

MATERIAL COMPLEMENTAR
FUNDAMENTOS DE TOXICOLOGIA
FORENSE, ANÁLISE TOXICOLÓGICA
DE ETANOL EM SANGUE
(ALCOOLEMIA) E OUTROS
SOLVENTES ORGÂNICOS VOLÁTEIS



TransPor

Treinamento sobre Novas
Substâncias Psicoativas

EXPEDIENTE

GOVERNO FEDERAL

PRESIDENTE DA REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

Luís Inácio Lula da Silva

MINISTRO DE ESTADO DA JUSTIÇA E SEGURANÇA PÚBLICA

Flávio Dino de Castro e Costa

SECRETÁRIA NACIONAL DE POLÍTICAS SOBRE DROGAS E GESTÃO DE ATIVOS

Marta Rodrigues de Assis Machado

DIRETORA DE PESQUISA, AVALIAÇÃO E GESTÃO DE INFORMAÇÕES

Maria Paula Gomes dos Santos

COORDENADORA-GERAL DE ENSINO E PESQUISA

Andreia de Oliveira Macedo

CONTEUDISTAS

Elvis Medeiros de Aquino

Gabriele Hampel

José Luiz da Costa



BY

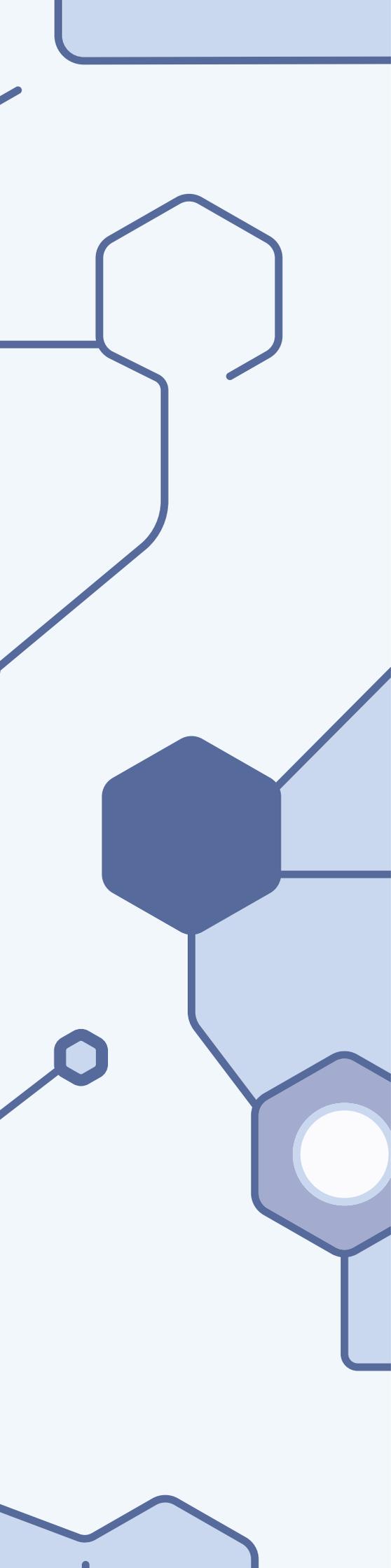


NC



ND

Todo o conteúdo do Curso TraNSPor – Treinamento sobre Novas Substâncias Psicoativas, da Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas e Gestão de Ativos (SENAD), Ministério da Justiça e Segurança Pública (MJSP) do Governo Federal - 2023, está licenciado sob a Licença Pública Creative Commons Atribuição - Não Comercial- Sem Derivações 4.0 Internacional.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

COORDENAÇÃO GERAL

Luciano Patrício Souza de Castro

FINANCEIRO

Fernando Machado Wolf

CONSULTORIA TÉCNICA EAD

Giovana Schuelter

COORDENAÇÃO DE PRODUÇÃO

Francielli Schuelter

COORDENAÇÃO DE AVEA

Andreia Mara Fiala

SECRETARIA

Elson Rodrigues Natario Junior

Murilo Cesar Ramos

DESIGN INSTRUCIONAL

Supervisão: Milene Silva de Castro

Gabriel de Melo Cardoso

Marielly Agatha Machado

DESIGN GRÁFICO

Supervisão: Caroline Daufemback Henrique

Eduardo Celestino

Laura Matielo Frota

Luana Pillmann de Barros

Vanessa de Oliveira Vieira

REVISÃO TEXTUAL

Cleusa Iracema Pereira Raimundo

PROGRAMAÇÃO

Supervisão: Alexandre Dal Fabbro

Luiz Eduardo Pizzinato

Thiago Assi

AUDIOVISUAL

Supervisão: Rafael Poletto Dutra

Andrei Krepsky de Melo

Daniel Almeida Vital de Oliveira

Fabíola de Andrade Borges

Luiz Felipe Moreira Silva Oliveira

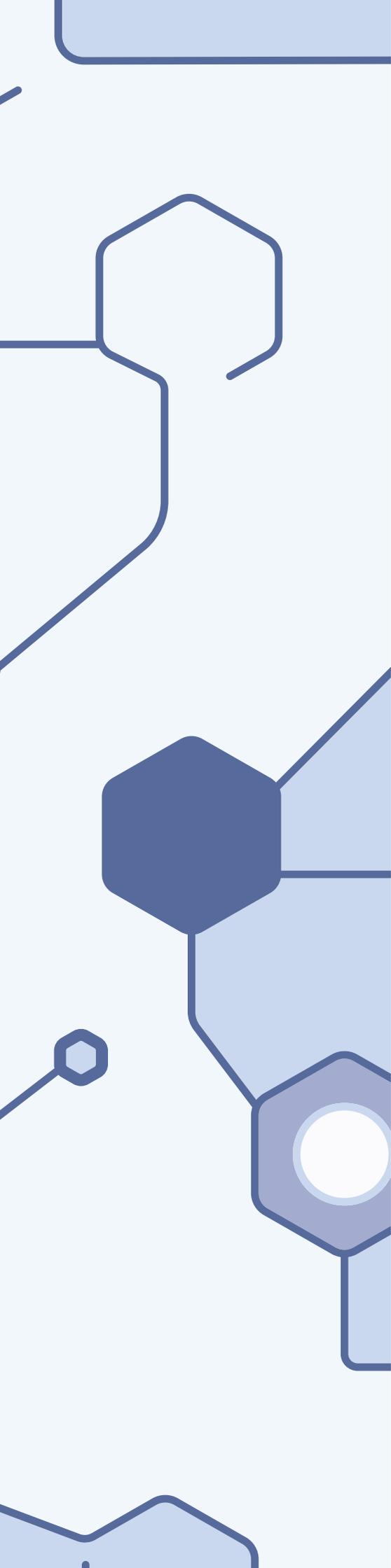
Robner Domenici Esprocati

TECNOLOGIA DA INFORMAÇÃO

Wilton Jose Pimentel Filho

SUMÁRIO

UNIDADE 1 FUNDAMENTOS DE TOXICOLOGIA FORENSE	7
1.1 Princípios da Toxicologia	8
1.2 Toxicocinética	9
1.3 Toxicodinâmica	15
1.4 Toxicologia Forense	16
UNIDADE 2 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS EM ANÁLISES TOXICOLÓGICAS	29
2.1 Limite de detecção	31
2.2 Limite de quantificação (LQ)	33
2.3 Linearidade / faixa linear de trabalho e modelo de calibração	35
2.4 Exatidão	37
2.5 Precisão	38
2.6 Contaminação cruzada (<i>carryover</i>)	40
2.7 Estudos de interferentes	41
2.8 Estabilidade de amostras	43
2.9 Integridade de diluição	44
2.10 Robustez	44



**UNIDADE 3 | ANÁLISE DE SOLVENTES
ORGÂNICOS VOLÁTEIS POR CROMATOGRAFIA
GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA
DE MASSAS** **45**

3.1 Os inalantes 45

3.2 Análise de inalantes por GC-MS 46

**UNIDADE 4 | ANÁLISE TOXICOLÓGICA
QUALITATIVA E QUANTITATIVA EM
AMOSTRAS DE INTERESSE FORENSE** **55**

4.1 Análises por Cromatografia Gasosa acoplada
à Espectrometria de Massas (GC-MS) em
Toxicologia Forense 59

4.2 Considerações sobre o uso do GC-MS em
Toxicologia Forense 62

4.3 O Tuning e sua importância para o Exame
Toxicológico por GC-MS 76

4.4 Manutenção do GC-MS utilizado na Análise de
Amostras Biológicas 78

4.5 Edição de Métodos para GC-MS 81

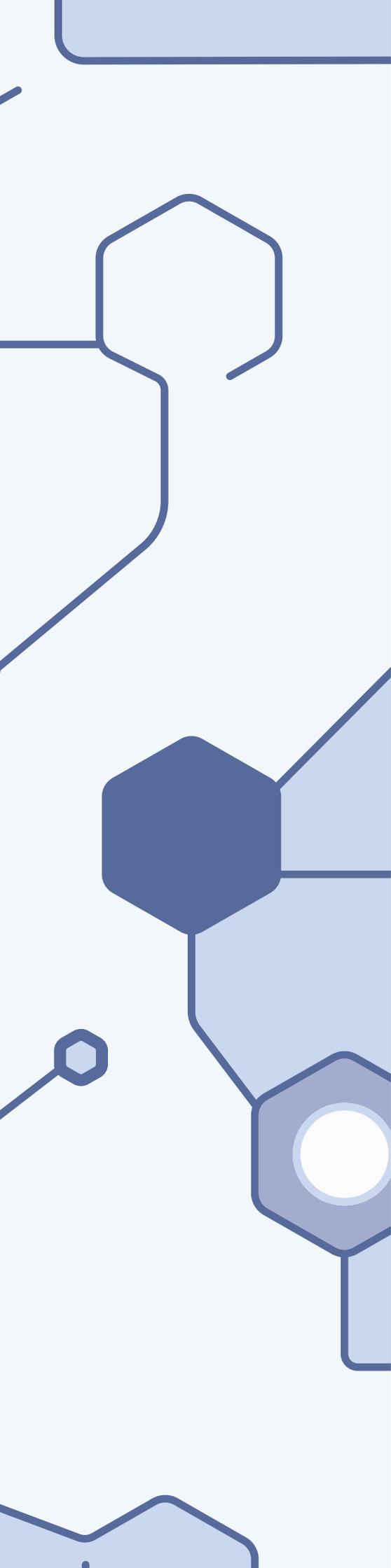
4.6 Tratamento de dados para Análise Qualitativa 86

4.7 Identificação de Cocaína em Urina por GC-MS 97

4.8 Quantificação de Cocaína e Produtos de
Biotransformação por GC-MS em Sangue 100

4.9 Quantificação de Cocaína e Metabólitos por
Extração Líquido-líquido e GC-MS em sangue 105

4.10 Quantificação de Ácido 11-NOR-DELTA-9-
TETRAHIDROCANABINOL (THC-COOH) em Urina
por GC-MS 109



UNIDADE 5 ANÁLISE TOXICOLÓGICA	114
QUANTITATIVA EM AMOSTRAS DE FLUIDO ORAL	
5.1 Análises Quantitativas de Fármacos e drogas de abuso em fluido oral	114
5.2 Recomendações internacionais para exames toxicológicos em fluido oral	122
5.3 Técnicas de preparo de amostras para fluido oral	131
5.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC)	136
5.5 Espectrometria de massas	142
5.6 Otimização dos analitos de interesse no espectrômetro de massas	146
5.7 Considerações sobre o dispositivo de fluido oral a ser usado e procedimento de coleta	160
5.8 Extração líquido-líquido para análise drogas de abuso em fluido oral	164
5.9 Extração micro-QuEChERS para análise de drogas de abuso em fluido oral	171
5.10 Análise das amostras de fluido oral	177
5.11 Validação analítica	186
5.12 Interpretação dos resultados analíticos	190

UNIDADE 1

FUNDAMENTOS DE TOXICOLOGIA FORENSE

A toxicologia é um ramo da ciência que estuda os efeitos nocivos causados por substâncias químicas em organismos vivos e tem como objetivos a prevenção, o diagnóstico e o tratamento das intoxicações. É uma ciência aplicada e multidisciplinar, implicando conhecimento em diversas áreas, como bioquímica, química, fisiologia, genética, matemática, farmacologia, entre outras.

Há diversas áreas que subdividem a toxicologia, as quais tratam de propósitos específicos e de estudos direcionados para determinado grupo de substância, matriz biológica e organismo vivo. São exemplos a toxicologia ambiental, experimental, clínica, de alimentos, forense e ocupacional. A toxicogenômica e toxicogenética são novos campos emergentes que estão mudando a maneira como pensamos sobre tóxicos e como eles afetam a saúde humana (HAYES; TOUWAIDE, 2014). Cada vez mais evidencia-se a necessidade de toxicologistas multidisciplinares na sociedade atual.

O conhecimento sobre plantas tóxicas, animais peçonhentos e venenos diversos sempre foi crucial para a sobrevivência, desde os tempos mais remotos, o que faz da toxicologia uma das ciências mais antigas. O objetivo era evitar o consumo acidental e utilizar tais venenos para matar os animais da caça ou os inimigos. Caçadores da América do Sul costumavam colocar nas pontas de suas flechas a planta *Strychnos toxifera* (curare), a fim de matar suas presas por paralisia dos músculos do sistema respiratório. Além disso, costumavam graduar a força dos diferentes venenos por meio da contagem do número de árvores que o macaco, após ser atingido pela flecha, conseguia pular antes de cair. Se o macaco lograsse pular três árvores, o veneno era considerado fraco para caça (AGGRAWAL; 2016).

A toxicologia evoluiu rapidamente no século XX. As tragédias que ocorreram devido a administração de novos medicamentos tornaram a avaliação de toxicidade parte obrigatória dos estudos prévios à comercialização, assim como o controle rígido de qualidade em todo o processo de fabricação. Em 1937, o antimicrobiano sulfanilamida foi vendido nos EUA na forma de xarope, utilizando o dietilenoglicol como excipiente. Menos de um mês após chegar às farmácias, notificou-se a morte de aproximadamente 100 pessoas, principalmente crianças, em decorrência do uso do produto. À época, não se pensou em testar a toxicidade do dietilenoglicol (HAYES; TOUWAIDE, 2014). Outro evento marcante para a toxicologia clínica foi o nascimento de milhares de crianças com defeitos congênitos ao redor do mundo, devido à ingestão de talidomida por gestantes entre 1957 e 1961. O fármaco foi retirado do mercado em 1962. No Brasil, no entanto, retornou em 1965 como tratamento para lesões de pele causadas pela hanseníase, e permanece até hoje.

1.1 PRINCÍPIOS DA TOXICOLOGIA

A definição de um toxicante (ou agente tóxico) é algo complexo, sob ponto de vista quantitativo e considerando a variedade biológica dos organismos vivos expostos. Toda substância, a depender da dose administrada, pode causar danos, como bem propôs Paracelsus (1493-1541), conhecido como um dos homens mais importantes no campo da toxicologia. Os medicamentos são exemplos clássicos, pois, embora terapêuticos e altamente benéficos em determinadas doses, apresentam efeitos danosos e, em altas doses, podem ser letais. No Brasil, os medicamentos se apresentam como o principal agente tóxico causador de intoxicação em seres humanos, ocupando, desde 1999, o primeiro lugar nas estatísticas do SINITOX (Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas-Fiocruz-Ministério da Saúde), conforme os dados disponíveis no site: <https://sinitox.icict.fiocruz.br/dados-nacionais>. Os metais, da mesma forma, ilustram bem a importância do conhecimento da relação dose-resposta, pois muitos são essenciais na dieta humana, mas tóxicos em altas doses.

A avaliação da resposta frente a dose administrada, ou relação dose-efeito, é imperativo aos toxicologistas. Geralmente, aumentando-se gradualmente as doses administradas a um indivíduo, ocorre aumento proporcional da resposta medida (por exemplo, determinado efeito tóxico). Qualquer que seja a resposta selecionada para medição, a relação entre o grau de resposta do sistema biológico e a quantidade de toxicante administrada assume uma forma tão consistente que é considerada o conceito mais fundamental e difundido na toxicologia (ROSS, 1996).

Existem dois tipos de relação dose-efeito. Uma medida no indivíduo, denominada relação dose resposta individual. Outra medida na população, denominada relação dose resposta quantal. Na relação dose-resposta individual, que descreve a resposta de um organismo individual a doses variáveis de uma substância, o efeito medido é contínuo em uma variedade de doses. Na relação dose-resposta quantal, verifica-se o efeito quantal, isto é, se a resposta está presente ou ausente (tudo ou nada), e a melhor forma de representação são as curvas de frequência de distribuição cumulativa versus o logaritmo da dose, o que produz geralmente curvas gaussianas (MEDINSKY; VALENTINE, 2001).

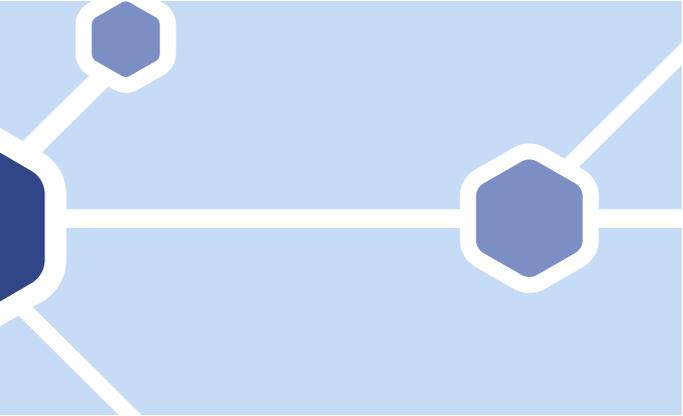
A dose letal média (DL50) é determinada experimentalmente, utilizando-se os dados do fenômeno quantal dose-efeito, e é definida como a dose capaz de matar 50% dos animais testados. Esse é o indicador mais utilizado para se estimar a toxicidade aguda de um certo composto em humanos. Embora a informação isolada e única do

DL50 limite certas conclusões, seu valor constitui-se de importante referência para classificar a toxicidade do agente. Algumas substâncias possuem baixa toxicidade aguda, caracterizada por um baixo DL50; no entanto, podem ser altamente carcinogênicas. Tal informação não pode ser deduzida a partir deste parâmetro, sendo necessária a aplicação de testes específicos que avaliam a toxicidade crônica por meio de exposições prolongadas e doses cumulativas (BARILE, 2008).

A exposição de animais experimentais às substâncias testadas pode ser feita uma única vez, definida como exposição aguda, ou repetidas vezes, dividida então em três categorias: subaguda, subcrônica e crônica. A variedade biológica dos organismos expostos às substâncias providencia diferentes mecanismos fisiológicos que podem ser capazes ou não de impedir o aparecimento de determinado efeito tóxico, fazendo com que uma substância possa ser considerada tóxica para uma espécie, mas não para outra (HODGSON, 2004). Tal variabilidade, portanto, torna-se um fator limitante no momento de extrapolar os achados experimentais (onde as cobaias são animais) para os humanos. Pela mesma razão, os testes de toxicidade devem sempre informar a espécie animal usada.

1.2 TOXICOCINÉTICA

Após exposição ao toxicante, há a ação do organismo sobre o composto, na tentativa de mitigar ou impedir os efeitos nocivos. Nesse processo, em que o composto se movimenta pelo corpo, ocorre simultaneamente os processos de absorção, distribuição pelos tecidos, biotransformação e finalmente a eliminação (excreção) do agente tóxico.



O estudo matemático que relaciona os fenômenos de absorção, distribuição, biotransformação e excreção de substâncias tóxicas em relação ao tempo chama-se toxicocinética. Os conceitos cinéticos básicos para tais processos vieram inicialmente do estudo de fármacos (farmacologia); portanto, essa área de estudo é tradicionalmente chamada de farmacocinética, sendo a toxicocinética a extensão desses princípios (GUPTA, 2016).

Usando modelos toxicocinéticos é possível prever o comportamento de uma substância tóxica sob diferentes cenários de exposição e rotas de administração, auxiliando no monitoramento e na avaliação do risco toxicológico. Ainda assim, outros fatores diversos podem alterar o movimento do composto pelo corpo, tais como indução ou inibição enzimática, variabilidade biológica, biotipo, entre outras (JOHANSON, 2017).

1.2.1 EXPOSIÇÃO AO AGENTE TÓXICO

A primeira fase do processo de intoxicação é a fase de exposição, que ocorre quando o toxicante entra em contato com o organismo. A porta de entrada pode ser diversa: via intravenosa (diretamente no sangue), pulmonar (inalação), gastrointestinal (ingestão), cutânea (tópica ou percutânea), intramuscular, entre outras.

A duração e a frequência da exposição influenciam tanto na determinação do efeito tóxico quanto na sua intensidade. Em situações práticas do cotidiano, a frequência e a duração das exposições geralmente não são definidas tão claramente quanto aquelas verificadas em estudos com animais controlados, mas muitos dos mesmos termos são usados para descrever situações gerais de exposição. Assim, as exposições a substâncias descritas como agudas são resultantes de um único incidente ou de múltiplos eventos durante um período máximo de 24 horas, as exposições subcrônicas são resultantes de episódios repetidos por várias semanas ou meses e as crônicas resultam de episódios repetidos por muitos meses ou anos (MEDINSKY; VALENTINE, 2001).

A forma de exposição, aguda ou crônica, traz informações fundamentais ao toxicologista para uma adequada coleta de amostras. As substâncias se concentrarão em diferentes fluidos/tecidos a depender, além de outros fatores, da frequência com a qual foi introduzida no organismo e do tempo de permanência ou de acúmulo antes de manifestar os sintomas de intoxicação.

1.2.2 VIAS DE ADMINISTRAÇÃO E ABSORÇÃO

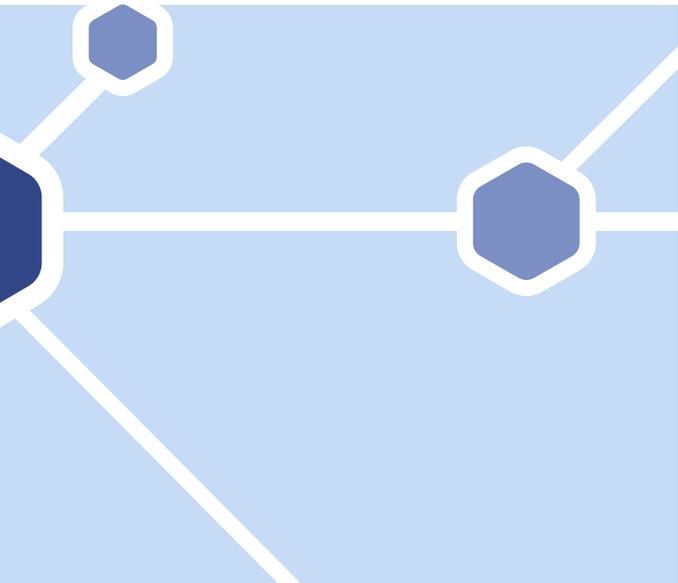
A absorção é etapa crucial na toxicocinética. Exceto aqueles que são introduzidos diretamente no sangue (via intravenosa), todos os toxicantes precisam cruzar as membranas celulares antes de atingirem a circulação sanguínea. Esta passagem do toxicante, do meio externo para a corrente sanguínea, cruzando membranas biológicas, é conhecida como absorção.

Algumas membranas, como o epitélio gastrointestinal, a barreira hematoencefálica, a barreira hemato-retiniana e a placenta, impedem ou limitam a entrada de substâncias. Consequentemente, as concentrações das drogas e metabolitos em ambos os lados dessas barreiras podem ser marcadamente diferentes. Além disso, a composição dos fluidos geralmente é diferente (um compartimento talvez não possua altas concentrações de proteínas, por exemplo), e por esse motivo, alguns toxicantes podem ser encontrados em altas concentrações em alguns tecidos e não em outros (FLANAGAN, 2020).

Em vista disso, a via pela qual as substâncias são administradas no corpo é um fator importante na determinação da taxa e extensão da absorção, sendo altamente relevante no que tange à intensidade do efeito, pois é capaz de modificar drasticamente a velocidade com a qual a droga alcança o alvo. Quanto mais rápido é o efeito, mais rápido ele se desfaz e maior é o potencial para geração de dependência.

A ordem decrescente de eficiência dessas vias é: intravenosa > pulmonar > intraperitoneal > subcutânea > intramuscular > intradérmica > oral, cutânea.

Os principais mecanismos de transporte através das membranas são a difusão passiva, a difusão facilitada e o transporte ativo, sendo a difusão passiva a forma mais utilizada por moléculas não iônicas. Difusão passiva refere-se ao processo em que uma substância se dissolve na membrana lipídica para entrar nas células. A direção da transferência é controlada pelo gradiente de concentração em ambos os lados da membrana, ocorrendo o movimento da substância a partir do lado de maior concentração para o de menor. Algumas características tais como a lipofilicidade do composto, seu grau de ionização e seu tamanho molecular facilitam a difusão passiva.



A taxa de absorção é proporcional à área de superfície da membrana e inversamente proporcional à sua espessura. Quando o composto é inalado, a grande área superficial dos pulmões leva à rápida absorção dos compostos inalados; além disso, o sangue que circulou pelos pulmões para sofrer oxigenação (e que recebeu o aporte de toxicante) deixa os pulmões em direção ao coração e logo em seguida para o cérebro. Portanto, as drogas administradas por via pulmonar (nicotina e cocaína, por exemplo) e por via intravenosa – na qual não ocorre a etapa limitante da absorção (heroína, por exemplo) – são capazes de desenvolver rapidamente dependência nos usuários, pois provocam efeitos psicotrópicos quase instantaneamente após sua administração.

Quando a substância é ingerida (via oral), apesar de ocorrer absorção em toda extensão do trato gastrointestinal, do estômago ao reto, o local principal da absorção é no intestino delgado superior, o qual apresenta células epiteliais com microvilosidades de alta área superficial (200 m²), alto fluxo sanguíneo e pH ideal (pH 5-7) (DRUMMER, 2008). A presença de excipientes na formulação e o veículo na qual ela está dissolvida/suspensa também são fatores que podem mudar acentuadamente a sua absorção e conseqüentemente sua biodisponibilidade e potência. O tempo para a absorção integral da droga na circulação sistêmica, a partir do trato gastrointestinal, é relativamente lento, tornando os efeitos mais suaves.

Além disso, antes de alcançar a circulação sistêmica, a substância administrada via oral é absorvida pelos capilares mesentéricos e se dirige ao fígado, por meio da veia porta, podendo ser extensamente metabolizada. Tal fenômeno é chamado de “efeito de primeira passagem”, sendo o responsável por reduzir a quantidade efetiva da droga e conseqüentemente seu efeito. Em alguns casos, a biotransformação torna a droga (pró-droga) ativa, e o fenômeno de primeira

passagem passa a ser fundamental para tal ativação. O metabolismo pré-sistêmico pode ocorrer em locais que não o fígado, como a mucosa intestinal e os pulmões (FLANAGAN, 2020).

1.2.3 DISTRIBUIÇÃO

A distribuição das substâncias no organismo se dá por meio da corrente circulatória e depende de vários fatores: o fluxo sanguíneo para os tecidos, o coeficiente de partição da substância entre o sangue e o tecido, o grau de ionização do composto no pH do plasma e o seu tamanho molecular, assim como a extensão da ligação ao tecido e às proteínas plasmáticas. Coração, fígado, rim, cérebro e outros órgãos bem perfundidos recebem grande parte da droga nos primeiros minutos depois da sua absorção. A entrada da droga nos músculos, nas vísceras e na gordura é mais lenta, e esses tecidos podem exigir vários minutos ou horas para que o equilíbrio seja atingido (BENET *et al.*, 1996).

A ligação a proteínas plasmáticas altera a distribuição da droga no corpo, uma vez que tal fração não é capaz de atravessar o endotélio vascular e então interagir com os tecidos. Se uma droga está 90% ligada às proteínas plasmáticas, apenas 10% pode exibir atividade biológica. Os anticoagulantes do tipo varfarina, por exemplo, que tem alta porcentagem de ligação a proteínas plasmáticas, ficam restritos ao plasma e ao fluido extracelular, enquanto o álcool se distribui igualmente na água total do corpo. As proteínas plasmáticas são predominantemente albumina (que preferencialmente liga drogas ácidas), β -globulina e glicoproteína ácida α -1 (particularmente as básicas). Devido à saturação das ligações, outras drogas podem competir, reduzindo a ligação da droga e aumentando sua disponibilidade de ação e, conseqüentemente, seu efeito. Essas, dentre outras, são informações importantes para serem levadas em consideração na interpretação dos resultados de uma análise (FLANAGAN *et al.*, 2020).

As concentrações de drogas nos tecidos raramente são iguais às do plasma. Imediatamente após administração intravenosa, alcança-se a concentração máxima de droga no plasma. À medida que o tempo avança, a quantidade da droga no compartimento do tecido aumenta e, assim como no compartimento do plasma, chega ao máximo, sendo simultaneamente eliminado. Se a substância for armazenada em um compartimento de tecido específico, a proporção final de concentração entre o tecido e o plasma será relativamente alta. Este é o caso do delta-9-tetrahydrocannabinol (THC), que se acumula no tecido adiposo, e dos agentes tóxicos inorgânicos (chumbo e o flúor, por exemplo), armazenados nos ossos.

A relação da concentração da droga em tecido: plasma depende não apenas dos processos de distribuição, mas também em grande parte da via de administração e se doses únicas ou múltiplas foram administradas. O conhecimento de como uma determinada droga ou metabolito se divide entre o sangue e os tecidos é importante na interpretação dos resultados analíticos, particularmente onde apenas um tipo de amostra está disponível para análise.

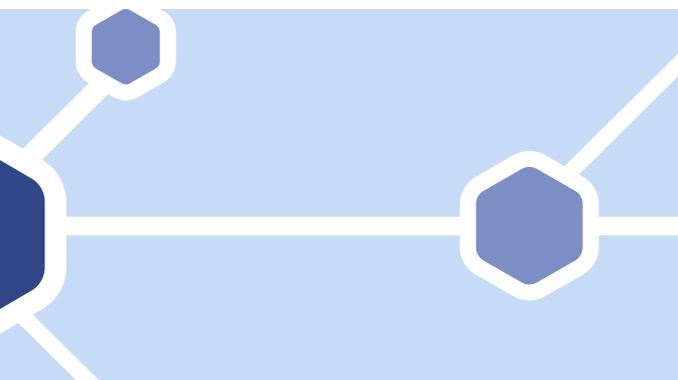
Muitas drogas mostram diferenças na concentração entre sangue total e plasma (ou soro). Isso ocorre porque a absorção de drogas nos glóbulos vermelhos (eritrócitos) pode ser limitada pelas propriedades físico-químicas da droga e por sua capacidade de se mover através das membranas celulares. Por exemplo, o delta-9-tetrahidrocannabinol (THC) está quase ausente nos glóbulos vermelhos e, portanto, a concentração plasmática é quase o dobro da do sangue total, assumindo um hematócrito (porcentagem de hemácias no sangue) de 0,5. Por outro lado, a cloroquina apresenta uma concentração muito maior nos glóbulos vermelhos do que no plasma (proporção plasma:sangue total cerca de 0,3). Se essa proporção for conhecida, a concentração sanguínea pode ser estimada a partir de uma concentração plasmática ou vice-versa. Os toxicologistas devem ter cautela ao realizar esse cálculo principalmente em casos *post mortem*, uma vez que na maioria das vezes tais amostras se encontram hemolisadas, com a consequente liberação do conteúdo dos glóbulos vermelhos no plasma (soro) afetando, portanto, esse equilíbrio (DRUMMER, 2008).

A extensão da distribuição de uma determinada droga no corpo pode ser estimada conhecendo-se seu valor de Volume de Distribuição Aparente (Vd), que é a quantidade de fármaco no corpo dividida pela sua concentração plasmática (Cp), após estabelecido o equilíbrio. O valor de Vd é determinado principalmente pelos processos fisiológicos de perfusão e taxa de ligação às proteínas. Por exemplo, o volume de distribuição da furosemida, fármaco altamente ligado a proteínas, é da ordem de 15 L, o de etanol é de cerca de 35 L; no entanto, o valor da digoxina, amplamente distribuída e ligada aos tecidos extravasculares, é da ordem de 450 L (DRUMMER, 2008).

Após a morte, ocorre um fenômeno denominado de “redistribuição *post mortem*”, o qual envolve a migração do toxicante a partir de tecidos de maior concentração para dentro dos vasos sanguíneos próximos. Após uma morte por intoxicação aguda via oral, por exemplo, a alta concentração do toxicante no conteúdo estomacal causa concentrações elevadas da droga no tecido próximo (por exemplo, lobo proximal do fígado) e no sangue. A redistribuição *post mortem* começa a ocorrer dentro de uma hora após a morte e continua à medida que o intervalo *post mortem* aumenta. O fenômeno ocorre de maneira desigual no corpo e afeta mais extensamente os locais centrais, como os vasos próximos ao coração e área abdominal, do que nos locais mais periféricos, como as veias femorais. Recomenda-se, portanto, que o sangue *post mortem* para análise toxicológica quantitativa seja coletado de um local periférico, como a veia femoral, onde teoricamente reflete o valor mais próximo daquele existente no momento da morte (JONES, 2008).

1.2.4 ELIMINAÇÃO

O organismo vivo apresenta mecanismos de defesa que buscam minimizar ou evitar a ação tóxica de uma substância, destacando-se o armazenamento, a biotransformação e a excreção.



A maioria das drogas é eliminada do organismo pela biotransformação hepática e/ou pela excreção da droga e de seus produtos de biotransformação pelos rins. Outros mecanismos também ocorrem, tais como remoção de compostos voláteis pelos pulmões por meio da expiração, e eliminação por meio das fezes, suor, lágrimas e leite materno.

Sem dúvida, o órgão excretor mais importante na toxicologia são os rins, produzindo uma das amostras mais úteis nas análises toxicológicas in vivo, a urina. O rim excreta mais facilmente os compostos polares, os quais são mais solúveis em água (urina). Por isso, as drogas lipossolúveis não são prontamente eliminadas até serem biotransformadas a compostos mais polares. O conjunto de processos que altera o composto original por meio de uma série de reações é denominado biotransformação ou metabolização, e ocorre praticamente em todos os órgãos e tecidos, apesar de o fígado ser o local de metabolização mais significativo. As reações são de oxidação, redução e hidrólise, caracterizando a Fase I, e de conjugação com compostos endógenos, denominada Fase II (PASSAGLI, 2013). No processo de biotransformação, alguns toxicantes podem ser convertidos em moléculas mais tóxicas, assim este processo não pode ser tratado como sinônimo de detoxificação (MARQUES, 2018).

Os conceitos de meia-vida e depuração são frequentemente usados para quantificar a taxa e a extensão da eliminação do composto do corpo. A meia-vida é o tempo necessário para que a concentração plasmática de uma droga no organismo diminua pela metade. A depuração (*clearance*) é a medida da capacidade do organismo em eliminar a droga, constituindo-se da soma dos processos de eliminação da droga, por meio do metabolismo, da excreção renal e de outros processos menores. Seu valor, expresso em volume por unidade de tempo, indica o volume do líquido biológico (sangue ou plasma) totalmente livre da droga.

Os sistemas de eliminação das drogas geralmente não estão saturados e assim a taxa absoluta de eliminação é praticamente uma função linear da concentração do fármaco no plasma, obedecendo à 'cinética de primeira ordem' – onde uma fração constante da droga é eliminada por unidade de tempo. A depuração torna-se variável quando uma alta dose é administrada (como nos casos de intoxicações agudas), e a cinética então converte-se a 'ordem zero' – onde os mecanismos

de eliminação ficam saturados e uma quantidade constante da droga é eliminada por unidade de tempo (BENET *et al.*, 1996). Um exemplo de substância que sofre a cinética não linear é o álcool.

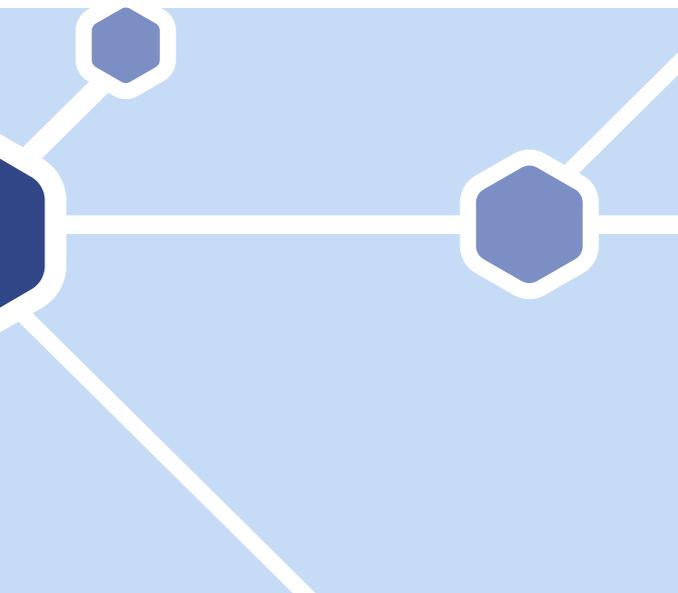
1.3 TOXICODINÂMICA

A manifestação do efeito tóxico após exposição à determinada substância só se dará quando essa e/ou seus produtos de decomposição metabólica (biotransformação) atingirem locais específicos no corpo (alvo) em uma concentração adequada e por um período suficiente para que a homeostasia do corpo (estado de equilíbrio) seja rompida.

O tipo de alteração que a toxicante produz no sistema biológico com o qual está interagindo, isto é, os mecanismos de ação em nível celular/bioquímico, conceitua-se toxicodinâmica.

Vários fatores interferem na ocorrência de uma resposta tóxica: propriedades químicas e físicas do agente, tipo e frequência de exposição, metabolização do agente pelo sistema, tipo de mecanismo de ação tóxica e suscetibilidade geral do indivíduo (GREGUS; KLAASSEN, 2001).

Os mecanismos de ação pelos quais um agente causa toxicidade podem ser diversos, tanto inespecíficos (como ácidos e bases que causam irritação e queimaduras nos tecidos e mucosas) como específicos (interação direta com biomoléculas alvo). Dentre os mecanismos específicos, inclui-se a interação com receptores, a peroxidação lipídica, a inibição enzimática, a fosforilação oxidativa, a desregulação cálcica e hormonal, a alteração do potencial de ação e a interferência no material genético (PEREIRA, *et al.*, 2018).



A cocaína, por exemplo, atua por meio de diversos mecanismos para gerar a estimulação no sistema nervoso central: bloqueia os canais de sódio dependentes de voltagem, exercendo seu efeito anestésico local por impedir a condução de impulsos nervosos; inibe a recaptção de dopamina, serotonina e noradrenalina a partir do bloqueio competitivo de seus transportadores, aumentando a quantidade de neurotransmissor na sinapse; atua pré-sinápticamente sobre o transportador vesicular da dopamina, localizado nas terminações nervosas mesolímbicas e nigroestriais; interage com receptores serotoninérgicos e muscarínicos (CRESPO-FERNADEZ; RODRIGUES, 2007).

1.4 TOXICOLOGIA FORENSE

A toxicologia forense é um dos ramos da toxicologia aplicada aos propósitos da lei, onde investiga-se a presença de substâncias (lícitas ou ilícitas) em amostras biológicas (de humanos ou de animais) que podem ter influenciado ou causado a ocorrência de crimes, geralmente contra a pessoa, mas podendo tratar-se de outros tipos, como crime ambiental e crime contra o patrimônio. Técnicas de química analítica são combinadas com princípios de toxicologia para abordar questões pertinentes aos processos judiciais (ADATSI, 2014). Os achados podem auxiliar no esclarecimento da causa da lesão, prejuízo ou morte e servir como agravante ou atenuante na aplicação das penalidades. Percebe-se claramente a importância da quantificação do agente tóxico como parte dos procedimentos analíticos forenses, não se limitando apenas à sua identificação, a fim de dar-lhe o devido ônus no contexto do delito e responder se o agente foi capaz, na concentração mensurada, de gerar o prejuízo verificado.

A história narra diversos assassinatos envolvendo intoxicações, embora a comprovação científica do uso de tais “venenos” fosse impossível até o início do século XIX, quando a toxicologia forense então emergiu como ciência. O primeiro toxicologista forense conhecido na história foi Mathieu Joseph Bonaventure Orfila (1787-1853), autor do livro “*Traité des poisons*”, de 1814, que trata da primeira abordagem sistemática do estudo de substâncias químicas e seus efeitos nocivos (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

Além dos numerosos cientistas que foram decisivos para o desenvolvimento da toxicologia forense, várias organizações surgiram no século XX com a finalidade de promover cooperação entre os membros, incentivar a pesquisa na área e fornecer guias orientativos e recomendações. Em 1948, foi fundada a *American Academy of Forensic Sciences* (AAFS); em 1963, *The International Association of Forensic Toxicologists* (TIAFT); e em 1970, a *Society of Forensic Toxicologists* (SOFT). No Brasil, em 1972, a Sociedade Brasileira de Toxicologia (SBTox) foi instituída como uma sociedade científica com o intuito de congrega docentes, profissionais, empresas e organizações interessadas no desenvolvimento da Toxicologia no Brasil (<https://www.sbtox.org>). Mais recentemente, com novas descobertas e inovações da área, sociedades mais específicas surgem, como é o caso da *Society of Hair Testing* (SoHT), fundada em 1995, e que trata especificamente de análises toxicológicas em cabelo e é referência na promoção de pesquisa e desenvolvimento de testes de proficiência (<https://www.soh.org>).

1.4.1 ÁREAS DE APLICAÇÃO

A toxicologia forense está subdividida em três grandes áreas de aplicação: toxicologia *post mortem*, toxicologia *ante mortem*, toxicologia do desempenho humano e toxicologia ambiental.

