	2693	931	1055	583	1302	1135	1276	781	1930	
	Arel	98,5	98,7	97,8	98,4	99,5	95,5	94,8	99,6	92,5	94,9	
Hidroclorotiazida	Tr	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	< 2% ou 0,1 min 1%
	TRR	0,718	0,712	0,718	0,718	0,712	0,718	0,718	0,718	0,724	0,712	
	$\Delta$ TRR	0,000	-0,008	0,000	0,000	-0,008	-	0,000	0,000	0,008	-0,008	
	A <sub>269</sub>	3353	2630	3858	5520	4988	5547	5748	2837	4011	3107	65,7 - 85,7
	A <sub>205</sub>	2638	2083	2872	4184	3980	4197	4616	2268	3066	2429	
Arel	78,7	79,2	74,4	75,8	79,8	75,7	80,3	80,0	76,5	78,2		
Indapamida	Tr	3,69	3,7	3,69	3,69	3,7	3,69	3,69	3,69	3,69	3,69	< 2% ou 0,1 min 1%
	TRR	2,976	2,960	2,976	2,976	2,960	2,976	2,976	2,976	3,000	2,952	
	$\Delta$ TRR	0,000	-0,005	0,000	0,000	-0,005	-	0,000	0,000	0,008	-0,008	
	A <sub>132,1</sub>	4758	1156	5384	5477	6079	5934	9251	6861	6229	7113	32,1 - 48,1
	A <sub>91</sub>	1775	2816	2253	2309	2485	2378	3195	2631	2405	2714	
	Arel	37,3	-	41,9	42,1	40,9	40,1	34,5	38,3	38,6	38,2	
Lercanidipina	Tr	5,14	5,16	5,14	5,14	5,13	5,14	5,14	5,14	5,14	5,14	< 2% ou 0,1 min 1%
	TRR	4,145	4,128	4,145	4,145	4,104	4,145	4,145	4,145	4,179	4,112	
	$\Delta$ TRR	0,000	-0,004	0,000	0,000	-0,010	-	0,000	0,000	0,008	-0,008	
	A <sub>280</sub>	36929	51144	23373	52756	113712	119368	169866	129170	76125	195721	27,9 - 41,8
	A <sub>315</sub>	12952	17844	8102	18011	38823	41560	58798	44123	26608	68025	
	Arel	35,1	34,9	34,7	34,1	34,1	34,8	34,6	34,2	35,0	34,8	
Nifedipina	Tr	4,84	4,84	4,84	4,84	4,84	4,84	4,84	4,84	4,84	4,84	< 2% ou 0,1 min 1%
	TRR	3,903	3,872	3,903	3,903	3,872	3,903	3,903	3,903	3,935	3,872	
	$\Delta$ TRR	0,000	-0,008	0,000	0,000	-0,008	-	0,000	0,000	0,008	-0,008	
	A <sub>315</sub>	10238	9108	10378	10455	12483	13716	16490	12950	12972	10766	17,3 - 27,3
	A <sub>254</sub>	2190	2209	2326	2386	2821	3058	3794	2920	2813	2429	
	Arel	21,4	24,3	22,4	22,8	22,6	22,3	23,0	22,5	21,7	22,6	
Telmisartan	Tr	3,62	3,63	3,62	3,62	3,62	3,62	3,62	3,62	3,62	3,63	< 2% ou 0,1 min 1%
	TRR	2,919	2,904	2,919	2,919	2,896	2,919	2,919	2,919	2,943	2,904	
	$\Delta$ TRR	0,000	-0,005	0,000	0,000	-0,008	-	0,000	0,000	0,008	-0,005	
	A <sub>276,3</sub>	8496	3340	4149	5988	4218	9706	14812	14427	5428	7046	34,2 - 51,3
	A <sub>497,1</sub>	3941	1607	1843	2730	1867	4146	7562	6717	2217	3252	
	Arel	46,4	48,1	44,4	45,6	44,3	42,7	51,1	46,6	40,8	46,2	
Zolpidem-d6	Tr	1,24	1,25	1,24	1,24	1,25	1,24	1,24	1,24	1,23	1,25	
	TRR	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	
	A <sub>235,3</sub>	324152	346513	317845	348627	338610	372011	352388	352311	365813	362406	





## C. Linearidade e modelo de calibração



C1. Avaliação da homocedasticidade das variâncias.

Amlodipina				
5 ng/mL		500 ng/mL		$F_{exp} (S_2^2/S_1^2)$
Conc. (ng/mL)	Variância ( $S_1^2$ )	Conc. (ng/mL)	Variância ( $S_2^2$ )	
3,99	0,45	524,92	177,38	394,18
5,34		517,26		
4,59		490,52		
4,07		513,65		
5,39		519,62		

Eq:  $y=0,0001x+0,0000301$

Arel (5 ng/mL)	Arel (500 ng/mL)
0,0007	0,0526
0,0008	0,0519
0,0008	0,0492
0,0007	0,0515
0,0008	0,0521

Hidroclorotiazida				
5 ng/mL		500 ng/mL		$F_{exp} (S_2^2/S_1^2)$
Conc. (ng/mL)	Variância ( $S_1^2$ )	Conc. (ng/mL)	Variância ( $S_2^2$ )	
-2,83	0,15	529,76	27,51	187,65
-2,39		518,34		
-2,93		528,43		
-3,05		521,62		
-3,45		529,62		

Eq:  $y=0,000064x+0,000613$

Arel (5 ng/mL)	Arel (500 ng/mL)
0,0004	0,0346
0,0005	0,0338
0,0004	0,0345
0,0004	0,0340
0,0004	0,0346

Indapamida				
5 ng/mL		500 ng/mL		$F_{exp} (S_2^2/S_1^2)$
Conc. (ng/mL)	Variância ( $S_1^2$ )	Conc. (ng/mL)	Variância ( $S_2^2$ )	
5,51	0,05	509,86	43,66	714,57
5,92		527,50		
5,47		519,67		
5,41		523,89		
5,77		521,05		

Eq:  $y=0,000426x+0,000128$

Arel (5 ng/mL)	Arel (500 ng/mL)
0,0025	0,2173
0,0026	0,2248
0,0025	0,2215
0,0024	0,2233
0,0026	0,2220

Lercanidipina				
5 ng/mL		500 ng/mL		$F_{exp} (S_2^2/S_1^2)$
Conc. (ng/mL)	Variância ( $S_1^2$ )	Conc. (ng/mL)	Variância ( $S_2^2$ )	
3,34	0,13	540,72	105,18	808,00
2,95		535,59		
2,44		513,97		
2,95		532,27		
3,29		526,45		

Eq:  $y=0,008009x+0,035788$

Arel (5 ng/mL)	Arel (500 ng/mL)
0,0625	4,3664
0,0594	4,3252
0,0553	4,1521
0,0594	4,2987
0,0621	4,2521

Nifedipina				
5 ng/mL		500 ng/mL		$F_{exp} (S_2^2/S_1^2)$
Conc. (ng/mL)	Variância ( $S_1^2$ )	Conc. (ng/mL)	Variância ( $S_2^2$ )	
1,42	0,09	520,25	70,59	758,16
1,77		534,20		
1,25		514,10		
0,94		527,90		
1,20		516,13		

Eq:  $y=0,000466x+0,004037$

Arel (5 ng/mL)	Arel (500 ng/mL)
0,0047	0,2467
0,0049	0,2532
0,0046	0,2438
0,0045	0,2502
0,0046	0,2447

C1 (continuação). Avaliação da homocedasticidade das variâncias.

Telmisartan				
5 ng/mL		500 ng/mL		$F_{exp} (S_2^2/S_1^2)$
Conc. (ng/mL)	Variância ( $S_1^2$ )	Conc. (ng/mL)	Variância ( $S_2^2$ )	
6,46	0,01	520,55	13,61	1074,35
6,55		518,32		
6,39		516,56		
6,61		518,50		
6,67		510,87		

Eq:  $y=0,000734x-0,00111$

Arel (5 ng/mL)	Arel (500 ng/mL)
0,0036	0,3808
0,0037	0,3791
0,0036	0,3778
0,0037	0,3793
0,0038	0,3737

C2. Estudo dos fatores de ponderação para a amlodipina e a hidroclorotiazida.

Amlodipina							
Data		13.03.17	14.03.17	15.03.17	16.03.17	17.03.17	Média $\Sigma$ res (%)
$\Sigma$ res (%)	w = 1/x	70,03	53,61	36,71	30,34	86,37	55,41
	w = 1/x <sup>2</sup>	<b>55,35</b>	<b>38,72</b>	<b>34,85</b>	<b>29,45</b>	<b>62,44</b>	44,16
	w = 1/x <sup>1/2</sup>	74,13	60,60	43,39	30,29	123,84	66,45
	w = 1/y	73,21	54,69	36,65	30,26	88,69	56,70
	w = 1/y <sup>2</sup>	60,90	39,04	35,69	29,50	63,34	45,69
	w = 1/y <sup>1/2</sup>	74,16	59,40	44,68	30,03	129,41	67,54
Data		13.03.17	14.03.17	15.03.17	16.03.17	17.03.17	Média r <sup>2</sup>
r <sup>2</sup>	w = 1/x	0,99212	0,99509	0,99665	0,99870	0,99423	0,99536
	w = 1/x <sup>2</sup>	0,98547	0,98991	0,99480	0,99578	0,98236	0,98966
	w = 1/x <sup>1/2</sup>	<b>0,99430</b>	<b>0,99680</b>	<b>0,99715</b>	<b>0,99920</b>	0,99708	0,99690
	w = 1/y	0,99184	0,99523	0,99645	0,99869	0,99499	0,99544
	w = 1/y <sup>2</sup>	0,98485	0,99036	0,99476	0,99615	0,98564	0,99035
	w = 1/y <sup>1/2</sup>	0,99406	0,99676	0,99703	0,99919	<b>0,99726</b>	0,99686
Normalização		$\Sigma$ res	(1-r <sup>2</sup> )	Soma			
Fatores	w = 1/x	-0,06	-0,39	<b>-0,45</b>			
	w = 1/x <sup>2</sup>	-1,20	1,37	0,17			
	w = 1/x <sup>1/2</sup>	1,06	-0,87	0,19			
	w = 1/y	0,07	-0,41	-0,34			
	w = 1/y <sup>2</sup>	-1,04	1,16	0,11			
	w = 1/y <sup>1/2</sup>	1,17	-0,85	0,32			

Hidroclorotiazida							
Data		13.03.17	14.03.17	15.03.17	16.03.17	17.03.17	Média $\Sigma$ res (%)
$\Sigma$ res (%)	w = 1/x	76,86	102,94	68,39	100,71	88,60	87,50
	w = 1/x <sup>2</sup>	<b>45,69</b>	<b>53,49</b>	<b>48,16</b>	<b>67,65</b>	<b>61,83</b>	55,36
	w = 1/x <sup>1/2</sup>	118,77	160,35	112,78	120,28	107,29	123,89
	w = 1/y	82,74	116,45	70,28	104,71	90,56	92,95
	w = 1/y <sup>2</sup>	47,88	59,39	51,17	74,55	64,49	59,50
	w = 1/y <sup>1/2</sup>	124,31	172,58	117,02	129,44	111,99	131,07
Data		13.03.17	14.03.17	15.03.17	16.03.17	17.03.17	Média r <sup>2</sup>
r <sup>2</sup>	w = 1/x	0,99587	0,99285	0,99541	0,99186	0,99567	0,99433
	w = 1/x <sup>2</sup>	0,98614	0,97957	0,99089	0,97490	0,98126	0,98255
	w = 1/x <sup>1/2</sup>	0,99781	0,99611	0,99751	0,99390	0,99775	0,99662
	w = 1/y	0,99645	0,99409	0,99586	0,99260	0,99615	0,99503
	w = 1/y <sup>2</sup>	0,98951	0,98510	0,99115	0,98277	0,98604	0,98691
	w = 1/y <sup>1/2</sup>	<b>0,99793</b>	<b>0,99640</b>	<b>0,99765</b>	<b>0,99413</b>	<b>0,99785</b>	0,99679
Normalização		$\Sigma$ res	(1-r <sup>2</sup> )	Soma			
Fatores	w = 1/x	-0,13	-0,39	<b>-0,52</b>			
	w = 1/x <sup>2</sup>	-1,15	1,61	0,45			
	w = 1/x <sup>1/2</sup>	1,02	-0,78	0,25			
	w = 1/y	0,04	-0,51	-0,47			
	w = 1/y <sup>2</sup>	-1,02	0,87	-0,15			
	w = 1/y <sup>1/2</sup>	1,25	-0,81	0,44			

C3. Estudo dos fatores de ponderação para a indapamida e a lercanidipina.

