



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA
Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Maria Augusta Alves Silva

Análise toxicológica por técnicas de triagem aplicada em amostras biológicas post-mortem de casos suspeitos de intoxicação provenientes de Instituto de Criminalística

Goiânia
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA
Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Maria Augusta Alves Silva

Análise toxicológica por técnicas de triagem aplicada em amostras biológicas post-mortem de casos suspeitos de intoxicação provenientes de Instituto de Criminalística

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título Mestre em Ciências Farmacêuticas.
Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha

Goiânia
2014

**Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas
da Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO

Aluna: Maria Augusta Alves Silva

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha

Membros:

1. Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha (Presidente/ Orientador; Faculdade de Farmácia/ UFG)

2. Profa. Dra. Keila Correia de Alcântara (Faculdade de Farmácia/ UFG)

3. Dra. Cristiane Effting

OU

4. Prof. Sérgio Henrique Nascente Costa (Faculdade de Farmácia/ UFG)

Data: 12/02/2014

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por conceder todas as coisas boas que acontecem na minha vida.

Aos meus pais, João e Iracy, pelo amor, dedicação e apoio incondicional.

À minha irmã, Alexandrina, pela amizade e companhia.

Ao meu marido, Murilo, por me apoiar e ajudar com nossa Liz nas várias manhãs corridas.

Aos meus amigos de laboratório, Vania, Tereza e Jerônimo, por me ajudarem na execução do trabalho e pelo carinho.

Ao meu orientador, Prof. Luiz Carlos da Cunha, pelo apoio, compreensão e orientação.

À Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fernanda, pela paciência e disposição em ajudar e atender.

Aos meus amigos no Instituto de Criminalística, pelo apoio e auxílio nas coletas e ao longo do mestrado.

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
ATS	Análise Toxicológica Sistemática
CEDIA	Clone enzyme donor immunoassay
DCM	Diclorometano
EFS	Extração em Fase sólida
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ELL	Extração Líquido-Líquido
EMIT	Enzyme-multiplied immunoassay technique
EMIT	Enzyme-multiplied immunoassay technique
FM	Fase móvel
FMN	Fator de Matriz Normalizado
HPLC-PDA	Cromatografia líquida de alta-eficiência
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICLR	Instituto de Criminalística Leonardo Rodrigues
KIMS	Kinetic interaction of microparticles in solution
MCE	Mortes por Causas Externas
MDA	Metilenodioxo-anfetamina
MDMA	Metilenodioxo-metanfetamina/ Ecstasy
MDEA	Metilenodioxo-N-etil-anfetamina
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDA	Detector de arranjo díodos
PAF	Projétil de arma de fogo
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RIA	Radioimunoensaio
SIM	Sistema de Informação sobre Mortalidade
SINITOX	Sistema Nacional de Informações Toxicológicas
TIAFT	Associação Internacional dos Toxicologistas Forenses
T_{rr}	Tempo de retenção relativo
σ	Desvio Padrão

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1: Drogas e fármacos detectados pelo kit e seus respectivos limites de detecção	18
Quadro 2: Condições cromatográficas da ATS	21
Tabela 1: Média e desvio padrão (σ) das áreas (mAu) obtidas para cada padrão em concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, em matriz e em solução e respectivo Fator de Matriz Normalizado.....	26
Tabela 2: Quadro comparativo dos resultados obtidos por imunocromatografia e análise toxicológica sistemática (ATS)	31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Interpretação do resultado da imunocromatografia.....	19
Figura 2: Fluxogramas das extrações básica, ácida e por precipitação utilizadas na ATS por HPLC-PDA de amostras de sangue <i>post-mortem</i> provenientes do Instituto de Criminalística do Estado de Goiás	20
Figura 3: Cromatogramas da triplicada do efeito matriz em diferentes pH: pH ácido, pH básico e precipitação. O extrato foi contaminado com os padrões: hidroclorotiazida (1), flurazepam (2), furosemida (3) e flunitrazepam (4), a uma concentração de 10 µg/mL.	27
Figura 4: Cromatogramas comparando a influência da matriz na extração em pH ácido, básico e precipitação. Em azul padrões extraídos e em vermelho não extraídos. Padrões de clordiazepóxido (1), nitrazepam (2), amitriptilina (3) e diazepam (4) em concentrações de 10 µg/mL.	28
Figura 5: Cromatogramas obtidos por HPLC-PDA a partir do estudo do efeito residual de acordo com a RDC 27/2012. Solução aquosa com os seguintes padrões: (1) Clordiazepóxido, (2) nitrazepam, (3) amitriptilina, (4) diazepam em concentração de 10 µg/mL.	29
Figura 6: Comparação dos resultados obtidos na triagem das amostras (n=35) por imunocromatografia e por HPLC-PDA.	30
Figura 7: Cromatograma do extrato básico da amostra 8 (1) e espectro UV (2) da catina (norpseudoefedrina) cujo o índice de similaridade foi 0,997.....	34
Figura 8: Cromatograma do extrato básico da amostra 11 (1) e espectro UV (2) da captagon (fenetilina) cujo o índice de similaridade foi 0,996.....	35
Figura 9: Cromatograma do extrato básico da amostra 28 e estrutura química da feniletilamina (1) e espectro UV (2) da feniletilamina, cujo o índice de similaridade foi 0,997.	36
Figura 10: Estrutura química das cadaverinas (1) e putrescinas (2).	37
Figura 11: Cromatograma do extrato básico da amostra 29 (1) e espectro UV (2) da benzoilecgonina, cujo o índice de similaridade foi 0,999.....	38

Figura 12: Cromatograma do extrato ácido da amostra 11 (1) e espectro UV (2) da cetobemidona, cujo o índice de similaridade foi 0,996. (3) estrutura química cetobemidona e metadona.	40
Figura 13: Cromatograma do extrato ácido da amostra 3 (1) e espectro UV do bromazepan (2), cujo o índice de similaridade foi 0,995.	42
Figura 14: Cromatograma do extrato básico da amostra 32 (1) e espectro UV (2) do midazolam (IS = 0,997).	43
Figura 15: Cromatograma do extrato básico da amostra 19 (1) e espectro UV (2) do 7-aminoflunitrazepam (IS = 0,997).	44
Figura 16: Cromatograma do extrato básico da amostra 26 (1) e espectro UV (2) do α -hidroxibrotizolam (IS = 0,997).	45
Figura 17: Cromatograma do extrato básico da amostra 2 (1) e espectro UV (2) da glutetimida (Doriden®) (IS=0,999).	46
Figura 18: Cromatograma do extrato ácido e básico, respectivamente, da amostra 9 (1) e espectro UV da fenitoína (IS=0,999) (2).	47
Figura 19: Cromatograma do extrato básico da amostra 5 (1) e espectro UV (2) do propargite (IS=0,996).	48
Figura 20: Cromatograma do extrato básico da amostra 10 (1) e espectro UV (2) do diflubenzuron (IS=0,995).	48
Figura 21: Cromatograma do extrato básico da amostra 12 (1) e espectro UV (2) do dalapon (IS=0,998).	49

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivos gerais	16
2.2 Objetivos específicos	16
3 METODOLOGIA	17
3.1 Coleta das amostras	17
3.2 Análise Imunocromatográfica	17
3.3 Análise Toxicológica Sistemática	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1 Epidemiologia	24
4.2 Validação parcial do método de ATS	24
4.3 Comparação dos resultados obtidos na triagem por imunocromatografia e por HPLC-PDA	30
5 CONCLUSÃO	51
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
7 ANEXO	56

RESUMO

As análises toxicológicas em diversas amostras são de extrema importância e podem ter várias finalidades, como por exemplo, o monitoramento de dependentes químicos, análises forense, controle de doping, monitoramento terapêutico, análise de contaminantes ambientais dentre outras. O objetivo deste trabalho foi analisar amostras de sangue *post-mortem* do Instituto de Criminalística de Goiás (IC) através de imunocromatografia e análise toxicológica sistemática por HPLC-PDA para a verificação da presença ou ausência de agentes tóxicos. As condições cromatográficas do método foram: fase móvel tampão fosfato de potássio monobásico pH 2,3 e acetonitrila, fluxo de 1 mL/min, coluna Lichrospher RP8, 5µm, 250 x 4,0mm, faixa de varredura de 200 a 380 nm. Os padrões de calibração utilizados foram MPPH, cafeína, benzeno e histamina. A base de dados utilizada foi a UVTOX proposta por Pragst e colaboradores (2001). Na validação parcial foi avaliado o efeito matriz através da extração líquido-líquido de amostras de sangue total contaminada com padrões de hidroclorotiazida, furosemida, flunitrazepam, flurazepam, amitriptilina, clordiazepóxido, nitrazepam e diazepam, na concentração de 10 µg/mL. As amostras de sangue total foram extraídas em diferentes valores de pH e analisadas por HPLC-PDA. Através das áreas obtidas de cada padrão, calculou-se o fator de matriz normalizado que apresentou coeficiente de variação inferior a 10%. Com o intuito de comparar duas técnicas de triagem para detecção de drogas de abuso, amostras de sangue *post-mortem* do IC (n=35) foram analisadas também por imunocromatografia, obtendo-se 10 amostras positivas para anfetamina, 3 para benzoilecgonina e 1 para Δ THC. Por outro lado, na ATS por HPLC-PDA apenas 1 amostra foi positiva para benzoilecgonina, 2 anfetaminas, e outras 3 para benzodiazepínicos. Nas demais amostras não foi detectada nenhuma substância de interesse toxicológico. Tanto a imunocromatografia quanto a análise toxicológica sistemática se mostraram ferramentas úteis na triagem de sangue *post-mortem*.

Palavras-chave: Análise toxicológica sistemática. HPLC-PDA. Sangue *post-mortem*.

ABSTRACT

The toxicological analyzes on various samples are extremely important and can be used for multiple purposes, such as monitoring of drug addicts, forensic analysis, doping control, therapeutic monitoring, analyses of environmental contaminants, etc. The objective of this study was to analyze *post - mortem* blood samples of the Instituto de Criminalística de Goiás (IC) by immunochromatography and systematic toxicological analysis HPLC - PDA to check the presence or absence of toxic agents. The chromatographic conditions of the method were: mobile phase monobasic potassium phosphate buffer pH 2.3 and acetonitrile, flow rate 1 ml / min, Lichrospher RP8 column, 5µm, 250 x 4.0 mm, scanning range 200-380 nm, the calibration standards were MPPH system, caffeine, benzene and histamine. It was used the database proposed by UVTOX Pragst et al (2001). As part of the partial validation the matrix effect was evaluated by liquid-liquid extraction of whole blood samples contaminated with 8 standards in known concentration. The whole blood samples were extracted at different pH values and analyzed by HPLC -PDA. Through the areas obtained from each standard, it was calculated the standardized factor matrix which showed a coefficient of variation less than 10 %. In order to compare two screening techniques for detection of drugs of abuse, *post-mortem* blood samples from the IC (n = 35) were also analyzed by immunochromatography, yielding 10 samples positive for amphetamine, 3 for benzoylecgonine and 1 for Δ^9 THC. The ATS by HPLC – PDA analyses showed only 1 sample positive for benzoylecgonine, 2 samples for amphetamines, and 3 benzodiazepines. In the other samples, no substance toxicological interest was detected. Both immunochromatography as systematic toxicological analysis proved useful tools in screening *post-mortem* blood.

Keywords: *Systematic toxicological analysis. HPLC – PDA. Post –mortem blood.*

1 INTRODUÇÃO

As mortes ou lesões por causas externas (MCE) estão relacionadas a atos de violência como suicídio, acidentes de trânsito, homicídios, envenenamentos, e acometem mais de 5 milhões de pessoas a cada ano em todo mundo. No Brasil, em 2010, foram registrados 1.136.947 óbitos no SIM (Sistema de Informações sobre Mortalidade), destes 12,5% (143.256) foram decorrentes de causas externas. As MCE são a primeira causa de morte na faixa etária de 20 a 39 anos. Na região Centro-Oeste, a taxa de MCE é de 86,3 óbitos por 100 mil habitantes, enquanto nas demais regiões do país essa taxa não passa de 80 óbitos por 100 mil habitantes (BRASIL, 2011; WHO 2007).

Dentre as causas de MCE temos as mortes por violência, como homicídios e suicídios. Nos últimos 17 anos ocorreu um aumento de 41% das taxas de homicídios no Brasil (IBGE, 2012) e em 2008 foram registrados 9.206 óbitos por suicídio no SIM, o que faz parte do aumento da incidência em 60% nas taxas mundiais de suicídio nos últimos 45 anos (WHO, 2013). Segundo dados divulgados pelo Ministério da Saúde em 2006 a intoxicação intencional por pesticidas ou medicamentos é o terceiro meio mais utilizado para cometer o suicídio, ficando atrás do enforcamento e disparo por armas de fogo (BRASIL, 2006).

De acordo com as estatísticas divulgadas pelo Sistema Nacional de Informações Toxicológicas (SINITOX), desde 1994 no Brasil os medicamentos vêm ocupando o primeiro lugar no conjunto dos 13 grupos de agentes tóxicos considerados, respondendo por aproximadamente 30,7% dos casos de intoxicação registrados no país sendo este valor mantido até 2010 (BORTOLLETO; BOCHER 1994; FIOCRUZ, 2010).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) a violência e o uso de drogas de abuso são os problemas de saúde pública mais fortemente correlacionados (WHO, 2009; ARROYO et al., 2011). Segundo dados divulgados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em novembro de 2011, 9,77% do total de mortes foram em decorrência de assassinatos, suicídios, afogamentos e acidentes de trânsito os quais podem estar relacionados ao uso de drogas lícitas ou ilícitas. No estado de Goiás o índice é de 12,53%

consequentemente, 3% acima da média do Brasil, o que torna extremamente importante detecção, identificação e quantificação da substância envolvida nestes casos (TIAFT, 2013).

A realização de um procedimento de triagem de drogas amplo e eficaz é essencial para casos clínicos e forenses. Uma vez que, as substâncias pesquisadas são desconhecidas as suas características físico-químicas também são, tornando a detecção por um único método de triagem pouco precisa. Sendo assim, se faz necessária a execução sequencial de vários procedimentos analíticos baseados em princípios diferentes (GONZÁLEZ, 2012; TIAFT, 2013).

A análise toxicológica sistemática (ATS) ou em inglês chamada de *general unknown screening* é uma técnica de triagem que compreende a pesquisa de substâncias de relevância toxicológica, cuja presença e identidade na amostra são incertas (GONZÁLEZ, 2012; LINDEN, 2010). Estas análises são realizadas em diversas matrizes (urina, sangue, cabelo, solo, alimentos, etc) e podem ter várias finalidades, como por exemplo, o monitoramento de dependentes químicos, análises forense, controle de doping, monitoramento de contaminantes ambientais na água e no solo, etc (NORMAND et al., 1994; BROWNE et al., 1994; MOELLER et al., 1998; MURA et al., 1999; MAHL et al., 2000; TOLEDO et al., 2001; REINHARDT; MÍDIO, 1995; CONE, 2001; FASSINA; LINDEN, 2003).

Diante do grande e crescente número de substâncias potencialmente presentes em triagens toxicológicas a Associação Internacional dos Toxicologistas Forenses (TIAFT) fomentou estudos para a criação de sistemas analíticos padronizados e reprodutíveis interlaboratorialmente associados a bases de dados de substâncias com relevância toxicológica (PRAGST, 2001).

O sucesso de uma análise toxicológica depende em grande parte da robustez e reprodutibilidade do sistema analítico utilizado (LAMBERT; BOCXLAER; LEENHEER, 1997). Para garantir a qualidade e confiabilidade de métodos analíticos são realizados testes qualitativos e quantitativos definidos por órgãos ou agências reguladoras. No Brasil a norma vigente para validação de métodos analíticos é a RDC 899/2003 e para métodos bioanalíticos a RDC 27/2012 (BRASIL, 2003; BRASIL, 2012).

As análises toxicológicas sistemáticas são classificadas como técnicas qualitativas e de identificação, sendo a especificidade o parâmetro a ser validado (BRASIL, 2003). A especificidade avalia a capacidade do método de medir exatamente um analito em presença de outras substâncias tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (PETERS et al, 2007).

A ATS é dividida em três etapas: preparação da amostra, isolamento e concentração dos analitos; detecção e diferenciação; e identificação (LINDEN, 2007). A etapa de preparo e extração da amostra deve ser capaz de extrair e concentrar uma ampla variedade de substâncias, desde lipofílicas até moderadamente polares e com propriedades ácidas, básicas, neutras e anfotéricas (DRUMMER, 1999). Os métodos de preparo de amostra mais utilizados em ATS são: a extração líquido-líquido (ELL) e a extração em fase sólida (EFS). A ELL é uma técnica clássica, de custo baixo, fácil execução, e com uma ampla faixa de solubilidade e seletividade dependendo do solvente utilizado, além do que, as proteínas presentes na amostra podem ser desnaturadas, diminuindo a quantidade de impurezas no extrato. A EFS é uma técnica mais seletiva, sendo necessário o conhecimento de outras características físico-químicas dos compostos a serem extraídos além da polaridade (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

O método de preparação da amostra e a análise cromatográfica escolhida devem ser padronizados e validados para assegurar a reprodutibilidade e confiança na identificação do analito (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001). Essa padronização da metodologia analítica permite detectar e identificar o toxicante através de bibliotecas eletrônicas, nas quais estão inseridos dados, como tempo de retenção, espectro UV, do toxicante dentro do sistema analítico (LINDEN, 2007).

Aproveitando o fomento do TIAFT e o avanço dos detectores de arranjo diodos (PDA), que possibilitam uma análise através de espectro de absorção UV ou visível, por varredura, além de permitir a avaliação da pureza do pico pela sobreposição dos espectros do início, topo e final do pico cromatográfico (*upslope*, *top* e *downslope*) e o armazenamento simultâneo dos dados (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002), Pragst e colaboradores (2001) propuseram um banco de dados de espectros de UV e os parâmetros de retenção de 2682 compostos, além do método

de preparo das amostras de plasma e urina por ELL e as condições cromatográficas da metodologia por HPLC-PDA.

Na biblioteca desenvolvida por Pragst et al., UV-TOX, a identificação dos toxicantes é baseada em espectros de ultravioleta na faixa de 195 a 380 nm, bem como em tempos de retenção relativos (T_{rr}). O uso do T_{rr} para identificação do toxicante foi empregado em diversos trabalhos (BOGUZ; WU, 1991; BOGUZ e ERKENS, 1994; KOVES, 1995; LAMBERT et al., 1997), pois este garante maior reprodutibilidade interlaboratorial do método analítico. Isto deve-se ao fato de que, o tempo de retenção dos analitos é prejudicado por fatores como variação do pH e proporção da fase móvel, desgaste da coluna cromatográfica, variação de pressão e fluxo do sistema cromatográfico (LINDEN, 2007; PRAGST, 2003).

Segundo o guia da TIAFT para uma identificação segura do toxicante é recomendada a utilização de pelo menos dois métodos analíticos diferentes (GONZÁLEZ, 2012). A associação de técnicas cromatográficas, como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia gasosa (GC) utilizando diferentes tipos de detectores (arranjo diodos (DAD), fluorescência, ionização de chama, nitrogênio-fósforo) a imunoenaios é amplamente aplicada em laboratórios forenses (GONZÁLEZ, 2012).

Na etapa inicial de triagem os imunoenaios como RIA (radioimunoensaio), EMIT (*enzyme-multiplied immunoassay technique*), FPIA (*fluorescence polarization immunoassay*), CEDIA (*clone enzyme donor immunoassay*), KIMS (*kinetic interaction of microparticles in solution*), ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) são muito utilizados, por serem técnicas rápidas e de fácil execução (GONZÁLEZ, 2012; KWONG T.C., 2007).

Geralmente, na detecção de drogas de abuso são utilizados testes imunológicos de competição, ou seja, a droga presente na amostra compete por uma ligação com anticorpos específicos marcados com moléculas fluorescentes, quimioluminescentes. A especificidade dos anticorpos empregados varia de acordo com a finalidade dos testes podendo ser específicos para um único composto (anticorpos monoclonais), classe de compostos ou para metabólitos (anticorpos policlonais) (DATTA, 2013; KWONG T.C., 2007; MELANSON, 2009).

Os imunoenaios são testes qualitativos e trabalham com concentrações limite específicas, cujo sinal é definido por substâncias calibradoras do próprio teste. Sendo assim, os resultados positivos nos imunoenaios indicam que a droga provavelmente está presente numa concentração acima do limite de detecção do teste. Já os resultados negativos indicam que a substância pesquisada não está presente na amostra ou está em concentração inferior ao limite de detecção, conseqüentemente a negatividade de uma amostra não exclui a presença da substância pesquisada (ARROYO et al., 2011; DATTA, 2013; KWONG T.C., 2007; MELANSON, 2012; PHIPPS et al., 2008).

Amostras com concentrações da droga pesquisada muito próximas ao limite de detecção dos imunoenaios podem gerar resultados falsos positivos ou negativos sendo, então, recomendada a aplicação de outras técnicas analíticas para a confirmação da presença do toxicante na amostra, para garantir a confiabilidade da triagem toxicológica (MELANSON, 2012; TIAFT, 2013).

Os manuais de perícias médico-legais (França, 2001; Croce, 2004) recomendam a coleta de amostras biológicas (conteúdo estomacal, sangue, urina, fígado, bile, cérebro, pulmão e rins) para o exame toxicológico, para complementar o laudo da necropsia de casos de MCE, especialmente em casos suspeitos de envenenamento e intoxicações. O órgão responsável por essa coleta e análise do toxicante é o Instituto Médico Legal de cada estado, em Goiás o Instituto de Criminalística Leonardo Rodrigues (ICLR) é responsável pela coleta e análise toxicológica dos casos de MCE.

O ICLR possui centenas de amostras biológicas de casos de MCE em seu acervo, além de uma deficiência em metodologias de triagem toxicológicas. Hoje apenas 3 peritos são responsáveis pela análise toxicológica de todos os casos de MCE pendentes e os novos. O armazenamento prolongado de amostras para triagem toxicológica prejudica a análise, uma vez que, os toxicantes sofrem diminuição da concentração ao longo do tempo (DRUMMER, 2004). Sendo assim, a implantação de técnicas de triagem rápidas e confiáveis como imunocromatografia e a ATS por HPLC-PDA acelerariam a análise dessa centena de casos arquivados no ICLR.

O objetivo deste projeto foi investigar os toxicantes (fármacos, drogas lícitas e ilícitas) envolvidos nos casos cadastrados no ICLR de março a outubro de 2013 empregando imunocromatografia associada a metodologia proposta por Pragst et al., assim como, estabelecer o perfil sócio-demográfico dos casos nos quais uma ou mais drogas ilícitas forem identificadas.

2 OBJETIVOS

2.1 Gerais

Otimizar e covalidar o método de análise toxicológica sistemática (ATS) em HPLC-PDA para sua aplicação em amostras de sangue *post-mortem* dos casos cadastrados no Instituto de Criminalística Leonardo Rodrigues (ICLR) da Secretária de Segurança Pública e Justiça do Estado de Goiás no período de março a outubro de 2013.

2.2 Específicos

- Otimizar o procedimento de extração e preparo de amostras *post-mortem*;
- Realizar a co-validação da metodologia analítica por HPLC- PDA com padrões das substâncias a serem estudadas;
- Pesquisar os toxicantes presentes nas amostras biológicas cedidas pelo ICLR;
- Comparar os resultados obtidos na imunocromatografia e na análise toxicológica sistemática por HPLC-PDA.

3 METODOLOGIA

3.1 Coleta das amostras

Após anuência da diretoria do Instituto de Criminalística Leonardo Rodrigues (ICLR) e aprovação do projeto no comitê de ética (CEP 007/2013). O ICLR recebe mensalmente 60 casos para análise toxicológica, as amostras de sangue recebidas devem estar acondicionadas em frasco de vidro âmbar e congeladas, não é adicionado nenhum anticoagulante ou conservante à amostra. Para a análise toxicológica realizada no ICLR são necessários 10 mL de sangue. Por tanto, foi definido como critério de exclusão, para o trabalho, as amostras que chegaram ao ICLR com um volume total de sangue menor que 10 mL.

Foram retirados 5 mL de sangue total de 35 amostras do ICLR, além dos seguintes dados sócio-demográficos: origem da amostra, sexo, ano e causa da morte.

3.2 Análise Imunocromatográfica

A análise imunocromatográfica foi realizada com o *kit* ABON[®] Multi Drogas para detecção qualitativa de anfetaminas e metabólitos, cocaína, benzodiazepínicos, maconha, metadona e metabólitos, opiáceos, antidepressivos tricíclicos. O teste imunocromatográfico utilizado é baseado no princípio de vínculos competitivos, ou seja, as drogas presentes (antígeno) na urina competem contra o conjugado respectivo da droga (antígeno marcado) para formar pontes no anticorpo fixado na linha do teste. Os fármacos, as drogas de abuso e seus metabólitos detectáveis pelo kit ABON[®] Multi Drogas estão apresentados no quadro 1.

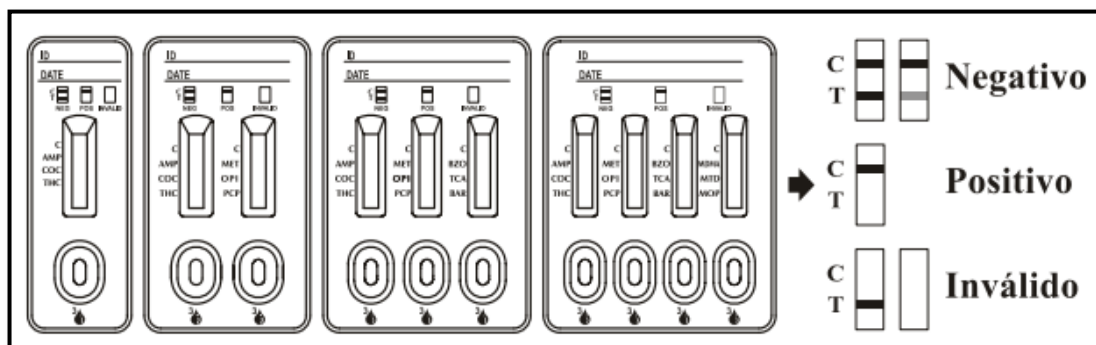
Quadro 1: Drogas e fármacos detectados pelo kit e seus respectivos limites de detecção.

Teste	Calibrador	Nível de Detecção (ng/ml)
Anfetamina (AMP)	d-Anfetamina	1.000
Anfetamina (AMP 500)	d-Anfetamina	500
Anfetamina (AMP 300)	d-Anfetamina	300
Barbitúricos (BAR)	Secobarbital	300
Benzodiazepinas (BZO)	Oxazepam	300
Buprenorfina (BUP)	Buprenorfina	10
Cocaína (COC)	Benzoilecgonina	300
Cocaína (COC 150)	Benzoilecgonina	150
Maconha (THC)	11-nor- Δ^9 -THC-9 COOH	50
Metadona (MTD)	Metadona	300
Metabolito da metadona (EDDP 100)	2-etilideno-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina (EDDP)	100
Metanfetamina (MET)	d-Metanfetamina	1.000
Metanfetamina (MET 500)	d-Metanfetamina	500
Metanfetamina (MET 300)	d-Metanfetamina	300
Metilenedioximetanfetamina (MDMA)	d,l-Metilenedioximetanfetamina	500
Morfina (MOP 300)	Morfina	300
Opiáceos (OPI 2000)	Morfina	2.000
Oxicodona (OXY)	Oxicodona	100
Fenciclidina (PCP)	Fenciclidina	25
Propoxifeno (PPX)	Propoxifeno	300
Antidepressivos Tricíclicos (TCA)	Nortriptilina	1.000
Tramadol (TRA)	Tramadol	100
Cetamina (KET 100)	Cetamina	100

Referência: Manual do *kit* ABON[®] Multi Drogas.

Visto que o teste imunocromatográfico utilizado foi desenvolvido para análise em urina, foi realizada uma adaptação do teste para a aplicação de amostras de sangue total, onde amostras de sangue muito viscosas foram diluídas na proporção de 1:1 com água ultrapura 18,2 M Ω , Gehaka[®]. Aplicou-se 200 μ l de sangue ou da amostra diluída no orifício do dispositivo de teste e aguardou-se alguns minutos (aproximadamente 5 min) até aparecerem as linhas vermelhas do controle, que garante que a amostra percorreu toda a fase estacionária. Os resultados foram interpretados de acordo com as orientações fornecidas pelo kit (Figura 1), sendo considerado resultado positivo quando não se observava a presença da linha do teste mas se observava a linha do controle, e negativo quando se observava a linha do teste e controle.

Figura 1: Interpretação do resultado da imunocromatografia.



Referência: Manual do *kit* ABON® Multi Drogas.

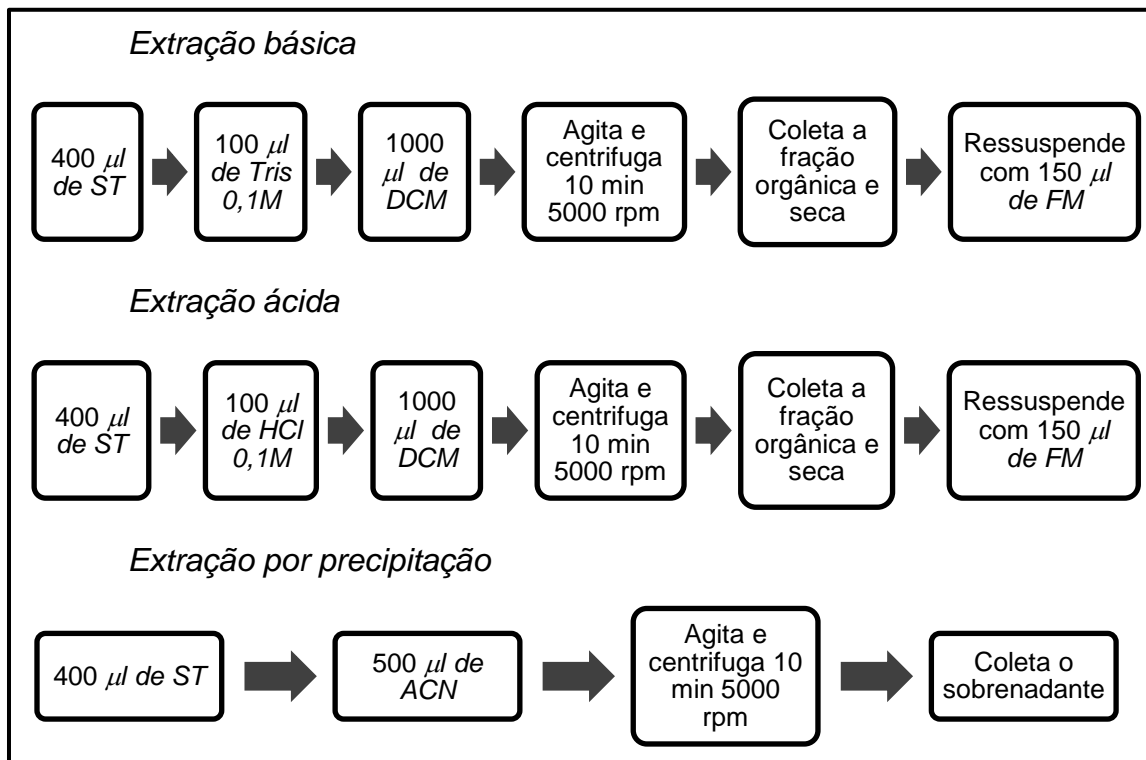
3.3 Análise Toxicológica Sistemática

3.3.1 Extração Líquido- Líquido (ELL)

O método de extração foi realizado como proposto por Pragst e colaboradores (2004) e otimizado para aplicação em amostras de sangue total. Utilizou-se 1000 μ L de diclorometano, o dobro do proposto na metodologia de Pragst et al., para evitar a emulsificação da amostra e garantir a completa separação do precipitado e do extrato.

Foram realizadas três extrações da amostra, em pH ácido, pH básico e uma por precipitação das proteínas da amostra (neutra), de acordo com o sugerido pelo guia da comissão de Análise Toxicológica Sistemática da TIAFT. O método de extração segue os seguintes fluxogramas apresentados na figura 2

Figura 2: Fluxogramas das extrações básica, ácida e por precipitação utilizadas na ATS por HPLC-PDA de amostras de sangue *post-mortem* provenientes do Instituto de Criminalística do Estado de Goiás.



Legenda: ST - sangue total; DCM – diclorometano; FM – fase móvel; ACN – acetonitrila.

3.3.2 Método de ATS por HPLC-PDA

O método analítico utilizado foi o proposto por Pragst et al. (2001). Utilizou-se HPLC-PDA Shimadzu Série Prominence Modelo 20AT, e o banco de dados UV-TOX. A metodologia proposta utiliza 3 diferentes misturas de acetonitrila e tampão fosfato pH 2,3. Sendo a mistura na proporção de 37:63 (ACN : TAMPÃO) a que abrange a maioria dos compostos da biblioteca, e a que foi utilizada no trabalho. As condições cromatográficas estão apresentadas no quadro 2.

Quadro 2: Condições cromatográficas da ATS.