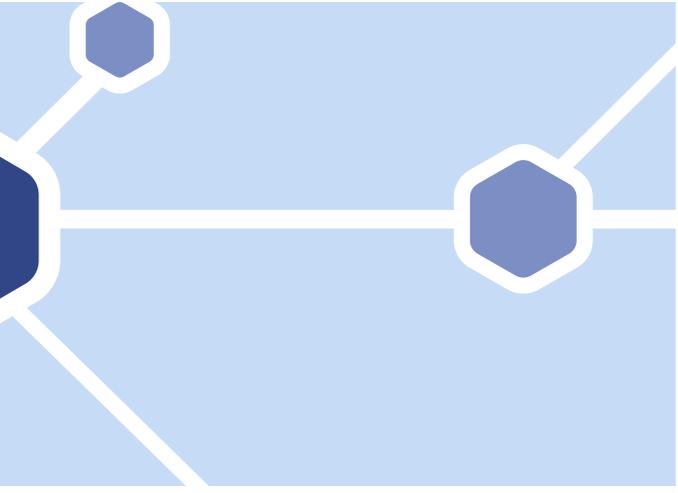
A toxicologia *post mortem* é aplicada nos casos de investigação da causa da morte. É a área por onde a toxicologia forense iniciou, estando intrinsecamente relacionada à sua história. O toxicologista analisa as

amostras biológicas coletadas durante a necropsia de vítimas fatais e, a depender do tipo de matriz disponível e dos achados, faz-se a interpretação baseada em evidências científicas, o que pode ser algo bem complexo, dado alguns fenômenos que ocorrem após a morte – como a redistribuição de drogas no corpo – e que, muitas vezes, impossibilitam um laudo conclusivo.

A toxicologia *ante mortem* está relacionada com crimes sem ocorrência de morte, onde existe a suspeita de que os envolvidos estivessem sob efeito de determinada substância no momento do delito e que isso então favorecesse a ação criminosa, como ocorre na tentativa de homicídio, por exemplo. Crimes como estupro, roubo e sequestro também podem estar associados ao uso das chamadas drogas facilitadoras de crimes, tais como hipnóticos e sedativos, que quando administradas de forma não consensual, geram um estado de incapacitação por parte das vítimas, limitando sua reação. A depender do caso, o tempo decorrido entre o crime e a coleta das amostras (sangue ou urina) é fator crucial para a detecção do agente e a possível correlação com o evento.

Há muito se conhece a utilização de substâncias para aumentar desempenho, seja no esporte, no ambiente de trabalho, em situações específicas como a guerra, e mesmo no cotidiano. As técnicas analíticas aprimoram-se cada vez mais para serem capazes de detectar novas drogas e diferenciar compostos endógenos de exógenos (autoadministração).

O controle de dopagem no esporte apresentou seu marco em 1984, durante as Olimpíadas de Los Angeles, pois aplica-se pela primeira vez a técnica de cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) na detecção e confirmação de esteroides anabolizantes. As sanções legais que podem resultar de um achado positivo nas amostras do atleta dão o aspecto forense a esse tipo de análise toxicológica. Há vários casos de atletas banidos do esporte devido a *doping*. Atualmente, a Agência Mundial Antidopagem (em inglês, WADA) é responsável por desenvolver pesquisas científicas, educar e monitorar a aplicação do Código Mundial Antidopagem, documento que harmoniza as políticas referentes em todos os esportes em todos os países. No Brasil, na cidade do Rio de Janeiro, o Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem – LBCD, remodelado em 2104 em virtude das Olimpíadas de 2016, tem a função de analisar amostras destinadas ao controle de dopagem no esporte, constituindo-se de um amplo espaço acadêmico, com modernas instalações e equipamentos de última geração, destinados à formação de profissionais de excelência.



Ainda com relação a drogas que alteram o desempenho humano, uma das aplicações que vêm ganhando grande repercussão no Brasil é a fiscalização no trânsito de motoristas sob efeito de álcool e de drogas. Acidentes de trânsito matam cerca de 1,35 milhão de pessoas por ano, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), sendo a nona causa de mortes em todo o mundo. Há massiva quantidade de estudos científicos que comprova a contribuição do uso do álcool e de outras substâncias psicoativas para a ocorrência de acidentes de trânsito.

Ainda assim, é um ramo da toxicologia forense extremamente desafiador, pois a correlação entre concentração mensurada da droga e a influência gerada no indivíduo pode variar devido a diversos fatores, e estabelecer valores positivos e negativos (valores de corte) torna-se bastante complexo.

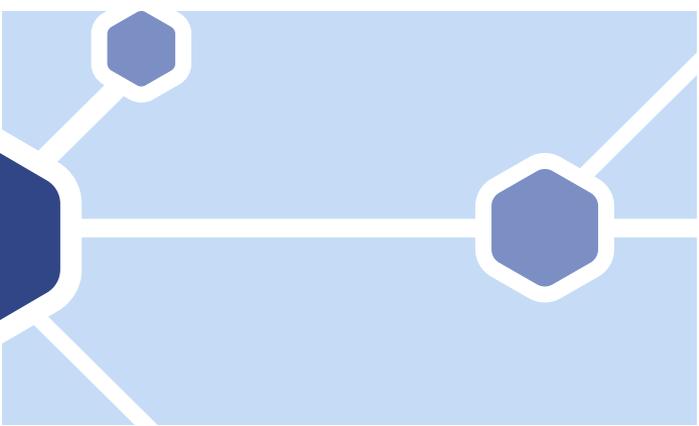
O Código de Trânsito Brasileiro, no seu artigo 306, criminaliza o motorista que estiver com uma concentração de álcool etílico no ar alveolar igual ou maior que 0,34 mg/L (medido por meio de etilômetro), enquanto qualquer concentração maior do que 0,05 mg/L (incerteza do próprio aparelho) gera infração administrativa. O monitoramento de outras drogas psicoativas no trânsito, além do álcool, é feito por diversos países há bastante tempo, com destaque para a Austrália e a Europa. O Brasil, embora preveja em lei a fiscalização no trânsito de qualquer substância psicoativa, na prática, fiscaliza e penaliza apenas o motorista usuário de álcool etílico. Em 2019, no desejo de mudar tal situação, o Ministério da Justiça instituiu um grupo de trabalho para estudar tecnicamente o tema, estabelecer requisitos e critérios, e implementar a fiscalização no trânsito de determinadas drogas.

A toxicologia ambiental é uma área forense que investiga contaminações ambientais e seus respectivos responsáveis. Comprovar a origem da presença de determinada substância no meio ambiente pode ser um trabalho inextricável para o toxicologista, haja vista a grande variedade de fontes envolvidas. Um exemplo recente ocorreu no litoral do Nordeste e Sudeste brasileiro, onde houve extenso derramamento de óleo com suspeita de ação criminosa, atingindo mais de 200 localidades. O evento causou a morte de animais marinhos, como tartarugas e golfinhos, e colocou em risco uma grande cadeia alimentar, além das chances de contato direto das pessoas com os contaminantes do óleo, presentes e muitas vezes visíveis nas praias e areias. Abriu-se inquérito policial na Polícia Federal e amostras do óleo derramado e de animais encontrados mortos foram enviadas aos peritos para verificação da origem do material, sendo encontradas correlações significativas com amostras de campos de petróleo venezuelano.

1.4.2 MATRIZES BIOLÓGICAS UTILIZADAS PARA ANÁLISES TOXICOLÓGICAS FORENSES

O efeito tóxico (ou terapêutico) de uma substância é comumente proporcional à sua concentração no sítio-alvo – local do organismo onde a droga irá interagir, gerando alterações estruturais ou funcionais. Como a concentração no sítio-alvo geralmente não pode ser mensurada, utilizam-se matrizes biológicas diversas que se prestam para diferentes objetivos e que podem servir como indicadores dessa concentração.

O tempo de permanência da droga na matriz analisada depende do tempo de meia-vida, da dose ingerida, da frequência de uso, da rota de administração, da matriz eleita, claro, de variações interindividuais. Esse tempo é chamado de janela de detecção. Ressalta-se que a capacidade de detectar uma substância está totalmente atrelada à sensibilidade e poder de resolução do método analítico utilizado para tal e que atualmente a tecnologia está suficientemente desenvolvida para que variadas substâncias em ínfimas quantidades consigam ser resolvidas, vistas e mensuradas. Em geral, o tempo de detecção é mais longo no cabelo, seguido pela urina, suor, fluido oral e sangue (VERSTRAETE, 2004).



A escolha da matriz a ser analisada depende principalmente do objetivo do caso, do que se deseja saber. Se a suspeita for uma intoxicação crônica, onde a vítima recebia dosagens frequentes ao longo do tempo, o cabelo provavelmente seja a melhor amostra a ser submetida à análise toxicológica. Se a suspeita for morte por overdose, a identificação e quantificação de drogas no sangue será fundamental para sanar tal pressuposto.

Adicionalmente, e não menos importante, a eleição da matriz depende se a coleta é feita em indivíduos vivos ou mortos. As amostras *post mortem* a serem coletadas variam conforme o grau de decomposição do corpo e, conseqüentemente, da qualidade e viabilidade de cada uma delas para o exame. Em casos em que a autópsia foi realizada, as amostras comumente coletadas de um corpo que não apresenta severa decomposição são: sangue (cardíaco e periférico), humor vítreo, fígado, conteúdo gástrico e urina (SKOOP, 2004).

Escolhas inadequadas geram resultados equivocados ou inconclusivos. Cabe ao toxicologista acompanhar o caso, obter todas as informações possíveis sobre o ocorrido e orientar na coleta das amostras. Apesar de a causa da morte ser estabelecida pelo médico legista, o sucesso em chegar à conclusão correta geralmente depende de esforços combinados do patologista, toxicologista e legista. Muitos toxicantes não produzem características patológicas e sua presença

no corpo pode ser demonstrada apenas por métodos químicos de isolamento e identificação. Exemplo disso são as vítimas de acidente de trânsito com altas concentrações de etanol no sangue e vítimas de incêndio com altas concentrações plasmáticas de monóxido de carbono (o incêndio criminoso é muitas vezes usado para ocultar homicídios). Em ambos os casos, a falta de uma análise toxicológica resultaria em definições errôneas de *causa mortis*.

É essencial que as amostras sejam coletadas o mais rápido possível após o ocorrido, estando corretamente rotuladas e armazenadas.

Em meio a uma gama grande de amostras biológicas disponíveis, a depender do objetivo e da condição, as amostras abaixo descritas foram escolhidas como exemplos de matrizes tradicionais (sangue e urina), matrizes comumente analisadas em casos *post mortem* (fígado e conteúdo estomacal) e matrizes alternativas (fluido oral).

◆ Sangue

O sangue é a matriz que melhor fornece informações sobre o estado do indivíduo. Trata-se do fluido que transporta as substâncias introduzidas no corpo, sendo responsável por distribuí-las até o local de interação, biotransformação e posterior excreção. Os estudos sistemáticos que relacionam efeitos e concentração utilizam na sua grande maioria o sangue, o que o torna a matriz referência para concentrações terapêuticas, tóxicas e fatais, sendo esse motivo para que as análises toxicológicas quantitativas sejam realizadas em sangue. Apesar de certas peculiaridades e variáveis, os achados sanguíneos refletem as concentrações nos locais de ação da droga.

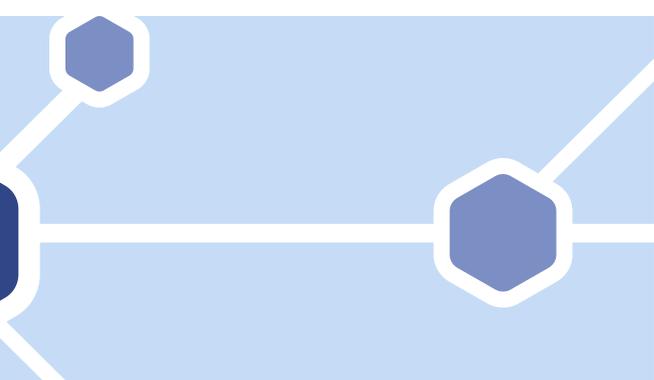
A permanência das substâncias no sangue é rápida, possuindo curta janela de detecção, e, portanto, nas análises toxicológicas em sangue é possível verificar somente exposição recente (ocorre exceção em alguns casos específicos em que a droga é cronicamente usada, se acumula e mesmo não sendo mais administrada é liberada de tempos em tempos na circulação sanguínea em pequenas quantidades). No sangue, pode-se verificar tanto a droga inalterada quanto os seus produtos de biotransformação, a depender da droga e da frequência de administração, aguda ou crônica. A maioria das drogas de abuso pode ser detectada no sangue por 1 ou 2 dias após o consumo (VERSTRAETE, 2004).

O sangue possui algumas desvantagens que muitas vezes dificultam sua coleta tradicional. Trata-se de um procedimento invasivo que requer pessoal especializado para realizá-lo. Ademais, o armazenamento da amostra pós-coleta requer adição de conservante (EDTA e fluoreto de sódio) e imediata refrigeração, a fim de permitir a integridade dos analitos até seu transporte ao laboratório. Em casos *post mortem*, essa deve-se lembrar que a concentração sanguínea pode ser alterada em virtude da redistribuição *post mortem* explicada anteriormente.

Para contornar essas limitações, diferentes abordagens para se obter o sangue estão sendo desenvolvidas e uma delas é a amostragem por DBS (mancha de sangue seco, traduzido da língua inglesa *dried blood spot*), onde a coleta é feita por punção do dedo para liberação do sangue capilar e posterior impregnação em papel cartão adequado (LIZOT *et al.*, 2019). No Brasil, a aplicação do DBS é vista na Programa Nacional de Triagem Neonatal ('teste do pezinho').

◆ Urina

A urina é a amostra preferida para as análises toxicológicas – desde que seja suficiente para responder às questões do caso específico –, uma vez que se trata de uma matriz que está disponível em grandes quantidades, sua coleta não é invasiva, a maioria das drogas é excretada por essa via, há detecção da substância original e de seus produtos de biotransformação e o tempo de permanência das substâncias na urina é alto, se comparado ao sangue (MARTINIS *et al.*, 2018).



A urina é uma matriz que se presta à verificação da exposição do indivíduo à determinada substância, uma vez que a janela de detecção, a depender de alguns fatores, é de média duração. Mesmo não estando mais sob o efeito da droga, o indivíduo continuará excretando-a pelos rins e/ou seus produtos de biotransformação em quantidades relativamente grandes.

Os exames *antidoping* elegem a urina como matriz, pois o objetivo é evitar que os atletas sejam expostos a determinadas substâncias (elencadas na lista anual da WADA) em qualquer tempo.

A janela de detecção na urina é muito variável, a começar pela natureza da droga pesquisada. O pH da urina e o metabolismo individual também influenciam o tempo de permanência da droga na matriz. Devido a essa e outras variabilidades, não existe dados que correlacionem efeitos com dosagens em urina. Desta maneira, não se realiza análises quantitativas em urina, pois os resultados não são passíveis de interpretação.

Outra desvantagem é o fato de algumas vezes não ser possível detectar a substância original na urina, mas somente seus produtos de biotransformação. Em virtude de certos compostos (por exemplo, canabinoides sintéticos) compartilharem dos mesmos produtos de biotransformação, a interpretação de qual composto foi efetivamente administrado se torna impossível, a menos que se tenha outras matrizes disponíveis que complemente a informação. Esse é caso também dos benzodiazepínicos, que tem caminhos comuns de biotransformação e compartilham os metabólitos nordiazepam e oxazepam.

A coleta da urina deve ser assistida para evitar adulterações e seu armazenamento dispensa conservantes, devendo ser refrigerada até a chegada ao laboratório.

● Fígado

Dos tecidos *post mortem*, o fígado é o mais importante. Muitas drogas estão mais concentradas no fígado que no sangue, em parte devido à absorção de drogas a partir do intestino delgado via sistema portal hepático, mantendo-se relativamente estáveis após a morte.

A desvantagem de se analisar qualquer tecido é a quantidade de interferentes e principalmente, no caso do fígado, de gorduras presentes. A etapa de limpeza prévia às análises deve ser suficientemente capaz de minimizar os efeitos da matriz.

● Conteúdo estomacal

O conteúdo estomacal é valioso em casos *post mortem* em duas principais situações: após uma sobredosagem via oral (a concentração da droga na matriz pode estar alta) e quando drogas extensivamente biotransformadas conseguem ser detectadas inalteradas (JONES, 2008). Em alguns casos é possível verificar fragmentos de formas farmacêuticas (comprimidos ou cápsulas) ou mesmo o produto intacto, como ocorre com a ingestão das pequenas esferas do praguicida popularmente conhecido como “chumbinho”.

A desvantagem do conteúdo estomacal é a sua composição, que varia de um fluido aquoso fino a um semissólido, dependendo da quantidade e tipo de comida presente. Isso reflete na importância da homogeneização da amostra antes da análise e na necessidade de se enviar ao laboratório o conteúdo estomacal total (conteúdo completo do estômago), a fim de se evitar erros grotescos de amostragem.

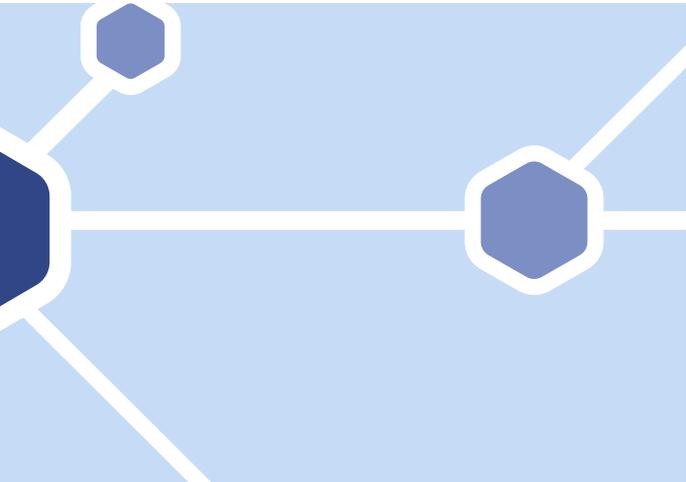
A detecção de um medicamento ou produto de biotransformação no conteúdo estomacal não significa necessariamente que o medicamento foi tomado por via oral, dado que o suco gástrico, formado a partir de fluido extracelular, é constantemente secretado no estômago (JONES, 2008).

◆ Fluido oral

O fluido oral é uma matriz cada vez mais utilizada em ambientes de trabalho e em fiscalizações de trânsito.

É constituído por uma mistura de saliva (maior componente) produzida pelas glândulas salivares, fluido crevicular, microorganismos da cavidade oral, secreções nasofaríngeas e resíduos de comida ou outras partículas (WHITE; MOORE, 2018). As substâncias são transportadas dos capilares sanguíneos para os ductos salivares por meio de processos de ultrafiltração e difusão passiva. Devido a diferenças de pH entre o sangue e o fluido oral, drogas básicas são mais facilmente incorporadas ao fluido oral se comparadas com drogas ácidas. Estudos farmacocinéticos demonstram que MDMA, por exemplo, é 7 vezes mais concentrada no fluido oral que no sangue (DRUMMER, 2006).

Devido aos mecanismos de incorporação das drogas, a janela de detecção no fluido oral se assemelha ao sangue. Publicações demonstraram que o THC proveniente da maconha fumada pode ser detectado no fluido oral até 34 horas após o uso; anfetaminas, em média de 20 a 50 horas; cocaína, de 5 a 24 horas; e opiáceos, de 0,5 a 24 horas (VERSTRAETE, 2004), possibilitando, portanto, verificação de exposição recente. Como já relatado anteriormente, esse tempo depende de vários fatores, como dose ingerida e via de administração.



As vantagens de se optar pelo fluido oral não se limitam à estreita janela de detecção e sua boa correlação com o sangue. Inclui-se também o fato de ser uma amostra com baixo potencial para adulteração, e de se tratar de uma coleta assistida, não invasiva e não constrangedora, que não requer pessoal especializado para executá-la. Além disso, atualmente, estão disponíveis no mercado uma gama de dispositivos de coleta e de triagem para fluido oral, já submetidos a testes por diversos estudos e organizações internacionais (WHITE; MOORE, 2018).

1.4.3 TÉCNICAS ANALÍTICAS COM FINALIDADE FORENSE

A fim de serem capazes de detectar uma enorme gama de toxicantes clássicos, assim como novas substâncias potencialmente tóxicas que são sintetizadas e inseridas no mercado velozmente, os laboratórios de toxicologia forense utilizam uma variedade de técnicas e instrumentação altamente especializadas.

Se houver suspeita do toxicante envolvido no caso, procede-se à marcha analítica direcionada para o analito em questão. Se, entretanto, como acontece na maioria das vezes, a pesquisa for relacionada

a agente(s) desconhecido(s), preconiza-se que se proceda à análise toxicológica sistemática, que se trata de uma sequência de procedimentos claramente sistematizados e tem como objetivo detectar a presença de todas as substâncias de relevância toxicológica e identificá-las com o maior grau possível de certeza e excluir a presença de todas as demais substâncias relevantes (LINDEN; ANTUNES, 2018).

Antes das análises propriamente ditas, as amostras biológicas devem passar por etapas de isolamento e concentração, visto que são amostras extremamente complexas, com interferentes na matriz que podem inviabilizar até mesmo a detecção dos compostos-alvo. Essas etapas podem envolver hidrólise, remoção de proteínas e de lipídeos, e além de uma variedade de tipos de extração (extração líquido-líquido, extração em fase sólida, microextração em fase sólida, extração em fluido supercrítico, microextração líquido-líquido, entre outras) (LINDEN; ANTUNES, 2018).

Os toxicologistas iniciam as análises com alguma técnica de triagem, com a finalidade de detectar os compostos de interesse forense. Geralmente aplica-se técnica de imunoensaio, mas métodos cromatográficos também são muito usados para triagem toxicológica. Em caso de resultado positivo nos exames de triagem, deve-se utilizar uma técnica confirmatória, para fins de identificar definitivamente o analito detectado e/ou quantificá-lo, utilizando-se comumente técnicas cromatográficas como a CG-EM e a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (CL-EM/EM). Estes instrumentos requerem investimento financeiro significativo na aquisição e manutenção, conhecimento técnico, e tempo necessário para desenvolver e manter métodos analíticos. A análise confirmatória deve ser realizada por técnica diferente daquela utilizada na triagem. De maneira geral, preconiza-se que o método de confirmação seja mais específico e apresente limite de detecção menor que o método de triagem para o alvo analítico (CHASIN, 2008; SWGTOX, 2013).

A identificação de determinados intoxicações pode exigir a aplicação de técnicas específicas, como por exemplo métodos espectrofotométricos, utilizada na análise de carboxiemoglobina (indicador biológico da intoxicação por monóxido de carbono) e de metemoglobina (indicador biológico do uso de agentes metemoglobinizantes).

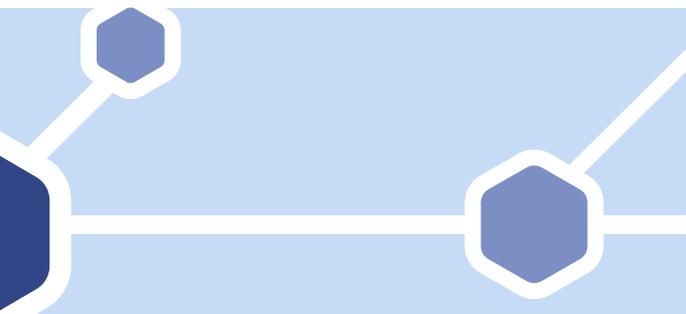
● Imunoensaio

Os imunoensaios se baseiam na ligação competitiva entre o antígeno da amostra (droga) e o antígeno marcado (presente no kit) com o anticorpo específico (presente no kit). A proporcionalidade do sinal resultante reflete a concentração da droga na amostra.

O processo conta com várias etapas sequenciais de pipetagem, tais como adição de tampão, de calibradores, amostras e controles, de marcador, de revelador, além de etapas de agitação e lavagem. Os equipamentos automáticos são práticos e eficientes, conduzindo rapidamente às próximas etapas da marcha analítica a partir dos resultados obtidos. Já os equipamentos manuais, em que os processos

de pipetagem são executados por operador, despendem muito tempo e são úteis apenas em laboratório com baixa demanda.

A técnica apresenta uma alta sensibilidade, fornecendo valores positivos ou negativos, com base no valor de corte especificado, ou até mesmo valores semiquantitativos. No entanto, não é específica, exibindo reatividade cruzada com analitos da mesma classe (por esse motivo, a detecção é por classe de substância e não por analito) ou até mesmo de classes diferentes (os fabricantes testam e especificam em seus documentos a probabilidade de reações cruzadas).



Por tratar-se de testes sensíveis e inespecíficos, tais técnicas de triagem são suscetíveis a resultados falsos positivos e, em menor escala, falsos negativos. A aplicação de uma técnica confirmatória de maior poder discriminatório na sequência de uma triagem é imperativa.

Os painéis de imunoensaios estão disponíveis no mercado para várias classes de fármacos e drogas, sendo normalmente desenvolvidos para análise em sangue e urina.

● **Cromatografia em fase gasosa**

A cromatografia em fase gasosa é uma poderosa técnica de separação cromatográfica usada para a análise de pequenas moléculas voláteis, como fármacos, drogas de abuso e substâncias voláteis (incluindo etanol).

Na toxicologia analítica, a cromatografia gasosa tem várias vantagens sobre outras técnicas amplamente usadas, como imunoensaio e cromatografia líquida. Em primeiro lugar, o cromatógrafo possui um detector “universal”, sensível e reproduzível, o detector por ionização de chama (em inglês, FID). Em segundo lugar, as colunas capilares, empregadas em cromatografia gasosa, são estáveis e de alta eficiência e estão amplamente disponíveis. Em terceiro lugar, os resultados gerados com o acoplamento da espectrometria de massas (ionização por elétrons como fonte de ionização e quadrupolo como analisador), CG-EM, permitem comparação direta com inúmeras bibliotecas e identificação rápida do composto (FLANAGAN *et al.*, 2020).

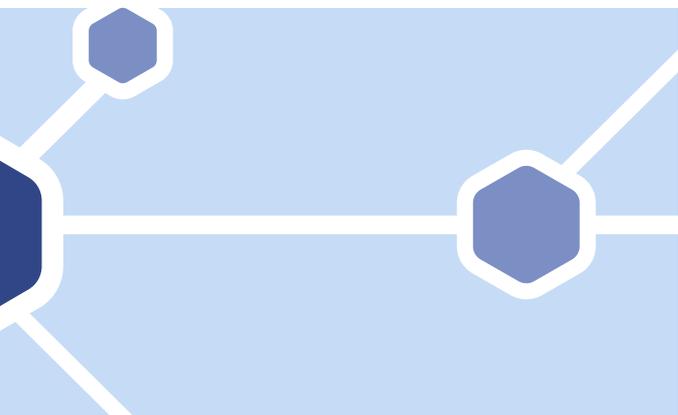
A desvantagem da técnica inclui a exigência de que o analito seja volátil e estável à temperatura requerida para a análise. Os produtos de decomposição daqueles termicamente lábeis podem degradar e seus produtos de decomposição interferir na análise, embora algumas vezes, tais produtos são utilizados para auxiliar na identificação. Substâncias com grupos funcionais polares ou ionizáveis causam

frequentemente baixo desempenho cromatográfico e para elas, alguma forma de preparação da amostra é necessária, como por exemplo derivatização (KYLE, 2020). O principal produto de biotransformação da cocaína, benzoilecgonina, não possui volatilidade e consequentemente uma adequada migração na cromatografia gasosa e para ser detectada na urina é geralmente submetida à reação de derivatização com MSTFA (N-Trimetilsilil-N-metil trifluoroacetamida), a fim de torná-la melhor cromatografável.

A dosagem alcoólica, assim como a análise de vários toxicantes voláteis é feita por CG-FID, com amostragem por *headspace*, pela grande maioria dos laboratórios de toxicologia forense no país.

◆ Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

Desde o surgimento da cromatografia de ultra eficiência em 2004 (em inglês, UHPLC), a técnica vem aprimorando cada vez mais seu desempenho, capacidade de separação e rapidez (MALDANER; JARDIM, 2012), comportando uma série de colunas com diferentes dimensões e fases estacionárias de diminutas granulometrias. Além disso, apresenta vantagens práticas de flexibilidade, como a variação de composição de eluentes e vários detectores seletivos ligados em série que proporcionam seletividade e identificação inequívoca do composto, respetivamente.



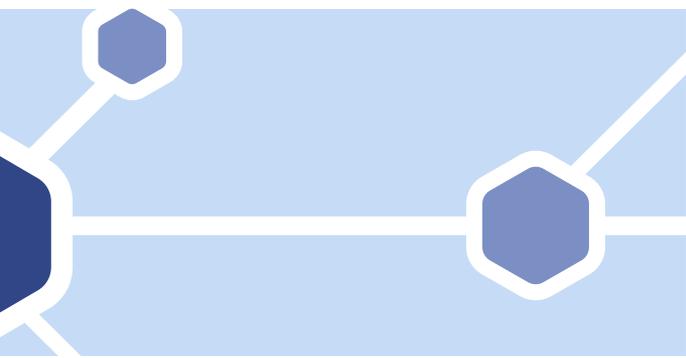
Possui vantagens sobre a cromatografia gasosa, uma vez que se mostra adequada para a análise de compostos hidrofílicos, termicamente lábeis e/ou com alto peso molecular, sem necessidade de extrair os analitos da matriz biológica aquosa. Essas propriedades geralmente podem ser exploradas para facilitar a análise de vários compostos (drogas e produtos de biotransformação) de uma só vez.

A LC-MS/MS ganha cada vez mais popularidade nos laboratórios forenses. Embora o LC-MS/MS tenha sido empregado para confirmação direcionada de drogas por muitos anos, equipamentos recentes de alta resolução e exatidão de massa (TOF, QTOF, Orbitrap) estão sendo usados igualmente para triagem. São analisadores de massa capazes de determinar a massa exata dos compostos com um erro de até 2 ppm, fornecer espectros de fragmentação e padrão isotópico. Esses recursos, combinados com o tempo de retenção da cromatografia líquida, conferem grande capacidade analítica ao laboratório.

Uma desvantagem é a menor oferta de bibliotecas espectrais comerciais quando comparadas à CG-EM. Isso é resultado da falta de padronização das energias de fragmentação utilizada nos equipamentos de LC-MS/MS, resultante das diferentes arquiteturas e engenharias próprias de cada fabricante (FAGIOLA, 2019).

1.4.4 INTERPRETAÇÃO DOS ACHADOS

A interpretação dos achados laboratoriais, quer em situações em vivos ou na determinação da *causa mortis*, é a integração dos conhecimentos sobre a toxicodinâmica e a toxicocinética do agente e achados necroscópicos que evidenciem ser o toxicante o responsável pelo efeito letal (CHASIN, 2008). Os dados farmacocinéticos obtidos de pacientes vivos servem para correlacionar a concentração mensurada com o efeito provocado, auxiliando na interpretação das concentrações sanguíneas após a morte: é factível concluir se uma dada concentração está na faixa terapêutica ou se é potencialmente fatal ou até prever a quantidade ingerida antes da morte.



Inúmeros fatores influenciam o efeito tóxico e, em vista disso, a informação sobre o caso deve ser a mais completa possível, com relação ao potencial toxicante, a exposição e a vítima, para que possa ser aplicado os procedimentos pré-analíticos e analíticos preconizados para uma possível interpretação toxicológica nas matrizes coletadas.

O principal desafio da toxicologia reside nos casos *post mortem*, em que as análises buscam correlacionar os achados analíticos com o real estado fisiológico no momento da morte. Sabe-se que após a morte inicia-se um processo que modifica progressivamente as condições físico-químicas do corpo, gerando alteração de pH, rompimento de membranas, produção de substâncias, liberação de enzimas e migração de drogas. Conforme o processo de decomposição avança, as condições corpóreas se afastam cada vez mais daquelas observadas no instante da morte, o que dificulta a interpretação dos dados analíticos toxicológicos (HEARN; WALLS, 2008; DRUMMER, 2004).

Além disso, o conhecimento sobre a redistribuição *post mortem* é decisivo para que a coleta de sangue seja executada em regiões apropriadas, isto é, áreas que sofrem menores alterações após o momento da morte. Médicos legistas muitas vezes não possuem esse entendimento, fazendo-se crucial a existência de treinamentos, procedimentos padronizados escritos e difundidos e a presença constante do toxicologista.

A coleta das amostras deve ser feita visando minimizar e/ou retardar as alterações não somente *post mortem* mas também fenômenos pós-coleta (por exemplo, degradação *in vitro*). Fenômenos *in vitro* também ocorrem e contribuem para as alterações indesejadas. O cuidado com a estocagem das amostras, utilizando os conservantes adequados ao tipo de matriz coletado e ao(s) toxicante(s) suspeito(s) é seriamente importante, pois evita a degradação das drogas de interesse e a geração de substâncias indesejadas, levando a um cenário fidedigno para correta identificação e interpretação.

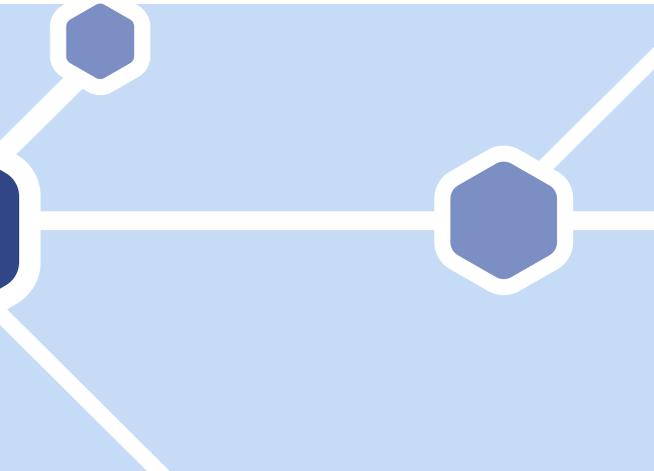
Embora as análises toxicológicas possam ser aplicadas a qualquer amostra, são limitadas àquelas para as quais existam estudos e bancos de dados, de modo que se possa proceder a uma interpretação significativa e útil.

UNIDADE 2

VALIDAÇÃO DE MÉTODOS EM ANÁLISES TOXICOLÓGICAS

Validação é o processo de realizar um conjunto de experimentos cujo objetivo é estimar com segurança a confiabilidade de um método analítico (ANSI/ASB, 2019; ANVISA, 2012; INMETRO, 2020). Nesta unidade abordaremos as formas de avaliar as limitações de um método, atestando sua credibilidade e obtendo uma boa estimativa do real desempenho deste.

A literatura é rica em artigos científicos (PETERS; DRUMMER; MUSSHOF, 2007; PETERS; MAURER, 2002; RIBANI; BOTTOLI; COLLINS; JARDIM *et al.*, 2004; WILLE *et al.*, 2017) e recomendações de associações nacionais e internacionais (ANSI/ASB, 2019; ANVISA, 2012; GTFCH, 2009; INMETRO, 2020; SWGDRUG, 2019; UNODC, 2009) sobre validação de métodos. É importante destacar que as recomendações nacionais, como as publicadas pela ANVISA e o INMETRO, são destinadas a outras finalidades que não análises toxicológicas com finalidade forense. Por haver peculiaridades na área forense, que nem sempre são observadas nestes textos nacionais, recomenda-se que o laboratório forense faça uma leitura crítica desses documentos e avalie a utilização de recomendações internacionais elaboradas já considerando um cenário forense, como o documento publicado pela *American Academy of Forensic Sciences – Standards Board* (ANSI/ASB, 2019).



Métodos devem ser validados visando verificar sua performance e aplicabilidade para uma análise específica, portanto o processo de validação aplica-se: a métodos analíticos não normalizados (ou novos), métodos criados/desenvolvidos pelo próprio laboratório, métodos antigos que sofreram modificações, métodos que serão aplicados de forma diferente à qual inicialmente foram desenvolvidos e visando demonstrar equivalência entre métodos/instrumentos antigos e métodos/instrumentos novos (ANSI/ASB, 2019; INMETRO, 2020).

É importante ressaltar que todo o processo de validação de um método deve ser documentado e realizado por profissional competente, com conhecimento suficiente na área e principalmente que tenha experiência com o método que será validado. Além disso, deve ser realizado empregando instrumentos e equipamentos corretamente calibrados e dentro das especificações (INMETRO, 2020).

Antes da validação, o método precisa passar pela etapa de desenvolvimento. Algumas etapas são fundamentais durante o desenvolvimento e posterior validação do método, tais como: a) definir o objetivo e o

escopo do método; b) definir parâmetros de desempenho (que posteriormente serão avaliados na validação); c) definir os critérios de aceitação para os parâmetros escolhidos; d) verificar se o desempenho dos equipamentos estão compatíveis com o exigido pelo método; e) qualificar os materiais, por exemplo, padrões, reagentes, micropipetas, etc.; f) planejar os experimentos de validação, incluindo o tratamento estatístico a ser utilizado; g) realizar os experimentos de validação; h) realizar a análise crítica dos resultados obtidos, considerando os critérios de aceitação; i) concluir se o método é adequado ao uso, a partir dos resultados obtidos (INMETRO, 2020).

Os métodos utilizados em análises toxicológicas podem ser divididos em qualitativos (cujo objetivo é identificar/confirmar a presença ou atestar a ausência do analito na amostra) e quantitativos (cujo objetivo é quantificar o analito presente na amostra).

Considerando essa classificação, diferentes parâmetros de desempenho são incorporados à validação de um método. A Tabela 1 sintetiza os diferentes parâmetros de validação abordados em ensaios quali e quantitativos destinado às análises toxicológicas, classificando de acordo com obrigatoriedade:

| TABELA 1 - PARÂMETROS DA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DISTRIBUÍDOS DE ACORDO COM O TIPO DE ENSAIO

Parâmetros	Tipo de ensaio	
	Qualitativo	Quantitativo
Limite de detecção	X	X
Limite de quantificação		X
Faixa linear de trabalho/modelo de calibração		X
Precisão		X
Exatidão		X
Contaminação cruzada (<i>carryover</i>)	X	X

Parâmetros	Tipo de ensaio	
	Qualitativo	Quantitativo
Estudos de interferentes	X	X
Estabilidade de amostras	(*)	(*)
Integridade de diluição		(*)
Robustez	(*)	(*)

(*) = parâmetro opcional.

Fonte: o autor.

2.1 LIMITE DE DETECÇÃO

O limite de detecção (LD) é definido como a menor quantidade do analito que pode ser identificada na amostra, mas não necessariamente quantificada. Sua determinação pode ser feita de diferentes maneiras, dentre elas: por método visual, por relação sinal-ruído, a partir da faixa de trabalho, considerando um valor de corte, entre outras (ANSI/ASB, 2019; ANVISA, 2012; INMETRO, 2020; UNODC, 2009).

O LD deve ser definido empregando matrizes biológicas “branco” (que não contenham o analito investigado) de três diferentes fontes (por exemplo, três diferentes doadores), adicionadas com material de referência contendo o analito de interesse. As matrizes empregadas no estudo devem ser condizentes com as matrizes das amostras nas quais o método será aplicado, ou seja, não se deve, por exemplo, avaliar o LD em brancos de urina e tentar extrapolar para amostras de sangue. O LD é um parâmetro que deve ser validado em todos os métodos, quali ou quantitativos.

2.1.1 MÉTODO VISUAL

Para métodos não instrumentais (por exemplo, imunoensaios e testes colorimétricos) pode-se avaliar o LD por meio de percepção visual dos resultados. Para esses casos, devem ser analisadas pelo menos três fontes diferentes de matriz branco, fortificadas com concentrações decrescentes do analito, em um mínimo de três corridas (análises). É interessante que diferentes analistas auxiliem a constatação do LD,

devido ao alto grau de subjetividade desse tipo de método. A menor concentração na qual seja possível constatar o efeito visual esperado em todas as amostras é determinado como LD (UNODC, 2009).

2.1.2 RAZÃO SINAL-RUÍDO

Para métodos instrumentais que possuam ruído de linha de base, a avaliação do LD pode ser feita pela razão sinal-ruído. Para avaliar o LD desta forma, pelo menos três fontes diferentes de matriz biológica branco devem ser fortificadas em concentrações decrescentes em triplicata por três corridas. Compara-se o sinal medido na mesma região das amostras em branco e das amostras fortificadas com baixas concentrações do analito. A relação sinal-ruído deve ser um valor igual ou superior a 3:1 para determinação do LD (ANSI/ASB, 2019; ANVISA, 2012; INMETRO, 2020).

2.1.3 DETERMINAÇÃO DO LD A PARTIR DA FAIXA LINEAR DE TRABALHO

Pode-se determinar o valor de LD levando em consideração a faixa linear de trabalho empregada no método (no caso de método quantitativo). Entretanto, o valor de LD calculado desta forma é mais fidedigno para análises a níveis de traço, podendo superestimar valores de LD em caso de concentrações altas de trabalho. Pelo menos três curvas de calibração diferentes devem ser estipuladas em toda a faixa linear de trabalho, empregando apenas uma fonte de matriz branco. O LD pode ser determinado com auxílio da fórmula descrita abaixo:

$$\text{Limite de detecção (LD)} = \frac{3,3 \times s}{b}$$

Onde, s = desvio padrão da resposta da amostra e branco e b = inclinação (coeficiente angular) da curva de calibração.

O valor de “s” pode ser determinado de 3 três formas diferentes, são elas: I - a partir do desvio padrão do intercepto com o eixo Y das 3 (três) curvas de calibração construídas; II - a partir do desvio padrão residual da linha de regressão e III - a partir da estimativa de ruído proveniente da análise de um apropriado número de amostras em branco (BRASIL, 2017).

2.1.4 EMPREGANDO PADRÕES ANALÍTICOS COMO REFERÊNCIA

Para essa abordagem, três ou mais diferentes fontes de matriz devem ser fortificadas em concentrações decrescentes e analisadas em duplicata, por pelo menos, três corridas. O LD é determinado como a menor concentração onde o sinal analítico obtido for maior que o sinal do ruído da linha de base em 3,3 vezes, além de obedecer aos critérios de identificação do método (p. ex. pico cromatográfico simétrico, tempo de retenção, espectro de massas ou razão entre íons dentro de valores definidos como aceitáveis) (ANSI/ASB, 2019).

2.1.5 CONSIDERANDO UM VALOR DE CORTE PARA O LD

Um laboratório pode definir um valor de LD baseado em uma abordagem administrativa, tanto para métodos qualitativos quanto para quantitativos. Essa forma de obter o LD pode ser suficiente mesmo quando um valor mais baixo for analiticamente atingível. Nesse caso, o laboratório determina o valor de LD que acredita ser suficiente para o método proposto e analisa, no mínimo, uma triplicata de matriz em branco fortificada com na concentração do suposto LD em três corridas (ANSI/ASB, 2019). Esta é a abordagem mais comum nos exames de alcoolemia.