Indapamida							
Data		13.03.17	14.03.17	15.03.17	16.03.17	17.03.17	Média $\Sigma$ res (%)
$\Sigma$ res (%)	w = 1/x	23,52	<b>32,78</b>	36,29	53,05	<b>35,82</b>	36,29
	w = 1/x <sup>2</sup>	<b>23,28</b>	32,98	23,60	<b>50,95</b>	36,83	33,53
	w = 1/x <sup>1/2</sup>	24,35	34,27	70,49	59,57	48,83	47,50
	w = 1/y	24,00	33,57	37,52	54,38	36,46	37,19
	w = 1/y <sup>2</sup>	24,03	34,39	<b>23,33</b>	53,01	37,85	34,52
	w = 1/y <sup>1/2</sup>	24,66	34,90	71,77	60,61	48,28	48,05
Data		13.03.17	14.03.17	15.03.17	16.03.17	17.03.17	Média r <sup>2</sup>
r <sup>2</sup>	w = 1/x	0,99964	0,99901	0,99807	0,99763	0,99832	0,99853
	w = 1/x <sup>2</sup>	0,99683	0,99472	0,99654	0,98856	0,99437	0,99420
	w = 1/x <sup>1/2</sup>	0,99984	<b>0,99941</b>	0,99886	<b>0,99895</b>	0,99885	0,99918
	w = 1/y	0,99965	0,99902	0,99821	0,99746	0,99835	0,99854
	w = 1/y <sup>2</sup>	0,99694	0,99482	0,99674	0,98802	0,99441	0,99419
	w = 1/y <sup>1/2</sup>	<b>0,99984</b>	0,99940	<b>0,99890</b>	0,99891	<b>0,99886</b>	0,99918
Normalização		$\Sigma$ res	(1-r <sup>2</sup> )	Soma			
Fatores	w = 1/x	-0,49	-0,51	-1,00			
	w = 1/x <sup>2</sup>	-0,92	1,28	0,36			
	w = 1/x <sup>1/2</sup>	1,22	-0,77	0,45			
	w = 1/y	-0,36	-0,51	-0,86			
	w = 1/y <sup>2</sup>	-0,76	1,29	0,52			
	w = 1/y <sup>1/2</sup>	1,31	-0,77	0,53			

Lercanidipina							
Data		13.03.17	14.03.17	15.03.17	16.03.17	17.03.17	Média $\Sigma$ res (%)
$\Sigma$ res (%)	w = 1/x	47,55	63,38	57,00	78,69	43,47	58,02
	w = 1/x <sup>2</sup>	<b>41,34</b>	<b>62,15</b>	51,23	<b>55,13</b>	<b>35,22</b>	49,01
	w = 1/x <sup>1/2</sup>	69,30	71,21	78,81	99,39	93,56	82,45
	w = 1/y	49,35	70,02	57,79	83,17	46,03	61,27
	w = 1/y <sup>2</sup>	41,77	71,36	<b>50,92</b>	60,98	36,09	52,22
	w = 1/y <sup>1/2</sup>	70,15	77,45	81,85	100,41	97,18	85,41
Data		13.03.17	14.03.17	15.03.17	16.03.17	17.03.17	Média r <sup>2</sup>
r <sup>2</sup>	w = 1/x	0,99626	0,99244	0,99610	0,99395	0,99535	0,99482
	w = 1/x <sup>2</sup>	0,99181	0,98014	0,98850	0,98439	0,99485	0,98794
	w = 1/x <sup>1/2</sup>	0,99785	<b>0,99470</b>	0,99796	<b>0,99637</b>	0,99600	0,99658
	w = 1/y	0,99651	0,99196	0,99644	0,99429	0,99545	0,99493
	w = 1/y <sup>2</sup>	0,99219	0,97845	0,98901	0,98529	0,99480	0,98795
	w = 1/y <sup>1/2</sup>	<b>0,99790</b>	0,99442	<b>0,99806</b>	0,99635	<b>0,99611</b>	0,99657
Normalização		$\Sigma$ res	(1-r <sup>2</sup> )	Soma			
Fatores	w = 1/x	-0,43	-0,41	-0,85			
	w = 1/x <sup>2</sup>	-1,01	1,27	0,26			
	w = 1/x <sup>1/2</sup>	1,14	-0,84	0,30			
	w = 1/y	-0,22	-0,44	-0,66			
	w = 1/y <sup>2</sup>	-0,81	1,27	0,46			
	w = 1/y <sup>1/2</sup>	1,33	-0,84	0,49			

C4. Estudo dos fatores de ponderação para a nifedipina e o telmisartan.

Nifedipina							
Data		13.03.17	14.03.17	15.03.17	16.03.17	17.03.17	Média $\Sigma$ res (%)
$\Sigma$ res (%)	w = 1/x	73,69	34,35	33,19	63,51	42,02	49,35
	w = 1/x <sup>2</sup>	<b>56,50</b>	<b>27,84</b>	<b>20,70</b>	35,31	<b>31,90</b>	34,45
	w = 1/x <sup>1/2</sup>	97,68	39,57	68,48	96,13	60,12	72,39
	w = 1/y	75,65	35,11	38,46	64,26	42,81	51,26
	w = 1/y <sup>2</sup>	58,82	29,35	21,95	<b>35,02</b>	33,39	35,71
	w = 1/y <sup>1/2</sup>	102,79	40,55	74,84	97,08	62,28	75,51
Data		13.03.17	14.03.17	15.03.17	16.03.17	17.03.17	Média r <sup>2</sup>
r <sup>2</sup>	w = 1/x	0,99684	0,99877	0,99808	0,99734	0,99871	0,99795
	w = 1/x <sup>2</sup>	0,98710	0,99656	0,99797	0,99096	0,99593	0,99370
	w = 1/x <sup>1/2</sup>	0,99869	0,99931	0,99855	0,99861	0,99940	0,99891
	w = 1/y	0,99734	0,99884	0,99814	0,99760	0,99882	0,99815
	w = 1/y <sup>2</sup>	0,98988	0,99681	0,99785	0,99268	0,99637	0,99472
	w = 1/y <sup>1/2</sup>	<b>0,99879</b>	<b>0,99932</b>	<b>0,99858</b>	<b>0,99866</b>	<b>0,99943</b>	0,99895
Normalização		$\Sigma$ res	(1-r <sup>2</sup> )	Soma			
Fatores	w = 1/x	-0,21	-0,39	<b>-0,60</b>			
	w = 1/x <sup>2</sup>	-1,06	1,48	0,42			
	w = 1/x <sup>1/2</sup>	1,10	-0,81	0,28			
	w = 1/y	-0,11	-0,48	-0,58			
	w = 1/y <sup>2</sup>	-0,99	1,03	0,04			
	w = 1/y <sup>1/2</sup>	1,28	-0,83	0,44			

Telmisartan							
Data		13.03.17	14.03.17	15.03.17	16.03.17	17.03.17	Média $\Sigma$ res (%)
$\Sigma$ res (%)	w = 1/x	<b>83,39</b>	81,89	40,29	98,60	114,97	83,83
	w = 1/x <sup>2</sup>	85,02	<b>75,76</b>	35,27	<b>66,90</b>	<b>88,97</b>	70,39
	w = 1/x <sup>1/2</sup>	85,35	99,04	59,96	152,44	122,13	103,78
	w = 1/y	86,77	96,00	43,02	100,42	129,49	91,14
	w = 1/y <sup>2</sup>	93,00	96,93	<b>34,66</b>	72,14	100,91	79,53
	w = 1/y <sup>1/2</sup>	90,14	108,20	64,25	155,59	123,42	108,32
Data		13.03.17	14.03.17	15.03.17	16.03.17	17.03.17	Média r <sup>2</sup>
r <sup>2</sup>	w = 1/x	0,99211	0,99279	0,99668	0,99292	0,99224	0,9933
	w = 1/x <sup>2</sup>	0,96941	0,96791	0,99388	0,97642	0,96467	0,9745
	w = 1/x <sup>1/2</sup>	<b>0,99499</b>	<b>0,99562</b>	<b>0,99758</b>	0,99594	0,99604	0,9960
	w = 1/y	0,99136	0,99164	0,99659	0,99353	0,99333	0,9933
	w = 1/y <sup>2</sup>	0,96055	0,95024	0,99420	0,97891	0,97677	0,9721
	w = 1/y <sup>1/2</sup>	0,99477	0,99536	0,99751	<b>0,99611</b>	<b>0,99606</b>	0,9960
Normalização		$\Sigma$ res	(1-r <sup>2</sup> )	Soma			
Fatores	w = 1/x	-0,39	-0,52	<b>-0,91</b>			
	w = 1/x <sup>2</sup>	-1,31	1,18	-0,14			
	w = 1/x <sup>1/2</sup>	0,98	-0,76	0,22			
	w = 1/y	0,11	-0,52	-0,40			
	w = 1/y <sup>2</sup>	-0,69	1,39	0,70			
	w = 1/y <sup>1/2</sup>	1,29	-0,76	0,54			

## C5. Linearidade da Amlodipina

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel
5	290	291951	0,001
10	477	314329	0,002
15	989	299087	0,003
20	832	345089	0,002
50	3695	362462	0,010
80	5655	305777	0,018
100	6171	301179	0,020
150	8275	289965	0,029
200	10584	302250	0,035
260	14370	303308	0,047
300	17022	298180	0,057
360	21273	301548	0,071
400	18250	295123	0,062
460	25596	287245	0,089
500	23557	245027	0,096

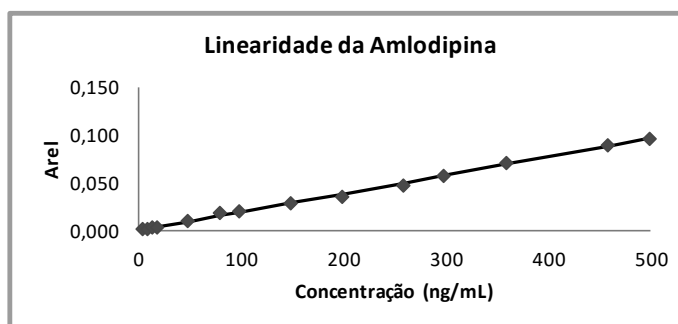
Conc. (ng/mL)	Arel
5	0,001
10	0,002
15	0,003
20	0,002
50	0,010
80	0,018
100	0,020
150	0,029
200	0,035
260	0,047
300	0,057
360	0,071
460	0,089
500	0,096

Desprezando o ponto de calibração a 400 ng/mL

s - substância; PI - padrão interno

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

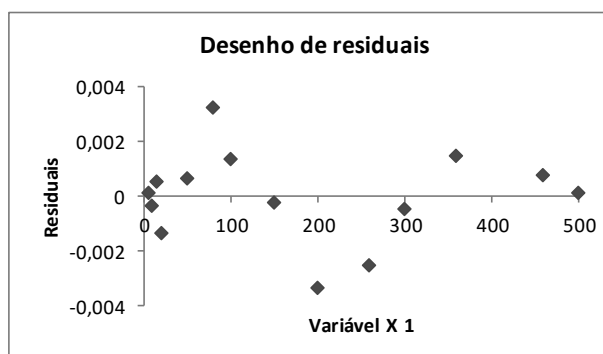
Estatística de regressão	
R	0,997660803
Quadrado de R	0,995327078
Erro-padrão	0,001711494
Observações	14



	Coefficientes	Erro-padrão	95% inferior	95% superior
Ordenada na origem	0,000903223	0,000596008	-0,000384373	0,00219082
Declive	0,000176275	9,44762E-06	0,000155865	0,000196686

### RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,000880095	0,000113818
2	0,001840952	-0,000324587
3	0,002801808	0,000506573
4	0,003762665	-0,001352963
5	0,009527803	0,000666975
6	0,015292941	0,003200201
7	0,019136367	0,001354136
8	0,028744931	-0,000205608
9	0,038353495	-0,003337652
10	0,049883771	-0,002505208
11	0,057570622	-0,000485647
12	0,069100899	0,001445593
13	0,088318027	0,00078945
14	0,096004878	0,000134919





## C6. Linearidade da Hidroclorotiazida

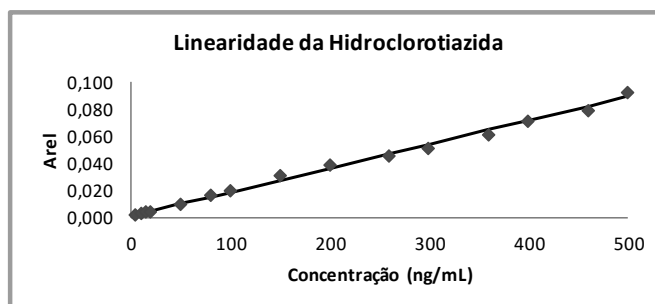
Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel
5	393	291951	0,001
10	791	314329	0,003
15	1347	299087	0,005
20	1521	345089	0,004
50	3526	362462	0,010
80	5012	305777	0,016
100	6031	301179	0,020
150	9037	289965	0,031
200	11542	302250	0,038
260	13708	303308	0,045
300	15164	298180	0,051
360	18489	301548	0,061
400	20800	295123	0,070
460	22631	287245	0,079
500	22445	245027	0,092

Conc. (ng/mL)	Arel
5	0,001
10	0,003
15	0,005
20	0,004
50	0,010
80	0,016
100	0,020
150	0,031
200	0,038
260	0,045
300	0,051
360	0,061
400	0,070
460	0,079
500	0,092

Considerando um modelo de regressão linear ponderada

$w=1/x$

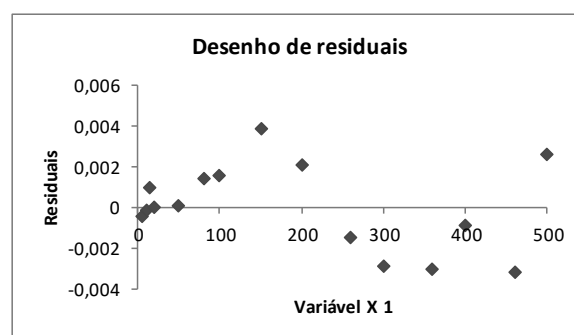
Estatística de regressão	
R	0,997595134
Quadrado de R	0,995196051
Erro-padrão	0,002182873
Observações	15



	Coefficientes	Erro-padrão	95% inferior	95% superior
Ordenada na origem	-8,07609E-05	0,000486231	-0,001140168	0,000978646
Declive	0,000192171	7,99696E-06	0,000174747	0,000209595

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,0017846	-0,000438689
2	0,002665977	-0,00014812
3	0,003547354	0,000957149
4	0,004428731	-2,10473E-05
5	0,009716992	1,1168E-05
6	0,015005254	0,001386608
7	0,018530761	0,001494254
8	0,02734453	0,003822649
9	0,036158299	0,002027041
10	0,046734821	-0,001539392
11	0,053785836	-0,002930941
12	0,064362359	-0,003047023
13	0,071413374	-0,000934199
14	0,081989896	-0,003201947
15	0,089040911	0,002562489



## C7. Linearidade da Indapamida

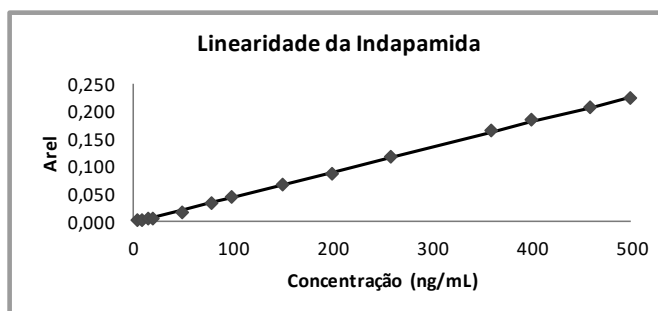
Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel
5	597	291951	0,002
10	1263	314329	0,004
15	2030	299087	0,007
20	2422	345089	0,007
50	6640	362462	0,018
80	10297	305777	0,034
100	13216	301179	0,044
150	19303	289965	0,067
200	26122	302250	0,086
260	35531	303308	0,117
300	37079	298180	0,124
360	50342	301548	0,167
400	54772	295123	0,186
460	60058	287245	0,209
500	54997	245027	0,224

Conc. (ng/mL)	Arel
5	0,002
10	0,004
15	0,007
20	0,007
50	0,018
80	0,034
100	0,044
150	0,067
200	0,086
260	0,117
360	0,167
400	0,186
460	0,209
500	0,224

Desprezando o ponto de calibração a 300 ng/mL

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

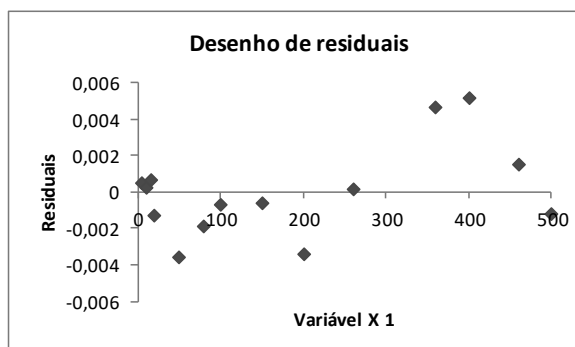
Estatística de regressão	
R	0,999251469
Quadrado de R	0,998503499
Erro-padrão	0,002642781
Observações	14



	Coefficientes	Erro-padrão	95% inferior	95% superior
Ordenada na origem	-0,000704786	0,000749025	-0,002336772	0,0009272
Declive	0,000452807	1,20704E-05	0,000426508	0,000479106

### RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,00155925	0,000485641
2	0,003823287	0,00019596
3	0,006087323	0,000699025
4	0,008351359	-0,001331487
5	0,021935577	-0,003616634
6	0,035519794	-0,001843659
7	0,044575939	-0,000695406
8	0,067216301	-0,000645104
9	0,089856664	-0,003433091
10	0,117025098	0,000119645
11	0,162305823	0,004640768
12	0,180418113	0,005173594
13	0,207586548	0,001496909
14	0,225698838	-0,001246161



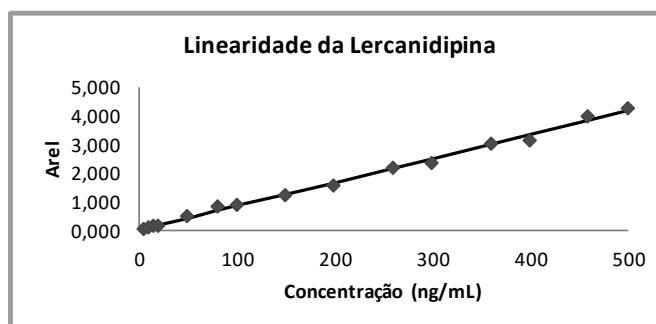
### C8. Linearidade da Lercanidipina

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel
5	17123	291951	0,059
10	28521	314329	0,091
15	45231	299087	0,151
20	47966	345089	0,139
50	180682	362462	0,498
80	257460	305777	0,842
100	268394	301179	0,891
150	359900	289965	1,241
200	475031	302250	1,572
260	657040	303308	2,166
300	697291	298180	2,338
360	909124	301548	3,015
400	920222	295123	3,118
460	1143273	287245	3,980
500	1039838	245027	4,244

Conc. (ng/mL)	Arel
5	0,059
10	0,091
15	0,151
20	0,139
50	0,498
80	0,842
100	0,891
150	1,241
200	1,572
260	2,166
300	2,338
360	3,015
400	3,118
460	3,980
500	4,244

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

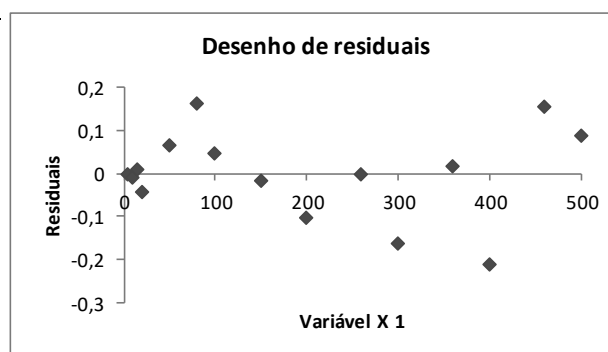
Estatística de regressão	
R	0,997406351
Quadrado de R	0,994819428
Erro-padrão	0,106759503
Observações	15



	Coefficientes	Erro-padrão	95% inferior	95% superior
Ordenada na origem	0,017841594	0,029149422	-0,045131904	0,080815093
Declive	0,008274238	0,000462062	0,007276013	0,009272463

#### RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,059212784	-0,00056258
2	0,100583973	-0,009849281
3	0,141955162	0,00927633
4	0,183326352	-0,044331102
5	0,431553488	0,066931439
6	0,679780624	0,162205347
7	0,845265382	0,045881811
8	1,258977276	-0,017793455
9	1,67268917	-0,101037982
10	2,169143443	-0,002894066
11	2,500112958	-0,161624392
12	2,996567231	0,018291533
13	3,327536746	-0,209444018
14	3,823991019	0,156140495
15	4,154960534	0,088809922



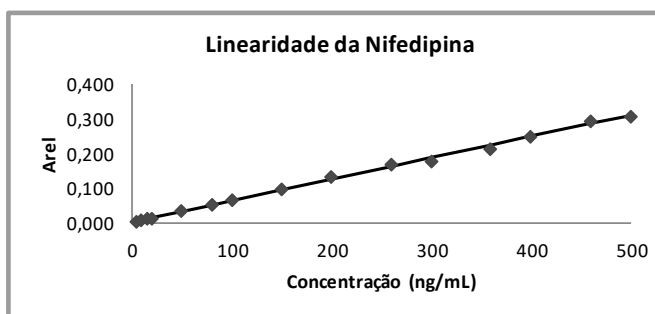
## C9. Linearidade da Nifedipina

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel
5	1622	291951	0,006
10	2508	314329	0,008
15	3479	299087	0,012
20	4724	345089	0,014
50	12467	362462	0,034
80	15787	305777	0,052
100	19447	301179	0,065
150	28216	289965	0,097
200	40785	302250	0,135
260	51089	303308	0,168
300	53255	298180	0,179
360	64807	301548	0,215
400	73049	295123	0,248
460	84309	287245	0,294
500	74689	245027	0,305

Conc. (ng/mL)	Arel
5	0,006
10	0,008
15	0,012
20	0,014
50	0,034
80	0,052
100	0,065
150	0,097
200	0,135
260	0,168
300	0,179
360	0,215
400	0,248
460	0,294
500	0,305

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

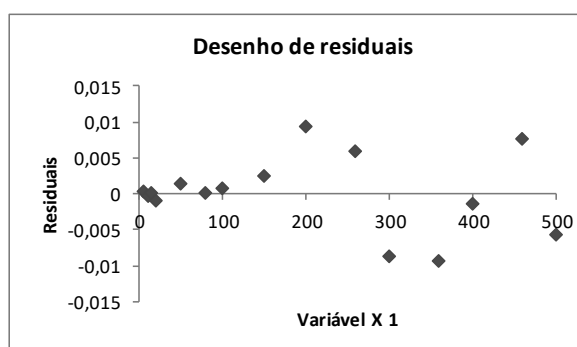
Estatística de regressão	
R	0,99924498
Quadrado de R	0,998490529
Erro-padrão	0,005454647
Observações	15