Condições Cromatográficas	
Fluxo	1 mL/min
Fase Móvel	Acetonitrila e Tampao fosfato de potássio monobásico pH 2,3 (37:63)
Faixa de varredura do detector	200 nm a 380 nm
Coluna Cromatográfica	Lichrospher RP8ec, 5 µm, 250 x 4,0 mm, Merck®
Temperatura da coluna	ambiente
Tempo de corrida	30 min
Volume de injeção	20 µl

Antes de cada análise do dia, foi injetada uma amostra contendo os seguintes padrões:

- 0,1 mg/mL de cloridrato de histamina – esta substância tem o objetivo de determinar o tempo morto da coluna;
- 0,1 mg/mL de cafeína – é empregada para controle da precisão do injetor, uma vez que a área obtida é reprodutível e o padrão possui alta estabilidade;
- 0,1 mg/mL de MPPH (5-(4-metilfenil)-5-fenilhidantoina) – para cálculo do tempo de retenção relativo (T_{rr});
- 1 mg/mL de Benzeno – para controle da resolução, precisão e reprodutibilidade na medição dos espectros, pois este analito possui bandas de vibração entre 240 e 270 nm bem características, verificando assim a precisão do detector na obtenção dos espectros de UV.

Estes padrões garantem a calibração do sistema e são parâmetros utilizados para a determinação do tempo de retenção relativo, índice obtido pela razão do tempo de retenção de uma substância com o tempo de retenção de uma substância padrão ou de referência, através da seguinte fórmula:

$$I \quad T_{rr} = \frac{T_{rx} - T_0}{T_{rPAD} - T_0}$$

T_{rr} : Tempo de retenção relativo;

T_{rx} : Tempo de retenção do analito;
 T_0 : Tempo de retenção da histamina;
 T_{rPAD} : Tempo de retenção do MPPH.

3.3.3 Validação parcial do método ATS

Para a validação parcial do método foi avaliado o efeito matriz. Nesta análise a extração do sangue total foi realizada em triplicada nos pH ácido, básico e na precipitação, além de, uma solução com os padrões onde trocou-se a matriz por água ultrapura 18,2 MΩ, Gehaka[®]. O extrato (300 μL) e a solução, então, foram contaminados com os seguintes padrões na concentração de 10 μg/mL: hidroclorotiazida, furosemida, flunitrazepam, flurazepam, amitriptilina, clordiazepóxido, nitrazepam e diazepam. Calculou-se a média das áreas obtidas dos padrões para cada extração, e então foi calculado o fator de matriz normalizado (FMN) através da seguinte fórmula:

$$II \quad FMN = \frac{\text{Resposta do analito em matriz}}{\text{Resposta do analito em solução}}$$

Avaliou-se também o efeito residual através de três injeções de uma amostra branco (água e padrões), sendo uma antes e duas logo após a injeção de duas amostras processadas. O efeito residual foi avaliado através da análise dos cromatogramas, onde observou-se haver ou não a presença de picos interferentes nos tempos de retenção.

3.3.4 Identificação dos toxicantes presentes nas amostras

Os seguintes passos foram seguidos para identificação da(s) substância(s) presente(s) nas amostras:

I. Cada pico cromatográfico encontrado foi integrado normalmente para que o software pudesse realizar o cálculo de pureza do mesmo. A partir do cálculo de pureza do pico verificou-se se ele pertencia a uma ou mais substâncias e também

permitiu escolher o melhor tempo de retenção para tomada do espectro UV para comparação com a biblioteca;

II. Posteriormente, calculou-se o T_{rr} do analito. Para seleção da biblioteca na qual seria realizada a comparação do espectro UV, foi selecionada uma biblioteca pertencente a um T_{rr} menor e um maior para realizarmos a busca;

III. A comparação dos espectros de UV foi realizada pelo software do equipamento na faixa de 200 a 380nm, não necessariamente toda faixa foi utilizada.

IV. A substância foi identificada quando o índice de similaridade (IS) obtido foi maior que 0,995 para faixa de comprimento de onda selecionado.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Epidemiologia

As análises toxicológicas se tornam mais complexas devido a diversidade das matrizes, disponibilidade de pequenas quantidades de amostra e pouca ou nenhuma informação do histórico da amostra (LINDEN, 2007). Os problemas relatados por Linden (2007) foram observados neste trabalho, no qual 45% (n=16) dos casos não possuíam histórico. Já a amostragem reduzida, 35 amostras em 8 meses de coleta, foi em decorrência do critério de exclusão, no qual amostras com volume total menor que 10 mL de sangue não seriam coletadas, o que excluiu aproximadamente 90% das amostras recebidas pelo ICLR de março a outubro de 2013.

De acordo com o Sistema Informação de Mortalidade (SIM) a maioria das mortes por causas externas (MCE) ocorrem no sexo masculino, cerca de 80% do total (BRASIL, 2011). De acordo com o levantamento realizado neste trabalho, um comportamento semelhante foi observado na presente amostra, onde 80% (n=28) das amostras pertenciam a indivíduos do sexo masculino.

Das 19 amostras com histórico da morte, a principal causa de óbitos foram os acidentes de transporte terrestre (ATT) que representam 47% (n = 9) dos casos, concordando com os dados do Ministério da Saúde onde os ATT representam 30% dos casos de MCE (BRASIL,2011).

4.2 Validação parcial do método de ATS

De acordo com a RDC 899/2003 o método utilizado neste trabalho pertence a categoria IV (testes de Identificação) (BRASIL, 2003). Para aplicação da metodologia analítica proposta por Pragst et al.(2001), foi realizada uma validação parcial visando garantir a confiabilidade dos resultados obtidos. Para tanto, analisou-se o efeito matriz através do cálculo do fator de matriz normalizado (FMN) que foi inferior a 2% para as áreas de todos os padrões (Tabela 1) (Figuras 3 e 4), valor de acordo com a RDC da ANVISA 27/2012 que determina um valor inferior a 10% para

o FMN. Na análise do efeito residual não foi observado nenhum pico interferente na amostra branco, como pode se observar nos cromatogramas da figura 5.

A hidroclorotiazida e furosemida foram escolhidas por serem substâncias proibidas em competições esportivas, sendo pesquisadas em análises anti-doping. Os benzodiazepínicos flunitrazepam, flurazepam, amitriptilina, clordiazepóxido, nitrazepam e diazepam foram utilizados por terem sido muito observados em casos de intoxicação medicamentosa (BRASIL, 2006; FIOCRUZ, 2010) (Tabela 1).

Tabela 1: Média e desvio padrão (σ) das áreas (mAu) obtidas para cada padrão em concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, em matriz e em solução e respectivo Fator de Matriz Normalizado.

Padrão	Neutro			Ácido			Básico		
	A.M.	A.S.	FMN	A.M.	A.S.	FMN	A.M.	A.S.	FMN
Hidroclorotiazida	273468	2945828	1,07	27346	18456	0,67	27346	247600	0,90
	σ 3,27	σ 1,09		σ 1,76	σ 1,03		σ 2,03	σ 2,02	
Furosemida	238693	2259638	0,94	23869	16038	0,67	23869	246513	1,03
	σ 2,07	σ 1,01		σ 2,04	σ 2,37		σ 2,76	σ 1,78	
Flunitrazepam	616879	5931437	0,96	61687	38086	0,61	61687	577944	0,93
	σ 2,92	σ 3,19		σ 1,09	σ 1,67		σ 2,31	σ 1,87	
Flurazepam	333799	3284368	0,98	33379	21130	0,63	33379	344585	1,03
	σ 3,25	σ 1,03		σ 2,91	σ 3,09		σ 2,07	σ 1,53	
Amitriptilina	74324	73029	0,98	97618	73029	0,74	58331	73029	1,25
	σ 1,23	σ 2,87		σ 2,03	σ 1,07		σ 1,72	σ 2,53	
Clordiazepóxido	47749	41186	0,86	52579	41186	0,78	31303	41186	1,31
	σ 2,67	σ 3,01		σ 3,01	σ 2,37		σ 2,69	σ 1,86	
Nitrazepam	26961	21632	0,80	34406	21632	0,62	20482	21632	1,05
	σ 1,57	σ 1,13		σ 2,47	σ 1,89		σ 2,04	σ 2,57	
Diazepam	26497	24468	0,92	32200	24468	0,75	19225	24468	1,27
	σ 1,93	σ 2,26		σ 3,11	σ 2,61		σ 1,42	σ 1,67	

Legenda: A.M.: Área em Matriz; A.S.: Área em Solução; FMN: Fator Matriz Normalizado.

Figura 3: Cromatogramas da triplicada do efeito matriz em diferentes pH: pH ácido, pH básico e precipitação. O extrato foi contaminado com os padrões: hidroclorotiazida (1), flurazepam (2), furosemida (3) e flunitrazepam (4), a uma concentração de 10 µg/mL.

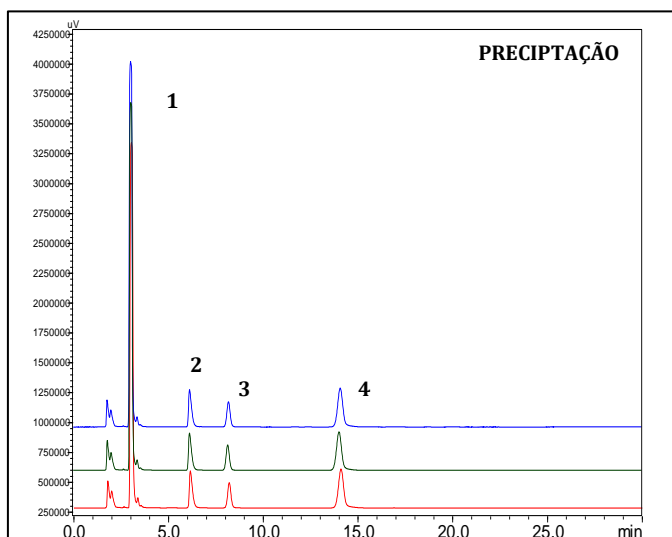
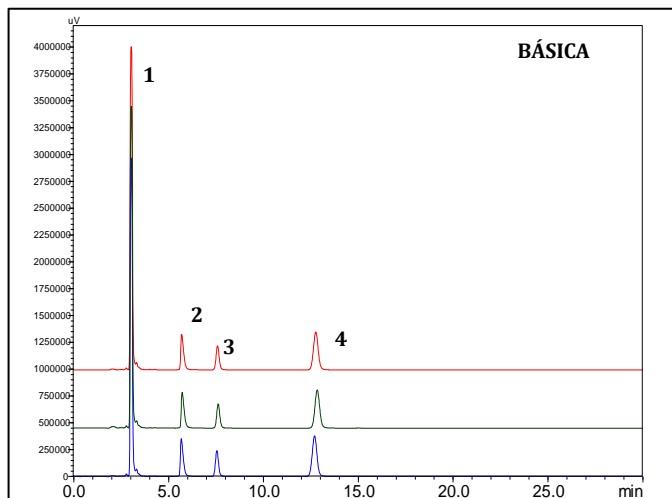
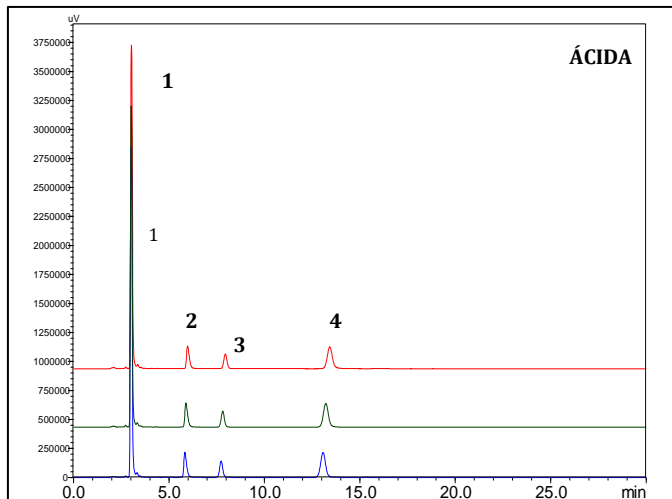


Figura 4: Cromatogramas comparando a influência da matriz na extração em pH ácido, básico e precipitação. Em azul padrões extraídos e em vermelho não extraídos. Padrões de clordiazepóxido (1), nitrazepam (2), amitriptilina (3) e diazepam (4) em concentrações de 10 µg/mL.

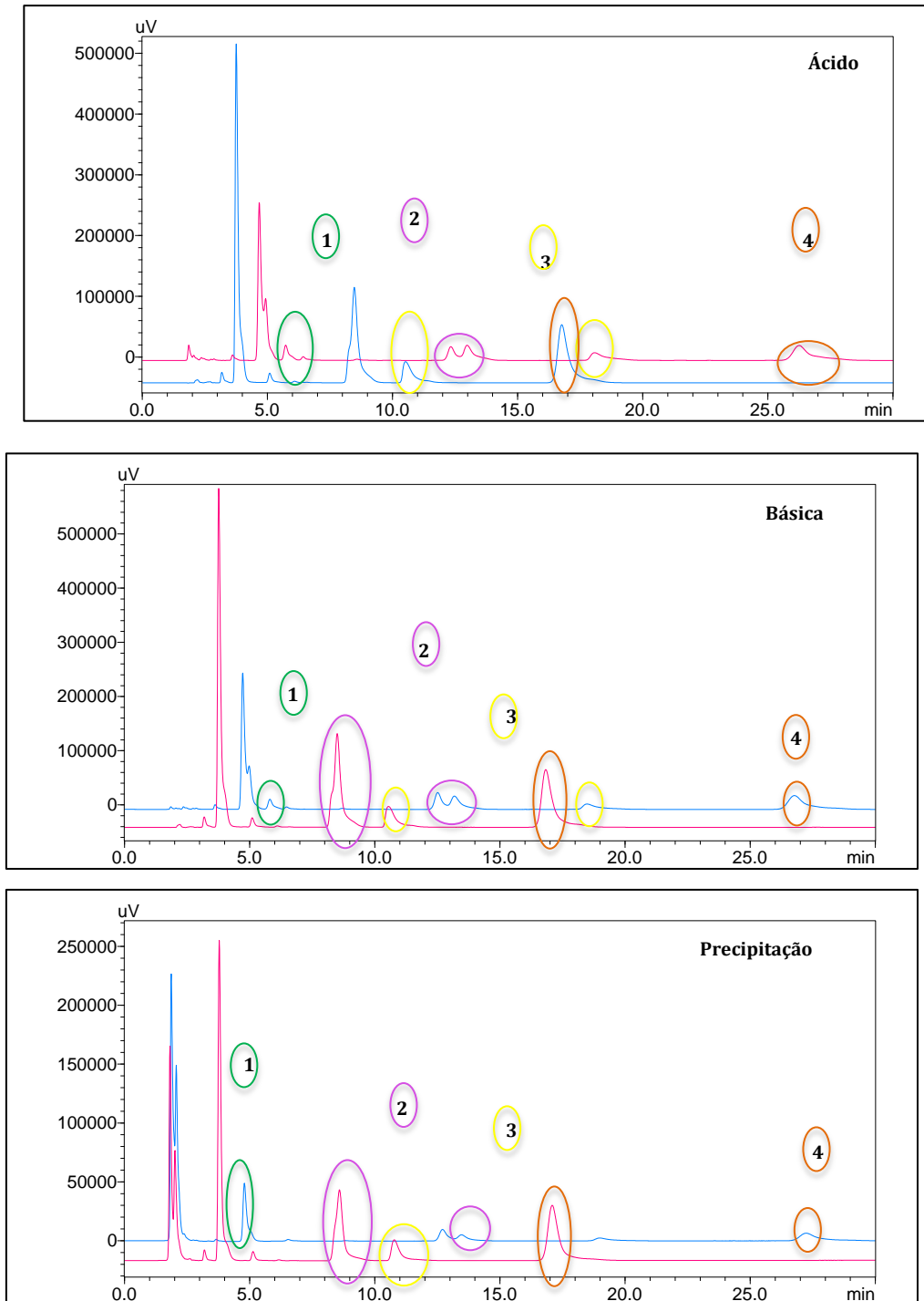
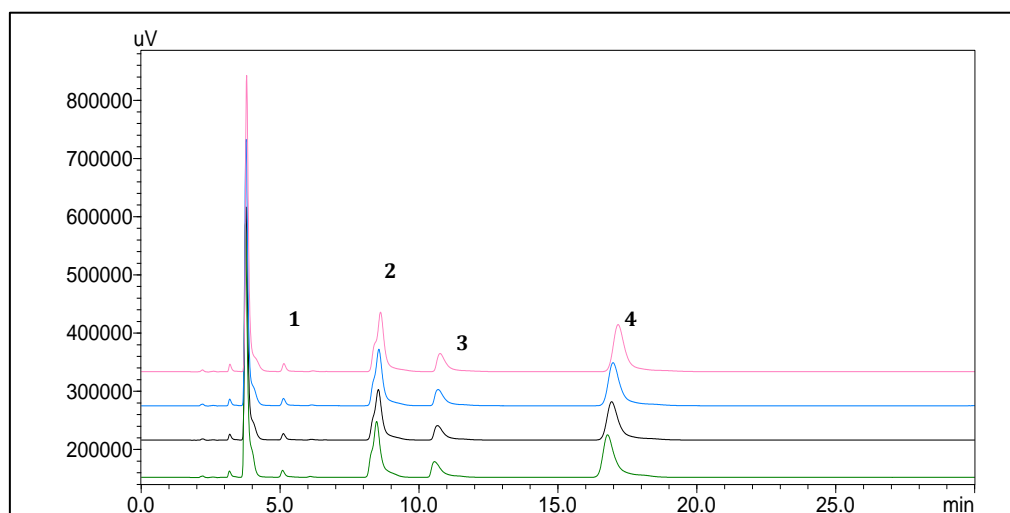


Figura 5: Cromatogramas obtidos por HPLC-PDA a partir do estudo do efeito residual de acordo com a RDC 27/2012. Solução aquosa com os seguintes padrões: (1) Clordiazepóxido, (2) nitrazepam, (3) amitriptilina, (4) diazepam em concentração de 10 µg/mL.



4.3 Comparação dos resultados obtidos na triagem por imunocromatografia e por HPLC-PDA.

Segundo o guia da TIAFT, as análises toxicológicas são compostas pelas seguintes etapas: detecção, identificação, quantificação das substâncias de interesse toxicológico e interpretação dos resultados. Para uma identificação segura do toxicante é recomendada a utilização de pelo menos dois métodos analíticos diferentes (GONZÁLEZ, 2012). Seguindo essas orientações utilizou-se a imunocromatografia e a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo diodos (HPLC-PDA) para a triagem das amostras, cujos resultados obtidos pelos dois métodos estão apresentados na Figura 6 e na Tabela 2.

Figura 6: Comparação dos resultados obtidos na triagem das amostras (n=35) por imunocromatografia e por HPLC-PDA.

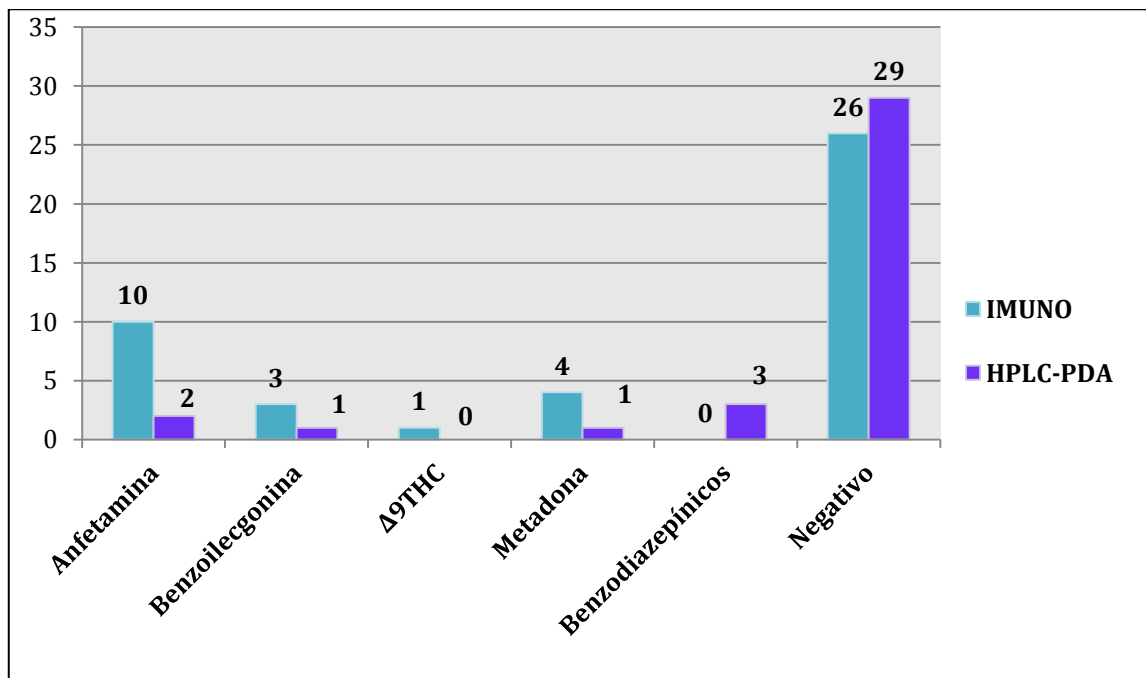


Tabela 2: Quadro comparativo dos resultados obtidos por imunocromatografia e análise toxicológica sistemática (ATS).

AMOSTRA	SEXO	HISTÓRICO	IMUNOCROMATOGRÁFIA	ATS	T _r (min)
1	M	acidente com trator	-	-	-
2	M	N/C	anfetamina; metadona	glutetimida; fenitoína	5,9; 5,8
3	F	N/C	-	bromazepam	4,8
4	M	encontro de cadáver	-	-	-
5	M	encontro de cadáver	anfetamina; div. metadona	propargite	4,1
6	M	N/C	-	-	-
7	F	N/C	cocaína; anfetamina	-	-
8	M	N/C	anfetamina; metadona e MDMA	norpseudoefedrina (catina)	2,5
9	M	N/C	Anfetamina; div. benzodiazepínico	fenitoína	7,6
10	M	N/C	div cocaína	diflubenzuron	2,5
11	M	N/C	anfetamina; div. metadona	captagon® - fenetilina; cetobemidona	2,7 / 2,3
12	M	N/C	anfetamina; metadona	dalapon	1,3
13	M	homicídio	-	-	-
14	M	suicídio por asfixia	-	-	-
15	M	acidente de trânsito	-	-	-
16	M	acidente de trânsito	anfetamina e THC	-	-
17	F	intoxicação exógena	-	-	-
18	M	a esclarecer	-	-	-
19	F	intoxicação medicamentosa	-	7-aminoflunitrazepam	4,1
20	M	N/C	-	-	-
21	M	acidente de trânsito	anfetamina	-	-
22	F	morte súbita	div. benzodiazepínico	-	-

23	F	acidente de trânsito	-	-	
24	M	morte natural	-	-	
25	M	acidente de trânsito	-	-	
26	M	a esclarecer	-	α -hidroxibrotizolam	2,4
27	M	acidente de trânsito	-	-	
28	M	acidente de trânsito	anfetamina; metadona; cocaína	feniletilamina	2,4
29	M	N/C	Cocaína	benzoilecgonina	2,6
30	F	afogamento	-	-	
31	M	afogamento	-	-	
32	M	acidente de trânsito	-	midazolam	5,1
33	M	homicídio por PAF	-	-	
34	M	N/C	-	-	
35	M	encontro de cadáver	-	-	

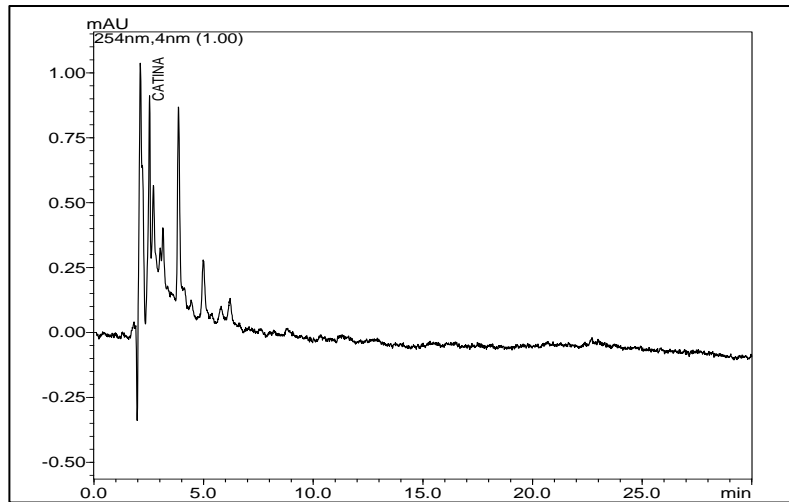
Legenda: M – masculino; F- feminino; N/C –não consta; PAF – projétil de arma de fogo

Na figura 6 pode ser observada a semelhança do número de casos negativos nas duas técnicas, n = 26 na imunocromatografia e n = 29 na ATS por HPLC-PDA. De acordo com a tabela 2, dezoito casos foram negativos, para substâncias de relevância toxicológica, em ambos ensaios. Essa concordância dos resultados negativos para toxicantes demonstra a capacidade das duas técnicas, quando associadas, em excluir falsos negativos.

No ensaio imunocromatográfico foram encontradas 10 amostras positivas para anfetamina, no entanto, na ATS por HPLC-PDA apenas duas amostras, 8 e 11, foram positivas para esta substância (Tabela 2). Os imunoensaios para detectar anfetaminas são divididos em dois tipos: os específicos para anfetamina e metanfetamina e os que tem reação cruzada com outras anfetaminas, como as anfetaminas modificadas (MDMA, MDA, MDEA), e aminas simpatomiméticas (efedrina, pseudoefedrina) (KWONG,2007). Segundo o fabricante o *kit* ABON[®] Multi Drogas, utilizado neste trabalho, possui anticorpos específicos para detectar anfetaminas e metanfetaminas, porém pelos resultados obtidos por ATS pode ter ocorrido reação cruzada com outras anfetaminas.

Como mostram as figura 7 e 8, na análise ATS por HPLC-PDA duas anfetaminas foram detectadas no extrato básico das amostras 8 e 11. A norpseudoefedrina ou catina (IS = 0,997) e fenetilina ou Captagon[®] (IS = 0,996), respectivamente.

Figura 7: Cromatograma do extrato básico da amostra 8 (1) e espectro UV (2) da catina (norpseudoefedrina) cujo o índice de similaridade foi 0,997.

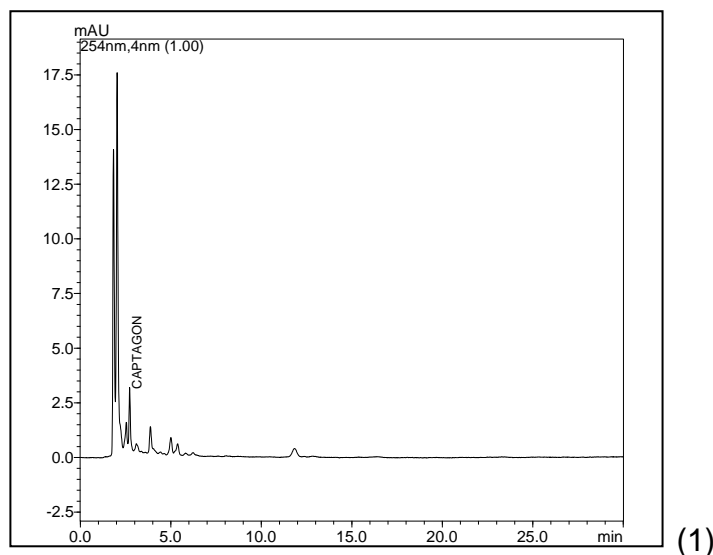


(1)



(2)

Figura 8: Cromatograma do extrato básico da amostra 11 (1) e espectro UV (2) da captagon (fenetilina) cujo o índice de similaridade foi 0,996.



(1)



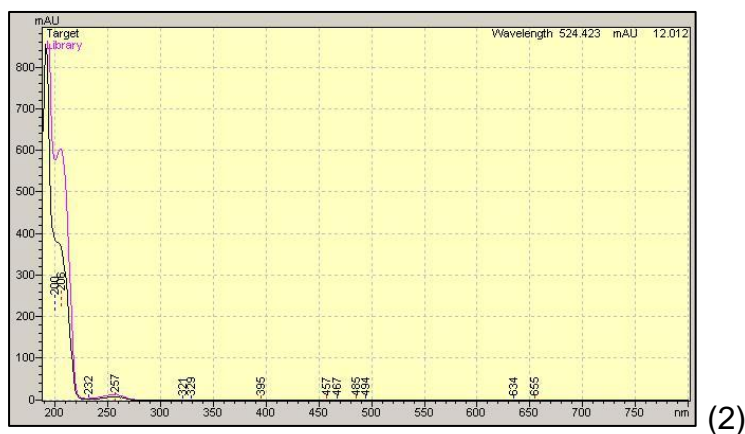
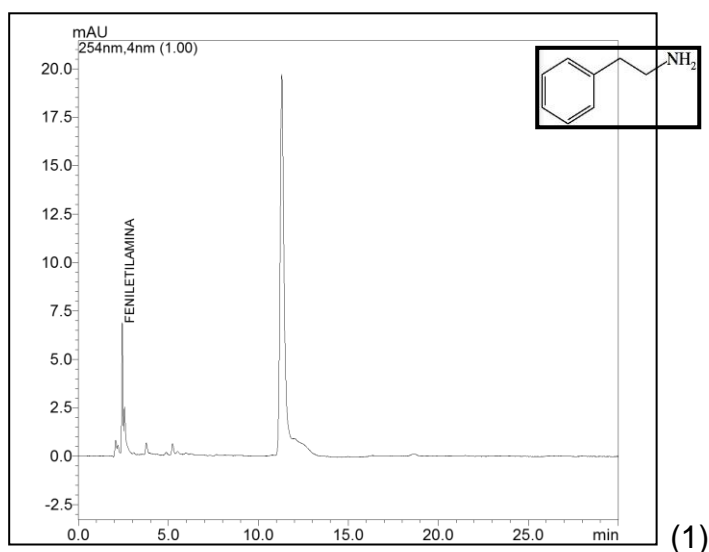
(2)

As oito amostras restantes que foram positivas para anfetaminas apenas no imunocromatográfico podem representar resultados falsos-positivos. Porém seria necessário uma técnica de confirmação como GC-MS para poder descartar a presença destes compostos. A especificidade do anticorpo, em ensaios desenvolvidos para detectar uma classe de drogas, pode variar dentro dessa classe, gerando resultados falsos-positivos ou falsos-negativos (ARROYO, 2011; MELANSON, 2012). Os resultados falso-

positivos em imunocromatografia podem ocorrer quando existe na amostra outras substâncias com estrutura química semelhante à da droga-alvo do teste (CASSEY, 2011).

Na amostra 28 foi detectada a feniletilamina (IS = 0,997), por HPLC-PDA. A feniletilamina é um alcalóide com estrutura semelhante a da classe das anfetaminas (figura 9), sendo um neurotransmissor monoamínico, biossintetizado através da descarboxilação enzimática do aminoácido fenilalanina (MANTEGAZZA e RIVA, 1963). Segundo Melanson (2006) alguns compostos simpatomiméticos reagem de forma cruzada com anticorpos monoclonais específicos para a classe das anfetaminas. A figura 9 mostra os resultados obtidos por HPLC-PDA.

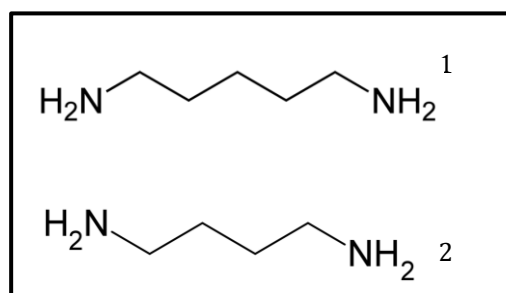
Figura 9: Cromatograma do extrato básico da amostra 28 e estrutura química da feniletilamina (1) e espectro UV (2) da feniletilamina, cujo o índice de similaridade foi 0,997.



As anfetaminas são constituídas por uma classe com vários compostos de estruturas muito semelhantes, sendo que alguns possuem relevância toxicológica (metanfetamina, MDMA, MDA, MDEA, fenetilina) e outros não (efedrina, pseudoefedrina). Sendo assim, outras metodologias analíticas são necessárias para a identificação definitiva da anfetamina presente na amostra (CASSEY, 2011).