2.2 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)

O LQ é considerado a menor concentração de um analito em uma amostra na qual é possível quantificar com precisão e exatidão. A determinação do LQ deve ser realizada para todos os métodos quantitativos. Experimentalmente, o valor de LQ costuma corresponder ao menor valor de concentração da faixa linear de trabalho, e pode ser calculado empregando as mais distintas abordagens, tais como as apresentadas a seguir.

2.2.1 RAZÃO SINAL-RUÍDO

Pode-se determinar o LQ ainda considerando a relação sinal-ruído obtida quando se analisa o sinal das amostras contendo o analito de interesse em baixa concentração e o ruído das amostras em branco. O valor de LQ considerado deve ser aquele cuja relação sinal-ruído 10:1 seja mantida. Assim como para a determinação do LD, a região do ruído da amostra em branco escolhida deve ser a mesma do sinal medido do analito (ANSI/ASB, 2019; INMETRO, 2020).

2.2.2 A PARTIR DA FAIXA LINEAR DE TRABALHO

O limite de quantificação pode ser estimado considerando a faixa linear de trabalho empregada no método e uma réplica de amostra em branco. Assim, aplica-se a seguinte fórmula:

$$\text{Limite de quantificação (LQ)} = \frac{10 \times s}{b}$$

Onde s = desvio padrão obtido da resposta da réplica em branco e b = inclinação (coeficiente angular) da curva analítica.

Esse método de estimativa fornece melhores resultados quando a concentração trabalhada é a nível de traço. Valores de concentração superiores podem superestimar o valor de LQ. Se a amostra em branco não gerar sinal algum, deve-se utilizar o valor de desvio padrão obtido para o menor nível da faixa analítica (INMETRO, 2020).

2.2.3 CONSIDERANDO O MENOR CALIBRADOR DIFERENTE DE ZERO

O LQ pode ser definido ainda como o valor de calibrador mais próximo a zero não nulo. Para isso, pelo menos três diferentes fontes de matriz em branco devem ser fortificadas com o analito na concentração do menor calibrador e analisadas por três corridas. Assim como para determinação do LD, aqui pode-se utilizar as mesmas réplicas empregadas para estabelecer o “modelo de calibração”, porém pelo menos nove determinantes devem ser realizados. É de extrema importância que os parâmetros de identificação (p. ex. pico cromatográfico simétrico, tempo de retenção, espectro de massas ou razão entre íons dentro de valores definidos como aceitáveis) e quantificação (precisão e exatidão) sejam garantidos (ANSI/ASB, 2019).

2.2.4 CONSIDERANDO UM VALOR DE CORTE PARA O LQ

Igualmente a determinação de LD por valor de corte, o valor de LQ também pode ser definido administrativamente. Para isso, uma triplicata de matriz em branco fortificada com o suposto valor de LD é analisada em três corridas. Os critérios de identificação e quantificação devem ser garantidos com precisão e exatidão (ANSI/ASB, 2019).

2.3 LINEARIDADE / FAIXA LINEAR DE TRABALHO E MODELO DE CALIBRAÇÃO

A linearidade ou faixa linear de trabalho define-se como a extensão entre a menor e a maior concentração de um analito que permite sua quantificação com grau considerável de precisão e exatidão. Além disso, é ainda a correlação de tais concentrações com a resposta analítica no instrumento empregado na análise. Essa faixa deve avaliar as concentrações mais esperadas do analito na amostra, considerando a finalidade de aplicação do método (ANSI/ASB, 2019; ANVISA, 2012; INMETRO, 2020; UNODC, 2009).



Para validação de métodos quantitativos inicia-se primeiramente determinando a faixa de trabalho e seus possíveis LQ e limite superior de quantificação (LSQ), representado pelo maior ponto utilizado na curva de calibração. De acordo com INMETRO (2020), para averiguar se esses valores condizem com a resposta analítica do equipamento utilizado, é necessário realizar uma réplica de cada concentração do analito, que pode ser adicionada na matriz em branco que será empregada na análise ou em água reagente. Esse procedimento tem como objetivo identificar visualmente os valores aproximados da faixa de trabalho, do LQ e do LSQ.

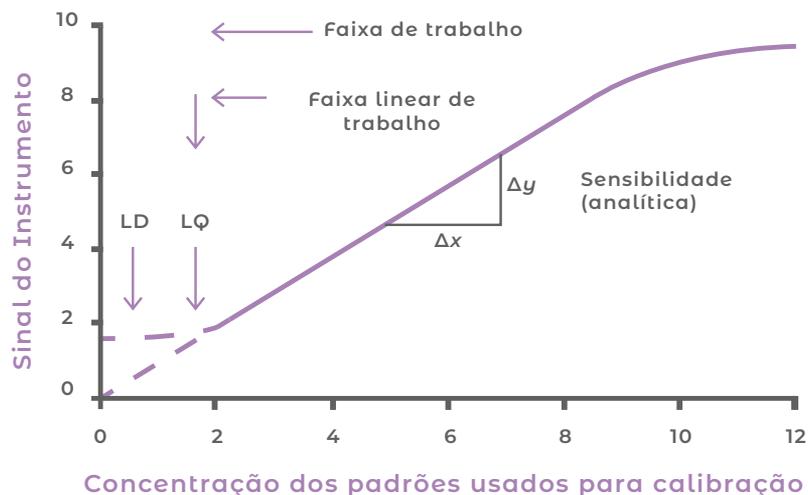
Segundo AAFS Standards Board (2019), após a determinação da faixa de trabalho, deve-se estabelecer ainda o “modelo de calibração”, pois são parâmetros interdependentes para obtenção de dados precisos e confiáveis. Para definir o “modelo de calibração” utilizam-se calibradores de seis concentrações diferentes de zero avaliados em, pelo menos, cinco diferentes corridas. Uma única fonte de matriz em branco deve ser empregada, entretanto o emprego de calibradores feitos com matriz pode ser realizado. O INMETRO (2020), contudo, exige um mínimo de cinco valores de concentração distribuídos na faixa de trabalho, analisados em no mínimo três corridas, preferencialmente de forma aleatória.

Todos os dados obtidos devem ser analisados empregando software específico e as concentrações definidas devem estar apropriadamente distribuídas na faixa de trabalho. O “modelo de calibração” assegura a correlação entre o sinal resposta do instrumento e concentração de analito encontrada na amostra (ANSI/ASB, 2019).

A faixa de trabalho possui uma porção que é chamada faixa linear de trabalho ou faixa dinâmica linear. Nesta porção, se o processo de validação for bem-sucedido, a concentração encontrada na amostra gera resposta analítica correspondente, ou seja, o sinal resposta obtido tem correlação direta com a concentração encontrada do analito na amostra. Fora da faixa dinâmica linear (no restante da faixa de trabalho), existem fatores que limitam a análise.

Abaixo do LQ, por exemplo, e acima do LSQ, as concentrações encontradas na amostra podem não condizer diretamente a resposta obtida pelo equipamento de medição (INMETRO, 2020). Abaixo, a Figura 1 exemplifica esses conceitos.

Figura 1. Exemplo de faixa de trabalho e a relação com o sinal do instrumento. Fonte: próprio autor.



De maneira geral, o “modelo de calibração” que melhor relacione os valores de concentração-resposta deve ser empregado. A variação ao longo da faixa linear de trabalho é outro conceito que deve ser levado em consideração. A homocedasticidade é o termo que define que a variação ao longo da faixa linear de trabalho é considerada constante. Heterocedasticidade, porém, compreende o contrário, ou seja, que notáveis diferenças de variação são observadas entre as baixas e altas concentrações da faixa linear (ALMEIDA; CASTEL-BRANCO; FALCAO, 2002; ANSI/ASB, 2019; INMETRO, 2020). No segundo caso, uma ponderação diferente pode ser necessária, de forma a maximizar o ajuste do modelo aos dados, ou o emprego de um modelo não linear de calibração.

Para avaliar a homo ou heterocedasticidade de um sistema alguns testes que podem ser usados são: testes de Cochran, de Levene ou de Brown-Forsythe. Para o “modelo de calibração” pode-se avaliar verificando a ausência de valores aberrantes (ou outliers) com o teste de Grubbs ou com base nos resíduos padronizados Jackknife ou ainda através dos testes da falta de ajuste ANOVA e avaliação do coeficiente de determinação (r^2) (para modelos lineares) (ANSI/ASB, 2019; INMETRO, 2020).

De acordo com a AAFS Standards Board (2019), após um “modelo de calibração” ser estabelecido, menos replicatas ou calibradores podem ser empregados para análises de rotina, entretanto pelo menos quatro calibradores devem ser utilizados e essa condição deve ser mantida para estudos de precisão e exatidão.

A quantificação de amostras deve sempre empregar a faixa linear de trabalho, padronização interna ou externa e a fórmula matemática que relaciona a resposta analítica no instrumento com a concentração do analito de interesse na amostra. Esta fórmula é a equação da reta, descrita abaixo:

$$y = ax + b$$

Onde: y = resposta analítica do equipamento empregado na análise (ex.: absorvância, altura ou área do pico); x = concentração do analito na amostra; a = coeficiente angular (inclinação da curva analítica) e b = coeficiente linear (ponto de interseção da reta com o eixo y, quando x = 0). Para finalizar, é importante constatar que algumas faixas de trabalho não demonstram linearidade e que, nesses casos, outra função que relacione a resposta analítica e a concentração do analito pode ser empregada (ANSI/ASB, 2019).

2.4 EXATIDÃO

A exatidão é uma forma de cálculo de erro dada pela proximidade entre a média dos resultados experimentais e o valor teórico de um analito. É relatada em porcentagem. De acordo com AAFS Standards Board (2019), para determinação da exatidão deve-se empregar matriz em branco fortificada em três concentrações diferentes (baixa, média e alta) em triplicata, por pelo menos cinco corridas.

O cálculo de exatidão é expresso pela porcentagem entre as concentrações teórica e experimental de um analito em determinada concentração. Este é obtido para as três concentrações (baixa, média e alta) do método desenvolvido (ANSI/ASB, 2019; ANVISA, 2012). A fórmula empregada para o cálculo está descrita abaixo. A concentração experimental média representa a média dos valores de concentração obtidos das matrizes em branco adicionadas com o padrão o analito estudado. A concentração teórica representa o valor predeterminado da concentração.

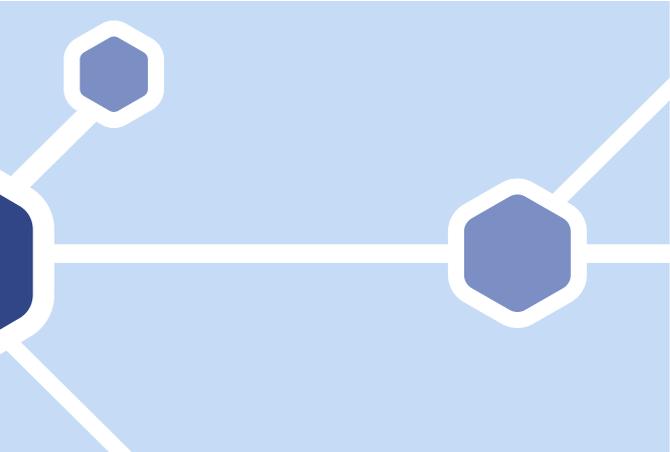
$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{\text{Concentração experimental média}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

Os valores de concentração designados como baixo, médio e alto devem estar distribuídos contemplando o intervalo da faixa linear de trabalho. O controle baixo deve ser três vezes o LQ, enquanto o controle alto deve corresponder a, pelo menos, 80% do LSQ. O valor do controle médio deve intermediar os valores dos controles baixo e alto. As soluções empregadas para os controles devem ser preparadas de maneira independente, empregando padrão analítico rastreável com o composto de interesse ou com uma mistura de compostos. A exatidão no LQ também deve ser avaliada da mesma forma como descrito acima.

A AAFS Standards Board (2019) estabelece que o valor de exatidão tolerado deve de $\pm 20\%$ para cada nível de concentração estudada. Em algumas aplicações específicas, como por exemplo no exame de alcoolemia, é desejável que o valor de exatidão do método seja de $\pm 10\%$ para cada nível de concentração estudada, ou menor.

2.5 PRECISÃO

A precisão tem como objetivo avaliar a proximidade entre os resultados experimentais obtidos de um método. É normalmente expressa em porcentagem, na forma de coeficiente de variação ou desvio padrão relativo. É um parâmetro que deve ser avaliado para todos os métodos quantitativos, e pode ser realizado juntamente com os estudos de exatidão (ANSI/ASB, 2019; ANVISA, 2012; INMETRO, 2020; UNODC, 2009).



A forma de execução dos testes de precisão e a avaliação de resultados obtidos, varia entre os guias nacionais e internacionais. De maneira geral, a precisão se divide em intra e interensaio, levando em consideração a repetibilidade e a reprodutibilidade do método, respectivamente. Para ambos os estudos, empregam-se três diferentes concentrações (baixa, média e alta), considerando a faixa linear de trabalho do método. A precisão no valor de LQ também deve ser avaliada em métodos destinados à toxicologia forense (ANSI/ASB, 2019).

2.5.1 PRECISÃO INTRAENSAIO

De acordo com o AAFS Standards Board (2019), a avaliação da precisão intraensaio é realizada com uma triplicata de matriz em branco adicionada de padrões analíticos nas concentrações baixa, média e alta por pelo menos cinco corridas. Os cálculos são realizados considerando a análise de variância (ANOVA) de uma via, conforme descrito abaixo:

$$\text{Precisão intra - ensaio (\%)} = \left[\frac{\sqrt{MQ_{eg}}}{\text{média para cada concentração}} \right] \times 100$$

Onde MQ_{eg} é a média quadrática entre grupos obtida da tabela de ANOVA.

Os cálculos por ANOVA podem ser facilmente executados usando uma planilha eletrônica ou um programa de software estatístico. Os dados são obtidos para as três concentrações e expressos como a porcentagem de imprecisão do método e não devem exceder 20% (ANSI/ASB, 2019).

A RDC nº 166 estabelece que a repetibilidade de um método deve ser avaliada utilizando pelo menos nove determinações, sendo uma triplicata de cada uma das concentrações, ou seja, apenas uma corrida. O INMETRO, porém, adota a necessidade de entre seis e quinze réplicas para cada concentração adotada (INMETRO, 2020). É fato que, quanto maior o número de réplicas, melhor é a avaliação da dispersão dos dados e conseqüentemente, da precisão do método.

Os critérios de aceitação são igualmente distintos entre os guias de validação. Os valores de imprecisão aceitos pelo INMETRO são semelhantes aos da AOAC, e variam com juntamente com o valor de concentração definido para o analito. Se as concentrações (baixa, média e alta) forem estabelecidas entre 1 e 100 µg/kg, os valores de imprecisão devem estar entre 15 e 30%. Quando maior as concentrações estabelecidas para avaliação da precisão, menor o desvio padrão relativo tolerado (INMETRO, 2020).

2.5.2 PRECISÃO INTERENSAIO

A precisão interensaio tem como objetivo avaliar o grau de reprodutibilidade de um método. O AAFS Standards Board (2019) preconiza o emprego de uma triplicata de matriz em branco adicionada de padrões analíticos nas concentrações baixa, média e alta por pelo menos cinco corridas, igualmente à precisão intraensaio. Os cálculos são realizados considerando a análise de variância (ANOVA) de uma via, como abaixo:

$$\text{Imprecisão inter - dia (\%)} = \left[\frac{\sqrt{\frac{MQ_{dg} + (n-1) \times MQ_{eg}}{n}}}{\text{média para cada concentração}} \right] \times 100$$

Onde MQ_{dg} é a média quadrática dentro dos grupos obtida da tabela de ANOVA e n o número de réplicas dentro do grupo (p. ex.: $n = 3$ para análises em triplicata). Semelhantemente aqui, os dados são obtidos para as três concentrações e expressos como a porcentagem de imprecisão do método e não devem exceder 20% (ANSI/ASB, 2019).

O INMETRO e a ANVISA subdividem a precisão interensaio em precisão intermediária e reprodutibilidade. A precisão intermediária tem como objetivo expressar a proximidade dos resultados obtidos de uma amostra sob condições semelhantes, o mesmo laboratório e equipamento de medição, porém por analistas diferentes e por dois dias. As mesmas concentrações e número de determinações para a

avaliação da repetibilidade devem ser empregados neste caso. A forma de cálculo da precisão intermediária pode ser feita por desvio padrão. Os critérios de aceitação devem ser definidos considerando o objetivo do método, a variabilidade intrínseca deste, a concentração de trabalho empregada e a concentração do analito esperada na amostra.

O teste de reprodutibilidade tem como objetivo avaliar o grau de proximidade dos resultados obtidos em diferentes laboratórios. Assim, é aplicável para padronização de métodos nos quais é preciso atestar reprodutibilidade interlaboratorial. As mesmas concentrações e o mesmo número de determinações empregadas para a avaliação da repetibilidade devem ser usados, entretanto isto é realizado por analistas, equipamentos e laboratórios diferentes em período estendido. Obtém-se o valor de imprecisão por cálculo de desvio padrão e os critérios de aceitação variam. Para o INMETRO, quanto maior o valor das concentrações (baixa, média e alta), menor o desvio padrão tolerado. Assim, se a concentração estiver entre 1 e 100 µg/kg, os valores de aceitos de imprecisão estão entre 32 e 45%. Para a ANVISA, entretanto os critérios de aceitação para o teste de reprodutibilidade são semelhantes aos empregados no teste de precisão intermediária (ANVISA, 2012).

Para avaliação de precisão de amostras sólidas ou semissólidas, deve-se realizar soluções diluídas de diferentes soluções-mãe. Além disso, as amostras usadas para avaliação deste parâmetro devem ser preparadas independentemente desde o início do método.

2.6 CONTAMINAÇÃO CRUZADA (CARRYOVER)

Carryover define-se como o aparecimento de sinais de analitos não intencionais após análise de uma amostra positiva, levando a resultados imprecisos ou inexatos. Em toxicologia forense, o *carryover* resulta em resultados falso-positivos. Para avaliar o *carryover*, amostras de matriz em branco devem ser analisadas imediatamente após uma amostra adicionada com o(s) analito(s) de estudo em alta concentração ou logo após um padrão analítico. Essa análise deve acontecer em triplicata. Pode-se empregar o teste de *carryover* usando o LSQ da faixa linear de trabalho, mas sempre que possível deve-se avaliar concentrações superiores a este (2-3x o LSQ). É considerado um método livre de *carryover* aquele cuja matriz em branco analisada após a amostra em alta concentração não apresenta sinal do(s) analito(s) acima do LD determinado pelo método (ANSI/ASB, 2019).

2.7 ESTUDOS DE INTERFERENTES

2.7.1 EFEITO MATRIZ

Durante o emprego de técnicas analíticas como a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, pode ocorrer o aumento/supressão da ionização (efeito matriz) resultante da presença de compostos coeluentes. De acordo com o AAFS Standards Board (2019), duas abordagens diferentes podem ser realizadas para avaliar o efeito matriz de um método, as quais são apresentadas a seguir.

◆ Infusão pós-coluna

Soluções de concentração baixa e alta do analito são infundidas com uma seringa no eluente da coluna por meio de uma conexão em T pós-coluna e monitora-se um sinal na linha de base. Durante essa infusão, um mínimo de dez fontes diferentes de matriz em branco devem ser injetadas. Deve-se monitorar qualquer efeito matriz considerável observável ($\pm 25\%$) no sinal no mesmo tempo de retenção do analito analisado (ANSI/ASB, 2019).

◆ Adição pós-extração

De acordo com a AAFS Standards Board (2019), para o efeito matriz, dois conjuntos diferentes de amostras são preparados. O conjunto um consiste em padrões puros preparados em duas concentrações – baixa e alta. Cada um desses padrões é injetado no mínimo seis vezes para estabelecer uma área média de sinal do analito para cada concentração. Enquanto o conjunto dois consiste em, pelo menos, dez fontes diferentes de matrizes em branco, extraídas em duplicata e que, após a extração, são fortificadas com o padrão puro na respectiva concentração. Deve-se então comparar as áreas obtidas do sinal do analito em ambas situações para obter a porcentagem de efeito matriz (ANSI/ASB, 2019). Para isso, a seguinte fórmula é empregada:

$$\text{Efeito matriz (\%)} = \left(\frac{\text{Média áreas conjunto 2}}{\text{Média área conjunto 1}} - 1 \right) \times 100$$

O INMETRO sugere uma abordagem um pouco diferenciada para a obtenção dos valores de efeito matriz. Deve-se preparar dois grupos de amostras, um com matriz e o outro sem ambos contendo a mesma concentração do analito. Toda a faixa linear de trabalho deve ser testada, aplicando três diferentes valores de concentração (baixa, média e alta), com no mínimo três replicatas cada. Após isso, emprega-se dois cálculos: Teste F (Snedecor) de homogeneidade de variâncias e Teste t (*Student*) de comparação de médias. Se o teste F

não for significativo, conclui-se que a matriz não causa um efeito significativo sobre a precisão do método, ao passo que, se o teste t não for significativo, o efeito matriz é considerado insignificante.

● Matriz contendo o analito

Pode acontecer de o laboratório não possuir matriz sem a presença do analito. Nesse caso, o cálculo de efeito matriz pode ser obtido preparando duas curvas analíticas, uma contendo a matriz cujo analito está presente e a outra sem nenhuma matriz. Devem ser preparados, no mínimo, cinco níveis de concentração em triplicata. Aplica-se então o Teste t (*Student*) para as inclinações das curvas extraídas, comparando seus coeficientes angulares. Considera-se então um nível de significância de 5% no teste de hipóteses e, se estes valores forem significativamente distintos, há efeito matriz considerável. Outro indicativo da presença de efeito matriz que pode ser visualmente observado é o não paralelismo das retas (BRASIL, 2017; INMETRO, 2020).

2.7.2 INTERFERENTES DE PADRÃO INTERNO

Inúmeros métodos empregam padrões internos para auxiliar a quantificação dos analitos de interesse. Entretanto, padrões internos marcados isotopicamente podem conter o composto não marcado como uma impureza, afetando diretamente a quantificação do analito.

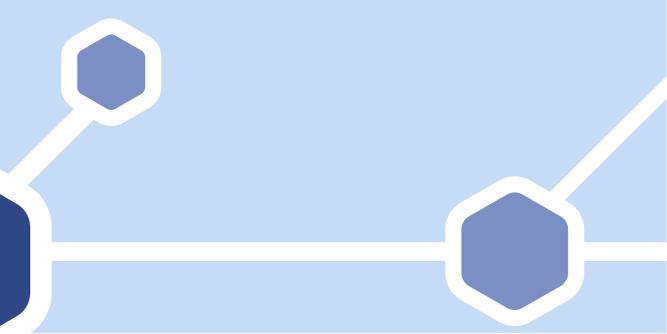
Para avaliar possíveis interferentes desse tipo, deve-se empregar uma matriz em branco fortificada com o(s) padrão(ões) interno(s) empregado(s) no método e monitor o sinal(is) do analito(s) de interesse. Interferências abaixo do LD do método podem ser insignificantes dependendo do objetivo do laboratório (ANSI/ASB, 2019).

2.7.3 SELETIVIDADE

Para todos os tipos de ensaio (quali e quantitativos), deve-se considerar a potencial interferência causada por outros analitos não presentes no método. Para isso deve-se empregar amostras em branco fortificadas, amostras reais de casos previamente analisados ou materiais de referência (como padrões analíticos) em concentrações elevadas, dependendo do objetivo do laboratório. Um método que consegue diferenciar os analitos de interesse de outros analitos é considerado seletivo (ANSI/ASB, 2019; ANVISA, 2012).

2.8 ESTABILIDADE DE AMOSTRAS

A estabilidade das amostras é um importante parâmetro a ser avaliado durante a validação de métodos, principalmente quando o laboratório possui condições específicas de armazenamento e processamento de amostras. Esse critério é considerado adicional dentre os outros já abordados, entretanto é de grande importância, principalmente quando as amostras não podem ser imediatamente analisadas, ou estão sujeitas a processos de congelamento e descongelamento (ANSI/ASB, 2019).



Para todos os estudos de estabilidade, compara-se a média das respostas de tempo zero com a média das respostas nos diferentes tempos de estabilidade. O analito será considerado estável se apresentar desvio dentro do aceitável ao comparar as médias descritas acima. O desvio aplicado para a estabilidade de amostras deve ser o mesmo empregado na avaliação de exatidão do método.

É importante ressaltar que esse parâmetro da validação deve ser realizado sempre que seja aplicável para o método em desenvolvimento, a menos que a estabilidade do analito já tenha sido abordada de outras formas (p. ex.: referências já publicadas) (ANSI/ASB, 2019).

2.8.1 ESTABILIDADE DE AMOSTRAS ARMAZENADAS

Para os estudos de estabilidade de amostras armazenadas, deve-se empregar um conjunto de amostras fortificadas com materiais de referência em duas concentrações diferentes (baixa e alta) na matriz de estudo em branco. Uma triplicata das amostras fortificadas será inicialmente analisada para estabelecer respostas no tempo zero em ambas as concentrações (ANSI/ASB, 2019).

2.8.2 CICLOS DE CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO

Se a prática de congelar e descongelar amostras for rotineira, a estabilidade do analito deve ser determinada após três ciclos de congelamento e descongelamento. Para este estudo, uma sextuplicata de matriz em branco fortificada nas duas concentrações (baixa e alta) deve ser congelada em recipientes distintos, empregando a temperatura de armazenamento semelhante à das amostras reais. Após 24 horas, a sextuplicata deve ser descongelada a temperatura ambiente, sendo uma triplicata analisada imediatamente. A outra

triplicata deve ser novamente congelada e submetida a mais dois ciclos de congelamento e descongelamento, até ser finalmente analisada (AAFS STANDARDS BOARD, 2019).

2.8.3 ESTABILIDADE EM AMOSTRADOR AUTOMÁTICO

Durante a rotina laboratorial, pode acontecer de amostras processadas não poderem ser imediatamente analisadas. Nesses casos, deve-se averiguar o período que essa amostra pode suportar sem sofrer alterações inaceitáveis, que possam impedir a detecção ou quantificação do analito (ANSI/ASB, 2019).

Para esse estudo, pelo menos uma sextuplicata de amostras em branco fortificadas em duas concentrações (baixa e alta) deve ser realizada. Uma triplicata é analisada imediatamente para obtenção da resposta no tempo zero. A outra triplicata, porém é armazenada por um tempo (p. ex. 24 horas), à temperatura usualmente empregada na rotina (p. ex.: no amostrador, no freezer etc.), e então analisada. Após a análise, deve-se comparar as respostas obtidas da triplicata de tempo zero e da armazenada por certo período (ANSI/ASB, 2019).

2.9 INTEGRIDADE DE DILUIÇÃO

Para métodos quantitativos, pode ser necessário avaliar o efeito da diluição de uma amostra durante o processo de validação. Esse parâmetro é considerado opcional, porém é útil quando há a necessidade de ajuste do método para volumes inferiores de amostra ou concentrações excessivamente acima da faixa linear de trabalho (ANSI/ASB, 2019).

Independente da aplicação, o efeito da diluição de amostras na exatidão e na precisão do método deve ser averiguado. Para isso, esses estudos devem ser repetidos nas diluições que serão empregadas (p. ex.: 1:2, 1:10, 1:20, etc.), e a exatidão e precisão devem ser mantidas (ANSI/ASB, 2019).

2.10 ROBUSTEZ

A robustez define-se como a capacidade de um método em resistir a pequenas variações durante sua execução. É considerada um parâmetro opcional na validação, mas de grande importância pois garante a confiabilidade do método desenvolvido (BRASIL, 2017; INMETRO, 2020).

De acordo com o INMETRO (2020), para determinar a robustez de um método, duas alternativas de planejamento são incentivadas: planejamento de Youden ou de Plackett-Burman, que tem como objetivo ordenar o grau de influência de cada variação nos resultados. Qualquer susceptibilidade do método deve ser documentada e controlada.

UNIDADE 3

ANÁLISE DE SOLVENTES ORGÂNICOS VOLÁTEIS POR CROMATOGRÁFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Nesta parte trataremos do exame de inalantes por Cromatografia Gasosa hifenada à Espectrometria de Massas (CG-EM, usualmente denominado GC-MS, do inglês *Gas Chromatography Mass Spectrometry*). O modelo de equipamento de referência para as considerações a seguir será o GC-MS Agilent 5975 com amostrador automático CTC Pal e com software *Chemstation*, uma vez que este é o modelo mais difundido de equipamento entre os entes federativos.

A pretensão desta unidade é capacitar o aluno para reconhecer as principais partes do sistema GC-MS Agilent 5975, identificar os problemas de hardware mais frequentes e como resolvê-los. Também é objetivo levar o aluno a adquirir familiaridade com as principais ferramentas do *ChemStation* e aprender sobre o desenvolvimento de métodos voltados para análise qualitativa de inalantes em GC-MS. Além disso, espera-se que o aluno compreenda a criação de biblioteca no formato AMDIS para análise de inalantes e a interpretação de resultados.

Discutiremos, ainda, as limitações da análise e de que forma, com base nos resultados obtidos, podemos elaborar um laudo toxicológico para inalantes.

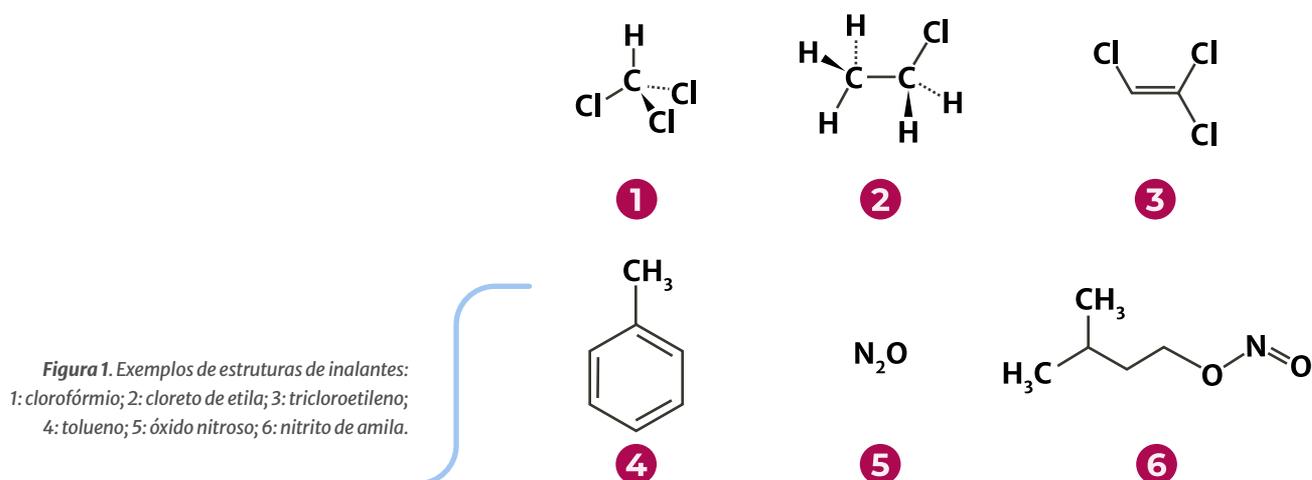
O conteúdo necessário para a aquisição de tais competências estará distribuído não só nos conteúdos abordados ao longo do material a seguir, como ainda em discussões práticas que serão realizadas nas etapas de configuração de métodos e preparo de amostras. Além disso, serão entregues artigos relacionados à criação de bibliotecas que servirão como material de referência.

3.1 OS INALANTES

Antes de mais nada, é preciso que tenhamos em mente o que são inalantes. De forma geral, trata-se de um grupo de moléculas que compartilha características físico-químicas como: alta volatilidade e/ou baixo ponto de ebulição e com massa molecular geralmente inferior a 200 Da. Do ponto de vista farmacológico, tais substâncias provocam alteração do nível de consciência, visto que muitas delas, no passado, foram empregadas como anestésicos gerais, mas abandonadas devido à hepatotoxicidade, além de arritmias cardíacas por elas provocadas.

Além disso, temos como característica comum dessas substâncias a via de administração, qual seja, a inalatória. A importância, do ponto de vista da Toxicologia Forense, reside na associação entre o uso recreacional de tais substâncias e quadros que vão desde acidentes

de trânsito até morte súbita. A Figura 1 ilustra alguns dos exemplos mais rotineiros destas substâncias.



3.2 ANÁLISE DE INALANTES POR GC-MS

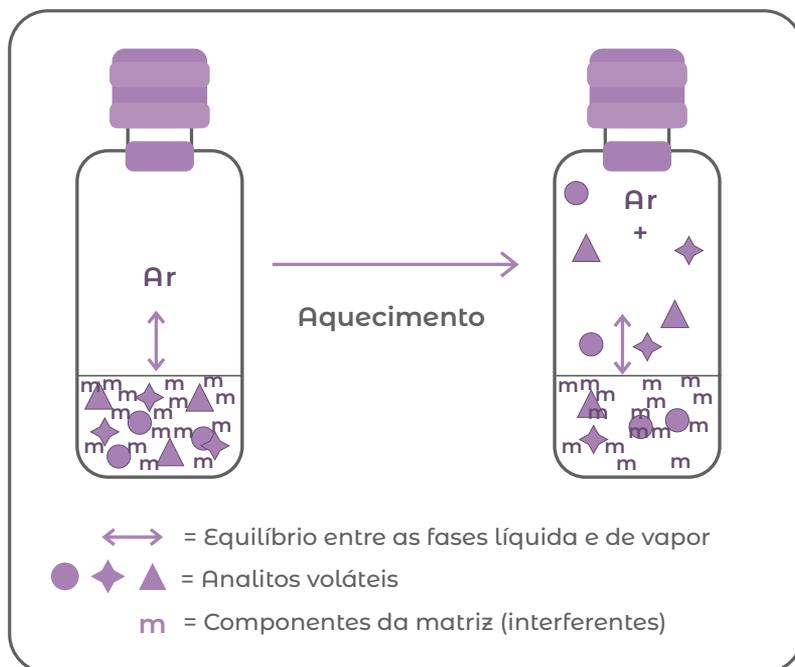
3.2.1 PRINCÍPIO DA TÉCNICA E HARDWARE

Já que uma das características mais marcantes dos inalantes é a volatilidade, torna-se razoável a análise destes compostos via cromatografia gasosa, uma vez que esta é a técnica por excelência destinada ao exame de compostos voláteis e/ou passíveis de volatilização.

Como os analitos de interesse são muito mais voláteis do que o restante da matriz, a melhor forma de realizar este tipo de exame é por meio da técnica de *headspace*, na qual, em frasco hermeticamente fechado contendo a amostra, esta é aquecida.

Uma vez que o sistema está fechado e aquecido, o equilíbrio entre os analitos voláteis presentes nas fases líquidas e de vapor passa a ser deslocado em direção a esta última, que terá poucos interferentes de matriz (Figura 2).

Figura 2. Esquema simplificado da concentração de analitos na fase de vapor que ocorre na técnica de headspace.



Uma vez concentrados em uma fase com poucos interferentes, resta apenas a captação desse vapor para análise, sem necessidade de outro tipo de tratamento.

No sistema que utilizaremos como modelo, essa etapa ocorre no amostrador automático CTC-Pal, que possibilita três modos de injeção distintos:

- Amostras líquidas.
- *Headspace*.
- Microextração em fase sólida (ou SPME, do inglês: *Solid Phase Micro Extraction*), que pode ser feita tanto por imersão da fibra na amostra, como também por *headspace*.

Para cada uma dessas formas de injeção há um tipo de suporte, sua respectiva seringa e um conjunto de parâmetros específicos a ser configurado. Além disso, para trabalhos em condições otimizadas faz-se necessária a utilização de *liners* específicos (falaremos mais adiante sobre esse item ao abordarmos o cromatógrafo).

Aqui faremos uso do módulo *headspace* (suporte vermelho e seringa de 2,5 mL), em que a etapa de agitação e aquecimento da amostra é feita em um forno acessório e a captação da amostra, na forma de vapor, ocorre em um suporte aquecido dotado de seringa apropriada para a injeção de vapores, além de possuir uma entrada lateral destinada

à passagem de gás hélio para a remoção de resquícios da amostra recém injetada. A essa etapa, que corresponde à lavagem da seringa com solventes no modo de injeção para amostra líquida, dá-se o nome de *flush* e é de suma importância para que se evite a ocorrência de *carryover*, ou seja: que uma amostra seja contaminada por resquícios de uma injeção anterior (Figuras 3 e 4). As principais vantagens desse tipo de abordagem são elencadas na Tabela 1.

| TABELA 1 - PRÓS E CONTRAS DO USO DE HEADSPACE NA ANÁLISE DE INALANTES

Prós	Contras
Rápido e simples preparo de amostra	Custo de insumos
Em geral, poucos interferentes	Coeluição de compostos de baixa retenção em coluna
Não requer métodos cromatográficos sofisticados	Risco de queima de filamento em alguns tipos de análise*
Menor custo com manutenção preventiva do equipamento	
Métodos de curta duração	

*Aqui a análise se refere ao uso de espectrômetro de massas como sistema de detecção.

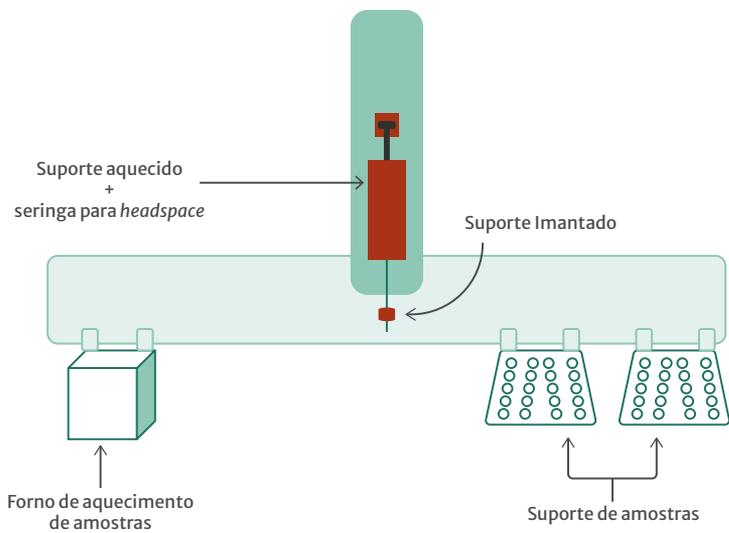


Figura 3. Esquema simplificado do sistema CTC-Pal.

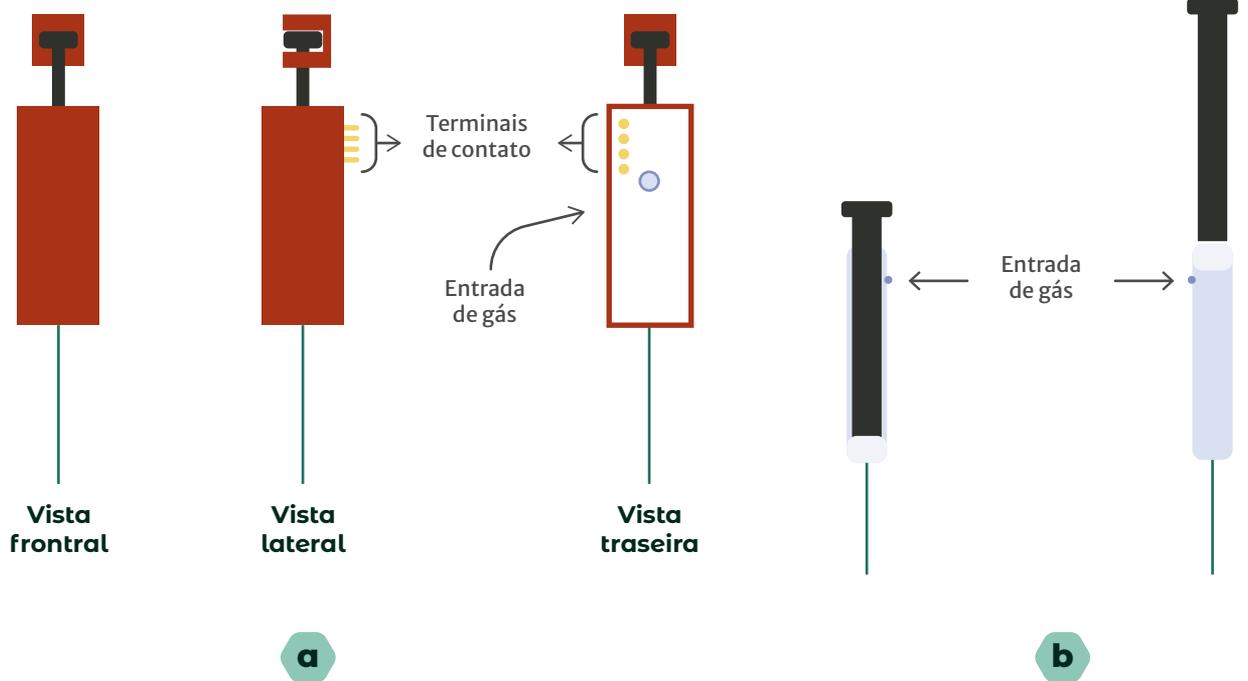


Figura 4. Conjunto de suporte aquecedor e seringa (a) e detalhe da seringa (b), notar a entrada de gás tanto no suporte como na seringa, que servirão para a realização de flush e diminuição de carryover.

A partir desta etapa, faz-se a captação direta deste vapor e sua introdução no *inlet*, que é a porta de entrada do cromatógrafo. A partir daí, a amostra é direcionada para a coluna cromatográfica, local em que ocorre a separação de seus componentes. Os componentes da amostra são arrastados por um gás inerte e no interior da coluna, que nosso caso será o hélio. Tanto por diferença de ponto de ebulição como por interação entre coluna e analitos, os componentes da amostra sofrem separação ao longo de sua trajetória até chegarem ao detector (Figura 5).