	Coefficientes	Erro-padrão	95% inferior	95% superior
Ordenada na origem	0,002310283	0,001489327	-0,000907212	0,005527779
Declive	0,000616787	2,36081E-05	0,000565785	0,000667789

### RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,005394218	0,00016074
2	0,008478153	-0,000498489
3	0,011562088	7,10845E-05
4	0,014646023	-0,00095775
5	0,033149632	0,001246166
6	0,051653241	-2,45009E-05
7	0,06398898	0,000581857
8	0,094828329	0,002479595
9	0,125667677	0,009270628
10	0,162674895	0,005765403
11	0,187346374	-0,008746915
12	0,224353592	-0,009438121
13	0,249025071	-0,00150436
14	0,286032289	0,007477467
15	0,310703768	-0,005882805



C10. Linearidade da **Telmisartan**

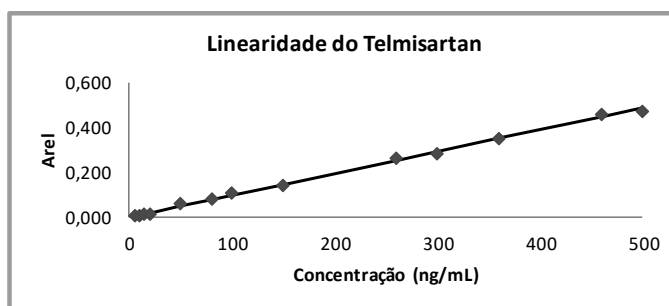
Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel
5	1405	291951	0,005
10	2769	314329	0,009
15	3683	299087	0,012
20	3429	345089	0,010
50	21548	362462	0,059
80	23361	305777	0,076
100	31126	301179	0,103
150	40115	289965	0,138
200	48412	302250	0,160
260	79816	303308	0,263
300	83460	298180	0,280
360	105967	301548	0,351
400	99676	295123	0,338
460	130826	287245	0,455
500	116001	245027	0,473

Conc. (ng/mL)	Arel
5	0,005
10	0,009
15	0,012
20	0,010
50	0,059
80	0,076
100	0,103
150	0,138
260	0,263
300	0,280
360	0,351
460	0,455
500	0,473

Desprezando os pontos de calibração a 200 e 400 ng/m

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

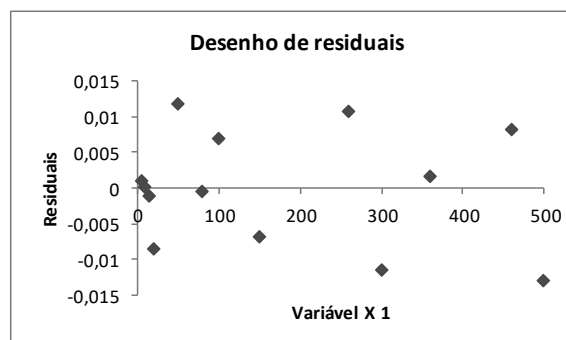
Estatística de regressão	
R	0,997631353
Quadrado de R	0,995268317
Erro-padrão	0,008476944
Observações	13



	Coefficientes	Erro-padrão	95% inferior	95% superior
Ordenada na origem	-0,001152099	0,002502358	-0,006659751	0,004355554
Declive	0,000974769	4,11263E-05	0,000884251	0,001065288

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,003721747	0,001091076
2	0,008595593	0,000212102
3	0,013469438	-0,001154743
4	0,018343284	-0,008407267
5	0,047586358	0,011862216
6	0,076829432	-0,000431855
7	0,096324814	0,007023041
8	0,145063271	-0,006718498
9	0,252287875	0,01086289
10	0,291278641	-0,011381471
11	0,349764789	0,001644671
12	0,447241702	0,008210776
13	0,486232467	-0,012812937





D. Efeito matriz





**Tabela D1.** Resultados obtidos no estudo do efeito matriz para os AHTs em estudo para as amostras brancas selecionadas (sangue vivo e sangue cardíaco *postmortem*). São também apresentados os resultados obtidos para o padrão interno (zolpidem-d6).

Hidroclorotiazida											
Conc. (ng/mL)	Sem Matriz			Com Matriz (SV119)				Com Matriz (POOL08)			
	Área	Média	CV (%)	Área	Média	CV (%)	EM (%)	Área	Média	CV (%)	EM (%)
50	3827	3853	3,2	4448	4313	2,9	11,9	2689	2886	4,4	-25,1
	3826			4130				2881			
	3999			4359				2870			
	3938			4373				3025			
	3675			4257				2963			
200	12667	11882	4,1	11881	12415	3,6	4,5	9660	9581	3,1	-19,4
	11530			12546				10024			
	11448			13021				9582			
	11967			12082				9241			
	11795			12546				9397			

Amlodipina											
Conc. (ng/mL)	Sem Matriz			Com Matriz (SV119)				Com Matriz (POOL08)			
	Área	Média	CV (%)	Área	Média	CV (%)	EM (%)	Área	Média	CV (%)	EM (%)
50	7978	7787	2,0	4006	4198	6,7	-46,1	3094	3243	6,3	-58,4
	7845			3839				2963			
	7821			4524				3344			
	7728			4203				3386			
	7563			4418				3427			
200	29913	28796	4,1	13832	13686	3,8	-52,5	9801	10483	8,1	-63,6
	29292			14208				9348			
	29219			13749				11047			
	28718			13832				11089			
	26836			12811				11130			

Indapamida											
Conc. (ng/mL)	Sem Matriz			Com Matriz (SV119)				Com Matriz (POOL08)			
	Área	Média	CV (%)	Área	Média	CV (%)	EM (%)	Área	Média	CV (%)	EM (%)
50	11912	12237	5,0	8810	9387	7,4	-23,3	10090	10405	2,8	-15,0
	13253			8481				10221			
	12352			9900				10329			
	11754			9966				10555			
	11915			9780				10831			
200	47750	47472	1,8	37346	35930	3,6	-24,3	36457	35604	2,6	-25,0
	48482			35837				34142			
	47264			35991				35316			
	47728			36572				36214			
	46138			33904				35890			

**Tabela D1** (continuação). Resultados obtidos no estudo do efeito matriz para os AHT's em estudo para as amostras brancas selecionadas (sangue vivo e sangue cardíaco *postmortem*). São também apresentados os resultados obtidos para o padrão interno (zolpidem-d6).

Lercanidipina											
Conc. (ng/mL)	Sem Matriz			Com Matriz (SV119)				Com Matriz (POOL08)			
	Área	Média	CV (%)	Área	Média	CV (%)	EM (%)	Área	Média	CV (%)	EM (%)
50	317776	328578	2,8	330217	308123	5,2	-6,2	316310	323388	3,4	-1,6
	338193			285614				331628			
	328781			303383				324165			
	321089			312986				335833			
	337050			308417				309006			
200	1223337	1172211	3,4	997735	950861	3,7	-18,9	907449	912025	10,2	-22,2
	1192109			974419				766249			
	1175140			943857				902748			
	1151950			914068				1004891			
	1118518			924225				978790			

Nifedipina											
Conc. (ng/mL)	Sem Matriz			Com Matriz (SV119)				Com Matriz (POOL08)			
	Área	Média	CV (%)	Área	Média	CV (%)	EM (%)	Área	Média	CV (%)	EM (%)
50	21773	22247	3,3	21707	16730	17,0	-24,8	25716	25352	4,7	14,0
	22851			15859				24840			
	22942			16266				25614			
	21235			14876				26904			
	22435			14943				23686			
200	59433	55950	9,2	48966	47284	3,8	-15,5	69057	66467	4,7	18,8
	61886			49419				61239			
	55285			46244				68262			
	54657			46506				67679			
	48492			45285				66098			

Telmisartan											
Conc. (ng/mL)	Sem Matriz			Com Matriz (SV119)				Com Matriz (POOL08)			
	Área	Média	CV (%)	Área	Média	CV (%)	EM (%)	Área	Média	CV (%)	EM (%)
50	53851	52460	3,0	31460	34815	11,4	-33,6	30526	31633	8,6	-39,7
	51296			29869				30215			
	53278			37293				35953			
	50289			36310				32432			
	53584			39145				29038			
200	169476	164094	2,8	112886	118405	4,2	-27,8	94740	101994	14,8	-37,8
	168371			119957				82768			
	159959			121624				97637			
	159703			124074				117967			
	162961			113484				116858			

**Tabela D1** (continuação). Resultados obtidos no estudo do efeito matriz para os AHT's em estudo para as amostras brancas selecionadas (sangue vivo e sangue cardíaco *postmortem*). São também apresentados os resultados obtidos para o padrão interno (zolpidem-d6).

Zolpidem-d6											
Conc. (ng/mL)	Sem Matriz			Com Matriz (SV119)				Com Matriz (POOL08)			
	Área	Média	CV (%)	Área	Média	CV (%)	EM (%)	Área	Média	CV (%)	EM (%)
50	317898	352807	5,9	348248	374772	4,1	6,2	326220	354841	5,2	0,6
	351506			374581				359159			
	362054			383016				362249			
	361178			382280				376192			
	371401			385738				350383			
200	370373	364371	2,1	377456	383652	1,6	5,3	366402	351766	2,5	-3,5
	359354			380716				344166			
	367351			383408				352599			
	371392			394007				348389			
	353387			382673				347276			



E. Eficiência da extração



**Tabela E1.** Eficiência da extração da amlodipina, hidroclorotiazida e indapamida.

<u>Amlodipina</u>		<u>C/ ext.</u>			<u>S/ ext.</u>			<b>% RECUPERAÇÃO</b>
Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel	Área (s)	Área (PI)	Arel		
50	2125	395911	0,0054	5066	410463	0,0123		
50	2418	431602	0,0056	5445	441779	0,0123		
50	2645	446396	0,0059	5170	443059	0,0117		
		<b>Média</b>	0,0056		<b>Média</b>	0,0121	<b>46,5 %</b>	
200	7275	445294	0,0163	18627	447754	0,0416		
200	9386	445052	0,0211	18686	447802	0,0417		
200	8918	449972	0,0198	20055	438454	0,0457		
		<b>Média</b>	0,0191		<b>Média</b>	0,0430	<b>44,4 %</b>	
500	21024	443384	0,0474	40958	437799	0,0936		
500	26187	435926	0,0601	43945	444234	0,0989		
500	27977	440728	0,0635	45876	439896	0,1043		
		<b>Média</b>	0,0570		<b>Média</b>	0,0989	<b>57,6 %</b>	
<u>Hidroclorotiazida</u>		<u>C/ ext.</u>			<u>S/ ext.</u>			<b>% RECUPERAÇÃO</b>
Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel	Área (s)	Área (PI)	Arel		
50	4168	395911	0,0105	4813	410463	0,0117		
50	4037	431602	0,0094	5272	441779	0,0119		
50	4383	446396	0,0098	5008	443059	0,0113		
		<b>Média</b>	0,0099		<b>Média</b>	0,0117	<b>85,0 %</b>	
200	12052	445294	0,0271	15995	447754	0,0357		
200	13724	445052	0,0308	16598	447802	0,0371		
200	13892	449972	0,0309	17040	438454	0,0389		
		<b>Média</b>	0,0296		<b>Média</b>	0,0372	<b>79,5 %</b>	
500	25734	443384	0,0580	31180	437799	0,0712		
500	26374	435926	0,0605	32821	444234	0,0739		
500	24588	440728	0,0558	34829	439896	0,0792		
		<b>Média</b>	0,0581		<b>Média</b>	0,0748	<b>77,7 %</b>	
<u>Indapamida</u>		<u>C/ ext.</u>			<u>S/ ext.</u>			<b>% RECUPERAÇÃO</b>
Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel	Área (s)	Área (PI)	Arel		
50	7573	395911	0,0191	10242	410463	0,0250		
50	7137	431602	0,0165	10240	441779	0,0232		
50	7397	446396	0,0166	10387	443059	0,0234		
		<b>Média</b>	0,0174		<b>Média</b>	0,0239	<b>73,0 %</b>	
200	29499	445294	0,0662	41671	447754	0,0931		
200	34927	445052	0,0785	45884	447802	0,1025		
200	34307	449972	0,0762	43273	438454	0,0987		
		<b>Média</b>	0,0737		<b>Média</b>	0,0981	<b>75,1 %</b>	
500	71463	443384	0,1612	88337	437799	0,2018		
500	74485	435926	0,1709	105806	444234	0,2382		
500	87260	440728	0,1980	106286	439896	0,2416		
		<b>Média</b>	0,1767		<b>Média</b>	0,2272	<b>77,8 %</b>	