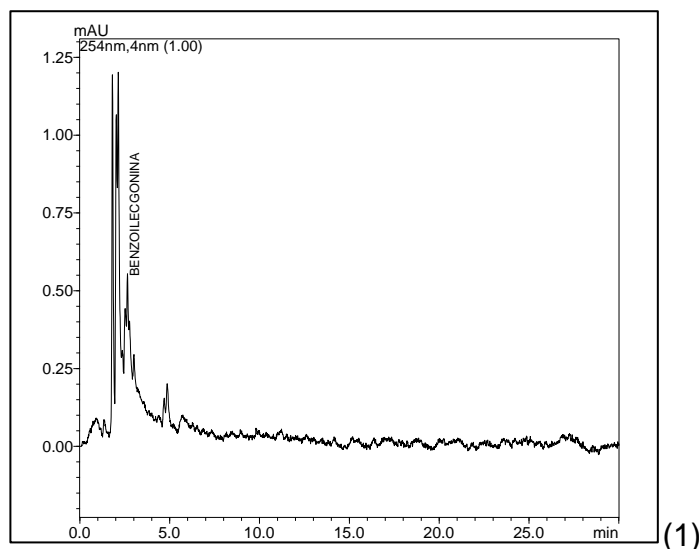
Como as amostras analisadas no trabalho são de sangue *post-mortem*, deve-se considerar as reações bioquímicas que acontecem após a morte. Estas reações produzem alguns compostos, como cadaverinas e putrescinas, que podem induzir a resultados errôneos (DRUMMER, 2004). Sendo assim, tanto as cadaverinas como as putrescinas, cujas estruturas são apresentadas na figura 10, podem ter reagido de forma cruzada com os anticorpos específicos para anfetamina do teste imunocromatográfico, devido a similaridade estrutural das substâncias.

Figura 10: Estrutura química das cadaverinas (1) e putrescinas (2).



No imunoensaio foram encontradas 3 amostras positivas para benzoilecgonina, enquanto na ATS por HPLC-PDA apenas a amostra 29 foi positiva com índice de similaridade de 0,999 (figura 11).

Figura 11: Cromatograma do extrato básico da amostra 29 (1) e espectro UV (2) da benzoilecgonina, cujo o índice de similaridade foi 0,999.



(1)



(2)

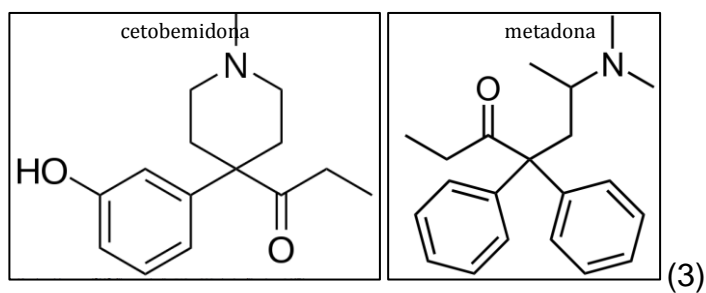
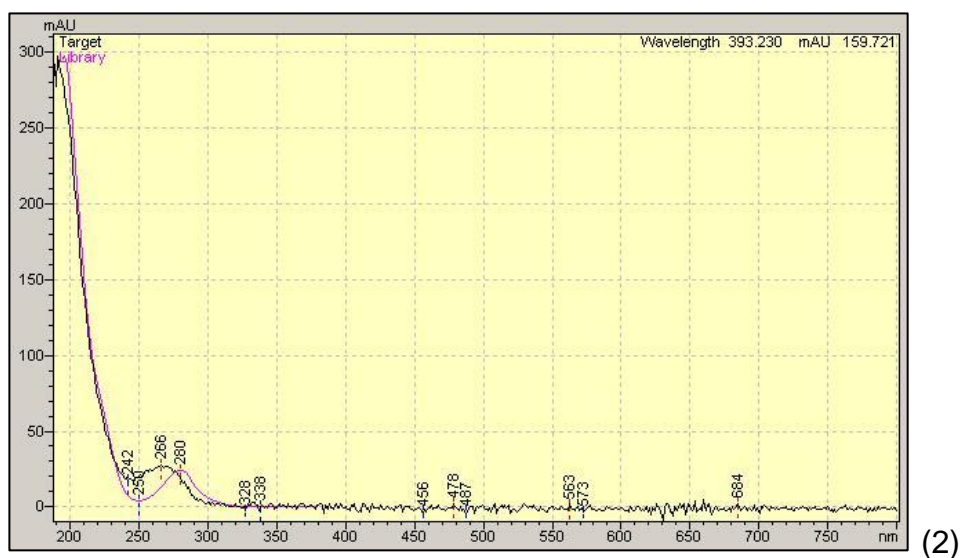
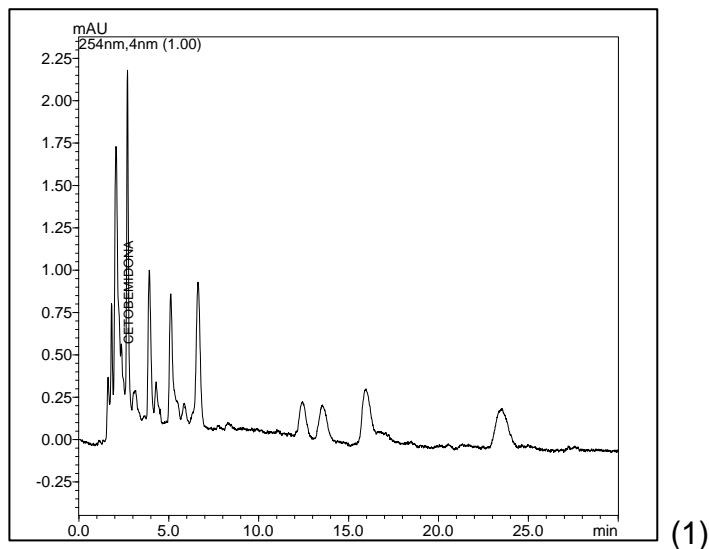
O método de ATS por HPLC-PDA é um método de triagem recomendado para casos de intoxicação aguda, sendo seu limite de detecção, superior ao da imunocromatografia que são de 150 ng/mL para COC 150 e 300 ng/mL para COC. O elevado limite de detecção também se aplica ao resultado positivo para Δ^9 THC apenas no imunoensaio. No trabalho de Mundim (2010) foi demonstrado que a ATS quando aplicada a casos onde a concentração plasmática da substância está em níveis tóxicos a taxa de acerto na identificação do toxicante chega a 78%, enquanto o acerto na

identificação de substâncias em concentrações terapêuticas não chega a 30%.

Segundo Drummer (2004) amostras armazenadas sob refrigeração por um longo período de tempo sofrem diminuição da concentração de benzoilecgonina e/ou Δ^9 THC. As amostras 7 e 10, positivas para benzoilecgonina no imunoensaio, são de 2008 e a amostra 16 positiva para Δ^9 THC é de 2011, portanto a concentração dessas substâncias nas amostras de sangue podem estar abaixo dos níveis tóxico, dificultando a detecção por ATS em HPLC-PDA.

A amostra 11 no imunoensaio apresentou resultado duvidoso para metadona, enquanto na cromatografia líquida foi detectada a cetobemidona (IS= 0,996), um analgésico opióide de estrutura química semelhante a da metadona (Figura 12).

Figura 12: Cromatograma do extrato ácido da amostra 11 (1) e espectro UV (2) da cetobemidona, cujo o índice de similaridade foi 0,996. (3) estrutura química cetobemidona e metadona.



Um dos parâmetros estatísticos de avaliação do método de ATS é o comprimento médio da lista (CML), trata-se do número de substâncias qualificáveis para um determinado parâmetro de identificação, quanto mais próximo de 1 for o valor de CML mais poderoso é o método de identificação. O CML da associação do tempo de retenção relativo e o espectro UV é de 1,2 (LINDEN, 2007; LINDEN 2010). Sendo assim, é necessária a aplicação de outro método analítico para a identificação correta de substâncias com estruturas químicas muito semelhantes ou substâncias pertencentes a mesma classe, como a metadona e cetobemidona ambas opióides.

Na ATS por HPLC-PDA foram encontradas 2 amostras positivas para benzodiazepínicos e 2 para metabólitos. Nas amostras 3 e 32 foi detectado bromazepam (IS = 0,995) (Figura 13) e midazolam (IS = 0,997) (Figura 14), respectivamente. Enquanto nas amostras 19 e 26 os metabólitos encontrados foram 7-aminoflunitrazepam (IS = 0,997) (Figura 15) e α -hidroxibrotizolam (IS = 0,997) (Figura 16). Outro hipinótico-sedativo identificado, na ATS, foi a glutetimida (Doriden®), com índice de similaridade de 0,999, que foi detectada no extrato básico da amostra 2 (Figura17).

Figura 13: Cromatograma do extrato ácido da amostra 3 (1) e espectro UV do bromazepam (2), cujo o índice de similaridade foi 0,995.

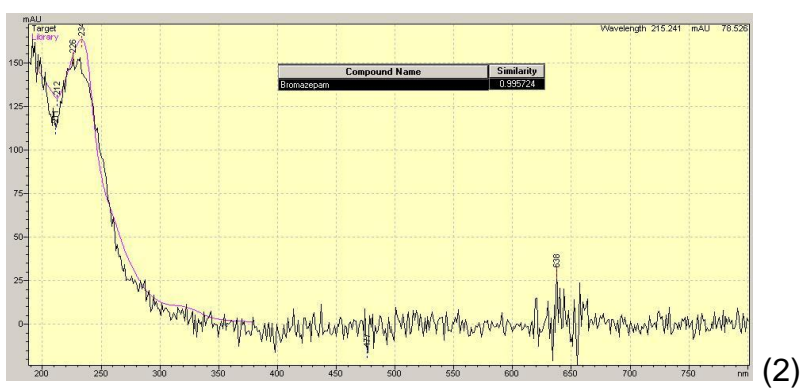
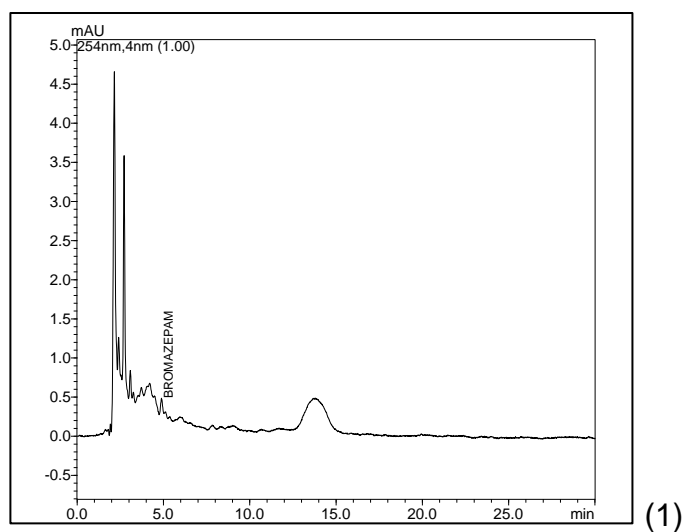
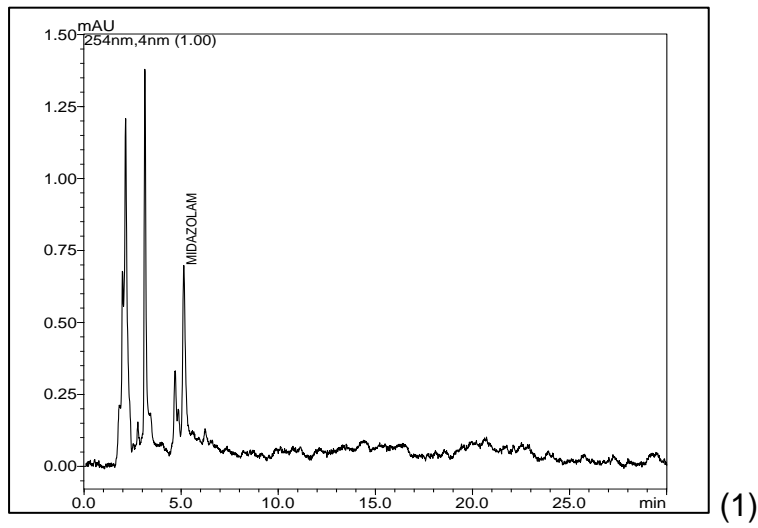


Figura 14: Cromatograma do extrato básico da amostra 32 (1) e espectro UV (2) do midazolam (IS = 0,997).



(1)



(2)

Figura 15: Cromatograma do extrato básico da amostra 19 (1) e espectro UV (2) do 7-aminoflunitrazepam (IS = 0,997).

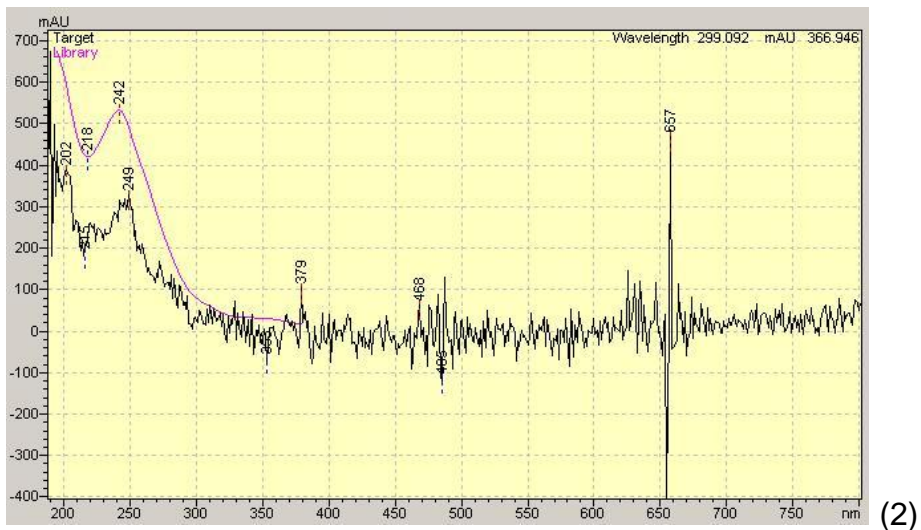
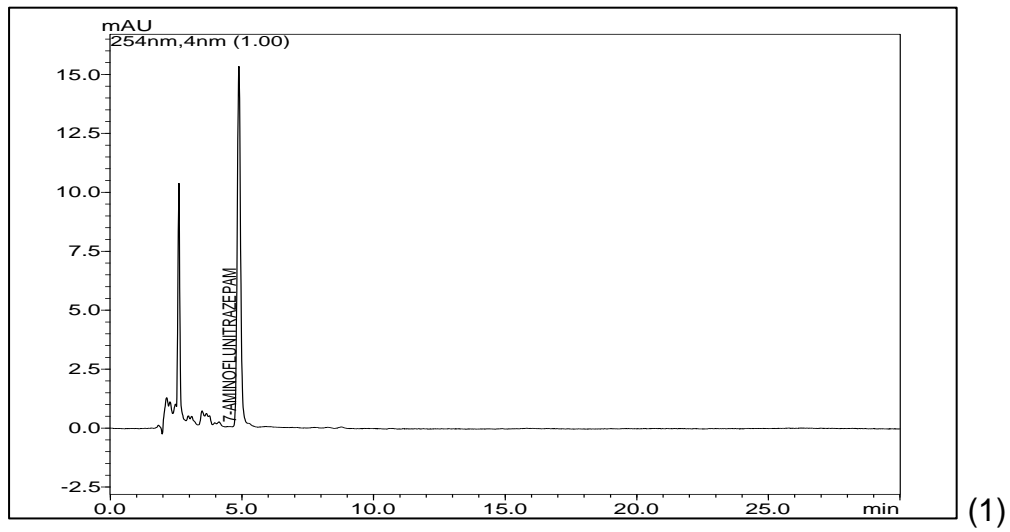


Figura 16: Cromatograma do extrato básico da amostra 26 (1) e espectro UV (2) do α -hidroxibrotizolam (IS = 0,997).

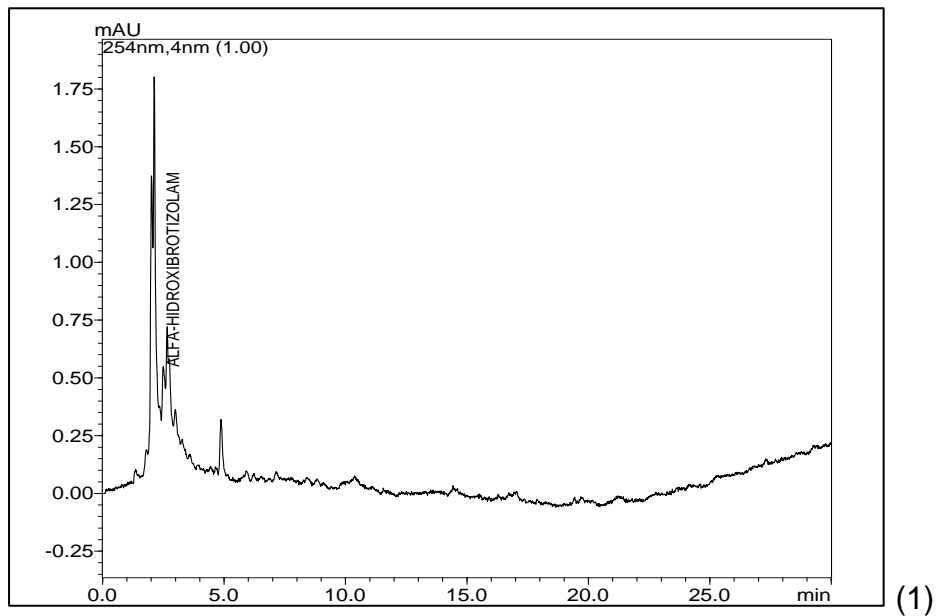
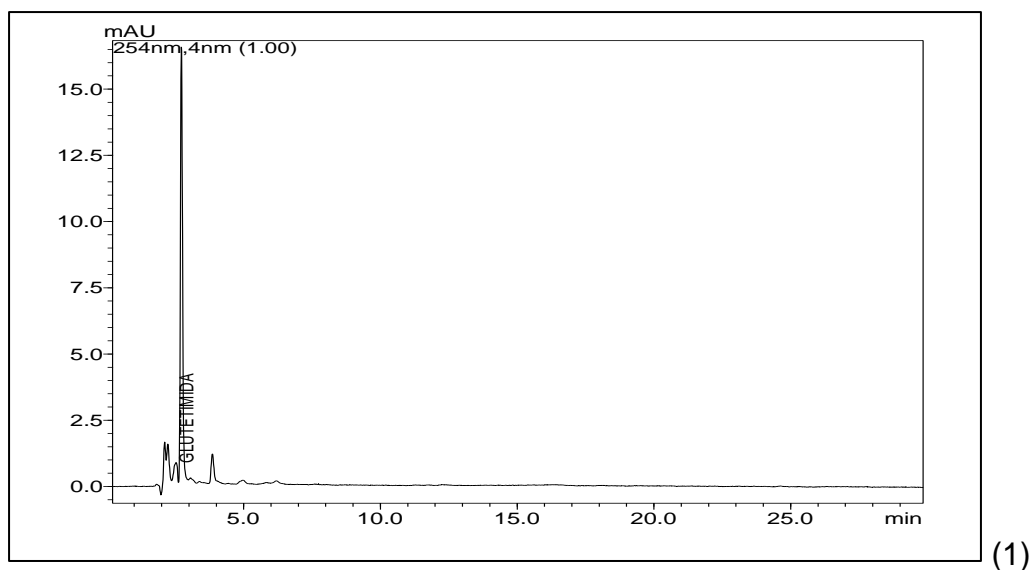


Figura 17: Cromatograma do extrato básico da amostra 2 (1) e espectro UV (2) da glutetimida (Doriden®) (IS=0,999).



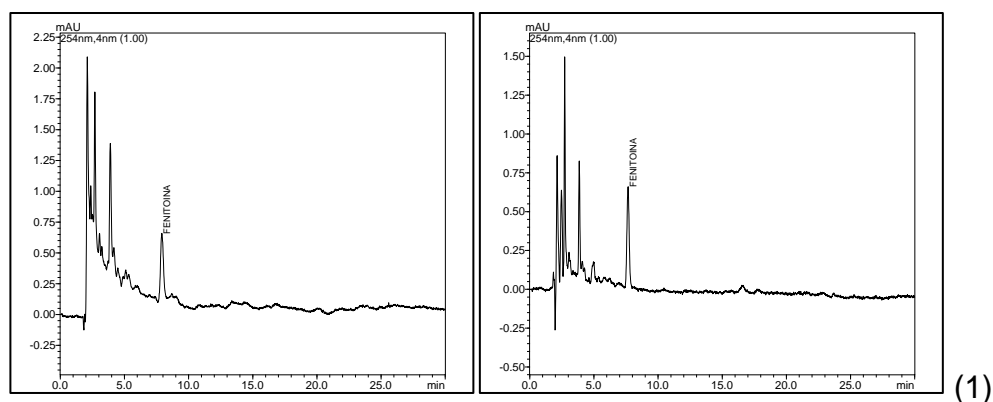
(1)



(2)

Segundo o histórico fornecido pelo ICLR, a amostra 19, na qual detectou-se o metabólito do flunitrazepam, é um caso de intoxicação medicamentosa. Já na amostra 9 foi identificada fenitoína (Figura 18), anticonvulsivante, tanto no extrato básico como no ácido, com índice de similaridade de 0,999. Segundo o SINITOX, a maioria das intoxicações medicamentosas são provocadas por medicamentos, principalmente os ansiolíticos, os antidepressivos, os analgésicos e os anticonvulsivantes (FIOCRUZ, 2010).

Figura 18: Cromatograma do extrato ácido e básico, respectivamente, da amostra 9 (1) e espectro UV da fenitoína (IS=0,999) (2).



Na ATS por HPLC-PDA também foram detectadas 3 amostras positivas para os seguintes pesticidas: propargite (IS = 0,996) (Figura 19), diflubenzuron (IS = 0,995) (Figura 20), dalapon (IS = 0,998) (Figura 21). De acordo com o Ministério da Saúde o propargite e o dalapon são classificados como moderadamente tóxicos, classe III e o diflubenzuron como pouco tóxico, classe IV (BRASIL,1992). O diflubenzuron é utilizado no controle do *Aedes aegypti* e segundo a OMS (2007) é um produto seguro a saúde humana. Nenhuma das amostras possui histórico, o que impossibilita uma associação entre a causa da morte e a detecção dessas substâncias nas análises por ATS.

Figura 19: Cromatograma do extrato básico da amostra 5 (1) e espectro UV(2) do propargite (IS=0,996).

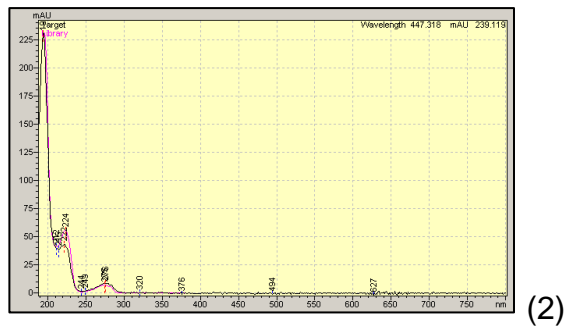
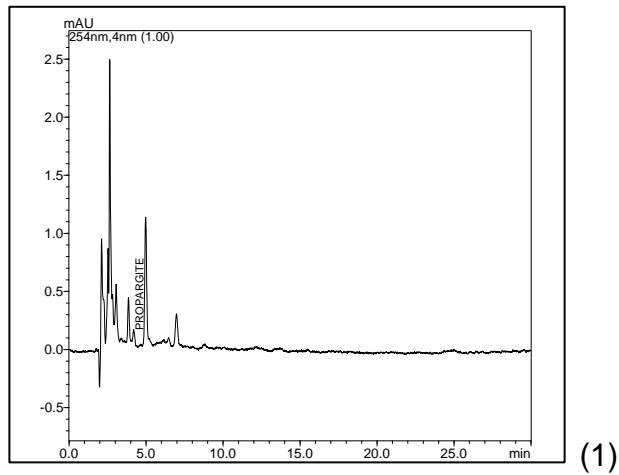
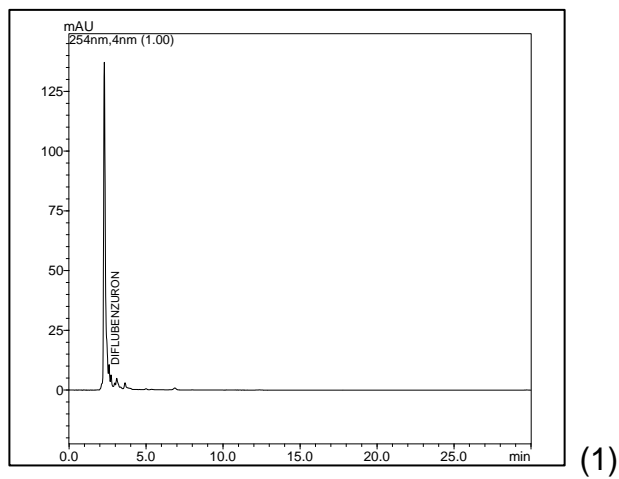


Figura 20: Cromatograma do extrato básico da amostra 10 (1) e espectro UV (2) do diflubenzuron (IS=0,995).



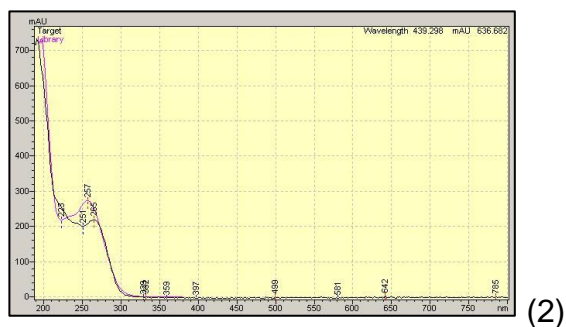
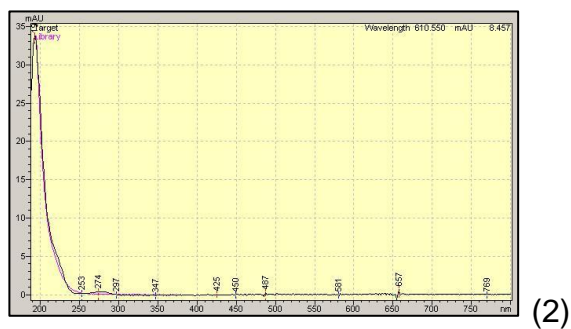
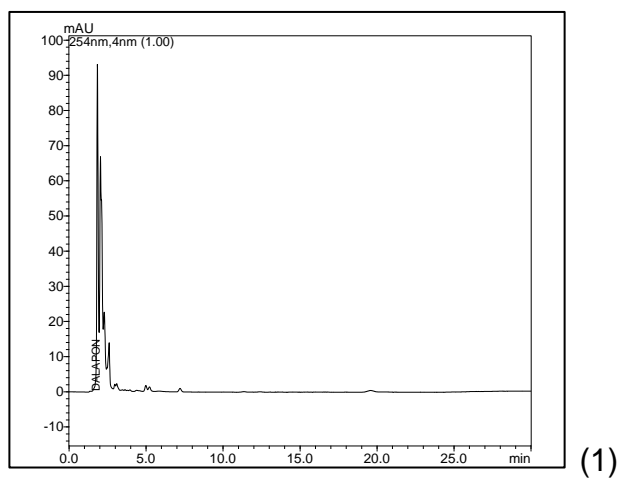


Figura 21: Cromatograma do extrato básico da amostra 12 (1) e espectro UV (2) do dalapon (IS=0,998).



Na análise toxicológica sistemática por HPLC-PDA foram detectadas várias substâncias sem relevância toxicológica como por exemplo: alguns hormônios endógenos, como ocitocina, cortisol, somatostatina; alguns fármacos, como anti-hipertensivos, antilipêmicos, antifúngicos, antibióticos, relaxantes musculares, antiinflamatórios; várias amostras foram positivas para xantinas, como cafeína, teofilina e teobromina.

O método proposto por Pragst e colaboradores (2001), indica a utilização de três misturas de acetonitrila e tampão fosfato pH 2,3 em diferentes proporções, sendo a mistura na proporção de 37:63 a que elui aproximadamente 90% dos compostos presentes na base de dados, as outras duas misturas são para compostos com alto tempo de retenção e para os que eluem em tempo de retenção inferior ao da histamina. Desta forma a mesma amostra é analisada em três condições diferentes e a triagem abrange analitos com diferentes propriedades físico-químicas. Não utilizamos as três fases no trabalho por não haver disponíveis os padrões de T_{rr} respectivos (4-fenilbenzofenona e salicilamida).

5 CONCLUSÃO

O método de ATS por HPLC-PDA mostrou-se como uma ferramenta útil para ser aplicada na triagem em amostras de sangue *post-mortem*. A técnica de extração mostrou-se eficiente para aplicação em uma matriz complexa como o sangue total *post-mortem*, assim como, a triagem por imunocromatografia.

No entanto, a grande quantidade de reações cruzadas entre substâncias com estrutura química semelhantes além do elevado limite de detecção do método de ATS por HPLC-PDA faz-se necessária a utilização de outros métodos analíticos para a confirmação da identidade das substâncias detectadas.

A aplicação da ATS por HPLC-PDA na rotina do ICLR aceleraria o processo de triagem do instituto, e asseguraria a reprodutibilidade das análises. Tornando o processo de triagem das amostras , ainda, mais confiável e eficaz.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. ANVISA. **Levantamento de laboratórios analíticos de toxicologia forense**. 2004. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br>. Acesso em: Nov de 2013.

BRASIL. ANVISA. **Resolução RE nº 27, De 17 de maio de 2012**. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. 2012. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br>. Acesso em: 15 Dez de 2013.

BRASIL. ANVISA. **Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003**. Dispõe sobre o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 02 jun. 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 15 Dez de 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde, **PORTARIA Nº 03/MS/SNVS, DE 16 DE JANEIRO DE 1992**, regulamenta "diretrizes e orientações referentes à autorização de registros, renovação de registro e extensão de uso de produtos agrotóxicos e afins - nº 1, de 9 de dezembro de 1991". Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis.html>. Acesso em: 15 Dez de 2013.

BRASIL, Ministério da Saúde Secretaria de vigilância em saúde. **Mortalidade por Suicídio – Uma Análise Da Desigualdade Em Saúde**, 2006. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes> . Acesso em: 15 Dez de 2013.

BRASIL, Ministério da Saúde, **Mortalidade por acidentes e violências no Brasil: situação em 2010 e tendências de 2001 a 2010**, Secretaria de vigilância em saúde, 2011. <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes>. Acesso em: 15 Dez de 2013.

ARROYO A., SÁNCHEZ M., PALAHÍ M., BARBAL M. ,MARRÓN M.T.,MORA A.. Applicability of an on-site test for its use in post-mortem blood. **Legal Medicine**, v 13; p 240–244; 2011.

BOGUSZAND M.; WU M.. Standardized HPLC-DAD system, based on retention indices and spectral library, applicable for systematic toxicological screening. **J.Anal. Toxicol.** v 15; p 188-197; 1991.

BOGUSZAND M., ERKENS M.. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic database of retention indices and UV spectra of toxicologically relevant substances and its interlaboratory use. **J. Chromatogr.A**, v 674; p 97-126; 1994.

BORTOLETTO, M. É., BOCHER, R.. Impacto dos medicamentos nas intoxicações humanas no Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v 15(4); p 859-869; 1999.

CASSEY E.R, SCOTT M.G., TANG S., MULLINS M.E.. Frequency of false positive amphetamine screens due to bupropion using the Syva Emit II Immunoassay. **J Med Toxicol**. v 7(2); p 105–108; 2011.

CONE, E.J.; Legal, workplace, and treatment drug testing with alternate biological matrices on a global scale. **Forensic Sci. Int.**, v 121; p 7-15; 2001.

CROCE, D.; CROCE, D.J. Manual de Medicina Legal. Ed. Saraiva, 2004.

DATTA P.. Immunoassay Design And Mechanism Of Interferences. **Accurate results in the clinical laboratory: A Guide to Error Detection and Correction**. Cap 6; p 63, Ed. Elsevier, 2013.

DRUMMER O.H., Chromatographic screening techniques in systematic toxicological analysis. **Journal of Chromatography B**, v 733; p 27–45; 1999.

DRUMMER O.H., Postmortem toxicology of drugs of abuse. **Forensic Science International**. v 142; p 101–113, 2004.

FASSINA, V. & LINDEN, R. Análise toxicológica sistemática em toxicologia forense. **Rev. Bras. Toxic**, v 16; p 35-48, 2003.

FIOCRUZ, SINITOX - Sistema Nacional de Vigilância Toxicológica Farmacológicas. 2010. Disponível em: http://www.fiocruz.br/sinitox_novo. Acesso em: 15 Dez 2013.

FRANÇA, G.V. Medicina Legal. Ed. Guanabara Koogan, 2001.

GONZÁLEZ M.A.M, Criterios cualitativos en toxicología forense. **Rev Esp Med Legal**, v 38(2); p 68-75; 2012.

KOVES E.M.. Use of high-performance liquid chromatography- Diode array detection in forensic toxicology. **J. Chromatogr.A**. v 692, p 103-119, 1995.

KWONG T.C., Introduction to drugs of abuse testing. **Handbook of Drug Monitoring Methods: Therapeutics and Drugs of Abuse**; cap. 16, ed. Humana press, 2007.

LAMBERT, W. E., BOCXLAER, F. F. V., LEENHEER, A.P. Potential of high-performance liquid chromatography with photodiode array detection in forensic toxicology. **Journal of Chromatography B**, v. 689, p. 45-53, 1997.