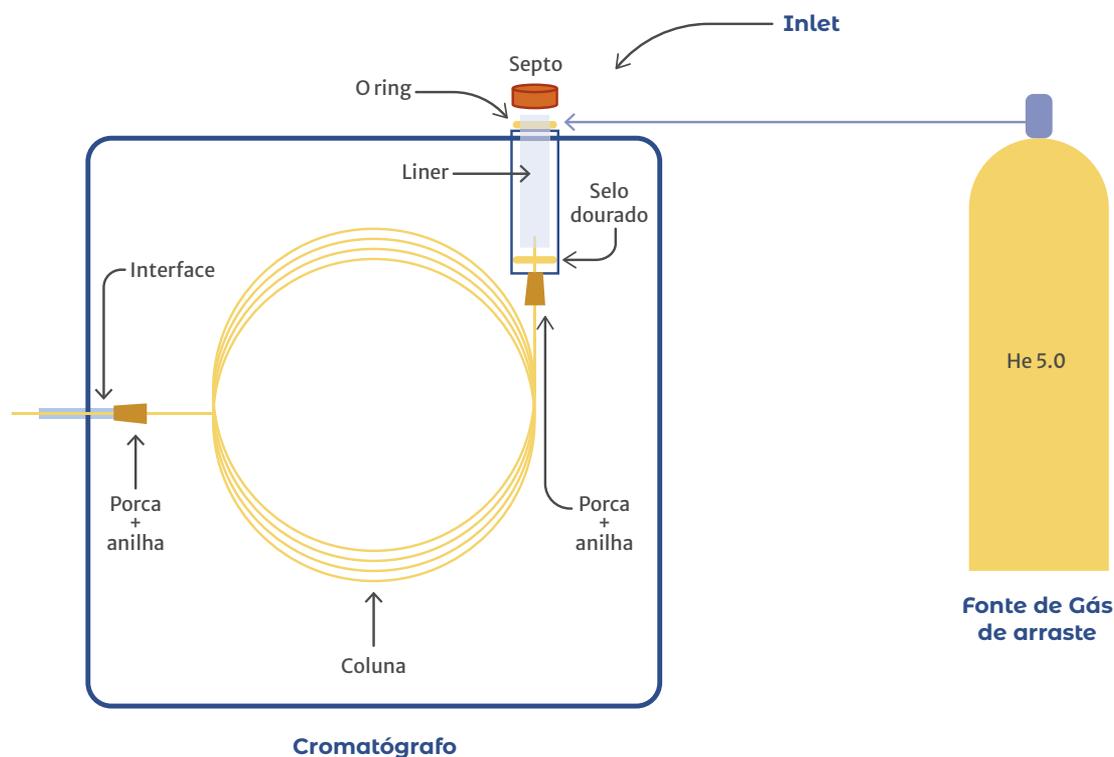


Figura 5. Principais elementos do cromatógrafo. Por simplificação, não foram apresentados outros elementos como sistema de purga, filtros e painel de comando.

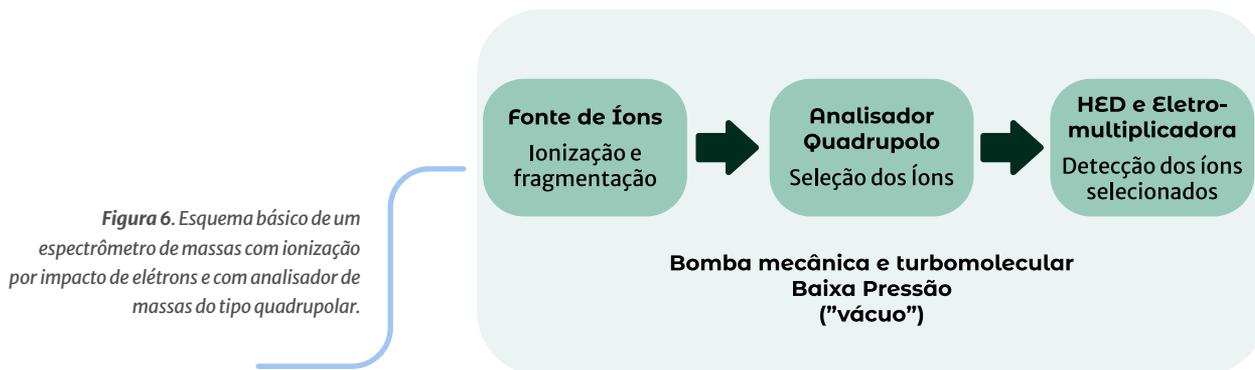
Dentre os diferentes tipos de detectores que podem ser acoplados ao cromatógrafo, aquele que é amplamente difundido e que fornece a maior quantidade de informação relacionada ao analito é o espectrômetro de massas.

Nessa técnica ocorre tanto a ionização como a fragmentação do analito, sendo que todos os fragmentos dotados de carga são direcionados a um analisador de massas (no nosso caso, um quadrupolo) que, a depender do ajuste desejado, permitirá a passagem de fragmentos previamente determinados.

Os íons selecionados são então direcionados a um dinodo de alta energia (HED, do inglês: *High Energy Dinode*) que, ao entrar em contato com tais íons, gera uma corrente de elétrons que será amplificada na eletromultiplicadora.

Também é de fundamental importância mencionar que todo esse sistema depende da manutenção de baixa pressão (vulgarmente denominada vácuo) para que haja não apenas reprodutibilidade dos resultados, como também sensibilidade. Assim, um “vácuo” ineficaz pode ser motivo tanto de diminuição de sensibilidade, como também de potenciais danos elétricos ao equipamento, já que o aumento da

pressão no interior do espectrômetro pode levar à geração de correntes elétricas indesejadas (Figura 6).



Os sinais elétricos resultantes deste processo são então convertidos em um rol (que pode ser gráfico ou em lista) discriminando o tipo e a intensidade relativa de cada fragmento, que é denominado espectro de massas que, além de ser uma forma sintética a partir da qual diferentes informações podem ser obtidas acerca de uma dada molécula (ex.: massa molecular, presença de determinados grupos funcionais e/ou átomos), carrega consigo a possibilidade de ser armazenado na forma de bancos de dados, denominados de bibliotecas de espectros de massas.

Sabemos que a principal informação fornecida por todos os sistemas de detecção é o tempo de retenção (TR), que pode ser definido como o intervalo de tempo entre a introdução da mistura que contém o analito de interesse e a detecção deste pelo analisador acoplado ao cromatógrafo.

Estabelecidas as condições analíticas (ex.: tipo de coluna, temperatura inicial de forno e taxa de aquecimento) o tempo de retenção torna-se fixo dentro de um intervalo estreito de tempo (em geral uma janela de $\pm 1\%$ do valor do TR).

Este mesmo tipo de raciocínio é válido para a obtenção dos dados espectrais, ou seja: uma vez fixados os parâmetros de aquisição, espera-se que haja reprodutibilidade dos espectros de massas adquiridos.

Por esta razão, em cromatografia gasosa com geração de íons por impacto de elétrons, em geral, trabalha-se com um valor fixo de energia de impacto de elétrons igual a 70 eV.

Além desse parâmetro, um fluxo de gás de arraste menor do que 2 mL/min na coluna também é necessário para a manutenção de um ambiente sob baixa pressão e assim haver um livre percurso médio (caminho dos íons entre a fonte de ionização e o HED) com a menor variação possível tornando não só a ionização como a detecção de íons eventos constantes e reprodutíveis.

3.2.2 SOFTWARE E CRITÉRIOS DE POSITIVIDADE

Feita esta introdução sobre o hardware, passaremos a explorar os elementos básicos do software que controla o sistema, denominado *Chemstation*.

Tal programa possibilita a configuração de até 4 *instruments*, sendo que cada um deles corresponde ao conjunto composto por um *Instrument Control*, destinado à aquisição de dados e um *Data Analysis*, dedicado basicamente à análise dos dados gerados no exame da amostra.

O modo de configuração mais usado no *Instrument* é o *enhanced*, que é um ambiente geral que pode ser usado em diferentes tipos de aplicação. Porém, há ainda a possibilidade de emprego de outros três modos: *drug analysis*, *enviroQuant* e *aromatics in gasoline*, usados, respectivamente para análise de fármacos, análises ambientais de acordo com métodos da EPA e para determinação de substâncias aromáticas em gasolina de acordo com protocolos da ASTM.

Assim, um mesmo equipamento pode ter quatro configurações distintas, já que a *Chemstation* permite a configuração de até quatro *instruments*.

Dois parâmetros básicos são usados na análise dos resultados de uma análise por GC-MS: o tempo de retenção e o espectro de massas. Em ambos os casos, comparamos o resultado obtido com uma referência. Para o tempo de retenção é necessário a injeção de um padrão analítico e determinação de seu tempo de retenção nas condições do método empregado no exame.

Já em relação ao espectro de massas, muito embora o ideal seja a criação de bibliotecas a partir das condições nas quais a análise será realizada, há também a possibilidade de emprego de bibliotecas comerciais.

De posse dos tempos de retenção e dos espectros obtidos e comparando tais informações com as referências, temos quatro possibilidades, conforme a Figura 7.

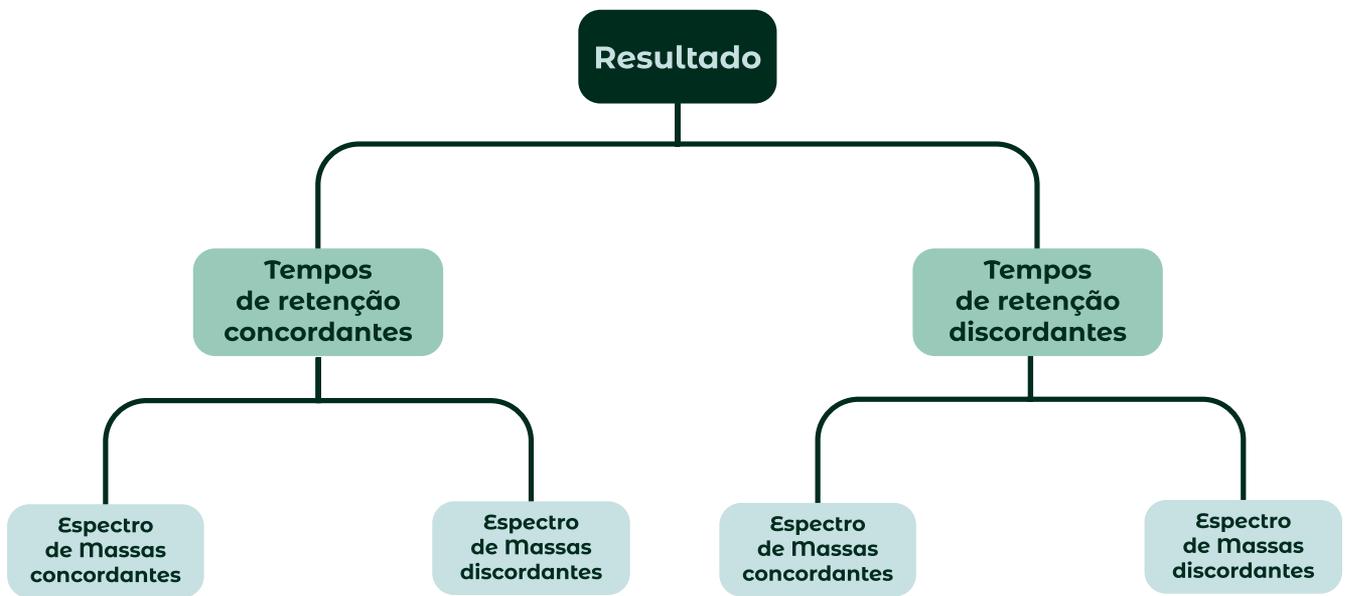


Figura 7. Possibilidades de combinação de resultados comparativos entre o tempo de retenção e espectro de massas de padrões de referência e de analitos de interesse.

Dentre as quatro combinações possíveis, apenas a primeira (tempos de retenção e espectros de massas concordantes) corresponde a um resultado positivo, já que, dentro de um método em que os parâmetros são fixos, não se espera que os tempos de retenção, nem os espectros de massas variem.

Aqui cabe a menção que é preciso cuidado na comparação entre os espectros de massas obtidos em uma dada análise e aqueles que compõem uma dada biblioteca. Muito embora parâmetros como o grau de similaridade entre espectros seja uma ferramenta útil neste tipo de exame, é a comparação visual feita pelo analista que dirá se um espectro é semelhante a outro, sobretudo no que diz respeito a espectros que apresentam poucos fragmentos ou, ainda, fragmentos pouco específicos, ou seja, com razão massa-carga (m/z) baixa, que geralmente estão associados a substâncias de baixa massa atômica como os compostos voláteis (Figura 8).

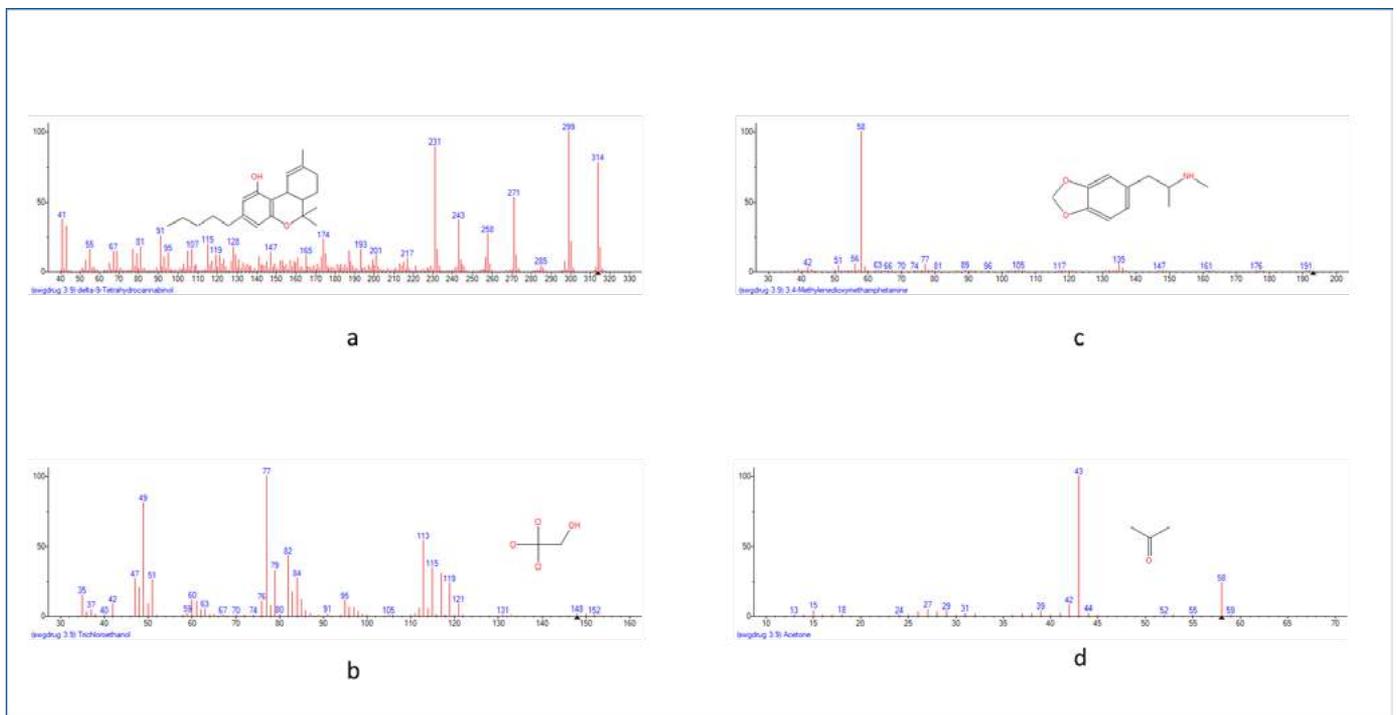


Figura 8. Exemplos de espectros de massas: **a:** espectro específico: contendo diferentes fragmentos com m/z de médio tamanho; **b:** espectro contendo poucos fragmentos (fragmentação pobre) e pouco específico (baixa relação m/z dos fragmentos); **c:** espectro com baixa razão m/z , porém especificidade conferida por assinatura isotópica dos átomos de cloro (observar agrupamentos de fragmentos ao longo do espectro); **d:** idem **b**.

É importante destacar que analitos que aparecem no cromatograma com alta área de pico podem ter tanto o tempo de retenção como o espectro de massas distorcidos, respectivamente por saturação dos sítios ativos da coluna e por saturação do detector, motivo pelo qual, caso isso ocorra podemos fazer a correção ou por aumento da razão de divisão no injetor (*split*) ou por meio de diluição da amostra.

UNIDADE 4

ANÁLISE TOXICOLÓGICA QUALITATIVA E QUANTITATIVA EM AMOSTRAS DE INTERESSE FORENSE

A toxicologia forense é uma das disciplinas técnico-científicas que constituem as denominadas Ciências Forenses, e coloca a ciência Toxicologia a serviço da Justiça. Pode ser definida como a aplicação desta ciência (Toxicologia) com finalidade judicial, estando frequentemente associada ao trabalho policial e fórum criminal, mas serve também à outras áreas da justiça, como o direito civil, trabalhista ou desportivo (CHASIN; LIMA, 2021) Esta área da Toxicologia pode ser dividida em quatro seguimentos principais:

- I. Toxicologia forense *post mortem*: que determina a presença ou ausência de toxicantes ou seus produtos de biotransformação (metabólitos) em amostras biológicas para avaliar a influência destas substâncias como fatores na *causa mortis* ou na circunstância *ante mortem*.
- II. Toxicologia forense do desempenho humano: que determina a presença ou ausência de substância psicoativa em amostras biológicas humanas e avalia seu papel no desempenho e comportamento humano. Como exemplos, pode-se citar as investigações de crimes contra o patrimônio (por exemplo: roubo) ou contra a pessoa (por exemplo: estupro) facilitado pelo uso de substâncias psicoativas que diminuem a atenção da vítima, ou a verificação do uso de álcool e drogas em motorista e consequente alteração na capacidade de dirigir.
- III. Testagem de drogas no ambiente de trabalho: através de análises toxicológicas realizadas em amostras biológicas, geralmente urina, é feita a pesquisa de drogas de abuso lícitas e ilícitas durante testes pré-admissionais, aleatórios, em acidentes e/ou em casos suspeitos. O objetivo deste tipo de testagem é evitar que pessoas realizem funções de alto risco (pilotos de aviação, transportadores de produtos perigosos, entre outros) sob efeito de substâncias que possam prejudicar suas funções cognitivas.
- IV. Controle de dopagem no esporte: esta área da toxicologia forense é regulada pela justiça desportiva, e nela análises toxicológicas são realizadas para pesquisar se atletas estão competindo fazendo uso de substâncias que melhoram a performance durante a competição.

No Brasil, o termo toxicologia forense se relaciona principalmente com as investigações criminais, o que leva a se conjecturar que termos como Toxicologia Criminal ou Toxicologia Médico-Legal seriam adequados para designar a prática da Toxicologia que se realiza nas instituições de segurança pública em âmbitos estadual e federal

(CHASIN; LIMA, 2021). Porém, outras áreas da toxicologia forense estão em franca evolução no Brasil, sendo desenvolvidas, por exemplo, por laboratórios privados e universidades.

Mathieu J. B. Orfila (1783-1853), considerado o pai da toxicologia forense, foi o primeiro a demonstrar ser possível utilizar a química analítica para identificar toxicantes em tecidos e fluidos biológicos coletados *post mortem*, e produzir uma prova legal de intoxicação (OLIVEIRA, 2018). Assim, a toxicologia forense está intimamente relacionada à toxicologia analítica, uma vez que a toxicologia forense faz uso das ferramentas fornecidas pela química analítica na estimativa qualitativa e quantitativa das substâncias de interesse toxicológico presente nos diferentes tipos de matrizes.

Embora as análises toxicológicas *post mortem sejam* de fato um importante ramo da toxicologia forense, os exames realizados *ante mortem* também fazem parte desta área da toxicologia. A verificação de uso de drogas no ambiente de trabalho e no trânsito, a pesquisa de substâncias psicoativas utilizadas como facilitadoras de crime (como no golpe “Boa noite Cinderela”) e a dopagem no esporte são outros exemplos de análises toxicológicas *ante mortem* com finalidade forense, uma vez que os resultados obtidos nos exames também terão implicações legais.

Os laboratórios de toxicologia forense possuem complexa estrutura analítica, que combina análise de grande número de possíveis toxicantes, presentes em concentrações extremamente variadas (de pg/mL a mg/mL), em fluidos biológicos complexos (com grande quantidade e diversidade de possíveis interferentes) (SKOPP, 2004; DORTA *et al.*, 2018).

Em toxicologia forense *post mortem*, o sangue total é a amostra biológica mais empregada na análise toxicológica. É uma matriz complexa, mais viscosa, por vezes coagulada, e que pode sofrer transformações de constituição a depender do estado de decomposição do cadáver (SKOPP, 2004; DRUMER, 2004). Assim, o sangue total coletado de cadáveres possui características que o diferem do sangue total coletado de indivíduos vivos, não sendo possível a separação de soro ou plasma para realização de exames (SKOPP, 2004). Mesmo com estas dificuldades (características da matriz), a concentração sanguínea de um toxicante é uma das principais informações para a investigação de *causa mortis* (MARTINIS *et al.*, 2018).

Nas análises *ante mortem*, o sangue (e seus derivados soro e plasma) é importante pois a concentração do xenobiótico neste material frequentemente apresenta boa correlação com seu efeito (tóxico). Contudo, uma vez que a coleta desta matriz biológica é sempre invasiva, vários cuidados devem ser tomados para garantir a segurança do paciente e a qualidade da amostra coletada, tais como assepsia do local da coleta, a qualidade e a quantidade de anticoagulante empregado (escolhido de acordo com a análise que será realizada), o modo de armazenamento (temperatura ambiente, sob refrigeração ou congelamento) e o tempo decorrido entre a coleta e a análise. Outro desafio desta matriz é a curta janela de detecção, limitada a algumas horas ou poucos dias desde a exposição ao xenobiótico (FLANAGAN *et al.*, 2020).

A urina constitui importante material biológico para a análise toxicológica forense, *ante mortem* ou *post mortem*, pois neste fluido biológico as concentrações dos toxicantes e dos seus respectivos produtos de biotransformação são relativamente altas (quando comparadas ao sangue). Contudo, os resultados de análises realizadas em amostras de urina oferecem pouca correlação com possíveis efeitos biológicos provocados pela substância identificada, pois vários são os fatores que afetam a taxa de excreção de determinado composto e o volume urinário. Mesmo assim, a urina é o principal material biológico para exames de triagem de drogas de abuso (FLANAGAN *et al.*, 2020).

O humor vítreo, fluido que se encontra na cavidade posterior do olho preenchendo o espaço entre o cristalino e a retina, é uma matriz simples e estável disponível para os exames toxicológicos *post mortem*. Trata-se de um fluido gelatinoso, transparente e incolor, mantido coeso por uma delicada rede de fibrilas e cuja viscosidade é devida à presença de ácido hialurônico (MARTINIS *et al.*, 2018; BÉVALOT, F. *et al.*, 2016). Como sua posição é anatomicamente isolada e de pouco contato com material passível de autólise, o humor vítreo é o fluido biológico menos sujeito às alterações químicas que ocorrem *post mortem*. Como desvantagem, cita-se o limitado volume de amostra disponível (1,5-2,0 mL) (BÉVALOT, F. *et al.*, 2016; PERES, 2013), propício para técnicas de extração que requeiram menor volume de amostra. Diversas drogas de abuso podem ser analisadas em humor vítreo, como cocaína, anfetamínicos e opiáceos (PERES, 2013; COSTA *et al.* 2014).

O cabelo é uma amostra indicada quando se pretende detectar a presença de substâncias psicoativas por um período prolongado, de semanas a meses após a exposição. Como o cabelo cresce aproximadamente 1 cm por mês, a partir da análise de fragmentos seriados do cabelo, é possível verificar o histórico de consumo ou abstinência do usuário sendo útil, por exemplo, na análise de substâncias psicoativas em pacientes sob tratamento de reabilitação de dependência e monitoramento da abstinência, em casos de dopagem no esporte e casos forense (CARDOSO *et al.* 2021).

O fluido oral, que será estudado em detalhes em outro curso, é uma das matrizes mais exploradas atualmente para análises toxicológicas *ante mortem*. Esta amostra biológica possui como principal vantagem a facilidade de coleta, que não é invasiva e pode ser realizada sob observação sem que haja constrangimento do doador – esta característica é fundamental para viabilizar a coleta da amostra em situações de campo, como em fiscalização (*blitz*) de trânsito, na avaliação do uso de drogas no ambiente de trabalho e em estudos epidemiológicos sobre uso de drogas (p. ex.: festivais). Outra vantagem importante do fluido oral em análises toxicológicas é a correlação que pode ser traçada entre as concentrações salivares e sanguíneas de um toxicante. Esta correlação permite, por exemplo, o uso do fluido oral em estudo de farmacocinética, em análises forenses e de emergência, por permitir correlacionar as concentrações obtidas com alterações comportamentais que possam eventualmente ser causadas pelo toxicante encontrado nesse fluido (SPIEHLER; COOPER, 2008; TOENNES *et al.*, 2005). Assim como o humor vítreo, a desvantagem desta amostra

biológica é a limitação de volume que pode ser coletado (poucos mililitros), especialmente se o doador estiver sob efeito de algumas drogas que diminuam a salivação, como a 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) e o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), por exemplo (SPIEHLER; COOPER, 2008).

A saliva é um fluido incolor formado pelas secreções das células serosas e mucosas das glândulas salivares (MARQUET; LACHÂTRE, 1999). É composta basicamente por água (99%), proteínas (0,3%), mucopolissacarídeos (0,3%) e eletrólitos (0,4%). Seu pH, quando coletada de forma não estimulada, possui valores entre 6,2 e 7,4. O fluxo salivar pode variar de 0 a 10 mL/min com produção diária de cerca de 500 a 1500 mL (KINTZ; SPIEHLER; NEGRUSZ, 2008). As glândulas salivares possuem elevada irrigação sanguínea, realizada principalmente pela artéria carótida. Substâncias circulando na forma livre no plasma (não ligada às proteínas) podem atravessar as paredes dos capilares sanguíneos e as membranas das células epiteliais das glândulas para assim serem secretadas junto à saliva. Princípios físico-químicos como a solubilidade e grau de dissociação também influenciam a taxa e extensão desta passagem (KINTZ; SPIEHLER; NEGRUSZ, 2008, UNDCP, 2001). O termo fluido oral é o que melhor descreve as amostras habitualmente coletadas por expectoração ou dispositivos de coleta apropriados, isso porque o fluido presente na cavidade oral é a mistura da saliva proveniente das glândulas salivares com outros constituintes presentes na boca. A coleta estrita de saliva se torna inviável, pois dependeria da extração diretamente de uma das glândulas que a produz (SPIEHLER; COOPER, 2008).

Nesta unidade, iremos aprender sobre a realização de exames toxicológicos de triagem de drogas de abuso nas matrizes urina e sangue, utilizando o imunoensaio como técnica analítica de triagem, e a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas como técnica confirmação. Serão discutidos os principais fundamentos teóricos das técnicas, preparo de amostras, as vantagens e limitações de diferentes procedimentos das análises toxicológicas forense, bem como a correta interpretação dos resultados. Espera-se que, após o fim desta unidade, os cursistas possam compreender os fundamentos das análises toxicológicas de triagem (qualitativas) na pesquisa de fármacos, drogas de abuso e praguicidas em amostras biológicas, compreendendo as principais técnicas analíticas utilizadas para triagem, suas vantagens, desvantagens e limitações.

Será dado destaque ao desenvolvimento de métodos utilizando cromatografia em fase gasosa acoplado à espectrometria de massas, para pesquisa de fármacos e drogas de abuso em amostras biológicas, compreendendo os diferentes tipos de extração, os principais parâmetros instrumentais relevantes na aquisição e tratamento de dados, os critérios de identificação, a interpretação dos resultados e a elaboração do relatório final de análise.

Durante a unidade, será dado destaque ao desenvolvimento de métodos para análise em fluidos biológicos das duas principais drogas de abuso ilícitas presentes no Brasil: a cocaína e a maconha. Assim, espera-se que o cursista possa, após este curso, ser capaz de

desenvolver método analítico confirmatório para determinar a presença e a concentração (quantificação) de cocaína e de seus principais produtos de biotransformação (benzoilecgonina, metilecgonina, cocaetileno) em amostras de urina, compreendendo as etapas de preparo de amostras, análise instrumental, tratamento de dados, os critérios de identificação, a interpretação dos resultados e a elaboração do relatório final de análise.

Ainda, espera-se que seja capaz de desenvolver método analítico confirmatório para determinar a presença de ácido 11-nor- Δ^9 -tetraidrocannabinol-carboxílico (THC-COOH) em amostras de urina. O THC-COOH é o principal produto de biotransformação do Δ^9 -tetraidrocannabinol (THC), princípio psicoativo presente na Cannabis sativa (maconha). Ao atingir este objetivo, o cursista compreenderá aspectos fundamentais do preparo de amostras, análise instrumental, tratamento de dados, dos critérios de identificação, da interpretação dos resultados e da elaboração do relatório final de análise confirmatório para verificação do uso de maconha.

4.1 ANÁLISES POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (GC-MS) EM TOXICOLOGIA FORENSE

A cromatografia gasosa (ou *Gas Chromatography*, GC), assim como as demais modalidades de cromatografia, é uma técnica primordialmente utilizada na separação de analitos presentes numa dada amostra. Representa uma das mais importantes técnicas analíticas utilizadas na Toxicologia Forense.

Além disso, o sistema é capaz de realizar análises qualitativas, sobretudo por meio de comparação entre os tempos de retenção de componentes de uma amostra, com aqueles obtidos quando da injeção de padrões no sistema.

Outra possibilidade de análise é a quantificação da substância de interesse. Dessa forma, as áreas dos gráficos gerados após a passagem dos analito(s) pelo detector são utilizadas como elemento para estabelecer a correlação entre amplitude do sinal (ex.: tamanho da área ou altura de pico) e concentração do analito na amostra.

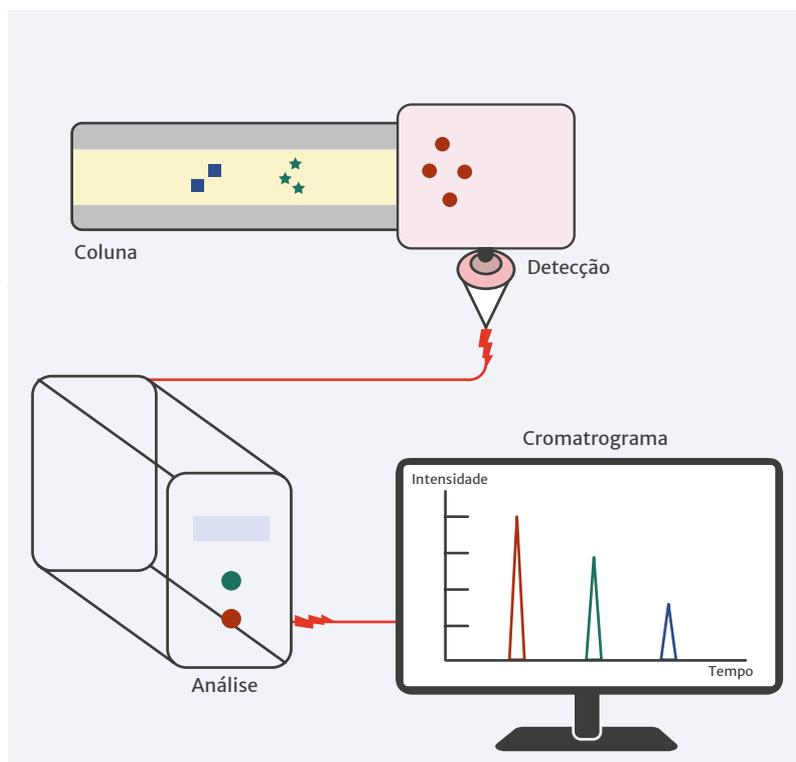
O equipamento consiste basicamente de:

- Um sistema de injeção de amostras.
- Uma câmara para vaporização das amostras, uma coluna cromatográfica dotada de revestimento interno (em geral, um filme de líquido de alta viscosidade - com o qual os componentes da amostra serão separados em virtude da interação de forma diferencial, conforme a afinidade entre amostras e coluna).
- Um detector.

Passada a etapa de separação, os componentes da amostra podem ser observados por diferentes tipos de detectores (Figura 1). Os detectores normalmente utilizados estão elencados na Tabela 1.

O sinal elétrico gerado pelo(s) detector(es), quando da interação com componentes da amostra, é transmitido a um computador, que, por sua vez, exibirá um gráfico correlacionando a intensidade do sinal (eixo Y) com o tempo decorrido entre a injeção da amostra e a detecção de cada um dos seus componentes (eixo X).

Figura 1. Esquema geral de um Cromatógrafo Gasoso com um detector genérico: dependendo da estrutura química, cada componente da amostra interage de forma diferencial com a coluna; com isso, aqueles que mais interagirem com a coluna terão seu percurso retardado e serão separadas das demais estruturas; após interação com o detector é gerado um sinal elétrico, traduzido, via software, para um gráfico que correlaciona intensidade do sinal com o tempo gasto entre a injeção da amostra e as detecções de seus componentes; a intensidade do sinal pode ser proporcional à concentração de cada componente da amostra.



Já que uma das etapas da análise via cromatografia gasosa consiste na vaporização do(s) analito(s), são condições necessárias para essas substâncias de interesse: a volatilidade e a termoestabilidade. Há ainda a possibilidade de volatilização por meio de um processo denominado derivatização, que nada mais é que uma reação com um composto denominado agente de derivatização, conforme ilustrado na Figura 2.

| TABELA 1 - ALGUNS DOS PRINCIPAIS DETECTORES UTILIZADOS EM CROMATOGRAFIA GASOSA

Tipo de Detector	Modo de Funcionamento	Tipo de informação
Condutividade Térmica*	Diferença entre condutividade térmica do gás de referência e os analitos	Tempo de retenção*
Ionização por Chama	Detecção baseada na mudança de ionização ocasionada pela queima do(s) analito(s)	Tempo de retenção
Nitrogênio e Fósforo	Detecção baseada na interação entre plasma do detector e elétrons livres de analitos nitrogenados e/ou fosforados	Tempo de retenção e informação estrutural (presença de “N” e/ou “P”)
Captura de Elétrons	Detecção baseada na variação de sinal causada pela captura de elétrons por compostos dotados de moléculas dotadas de átomos de alta eletronegatividade (ex.: halogenados)	Tempo de retenção e informação estrutural (presença de heteroátomos eletronegativos como “Cl”, “Br” e “I”)
Espectrômetro de Massas*	Ionização, fragmentação de analito(s) e seleção destes últimos para comparação com bancos de dados	Tempo de retenção e espectro de massas*

** Detectores denominados de universais, por serem capazes de detectar qualquer tipo de analito.*

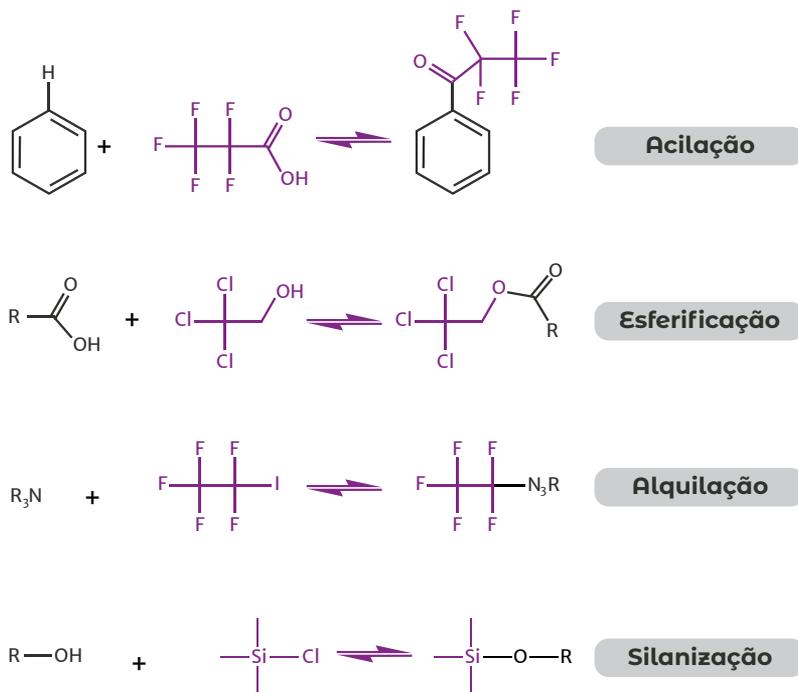


Figura 2. Alguns exemplos de reações de derivatização.

4.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE O USO DO GC-MS EM TOXICOLOGIA FORENSE

Com base na funcionalidade dos componentes do equipamento, podemos dividi-lo da seguinte forma:

1. Sistema de introdução da amostra
2. Cromatógrafo Gasoso
3. Espectrômetro de Massas
4. *Software* para controlar o instrumento e para tratamento de dados

Em relação ao sistema de introdução de amostra, será utilizado o CTC para Cromatógrafo Gasoso, capaz de realizar injeções de líquidos e vapores (via *headspace*, com seringa aquecida ou ainda, por meio de micro extração em fase sólida – SPME). Salienta-se ainda que o CTC possui forno para aquecimento de amostras, bem como estação para condicionamento de fibras para SPME.

Após a amostragem (com ou sem aquecimento), é feita a injeção para o cromatógrafo, cujo *inlet* (porta de entrada da amostra) é do tipo *split/splitless*.

Na injeção no modo *split*, apenas parte da amostra é enviada para a coluna, ocorrendo uma espécie de diluição durante o processo. Já no tipo de injeção *splitless*, cerca de 95% daquilo que foi injetado será transferido do *inlet* para a coluna.

Na Figura 3, observa-se o resumo do funcionamento destas duas possibilidades quando da injeção da amostra.

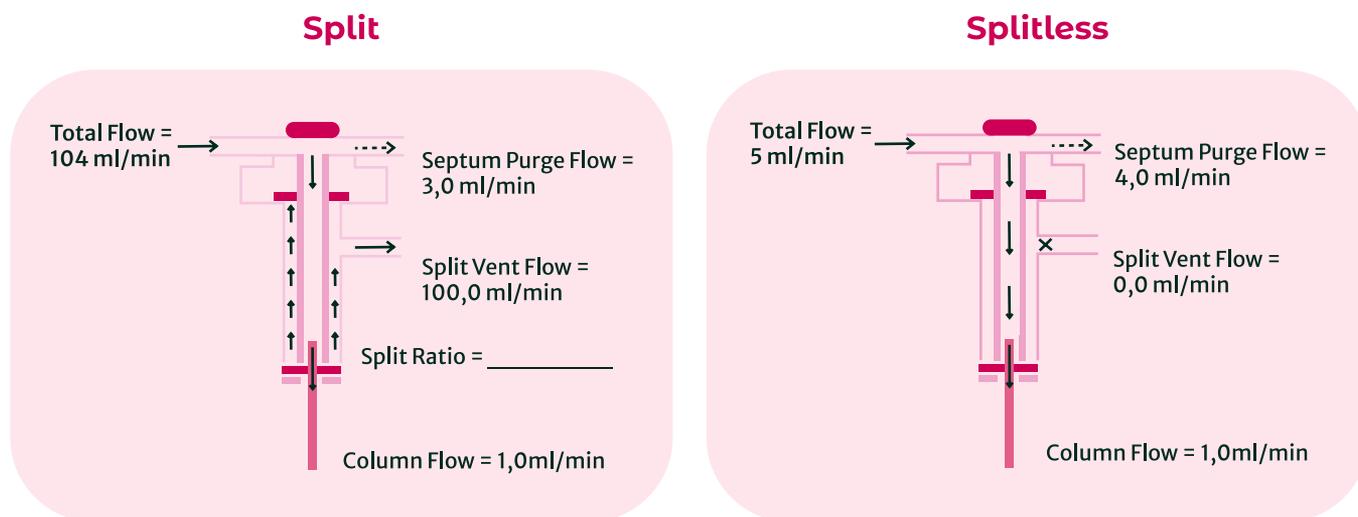


Figura 3. Momento da injeção em dois modos diferentes: *Split* e *Splitless*. No primeiro, a válvula de *Split Vent* permanece aberta, fazendo com que a maior parte do fluxo total seja desprezada; no modo *Splitless*, a válvula de *Split Vent* encontra-se fechada e o fluxo total será a soma do fluxo direcionado à coluna e aquele enviado para o septo.

Na Tabela 2 temos a descrição dos principais componentes consumíveis do *inlet*.

TABELA 2 - PRINCIPAIS CONSUMÍVEIS DO *INLET*

Componente	Função
Septo	Responsável pela vedação do ápice do injetor.
O-Ring	Responsável por vedação da região superior do <i>inlet</i> .
Liner	Câmara na qual ocorre, quando possível, a vaporização dos compostos presentes na amostra.
Selo Dourado	Situado na região logo abaixo do <i>liner</i> ; na sua face externa, acomoda-se a anilha do injetor.
Washer	Arruela metálica situada entre a porca do <i>inlet</i> e o selo dourado; utilizada na vedação do <i>inlet</i> .

Já o espectrômetro de massas (MS 5975-C) pode ser dividido nos itens abaixo, e cujas funções estão listadas na Tabela 3 e Figura 4.

- Fonte de Íons
- Analisador de Massas
- Sistema de Detecção
- Sistema de Vácuo

TABELA 3 - DIVISÃO DOS COMPONENTES DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS

Componente	Descrição Sucinta
Fonte de Íons	Responsável pela ionização dos analitos (emissão de feixe de elétrons por filamentos incandescentes), pela fragmentação e posterior aceleração focalização dos fragmentos formados em direção ao analisador de massas.
Quadrupolo (analisador de massas)	Responsável pela seleção de íons, por meio de aplicações de potenciais que estabilizam a trajetória de apenas uma razão massa/carga por vez.
Sistema de Detecção	Composto por Dinodo de Alta Energia (HED) e multiplicadora de elétrons (EM); ambos submetidos a grandes diferenças de potencial; são responsáveis pela amplificação e detecção do sinal gerado pelos fragmentos “filtrados” no quadrupolo.
Sistema de Vácuo	Criar ambiente necessário para que o sistema apresente sensibilidade e reprodutibilidade.