**Tabela E2.** Eficiência da extração da lercanidipina, nifedipina e telmisartan.

<u>Lercanidipina</u>		C/ ext.			S/ ext.			% RECUPERAÇÃO
Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel	Área (s)	Área (PI)	Arel		
50	165877	395911	0,4190	384753	410463	0,9374		
50	184804	431602	0,4282	359373	441779	0,8135		
50	206687	446396	0,4630	352441	443059	0,7955		
		<b>Média</b>	<b>0,4367</b>		<b>Média</b>	<b>0,8488</b>	<b>51,5 %</b>	
200	501746	445294	1,1268	1224485	447754	2,7347		
200	640396	445052	1,4389	1382192	447802	3,0866		
200	529491	449972	1,1767	1313183	438454	2,9950		
		<b>Média</b>	<b>1,2475</b>		<b>Média</b>	<b>2,9388</b>	<b>42,4 %</b>	
500	1584560	443384	3,5738	2501527	437799	5,7139		
500	1695796	435926	3,8901	2783146	444234	6,2650		
500	1796263	440728	4,0757	2879076	439896	6,5449		
		<b>Média</b>	<b>3,8465</b>		<b>Média</b>	<b>6,1746</b>	<b>62,3 %</b>	
<u>Nifedipina</u>		C/ ext.			S/ ext.			% RECUPERAÇÃO
Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel	Área (s)	Área (PI)	Arel		
50	13503	395911	0,0341	20864	410463	0,0508		
50	10953	431602	0,0254	16919	441779	0,0383		
50	12189	446396	0,0273	17091	443059	0,0386		
		<b>Média</b>	<b>0,0289</b>		<b>Média</b>	<b>0,0426</b>	<b>68,0 %</b>	
200	33141	445294	0,0744	52933	447754	0,1182		
200	40179	445052	0,0903	58003	447802	0,1295		
200	39603	449972	0,0880	56575	438454	0,1290		
		<b>Média</b>	<b>0,0842</b>		<b>Média</b>	<b>0,1256</b>	<b>67,1 %</b>	
500	79162	443384	0,1785	103992	437799	0,2375		
500	86573	435926	0,1986	121213	444234	0,2729		
500	86752	440728	0,1968	113614	439896	0,2583		
		<b>Média</b>	<b>0,1913</b>		<b>Média</b>	<b>0,2562</b>	<b>74,7 %</b>	
<u>Telmisartan</u>		C/ ext.			S/ ext.			% RECUPERAÇÃO
Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel	Área (s)	Área (PI)	Arel		
50	14752	395911	0,0373	54053	410463	0,1317		
50	17304	431602	0,0401	64595	441779	0,1462		
50	17746	446396	0,0398	63390	443059	0,1431		
		<b>Média</b>	<b>0,0390</b>		<b>Média</b>	<b>0,1403</b>	<b>27,8 %</b>	
200	60104	445294	0,1350	205877	447754	0,4598		
200	63016	445052	0,1416	233691	447802	0,5219		
200	59558	449972	0,1324	223575	438454	0,5099		
		<b>Média</b>	<b>0,1363</b>		<b>Média</b>	<b>0,4972</b>	<b>27,4 %</b>	
500	124014	443384	0,2797	412713	437799	0,9427		
500	257162	435926	0,5899	510433	444234	1,1490		
500	216529	440728	0,4913	487159	439896	1,1074		
		<b>Média</b>	<b>0,4536</b>		<b>Média</b>	<b>1,0664</b>	<b>42,5 %</b>	



F. Límiares analíticos



## F1. Limites da Amlodipina

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel
3	121	398475	0,000
4	182	383850	0,000
5	235	400945	0,001
6	268	381088	0,001
7	338	394721	0,001
8	375	394908	0,001
9	451	395323	0,001
10	479	385198	0,001
12	527	374682	0,001
15	718	389713	0,002

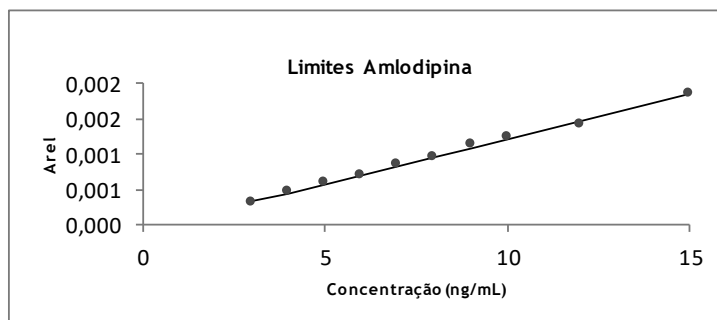
Conc. (ng/mL)	Arel
3	0,000
4	0,000
5	0,001
6	0,001
7	0,001
8	0,001
9	0,001
10	0,001
12	0,001
15	0,002

s - substância; PI - padrão interno

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

LD=	0,88
LQ=	2,67

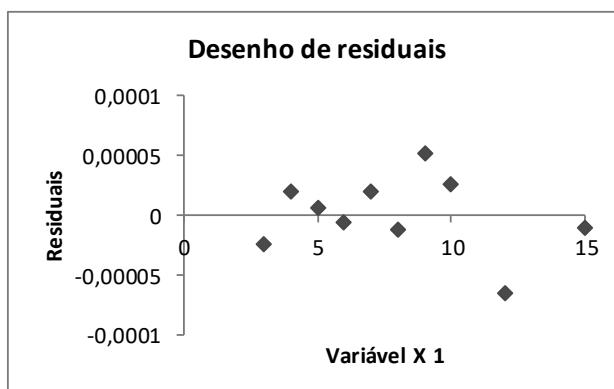
Estatística de regressão	
R	0,997836147
Quadrado de R	0,995676976
Erro-padrão	3,40046E-05
Observações	10



	Coefficientes	Erro-padrão	95% inferior	95% superior
Ordenada na origem	-5,40232E-05	2,41463E-05	-0,000109705	1,65833E-06
Declive	0,00012713	3,41369E-06	0,000119258	0,000135002

### RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,000327365	-2,42099E-05
2	0,000454495	1,99948E-05
3	0,000581625	5,11189E-06
4	0,000708754	-6,04162E-06
5	0,000835884	1,92557E-05
6	0,000963013	-1,30112E-05
7	0,001090143	5,08327E-05
8	0,001217272	2,51963E-05
9	0,001471531	-6,56626E-05
10	0,00185292	-1,1466E-05



F2. Limites da **Hidroclorotiazida**

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel
3	192	398475	0,000
4	206	383850	0,001
5	283	400945	0,001
6	322	381088	0,001
7	413	394721	0,001
8	462	394908	0,001
9	521	395323	0,001
10	560	385198	0,001
12	531	374682	0,001
15	798	389713	0,002

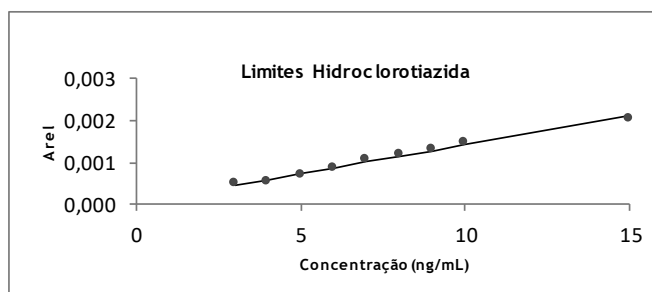
Conc. (ng/mL)	Arel
3	0,000
4	0,001
5	0,001
6	0,001
7	0,001
8	0,001
9	0,001
10	0,001
15	0,002

Desprezando o ponto de calibração a 12 ng/mL

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

LD=	1,06
LQ=	3,22

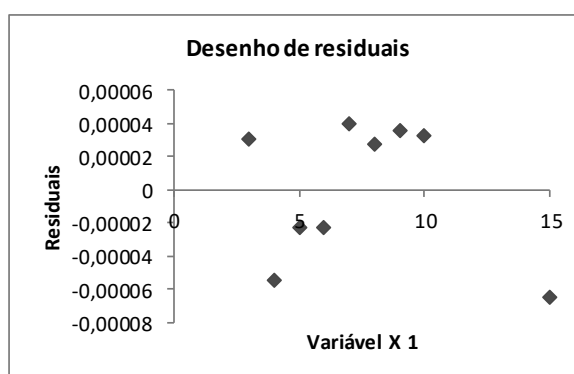
Estatística de regressão	
R	0,995766044
Quadrado de R	0,991550014
Erro-padrão	4,45195E-05
Observações	9



	Coefficientes	Erro-padrão	95% inferior	95% superior
Ordenada na origem	3,67571E-05	4,64964E-05	-7,31894E-05	0,000146704
Declive	0,000138352	6,59046E-06	0,000122768	0,000153936

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,000451813	3,02171E-05
2	0,000590165	-5,45156E-05
3	0,000728517	-2,3285E-05
4	0,000866868	-2,27266E-05
5	0,00100522	4,01143E-05
6	0,001143572	2,72358E-05
7	0,001281924	3,57194E-05
8	0,001420276	3,24404E-05
9	0,002112035	-6,51998E-05



### F3. Limites da Indapamida

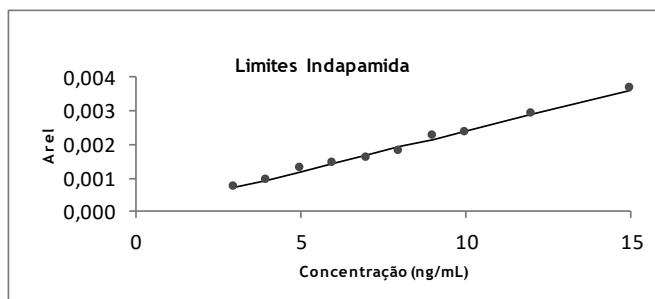
Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel
3	288	398475	0,001
4	356	383850	0,001
5	504	400945	0,001
6	538	381088	0,001
7	619	394721	0,002
8	715	394908	0,002
9	895	395323	0,002
10	910	385198	0,002
12	1096	374682	0,003
15	1424	389713	0,004

Conc. (ng/mL)	Arel
3	0,001
4	0,001
5	0,001
6	0,001
7	0,002
8	0,002
9	0,002
10	0,002
12	0,003
15	0,004

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

LD=	1,00
LQ=	3,04

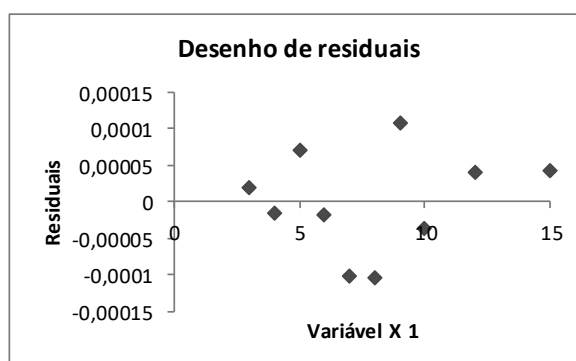
Estatística de regressão	
R	0,996891318
Quadrado de R	0,9937923
Erro-padrão	7,37142E-05
Observações	10



	Coefficientes	Erro-padrão	95% inferior	95% superior
Ordenada na origem	-2,51209E-05	5,23437E-05	-0,000145826	9,5584E-05
Declive	0,000242446	7,4001E-06	0,000225382	0,000259511

#### RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,000702218	1,95407E-05
2	0,000944664	-1,64898E-05
3	0,001187111	7,01718E-05
4	0,001429557	-1,78998E-05
5	0,001672003	-0,00010289
6	0,001914449	-0,000103806
7	0,002156896	0,00010662
8	0,002399342	-3,78066E-05
9	0,002884235	3,97315E-05
10	0,003611573	4,28288E-05