LEVINE B. Postmortem forensic toxicology, cap 1, **Principles Of Forensic Toxicology**, 2 edicao, 2003.

LINDEN, R., FASSINA, V. Análise toxicológica sistemática em toxicologia forense. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v 16(1); p 35-48; 2003.

LINDEN, R., SARTORI, S., KELLERMANN, E., SOUTO, A. A. Identificação de substâncias em análise toxicológica sistemática utilizando um sistema informatizado para cálculo de parâmetros cromatográficos e busca em bases de dados. **Química Nova**, v. 30 nº 02, 2007.

LINDEN R., Feltraco L.L., Comerlato L.C., Kellermann E., Antunes M.V., Computer assisted substance identification in systematic toxicological analysis: New life for old methods?. **Forensic Science International**. v 202; p e53–e60; 2010.

MAHL, M.A.; HIRSCH, M.; SUGG, U. Verification of the drug history given by potential blood donors results of drug screening that combines hair and urine analysis. **Transfusion**, v 4; p 637-641, 2000.

MANTEGAZZA P., RIVA M.. Amphetamine-like activity of β -phenethylamine after a monoamine oxidase inhibitor in vivo. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v 15; p 472–478; 1963.

MAURER H.H. Systematic toxicological analysis procedures for acidic drugs and/or metabolites relevant to clinical and forensic toxicology and/or doping control. **J. Chromatogr. B**, v 733; p 3–25, 1999.

MELANSON SE, MAGNANI B. False positive urine drug screens: what clinicians should know and when the laboratory should be consulted? **News Path**, 2006.

MELANSON S.E.F. The Utility of Immunoassays for Urine Drug Testing. **Clin Lab Med**, v 32; p 429–447, 2012.

MOELLER, M.R.; STEINMEYER, S.; KRAEMER, T. Determination of drugs of abuse in blood. **J. of Chromatography B**. v 713; p 91-109; 1998.

MUNDIM, I. Análise Toxicológica Sistemática utilizando HPLC-DAD: Validação da técnica analítica para triagem de intoxicações agudas por medicamentos. 2010. Dissertação de mestrado. UFG, Goiânia, pp. 90.

MURA, P.; KINTZ, P.; PAPET, Y.; RUESCH, G.; PIRIOU.A. Evaluation de six tests rapides pour le despitage du cannabis dans la sueur, la salive et les urines. **Acta Clin Belg, Supplememnt**. v 1; p 35-38; 1999.

NORMAND, J, LEMPERT, RO, O'BRIEN, CP. Under the influence?: drugs and the American work force. Washington, DC: National Academy Press; 1994.

PETERS FT, DRUMMER OH, MUSSHOF F. Validation of new methods. **Forensic Sci Int.** v 165; p 216-24; 2007.

PHIPPS R.J, SMITH J.J, DARWIN W.D., CONE E.J., Current methods for the separation and analysis of cocaine analytes. **Handbook of Analytical Separations**, cap 2, v 6, ed Elsevier, 2008.

PRAGST, F., HERZLER, M., ERXLEBEN, B. Systematic toxicological analysis by high performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD). **Clin. Chem. Lab. Med.** v 42(11); p 1325-1340; 2004.

PRAGST, F., HERZLER, M., ERXLEBEN, B., RHOE, M. UV Spectra of Toxic Compounds. 4th ed. Verlag Dr. Diet er Helm: Heppenheim, 2001.

QUEIROZ S.C.N, COLLINS C.H. e JARDIM I.C.S.F.. Métodos De Extração e/ou Concentração De Compostos Encontrados Em Fluidos Biológicos Para Posterior Determinação Cromatográfica. **Quim. Nova**, v 24, n 1, p 68-76, 2001.

REINHARDT, V.E.D. & MÍDIO, A.F. Revisão dos métodos analíticos para detecção de canabinóides em material biológico. **Rev. Bras. Toxic.** v 8(2); p 29-40, 1995.

TIAFT. The International Association of Forensic Toxicologists TIAFT, **Laboratory Guidelines**- XXXI Number 4 p. 23-26. Disponível em: <http://www.tiaft.org>. Acesso em: 05 Dez de 2013.

WHO, World Health Organization. Expert Consultation for the 4th edition of the **Guidelines for Drinking-water Qualit**. 2007. Disponível em: <http://www.who.int/>. Acesso em: 14 Jan de 2014.

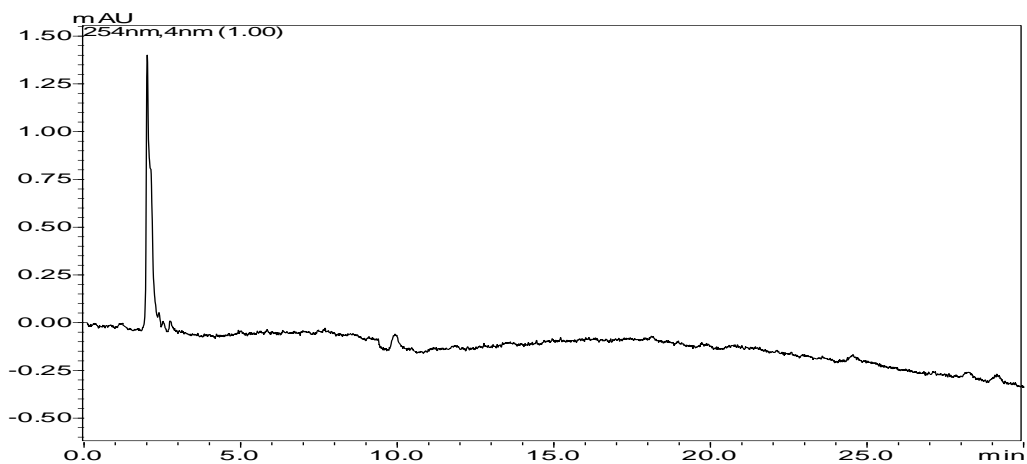
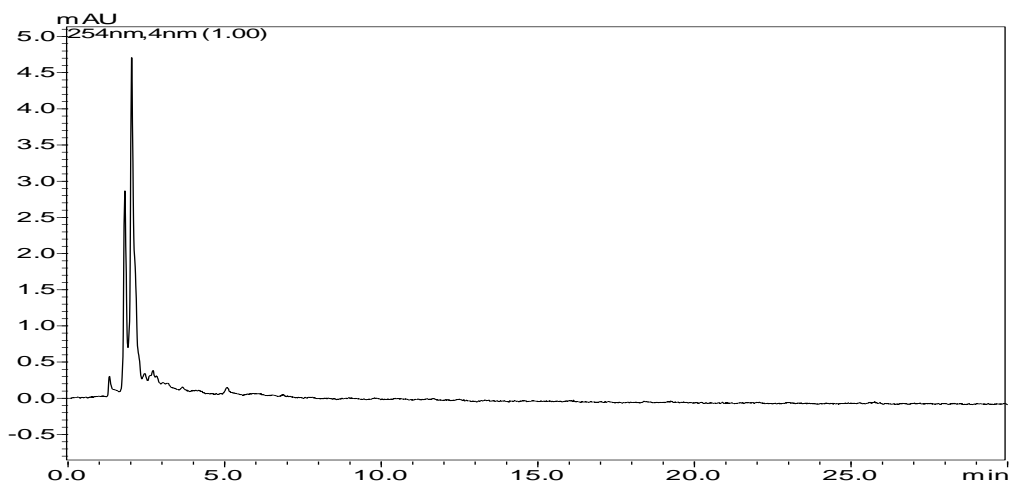
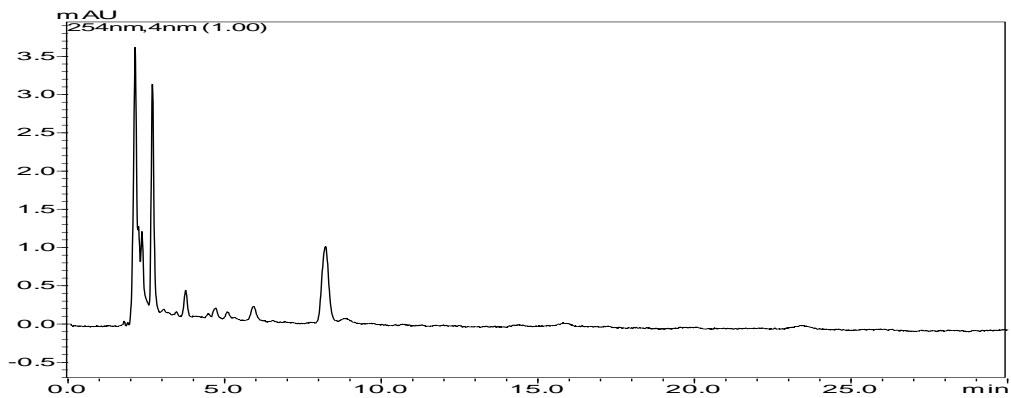
WHO, World Health Organization. **Preventing injuries and violence: a guide for ministries of health**. Geneva: WHO; 2007. Disponível em: <http://www.who.int>. Acesso em: 05 Dez de 2013.

WHO, World Health Organization. **Suicide prevention**. Disponível em: http://www.who.int/mental_health/prevention/en/. Acesso em: 05 Dez de 2013.

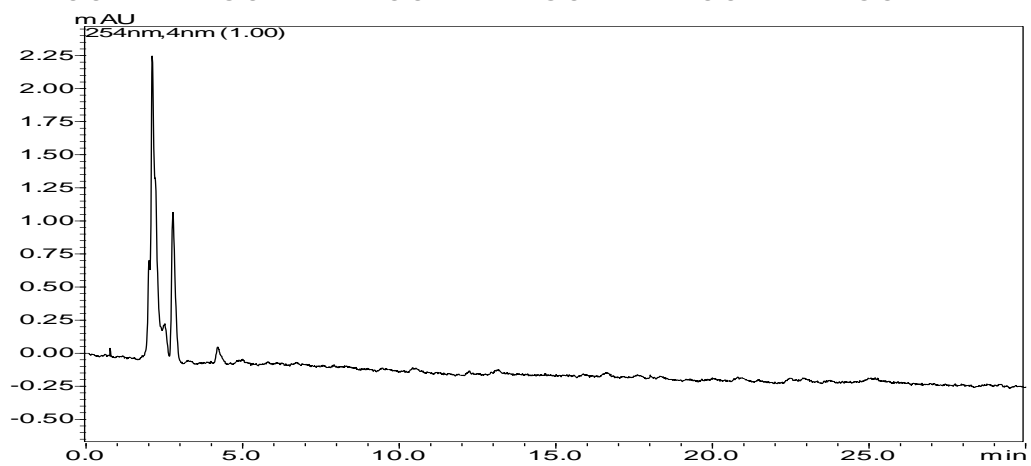
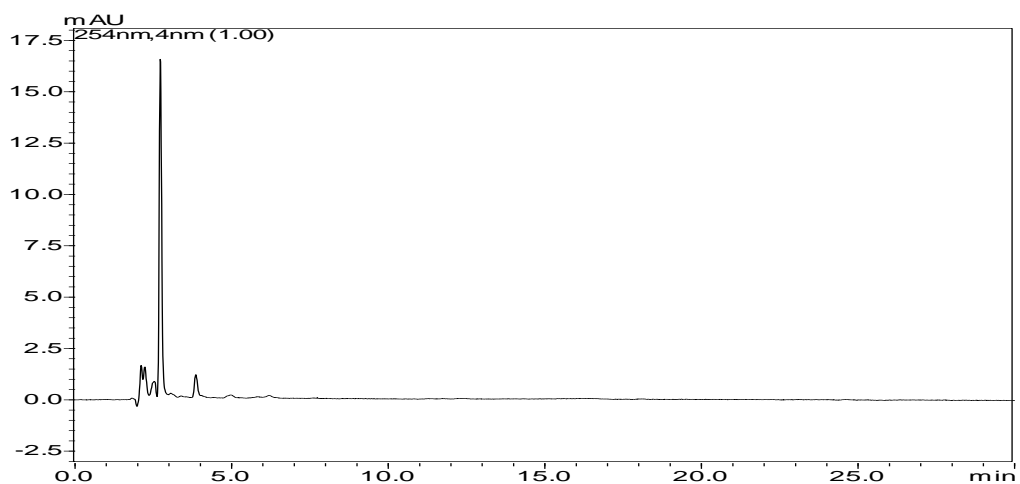
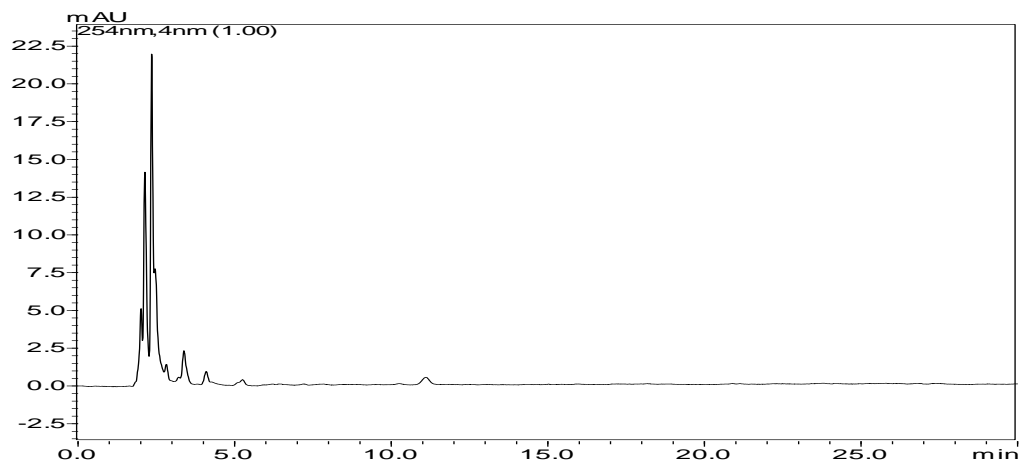
WHO, World Health Organization, **Interpersonal violence and illicit drugs**. Liverpool, 2009. Disponível em: <http://www.who.int>. Acesso em: 05 Dez de 2013.

ANEXO

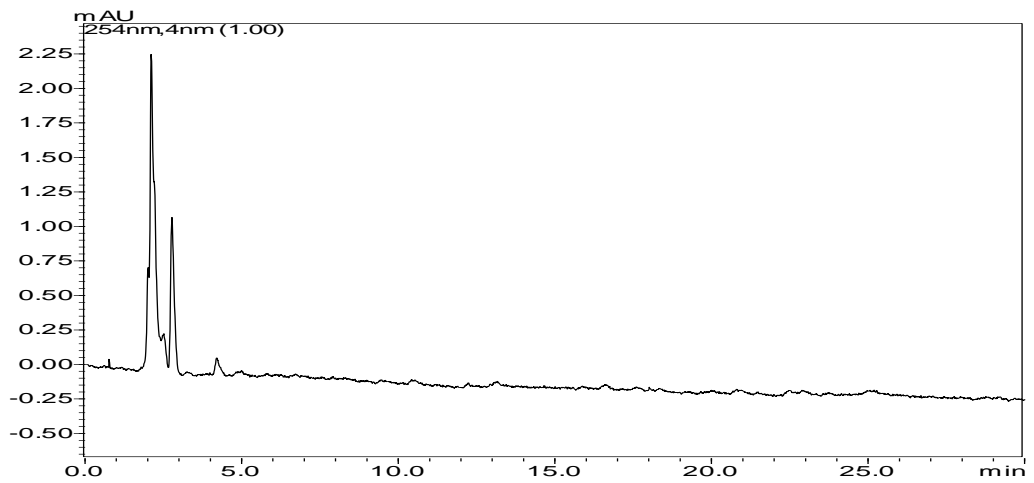
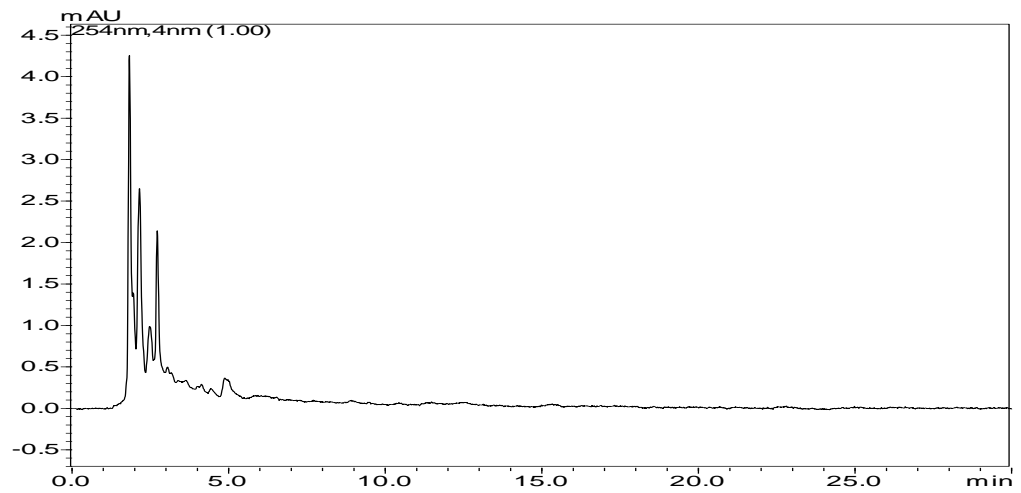
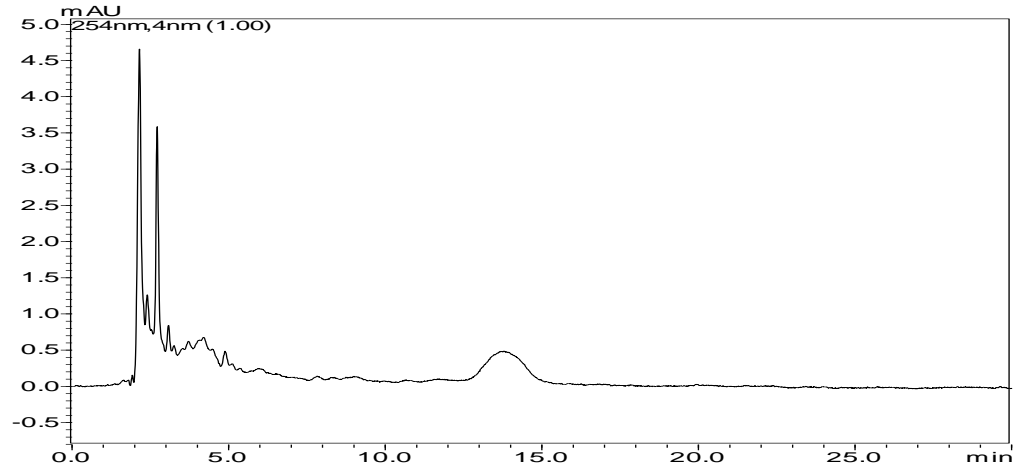
Amostra 1: Cromatogramas das extrações ácida, básica e neutra, respectivamente.



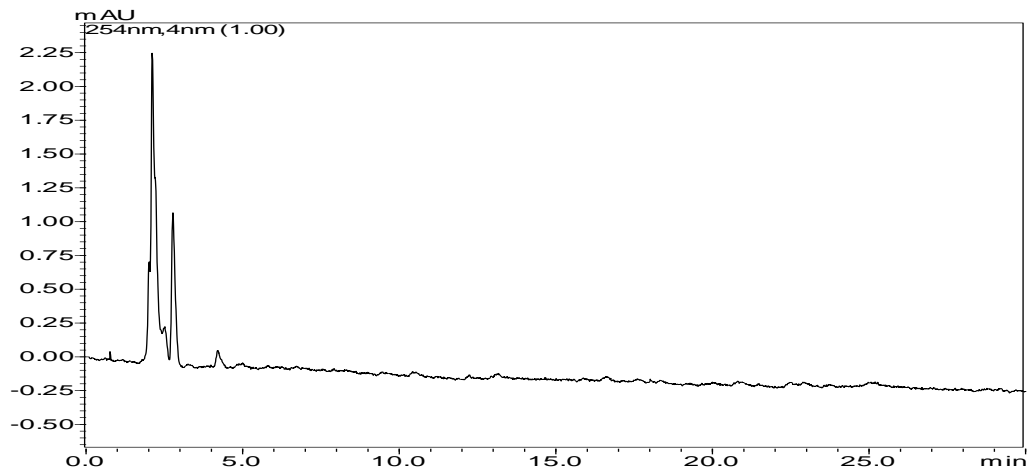
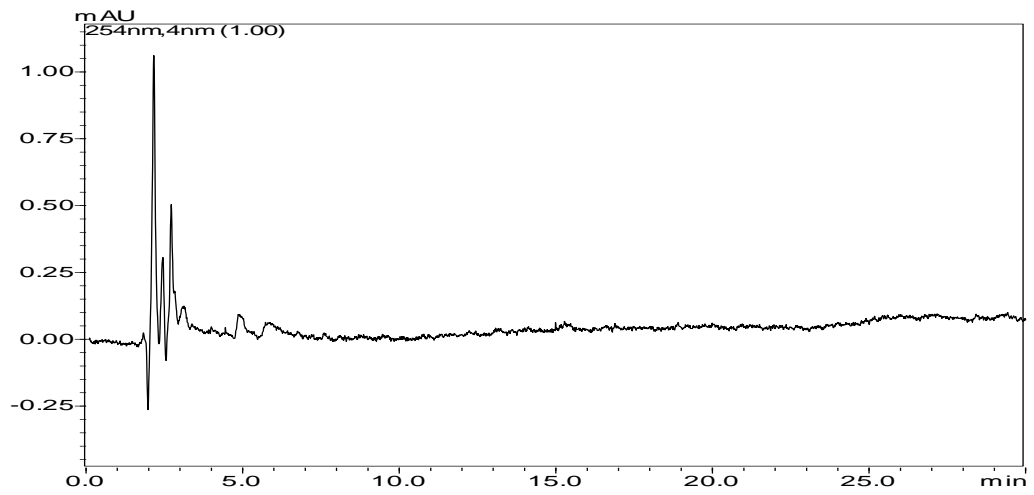
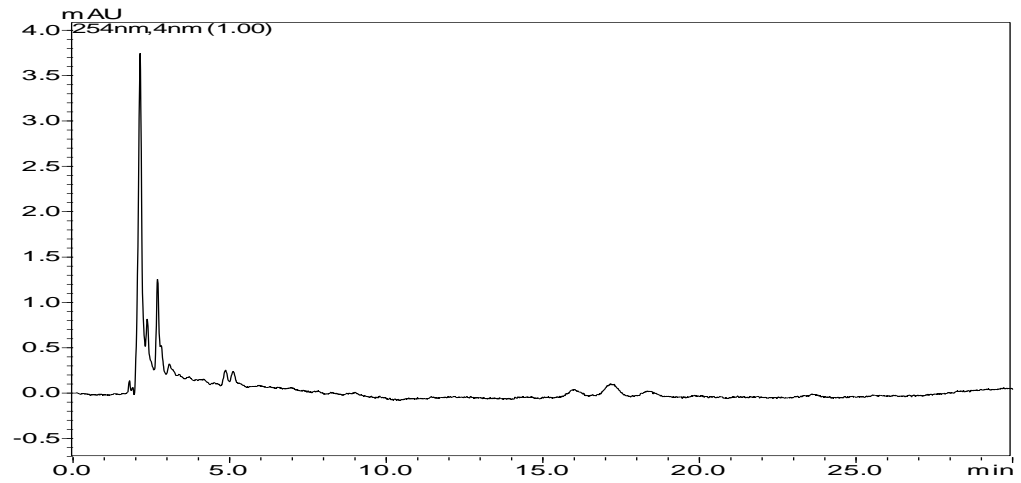
Amostra 2: Cromatogramas das extrações ácida, básica e neutra, respectivamente.



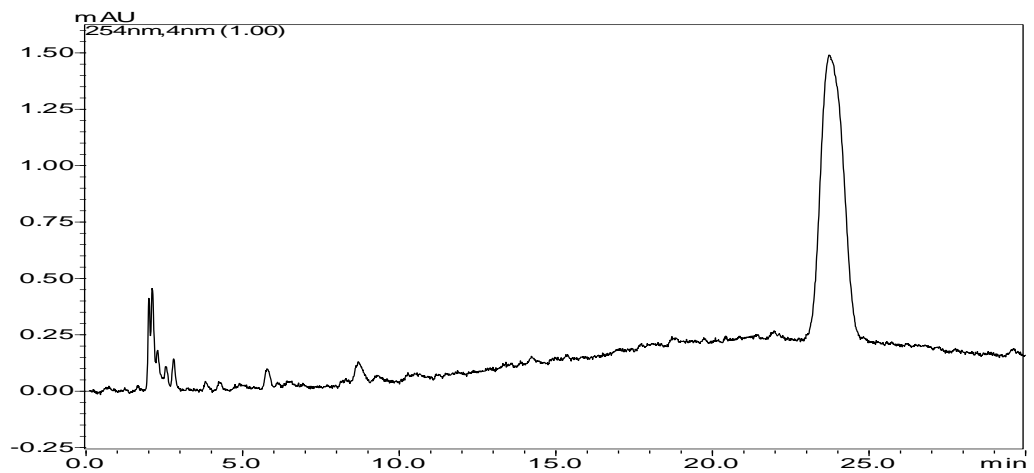
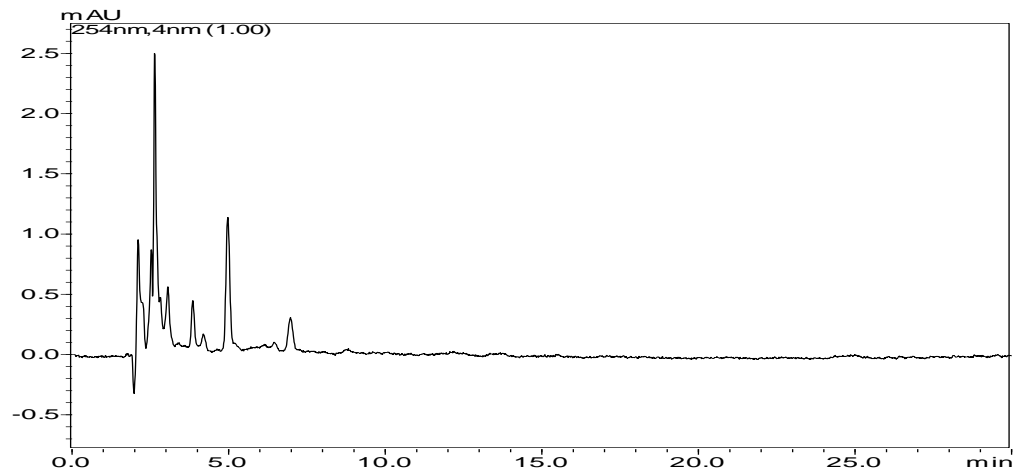
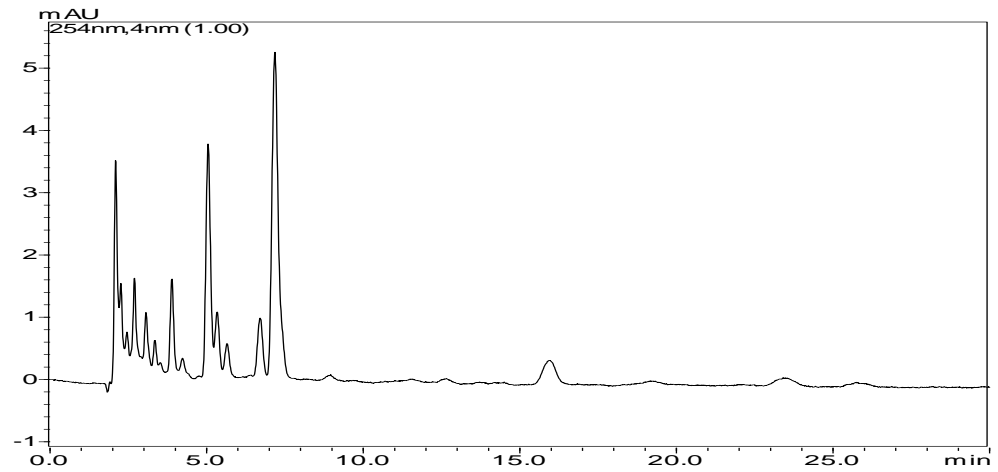
Amostra 3: Cromatogramas das extrações ácida, básica e neutra, respectivamente.



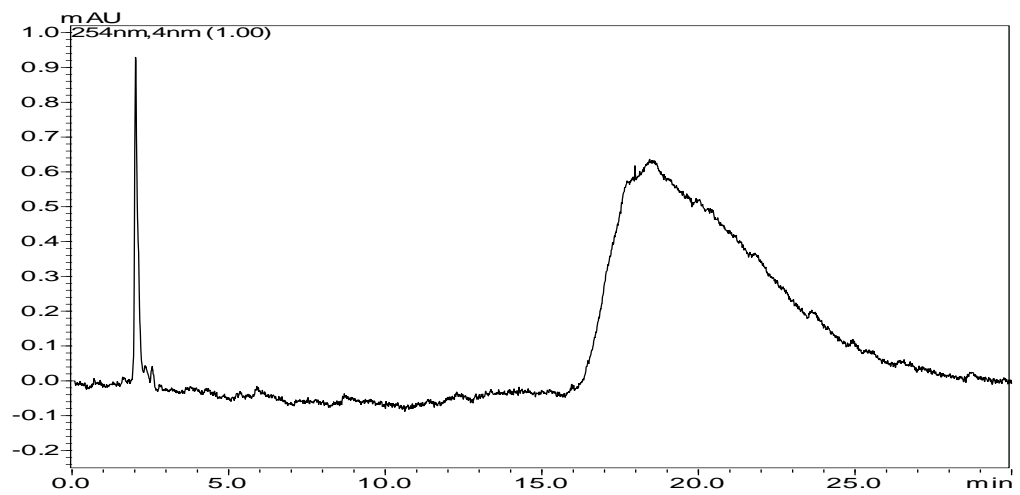
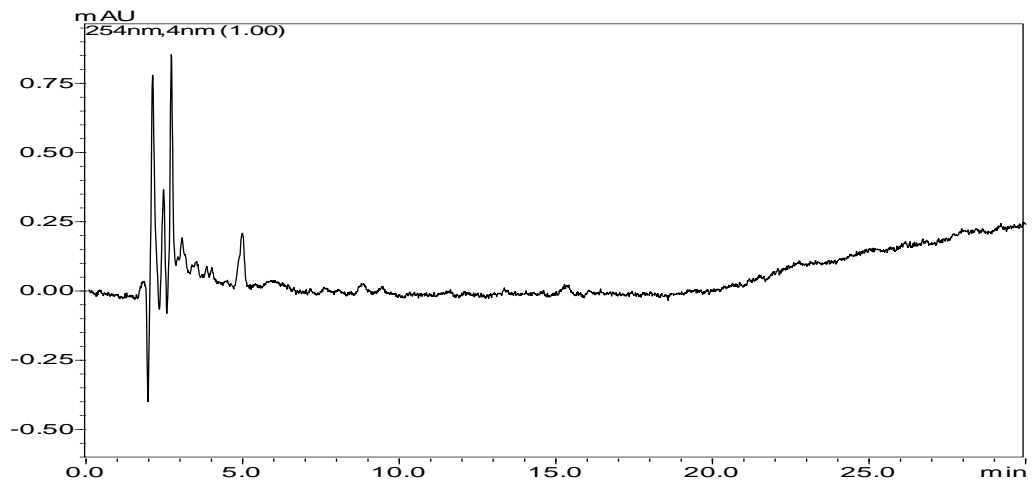
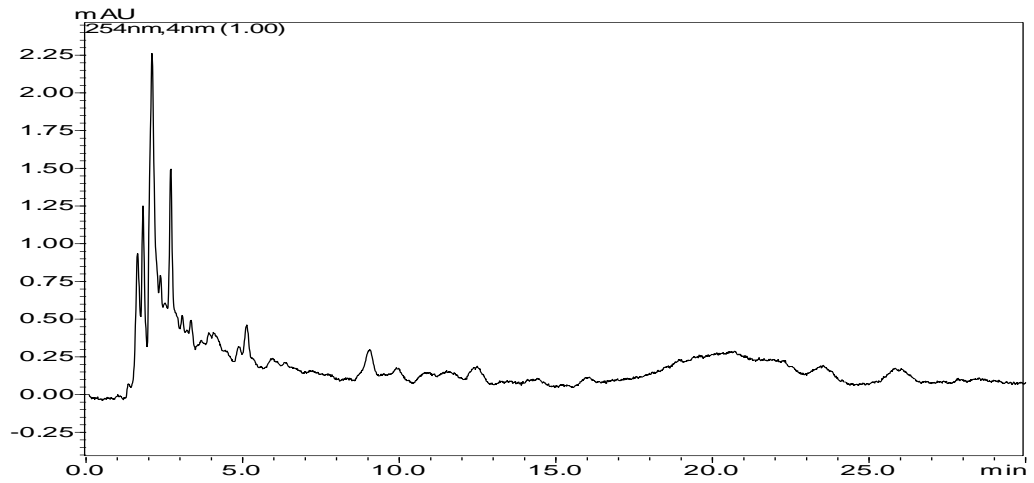
Amostra 4: Cromatogramas das extrações ácida, básica e neutra, respectivamente.