As etapas de funcionamento do MS-5975-C podem ser resumidas assim:

- Ionização do composto promovida por emissão de feixe de elétrons com energia fixa de 70 eV.
- Ejeção com focalização dos íons formados, em direção ao quadrupolo (analisador de massas).
- Seleção de massas por dois modos básicos:
 - Varredura de uma faixa de razões massa/carga (SCAN).
 - Seleção de razões massa/carga específicas características de um dado composto (*Selected Ion Monitoring - SIM*).
- Detecção de razões massa/carga selecionadas.
- Apresentação dos dados.

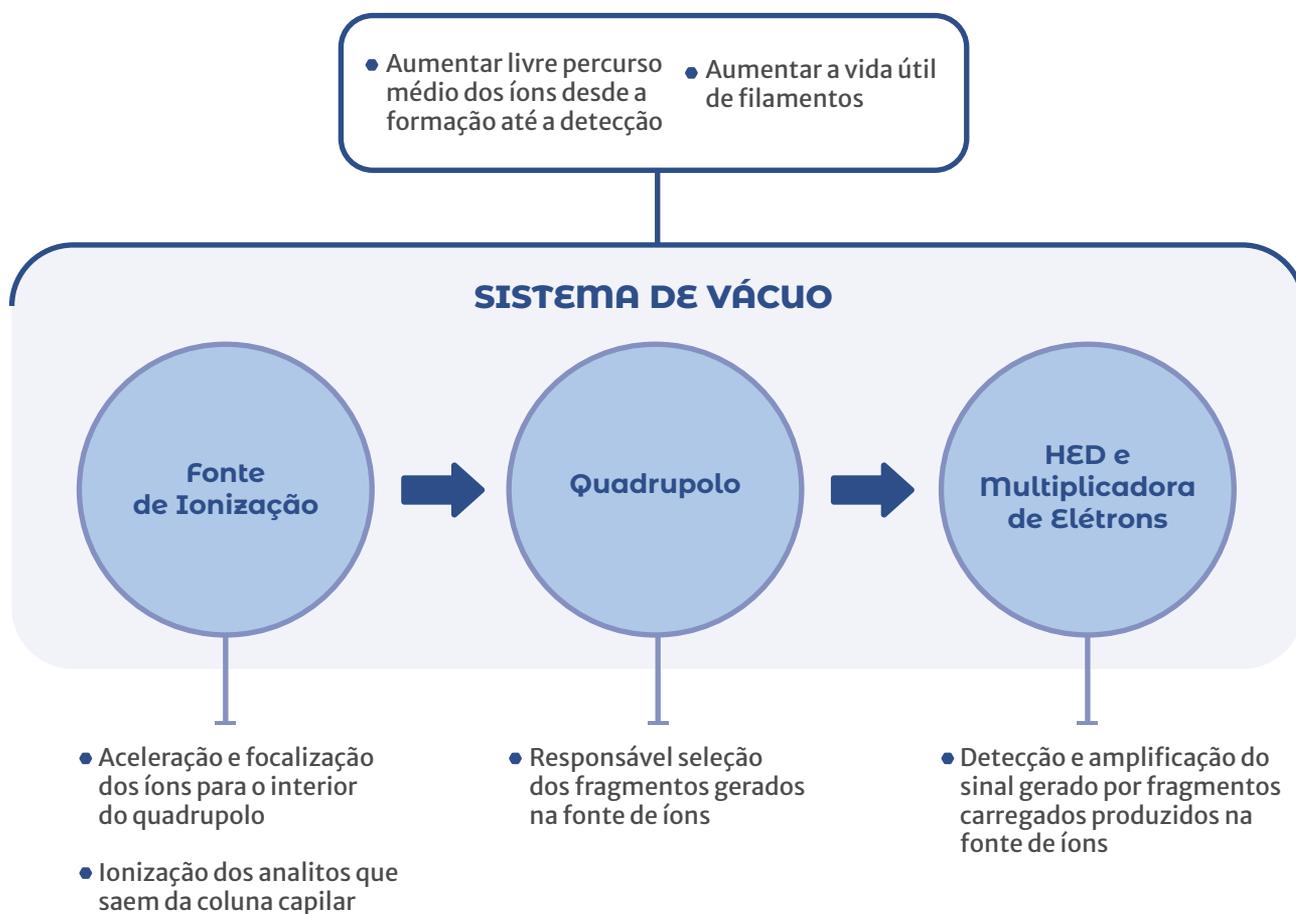


Figura 4. Resumo dos Principais Componentes do Espectrômetro de Massas.

A Figura 5 mostra todo o processo que ocorre no espectrômetro de massas desde a chegada da amostra pela região da coluna que se encontra na interface, até a geração do sinal que será traduzido para um espectro.

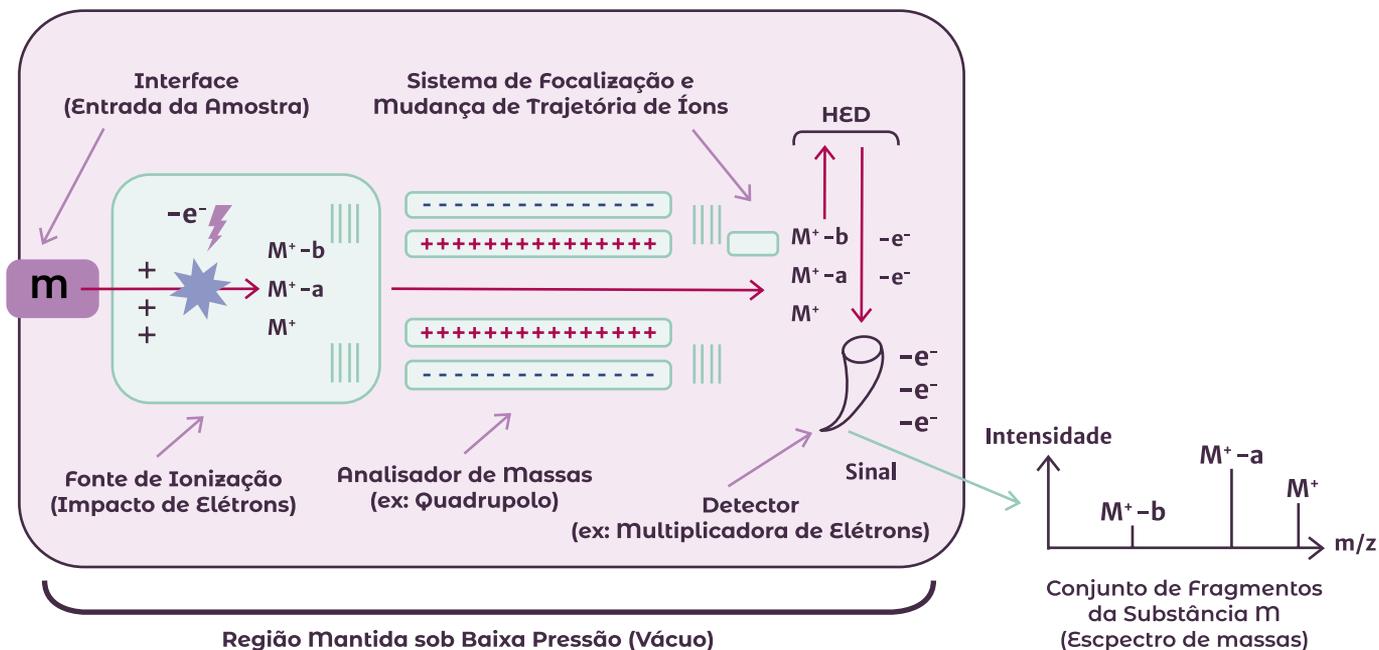


Figura 5. Esquema do Espectrômetro de Massas: compostos voláteis da amostra saem da coluna cromatográfica e chegam à fonte de íons. Nesta, são submetidos a um feixe de elétrons que remove um ou mais elétrons das moléculas, levando ao processo de ionização. Os íons formados na fonte são acelerados em direção ao analisador de massas (neste caso: um quadrupolo) que fará a “filtragem” dos íons de acordo com a programação desejada; os íons que conseguem atravessar o quadrupolo são direcionados para o Dinodo de Alta Energia (HED), no qual promoverão o surgimento de uma corrente elétrica que será então direcionada para a Multiplicadora de Elétrons. Nesta, ocorre amplificação do sinal (aumento da corrente gerada no HED) que será tratado pelo Software ChemStation. A informação final é o espectro de massas.

Já na Figura 6 temos uma síntese do processo de fragmentação e a correspondência entre os fragmentos gerados e o espectro observado.

Em relação aos espectros de massas temos como nomenclatura básica:

- pico base - fragmento de maior abundância.
- íon molecular - fragmento que possui razão massa-carga igual a massa da molécula que o originou.

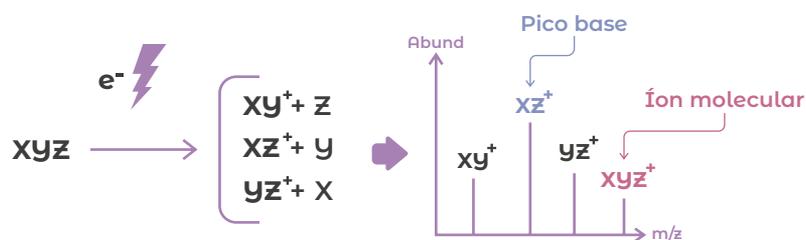


Figura 6. Após a formação, seleção e detecção de íons correspondentes à fragmentação de um composto, o resultado é uma compilação de informações em forma gráfica sobre as razões massa-carga e suas respectivas abundâncias, denominada espectro de massas.

A seguir, serão apresentados os principais detalhes relacionados a cada um dos componentes no espectrômetro de massas.

4.2.1 PROCESSO DE IONIZAÇÃO

No processo de ionização, um feixe de elétrons com energia, de valor fixado em 70 eV, é incidido sobre os componentes que saem da coluna cromatográfica, promovendo a perda de seus elétrons. Para compostos com massa molecular próxima de 1.000 unidades e massa atômica (u.m.a.), ou menores do que esta, a perda é tipicamente de 1 elétron, sendo que a eficiência de ionização é da ordem de 0,01%.

Contudo, dada a transferência de energia ocasionada pela interação entre o feixe de elétrons e as moléculas, elas, além de sofrerem perda de elétrons, acabam se fragmentando.

Todas as espécies deficientes em elétrons e que apresentem carga positiva formadas durante este processo são ejetadas da fonte de íons por conta de repulsão eletrostática causada pelo elemento da fonte denominado *repeller* e em seguida são focalizadas em direção ao analisador de massas por uma série de lentes magnéticas.

4.2.2 PROCESSO DE SELEÇÃO DE MASSAS NO QUADRUPOLO

Os fragmentos formados na fonte de íons são diferenciados no analisador por meio da medida da razão entre sua massa e a sua carga (m/z) cuja unidade é denominada Thomson.

O sistema CTC-GC-MS-5975C apresenta analisador do tipo quadrupolo é formado por dois pares de barras de quartzo com ouro, dispostos em planos perpendiculares entre si.

Cada par de barras é submetido a um potencial elétrico denominado DC e outro denominado RF, que, em conjunto, conferem a um dos pares de barra um potencial positivo e, para o outro, um potencial negativo.

Graças ao RF, estes potenciais variam tal como uma onda senoidal de forma que o par de barras, que num dado momento encontrava-se sob potencial negativo, passe a ser submetido a potenciais cada vez maiores até alcançar um potencial positivo máximo que, ao ser atingido, faz com que potenciais cada vez menores sejam aplicados ao quadrupolo até que o valor de potencial negativo original seja restabelecido.

Este processo de inversão de potencial ocorre de forma semelhante para o par de barras submetido inicialmente ao potencial negativo e, em ambos os casos, a variação ocorre milhões de vezes por segundo (MHz).

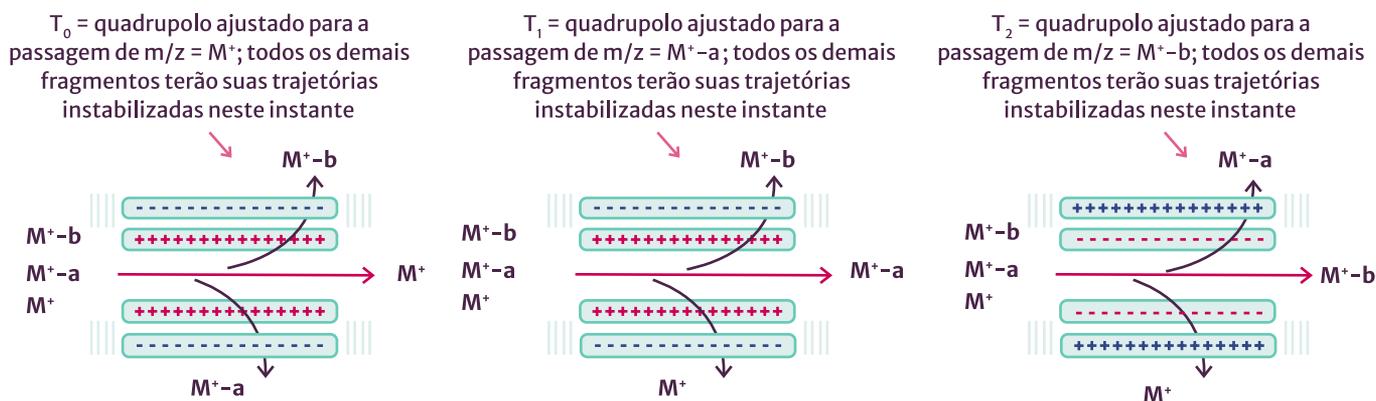
Para um dado conjunto de potenciais DC e RF aplicados aos dois pares de barras, há a estabilização da trajetória de uma razão massa/carga por vez.

Assim, por exemplo, se num dado momento o quadrupolo encontra-se submetido a potenciais que estabilizam a trajetória do fragmento de m/z 77 em direção ao sistema de detecção, todos os demais

fragmentos de razão massa/carga que adentraram o quadrupolo com aquele primeiro (77) terão suas trajetórias instabilizadas e não serão transferidos para o detector (Figura 7).

Ainda em relação ao processo de seleção de íons pelo quadrupolo, este pode ocorrer de duas formas: no modo de Varredura (*Scan*) ou no modo de Monitoramento de Íons Seleccionados (*SIM*).

Vista Lateral do Quadrupolo



Vista Frontal do Quadrupolo

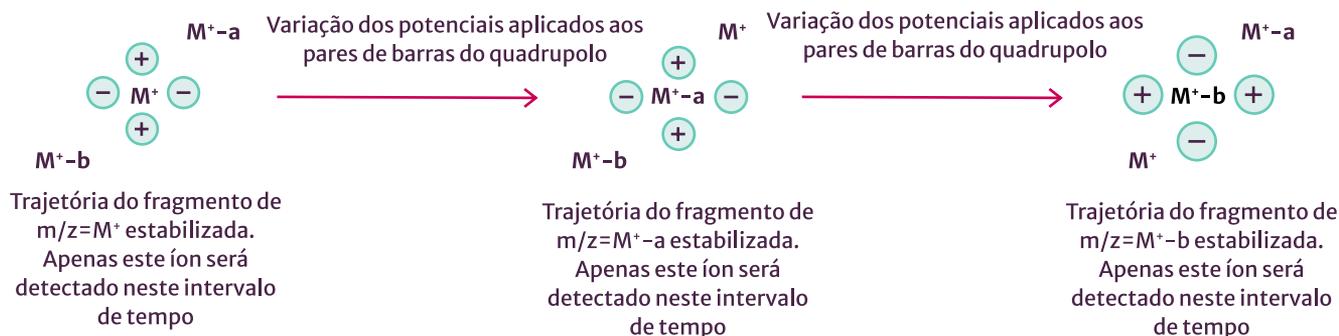


Figura 7. Efeito da variação do potencial aplicado ao quadrupolo sobre a seleção dos fragmentos gerados na fonte de íons: para cada par RF/DC aplicado aos pares de barras do quadrupolo, apenas uma m/z terá sua trajetória estabilizada em direção ao sistema de detecção; as demais m/z são instabilizadas e podem colidir contra o quadrupolo, tornando-se neutras e posteriormente, sendo removidas do MS pelo sistema de "vácuo".

4.2.3 AQUISIÇÃO DE DADOS NO MODO SCAN

No modo de aquisição por varredura (*Scan*), o quadrupolo é ajustado para selecionar razões massa/carga (m/z) que se encontram dentro de um intervalo estipulado pelo usuário. As m/z que se encontram dentro desta faixa previamente definida serão filtradas da seguinte forma:

- É aplicada ao quadrupolo o par DC-RF para estabilizar a trajetória do fragmento de maior massa estipulado pelo usuário; todos os demais fragmentos que tiverem m/z diferentes deste terão sua trajetória desestabilizada.
- Num segundo momento, ocorre a variação de DC-RF aplicada ao quadrupolo de tal forma que o fragmento que apresente um valor de m/z que difira em 0,1 u.m.a./coulomb (unidade de massa atômica/coulomb) do seu antecessor será estabilizado em detrimento dos demais.

- O processo de varredura dos fragmentos ocorre até que aquele que apresente menor razão massa/carga definida pelo usuário seja alcançado.

Ao processo de seleção de fragmentos dentro de um intervalo de valores de m/z previamente definido, dá-se o nome de *Scan* e suas etapas podem ser definidas de acordo com a Figura 8.

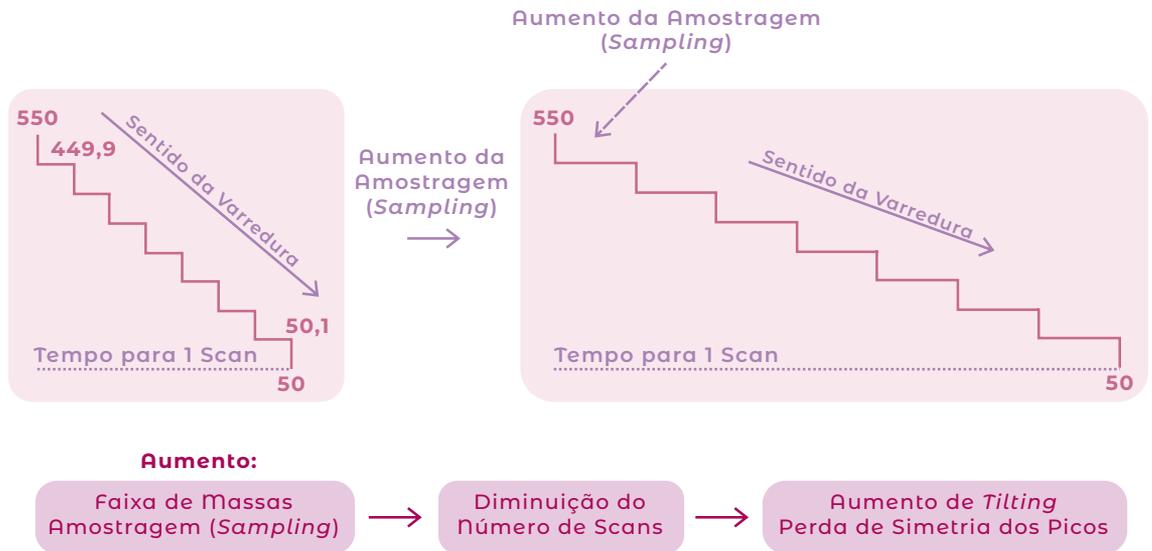


Figura 8. Resumo dos efeitos relacionados aos principais parâmetros de análise no modo SCAN.

Os principais parâmetros a serem observados na configuração de uma aquisição no modo Scan são resumidos na Tabela 4.

| TABELA 4 - PRINCIPAIS PARÂMETROS A SEREM OBSERVADOS NA AQUISIÇÃO NO MODO *SCAN*

Parâmetro	Função	Comentário
Faixa de m/z	Determina o intervalo de razões massa/carga que será percorrido.	A faixa de massas deve ser tal que o ruído de fundo seja minimizado e o íon molecular, quando possível, seja observado. As faixas típicas de uso são: 40–500, 45–550 m/z, para moléculas como drogas de abuso e medicamentos e de 18 até 120 m/z, para solventes e moléculas de baixa massa molecular.
Amostragem	Parâmetro relacionado ao tempo de monitoramento de cada fragmento analisado pelo quadrupolo.	Em geral este valor é ajustado dentro de uma faixa entre 0 e 2 e junto com a faixa de m/z, ajusta o número de <i>scans</i> de um pico, além de se relacionar a sensibilidade do método.
Ponto de corte (<i>threshold</i>)	Delimita a abundância mínima a partir da qual um sinal gerado por um fragmento será armazenado no arquivo de dados.	Um <i>threshold</i> alto pode fazer com que informações importantes sobre o perfil de espectro de interesse sejam perdidas; para análise de traços, este parâmetro pode ser zero.
Número de <i>Scans</i> por pico	Parâmetro relacionado à simetria de pico e ao fenômeno de variação de espectros de massas que compõem um dado pico.	Para análise qualitativa este valor deve variar entre 5 e 10; quando a análise for quantitativa, o ideal é que este valor esteja no intervalo entre 15 e 20 <i>scans</i> .

4.2.4 AQUISIÇÃO DE DADOS NO MODO SIM

Diferente do método *Scan*, no qual é selecionada uma faixa de m/z, no modo de Monitoramento de Íon Único (*Selected Ion Monitoring* ou SIM) é feita a seleção apenas de alguns fragmentos de gerados pelo(s) analito(s). Tipicamente são escolhidos de dois a quatro íons para a análise neste modo de aquisição.

Como apenas alguns íons são escolhidos, os sinais produzidos por interferentes ou ruídos de fundo, são minimizados, aumentando assim a razão entre sinal gerado pelo analito e ruído, resultando em um aumento da sensibilidade.

Contudo, como o número de fragmentos observados no modo SIM é pequeno, a informação estrutural também se torna menor.

Por conta deste fato, este tipo de modo de aquisição de dados é mais utilizado para processos de quantificação, nos quais os analitos já são previamente conhecidos e a ocorrência destes na amostra analisada é esperada.

Na Tabela 5 temos os principais parâmetros associados à aquisição no modo SIM.

| TABELA 5 - PRINCIPAIS PARÂMETROS A SEREM OBSERVADOS NA AQUISIÇÃO NO MODO SIM

Parâmetro	Função	Comentário
Fragmentos escolhidos para Monitoramento	Caracterizar o composto de interesse.	Em geral a escolha está baseada na abundância e na m/z.
<i>Dwell Time</i>	Parâmetro relacionado ao tempo de monitoramento de cada fragmento analisado pelo quadrupolo.	Tempo de residência do ajuste do quadrupolo para a passagem de uma única m/z. É um fator utilizado, dentre outras funções, para ajustar o número de ciclos por segundo.
Resolução	Parâmetro relacionado à discriminação de fragmentos incluídos num mesmo grupo; relaciona-se ainda à sensibilidade.	Define a largura a meia altura dos picos analisados no modo SIM.
Número de ciclos por pico	Parâmetro relacionado à simetria de pico e qualidade do sinal.	Para análise em condições ideais este valor deve estar entre 15 e 25 ciclos.

No modo SIM, a escolha dos fragmentos para monitoramento é feita com base, principalmente, na abundância e na razão massa/carga. Assim, quanto maior forem os valores destes dois parâmetros para um determinado fragmento, maior é a representatividade deste dentro do conjunto de fragmentos da estrutura que se quer analisar.

Já o *Dwell Time* está relacionado ao tempo em que o quadrupolo estabilizará uma única razão massa-carga.

Por uma questão de simplicidade, recomenda-se o uso de mesmo tempo de monitoramento (*Dwell Time*) para todos os fragmentos de um dado analito, pois assim, a abundância relativa que seria observada no modo *Scan* é preservada para o modo *SIM*.

Contudo, este critério não é fixo e pode ser alterado, por exemplo, quando se deseja destacar a intensidade de um íon que apresentaria baixíssima intensidade com a conservação do *Dwell Time* igual para todos os fragmentos analisado.

Por fim, cabe ressaltar que a eletrônica do sistema permite a aquisição de dados nos modos *SIM/SCAN* de forma simultânea.

4.2.5 SISTEMA DE DETECÇÃO

O sistema de detecção do equipamento é composto basicamente por um eixo que desvia os fragmentos que passaram pelo analisador de massas, além de um Dinodo de Alta Energia (*High Energy Dinode* ou *HED*), submetido a um potencial negativo de -10.000 V , que tem como função atrair os fragmentos com carga positiva para si.

Quando os fragmentos atingem o *HED*, este emite um feixe de elétrons (corrente elétrica) em direção à multiplicadora de elétrons.

Esta, por sua vez, amplifica a corrente gerada pelo *HED* da seguinte forma: para cada elétron que colide contra seu interior, uma quantidade de elétrons é liberada da superfície interna da multiplicadora de elétrons e que colidirão com outras regiões desta mesma superfície. A corrente gerada por este processo pode ser milhares de vezes superior à corrente emitida pelo *HED*.

A razão entre a corrente gerada na multiplicadora de elétrons e a corrente emitida pelo *HED* é denominada ganho, fator que é diretamente proporcional à diferença de potencial aplicada à multiplicadora de elétrons. Quanto maior for o ganho, maior será o sinal obtido.

Contudo, quanto maior for a diferença de potencial aplicada à multiplicadora de elétrons, menor será a vida útil deste componente.

Este processo de seleção de íons ao longo do tempo tem como resultado um gráfico tridimensional denominado Cromatograma de Íons Totais (*Total Ion Chromatogram* ou *TIC*) que relaciona razão massa/carga, tempo e abundância de cada fragmento detectado (Figura 9).

Por este gráfico identifica-se que os picos correspondentes a cada m/z são independentes uns dos outros. Além disso, é importante salientar que os picos que se observam no *TIC* são virtuais e representam a somatória das áreas dos picos correspondentes a cada fragmento detectado.

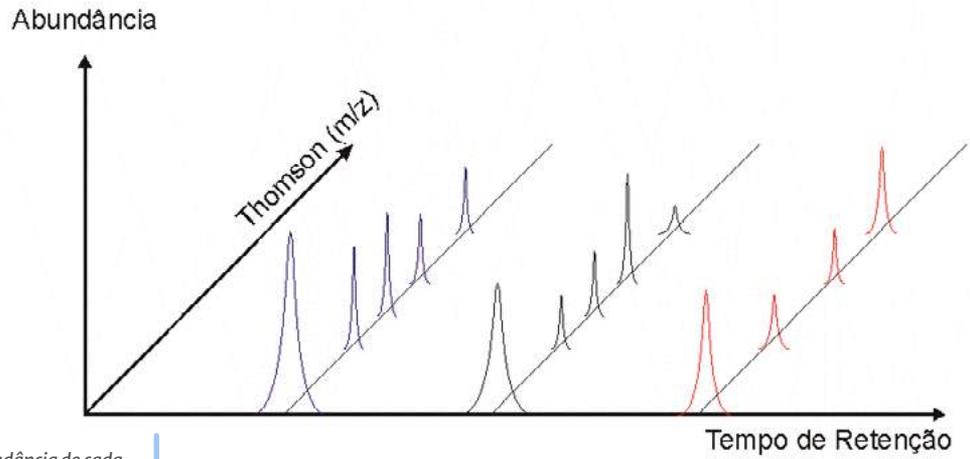


Figura 9. Razão massa/carga, tempo e abundância de cada fragmento detectado no espectrômetro de massas.

Devido à velocidade com a qual os potenciais dos quadrupolos podem variar (frequência na ordem de MHz) no resultado, vemos que os ápices dos picos correspondentes a cada uma das m/z estão praticamente coincidentes, gerando a ideia de que todos foram filtrados ao mesmo tempo (Figura 10).

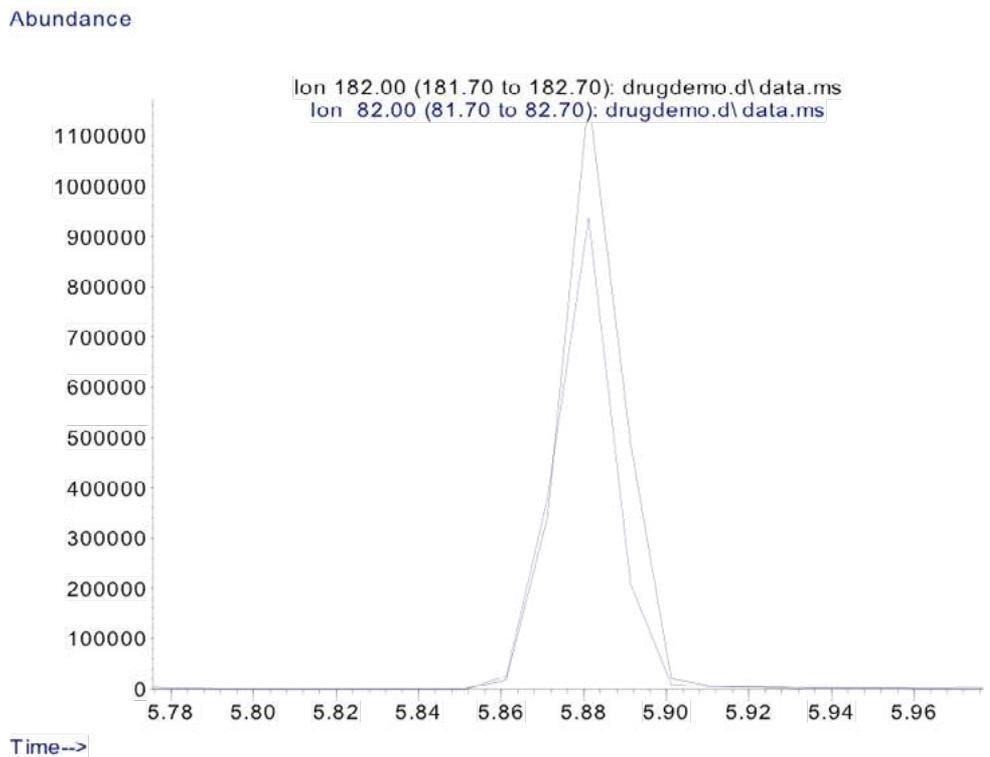


Figura 10. Ápices de picos correspondentes a cada uma das m/z estão praticamente coincidentes, gerando a ideia de que todos foram filtrados ao mesmo tempo.

Ainda em relação ao espectro de massas obtido no final da análise, é preciso ter em mente que mesmo sem informações que possam ser utilizadas como referência, é possível inferir sobre algumas características da molécula analisada.

Por exemplo, quando uma molécula apresenta um número par de nitrogênios, seu íon molecular, quando presente, apresentará um valor par de m/z . Quando o número de nitrogênios for ímpar, o íon molecular, quando observável, terá m/z ímpar (Figura 11).

A presença de alguns halogênios também pode ser inferida a partir do espectro de massas: se uma molécula apresenta um átomo de cloro, haverá no espectro (mesmo que em baixa abundância) um par de m/z que difere em 2 unidades e que estará em proporção de cerca de 100:32,5. Caso haja um átomo de Bromo, esta proporção será de aproximadamente 100:98.

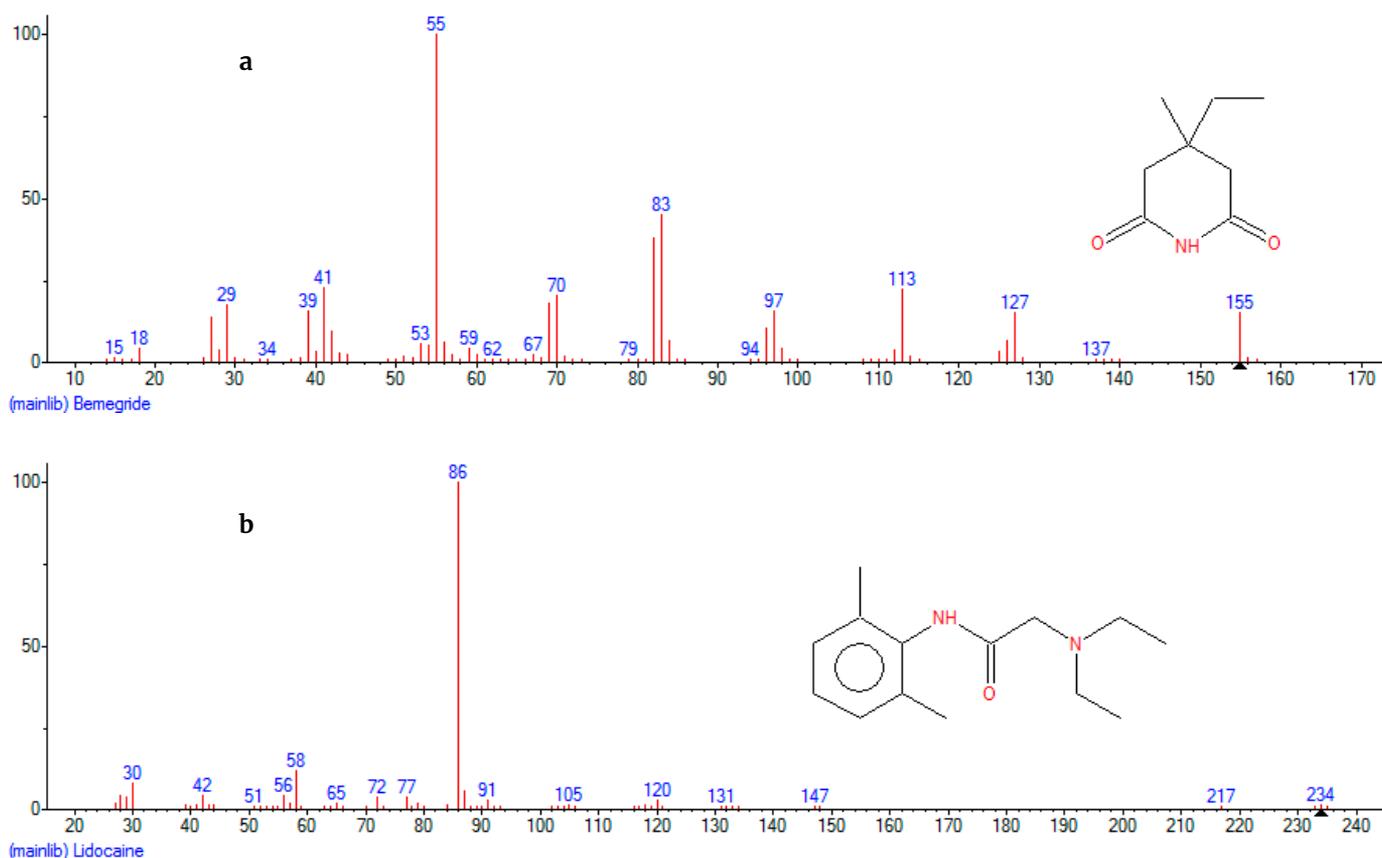


Figura 11. Espectros de massas de substâncias com número ímpar (a) e par (b).

4.2.6 SISTEMA DE BAIXA PRESSÃO (“VÁCUO”) DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS

Diferente do Cromatógrafo Gasoso, que trabalha numa pressão próxima daquela que se encontra na atmosfera (cerca de 760 Torr), o Espectrômetro de Massas trabalha sob baixa pressão (em torno de 10^{-5} Torr).

Tal requisito faz-se necessário não apenas pelo fato de que no interior do espectrômetro de massas há filamentos incandescentes e componentes metálicos submetidos a altas temperaturas e a diferenças de potenciais que, sob pressão atmosférica, poderiam ocasionar aumento da oxidação, além de descargas elétricas.

A necessidade de pressão reduzida relaciona-se também a um parâmetro denominado livre percurso médio, que pode ser entendido como o caminho percorrido por um fragmento gerado na fonte de íons sem que este colida com vapores, gases ou outro elemento que faça parte da “atmosfera” do interior do espectrômetro.

Assim, a diminuição da quantidade de matéria no interior do espectrômetro de massas também se encontra relacionada à minimização de possíveis reações entre os íons formados e espécies reativas como, por exemplo, oxigênio e água; também está relacionada à minimização de ionização de gases e vapores na fonte de íons que poderiam aumentar o sinal de ruído de fundo. Em ambos os casos, a consequência direta seria a diminuição de sensibilidade.

Para manter o espectrômetro de massas sob baixa pressão, são necessárias duas bombas.

A primeira delas, denominada de bomba de pré-vácuo ou mecânica, situa-se fora do espectrômetro e é responsável pela geração de pressão suficientemente baixa para que a segunda bomba possa atuar. Ela é dotada de pás que se removem matéria do sistema e a mistura em óleo dotado de propriedades físico-químicas adequadas para este tipo de uso (*Inhland 45*).

Já a segunda bomba de baixa pressão encontra-se no interior do espectrômetro, não possui óleo e é responsável por reduzir ainda mais a pressão proporcionada pela bomba mecânica. Seu funcionamento está baseado num sistema de pás fixas ao seu corpo e um eixo central dotado de pás cujo movimento rotacional faz com que a matéria do interior do espectrômetro seja capturada e movimentada para regiões cada vez mais inferiores da bomba até que esta seja enviada para uma saída que apresenta conexão com a bomba mecânica.

Por conta desta necessidade de baixa pressão associada à limitação de remoção de matéria do “sistema de vácuo”, o espectrômetro de massas, diferentemente de outros detectores associados à Cromatografia Gasosa, apresenta uma limitação em termos de fluxos de trabalho aplicados à coluna cromatográfica, que não devem ultrapassar 2,0 mL/min.

Além disso, para que a pressão no interior do MS permaneça constante, o ideal é que o cromatógrafo gasoso seja ajustado para trabalhar em regime de fluxo constante.

4.3 O TUNING E SUA IMPORTÂNCIA PARA O EXAME TOXICOLÓGICO POR GC-MS

Conforme o sistema GC-MS é usado, seus componentes internos invariavelmente acabam sendo impregnados por sujidades, quer seja por injeções de amostras de alta concentração ou pelo número de amostras analisadas, e com isso o desempenho do equipamento pode ser comprometido.

Uma das formas de contornar tal problema seria a limpeza do sistema, toda vez que este fosse diagnosticado abaixo do desempenho ideal.

Contudo, na prática, este tipo abordagem torna-se desaconselhada uma vez que para a limpeza da fonte de íons é necessário abrir o espectrômetro de massas e tal procedimento implica em manter o equipamento inoperante durante algumas horas.

Além disso, o risco de ser gerada uma entrada de ar ou ainda de dani-ficação de algum dos componentes da fonte de íons será proporcional ao número de intervenções no sistema.

Para solucionar estas possíveis situações realiza-se um procedimento denominado *Tune*, no qual, ocorre a correção de pequenos desvios de calibração ocasionados, sobretudo pela impregnação de sujidades no espectrômetro de massas.

Por meio do *Tune* é possível também a realização de avaliação do sistema GC-MS quanto à presença de entradas de ar e/ou umidade ou ainda sujidades presentes em fonte de íons.

Durante a execução desta calibração ocorrem ajustes dos seguintes componentes e parâmetros:

- Diferenças de potencial aplicadas ao *repeller* e lentes da fonte de íons
- Diferença de potencial aplicada à eletromultiplicadora
- Correção de largura de pico
- Correção de Assinatura (eixo) de Massas

Para tanto, durante este procedimento, é utilizado o Perfluortributylamina (PFTBA), um agente de calibração composto apenas por Nitrogênio, Flúor e Carbono.

Durante o procedimento de *Tune*, ocorre a liberação da entrada deste calibrador para a fonte de íons e nesta, ele é ionizado e fragmentado.

Nos tipos mais utilizados de *Tune*, são monitorados basicamente três fragmentos, com razões massa-carga de 69, 219 e 502, que são monitorados para os ajustes que ocorrem ao longo do processo de calibração.

Dentre tais processos destacam-se o estabelecimento entre os potenciais aplicados ao quadrupolo (RF e DC), as diferenças de potenciais aplicadas aos elementos da fonte de íons (*repeller*, *drawout*, *ion focus*, *entrance lenses*) e à multiplicadora de elétrons, além do ajuste dos picos referentes a cada um dos fragmentos supracitados.

Uma vez que os estes potenciais e os demais parâmetros de *Tune* tenham sido estabelecidos, é feita uma extrapolação desses. Como resultado, é gerada uma reta denominada linha de *Scan*, que correlaciona os potenciais DC e RF aplicados ao quadrupolo, com a estabilização de m/z ao longo de uma faixa que vai de 1.6 até 1050 u.m.a.

O coeficiente angular e o linear desta curva, denominados, respectivamente, *AMU Gain* e *AMU Offset*, estão relacionados à largura dos picos relativos à detecção dos fragmentos produzidos tanto durante o processo de calibração como na análise de dados. Contudo, ressalta-se o fato de que as alterações do coeficiente angular afetam com maior intensidade as massas mais altas do que aquelas de baixo valor, enquanto as alterações afetam todas as razões massa carga de maneira semelhante.

Quanto maior forem os valores destes parâmetros, menor será a largura de picos e assim, melhor será a resolução de m/z efetuada pelo quadrupolo (discriminação entre razões massa-carga próximas). Do contrário, quanto menor forem os valores deste parâmetro, maior será a largura de picos e menor será a resolução entre m/z vizinhas.

Outro ponto a ser destacado é a relação inversa entre resolução e sensibilidade: quanto maior for a resolução entre fragmentos vizinhos, menor será a sensibilidade para uma dada m/z .

Existem diferentes tipos de *Tunes*, dos quais, os mais usuais são:

- *Auto TUNE*
- *Standard TUNE*
- *Gain TUNE*
- *Manual TUNE*

Embora todos estes tipos de *Tune* apresentem basicamente as mesmas funcionalidades e gerem relatórios muito semelhantes, há particularidades que devem ser levadas em conta quando da escolha de um ou outro tipo de *Tune*.

O objetivo do *AutoTune* é a otimização do sistema como um todo, de tal forma que o equipamento o mais esteja sensível para todas as m/z de forma igualitária.

Já no *Standard Tune*, há uma tendência ao aumento de sensibilidade para a m/z 502, que terá como resultado o aumento da sensibilidade do equipamento para m/z altas.