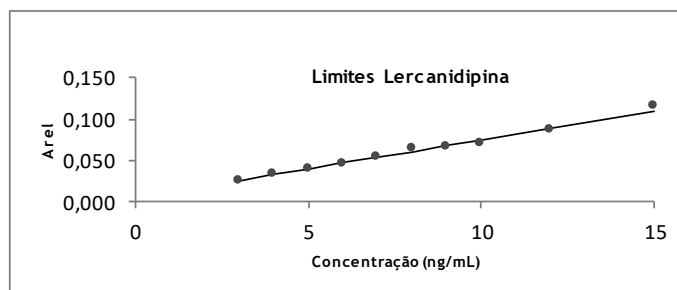
#### F4. Limites da Lercanidipina

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel
3	10436	398475	0,026
4	12650	383850	0,033
5	16247	400945	0,041
6	17573	381088	0,046
7	21052	394721	0,053
8	24977	394908	0,063
9	26599	395323	0,067
10	26991	385198	0,070
12	32881	374682	0,088
15	45140	389713	0,116

Conc. (ng/mL)	Arel
3	0,026
4	0,033
5	0,041
6	0,046
7	0,053
8	0,063
9	0,067
10	0,070
12	0,088
15	0,116

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

LD=	1,33
LQ=	4,02

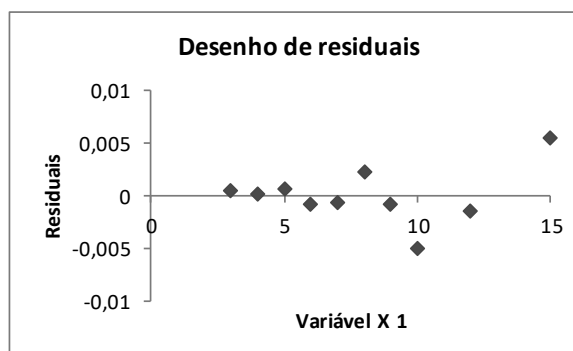


Estatística de regressão	
R	0,996356571
Quadrado de R	0,992726417
Erro-padrão	0,002837839
Observações	10

	Coefficientes	Erro-padrão	95% inferior	95% superior
Ordenada na origem	0,004580391	0,002015122	-6,64898E-05	0,009227272
Declive	0,00705694	0,000284888	0,006399986	0,007713893

#### RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,02575121	0,000438784
2	0,032808149	0,000146892
3	0,039865089	0,000655986
4	0,046922028	-0,000808528
5	0,053978968	-0,000645774
6	0,061035908	0,002211053
7	0,068092847	-0,000808441
8	0,075149787	-0,005078831
9	0,089263666	-0,001506152
10	0,110434485	0,00539501



## F5. Limites da Nifedipina

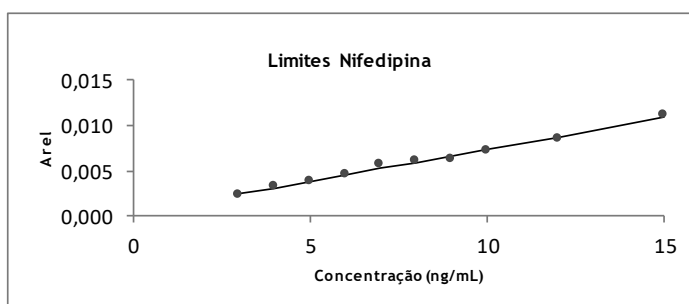
Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel
3	922	398475	0,002
4	1218	383850	0,003
5	1554	400945	0,004
6	1712	381088	0,004
7	2216	394721	0,006
8	2354	394908	0,006
9	2501	395323	0,006
10	2737	385198	0,007
12	3215	374682	0,009
15	4318	389713	0,011

Conc. (ng/mL)	Arel
3	0,002
4	0,003
5	0,004
6	0,004
7	0,006
8	0,006
9	0,006
10	0,007
12	0,009
15	0,011

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

LD=	1,04
LQ=	3,15

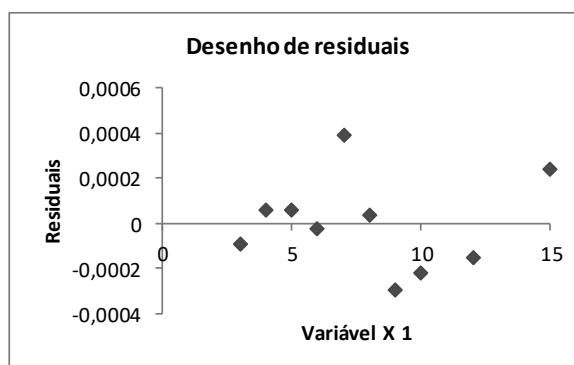
Estatística de regressão	
R	0,996927708
Quadrado de R	0,993864854
Erro-padrão	0,000221462
Observações	10



	Coefficientes	Erro-padrão	95% inferior	95% superior
Ordenada na origem	0,000302194	0,000157258	-6,04439E-05	0,000664832
Declive	0,000702572	2,22324E-05	0,000651304	0,00075384

### RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,00240991	-9,665E-05
2	0,003112482	6,03753E-05
3	0,003815054	6,03184E-05
4	0,004517626	-2,39899E-05
5	0,005220198	0,000393708
6	0,00592277	3,85557E-05
7	0,006625342	-0,000298758
8	0,007327914	-0,000221275
9	0,008733058	-0,000151852
10	0,010840774	0,000239568



F6. Limites do **Telmisartan**

Conc. (ng/mL)	Área (s)	Área (PI)	Arel
3	1042	398475	0,003
4	1357	383850	0,004
5	1771	400945	0,004
6	1949	381088	0,005
7	2054	394721	0,005
8	1815	394908	0,005
9	3148	395323	0,008
10	3405	385198	0,009
12	4234	374682	0,011
15	5699	389713	0,015

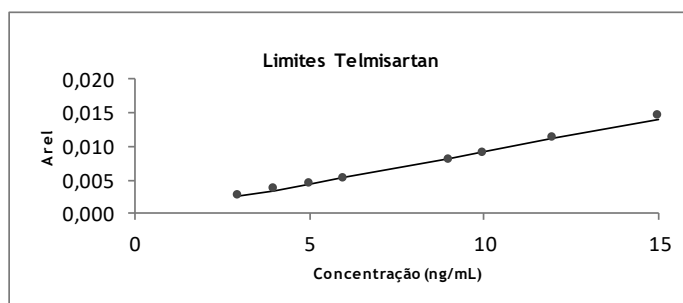
Conc. (ng/mL)	Arel
3	0,003
4	0,004
5	0,004
6	0,005
9	0,008
10	0,009
12	0,011
15	0,015

Desprezando o ponto de calibração a 7 e 8 ng/mL

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

LD=	1,17
LQ=	3,53

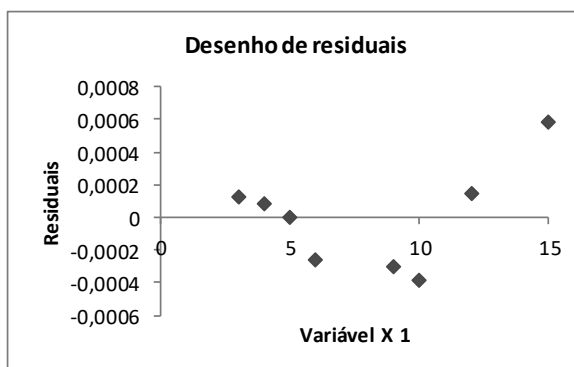
Estatística de regressão	
R	0,997589522
Quadrado de R	0,995184854
Erro-padrão	0,000340023
Observações	8



	Coefficientes	Erro-padrão	95% inferior	95% superior
Ordenada na origem	-0,000400458	0,000556831	-0,001762975	0,000962059
Declive	0,000962609	7,1285E-05	0,000788181	0,001137038

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,002487371	0,000126807
2	0,00344998	8,55735E-05
3	0,004412589	3,33111E-06
4	0,005375199	-0,000262201
5	0,008263027	-0,000300901
6	0,009225637	-0,000384992
7	0,011150856	0,000148728
8	0,014038684	0,000583654





## G. Repetibilidade



**Tabela G1.** Resultados obtidos no estudo da repetibilidade para a amlodipina e a hidroclorotiazida.

<b>Amlodipina</b>							
	Repetibilidade_TRR			Repetibilidade_Áreas			
	TR (min)	TR PI (min)	TRR	Área	Área PI	A/API	
50 ng/mL	3,33	1,28	2,602	1789	324990	0,006	
	3,33	1,28	2,602	1752	333414	0,005	
	3,33	1,28	2,602	1798	329008	0,005	
	3,33	1,28	2,602	1785	327618	0,005	
	3,33	1,28	2,602	1762	316241	0,006	
		<b>Média</b>		2,602		<b>Média</b>	0,005
		<b>Desvio padrão</b>		0,000		<b>Desvio padrão</b>	0,000
		<b>CV (%)</b>	0,0		<b>CV (%)</b>	2,2	
200 ng/mL	3,33	1,28	2,602	6036	326058	0,019	
	3,33	1,28	2,602	6532	313143	0,021	
	3,33	1,27	2,622	6558	320488	0,020	
	3,33	1,27	2,622	6000	315329	0,019	
	3,33	1,27	2,622	5969	326059	0,018	
		<b>Média</b>		2,614		<b>Média</b>	0,019
		<b>Desvio padrão</b>		0,011		<b>Desvio padrão</b>	0,001
		<b>CV (%)</b>	0,4		<b>CV (%)</b>	6,0	
<b>Hidroclorotiazida</b>							
	Repetibilidade_TRR			Repetibilidade_Áreas			
	TR (min)	TR PI (min)	TRR	Área	Área PI	A/API	
50 ng/mL	0,9	1,28	0,703	1277	324990	0,004	
	0,9	1,28	0,703	1234	333414	0,004	
	0,9	1,28	0,703	1204	329008	0,004	
	0,9	1,28	0,703	1177	327618	0,004	
	0,9	1,28	0,703	1116	316241	0,004	
		<b>Média</b>		0,703		<b>Média</b>	0,004
		<b>Desvio padrão</b>		0,000		<b>Desvio padrão</b>	0,000
		<b>CV (%)</b>	0,0		<b>CV (%)</b>	4,2	
200 ng/mL	0,9	1,28	0,703	4495	326058	0,014	
	0,9	1,28	0,703	4123	313143	0,013	
	0,9	1,27	0,709	4405	320488	0,014	
	0,9	1,27	0,709	4640	315329	0,015	
	0,9	1,27	0,709	4396	326059	0,013	
		<b>Média</b>		0,706		<b>Média</b>	0,014
		<b>Desvio padrão</b>		0,003		<b>Desvio padrão</b>	0,001
		<b>CV (%)</b>	0,4		<b>CV (%)</b>	4,2	