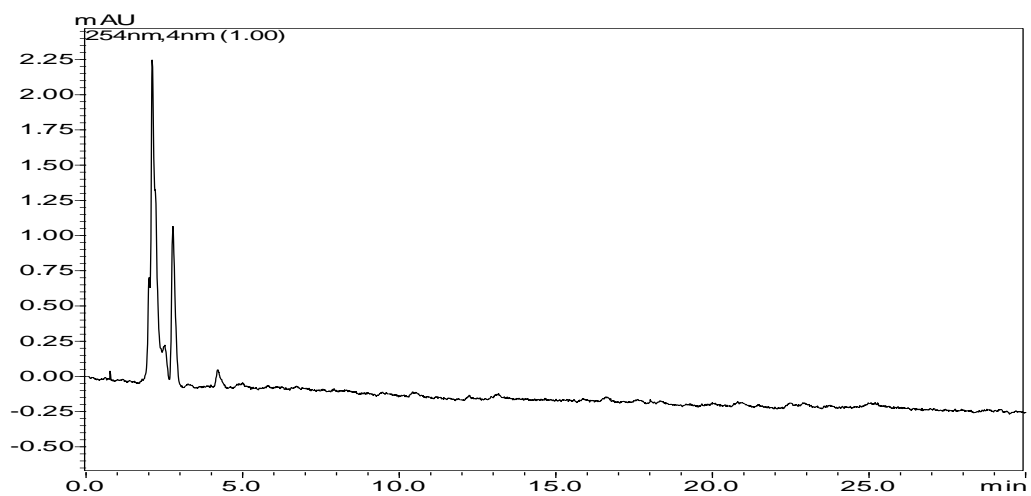
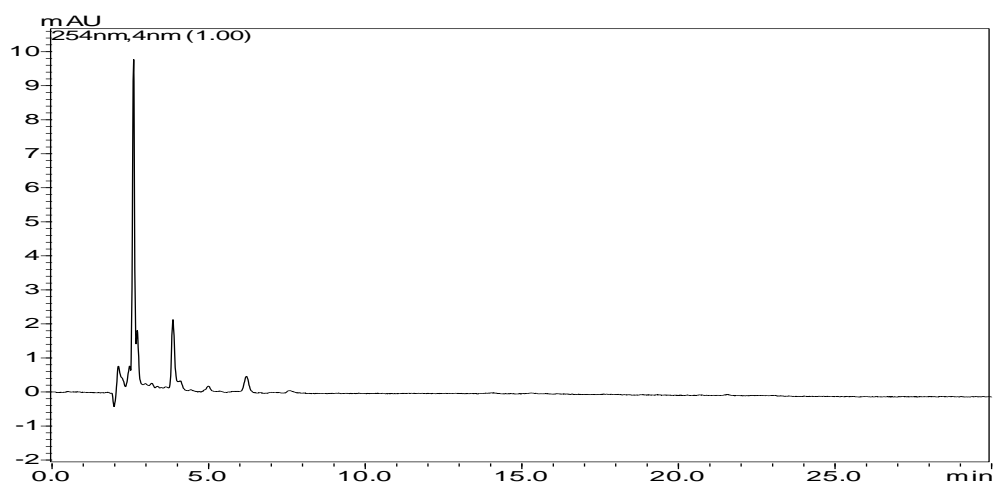
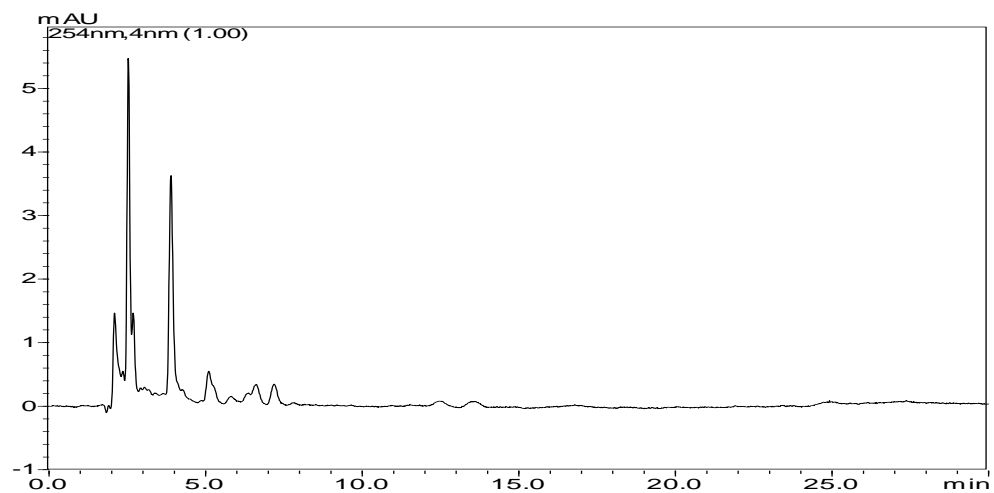
Amostra 5: Cromatogramas das extrações ácida, básica e neutra, respectivamente.



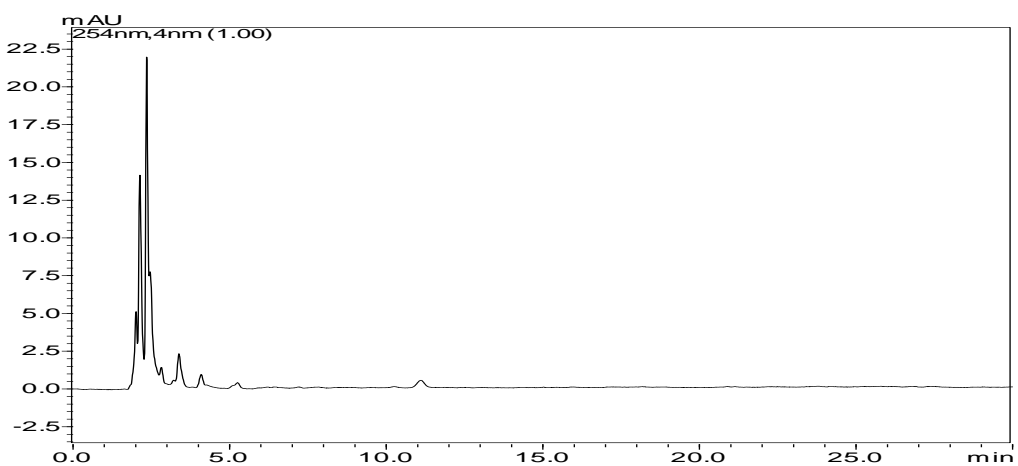
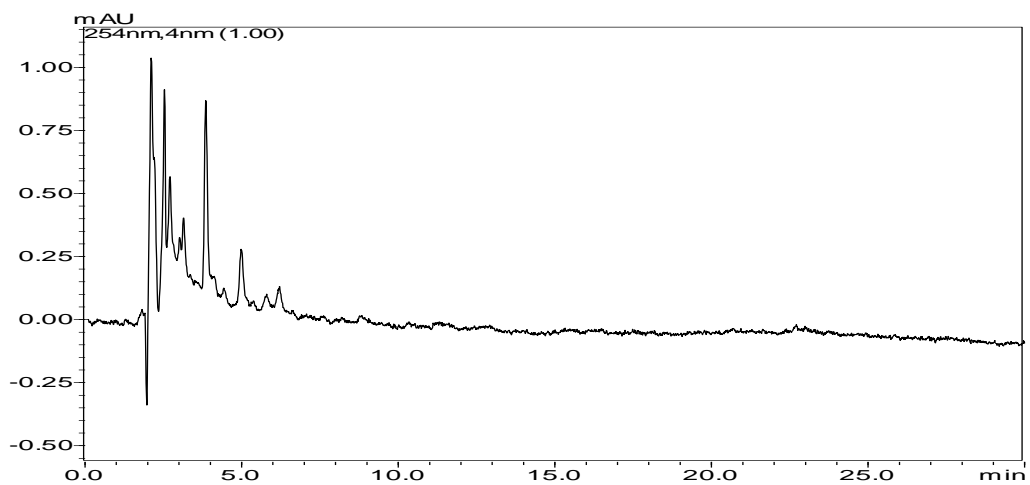
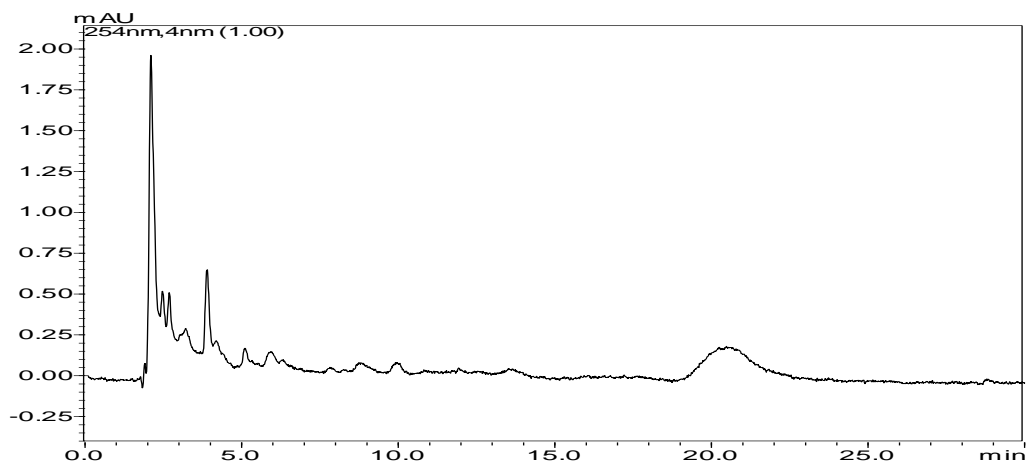
Amostra 6: Cromatogramas das extrações ácida, básica e neutra, respectivamente.



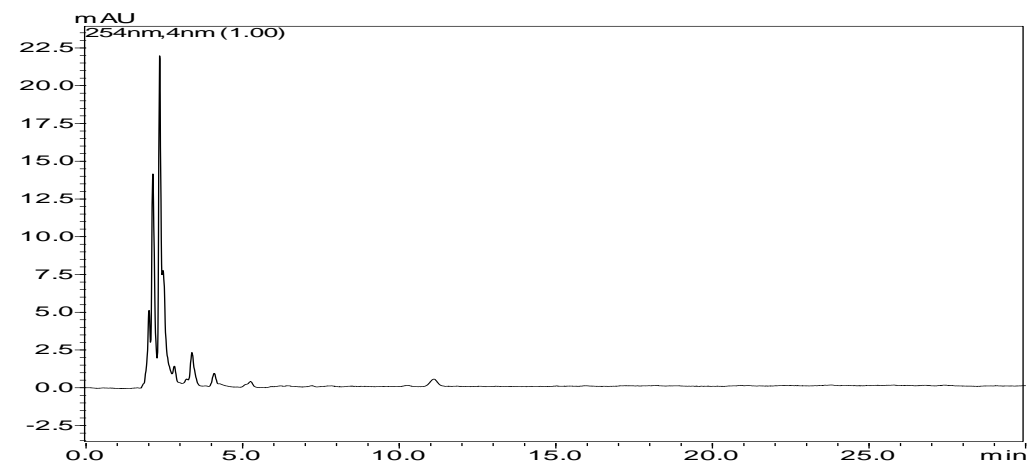
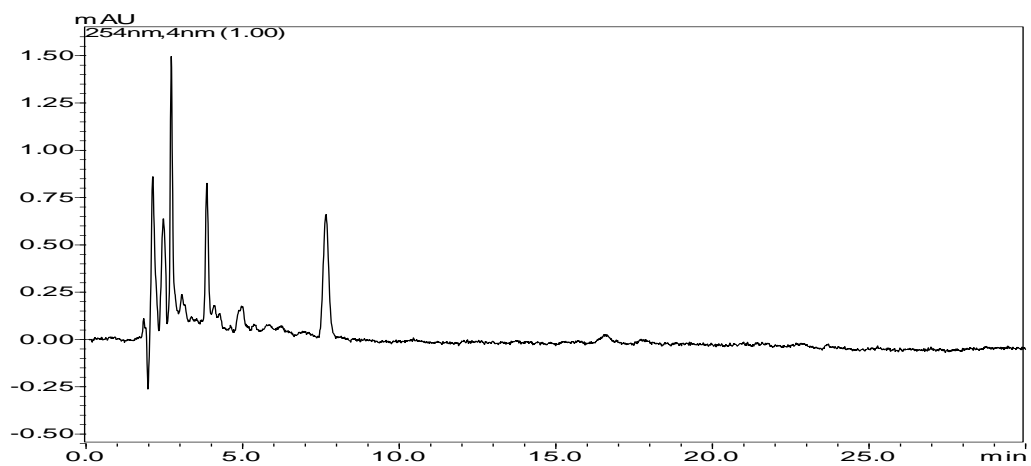
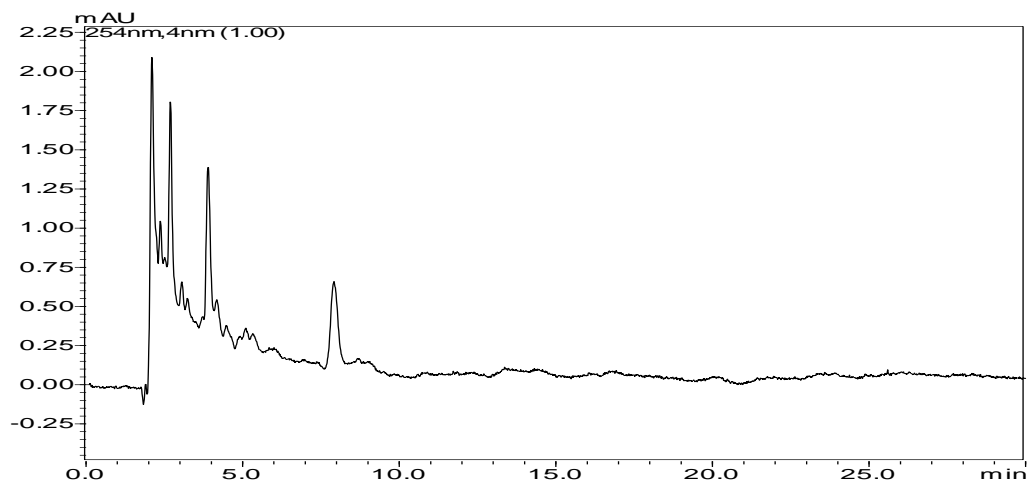
Amostra 7: Cromatogramas das extrações ácida, básica e neutra, respectivamente.



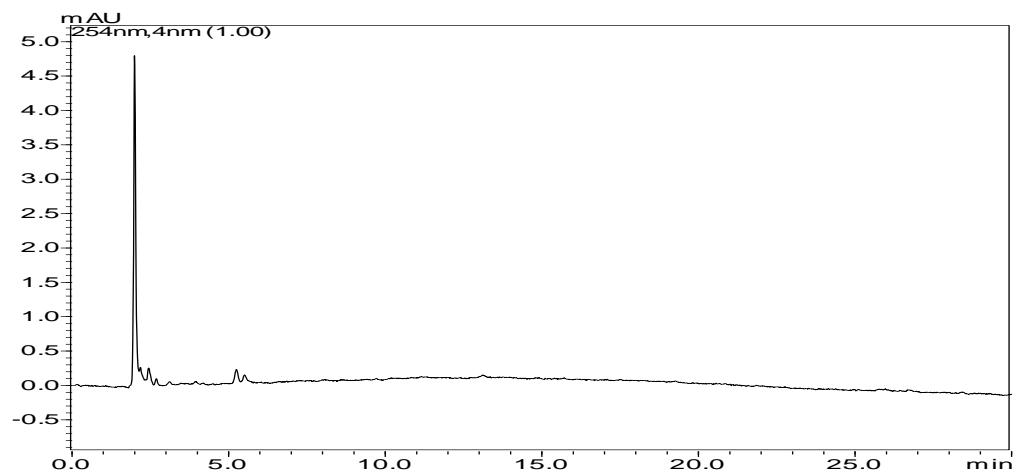
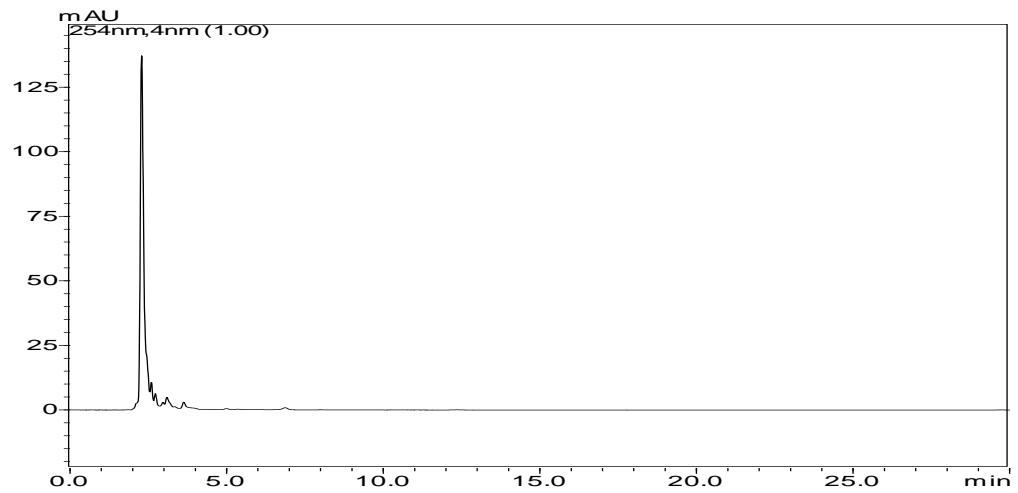
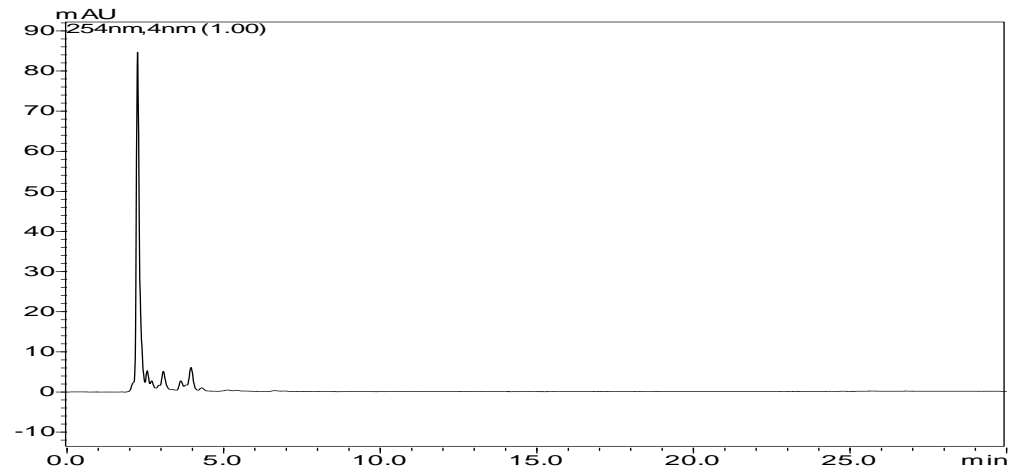
Amostra 8: Cromatogramas das extrações ácida, básica e neutra, respectivamente.



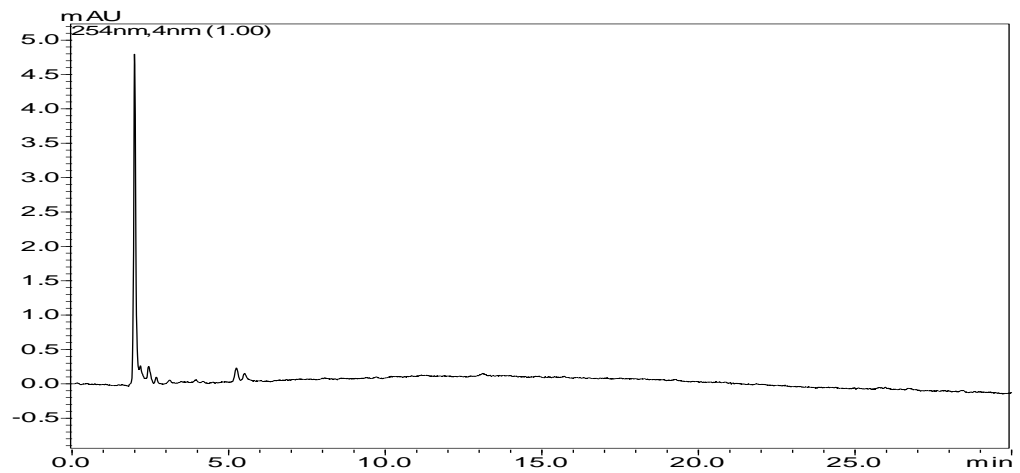
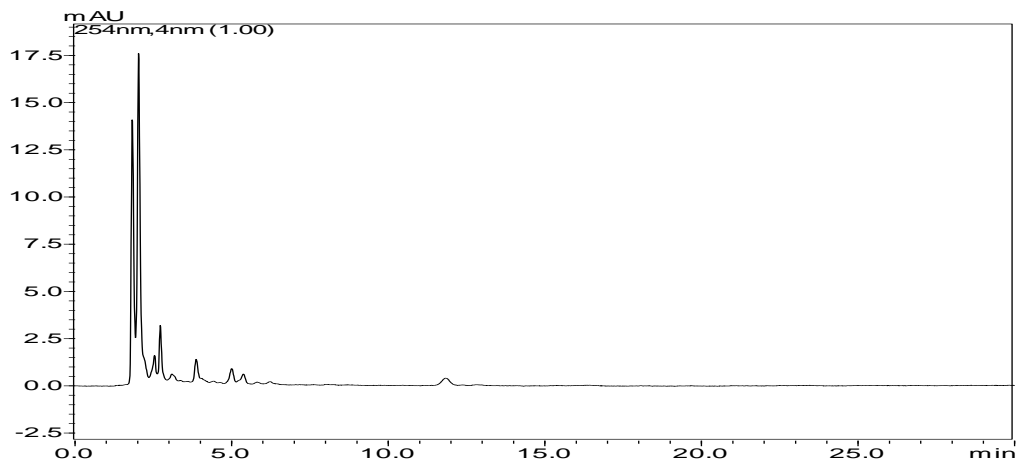
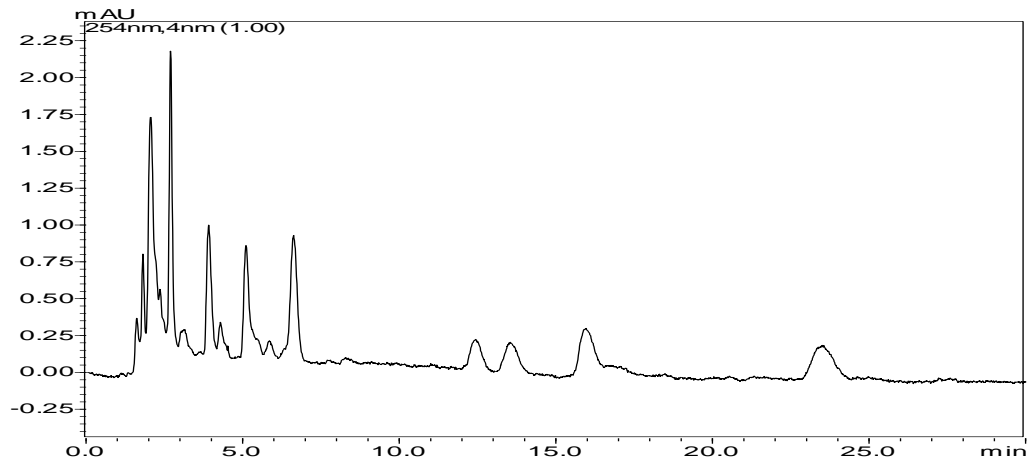
Amostra 9: Cromatogramas das extrações ácida, básica e neutra, respectivamente.



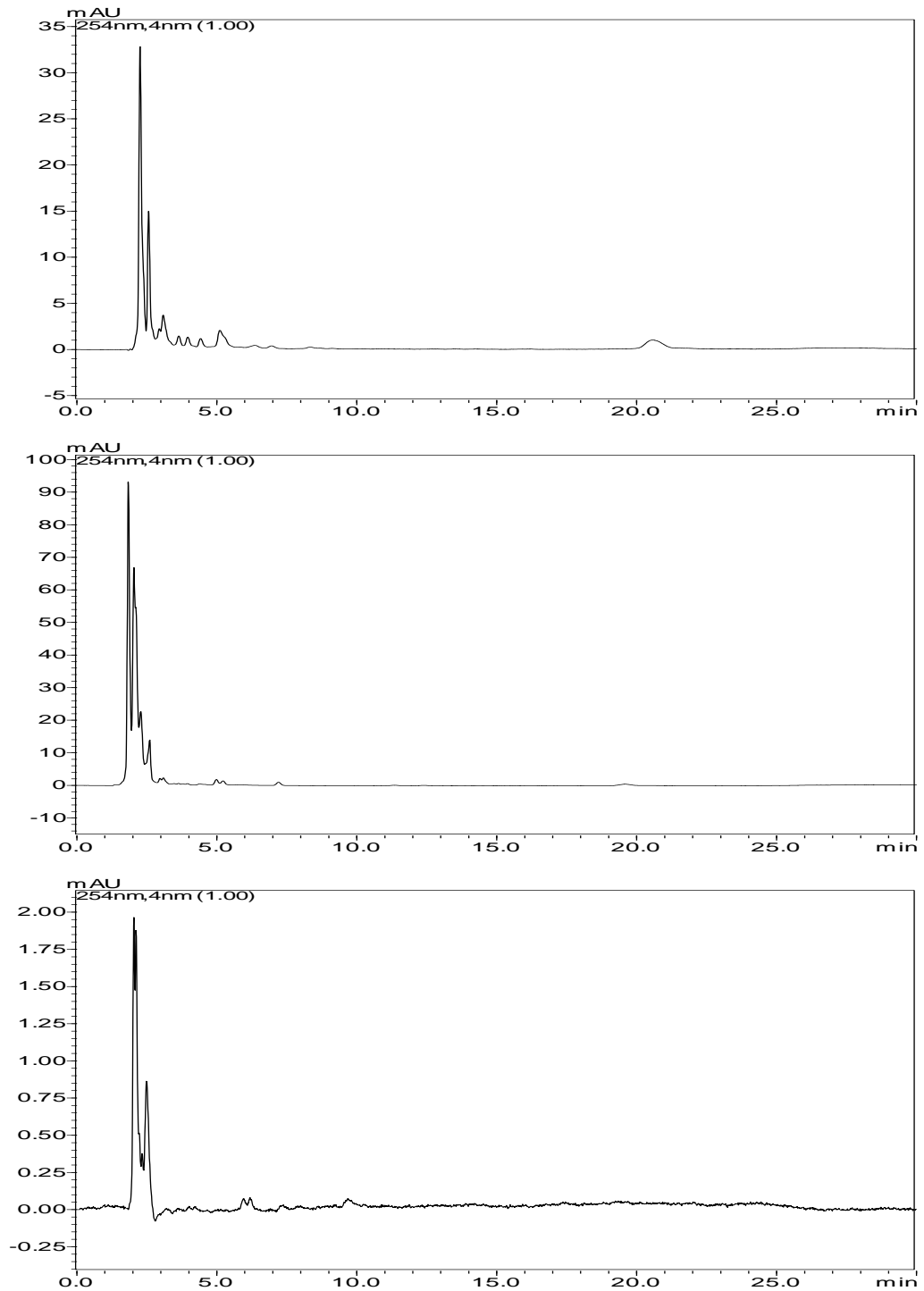
Amostra 10: Cromatogramas das extrações ácida, básica e neutra, respectivamente.



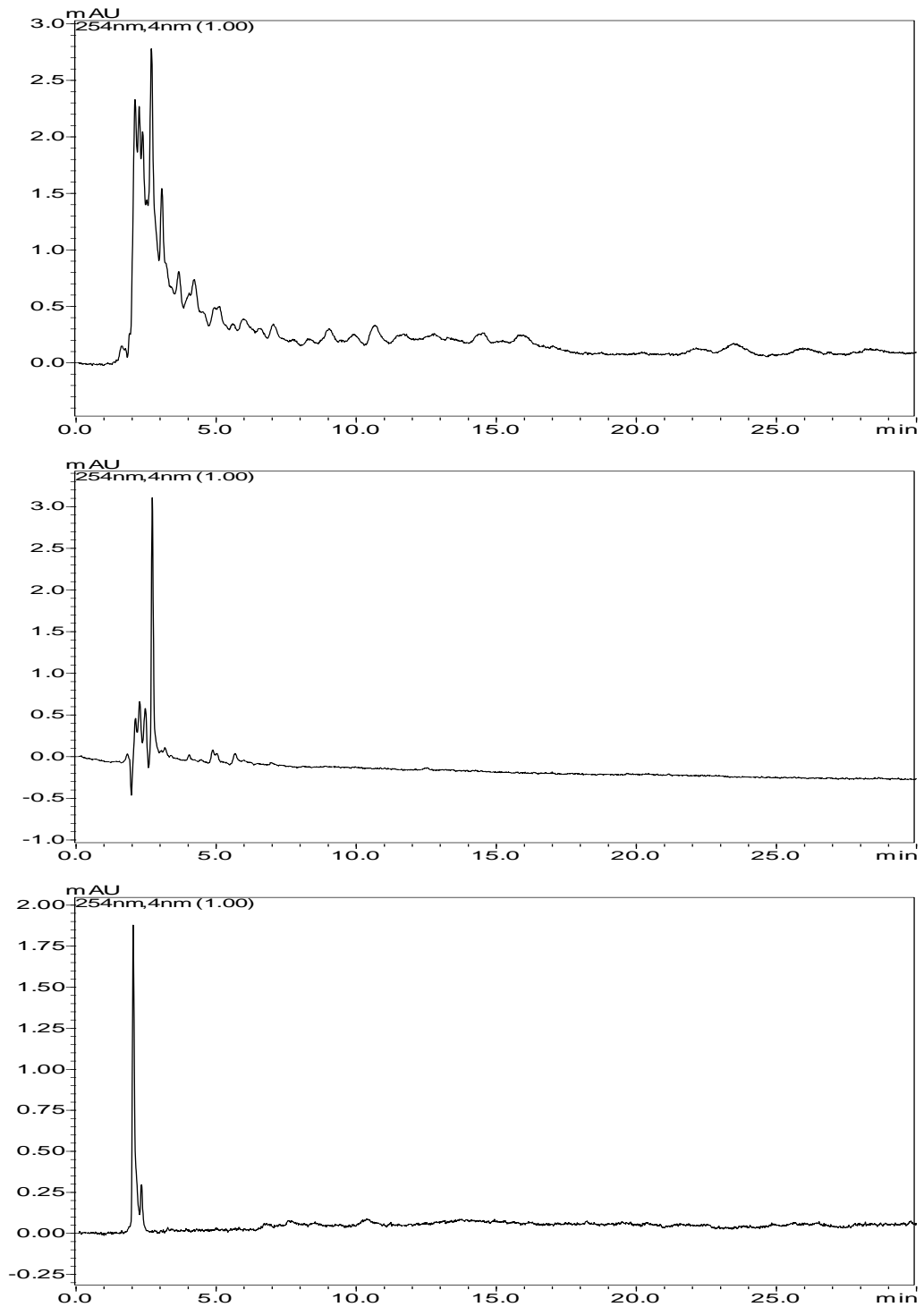
Amostra 11: Cromatogramas das extrações ácida, básica e neutra, respectivamente.