Além disso, este tipo de calibração utiliza outras três massas (50, 131 e 414); também possui em seu algoritmo metas mais restritivas do que aquelas que são usadas no *AutoTune*.

Por exemplo, enquanto a meta do *Standard Tune* é alcançar uma proporção de 2,5 % do fragmento com $m/z = 502$ em relação àquele de $m/z = 69$, para o *AutoTune* basta que a proporção da $m/z 502$ em relação à $m/z = 69$ seja maior do que 3%.

Com isso, o *Standard Tune* é uma calibração que torna o desempenho do equipamento mais constante e pode ser usado para comparar a performance de dois ou mais instrumentos.

Para a calibração do sistema via *Gain Tune* (no qual o equipamento é ajustado de tal forma a exibir alta sensibilidade a custo de aumento do potencial aplicado à multiplicadora de elétrons), o sistema será otimizado pelo procedimento de *AutoTune*.

Contudo, são gerados dois arquivos de *Tune*: um arquivo de *Tune* semelhante ao *AutoTune* e outro, denominado *HiSense*, sendo que o primeiro estará já ajustado para um ganho de 1 (1×10^5), enquanto o segundo ajustará o sistema para um ganho de 15 (15×10^5).

Já o *Manual Tune* é utilizado, em geral, como ferramenta de diagnóstico. Com ele, é possível monitorar massas, diferentes das habituais, com o propósito de detectar entradas de ar para o interior do espectrômetro ou, ainda, realizar procedimentos de diagnóstico específicos.

Também pode ser utilizado para otimizar os parâmetros de determinado tipo de *Tune*.

Ao final de cada *Tune* é gerado um relatório que informa todos os valores atuais de diferenças de potencial aplicadas aos elementos da fonte de íons, à fonte de ionização, além de parâmetros relacionados a proporção isotópica de m/z utilizadas durante este procedimento.

Além disso, por meio do relatório de *Tune*, é possível diagnosticar entradas de ar, além de impregnação de sujidades da fonte de íons.

4.4 MANUTENÇÃO DO GC-MS UTILIZADO NA ANÁLISE DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

A partir da instalação do equipamento, a realização de análises leva ao desgaste natural, bem como à impregnação de matéria no sistema GC-MS, principalmente nos exames toxicológicos em amostras biológicas.

O preparo de amostras pode, se for bem elaborado, diminuir a “sujeira” do GC-MS, mas nunca será capaz de eliminar por completo, dada a complexidade das amostras biológicas, principalmente as *post mortem* como vísceras e conteúdo gástrico.

O primeiro ocorre, sobretudo, em partes denominadas consumíveis, que nada mais são do que componentes do sistema susceptíveis a uma maior deterioração. Já a segunda, pode ocorrer em diferentes partes do sistema. Em ambos os casos, o equipamento estará fora daquele que seria seu ponto ótimo de desempenho. Salienta-se que tal desvio da normalidade é cumulativo ao longo do tempo.

Contudo, é de fundamental importância a garantia de que o sistema esteja em pleno funcionamento antes mesmo do início das atividades analíticas, pois, dessa forma, é possível a minimização de ocorrências de resultados tanto falso positivos como negativos e assim, atribuir maior confiabilidade aos resultados obtidos e conseqüentemente, menores possibilidade de contestação destes últimos.

Assim, pode-se colocar a estabilidade operacional do equipamento no mesmo rol de outros parâmetros decisivos para a realização de uma análise confiável, como o preparo de amostra e da utilização de métodos devidamente desenvolvidos para uma dada aplicação.

Com o propósito de restaurar o sistema até um ponto em que este se encontre o mais livre possível de interferentes externos (por exemplo, entradas de ar e sujidades), são realizadas uma série de ações genericamente denominadas de manutenções preventivas. Na Tabela 6 encontram-se as principais intervenções tipicamente realizadas no GC-MS 5975-C.

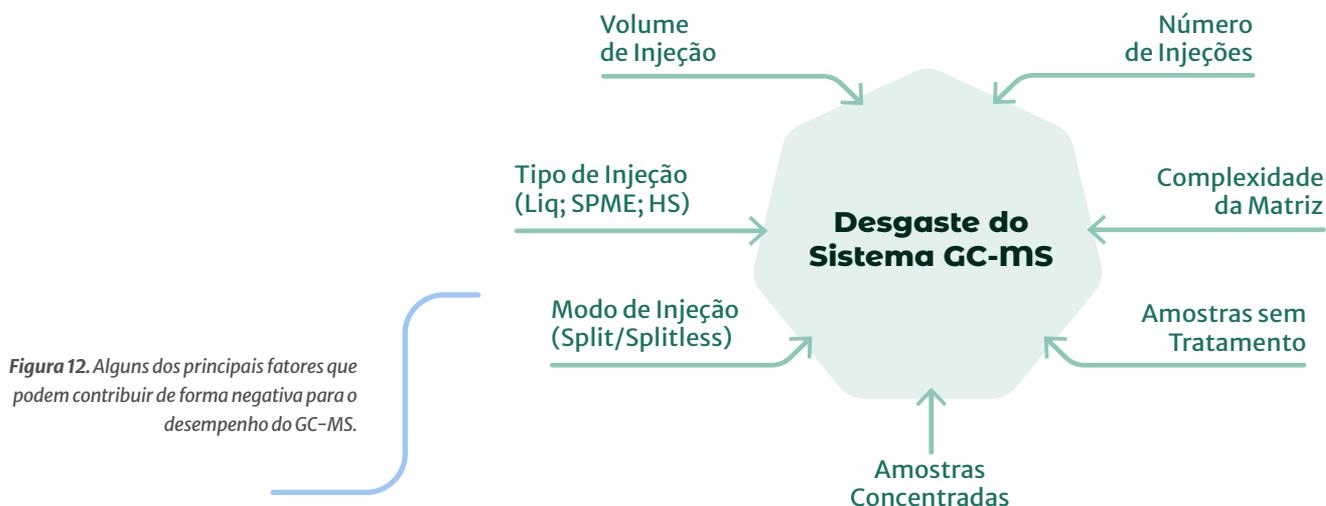
TABELA 6 - AÇÕES CORRETIVAS NAS REGIÕES MAIS CRÍTICAS DO GC-MS-5975

Sistema	Região Específica	Atividade	Frequência
Hardware: Vácuo	Bomba Mecânica	Verificação/Troca do Óleo	Semanal/Semestral
Hardware: GC	Inlet	Troca de Septo	Quando necessário
		Troca do Liner	Quando necessário
		Troca/Limpeza do Selo Dourado	Quando necessário
		Verificação/Troca do Washer	Quando necessário
		Troca da Anilha do Inlet	Quando necessário

Sistema	Região Específica	Atividade	Frequência
		Verificação/Troca da Porca do Inlet	Quando necessário
	Forno	Corte/Troca da Coluna	Quando necessário
		Verificação/Troca da Porca da Interface	Quando necessário
		Verificação/Troca da Anilha da Interface	Quando necessário
		Troca do Filtro da Purga do Split Vent	Anual
MS	Fonte de Íons	Limpeza da Fonte de Íons	Quando necessário
		Troca de Filamentos	Quando necessário
		Verificação/Carregamento do PFTBA	Quando necessário
Software: Tune			Semanal*
Software: Backup de Dados			Semestral
Software: Desfragmentação de Disco			Semestral

** Este valor refere-se a uma estimativa para análise qualitativa, uma vez que após a realização de um Tune, os métodos quantitativos que dele se valem devem ter suas curvas de calibração refeitas.*

Podemos verificar que a maioria das intervenções é de periodicidade variável, bastante razoável, dado os fatores que levam o equipamento ao desgaste e/ou à impregnação de sujidades (Figura 12).



Cabe salientar que para grandes intervenções no equipamento, como, por exemplo: limpeza da fonte de íons e troca do óleo da bomba mecânica, é necessário não apenas desligar o sistema por completo, como também equalizar a pressão do MS com a pressão atmosférica.

Nestes casos, para que haja um ponto de comparação entre os dois estados do sistema antes e depois da intervenção, é prudente a realização de um *Tune*.

4.5 EDIÇÃO DE MÉTODOS PARA GC-MS

Quando falamos em desenvolvimento de métodos instrumentalizados, independente da técnica de análise, o primeiro tópico geralmente considerado é relativo aos parâmetros instrumentais. Contudo, uma série de outros questionamentos devem ser feita antes de se passar para a elaboração do método em si.

Os cuidados com a manutenção do equipamento, a validação do método, passando por etapas como o preparo de amostras, criação de bibliotecas e a escolha de abordagem para tratamento de dados podem ser tão relevantes quanto a escolha dos parâmetros dos métodos de análise (Figura 13).



Figura 13. Etapas Coadjuvantes ao Desenvolvimento de Método.

Assim, salienta-se que as particularidades do analito que se deseja qualificar ou quantificar podem ser tais que, os métodos comumente utilizados por um analista, podem não ser úteis.

Dessa maneira, para a introdução de novos analitos à rotina de análise, é sempre necessário saber se os métodos utilizados por um dado laboratório serão os mais interessantes para sua detecção ou quantificação ou, ainda, se haverá a necessidade de se recorrer a fontes de auxílio para abordar tal problema (Figura 14).

Nas próximas linhas, serão discutidos detalhes sobre o desenvolvimento dos métodos para a aquisição de dados.

4.5.1 SOBRE DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA TOXICOLOGIA FORENSE

Uma abordagem possível para o desenvolvimento de um método em geral inicia-se com duas indagações iniciais: uma relativa ao conjunto analito/amostra e outra relativa à finalidade do método.

Em relação à primeira questão, deve-se ter em mente, mesmo que de uma forma aproximada:

- que tipo(s) de analito(s) é (são) o(s) alvo(s) da análise (se a molécula é conhecida ou desconhecida, certamente ou potencialmente presente na amostra, dentre outros).
- complexidade da matriz.
- qual a provável concentração do analito na amostra.

MÉTODO X AMOSTRA

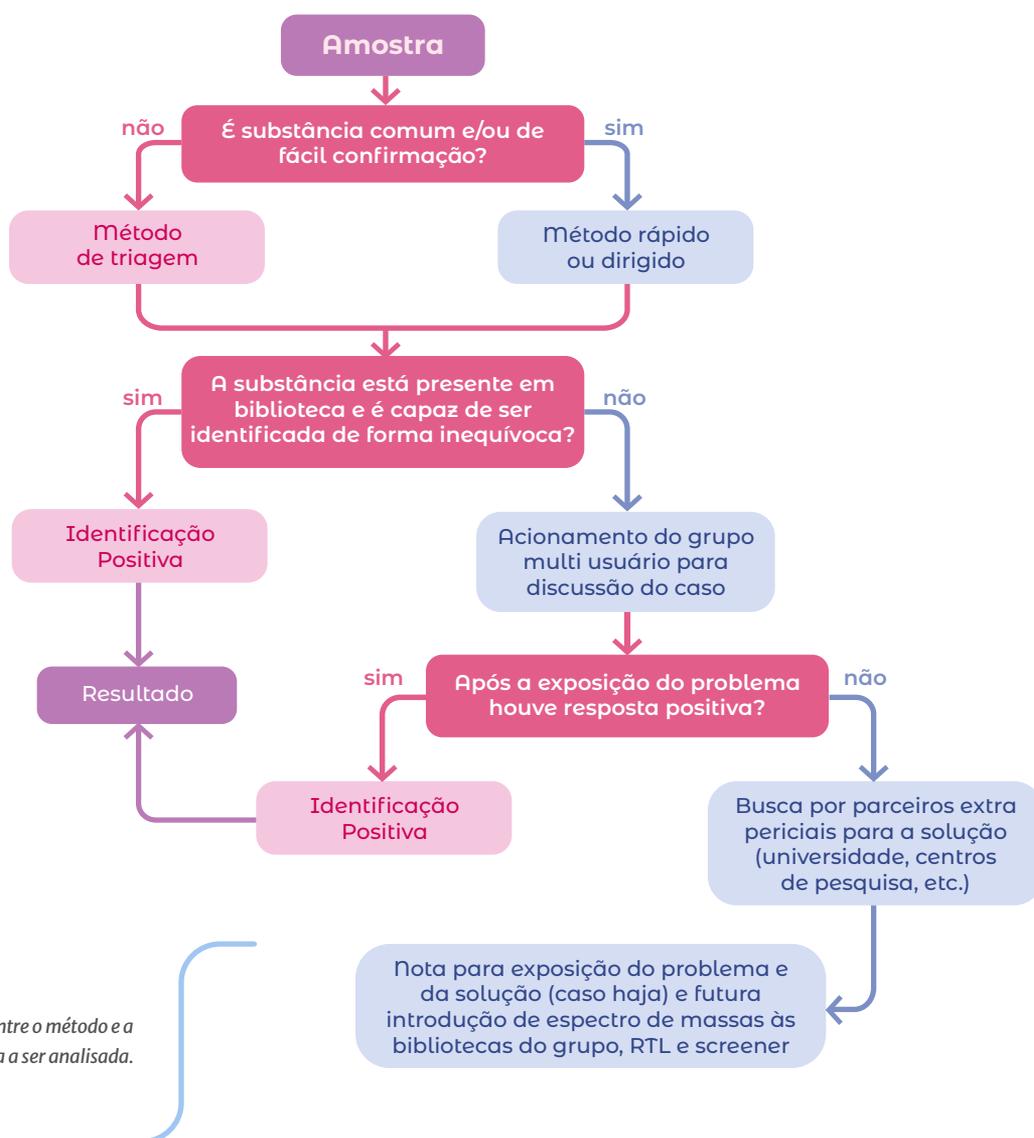


Figura 14. Correlação entre o método e a amostra a ser analisada.

Já a segunda questão refere-se ao tipo de análise que se pretende realizar (qualitativa e/ou quantitativa).

Tais informações são fundamentais para a escolha, por exemplo, do método de injeção da amostra (líquida, *headspace* ou SPME), da configuração do *inlet* (*split* ou *splitless*), do formato do cromatógrafo, do modo de aquisição dos dados (SIM, SCAN, ou SIM/SCAN), dentre outros.

Uma vez respondidas estas questões, pode-se passar para a fase de configuração do GC-MS, feita basicamente de duas formas: direcionada para a região na qual se pretende realizar algum tipo de alteração (ex: mudanças apenas nos parâmetros do cromatógrafo), ou ainda uma edição de métodos completa.

Caso a injeção seja feita pelo amostrador CTC, é recomendável que antes da edição do método seja feita a instalação da seringa correspondente ao método de injeção (líquida, *headspace* ou SPME).

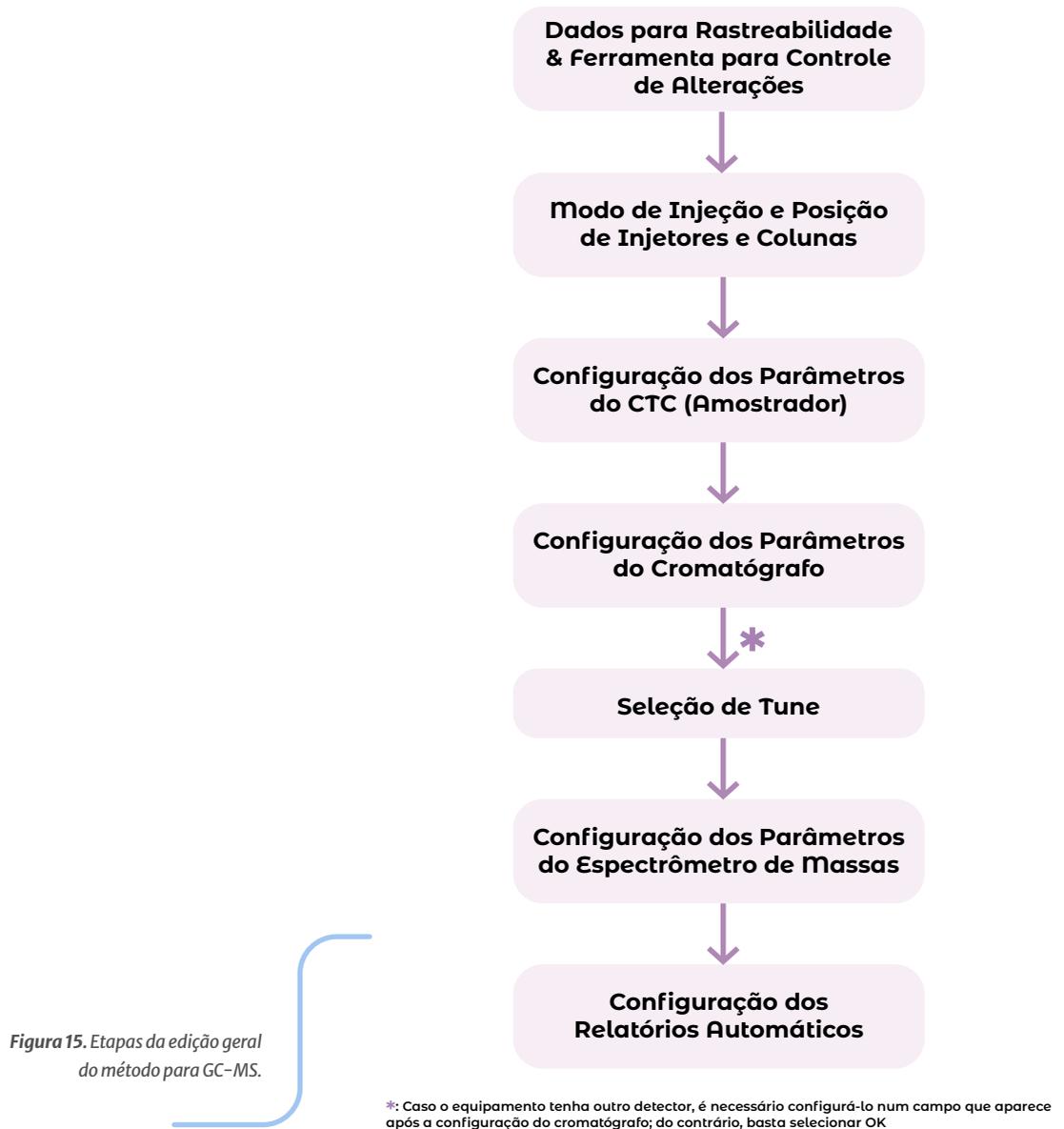
Em relação ao primeiro campo de edição, é facultada a colocação dos dados referentes a informações sobre o método e/ou salvar cópia dos métodos no interior de arquivos de dados.

Já os parâmetros do segundo grupo, basicamente relacionam-se às configurações gerais do equipamento (posicionamento de *inlets* e modos de introdução de amostra neste último (injeção manual ou via amostrador automático).

Em seguida são configurados, caso seja utilizado, os parâmetros de injeção do CTC.

Após esta etapa, serão configurados todos os parâmetros referentes ao cromatógrafo, incluindo a temperatura da interface com o espectrômetro de massas. Depois deste, é a vez da seleção de *Tune* que será associado ao método e em seguida é realizada a configuração do espectrômetro de massas.

Por fim, se necessário, serão configurados os relatórios automáticos. A Figura 15 sintetiza os passos de edição do método para GC-MS.



Caso as informações sobre a amostra sejam incertas ou mesmo totalmente desconhecidas, o que em geral ocorre com frequência em análises forenses, recomenda-se, com os propósitos de salvaguardar o equipamento e ter segurança analítica do resultado, as seguintes ações:

- Utilizar o menor volume possível de amostra injetada.
- Preparar amostras cuja concentração não ultrapasse 200 ppm para injeção no modo *Split*, para minimizar risco de contaminação. Para métodos *splitless*, procura-se trabalhar com concentrações com, pelo menos, uma ordem de grandeza a menos.

- Para métodos *Split*, iniciar os trabalhos por meio de uma análise exploratória com alta taxa de *Split* (ex: 100:1); para métodos *Splitless*, a solução é diminuir o volume de amostra ou diminuir a concentrações da amostra.
- Caso a análise seja referente a traços, sugere-se o uso de análise do tipo *Splitless* com *liner* sem lâ de vidro (minimização do risco de formação de pontos ativos).
- Em relação à programação de forno do cromatógrafo, considerando uma análise exploratória, recomenda-se o uso da fórmula: $TFM = TCM - 15^{\circ}C$, em que TFM e TCM correspondem, nessa ordem, à temperatura máxima atingida pelo forno do cromatógrafo durante o método e a temperatura máxima a qual pode ser submetida a coluna cromatográfica. Como rampa de aquecimento, valores entre 10 e 20°C são os mais usuais.
- Em termos de configuração da interface, as temperaturas usuais são sempre próximas da temperatura do *inlet*; do contrário poderá ocorrer ou degradação (temperaturas mais altas do que a do *inlet*) dos analitos ou condensação destes na interface (temperaturas mais baixas do que a do *inlet*).
- Sobre a configuração do espectrômetro, é aconselhável o uso de método no modo *Scan* para análise de compostos desconhecidos ou que necessitem de confirmação feita com base no espectro de massas. Para análise de traços é recomendado o incremento da voltagem na eletromultiplicadora ou ainda a normalização do ganho.
- Ainda em relação ao espectrômetro, é necessário ter em mente a importância de parâmetros do modo SIM, tais como: resolução e *Dwell Time* e no modo *Scan*: faixa de massas, amostragem e ponto de corte.
- Em relação à análise de dados, recomenda-se, quando possível, a atualização das bases de dados. Uma fonte interessante é o site do organismo SWGDRUG.

4.6 TRATAMENTO DE DADOS PARA ANÁLISE QUALITATIVA

A análise por GC-MS é considerada como uma técnica de referência para a caracterização da estrutura química de um dado analito.

É importante salientar que, por conta do processo de aquisição dos dados, o espectro de massas resultante quase nunca representa apenas o(s) fragmento(s) do(s) analito(s) de interesse. Há uma série de interferentes em potencial que podem trazer acréscimos ao sinal, causando dúvida e má interpretação do resultado.

Para diminuir os erros de interpretação causados por sinais oriundos de interferentes, existem alguns procedimentos destinados à “limpeza” ou purificação do espectro obtido.

O resultado final da análise será baseado na devida comparação entre espectros de massas, bem como nos tempos de retenção do material de referência com aqueles provenientes do(s) analito(s) estudado(s).

4.6.1 GC-MS COMO TÉCNICA DE REFERÊNCIA PARA ANÁLISE QUALITATIVA

A combinação entre as técnicas de Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massas teve início na década de 1950 e, desde então, tem sido amplamente estudada e desenvolvida.

Da Cromatografia Gasosa temos a contribuição não apenas da sua capacidade de separação, como também, da repetibilidade dos tempos de retenção de compostos analisados.

Já da espectrometria de massas, observamos a relação entre estrutura química e perfil de fragmentação, que pode ser armazenada em base de dados e utilizada posteriormente como fonte de pesquisa.

Por conta da estabilidade ao longo do tempo, tanto das informações cromatográficas como das oriundas da espectrometria de massas, a combinação de ambas as técnicas é considerada, por diferentes grupos relacionados à Análise Química, como uma técnica Padrão Ouro na análise qualitativa de um dado analito.

4.6.2 SOBRE AS INFORMAÇÕES ESPECTRAIS

Um erro muito comum é associar um espectro de massas bruto, isto é, aquele que aparece imediatamente no ambiente destinado à análise de dados no GC-MS-5975 e uma estrutura recuperada a partir de uma base de dados.

Isso porque, durante a aquisição dos espectros, não apenas os íons provenientes do analito, que deixam a coluna cromatográfica e chegam ao espectrômetro de massas, são observados.

Na maior parte das situações com a qual um analista de GC-MS se deparará, o perfil de fragmentação associado a um dado composto é, na verdade, a composição do sinal do analito, além de sinais que podem ser provenientes de diferentes fontes de interferência, conforme se verifica na Figura 16.

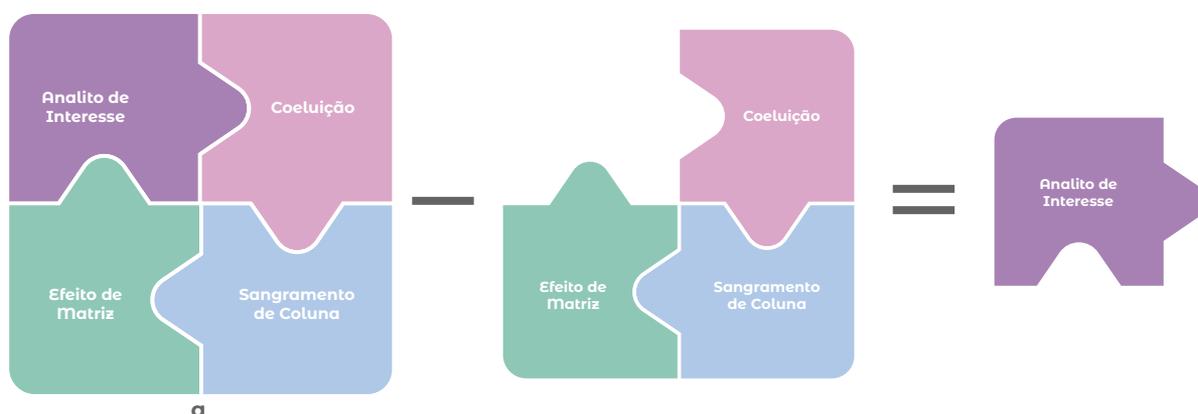
A saída mais imediata para resolver este tipo de problema seria a alteração de parâmetros cromatográficos com o propósito de resolver coeluição entre analitos de interesse e interferentes.

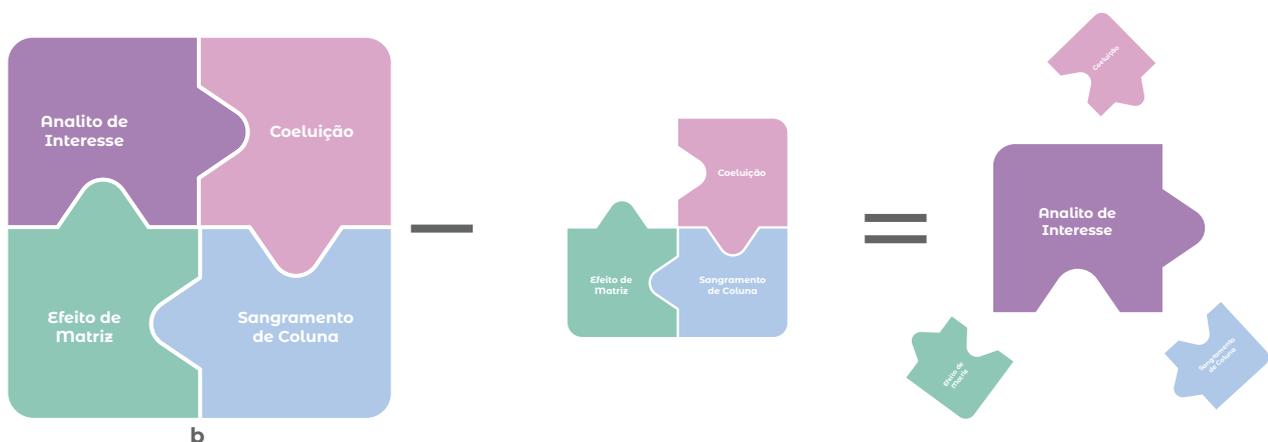
Figura 16. Composição do espectro de massas: em geral, o espectro observado é uma combinação de sinais, constituído por fragmentos pertencentes ao analito de interesse e por interferentes que podem fazer parte da matriz, sangramento de coluna, ou ainda a coeluição de um ou mais analitos.



Contudo, na prática, nem sempre é viável a separação perfeita de analitos e interferentes, sobretudo quando a matriz é complexa e/ou o analito ocorre em baixa concentração na amostra. Há ainda a possibilidade de interesse em mais de um analito, fazendo com que o tempo para a plena resolução cromatográfica se torne muito além do disponível na rotina.

Pensando nestes problemas, muitas ferramentas de “purificação” ou pelo menos de minimização de interferência foram desenvolvidas para facilitar a comparação entre espectro questionado e referência, feita pelo analista (Figura 17).





b

Figura 17. A composição de um espectro de massas: o espectro obtido por GC-MS em geral é uma composição de fragmentos de diferentes origens (ex: analito, matriz, coeluição com dado interferente e sangramento da coluna cromatográfica). Há disponível no software do GC-MS-5975 diversas ferramentas para a observação do espectro puro do analito (a) ou pelo menos para minimizar o efeito dos interferentes na observação deste último (b).

Na Tabela 7 temos uma compilação das principais ferramentas disponíveis no GC-MS-5975-C para o tratamento dos espectros obtidos durante uma análise.

TABELA 7 - PRINCIPAIS FERRAMENTAS PARA TRATAMENTO DE ESPECTROS DE MASSAS DISPONÍVEIS NO GC-MS-5975-C

Localização	Ferramenta	Ação	Comentário
Data Analysis	Espectro Médio	Obtenção do espectro médio da região selecionada	Espectro em geral, mais homogêneo do que aqueles isolados; promove minimização de <i>Tilting</i>
	Subtração de espectro	Subtração entre dois conjuntos de espectros	Diminuição da interferência de ruído de fundo e alguns casos de coeluição
	Subtração de <i>background</i>	Subtrai um sinal selecionado pelo usuário ao longo de todo o TIC	Minimização da interferência do ruído de fundo
NIST11	AMDIS	Deconvolução e subtração de espectros	Minimiza a subjetividade do tratamento de dados

4.6.3 SOBRE A COMPARAÇÃO DE ESPECTROS DE MASSAS

Existem basicamente duas formas de comparação de espectros no GC-MS-5975-C: manual e automática (Figura 18).

Em conjunto com o GC-MS-5975-C, foram adquiridas uma base de dados para busca manual (livro do Maurer), além de diferentes bases de dados para serem utilizadas nos programas para tratamento de dados do sistema:

- Utilização do algoritmo PBM *Quick Search*, presente no *Data Analysis*.
- Utilização do programa *NIST Search*.
- Utilização do AMIDS.

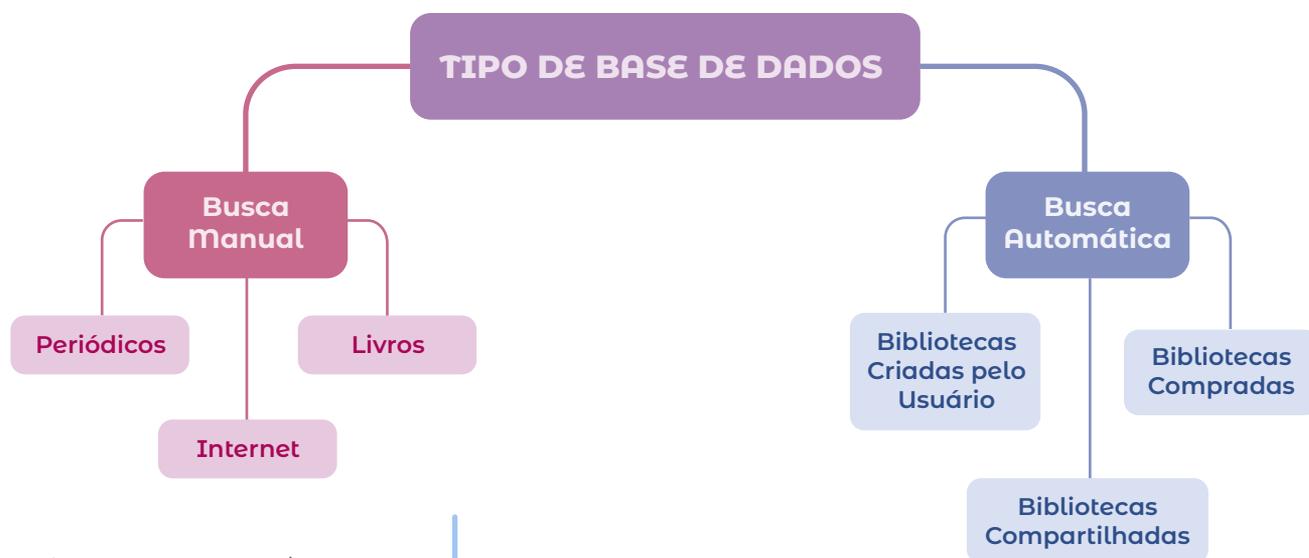


Figura 18. Bases de dados passíveis e utilização.

No primeiro método de comparação (manual), apesar de ter notória credibilidade, o processo pode se tornar muito demorado, uma vez que é feito manualmente.

Já a utilização do PBM *Quick Search* é um processo rápido e que ocorre totalmente no *software Data Analysis*. Com esta ferramenta é possível a realização de análise por diversos algoritmos de comparação em uma única etapa. Contudo, seus recursos visuais são limitados, tornando-o pouco atraente para o usuário (Figura 19).

Library Searched : C:\DATABASE\DEMO.L

Quality : 99

ID : Cocaine

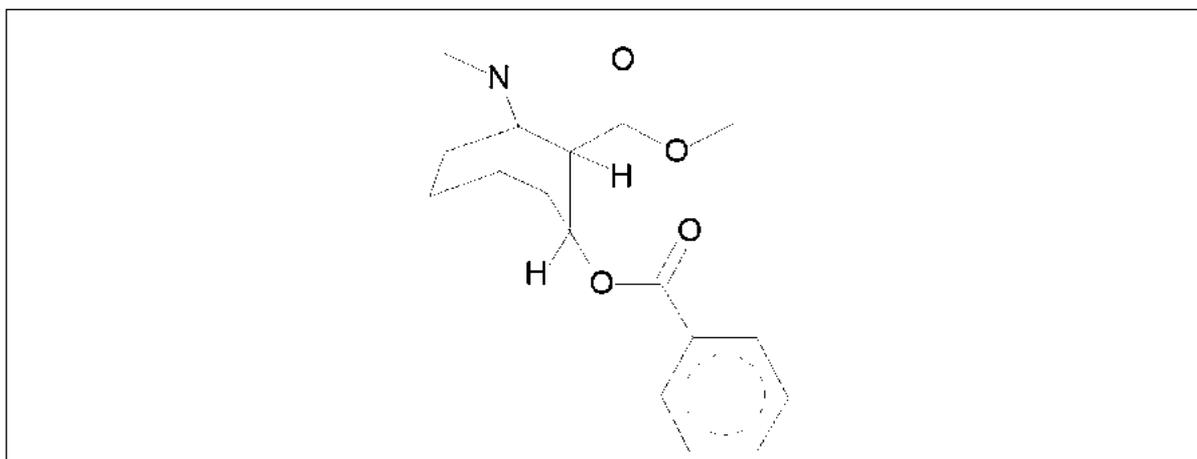
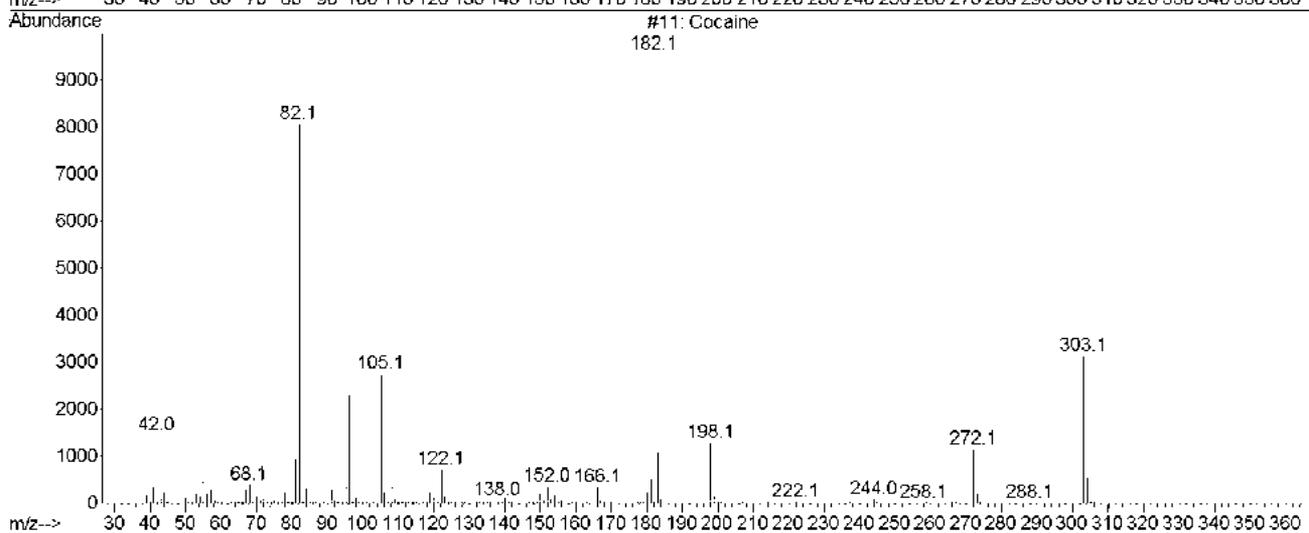
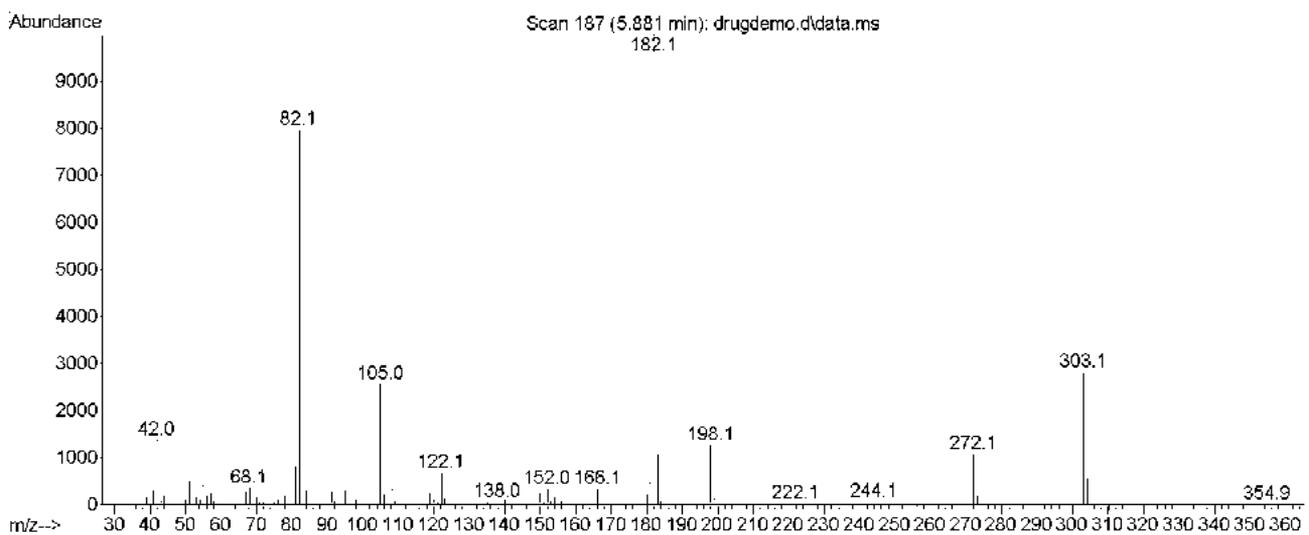


Figura 19. Relatório do PBM para pesquisa de apenas um analito: observar o espectro questionado (região superior), espectro de referência (inferior) e estrutura. Notar ainda a base de dados utilizada na pesquisa, além da similaridade obtida na pesquisa (canto superior esquerdo).

Em relação ao *NIST Search*, observa-se que a pesquisa, apesar de ser um pouco mais lenta quando comparada ao *PBM Quick Search*, apresenta, além das comparações por algoritmos, diferentes maneiras de análise visual de similaridade espectral (ex.: sobreposição de espectros e visualização na forma cabeça-cauda), além de informações adicionais associadas aos espectros que constam em suas bases de dados (ex.: espectro de referência é apresentado na base de dados, sinonímia, relação dos principais fragmentos tanto do espectro de referência como do analito de interesse, dentre outros).

Na Figura 20 temos a tela com algumas informações fornecidas pelo programa *NIST Search*.

Este programa oferece uma série de informações ao analista. Apesar disso, nenhuma delas deve ser observada isolada e dentre todo o aparato fornecido, a melhor das informações está relacionada à comparação visual entre o espectro do analito alvo e o espectro proposto (visualizados respectivamente nos campos **d1** e **d2**), seguido dos valores *Match* e *RMatch*.

O primeiro é uma comparação direta entre o espectro do analito de interesse e aqueles cadastrados na biblioteca alvo. Já o *RMatch* é a comparação entre os espectros da biblioteca com o espectro alvo (processo no sentido contrário ao do *Match*).

Além disso, no *RMatch*, os fragmentos do espectro questionado que não apresentam correspondência com aqueles presentes nos espectros de referência são considerados interferentes que coeluíram e não são levados em conta no cálculo de similaridade.