**Tabela G2.** Resultados obtidos no estudo da repetibilidade para a indapamida e a lercanidipina.

<b>Indapamida</b>							
	<b>Repetibilidade_TRR</b>			<b>Repetibilidade_Áreas</b>			
	<b>TR (min)</b>	<b>TR PI (min)</b>	<b>TRR</b>	<b>Área</b>	<b>Área PI</b>	<b>A/API</b>	
<b>50 ng/mL</b>	3,73	1,28	2,914	7383	324990	0,023	
	3,73	1,28	2,914	7508	333414	0,023	
	3,73	1,28	2,914	7164	329008	0,022	
	3,74	1,28	2,922	7071	327618	0,022	
	3,73	1,28	2,914	7278	316241	0,023	
		<b>Média</b>		2,916		<b>Média</b>	0,022
		<b>Desvio padrão</b>		0,003		<b>Desvio padrão</b>	0,001
	<b>CV (%)</b>		0,1		<b>CV (%)</b>	2,8	
<b>200 ng/mL</b>	3,73	1,28	2,914	27059	326058	0,083	
	3,73	1,28	2,914	27122	313143	0,087	
	3,73	1,27	2,937	27983	320488	0,087	
	3,73	1,27	2,937	27393	315329	0,087	
	3,73	1,27	2,937	27883	326059	0,086	
		<b>Média</b>		2,928		<b>Média</b>	0,086
		<b>Desvio padrão</b>		0,013		<b>Desvio padrão</b>	0,002
	<b>CV (%)</b>		0,4		<b>CV (%)</b>	2,0	
<b>Lercanidipina</b>							
	<b>Repetibilidade_TRR</b>			<b>Repetibilidade_Áreas</b>			
	<b>TR (min)</b>	<b>TR PI (min)</b>	<b>TRR</b>	<b>Área</b>	<b>Área PI</b>	<b>A/API</b>	
<b>50 ng/mL</b>	5,24	1,28	4,094	154780	324990	0,476	
	5,24	1,28	4,094	157642	333414	0,473	
	5,24	1,28	4,094	145533	329008	0,442	
	5,25	1,28	4,102	153416	327618	0,468	
	5,25	1,28	4,102	153159	316241	0,484	
		<b>Média</b>		4,097		<b>Média</b>	0,469
		<b>Desvio padrão</b>		0,004		<b>Desvio padrão</b>	0,016
	<b>CV (%)</b>		0,1		<b>CV (%)</b>	3,4	
<b>200 ng/mL</b>	5,24	1,28	4,094	146929	326058	0,451	
	5,24	1,28	4,094	148629	313143	0,475	
	5,24	1,27	4,126	145533	320488	0,454	
	5,24	1,27	4,126	149770	315329	0,475	
	5,24	1,27	4,126	141475	326059	0,434	
		<b>Média</b>		4,113		<b>Média</b>	0,458
		<b>Desvio padrão</b>		0,018		<b>Desvio padrão</b>	0,017
	<b>CV (%)</b>		0,4		<b>CV (%)</b>	3,8	

Tabela G3. Resultados obtidos no estudo da repetibilidade para a nifedipina e o telmisartan.

<b>Nifedipina</b>						
	Repetibilidade_TRR			Repetibilidade_Áreas		
	TR (min)	TR PI (min)	TRR	Área	Área PI	A/API
50 ng/mL	4,89	1,28	3,820	9347	324990	0,029
	4,89	1,28	3,820	9067	333414	0,027
	4,89	1,28	3,820	9030	329008	0,027
	4,89	1,28	3,820	9370	327618	0,029
	4,89	1,28	3,820	8852	316241	0,028
		<b>Média</b>	3,820		<b>Média</b>	0,028
		<b>Desvio padrão</b>	0,000		<b>Desvio padrão</b>	0,001
	<b>CV (%)</b>	0,0		<b>CV (%)</b>	2,5	
200 ng/mL	4,89	1,28	3,820	32920	326058	0,101
	4,89	1,28	3,820	32381	313143	0,103
	4,89	1,27	3,850	32459	320488	0,101
	4,89	1,27	3,850	32263	315329	0,102
	4,89	1,27	3,850	32200	326059	0,099
		<b>Média</b>	3,838		<b>Média</b>	0,101
		<b>Desvio padrão</b>	0,016		<b>Desvio padrão</b>	0,002
	<b>CV (%)</b>	0,4		<b>CV (%)</b>	1,7	
<b>Telmisartan</b>						
	Repetibilidade_TRR			Repetibilidade_Áreas		
	TR (min)	TR PI (min)	TRR	Área	Área PI	A/API
50 ng/mL	3,69	1,28	2,883	12428	324990	0,038
	3,69	1,28	2,883	12430	333414	0,037
	3,69	1,28	2,883	11882	329008	0,036
	3,69	1,28	2,883	12288	327618	0,038
	3,69	1,28	2,883	11924	316241	0,038
		<b>Média</b>	2,883		<b>Média</b>	0,037
		<b>Desvio padrão</b>	0,000		<b>Desvio padrão</b>	0,001
	<b>CV (%)</b>	0,0		<b>CV (%)</b>	2,1	
200 ng/mL	3,69	1,28	2,883	37869	326058	0,116
	3,69	1,28	2,883	44961	313143	0,144
	3,68	1,27	2,898	44961	320488	0,140
	3,68	1,27	2,898	37976	315329	0,120
	3,68	1,27	2,898	44057	326059	0,135
		<b>Média</b>	2,892		<b>Média</b>	0,131
		<b>Desvio padrão</b>	0,008		<b>Desvio padrão</b>	0,012
	<b>CV (%)</b>	0,3		<b>CV (%)</b>	9,3	



## H. Precisão intermédia





**Tabela H1.** Resultados obtidos referentes à precisão intermédia para a amlodipina.

Data	1º DIA (13/03/17)	2º DIA (14/03/17)	3º DIA (15/03/17)	4º DIA (16/03/17)	5º DIA (17/03/17)
R <sup>2</sup>	0,99212	0,99509	0,99665	0,99870	0,99423
Declive	0,00010	0,00010	0,00012	0,00011	0,00015
Y0	0,00032	0,00017	0,00003	0,00023	0,00056
<b>Gama Baixa 50 ng/mL</b>					
Replicado 1	49,6	52,4	51,6	50,2	49,7
Replicado 2	51,7	49,9	50,0	48,3	51,6
Replicado 3	51,5	52,0	50,7	50,0	51,5
Média (ng/mL)	50,9	51,4	50,8	49,5	50,9
Recuperação (%)	101,9	102,9	101,5	99,0	101,9
Conc. Média (ng/mL)	50,7				
C.V (%)	1,4				
Recuperação Média (%)	101,4				
Repetibilidade (S <sub>r</sub> )	1,1				
Limite repetibilidade* (%)	7,2				
Between Run (S <sub>run</sub> )	0,3				
Precisão intermédia (S <sub>1</sub> )	1,2				
<b>Gama Alta 200 ng/mL</b>					
Replicado 1	206,4	198,5	186,0	202,2	158,4
Replicado 2	202,4	208,2	200,7	197,8	193,6
Replicado 3	180,7	202,2	203,9	207,1	192,1
Média (ng/mL)	196,5	203,0	196,9	202,4	181,4
Recuperação (%)	98,3	101,5	98,4	101,2	90,7
Conc. Média (ng/mL)	196,0				
C.V (%)	4,4				
Recuperação Média (%)	98,0				
Repetibilidade (S <sub>r</sub> )	12,0				
Limite repetibilidade* (%)	19,9				
Between Run (S <sub>run</sub> )	5,3				
Precisão intermédia (S <sub>1</sub> )	13,1				
CVpool	4,9				

**Tabela H2.** Resultados obtidos referentes à precisão intermédia para a hidroclorotiazida.

Data	1º DIA (13/03/17)	2º DIA (14/03/17)	3º DIA (15/03/17)	4º DIA (16/03/17)	5º DIA (17/03/17)
R <sup>2</sup>	0,99587	0,99285	0,99541	0,99186	0,99567
Declive	0,00007	0,00006	0,00008	0,00008	0,00008
Y0	0,00029	0,00039	0,00022	0,00042	0,00032
<b>Gama Baixa 50 ng/mL</b>					
Replicado 1	51,2	55,1	51,3	50,1	49,6
Replicado 2	50,6	52,0	49,8	54,6	50,6
Replicado 3	48,6	54,7	53,1	52,1	52,0
Média (ng/mL)	50,1	53,9	51,4	52,3	50,7
Recuperação (%)	100,3	107,9	102,8	104,5	101,5
Conc. Média (ng/mL)	51,7				
C.V (%)	2,9				
Recuperação Média (%)	103,4				
Repetibilidade (S <sub>r</sub> )	1,7				
Limite repetibilidade* (%)	11,0				
Between Run (S <sub>run</sub> )	1,1				
Precisão intermédia (S <sub>1</sub> )	2,0				
<b>Gama Alta 200 ng/mL</b>					
Replicado 1	193,2	199,9	200,6	203,8	207,8
Replicado 2	201,8	203,5	201,3	198,9	202,9
Replicado 3	197,9	199,5	203,9	198,6	200,3
Média (ng/mL)	197,6	201,0	201,9	200,4	203,7
Recuperação (%)	98,8	100,5	101,0	100,2	101,8
Conc. Média (ng/mL)	200,9				
C.V (%)	1,1				
Recuperação Média (%)	100,5				
Repetibilidade (S <sub>r</sub> )	3,1				
Limite repetibilidade* (%)	5,2				
Between Run (S <sub>run</sub> )	1,3				
Precisão intermédia (S <sub>1</sub> )	3,4				
CVpool	3,4				

Tabela H3. Resultados obtidos referentes à precisão intermédia para a indapamida.

Data	1º DIA (13/03/17)	2º DIA (14/03/17)	3º DIA (15/03/17)	4º DIA (16/03/17)	5º DIA (17/03/17)
R <sup>2</sup>	0,99964	0,99901	0,99807	0,99763	0,99832
Declive	0,00029	0,00048	0,00051	0,00041	0,00043
Y0	0,00043	0,00050	0,00081	-0,00029	0,00034
<b>Gama Baixa 50 ng/mL</b>					
Replicado 1	52,3	50,9	50,5	52,0	51,8
Replicado 2	50,6	47,0	51,4	50,1	51,6
Replicado 3	53,5	49,6	51,6	53,1	50,2
Média (ng/mL)	52,1	49,2	51,2	51,7	51,2
Recuperação (%)	104,3	98,3	102,3	103,5	102,4
Conc. Média (ng/mL)	51,1				
C.V (%)	2,2				
Recuperação Média (%)	102,2				
Repetibilidade (S <sub>r</sub> )	1,4				
Limite repetibilidade* (%)	9,1				
Between Run (S <sub>run</sub> )	0,8				
Precisão intermédia (S <sub>1</sub> )	1,6				
<b>Gama Alta 200 ng/mL</b>					
Replicado 1	203,3	198,9	184,1	197,7	205,7
Replicado 2	205,0	201,4	200,3	205,0	207,1
Replicado 3	200,7	206,1	183,7	198,9	204,8
Média (ng/mL)	203,0	202,1	189,4	200,5	205,9
Recuperação (%)	101,5	101,1	94,7	100,3	102,9
Conc. Média (ng/mL)	200,2				
C.V (%)	3,2				
Recuperação Média (%)	100,1				
Repetibilidade (S <sub>r</sub> )	5,0				
Limite repetibilidade* (%)	8,2				
Between Run (S <sub>run</sub> )	5,7				
Precisão intermédia (S <sub>1</sub> )	7,5				
CVpool	4,1				

**Tabela H4.** Resultados obtidos referentes à precisão intermédia para a lercanidipina.

Data	1º DIA (13/03/17)	2º DIA (14/03/17)	3º DIA (15/03/17)	4º DIA (16/03/17)	5º DIA (17/03/17)
R <sup>2</sup>	0,99626	0,99244	0,99610	0,99395	0,99535
Declive	0,00810	0,00757	0,00917	0,00895	0,00889
Y0	0,02477	0,01922	0,03998	0,03390	0,01763
<b>Gama Baixa 50 ng/mL</b>					
Replicado 1	52,0	50,4	53,7	51,8	51,2
Replicado 2	51,6	49,2	51,1	49,3	51,8
Replicado 3	53,4	48,3	50,7	51,2	50,2
Média (ng/mL)	52,3	49,3	51,8	50,8	51,1
Recuperação (%)	104,7	98,6	103,7	101,5	102,1
Conc. Média (ng/mL)	51,1				
C.V (%)	2,3				
Recuperação Média (%)	102,1				
Repetibilidade (S <sub>r</sub> )	1,2				
Limite repetibilidade* (%)	7,8				
Between Run (S <sub>run</sub> )	0,9				
Precisão intermédia (S <sub>1</sub> )	1,5				
<b>Gama Alta 200 ng/mL</b>					
Replicado 1	165,0	188,8	176,2	194,6	202,3
Replicado 2	181,7	200,4	196,1	195,4	202,2
Replicado 3	188,5	191,9	191,1	198,3	196,8
Média (ng/mL)	178,4	193,7	187,8	196,1	200,4
Recuperação (%)	89,2	96,9	93,9	98,1	100,2
Conc. Média (ng/mL)	191,3				
C.V (%)	4,5				
Recuperação Média (%)	95,6				
Repetibilidade (S <sub>r</sub> )	7,8				
Limite repetibilidade* (%)	12,8				
Between Run (S <sub>run</sub> )	7,2				
Precisão intermédia (S <sub>1</sub> )	10,6				
CVpool	5,2				