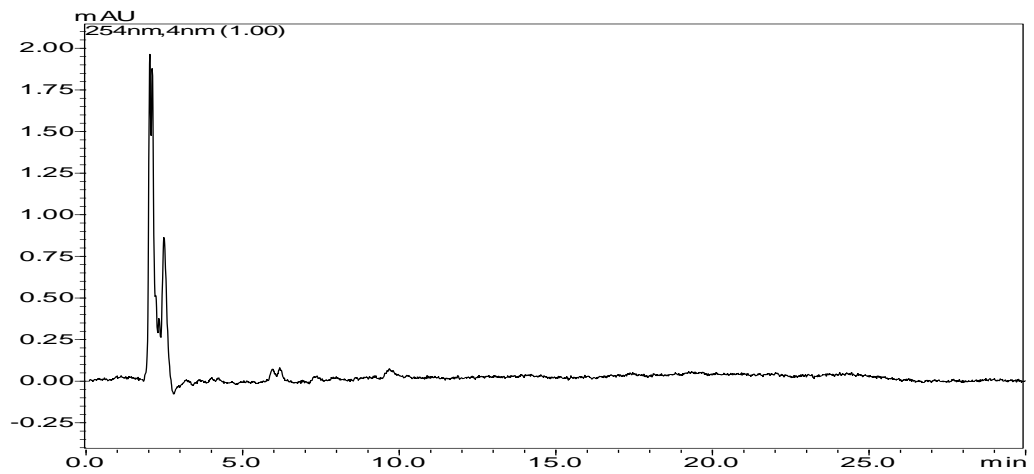
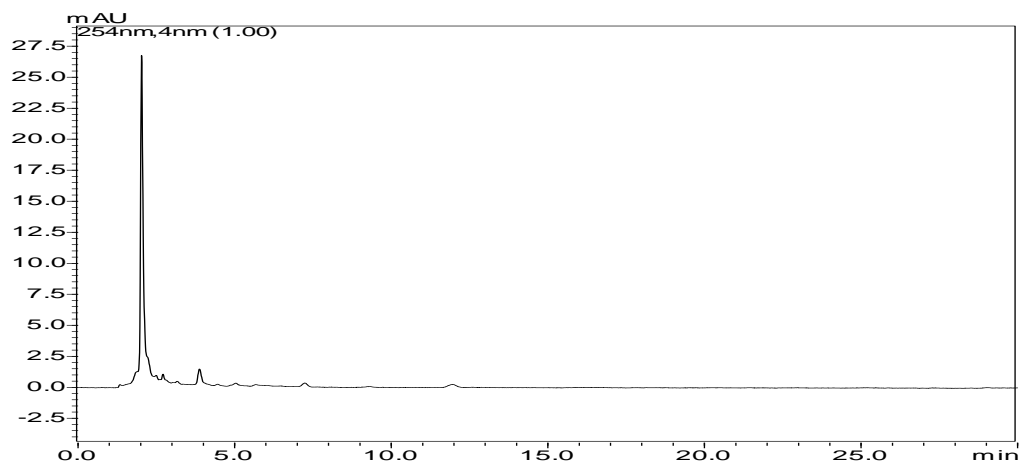
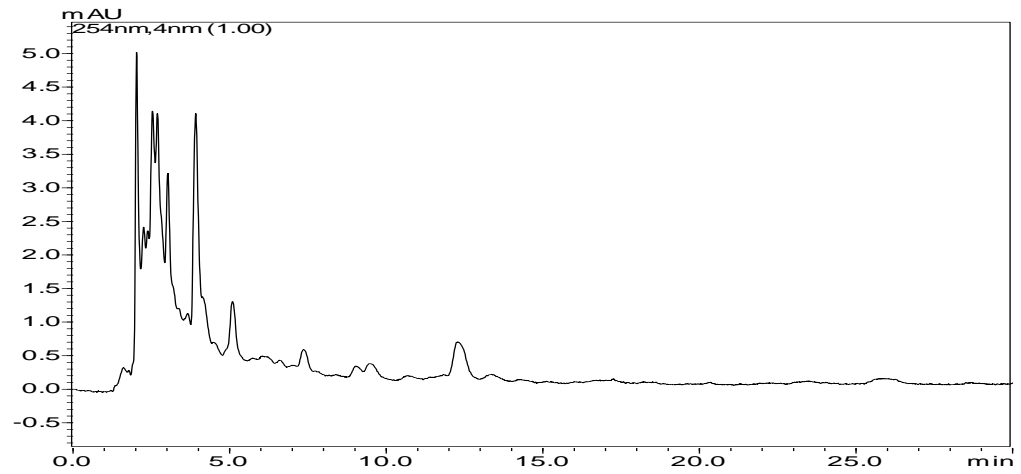
Amostra 12: Cromatogramas das extrações ácida, básica e neutra, respectivamente.



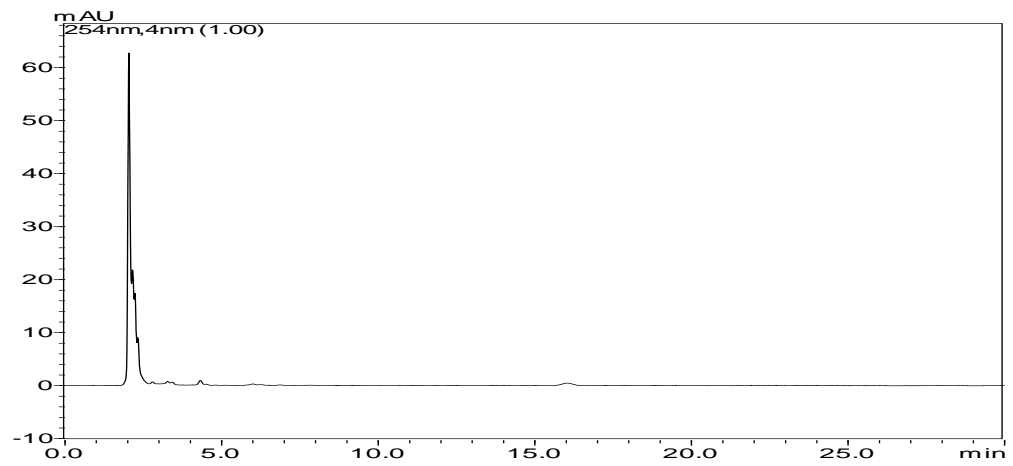
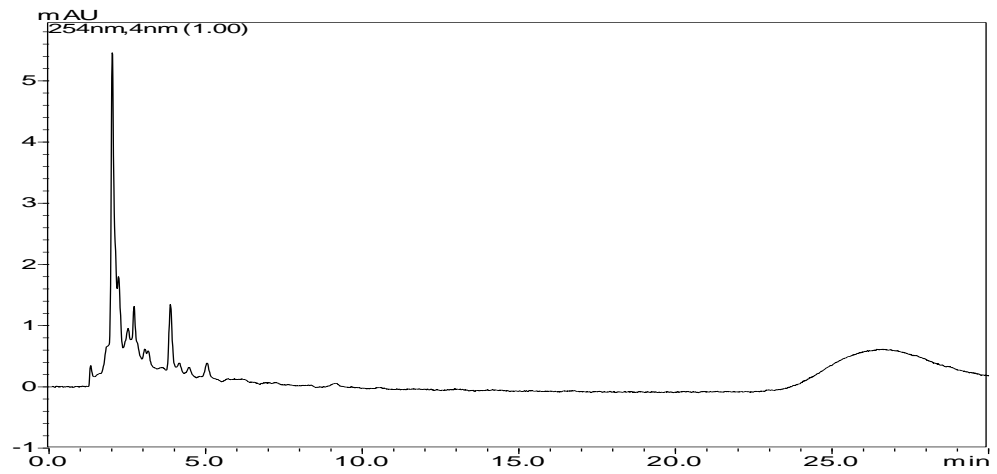
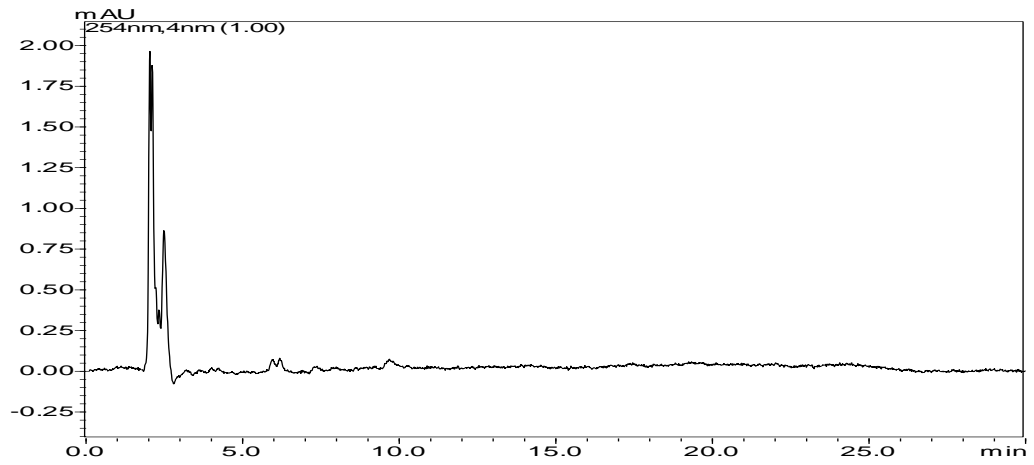
Amostra 13: Cromatogramas das extrações ácida, básica e neutra, respectivamente.



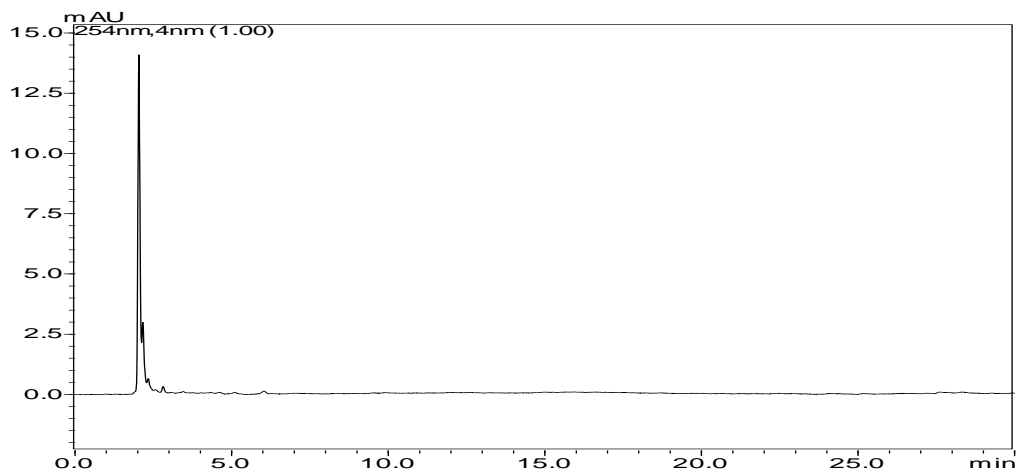
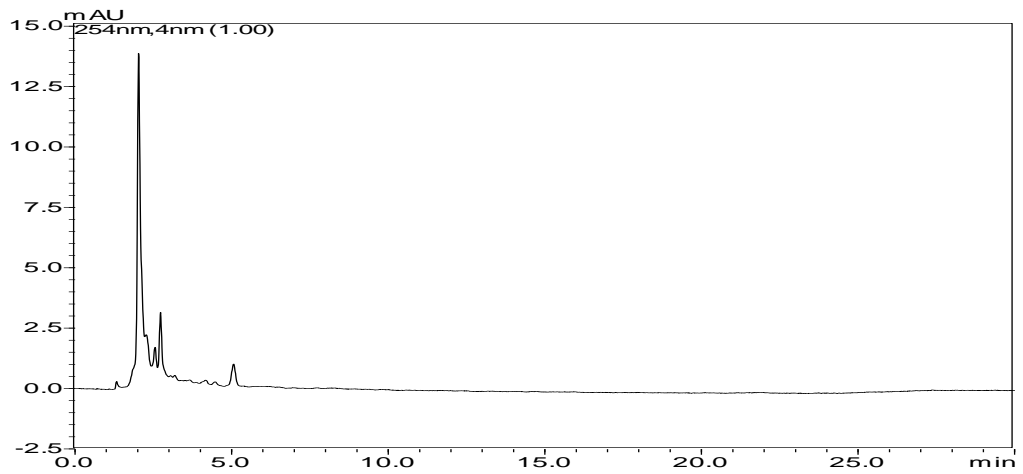
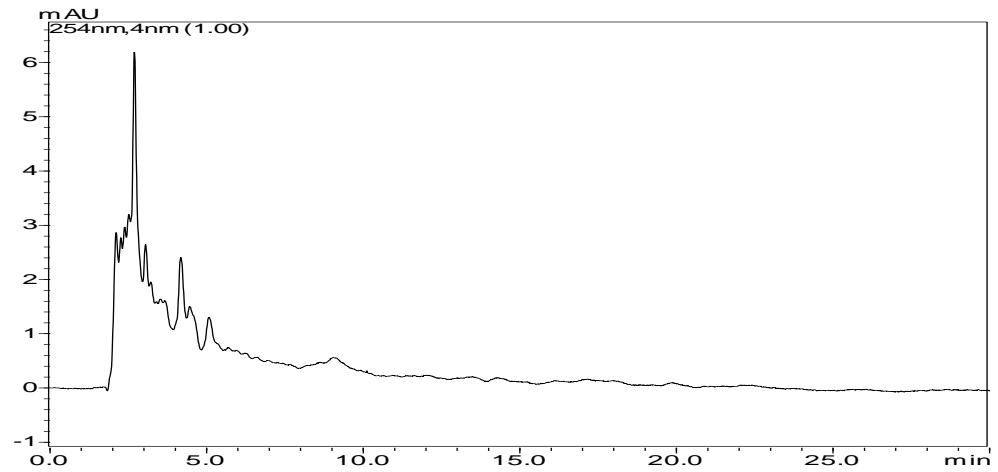
Amostra 14: Cromatogramas das extrações ácida, básica e neutra, respectivamente.



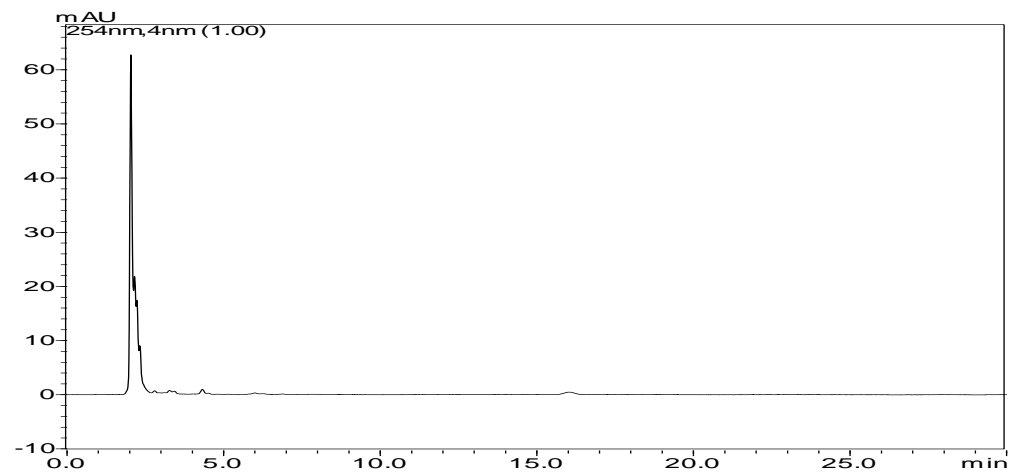
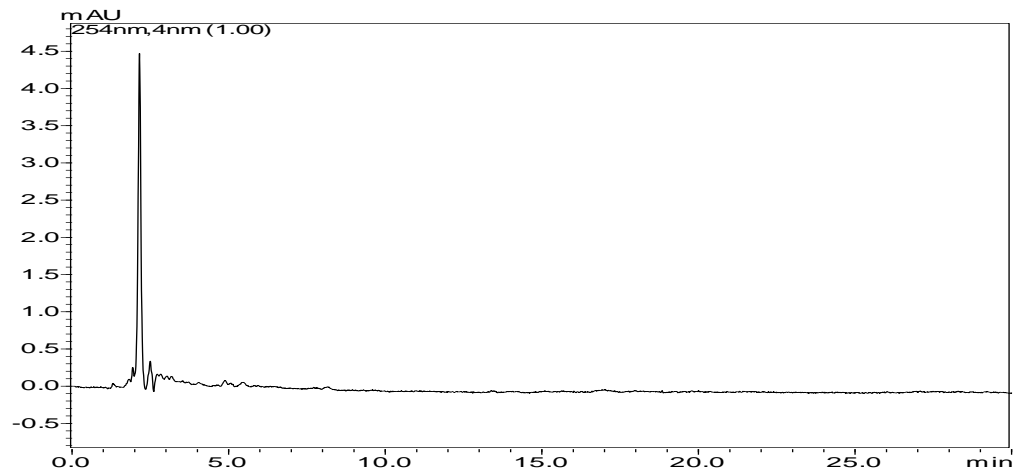
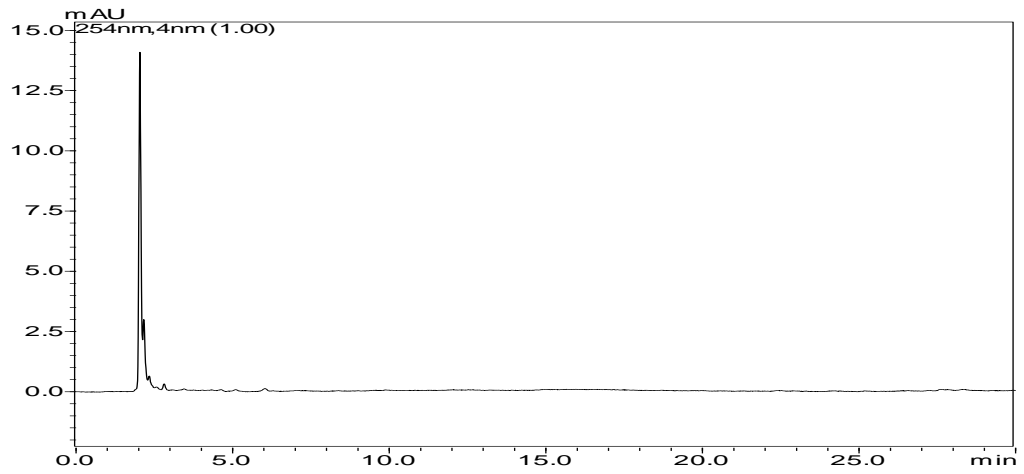
Amostra 15: Cromatogramas das extrações ácida, básica e neutra, respectivamente.



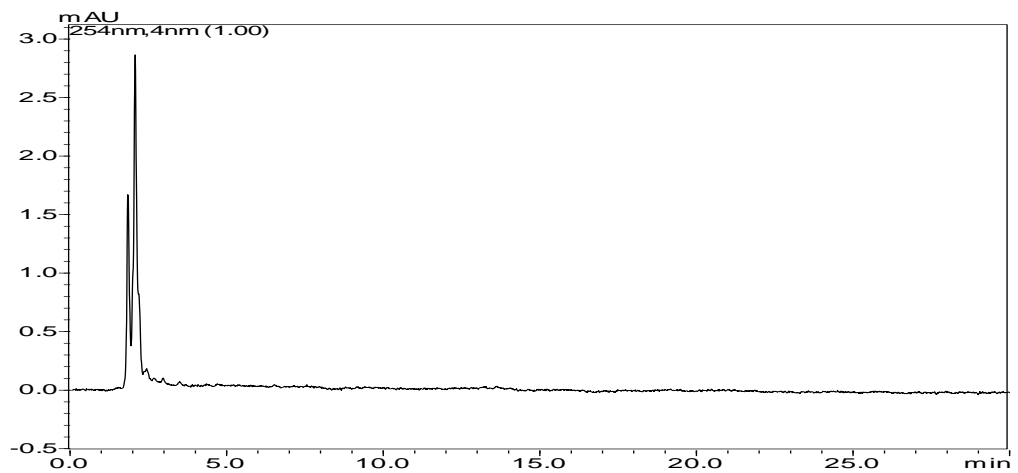
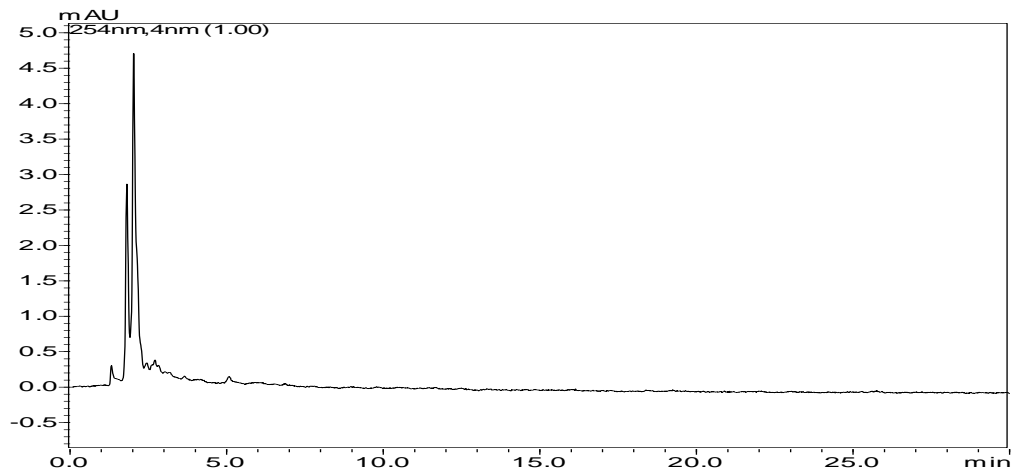
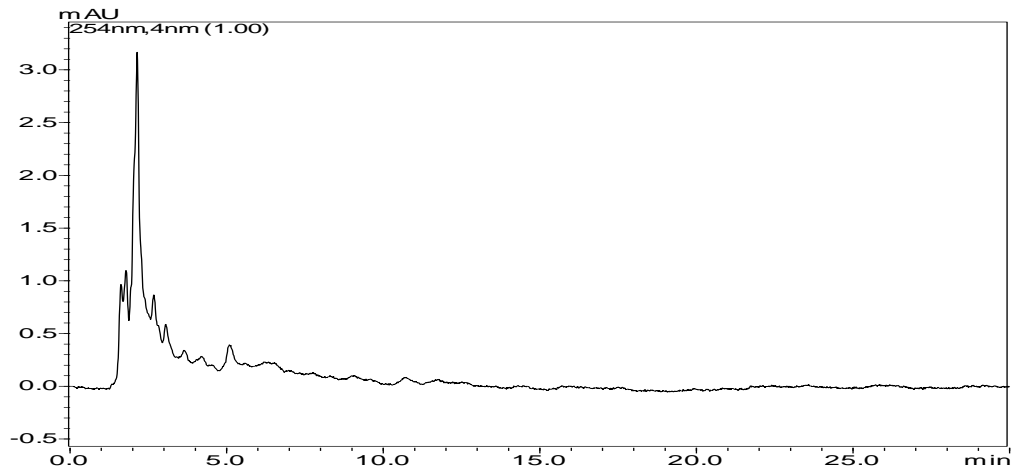
Amostra 16: Cromatogramas das extrações ácida, básica e neutra, respectivamente.



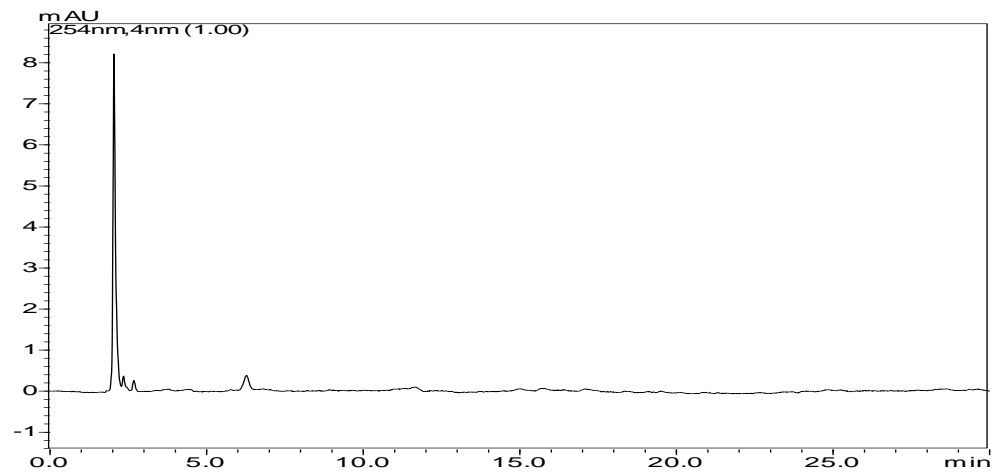
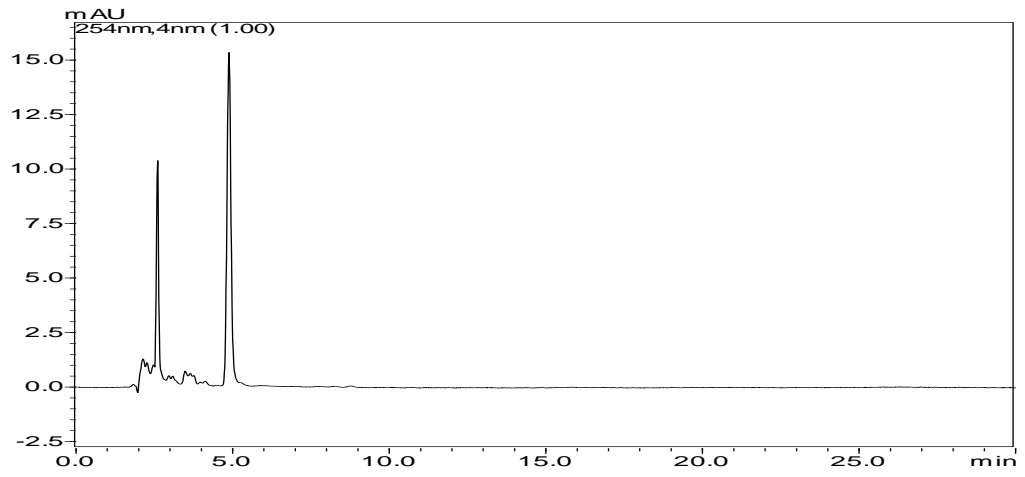
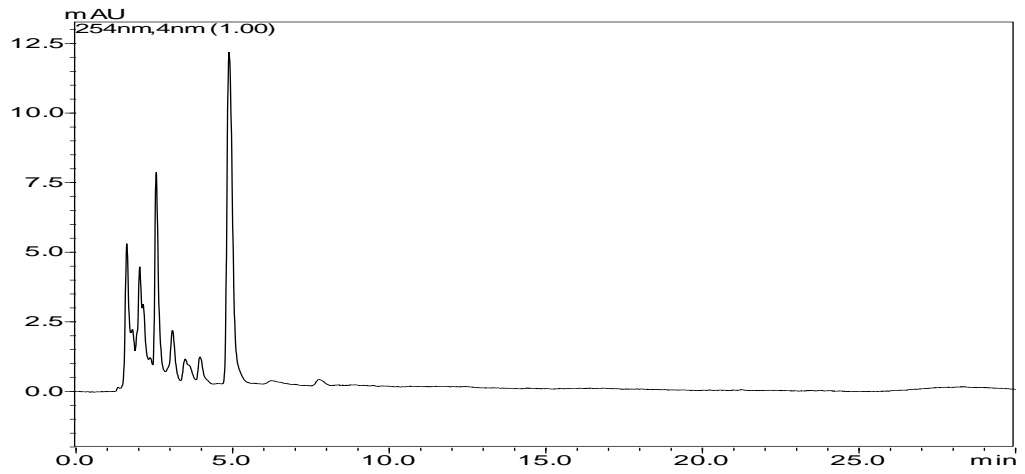
Amostra 17: Cromatogramas das extrações ácida, básica e neutra, respectivamente.



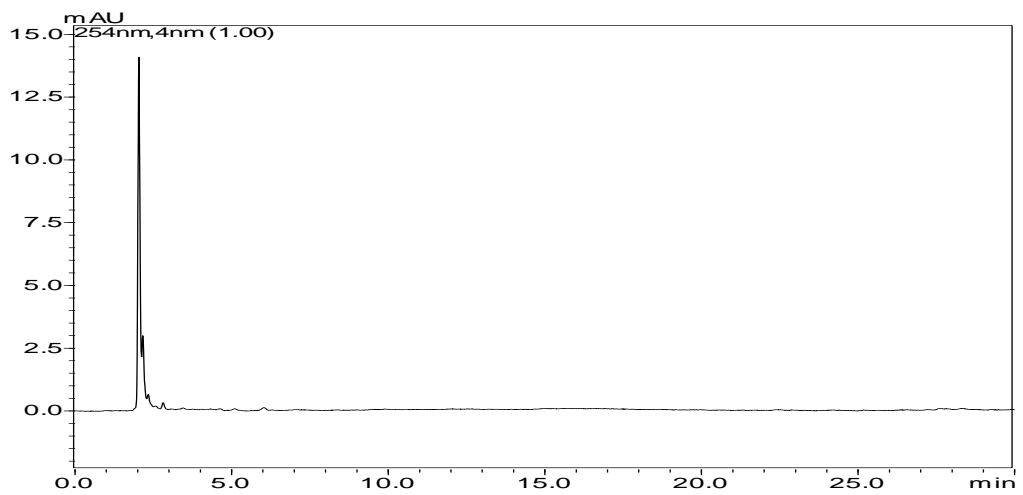
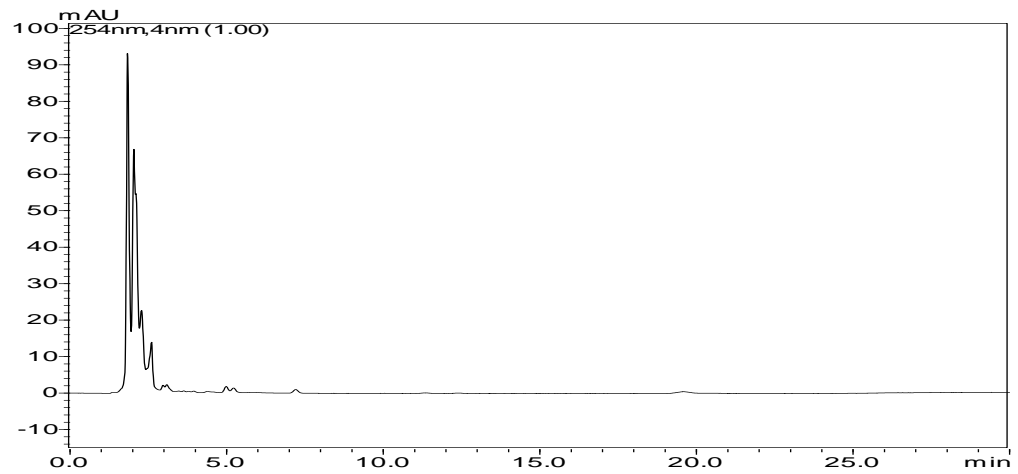
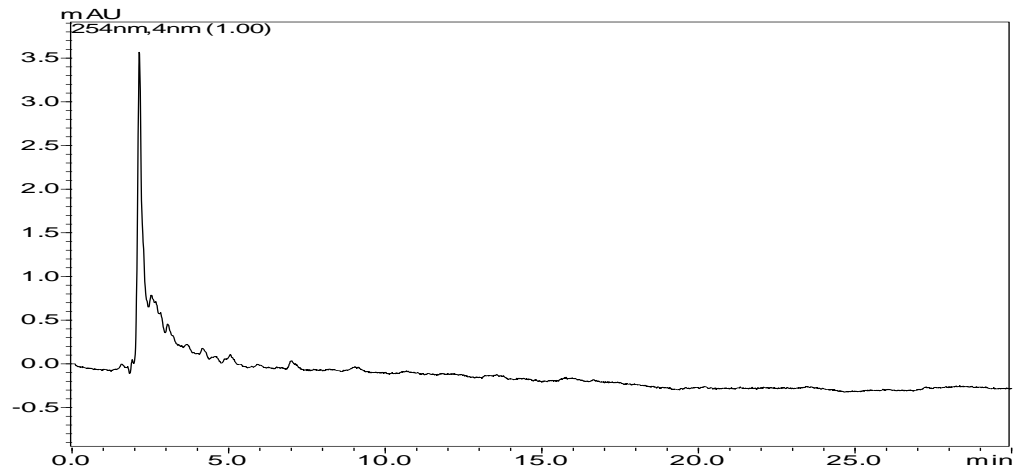
Amostra 18: Cromatogramas das extrações ácida, básica e neutra, respectivamente.