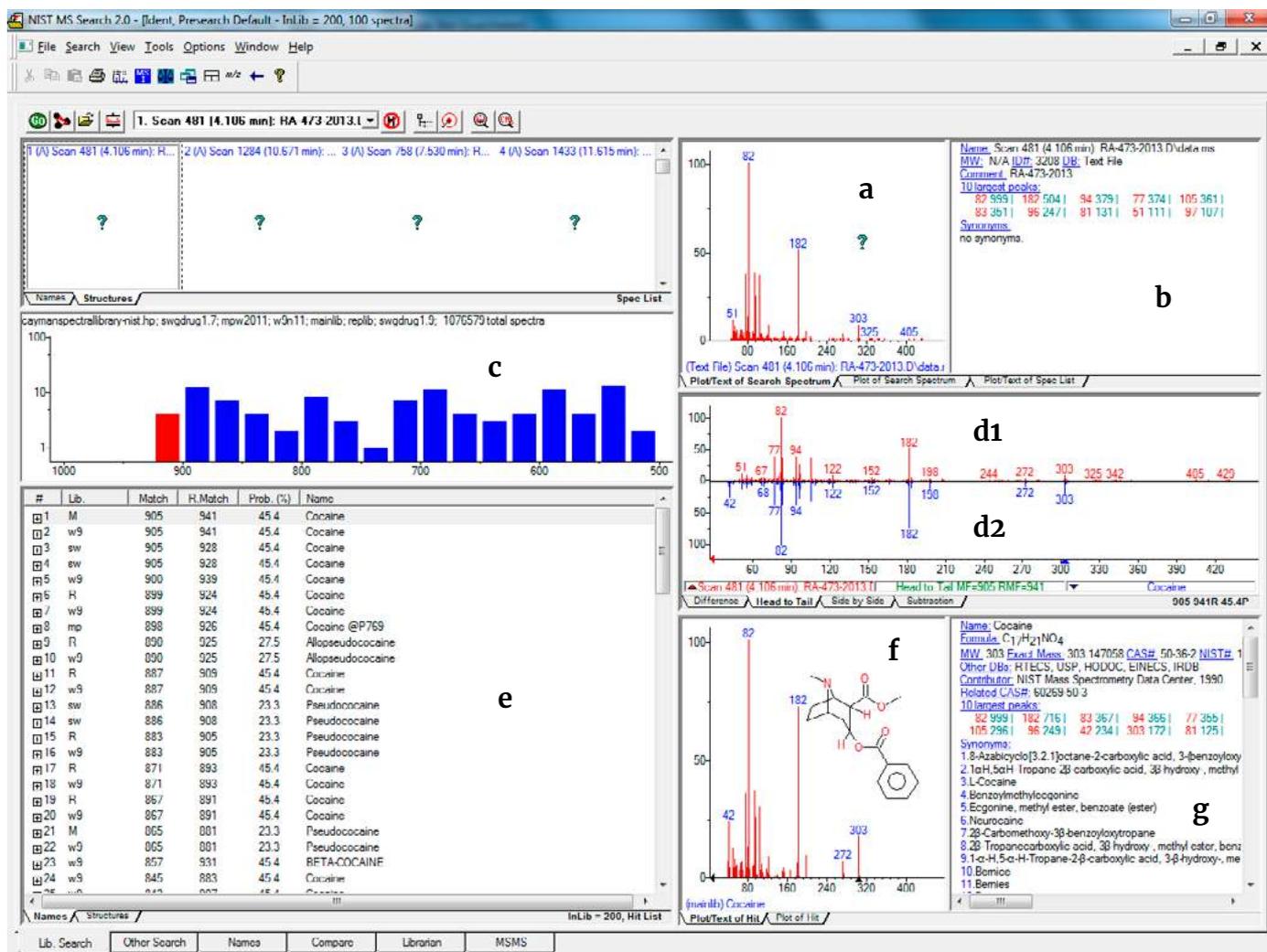


Figura 20. Tela Principal do NIST Search: a: espectro do analito questionado; b: dez m/z mais abundantes no espectro do analito-alvo; c: histograma utilizado na comparação espectral; d1: espectro do analito; d2: espectro da base de dados; e: lista das estruturas mais similares ao analito de interesse; f: provável estrutura química do analito; g: informações gerais sobre o provável analito.

Por fim, há o AMDIS, ferramenta desenvolvida pela NIST com o propósito de analisar analitos em níveis de concentração muito baixa (traços) em matrizes complexas.

Apesar de sua aparência simples e ainda pouco explorada em território nacional, esta ferramenta apresenta uma série de vantagens em relação às demais, como, por exemplo, o tratamento do espectro, por meio de processo chamado de deconvolução, por meio do qual é possível minimizar e, em alguns casos, resolver completamente, os problemas ocasionados pela coeluição de um analito de interesse com interferentes de matriz ou ainda a remoção de ruídos de linha de base que costumam interferir na aquisição de espectros de analitos em baixas concentrações (Figura 21).

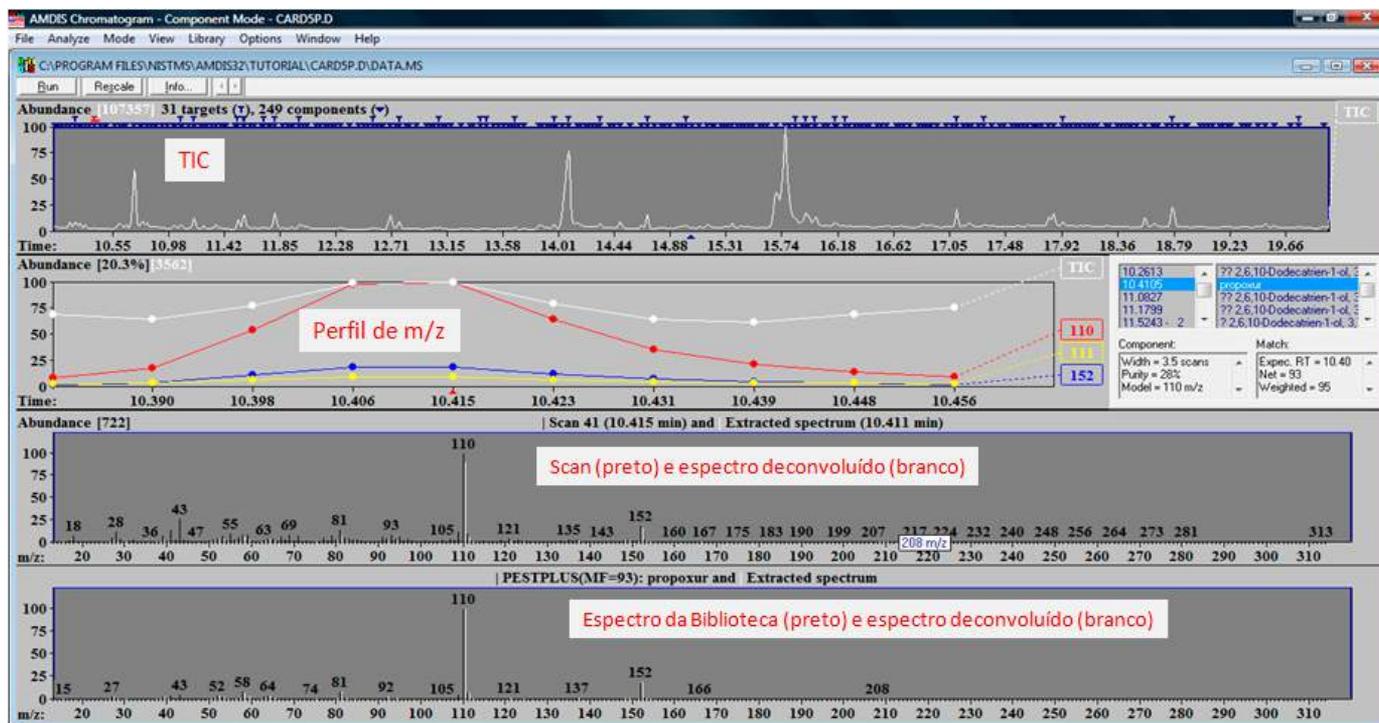


Figura 21. AMDIS: observamos quatro telas com diferentes informações relativas à análise, além de uma janela de resultados.

Salienta-se que, independente do programa utilizado na pesquisa automatizada, é possível, em qualquer um deles, que o usuário construa as suas próprias bases de dados. Apesar de ser um processo que pode ser moroso, tais bibliotecas apresentam como vantagem de serem elaboradas dentro das condições de trabalho do usuário.

Com isso, variáveis tais como: tipo de *Tune*, de analisador (quadrupolo, *Ion Trap*, setor magnético, etc.), condições do equipamento (tipo de *liner*, coluna, condições da limpeza da fonte de íons, método utilizado), e outros parâmetros que, em geral, são desconhecidos quando se adquire uma biblioteca de terceiros, podem ser controlados, dando a este tipo de base de dados uma maior confiabilidade do que as demais.

4.6.4 SOBRE A COMPARAÇÃO DE TEMPOS DE RETENÇÃO

Apesar da indiscutível importância do espectro de massas na identificação de um analito, esta, quando isolada, pode trazer erros de interpretação de resultados, sobretudo nos casos nos quais o perfil de fragmentação do composto de interesse apresenta baixa diversidade de fragmentos e/ou os fragmentos apresentam baixa m/z, que, por sua vez, apresenta baixa especificidade.

Nestas situações, a interpretação do dado pode levar o analista a concluir erroneamente que identificou uma substância controlada e/ou proscrita quando de fato esta não é (falso-positivo), ou vice-versa (falso-negativo).

Tomemos como exemplo dois espectros cadastrados na Biblioteca SWGDRUG, versão 1,7, que são apresentados na Figura 22.

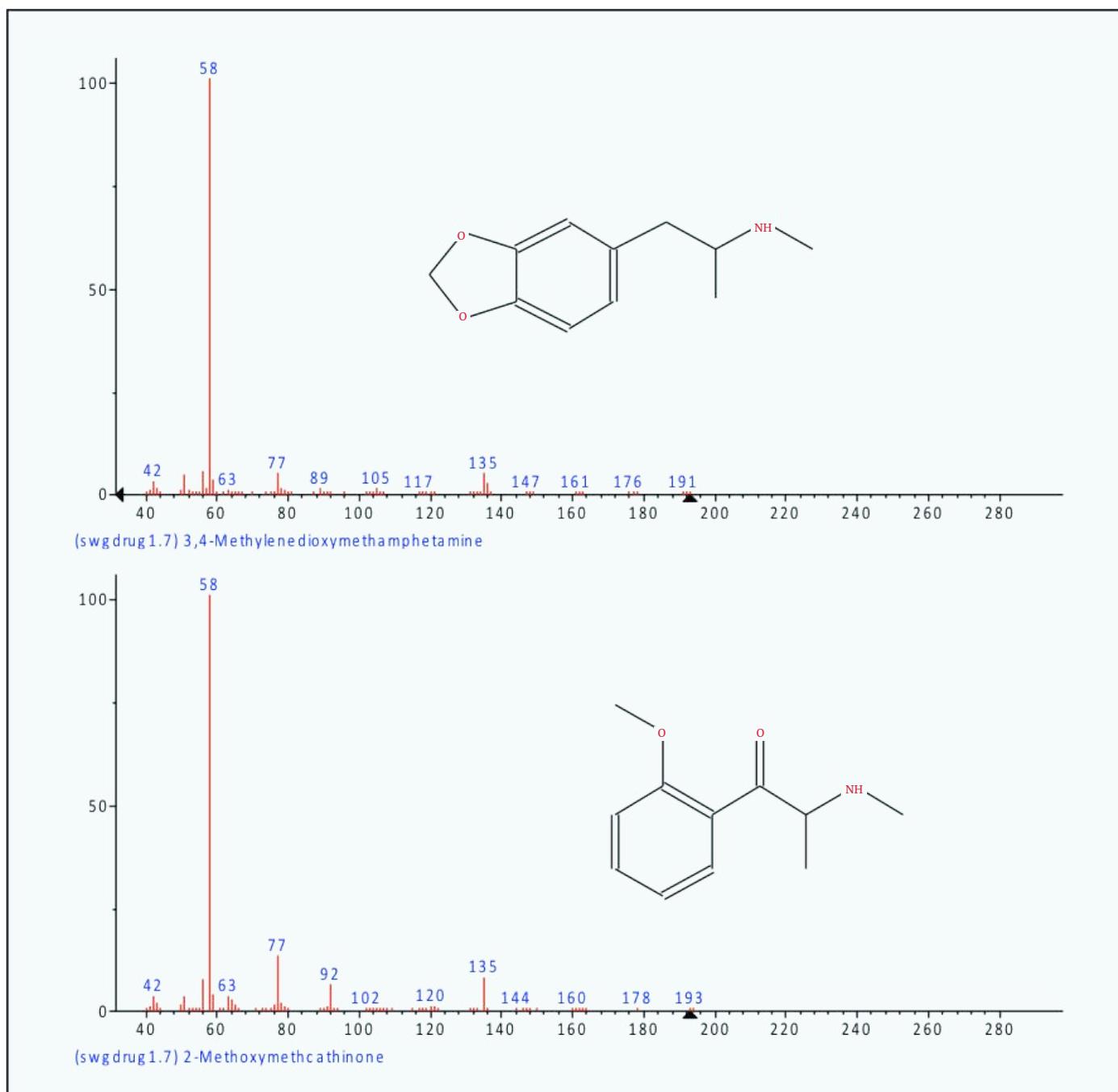


Figura 22. Dois espectros de isômeros. O espectro superior é do MDMA, substância explicitamente controlada pela portaria 344/98. O espectro inferior corresponde a uma catinona não listada.

O primeiro espectro corresponde ao MDMA, atualmente classificado como proscrito pela portaria 344/98 da ANVISA. Já no segundo caso, temos o espectro do 2-metoxi-methcathinona, que não aparece listada na portaria supramencionada.

Observando a figura acima, percebemos, sem dificuldades, que a similaridade dos dois espectros de referência é alta, já que os dois compostos apresentam características estruturais muito próximas (apresentam a mesma fórmula molecular ($C_{11}H_{15}NO_2$), o mesmo pico base, além de perfil de fragmentação muito semelhante).

Cabe aqui uma ressalva sobre a interpretação legal da portaria 344/98. Nesta, consta a redação de que não apenas as substâncias que constam na lista F, mas também seus isômeros serão proscritos.

No exemplo (Figura 19), estamos diante de um caso de isomeria, dois compostos que apresentam mesma fórmula molecular.

Contudo, utilizar apenas esta informação como fundamento para embasar uma identificação positiva pode ser altamente temerária, pois assim sendo, qualquer analito que apresente a fórmula $C_{11}H_{15}N_{02}$ poderia, em tese, ser enquadrado como proscrito, mesmo que não apresente qualquer relação com qualquer tipo de “droga de abuso”.

Assim, o mais provável quanto a intenção do uso do termo isomeria, foi salvaguardar o resultado analítico em relação à enantiomeria, e não ao caso genérico de isomeria. Além disso, mesmo que fosse utilizado este critério, o analito não estaria plenamente identificado, o que poderia causar contestações quanto à validade do laudo.

Diante do exposto, surge a necessidade de utilização de outros critérios para caracterização inequívoca da correta identidade de um analito de interesse pericial.



Em termos práticos de análise por GC-MS, a solução mais simples e amplamente aceita por organismos internacionais que se valem desta técnica é a comparação de tempos de retenção de padrões analíticos e dos analitos que se deseja caracterizar.

4.6.5 SOBRE OS RESULTADOS

Feita a comparação entre espectros e tempos de retenção de analitos e materiais de referência, espera-se que o analista tenha informações suficientes para concluir a análise por meio da emissão de resultado.

Como existem duas possibilidades (coincidência ou não coincidência) para cada um dos parâmetros analisados (tempo de retenção e comparação espectral), surgem quatro combinações de observações possíveis que, ao final, subsidiarão o resultado do analista (Tabela 8).

TABELA 8 - CRITÉRIOS PARA COMPARAÇÃO DE RESULTADOS DE GC-MS ENTRE PADRÕES E ANALITOS

Comparação entre Tempos de Retenção de Padrão de Referência e do Analito	Comparação Padrões de Fragmentação de Padrão de Referência e do Analito	Resultado
Diferentes	Diferentes	Negativo*
Coincidentes	Diferentes	Negativo*
Diferentes	Coincidentes	Negativo*
Coincidentes	Coincidentes	POSITIVO**

* Considerando que o equipamento está em condições ideais de funcionamento.

** Método validado e testado frente a possíveis interferentes que possam gerar resultados falso-positivos.

É importante frisar que as respostas supramencionadas partem do princípio de que o método foi devidamente validado, os materiais de referência são adequados e que o equipamento se encontra em condições básicas de uso.

4.7 IDENTIFICAÇÃO DE COCAÍNA EM URINA POR GC-MS

4.7.1 PROCEDIMENTO

1. Identificação dos tubos:

Usar tubos de centrífuga de 10 mL e identificá-los com o número do laudo.

2. Preparo das amostras:

- Pipetar 2 mL de urina em um tubo de centrífuga de 10 mL.
- Acrescentar 30 µL de cocaína D3 10 µg/mL.
- Adicionar 0,6g de cloreto de sódio.
- Agitar vigorosamente por 1 minuto (vórtex).

- Adicionar 1,5 mL de tampão fosfato pH7.
- Acrescentar 4 mL de clorofórmio: etanol (8:2);
- Agitar por 30 minutos em homogeneizador orbital.
- Centrifugar a 2000 rpm por 10 minutos (Programa 1).
- Adicionar 0,5g de sulfato de sódio em um béquer de 5 a 10 mL.
- Após a centrifugação, levar o frasco para a capela química e recolher a fase orgânica (inferior) com o auxílio da pipeta Pasteur.
- Transferir a fase orgânica para o béquer com sulfato de sódio.
- Verificar se a fase orgânica encontra-se livre de água e, caso afirmativo, transferir a fase orgânica para outro béquer, devidamente identificado.
- Concentrar a amostra reduzindo seu volume em banho-seco a 40°C. Pode ser utilizado o gás nitrogênio (N₂) para concentrar a amostra.

3. Derivatização:

- Após a evaporação da amostra, ressuspender com aproximadamente 300 µL de clorofórmio: etanol (8:2).
- Transferir para um vial de 2 mL.
- Evaporar até a secura em banho-seco a 40°C ou evaporar com N₂.
- Acrescentar 40 µL de BSTFA com 1% de TMCS.
- Colocar 20 minutos em banho seco a 80°C.
- Aguardar esfriar e injetar 1 µL no GC/MS de acordo com as condições do item 5.

4.7.2 MÉTODO CROMATOGRÁFICO

O método cromatográfico utilizado é o MULTIRESÍDUOS *FULL SCAN* (VARIAN CP-3800/SATURN 2200). Os seguintes parâmetros são relativos ao método:

a. Coluna cromatográfica:

Coluna do tipo 5MS 30 metros, 0,25 µm de diâmetro, 0,25 µm de filme.

b. Condições do cromatógrafo em fase gasosa:

Modo de injeção: *splitless*

Temperatura do injetor: 270°C

Fluxo de 1.0 mL/min – modo fluxo constante

Rampa: temperatura inicial de 140°C mantida por 1 minuto, sobe a 15°C/minuto até 280°C, essa temperatura final é mantida por 10 minutos.

Temperatura da linha de transferência: 250°C

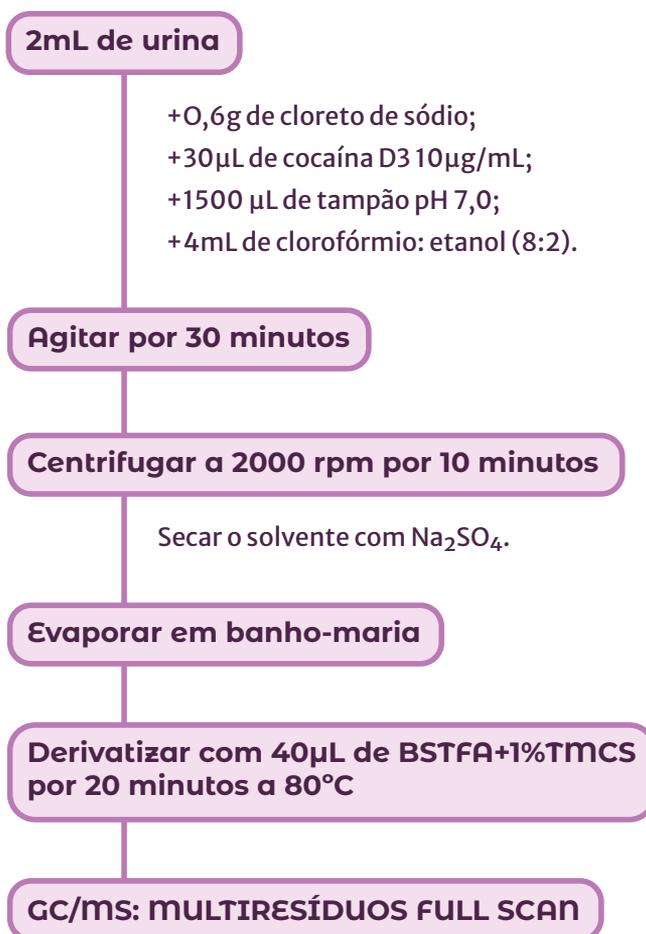
c. Condições do espectrômetro de massa:

Temperatura do *trap*: 180°C

Início da análise: 4 minutos

Scan: 40 -550m/z; Target TIC: 40000; Tempo de ionização no *pre scan*: 200ms

4.7.3 FLUXOGRAMA DA EXTRAÇÃO



4.8 QUANTIFICAÇÃO DE COCAÍNA E PRODUTOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO POR GC-MS EM SANGUE

4.8.1 PROCEDIMENTO

1. Identificação dos tubos

Usar tubos de centrifuga de 15 mL e identificá-los com o número da amostra correspondente, do branco e do adicionado (ou dos pontos de calibração).

2. Preparo da curva de calibração

TABELA 9 - PONTOS DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (COCAÍNA, COCAETILENO, EMA)

Pontos da curva	Concentrações	Volume	Padrão
1	10 ng/mL	5 µL	1 µg/mL
2	25 ng/mL	25 µL	1 µg/mL
3	50 ng/mL	5 µL	10 µg/mL
4	100 ng/mL	10 µL	10 µg/mL
5	250 ng/mL	25 µL	10 µg/mL
6	500 ng/mL	5 µL	100 µg/mL

| TABELA 10 - PONTOS DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (EME E BEG)

Pontos da curva	Concentrações	Volume	Padrão
1	100 ng/mL	10 µL	10 µg/mL
2	300 ng/mL	25 µL	10 µg/mL
3	500 ng/mL	5 µL	10 µg/mL
4	1000 ng/mL	10 µL	100 µg/mL
5	1400 ng/mL	15 µL	100 µg/mL
6	2000 ng/mL	20 µL	100 µg/mL

3. Desproteinização das amostras

- Pipetar 1 mL de sangue total em um tubo de centrífuga de 15 mL.
- Adicionar 6 mL de tampão pH 6,0.
- Acrescentar 10 µL de cocaína-D₃ 10 µg/mL e 20 µL de BEG-D₃ 10 µg/mL.
- Homogeneizar e sonicar por 15 minutos em temperatura ambiente.
- Centrifugar as amostras – PROGRAMA 2.

4. Recondicionamento dos cartuchos (no caso de cartuchos usados)

Os cartuchos de extração em fase sólida de fase mista de grupamento sulfônico e C18 com 200 mg / 3 mL devem ser recondicionados antes do uso, conforme procedimento abaixo:

- Adicionar ao cartucho 2 mL de metanol sob vácuo mínimo (cuidado para não secar o cartucho).
- Adicionar 2 mL de ácido clorídrico 1%, depois mais 2 mL de ácido clorídrico 1% (totalizando 4 mL).
- Secar em vácuo máximo por 2 minutos.

5. Condicionamento dos cartuchos de SPE

- Montar o sistema de manifold a vácuo com a quantidade de cartuchos necessária.
- Adicionar ao cartucho 2 mL de metanol.
- Adicionar 2 mL do tampão fosfato pH 6,0.
- **Atenção: não deixar os cartuchos secarem nessa etapa. Caso o cartucho seque, repetir etapa de condicionamento.**

6. Aplicação das amostras

- Aplicar todo o sobrenadante das amostras centrifugadas no passo 4.3, sob vácuo mínimo.
- A aplicação de material depositado no fundo dos tubos causará o entupimento dos cartuchos.

7. Aplicação das amostras

- Aplicar todo o sobrenadante das amostras centrifugadas no passo 4.3, sob vácuo mínimo.
- **CUIDADO: A aplicação de material depositado no fundo dos tubos causará o entupimento dos cartuchos.**

8. Lavagem dos cartuchos

- Lavar os cartuchos com 1 mL de água e, em seguida, lavar com mais 0,5 mL de ácido acético 0,01 M.
- Secar os cartuchos por 5 minutos em vácuo máximo.
- Reduzir o vácuo e adicionar 50 µL de metanol no centro de cada cartucho.
- Aplicar vácuo máximo por 1 minuto.
- Verificar se há umidade no interior dos tubos e, caso haja, limpar com *swabs*.

9. Eluição dos analitos

- Retirar a bandeja de descarte.
- Transferir cada cartucho para a posição imediatamente à direita e colocar béqueres devidamente identificados para recolhimento do eluato.
- Eluir aplicando 3 mL da solução de diclorometano: álcool isopropílico: hidróxido de amônio (78 : 20 : 2), preparado na hora.

- **Obs 1: Essa etapa deve ser realizada sem aplicar vácuo para permitir o máximo contato entre os analitos e o solvente de eluição, resultando em uma melhor recuperação.**
- **Obs 2: Caso a completa eluição não ocorra em 5 minutos, aplicar vácuo mínimo.**
- Ao final, aplicar vácuo máximo por 10 segundos para recuperação de resíduos.

10. Concentração da amostra

- Levar os béqueres com o eluato para secar sob fluxo de nitrogênio e, quando restar cerca de 0,5 mL, transferir para vials de 2 mL devidamente identificados.
- Deixar os vials sob fluxo de nitrogênio até completa secura.
- Adicionar 50 µL do derivatizante MSTFA e aquecer os vials por 30 minutos a 80°C.
- Injetar 1 µL no GC/EM no método DOSAGEM COCA.

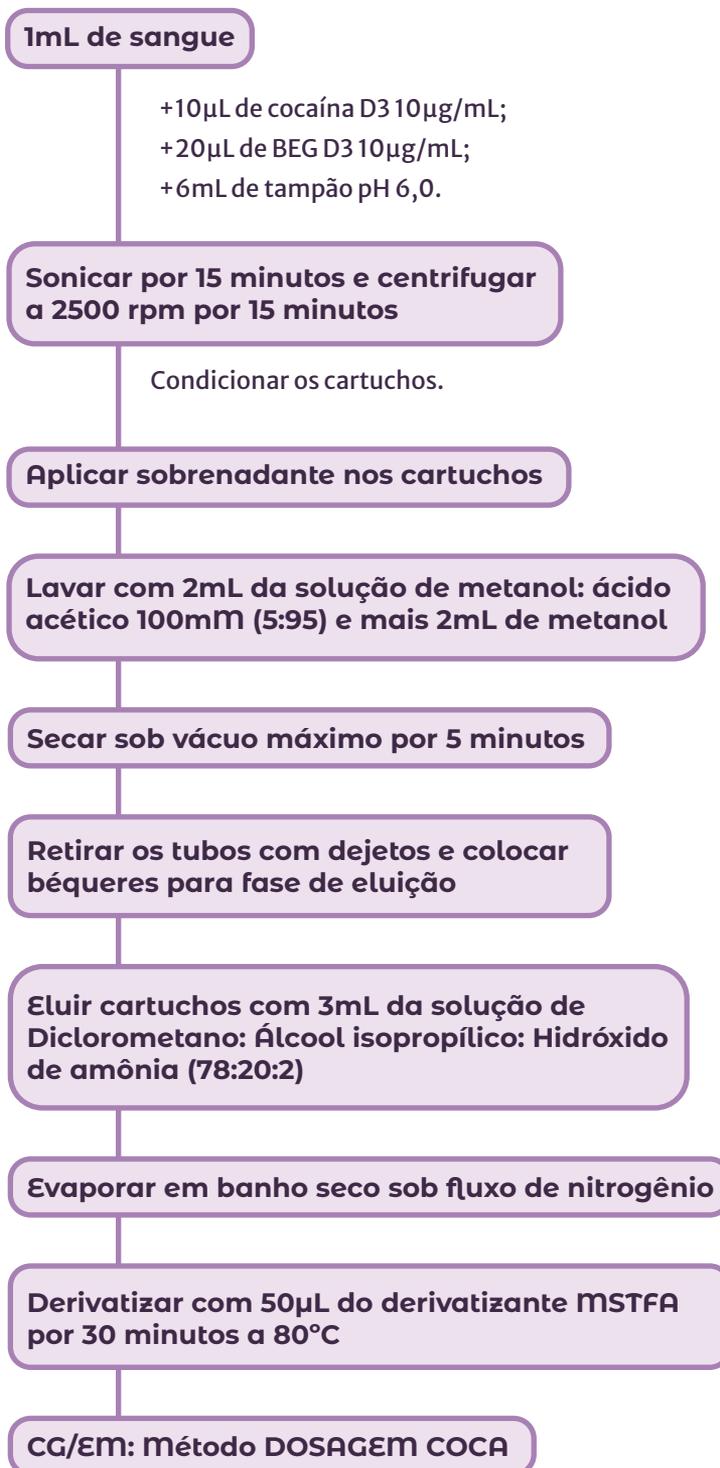
4.8.2 MÉTODO CROMATOGRÁFICO

- O método cromatográfico utilizado é o DOSAGEM COCA. Os seguintes parâmetros são relativos ao método:
- Coluna cromatográfica:
- Coluna do tipo 5MS 30 metros, 0,25 µm de diâmetro, 0,25 µm de filme.
- Condições do cromatógrafo em fase gasosa:
- Modo de injeção: *splitless*
- Temperatura do injetor: 280°C
- Fluxo de 1.1 mL/min – modo fluxo constante
- Rampa: temperatura inicial de 90°C mantida por 2 minutos; sobe 10°C/minuto até 220°C; sobe 30°C por minuto até 290°C, mantida por 4 minutos.
- Temperatura da linha de transferência: 250°C
- Condições do espectrômetro de massa:
 - Temperatura do *trap*: 180°C
 - *Scan time*: 0,35 sec/scan

- *Count threshold: 1 counts*

- Método: SCAN

4.8.3 FLUXOGRAMA DA EXTRAÇÃO



4.9 QUANTIFICAÇÃO DE COCAÍNA E METABÓLITOS POR EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO E GC-MS EM SANGUE

4.9.1 PROCEDIMENTO

1. Identificação dos tubos

Usar tubos de centrífuga de 50 mL e identificá-los com o número da amostra correspondente, do branco e do adicionado (ou dos pontos de calibração).

2. Preparo da curva de calibração

TABELA 11 - PONTOS DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (COCAÍNA, COCAETILENO, EMA)

Pontos da curva	Concentrações	Volume	Padrão
1	50 ng/mL	5 µL	10 µg/mL
2	100 ng/mL	10 µL	10 µg/mL
3	250 ng/mL	25 µL	10 µg/mL
4	500 ng/mL	5 µL	100 µg/mL

TABELA 12 - PONTOS DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (EME E BEG)

Pontos da curva	Concentrações	Volume	Padrão
1	100 ng/mL	10 µL	10 µg/mL
2	500 ng/mL	5 µL	10 µg/mL
3	1000 ng/mL	10 µL	100 µg/mL
4	2000 ng/mL	20 µL	100 µg/mL

3. Primeira extração

- Pipetar 2,5 mL de sangue em um tubo de ensaio 50 mL.
- Adicionar 5 mL de tampão pH 7,0.
- Acrescentar 3g de cloreto de sódio.
- Acrescentar 25 µL de cocaína D3 10 µg/mL.
- Adicionar 15 mL de clorofórmio: isopropanol (9:1).
- Agitar por 30 minutos no agitador mecânico.
- Centrifugar a 2000 rpm por 10 minutos.
- Retirar a fase aquosa, que se encontra na parte superior da rolha, com o auxílio de uma pipeta automática de 5 mL e desprezar.
- Furar a rolha com a pipeta Pasteur.
- Transferir a fase orgânica para um béquer com papel de filtro com aproximadamente 3g de sulfato de sódio.
- Lavar o papel de filtro com 5 mL da fase orgânica.
- Evaporar a fase orgânica em banho-maria a 60°C ou sob fluxo de nitrogênio.

4. Back-extraction

- Acrescentar 3 mL de ácido sulfúrico 0,5N no béquer com extrato seco e transferir para um tubo de ensaio de 10 mL.
- Adicionar 3 mL de clorobutano no béquer com extrato seco e transferir para o tubo de ensaio de 10 mL com a suspensão de ácido sulfúrico.
- Agitar por 10 minutos no agitador mecânico.
- Centrifugar a 2000 rpm por 10 minutos.
- Retirar a fase orgânica (parte superior) com o auxílio da pipeta Pasteur e desprezar.
- **OBS: Caso haja formação de emulsão, prosseguir com o procedimento, mas manter a emulsão no tubo de ensaio.**

5. Segunda extração

- Acrescentar ao tubo de ensaio bicarbonato de sódio até o desprendimento total de bolhas da amostra, representando o consumo de ácido sulfúrico e a formação de dióxido de carbono.

OBS: acrescentar aos poucos o bicarbonato para evitar o excesso de formação de gases e o extravasamento de amostra do tubo de ensaio, caso isso ocorra verter o tubo para aumentar a área de superfície da fase aquosa com o ar.

- Acrescentar 3 mL de clorobutano.
- Agitar por 10 minutos no agitador mecânico.
- Centrifugar a 2000 rpm por 10 minutos.
- Transferir a fase orgânica (parte superior) para um béquer.
- Evaporar em banho-maria a 60°C ou sob fluxo de nitrogênio.
- Após a evaporação da amostra, ressuspender com 100 µL de clorobutano.
- Injetar 2 µL do cromatógrafo.

4.9.2 MÉTODO CROMATOGRÁFICO

O método cromatográfico utilizado é o DOSAGEM COCA. Os seguintes parâmetros são relativos ao método:

a. Coluna cromatográfica:

Coluna do tipo 5MS30 metros, 0,25 µm de diâmetro, 0,25 µm de filme.

b. Condições do cromatógrafo em fase gasosa:

Modo de injeção: *splitless*

Temperatura do injetor: 280°C

Fluxo de 1.1 mL/min – modo fluxo constante

Rampa: temperatura inicial de 90°C mantida por 2 minutos; sobe 10°C/minuto até 220°C; sobe 30°C por minuto até 290°C, mantida por 4 minutos.

Temperatura da linha de transferência: 250°C

c. Condições do espectrômetro de massa:

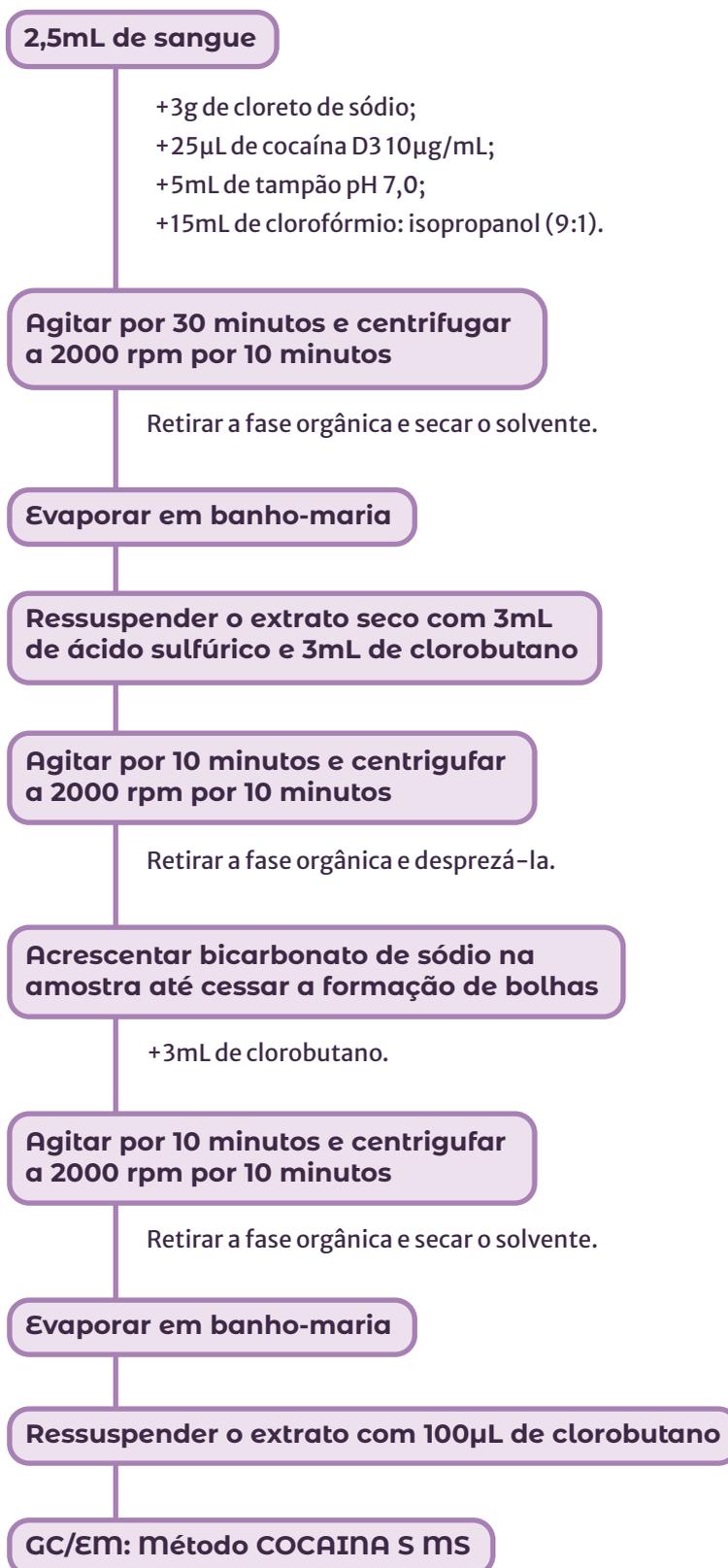
Temperatura do *trap*: 180°C

Scan time: 0,35 sec/*scan*

Count threshold: 1 counts

Método: SCAN

4.9.3 FLUXOGRAMA DA EXTRAÇÃO



4.10 QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO 11-NOR-DELTA-9-TETRAHIDROCANABINOL (THC-COOH) EM URINA POR GC-MS

Este procedimento descreve o preparo de amostras (extração líquido-líquido) para análise ácido 11-nor-delta-9-tetrahidrocanabinol (THC-COOH) em amostras de urina por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).

Os canabinoides são degradados por oxidação. Por esta razão, deve-se realizar o procedimento com a maior brevidade possível, evitar aquecimento excessivo ou prolongado da amostra durante a etapa de hidrólise. Preferencialmente, a extração das amostras e a análise no GC-MS devem ocorrer em até 24 horas.

4.10.1 PREPARO DOS CONTROLES

1. Neste procedimento será utilizado material certificado de referência de THC-COOH-glicuronídeo na concentração de 100 µg/mL (Cerilliant, código T-038-1ML, (+)-11-nor-9-Carboxy- Δ^9 -THC glucuronide). A partir deste MRC, foram preparadas soluções de trabalho nas concentrações de 0,5 µg/mL e 5 µg/mL, em metanol.
2. Neste procedimento será utilizado material certificado de referência de THC-COOH-D₃ na concentração de 100 µg/mL (Cerilliant, código T-004-1ML, (+)-11-nor-9-Carboxy- Δ^9 -THC-D₃). A partir deste MRC, foi preparada solução de padrão interno na concentração de 0,5 µg/mL, em metanol.
3. Rotular 7 tubos de polipropileno (“falcon” de 15 mL ou “eppendorff” de 5 mL) com tampa rosqueável com as informações: NEGATIVO, CAL-1, CAL-2, CAL-3, CAL-4, CAL-5 e CAL-6.
4. Transferir 1 mL de urina branco (coletada de indivíduo não usuário de maconha) para cada um dos tubos.
5. Pipetar os volumes de soluções padrão descritos abaixo para os respectivos tubos.

| TABELA 13 - PREPARO DO CONTROLE NEGATIVO E DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DE THC-COOH PARA ANÁLISE EM URINA

Rótulo do Controle	Concentração da solução de trabalho (µg/mL)	Volume adicionado em 1 mL de urina (µL)	Concentração final de THC-COOH na amostra (ng/mL)
NEGATIVO	NÃO ADICIONAR PADRÃO	NÃO ADICIONAR PADRÃO	ZERO (NEGATIVO)
CAL-1	0,5 µg/mL	25	12,5
CAL-2	0,5 µg/mL	50	25
CAL-3	0,5 µg/mL	100	50
CAL-4	5 µg/mL	25	125
CAL-5	5 µg/mL	50	250
CAL-6	5 µg/mL	100	500

6. Submeter estes 7 tubos aos mesmos procedimentos descritos abaixo.

4.10.2 PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO

1. Rotular os tubos de polipropileno (15 mL ou 5 mL) com o número da amostra.
2. Transferir 1 mL de amostra de urina a ser analisada para tubo de polipropileno (15 mL) com tampa rosqueável.
3. Adicionar 50 µL de solução de padrão interno (THC-COOH-D₃ 0,5 µg/mL em metanol).
4. Adicionar 100 µL de NaOH 10 mol/L. Fechar os tubos e agitar brevemente.
5. Aquecer a 70 °C, por 20 minutos, em bloco de aquecimento. **IMPORTANTE:** ligar o bloco com antecedência, para que a temperatura esteja correta nesta etapa.

6. Retirar os tubos do bloco de aquecimento, aguardar atingir temperatura ambiente (10–15 min).
7. Adicionar 1 mL de H₂SO₄ 5% (v/v). Agitar.
8. Adicionar 3 mL de solvente extrator (n-hexano:acetato de etila, 9:1 v/v).
9. Fechar o tubo, homogeneizar por inversão 5–10 vezes, agitar em vórtex por 30 s e no agitador mecânico de tubos (homogeneizador hematológico) por 30 minutos.
10. Centrifugar a 4000 rpm por 4 minutos.
11. Transferir o sobrenadante para tubo de vidro cônico novo ou para vial de vidro.
12. Evaporar o sobrenadante a 50 °C, sob fluxo de nitrogênio.
13. Ressuspender com 25 µL de acetato de etila e 25 µL de BSTFA+1%TCMS. Fechar o tubo com tampa plástica branca, ou o vial com a respectiva tampa.
14. Agitar em vortex por 15–20 segundos. Incubar em banho seco a 70°C por 20 min.
15. Retirar do aquecimento, aguardar atingir temperatura ambiente (10 min).
16. Transferir para vial novo com insert e acondicionar no mesmo vial. Fechar o vial com a mesma tampa usada anteriormente.
17. Injetar 2 µL no GC-MS.