**Tabela H5.** Resultados obtidos referentes à precisão intermédia para a nifedipina.

Data	1º DIA (13/03/17)	2º DIA (14/03/17)	3º DIA (15/03/17)	4º DIA (16/03/17)	5º DIA (17/03/17)
R <sup>2</sup>	0,99684	0,99877	0,99808	0,99734	0,99871
Declive	0,00048	0,00043	0,00054	0,00048	0,00033
Y0	0,00212	0,00118	0,00211	0,00098	0,00085
<b>Gama Baixa 50 ng/mL</b>					
Replicado 1	52,1	50,9	51,5	50,9	51,9
Replicado 2	52,6	49,0	50,3	49,4	50,4
Replicado 3	53,7	51,7	48,9	52,3	49,8
Média (ng/mL)	52,8	50,5	50,2	50,9	50,7
Recuperação (%)	105,6	101,1	100,5	101,7	101,4
Conc. Média (ng/mL)	51,0				
C.V (%)	2,0				
Recuperação Média (%)	102,1				
Repetibilidade (S <sub>r</sub> )	1,2				
Limite repetibilidade* (%)	8,1				
Between Run (S <sub>run</sub> )	0,7				
Precisão intermédia (S <sub>1</sub> )	1,4				
<b>Gama Alta 200 ng/mL</b>					
Replicado 1	210,3	200,9	202,6	196,9	200,7
Replicado 2	205,9	209,4	203,9	204,1	202,3
Replicado 3	200,7	204,4	203,5	201,6	194,1
Média (ng/mL)	205,6	204,9	203,3	200,9	199,0
Recuperação (%)	102,8	102,5	101,7	100,4	99,5
Conc. Média (ng/mL)	202,8				
C.V (%)	1,4				
Recuperação Média (%)	101,4				
Repetibilidade (S <sub>r</sub> )	3,8				
Limite repetibilidade* (%)	6,3				
Between Run (S <sub>run</sub> )	1,7				
Precisão intermédia (S <sub>1</sub> )	4,2				
CVpool	2,8				

**Tabela H6.** Resultados obtidos referentes à precisão intermédia para o telmisartan.

Data	1º DIA (13/03/17)	2º DIA (14/03/17)	3º DIA (15/03/17)	4º DIA (16/03/17)	5º DIA (17/03/17)
R <sup>2</sup>	0,99211	0,99279	0,99668	0,99292	0,99224
Declive	0,00072	0,00061	0,00060	0,00134	0,00109
Y0	0,00016	0,00032	0,00138	0,00463	0,00796
<b>Gama Baixa 50 ng/mL</b>					
Replicado 1	51,3	49,3	51,8	51,1	52,0
Replicado 2	49,7	49,1	53,4	49,4	51,7
Replicado 3	51,9	51,3	51,0	50,2	50,8
Média (ng/mL)	51,0	49,9	52,1	50,2	51,5
Recuperação (%)	101,9	99,8	104,1	100,5	103,0
Conc. Média (ng/mL)	50,9				
C.V (%)	1,7				
Recuperação Média (%)	101,9				
Repetibilidade (S <sub>r</sub> )	1,0				
Limite repetibilidade* (%)	6,8				
Between Run (S <sub>run</sub> )	0,7				
Precisão intermédia (S <sub>1</sub> )	1,2				
<b>Gama Alta 200 ng/mL</b>					
Replicado 1	198,2	187,6	159,6	176,7	190,0
Replicado 2	200,4	206,1	187,5	188,2	201,4
Replicado 3	186,5	203,7	190,4	205,6	182,7
Média (ng/mL)	195,0	199,1	179,2	190,2	191,4
Recuperação (%)	97,5	99,6	89,6	95,1	95,7
Conc. Média (ng/mL)	191,0				
C.V (%)	3,9				
Recuperação Média (%)	95,5				
Repetibilidade (S <sub>r</sub> )	12,2				
Limite repetibilidade* (%)	20,2				
Between Run (S <sub>run</sub> )	2,5				
Precisão intermédia (S <sub>1</sub> )	12,5				
CVpool	4,5				

I. Exatidão





**Tabela II.** Resultados obtidos referentes à exatidão para a amlodipina.

Data Equação	1º DIA (13/03/17) $y=0,00010x+0,0032$	2º DIA (14/03/17) $y=0,00010x+0,00017$	3º DIA (15/03/17) $y=0,00012x+0,00003$	4º DIA (16/03/17) $y=0,00011x+0,00023$	5º DIA (17/03/17) $y=0,00015x+0,00056$
<b>Gama Baixa 50 ng/mL</b>					
Conc. Média (ng/mL)	50,9	51,4	50,8	49,5	50,9
Recuperação (%)	101,9	102,9	101,5	99,0	101,9
Recuperação Média (%)	101,4				
Desvio padrão (ng/mL)	1,4				
C.V (%)	1,4				
N	5				
Texp	2,21				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R (%)	0,6				
Incerteza padrão rel.	0,006				
<b>Gama Alta 200 ng/mL</b>					
Conc. Média (ng/mL)	196,5	203,0	196,9	202,4	181,4
Recuperação (%)	98,3	101,5	98,4	101,2	90,7
Recuperação Média (%)	98,0				
Desvio padrão (ng/mL)	4,4				
C.V (%)	4,4				
N	5				
Texp	1,02				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R (%)	2,0				
Incerteza padrão rel.	0,020				

**Tabela I2.** Resultados obtidos referentes à exatidão para a hidroclortiazida.

Data Equação	1º DIA (13/03/17) $y=0,00007x+0,00029$	2º DIA (14/03/17) $y=0,00006x+0,00039$	3º DIA (15/03/17) $y=0,00008x+0,00022$	4º DIA (16/03/17) $y=0,00008x+0,00042$	5º DIA (17/03/17) $y=0,00008x+0,00032$
<b>Gama Baixa 50 ng/mL</b>					
Conc. Média (ng/mL)	50,1	53,9	51,4	52,3	50,7
Recuperação (%)	100,3	107,9	102,8	104,5	101,5
Recuperação Média (%)	103,4				
Desvio padrão (ng/mL)	3,0				
C.V (%)	2,9				
N	5				
Texp	2,55				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R (%)	1,3				
Incerteza padrão rel.	0,013				
<b>Gama Alta 200 ng/mL</b>					
Conc. Média (ng/mL)	197,6	201,0	201,9	200,4	203,7
Recuperação (%)	98,8	100,5	101,0	100,2	101,8
Recuperação Média (%)	100,5				
Desvio padrão (ng/mL)	1,1				
C.V (%)	1,1				
N	5				
Texp	0,94				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R (%)	0,5				
Incerteza padrão rel.	0,005				

**Tabela I3.** Resultados obtidos referentes à exatidão para a indapamida.

Data Equação	1º DIA (13/03/17) $y=0,00029x+0,00043$	2º DIA (14/03/17) $y=0,00048x+0,00050$	3º DIA (15/03/17) $y=0,00051x+0,00081$	4º DIA (16/03/17) $y=0,00041x-0,00029$	5º DIA (17/03/17) $y=0,00043x+0,00034$
<b>Gama Baixa 50 ng/mL</b>					
Conc. Média (ng/mL)	52,1	49,2	51,2	51,7	51,2
Recuperação (%)	104,3	98,3	102,3	103,5	102,4
Recuperação Média (%)	102,2				
Desvio padrão (ng/mL)	2,3				
C.V (%)	2,2				
N	5				
Texp	2,11				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R (%)	1,0				
Incerteza padrão rel.	0,010				
<b>Gama Alta 200 ng/mL</b>					
Conc. Média (ng/mL)	203,0	202,1	189,4	200,5	205,9
Recuperação (%)	101,5	101,1	94,7	100,3	102,9
Recuperação Média (%)	100,1				
Desvio padrão (ng/mL)	3,2				
C.V (%)	3,2				
N	5				
Texp	0,06				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R (%)	1,4				
Incerteza padrão rel.	0,014				

**Tabela I4.** Resultados obtidos referentes à exatidão para a lercanidpina.

Data Equação	1º DIA (13/03/17) $y=0,00810x+0,02477$	2º DIA (14/03/17) $y=0,00757x+0,01922$	3º DIA (15/03/17) $y=0,00917x+0,03998$	4º DIA (16/03/17) $y=0,00895x+0,03390$	5º DIA (17/03/17) $y=0,00889x+0,01763$
<b>Gama Baixa 50 ng/mL</b>					
Conc. Média (ng/mL)	52,3	49,3	51,8	50,8	51,1
Recuperação (%)	104,7	98,6	103,7	101,5	102,1
Recuperação Média (%)	102,1				
Desvio padrão (ng/mL)	2,3				
C.V (%)	2,3				
N	5				
Texp	2,04				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R (%)	1,0				
Incerteza padrão rel.	0,010				
<b>Gama Alta 200 ng/mL</b>					
Conc. Média (ng/mL)	178,4	193,7	187,8	196,1	200,4
Recuperação (%)	89,2	96,9	93,9	98,1	100,2
Recuperação Média (%)	95,6				
Desvio padrão (ng/mL)	4,3				
C.V (%)	4,5				
N	5				
Texp	2,28				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R (%)	1,9				
Incerteza padrão rel.	0,019				

**Tabela I5.** Resultados obtidos referentes à exatidão para a nifedipina.

Data	1º DIA (13/03/17)	2º DIA (14/03/17)	3º DIA (15/03/17)	4º DIA (16/03/17)	5º DIA (17/03/17)
Equação	$y=0,00048x+0,00212$	$y=0,00043x+0,00118$	$y=0,00054x+0,00211$	$y=0,00048x+0,00098$	$y=0,00033x+0,00085$
<b>Gama Baixa 50 ng/mL</b>					
Conc. Média (ng/mL)	52,8	50,5	50,2	50,9	50,7
Recuperação (%)	105,6	101,1	100,5	101,7	101,4
Recuperação Média (%)	102,1				
Desvio padrão (ng/mL)	2,0				
C.V (%)	2,0				
N	5				
Texp	2,25				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R (%)	0,9				
Incerteza padrão rel.	0,009				
<b>Gama Alta 200 ng/mL</b>					
Conc. Média (ng/mL)	205,6	204,9	203,3	200,9	199,0
Recuperação (%)	102,8	102,5	101,7	100,4	99,5
Recuperação Média (%)	101,4				
Desvio padrão (ng/mL)	1,4				
C.V (%)	1,4				
N	5				
Texp	2,22				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R (%)	0,6				
Incerteza padrão rel.	0,006				

**Tabela I6.** Resultados obtidos referentes à exatidão para o telmisartan.

Data	1º DIA (13/03/17)	2º DIA (14/03/17)	3º DIA (15/03/17)	4º DIA (16/03/17)	5º DIA (17/03/17)
Equação	$y=0,00072x+0,00016$	$y=0,00061x+0,00032$	$y=0,00060x+0,00138$	$y=0,00134x+0,00463$	$y=0,00109x+0,00796$
<b>Gama Baixa 50 ng/mL</b>					
Conc. Média (ng/mL)	51,0	49,9	52,1	50,2	51,5
Recuperação (%)	101,9	99,8	104,1	100,5	103,0
Recuperação Média (%)	101,9				
Desvio padrão (ng/mL)	1,8				
C.V (%)	1,7				
N	5				
Texp	2,35				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R (%)	0,8				
Incerteza padrão rel.	0,008				
<b>Gama Alta 200 ng/mL</b>					
Conc. Média (ng/mL)	195,0	199,1	179,2	190,2	191,4
Recuperação (%)	97,5	99,6	89,6	95,1	95,7
Recuperação Média (%)	95,5				
Desvio padrão (ng/mL)	3,7				
C.V (%)	3,9				
N	5				
Texp	2,70				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R (%)	1,7				
Incerteza padrão rel.	0,017				