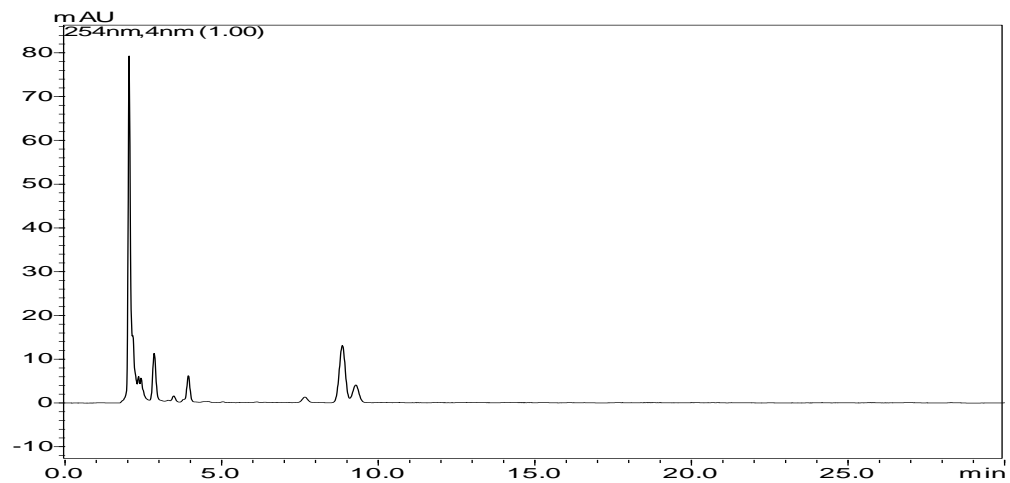
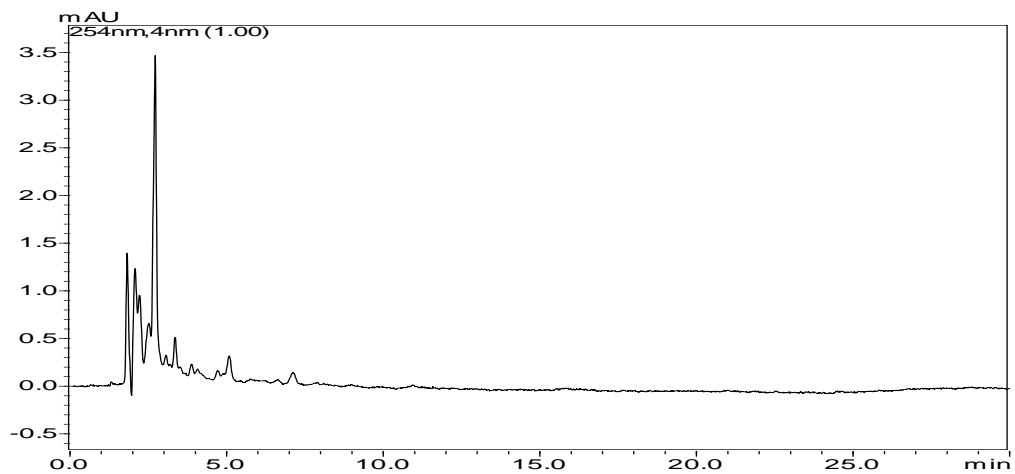
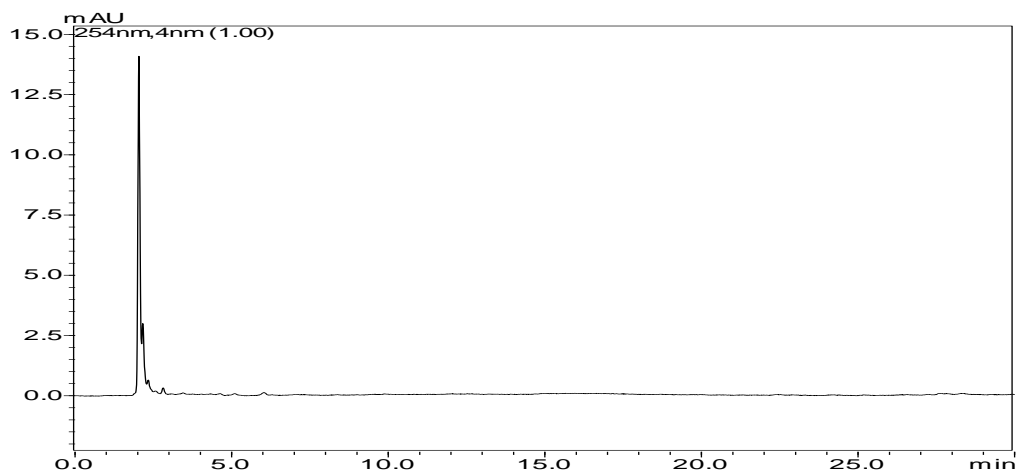
Amostra 19: Cromatogramas das extrações ácida, básica e neutra, respectivamente.



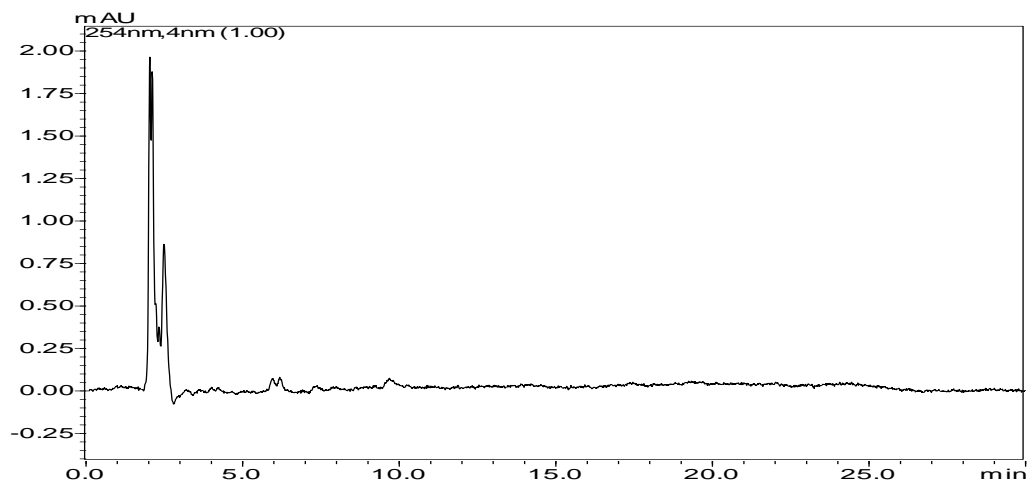
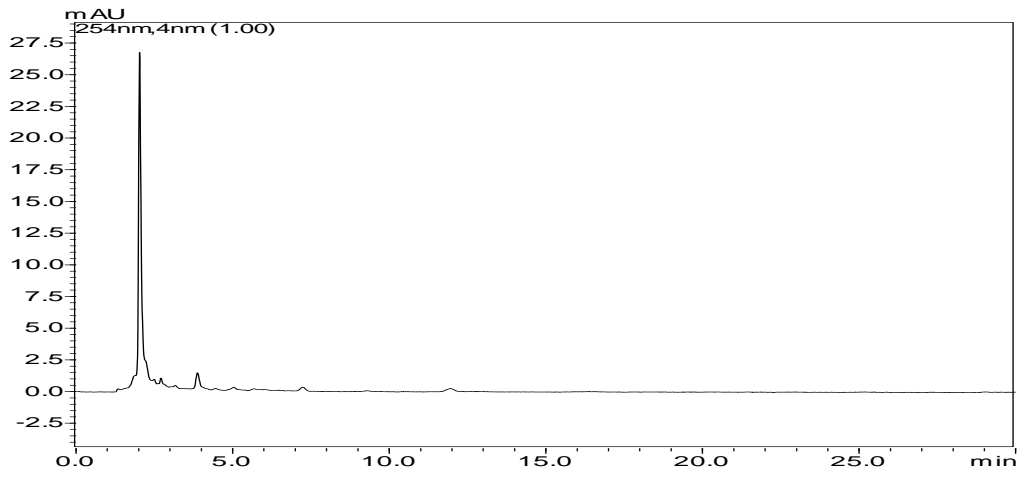
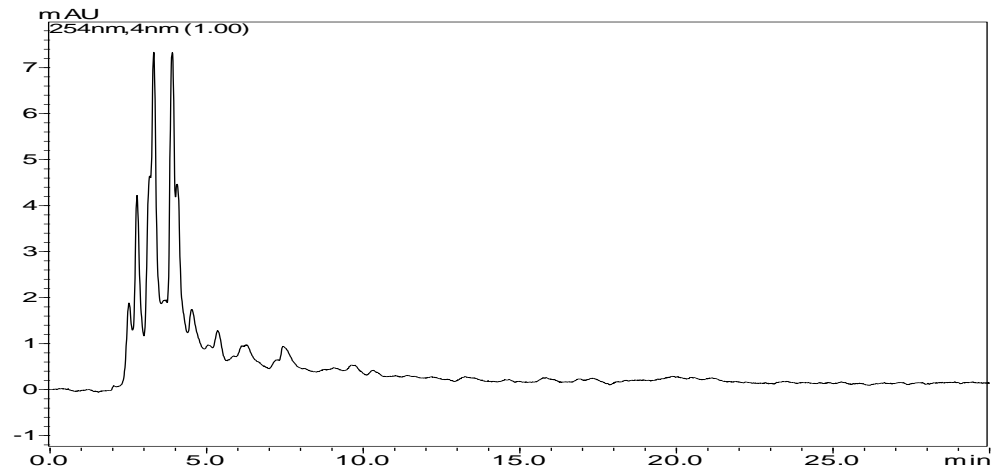
Amostra 20: Cromatogramas das extrações ácida, básica e neutra, respectivamente.



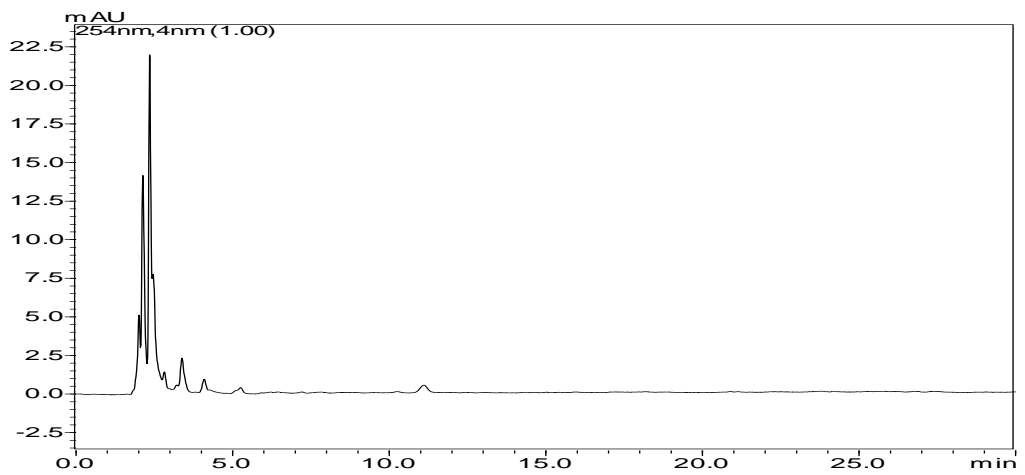
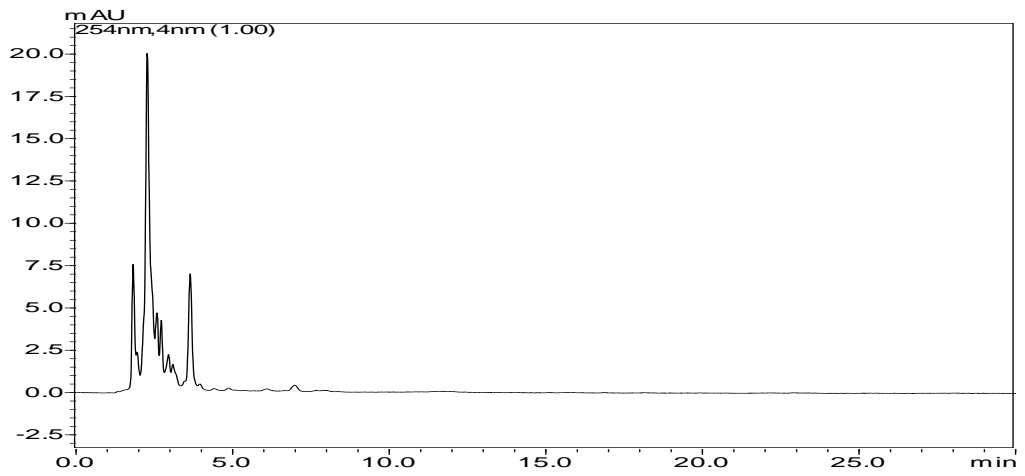
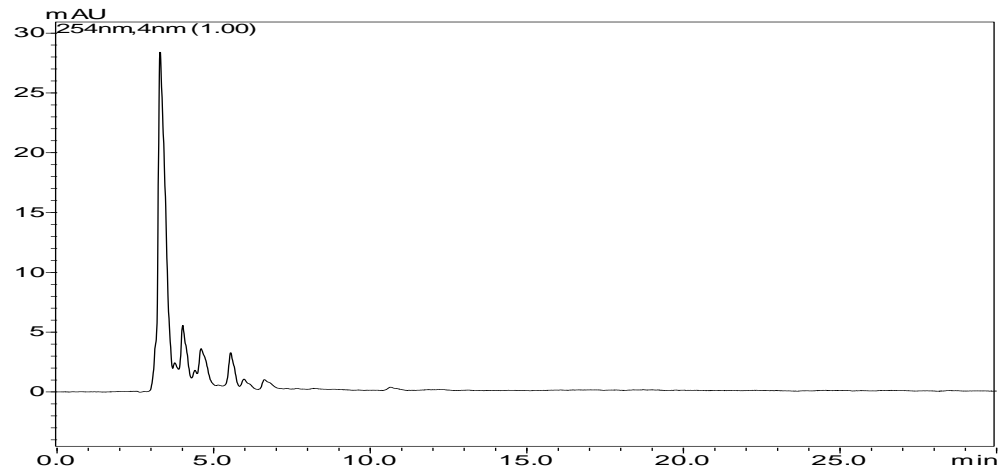
Amostra 21: Cromatogramas das extrações ácida, básica e neutra, respectivamente.



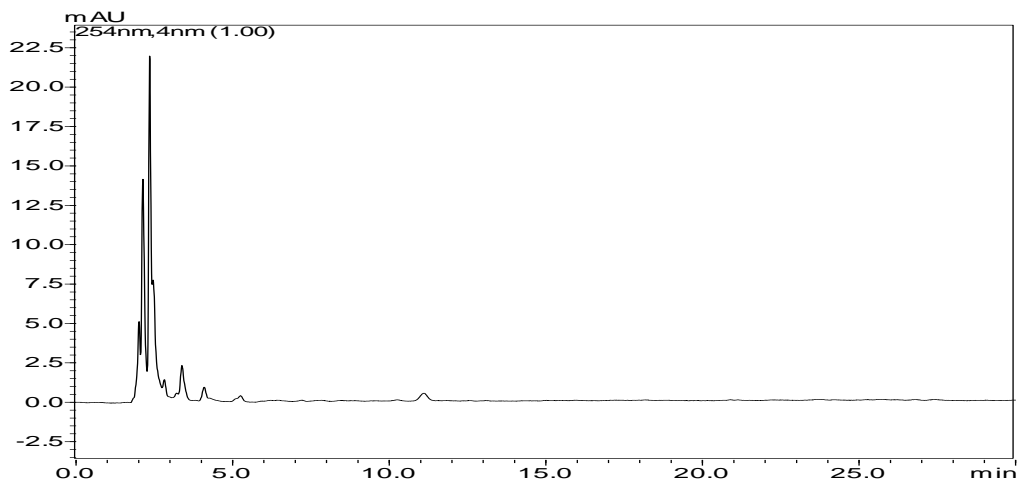
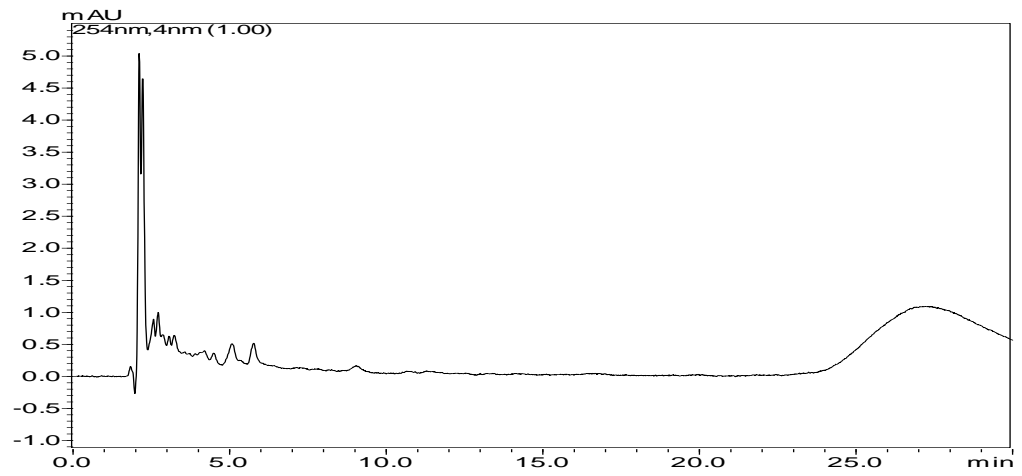
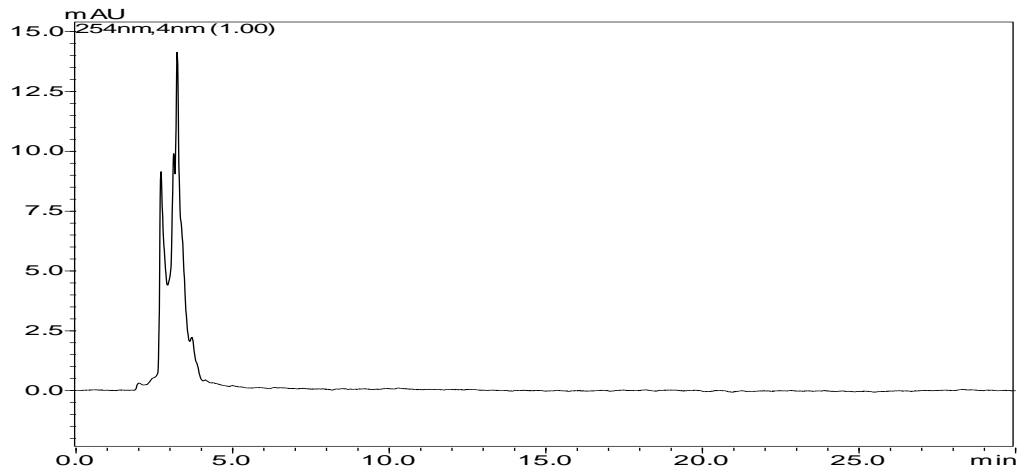
Amostra 22: Cromatogramas das extrações ácida, básica e neutra, respectivamente.



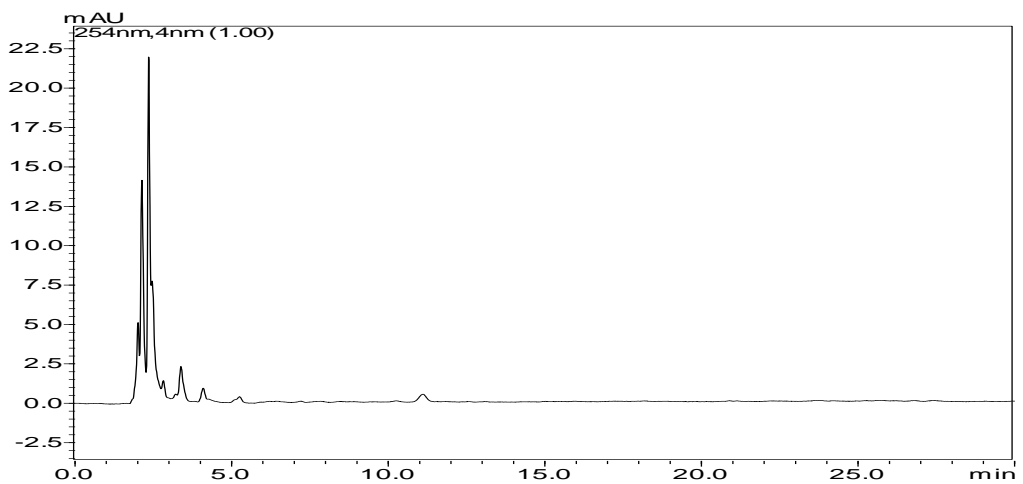
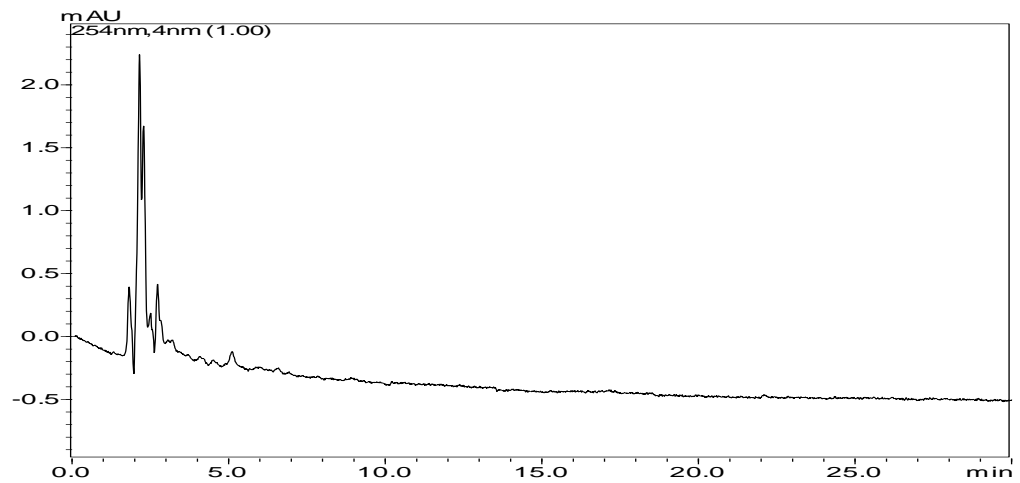
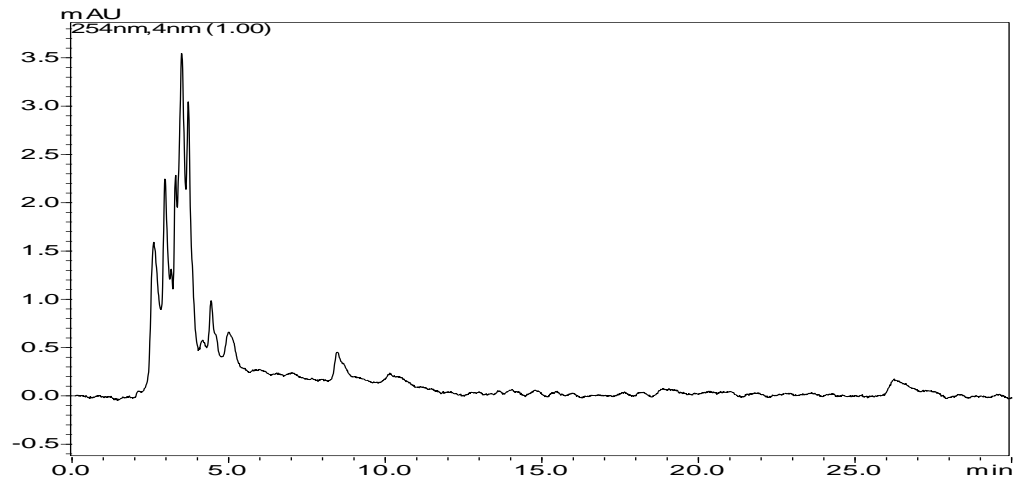
Amostra 23: Cromatogramas das extrações ácida, básica e neutra, respectivamente.



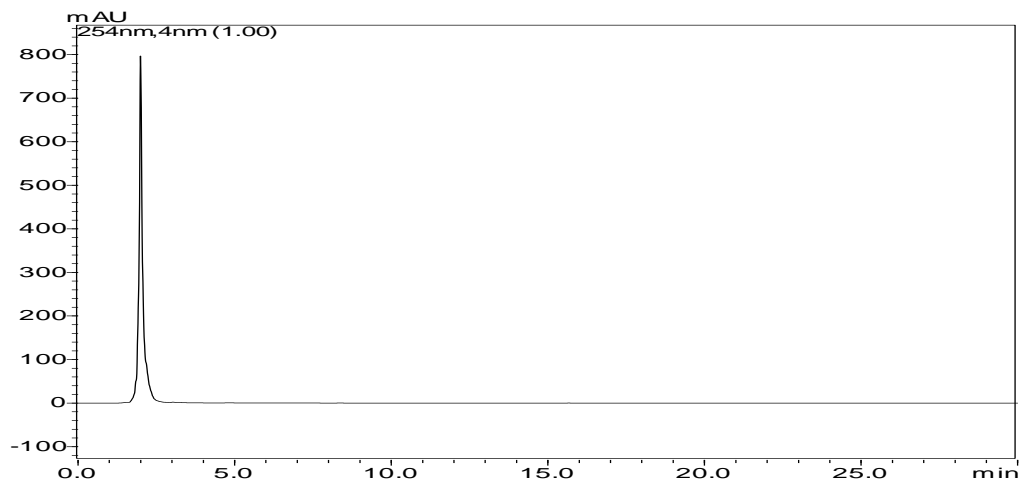
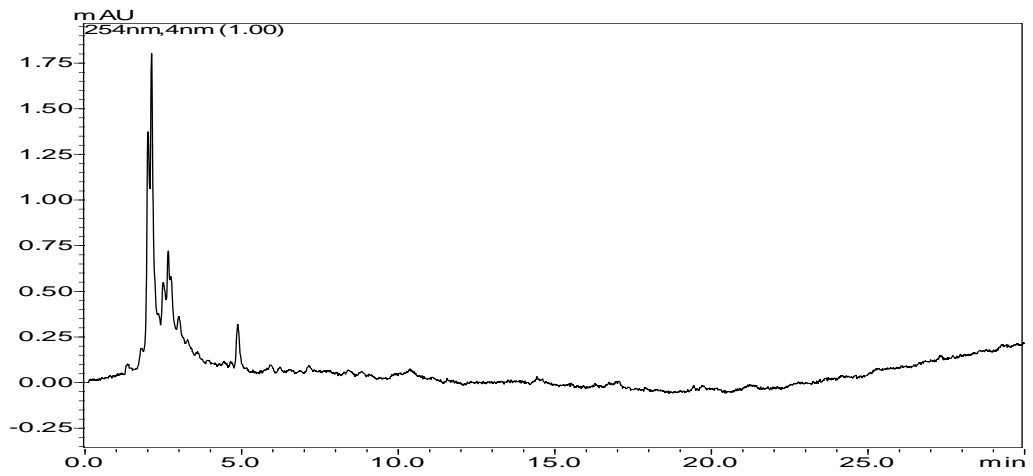
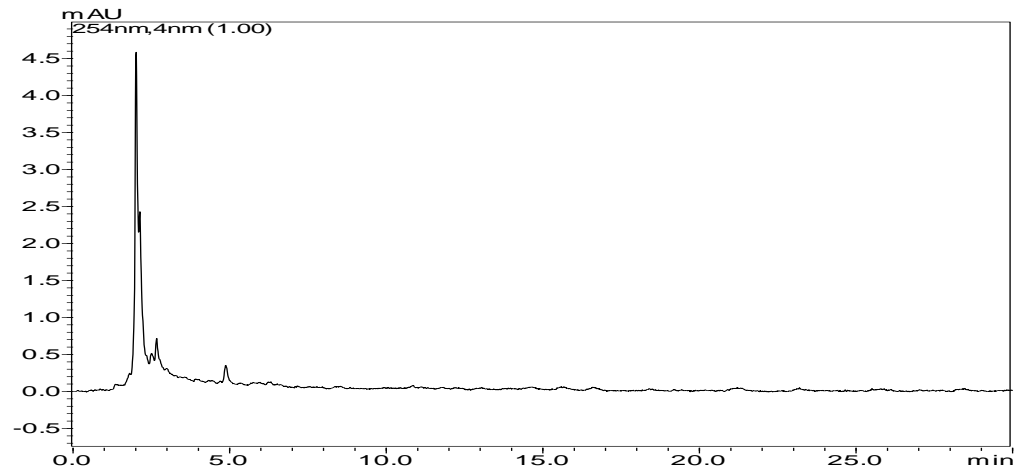
Amostra 24: Cromatogramas das extrações ácida, básica e neutra, respectivamente.



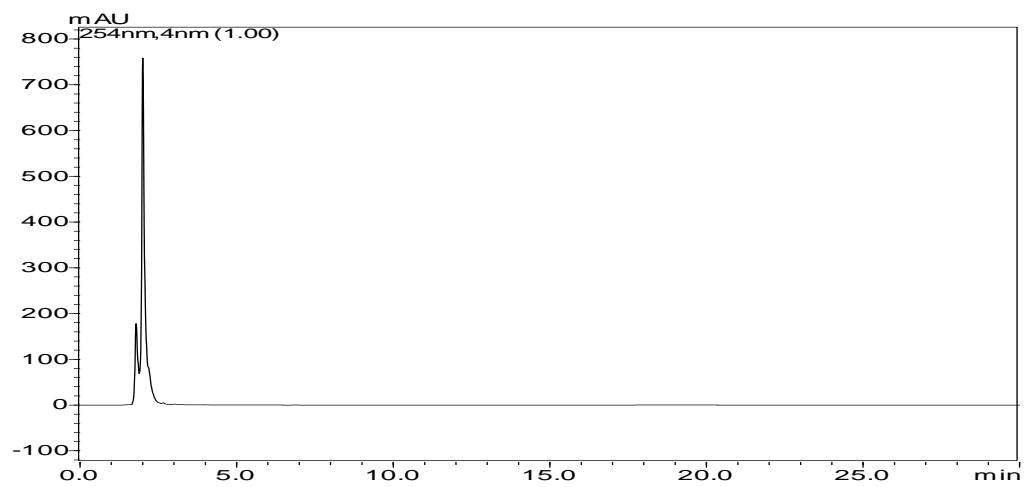
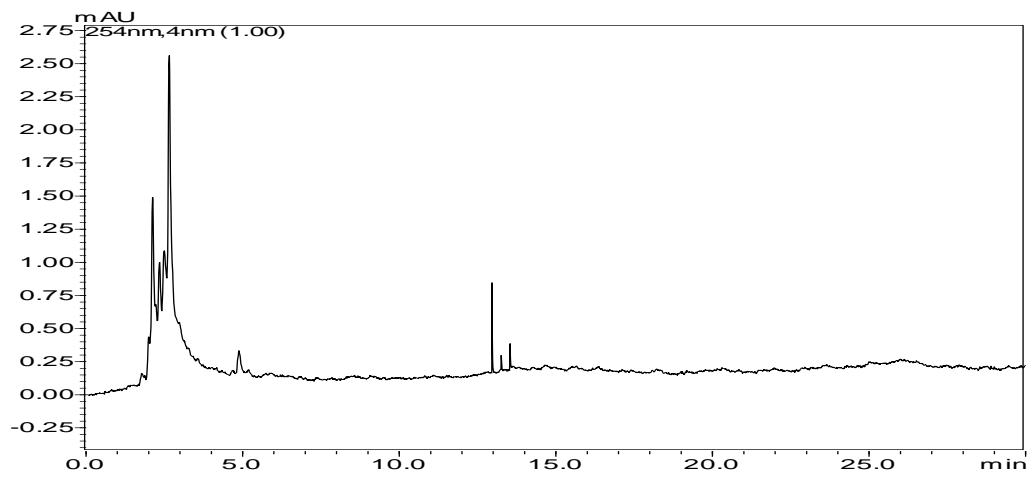
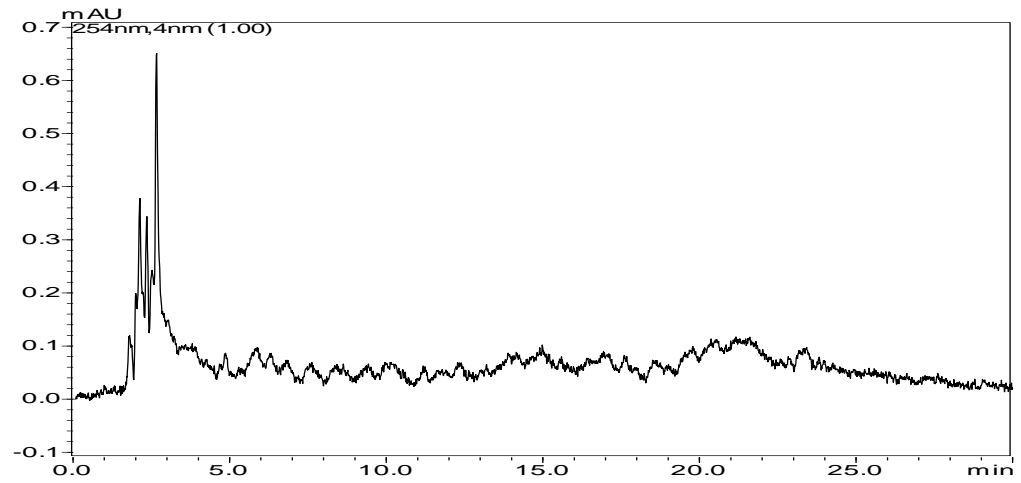
Amostra 25: Cromatogramas das extrações ácida, básica e neutra, respectivamente.



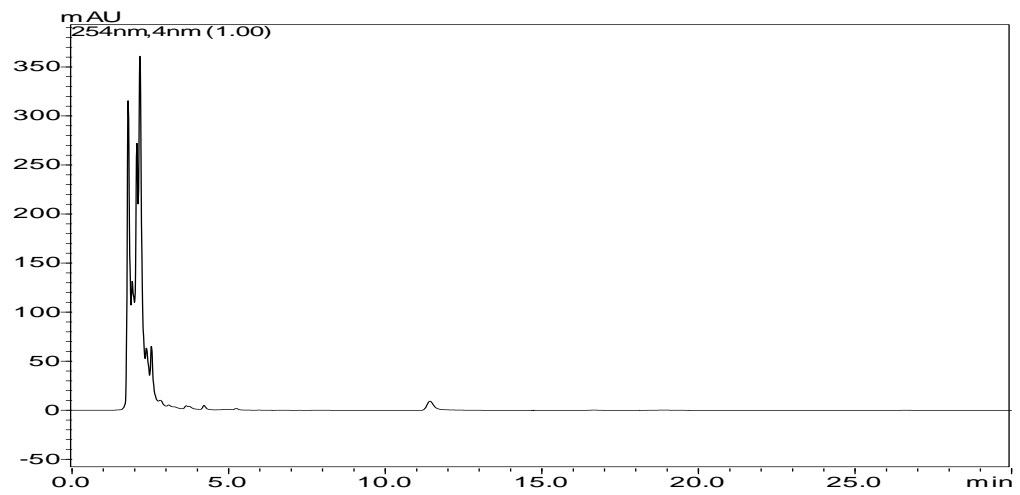
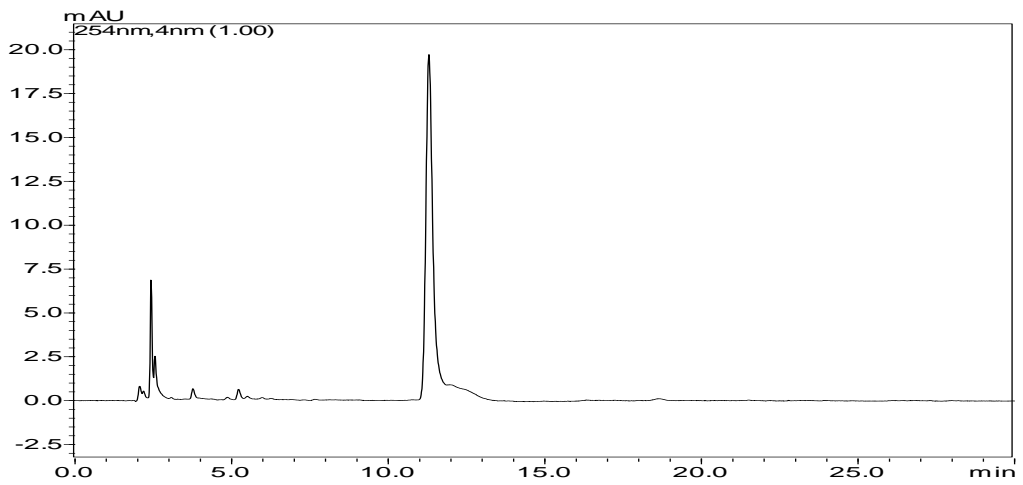
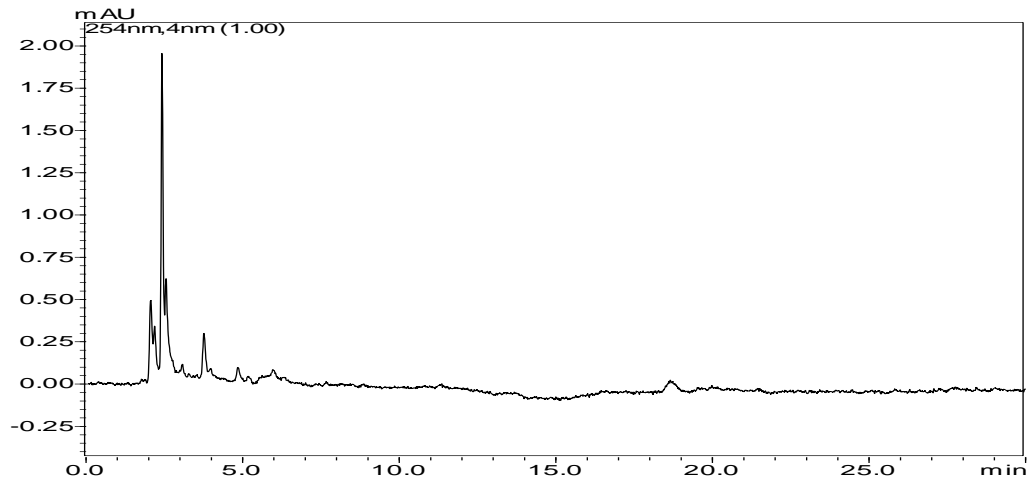
Amostra 26: Cromatogramas das extrações ácida, básica e neutra, respectivamente.



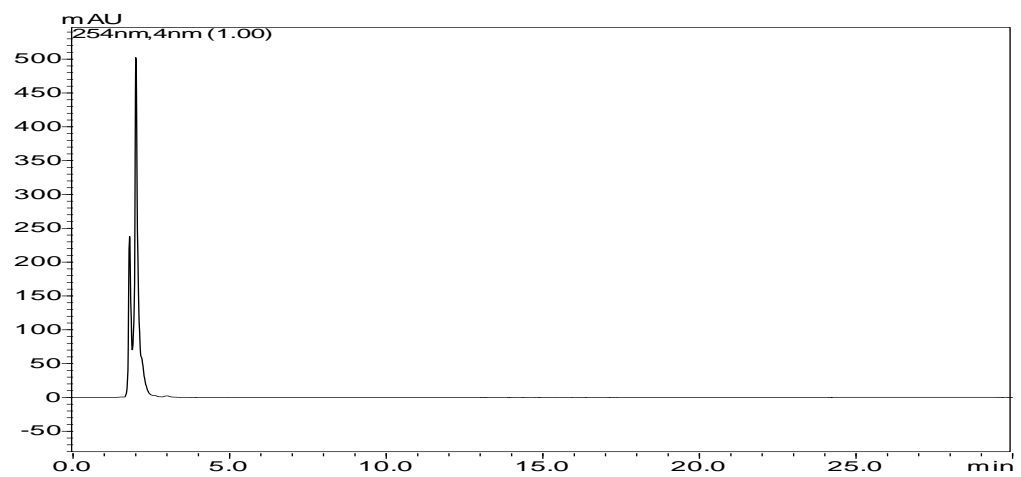
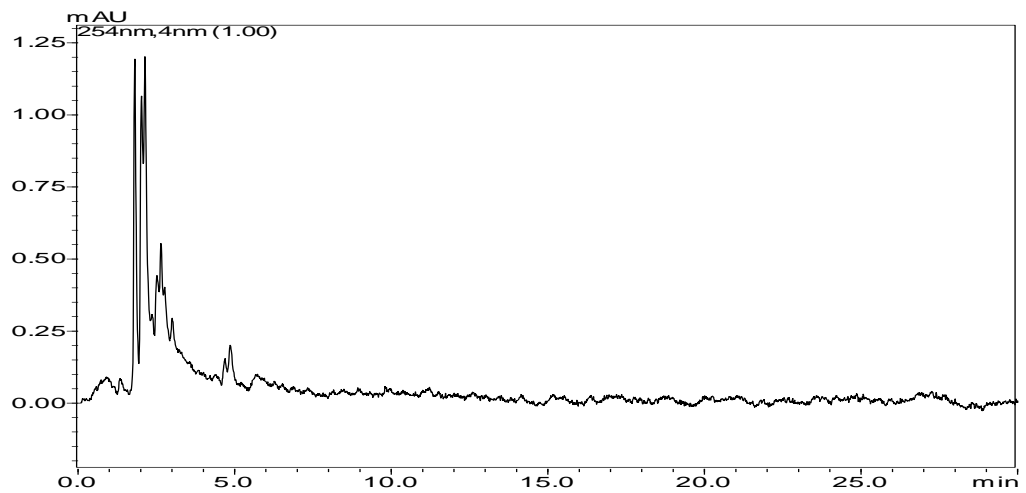
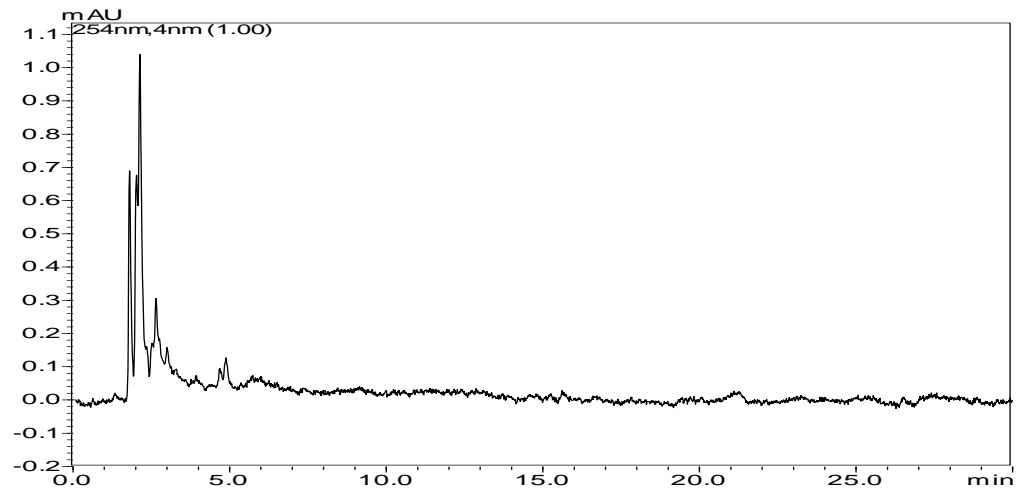
Amostra 27: Cromatogramas das extrações ácida, básica e neutra, respectivamente.



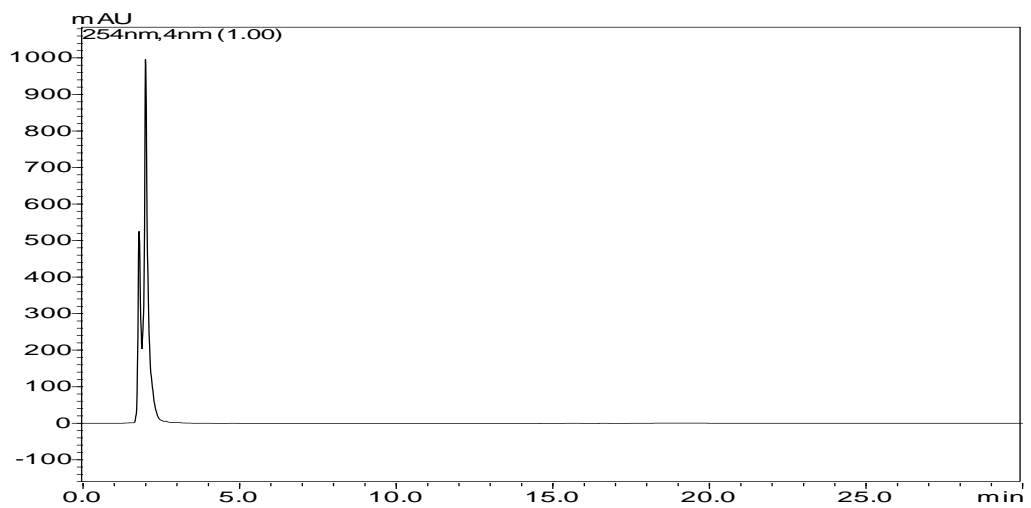
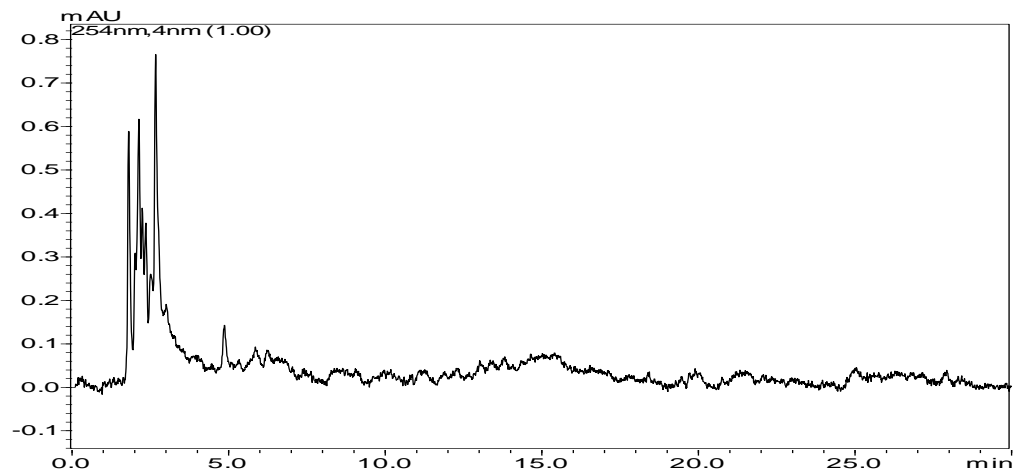
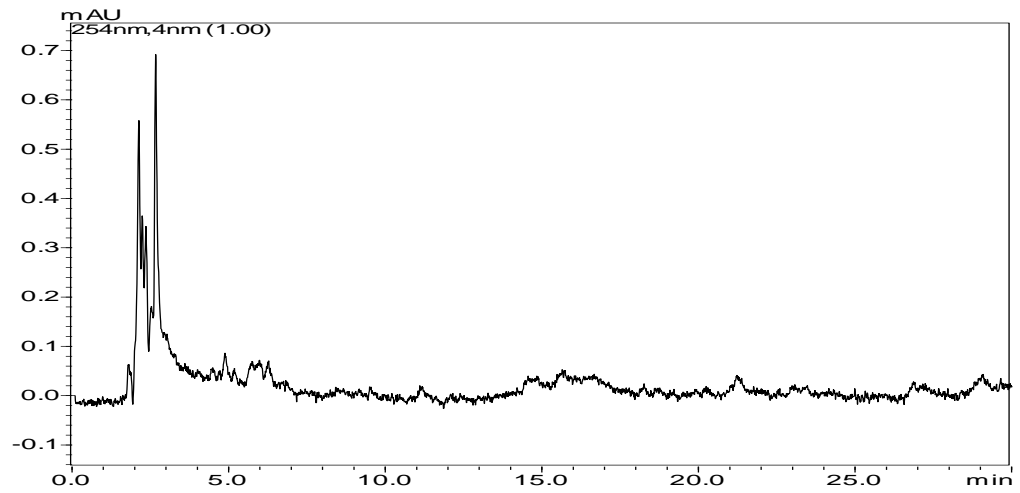
Amostra 28: Cromatogramas das extrações ácida, básica e neutra, respectivamente.



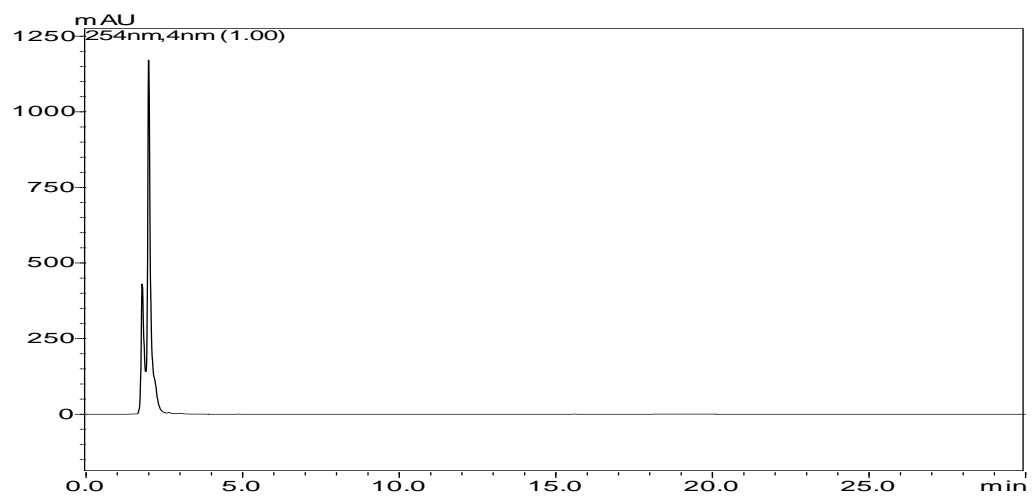
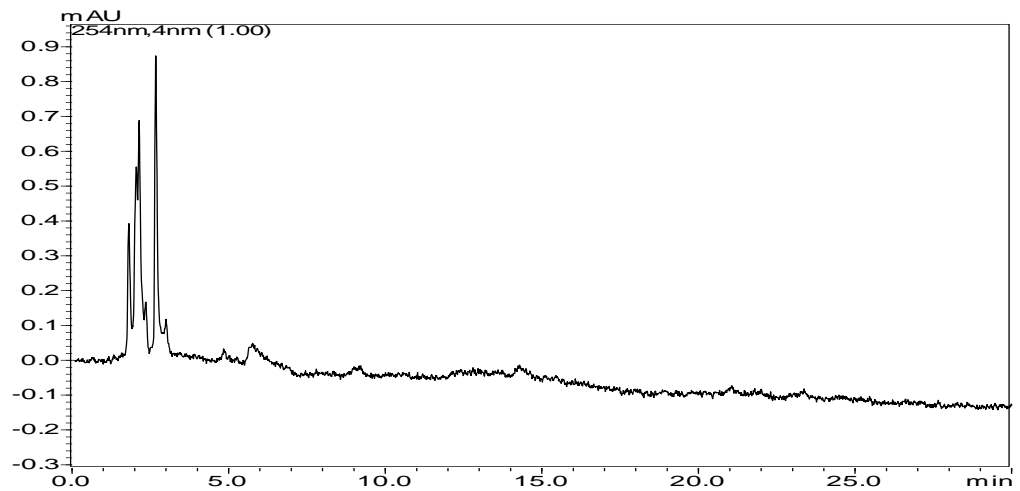
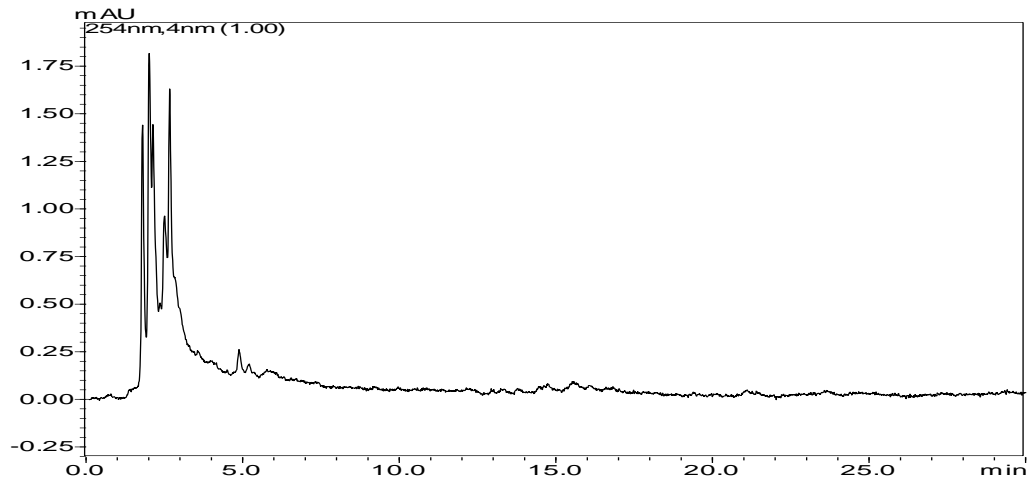
Amostra 29: Cromatogramas das extrações ácida, básica e neutra, respectivamente.



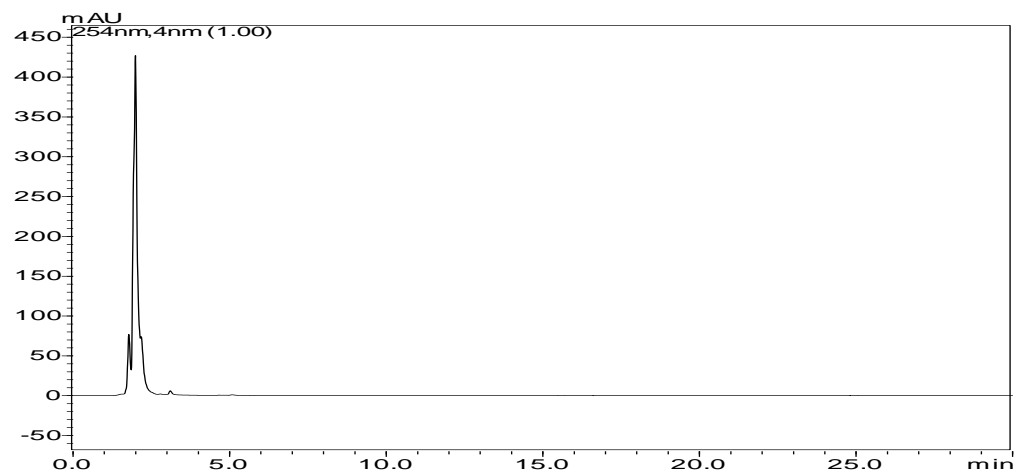
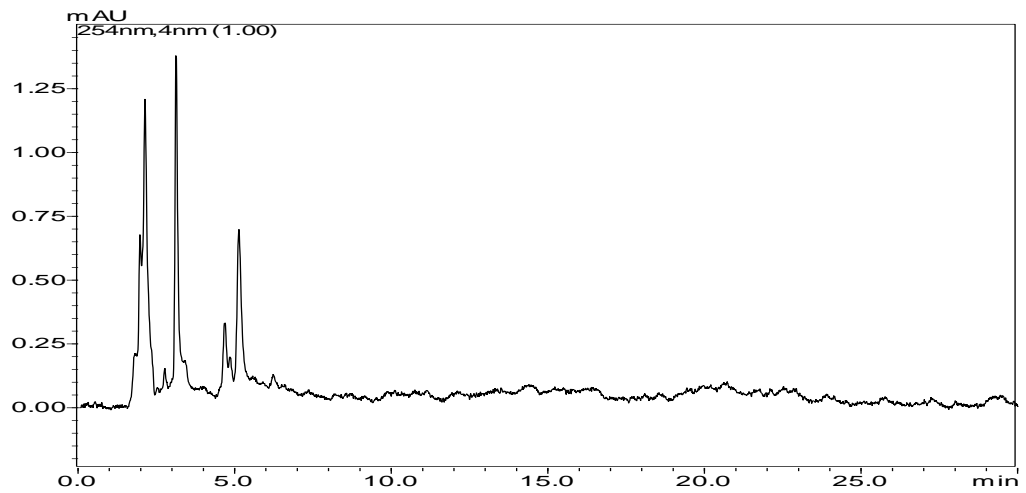
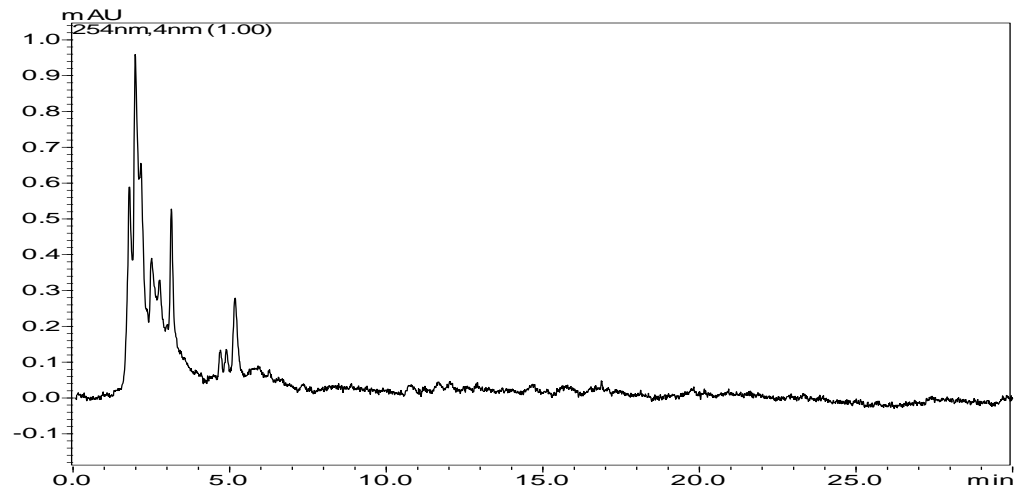
Amostra 30: Cromatogramas das extrações ácida, básica e neutra, respectivamente.



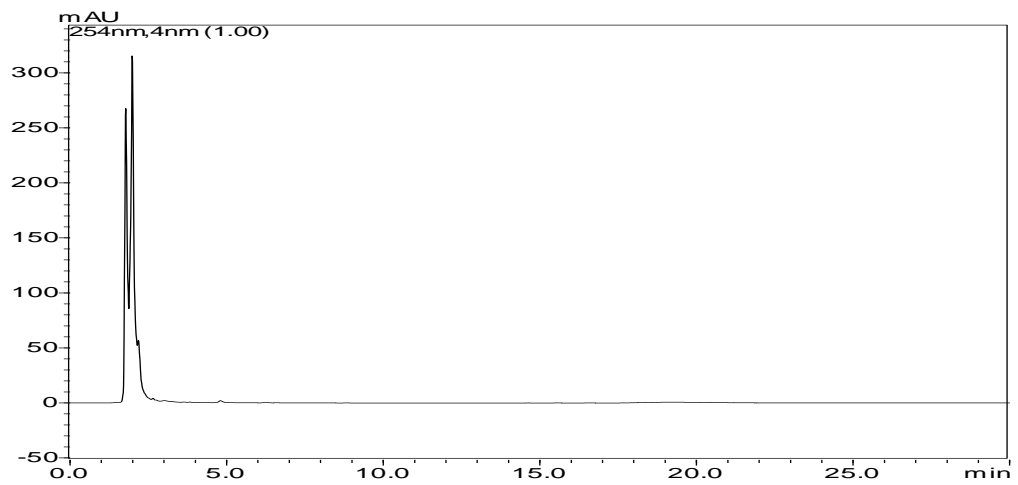
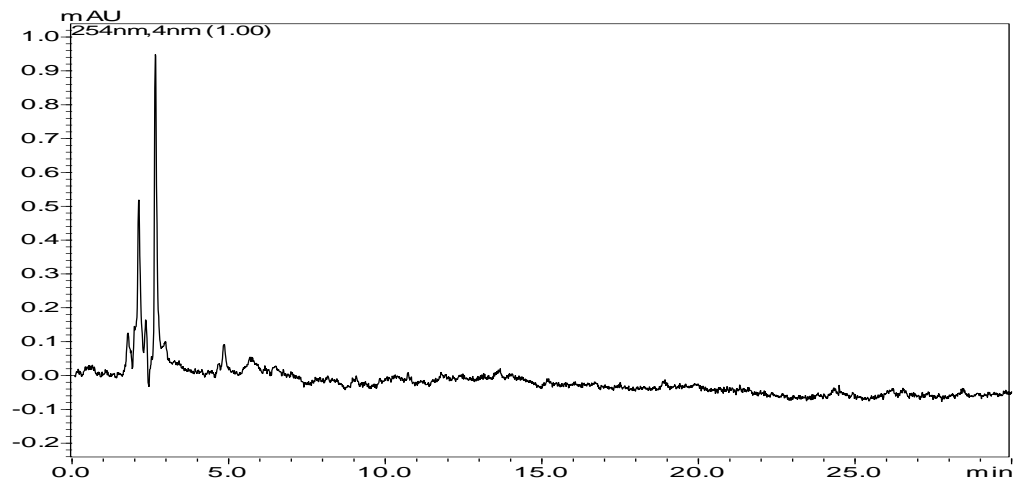
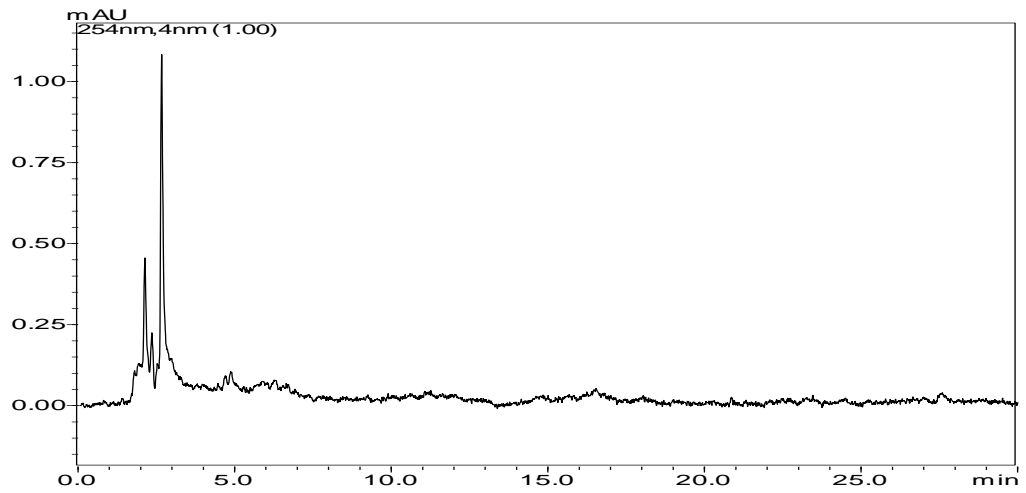
Amostra 31: Cromatogramas das extrações ácida, básica e neutra, respectivamente.



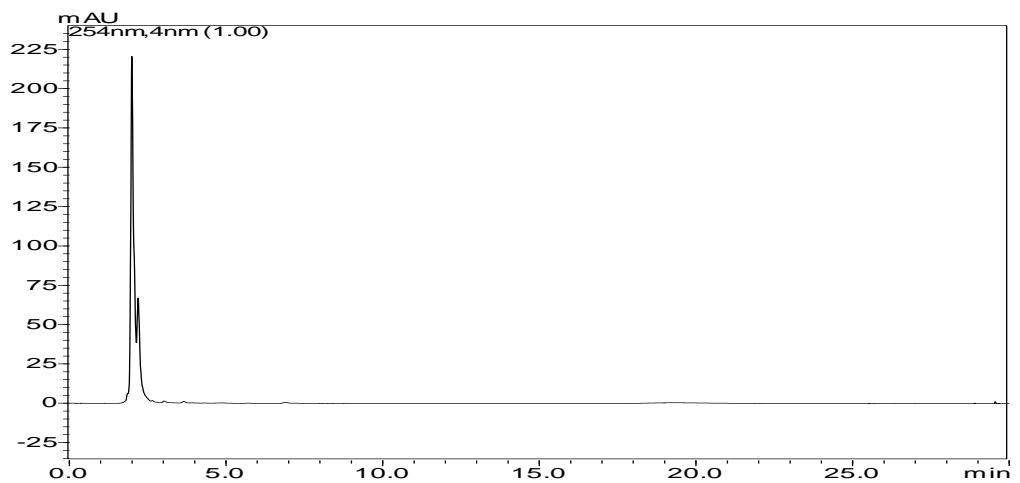
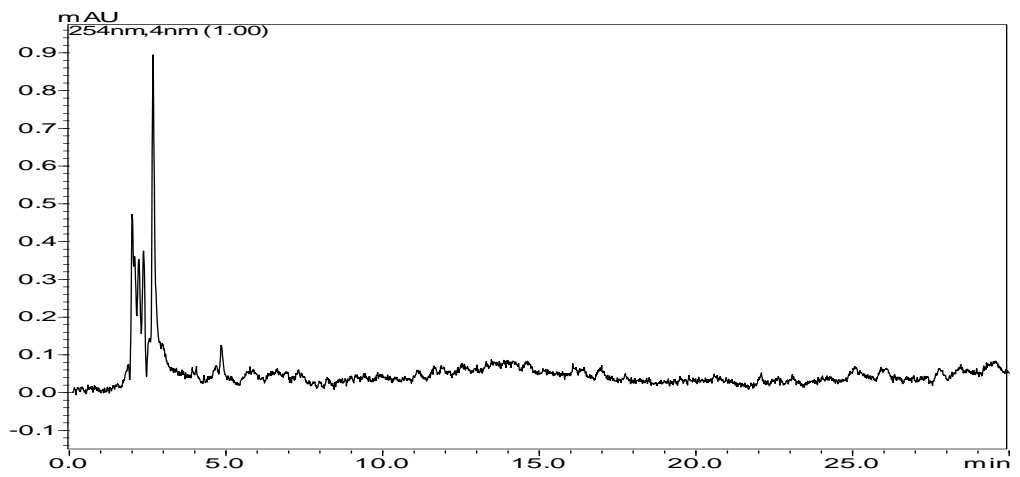
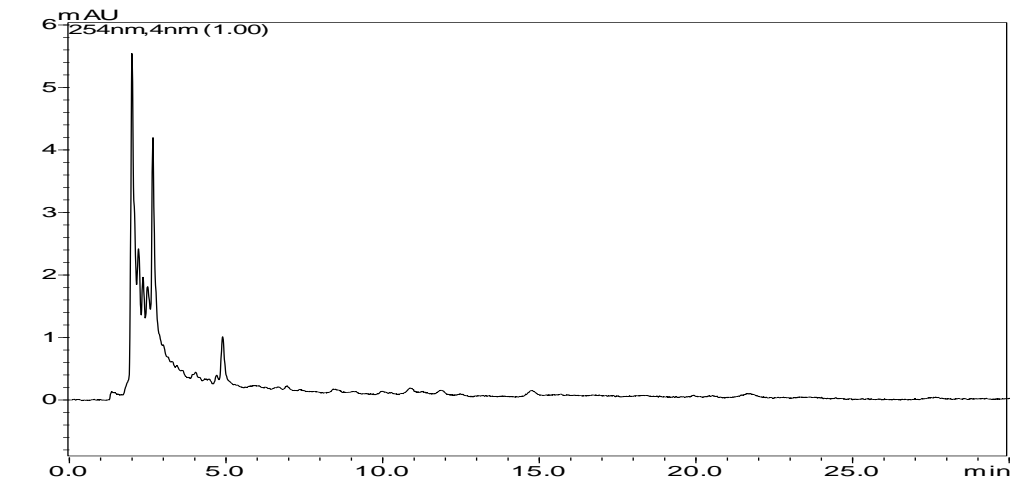
Amostra 32: Cromatogramas das extrações ácida, básica e neutra, respectivamente.



Amostra 33: Cromatogramas das extrações ácida, básica e neutra, respectivamente.



Amostra 34: Cromatogramas das extrações ácida, básica e neutra, respectivamente.



Amostra 35: Cromatogramas das extrações ácida, básica e neutra, respectivamente.