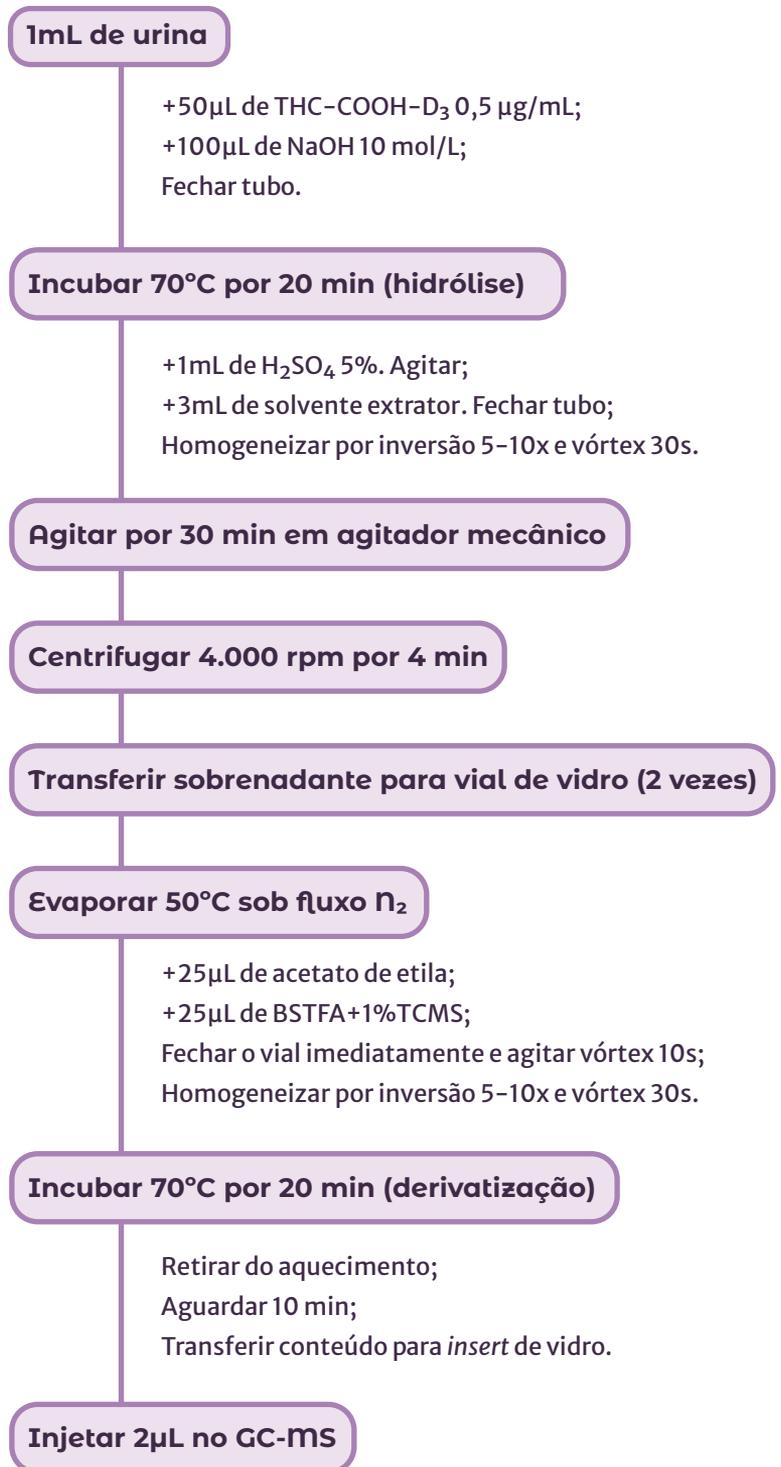
4.10.3 PARÂMETROS DO GC-MS E AMOSTRADOR AUTOMÁTICO

Os parâmetros a seguir podem ser ajustados de acordo com o modelo do instrumento utilizado.

1. Temperatura do injetor: 280°C
2. Temperatura do forno: início 200°C por 0.5 min, rampa 25°C/min até 320°C e manter por 3 min
3. Modo de injeção: *splitless* (ou pulsado 45 psi/0,40 min se necessário)
4. Gás de arraste: hélio 1,0 ml/min
5. Temperatura da fonte de ionização: 280°C

6. Temperatura da interface (Interface Temp): 280°C
7. Temperatura do quadrupolo: 150°C
8. Tempo de saída do solvente (*solvent delay*): 5 min
9. Modo de leitura: SIM
 - a. THC-COOH: 371, 473, 488
 - b. THC-COOH-D₃: 374, 476, 491
10. *Dwell time*: 40 msec
11. Resolução do quadrupolo: UNIT
12. **IMPORTANTE: usar apenas acetato de etila nos 2 frascos de lavagem da seringa.**

4.10.4 FLUXOGRAMA DA EXTRAÇÃO



UNIDADE 5

FUNDAMENTOS DE TOXICOLOGIA FORENSE

5.1 ANÁLISES QUANTITATIVAS DE FÁRMACOS E DROGAS DE ABUSO EM FLUIDO ORAL

O fluido oral é uma matriz biológica constituída de saliva (secreção produzida pelas glândulas salivares, transudato da mucosa e fluido gengival crevicular. Água é responsável por 95% da sua formulação, além de solutos, como eletrólitos, amilase, glicose, ureia e proteínas. O volume de produção por dia varia entre 0,6 e 1,5 L.

As vantagens do uso dessa matriz nas análises toxicológicas são a facilidade da coleta, que é não invasiva e possibilita a coleta observada, com redução de possíveis constrangimentos (como na coleta de urina) e com menor risco de adulteração de amostra na coleta. O procedimento de coleta não exige pessoal ou local especializado para sua realização, como acontece com coletas de sangue, bastando treinamento para garantir a correta coleta e aproveitamento da amostra. Além disso, as concentrações das drogas inalteradas encontradas no fluido oral apresentam melhor correlação com o sangue (Tabela 1) quando comparadas as obtidas pela urina. Assim, as substâncias ali detectadas e/ou quantificadas são geralmente associadas ao seu uso recente.

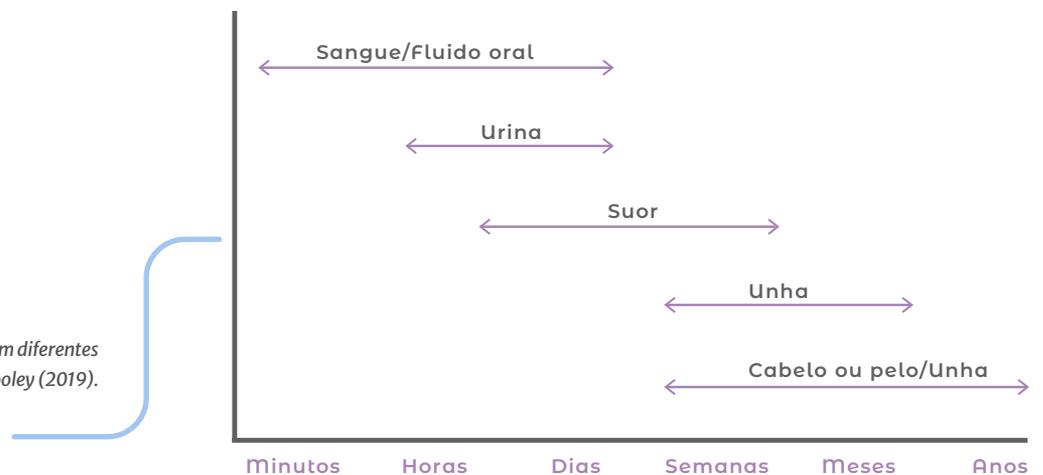
| TABELA 1 - RAZÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES EM FLUIDO ORAL E SANGUE OBSERVADAS PARA 8 ANALITOS DE INTERESSE FORENSE (ADAPTADO DE LANGEL *ET AL.*, 2013)

Substância	Fluido oral/sangue
Anfetamina	23
Metanfetamina	29
Cocaína	20
Benzoilecgonina	3,3

Substância	Fluido oral/sangue
Morfina	9,8
Codeína	8,8
Metadona	2,9
THC	31

Apesar de várias substâncias serem passíveis de serem identificadas até 48 h após o consumo (Figura 1), a concentração obtida nesses casos chega a valores abaixo de ng/mL, o que requer uso técnicas analíticas sensíveis, como a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) (Garg and Cooley, 2019). As vantagens citadas acima facilitam a adoção dessa matriz biológica para análises onde a coleta necessita ser feita em campo, como é no caso das que avaliam a direção sob efeito de drogas (DUID, do inglês *Driving Under the Influence of Drugs*) (BOMBANA *et al.*, 2017) ou ainda para fins epidemiológicos em contextos específicos, como festivais de música eletrônica (CUNHA *et al.*, 2021), por exemplo.

Figura 1. Janela de detecção de drogas em diferentes matrizes. Adaptado de Garg e Cooley (2019).



Entre as desvantagens da matriz podemos citar a possibilidade de contaminação da amostra por exposição passiva e/ou mesmo aumento das concentrações encontradas devido contaminação da cavidade oral, dependendo da via de administração que a substância foi consumida e tempo decorrido da coleta. Além disso, algumas substâncias (ex.: THC, anfetaminas, MDMA, alguns fármacos anti-histamínicos e antipsicóticos, por exemplo) podem levar a uma redução na produção de fluido oral, o que pode aumentar o tempo total para a coleta da amostra (DRUMMER, 2006; GARG; COOLEY, 2019).

O pH do fluido oral varia entre 6,2 e 7,4 e, em geral, a passagem da droga/fármaco do sangue para o fluido oral é afetada pela composição do fluido oral, vazão e pH, assim como o pKa da substância, sua ligação a proteínas plasmáticas, lipofilicidade e peso molecular. Assim, a fração livre e não ionizada acessa o fluido oral por difusão passiva. Produtos de biotransformação conjugados ao ácido glicurônico podem ser detectados, mas em menor concentração que a fração livre. Uma vez que o sangue possui pH (7,4) maior que o do fluido oral, substâncias básicas tendem a estarem em maior concentração no fluido oral devido ao seu “aprisionamento” (*ion trapping*) após ionização ocasionada pela diferença do pH do meio e consequente redução da taxa de difusão de volta ao sangue (DESROSIERS; HUESTIS, 2019).

5.1.1 DISPOSITIVOS DE COLETA DE FLUIDO ORAL

A coleta de fluido oral pode ser de forma passiva ou expectoração, com ou sem estimulação, ou ainda associados à dispositivos de coleta para esse fim. A obtenção da amostra de forma passiva é a que mais se aproximaria da concentração real encontrada apenas na saliva, porém é lenta e desagradável para o doador e o responsável pela coleta, fazendo da coleta por dispositivo apropriado a mais adequada.

No mercado, é possível encontrar variadas opções de dispositivos de coleta para fluido oral, tanto para fins de triagem quanto para servir de análise confirmatória (Figura 2). Para a realização do exame confirmatório, é fundamental que o dispositivo de coleta possua controle volumétrico do fluido oral coletado. Além disso, o uso de agentes estimulantes de salivação deve ser evitado, pois apesar de facilitar a coleta, esses agentes levam a um aumento do pH do meio e a um desbalanço das concentrações de alguns toxicantes, com impacto nos resultados quantitativos (DRUMMER, 2006). Como exemplo, concentrações reduzidas de metanfetamina, anfetamina e codeína já foram reportadas após coleta de fluido oral por estimulação com ácido cítrico (DESROSIERS; HUESTIS, 2019).

Outra diferença encontrada nos dispositivos é a presença, em parte deles, de uma solução preservante que ficará em contato com a almofada absorvente contendo o fluido oral coletado. Essa solução tende a estabilizar os analitos presentes na amostra para transporte até o laboratório de análise, além de trazer a vantagem de reduzir a viscosidade da matriz. Porém, apresenta a desvantagem de diluir o analito da amostra (DESROSIERS; HUESTIS, 2019), e a concentração final da droga e/ou fármaco deverá ser corrigida em algum momento da análise.



TRIAGEM / CONFIRMATÓRIO



Figura 2. Exemplos de dispositivos de coleta de fluido oral disponíveis no mercado para análises de triagem e/ou confirmação de fármacos e drogas de abuso.

TABELA 2 - SUBSTÂNCIAS ANALISADAS E CUT OFF DOS DISPOSITIVOS ORALTOX®, ALERE DDS2® E DRÄGER DRUGTEST®

Analito	Cut off (ng/mL)		
	OralTox®	Alere DDS2®	Dräger DrugTest®
Anfetamina	50	50	50
Barbitúricos	50	-	-
Benzodiazepínicos	10	20	15
Cocaína	20	30	20
Metanfetamina	50	50	35
Opiáceos	40	40	20
Oxicodona	20	-	-
Fenciclidina (PCP)	10	-	-

Analito	Cut off (ng/mL)		
	OralTox®	Alere DDS2®	Dräger DrugTest®
THC	40	25	5/10/25
Metadona	-	15	20
Cetamina	-	-	300

DrugWipe® 6S: Usado apenas para triagem. O resultado pode ser liberado já no local da coleta (5 min). Pode ser usado para análise de THC, anfetamina/metanfetamina/MDMA, cocaína, opiáceos (morfina/heroína), cetamina ou benzodiazepínicos (dependendo do número do catálogo). É usado para testes de triagem relacionados a DUID na Austrália. Disponível em: <https://www.securetec.net/en/products/saliva-drug-test-drugwipe/#1537772423775-356cbc28-47a31542310600446>.

SalivaScreen®: Usado apenas para triagem. O resultado pode ser liberado já no local da coleta. Contém indicador de saturação (coleta em até 7 min). Pode ser usado para análise de THC, cocaína, opiáceos, anfetamina, metanfetamina, benzodiazepínicos, fenciclidina (PCP), metadona, buprenorfina, oxicodona. Leitura em 10 min. Disponível em: <https://www.medicaldisposables.us/10-panel-saliva-drug-test-p/md-s6101.htm>.

OralTox®: Usado apenas para triagem. O resultado pode ser liberado já no local da coleta (10 min). Contém indicador de saturação (coleta em até 7 min). Analitos investigados e seus respectivos *cut offs* podem ser encontrados na Tabela 2. Disponível em: https://www.orasure.com/documents/products/oraltox/OralTox_Proc.pdf.

Alere DDS2®: Usado apenas para triagem. O resultado pode ser liberado já no local da coleta (5 min). Analitos investigados e seus respectivos *cut offs* podem ser encontrados na Tabela 2.

Dräger DrugTest®: Usado apenas para triagem. O resultado pode ser liberado já no local da coleta (4,5-8,5 min). Analitos investigados e seus respectivos *cut offs* podem ser encontrados na Tabela 2. Disponível em: https://www.draeger.com/en_sea/Products/DrugTest-5000.

Quantisal™: Possui indicador de volume de fluido oral a ser coletado (1±0,1 mL). Possui solução para estabilizar os analitos durante o transporte até o laboratório (3 mL). Pode ser usado para triagem e confirmatório. Algumas catinonas sintéticas apresentam estabilidade superior quando as amostras são coletadas com o Quantisal™ em comparação a outros dispositivos, como o Oral-Eze® (MILLER *et al.*, 2017). O Quantisal™ já foi usado em projeto de pesquisa realizado no Brasil, onde foi desenvolvido método de *screening* para mais de 100 drogas de abuso e novas substâncias psicoativas, além de aplicação na coleta de amostras autênticas (CUNHA *et al.*, 2021, 2020). Métodos quantitativos para anfetamina, metanfetamina, MDMA, MDA e MDEA (KAHL *et al.*, 2021), antidepressivos, benzodiazepínicos e opioides (ARANTES *et al.*, 2021) estão disponíveis na literatura. Mais informações a respeito deste dispositivo e coleta será discutido na apostila prática. Disponível em: <https://immunalysis.com/products/oral-fluid/quantisal/>.

Intercept i2®: Possui indicador de volume de fluido oral a ser coletado. Pode ser usado para triagem e confirmatório. Indicado para análise de THC, cocaína, fenciclidina (PCP), opiáceos, anfetaminas, barbitúricos, benzodiazepínicos e metadona. Disponível em: <https://orasure.com/products-substance-abuse/i2.html>. Observação: Intercept (primeira linha do gênero) não possui coleta de volume fixo (cerca de 0,4 mL), com 0,8 mL de tampão (SAMANO *et al.*, 2015).

Oral-Eze®: Possui indicador de volume de fluido oral a ser coletado (1 mL). Pode ser usado para triagem e confirmatório. Coleta em até 10 min. Possui tampão para estabilizar os analitos durante o transporte até o laboratório (2 mL) (SAMANO *et al.*, 2015). Analitos investigados e seus respectivos *cut offs* para triagem e exame confirmatório podem ser encontrados na Tabela 3.

| TABELA 3 - SUBSTÂNCIAS ANALISADAS E CUT OFF PARA TRIAGEM E CONFIRMATÓRIO DO DISPOSITIVO ORAL-EZE®

Analito	Cut off (ng/mL) triagem	Cut off (ng/mL) confirmatório
Anfetamina	150	120
Cocaína	15	6
THC	3	1,5
Metanfetamina	120	120

Analito	Cut off (ng/mL) triagem	Cut off (ng/mL) confirmatório
Opiáceos (codeína, morfina, hidrocodona, hidromorfona, 6-acetilmorfina)	30	30 ^a
Oxicodona e oximorfona	30	30
Fenciclidina (PCP)	3	1,5

^a Cut off para 6-acetilmorfina no teste confirmatório é 3 ng/mL. Disponível em: <https://www.questdiagnostics.com/business-solutions/employers/drug-screening/products-services/oral-fluid-testing/process>.

Salivette®: Não possui indicador de volume de fluido oral a ser coletado (volume coletado entre 0,8 e 1,4 mL). Pode ser usado para triagem e confirmatório. Precisa ser centrifugado após chegada no laboratório para extrair amostra do algodão. O dispositivo com tampa branco opaco é de rolo de algodão sem preparo, já o de tampa verde contém ácido cítrico. Disponível em: <https://www.sarstedt.com/pt/produutos/diagnostico/salivaexcrecao/product/51.1534/>.

OraSure®: Não possui indicador de volume de fluido oral a ser coletado. Coleta deve ser entre 2-5 min. Pode ser usado para triagem e confirmatório. Possui tampão para estabilizar os analitos durante o transporte até o laboratório. Disponível em: <https://orasure.com/products-substance-abuse/OSCD.html>.

5.1.2 SUBSTÂNCIAS DE INTERESSE

● Cocaína

A dose usual intranasal para cocaína varia entre 20 e 100 mg, mas pode ser superior em indivíduos com consumo pesado. O tempo de meia-vida é de 1 h, enquanto do seu produto de biotransformação benzoilecgonina é de 6 h. O tempo de detecção no sangue varia de 4-6 h após dose de 20 mg, e 12 h após 100 mg. Em usuários crônicos, a benzoilecgonina, com um limite de detecção de 25 ng/mL, foi possível ser detectada em soro por uma média de 5 dias. Já em fluido oral, a cocaína pode ser identificada entre 5-12 h após uma única dose. A um limite de detecção de 1 ng/mL, benzoilecgonina pode ser detectada de 12-24 h. Em usuários crônicos pode alcançar até 10 dias, com limite de 0,5 ng/mL (VERSTRAETE, 2004).

● Delta-9-tetrahydrocannabinol (THC)

A dose absorvida após consumo de um cigarro varia entre 5 e 30 mg. A concentração plasmática do THC tem um pico em 3 a 8 min que cai rapidamente (meia-vida aproximada de 30 min). O seu produto de biotransformação carboxílico, 11-nor-9-carboxi-delta9-tetrahydrocannabinol (THC-COOH), apresenta meia-vida entre 3 a 13 h em usuários ocasionais, e entre 20 e 57 h em usuários frequentes. Assim, o THC, com um limite de detecção de 1 ng/mL, é passível de detecção por 5 h em plasma, enquanto o THC-COOH, com um limite de detecção de 5 ng/mL, pode ser detectado por até 25 dias. Em fluido oral, THC foi detectado até 15 h por ELISA (ensaio imunoenzimático) e 13 h por GC-MS/MS, com limites de detecção de 1 e 0,5 ng/mL, respectivamente (VERSTRAETE, 2004).

● Anfetamina

A dose usual de anfetamina é de 10 a 30 mg, podendo ser superior em indivíduos tolerantes, sendo o tempo de meia-vida variável de 7 a 34 h, dependendo do pH urinário. Em sangue, a anfetamina é detectável por 46 h após dose de 10 mg, com um limite de detecção de 4 ng/mL. Já em fluido oral, com um limite de 10 ng/mL, sua detecção ocorre entre 20 e 50 h após administração oral (VERSTRAETE, 2004). A razão entre as concentrações obtidas em fluido oral e plasma é cerca de 2-3 vezes (COMIRAN *et al.*, 2012).

● Metanfetamina

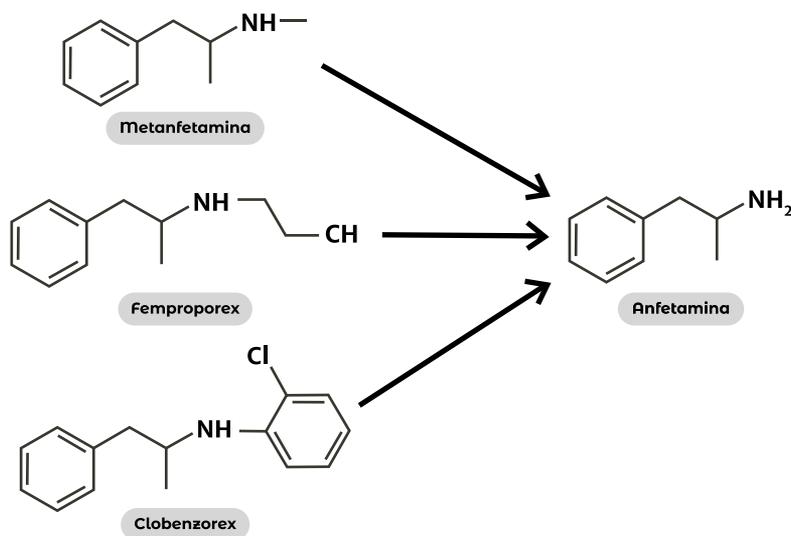
A dose usual é de 5 a 10 mg, podendo ser superior em indivíduos tolerantes, com uma meia-vida que varia de 10 a 30 h. Em sangue, é detectado por 48 h após consumo de 22 mg por via respiratória, com limite de detecção de 3 ng/mL e 1 ng/mL para a anfetamina (produto de biotransformação). Já em fluido oral, após consumo oral em cápsula de liberação controlada de 10 mg, foi detectável por, pelo menos, 24 h (concentração média = 19 ng/mL) e após 4 administrações de doses de 10 ou 20 mg, por 36-72 h. A concentração foi 2,3 a 4,3 vezes maior que a obtida no plasma (Verstraete, 2004).

● Femproporex, anfepramona e clobenzorex

Femproporex é encontrado em concentração maior que no plasma, devido ser uma base fraca e com baixa ligação a proteínas plasmáticas. Femproporex foi detectado após dose oral única de 25 mg por até 12 h (tempo de meia-vida de 1,9 h), com limite de detecção de 2 ng/mL, enquanto o produto de biotransformação anfetamina, principal desse fármaco, foi detectado por até 24 h (COMIRAN *et al.*, 2012). Não há dados na literatura para janela de detecção da anfepramona e clobenzorex em fluido oral.

Na biotransformação dos fármacos femproporex e clobenzorex, há a formação do produto de biotransformação anfetamina (Figura 3). Assim, a confirmação deve ser criteriosa para garantir a correta identificação destas substâncias.

Figura 3. Produção da anfetamina, a partir do metabolismo da metanfetamina, femproporex e clobenzorex. Adaptado de Yonamine (2004).



5.2 RECOMENDAÇÕES INTERNACIONAIS PARA EXAMES TOXICOLÓGICOS EM FLUIDO ORAL

O valor de corte, também conhecido como “*cut off*”, é um valor numérico onde os resultados das amostras que se apresentem abaixo deste valor, são considerados não detectados (“negativo”) e acima deste valor são considerados detectados (“positivo”) (BRCAK *et al.*, 2018). O *cut off* apresenta variação de acordo com o tipo de matriz analisada, com a finalidade de análise, recomendação (*guideline*) e método de análise. O *cut off* é aplicado nas análises clínicas e toxicológicas para minimizar os falsos positivos devido à contaminação externa ou passiva. Além disso, também é aplicado para fornecer uma janela de detecção mais próxima do necessário em determinado exame, evitando a detecção de uso em períodos anteriores ao proposto pelo teste.

Como citado anteriormente, a análise em fluido oral permite uma coleta não invasiva, com detecção de uso de horas até dias. Os resultados se correlacionam com a finalidade de análise e permitem uma estimativa de detecção de níveis sanguíneos, mas é passível de contaminação externa, por isso a aplicação do *cut off* é essencial numa análise de fluido oral. Para a análise de fluido oral são aplicados dois diferentes níveis de *cut off*. O primeiro é aplicado no teste de “triagem”, onde geralmente as técnicas de análise são menos sensíveis e por este motivo tende a apresentar um valor de *cut off* mais alto. Neste teste, caso o resultado da amostra seja maior que o determinado, é analisada em teste de confirmação. Na análise de confirmação, o valor de *cut off* é mais baixo e fornecem um valor quantitativo como resultado. As Tabelas 4 e 5 abaixo mostram os diferentes níveis de *cut off*, fornecidos por diferentes órgãos regulamentadores, para diferentes aplicações, para teste de triagem e confirmatório de fluido oral.

| TABELA 4 - COMPARAÇÃO DE VALORES DE CUT OFF PARA TESTE DE TRIAGEM EM AMOSTRAS DE FLUIDO ORAL, EM NG/ML, PARA DIFERENTES APLICAÇÕES (EXAMES EM AMBIENTE DE TRABALHO OU TRÂNSITO), DETERMINADOS POR DIFERENTES ENTIDADES INTERNACIONAIS

Substância Finalidade	EWDTs (2018) Trabalho	Austrália Trabalho	SAMHSA (2019) Trabalho	DRUID Trânsito
Anfetamina	40	50	50	-
Cannabis (THC)	10	15	4	-
Cocaína	30	50	15	-
Benzoilecgonina	30	50	15	-

| TABELA 5 - COMPARAÇÃO DE VALORES DE CUT OFF PARA TESTE DE CONFIRMATÓRIO EM AMOSTRAS DE FLUIDO ORAL, EM NG/ML, PARA DIFERENTES APLICAÇÕES (EXAMES EM AMBIENTE DE TRABALHO OU TRÂNSITO), DETERMINADOS POR DIFERENTES ENTIDADES INTERNACIONAIS

Substância Finalidade	EWDTs (2018) Trabalho	Austrália^a Trabalho	SAMHSA (2019) Trabalho	DRUID Trânsito
Anfetamina	15	25	25	360
Cannabis (THC)	2	5	2	27
Cocaína	8	25	8	170
Benzoilecgonina	8	25	8	95

^a (Casolin, 2016).

A Legislação Brasileira ainda não possui qualquer definição quanto ao uso do fluido oral para fiscalização de trânsito, logo ainda não existe valor de *cut off* determinado para análise neste fluido biológico. Assim, como orientação, guias internacionais podem ser usados como base para estimar os *cut off* de análises de triagem e confirmatórias.

Para análises voltadas para ambiente de trabalho, podemos citar as recomendações europeias publicado pela Sociedade Europeia de Testagem de Drogas no Local de Trabalho (EWDTS, do inglês, *European Workplace Drug Testing Society*) (BRCAK *et al.*, 2018). Apesar de não determinar a marca comercial a ser utilizada para essas análises, é preciso garantir que os dispositivos de coleta cumpram com o requisito de determinação do volume coletado, a fim de garantir o cálculo das concentrações das substâncias presentes na amostra. Além disso, é solicitada a coleta de duas amostras do doador (prova e contraprova), com um tempo de espera de 5 min entre as coletas, assim como lacre inviolável para evitar qualquer manipulação posterior. Antes da coleta da amostra, o doador deve ficar sem beber, comer e/ou fumar durante 10–20 min. O procedimento de coleta pode variar dependendo do fabricante do dispositivo, mas usualmente o dispositivo coletor é colocado debaixo da língua do doador por um período de 2–5 min, podendo se estender até 10 min, quando há redução do volume de fluido oral. Em coletas com volume fixo de amostra é comum que exista um indicador de cor para indicar quando o volume correto de fluido oral foi coletado, como é no caso do Quantisal™, por exemplo.

Da chegada da amostra no laboratório é preciso fazer uma inspeção visual da amostra (dois dispositivos por doador, em caso de prova e contraprova), verificar o volume de cada amostra e testar a autenticidade da amostra por algum biomarcador endógeno (amilase salivar ou cortisol, por exemplo), a fim de validar o recebimento da amostra. Outros dados que precisam ser coerentes é a hora da coleta e o fator de diluição quando o dispositivo utilizado contém tampão para garantir a estabilidade durante o transporte. A checagem do marcador endógeno tem finalidade apenas de verificar a autenticidade da matriz, já que não há consenso sobre um biomarcador apropriado pra normalizar a concentração de drogas e fármacos quantificados no fluido oral (DESROSIERS; HUESTIS, 2019).

Uma alíquota das amostras é usada para teste de triagem e, caso positivo para determinada substância (Tabela 6), um teste de confirmação com nova alíquota dessa amostra é obrigatório para provar ou refutar a presença da substância ou seu produto de biotransformação (Tabela 7). Os resultados, especialmente positivos, devem passar por criteriosa interpretação antes de o laudo ser finalizado.

O teste de triagem pode ser realizado por imunoensaio ou por técnicas cromatográficas ou eletroforéticas acopladas à espectrometria de massas. Qualquer que seja a técnica escolhida para os exames de triagem ou confirmatórios, é necessário que ele seja validado antes de ser aplicado na rotina. Mesmo os imunoensaios disponíveis no mercado possuem diferentes valores de *cut off* para um mesmo analito. Portanto, é preciso verificar a legislação ou regulamento jurídico de referência que deverá ser atendido, para que o dispositivo adquirido ou o método desenvolvido se enquadre nos valores regulamentados.

O teste confirmatório deve usar uma técnica cromatográfica em combinação com a espectrometria de massas. Caso a triagem já seja realizada usando espectrometria de massas, a confirmação deve ser feita pela análise de nova alíquota da amostra, com quantificação da substância identificada. A amostra que tiver uma droga inalterada e/ou seu produto de biotransformação em concentração igual ou maior ao *cut off*, o resultado deve ser reportado como “detectado”. Os parâmetros da validação, pelo menos para análise quantitativa, devem determinar: imprecisão, verificação do *cut off*, seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, sensibilidade, especificidade, estabilidade (amostrador automático e sob as condições de armazenamento da amostra aplicado pelo laboratório), incerteza da medição, recuperação do dispositivo de coleta, e efeito matriz (quando aplicável). Uma vez que prova e contraprova devem ser armazenadas por um período maior quando positivas, é recomendado que o armazenamento seja feito sob temperatura de freezer (-20 °C ou menor), já que os analitos tendem a ser mais estáveis nessas temperaturas.

| TABELA 6 - SUBSTÂNCIAS RECOMENDADAS E VALORES DE CUT OFF PARA TESTES DE TRIAGEM EM FLUIDO ORAL. ADAPTADOS DO GUIA DA SOCIEDADE EUROPEIA DE TESTAGEM DE DROGAS NO LOCAL DE TRABALHO (EWTDS) (BRCAK ET AL., 2018)

Analito	Concentração (ng/mL)
Grupo das anfetaminas	40
Cannabis (THC)	10
Cocaína + metabólitos	30
Opiáceos (morfina)	40
6-Acilmorfina	4
Metadona	50
Grupo dos benzodiazepínicos	10
Buprenorfina	5
Propoxifeno ou metabólitos	40

A Administração de Serviços de Abuso de Substâncias e Serviços de Saúde Mental (SAMHSA, do inglês *Substance Abuse and Mental Health Services Administration*) (SAMHSA, 2019), é órgão americano vinculado ao Departamento de Saúde e Serviços Humanos (HHS) que estabelece as diretrizes para inclusão da amostra de fluido oral nos programas de testes de drogas de abuso no local de trabalho. Para garantir a viabilidade da amostra é permitido, mas não obrigatório, o teste para albumina ou imunoglobulina G (IgG), já que se entende que a coleta assistida minimiza a possibilidade de adulteração. Se uma amostra apresentar características incomuns, como odor e cor, ou respostas que sugiram a presença de algum adulterante, testes adicionais podem ser realizados. Apenas dispositivos aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) e que colem, pelo menos, 1 mL de fluido oral, são aceitos para a coleta. A variação máxima do volume coletado é de 10%, enquanto o diluente pode variar até 2,5%. A estabilidade dos analitos deve ser de 5 dias em temperatura ambiente. Antes da coleta, o responsável por esta inspeciona a cavidade oral do doador para garantir que não há impedimentos para a continuidade do procedimento, inclusive da presença de algum possível adulterante, diluente ou substituto da amostra e 10 min são contabilizados para início. A coleta de duas amostras de cada doador deve ocorrer com uma diferença máxima entre elas de 2 min, sendo proibido beber ou comer entre elas.

| TABELA 7 - SUBSTÂNCIAS RECOMENDADAS E VALORES DE CUT OFF PARA TESTES CONFIRMATÓRIOS EM FLUIDO ORAL. ADAPTADOS DO GUIA DA SOCIEDADE EUROPEIA DE TESTAGEM DE DROGAS NO LOCAL DE TRABALHO (EWTDS) (BRCAK ET AL., 2018)

Analito	Concentração (ng/mL)
Anfetamina (d + l)	15
Metanfetamina	15
MDA	15
MDMA	15
7-Aminoflunitrazepam	3
7-Aminoclonazepam	3

Analito	Concentração (ng/mL)
7-Aminonitrazepam	3
Alprazolam	3
Bromazepam	3
Clonazepam	3
Desmetildiazepam	3
Diazepam	3
Flunitrazepam	3
Flurazepam	3
Lorazepam	3
Lormetazepam	3
Midazolam	3
Nitrazepam	3
Nordiazepam	3
Oxazepam	3
Fenazepam	3
Temazepam	10
Morfina	15
Codeína	15

Analito	Concentração (ng/mL)
Norcodeína	2
Dihidrocodeína	15
6-Monoacetilmorfina	2
Cannabis (THC)	2
Cocaína	8
Benzoilecgonina	8
Cocaetileno	-

Cada lote (*batch*) de amostras analisadas em exames de triagem deve conter os seguintes controles: pelo menos um controle que não contenha droga e seu produto de biotransformação, pelo menos uma amostra controle com a droga ou seu produto de biotransformação a uma concentração 25% acima do *cut off* (Tabela 8), pelo menos uma amostra controle com a droga ou seu produto de biotransformação a uma concentração 75% do *cut off* e pelo menos um controle que seja classificado como uma amostra autêntica para os analistas. Os calibradores e controles devem totalizar, pelo menos, 10% das amostras analisadas por *batch*.

Já para os exames confirmatórios, cada lote de amostras analisado deve conter: pelo menos um calibrador na concentração do *cut off*, pelo menos um controle que não contenha droga e seu produto de biotransformação, pelo menos uma amostra controle com a droga ou seu produto de biotransformação a uma concentração 25% acima do *cut off* (Tabela 8) e pelo menos uma amostra controle com a droga ou seu produto de biotransformação a uma concentração a 40% ou menos do valor do *cut off*. Os calibradores e controles devem totalizar, pelo menos, 10% das amostras analisadas. O resultado das análises deve ser liberado dentro de 5 dias da chegada da amostra.

| TABELA 8 - SUBSTÂNCIAS RECOMENDADAS E VALORES DE CUT OFF PARA TESTES DE TRIAGEM E CONFIRMATÓRIO EM FLUIDO ORAL (SAMHSA, 2019)

Analito	Concentração (ng/mL)	
	Cut off para triagem	Cut off para confirmatório
THC	4	2
Cocaína	15	8
Benzoilecgonina	15	8
Codeína	30	15
Morfina	30	15
Hidrocodona	30	15
Hidromorfona	30	15
Oxicodona	30	15
Oximorfona	30	15
6-Acetil morfina	4	2
Fenciclidina (PCP)	10	10
Anfetamina	50	25
Metanfetamina	50	25
MDMA	50	25
MDA	50	25

O projeto relacionado com direção sob influência de drogas, álcool e fármacos (DRUID, do inglês Driving Under the Influence of Drugs, Alcohol and Medicines) foi desenvolvido na Europa com o objetivo de entender o grau da problemática e traçar contramedidas apropriadas. As pesquisas foram conduzidas nas estradas de 13 países da Europa e amostras de sangue e fluido oral foram coletadas de 50.000 motoristas. Os valores de *cut off* para análise de fluido oral são apresentados na Tabela 9 (EMCDDA, 2012).

| TABELA 9 - SUBSTÂNCIAS RECOMENDADAS E VALORES DE *CUT OFF* PARA ANÁLISE EM FLUIDO ORAL DETERMINADOS NO PROJETO DRUID (EMCDDA, 2012)

Analito	Cut off (ng/mL)
Etanol	0,082 g/L
6-Acetilmorfina	16
7-Aminoclonazepam	3,1
7-Aminoflunitrazepam	1,0
Alprazolam	3,5
Anfetamina	360
Benzoilecgonina	95
Clonazepam	1,7
Cocaína	170
Codeína	94
Diazepam	5,0
Flunitrazepam	1,0

Analito	Cut off (ng/mL)
Lorazepam	1,1
MDA	220
MDEA	270
MDMA	270
Metadona	22
Metanfetamina	410
Morfina	95
Nordiazepam	1,1
Oxazepam	13
THC	27
Tramadol	480
Zolpidem	10
Zopiclone	25

5.3 TÉCNICAS DE PREPARO DE AMOSTRAS PARA FLUIDO ORAL

O fluido oral tem ganhado cada vez mais destaque nas análises toxicológicas e, conseqüentemente, diversas técnicas de preparo de amostra são reportadas na literatura para manipulação desta amostra. Entre elas podemos citar a extração líquido-líquido (ELL) (ARANTES *et al.*, 2021; BAHMANABADI *et al.*, 2017; DA CUNHA *et al.*, 2020; INSTITÓRIS *et al.*, 2012; ØIESTAD *et al.*, 2007), extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*) (FRITCH *et al.*, 2009; SHIN *et al.*, 2020), microextração por sorvente empacotado (MEPS)

(ARES *et al.*, 2017; MONTESANO *et al.*, 2015; WOŹNIAKIEWICZ *et al.*, 2014), microextração em fase sólida (SPME) (ANZILLOTTI *et al.*, 2014), microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) (KAHL *et al.*, 2021; TOMAI *et al.*, 2021) e micro-QuEChERS (CHINAGLIA *et al.*, 2022).

A ELL tem o princípio de uso de dois líquidos imiscíveis entre si, sendo um aquoso, representado pela matriz biológica que ainda pode ser acrescida de um tampão para auxiliar na extração de compostos ácidos ou básicos, e o outro, um solvente orgânico ou mistura de mais de um, que idealmente terá maior seletividade aos analitos de interesse, deixando o máximo possível de proteínas, fosfolipídeos e sais na fração aquosa (Figura 4).

Quanto mais seletivo for esse solvente ou mistura de solventes, menor a interferência dos componentes endógenos da matriz durante a análise, especialmente para LC-MS/MS. Essa fase orgânica pode ser evaporada com a finalidade de concentrar os analitos extraídos, melhorando assim a sua detectabilidade na técnica de análise de escolha. Tem a vantagem de ser uma técnica simples e barata, com moderada capacidade de limpeza do extrato (PETERS *et al.*, 2018).

Porém, maior volume de solvente e resíduos é usado/gerado. Para análise de 50 analitos entre benzodiazepínicos, antidepressivos e opioides foi usado 500 µL de fluido oral coletado com Quantisal™, extraído com MTBE e analisado por LC-MS/MS. O limite de detecção ficou entre 0,5-1 ng/mL (ARANTES *et al.*, 2021).

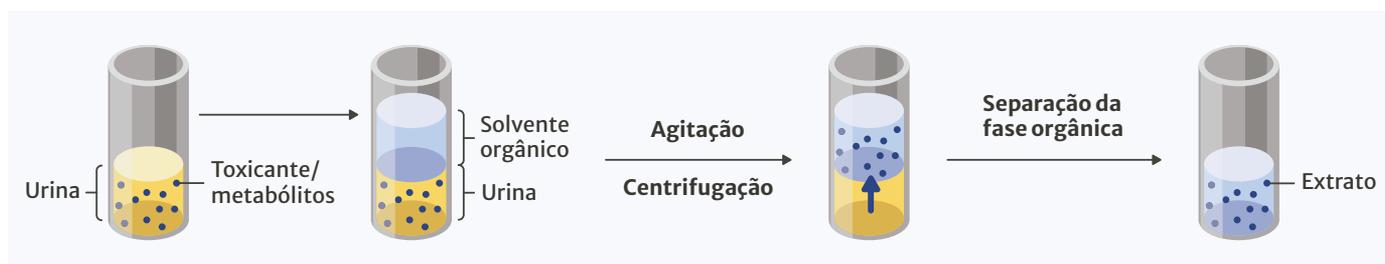


Figura 4. Representação esquemática da extração líquido-líquido (ELL).

Na extração por SPE é usado um cartucho contendo uma fase estacionária (sorvente) onde os analitos da amostra serão retidos (adsorção) até a etapa de sua eluição com um solvente orgânico ou uma mistura deles. Existem diversos cartuchos disponíveis no mercado (ex.: C8, C18, troca aniônica ou catiônica), com seletividades diferentes para vários analitos, diferentes tamanhos de partículas e polaridade (fase normal, reversa e troca iônica). O procedimento de extração envolve 4 etapas, sendo a primeira de condicionamento do cartucho, seguida de adição da amostra, lavagem do cartucho e, por fim, eluição dos analitos (Figura 5).

A lavagem do cartucho deve ser feita com um solvente orgânico com pouca seletividade para os analitos de interesse, para que não ocorra sua eluição antes da etapa de dessorção. Possui a vantagem de poder ser automatizada, de gerar extratos mais limpos, o que reduz o efeito matriz durante as análises por LC-MS e ter alta reprodutibilidade. Porém, tem um custo elevado e não é fácil o seu desenvolvimento (PETERS *et al.*, 2018). Para a análise de 18 antidepressivos, 500 µL de fluido oral coletado com Quantisal™ foram extraídos por SPE de leito misto, com auxílio de 0,75 mL de diclorometano/álcool isopropílico/hidróxido de amônio (70:26:4) e analisados por LC-MS/MS. O limite de quantificação foi de 10 ng/mL (SHIN *et al.*, 2020).

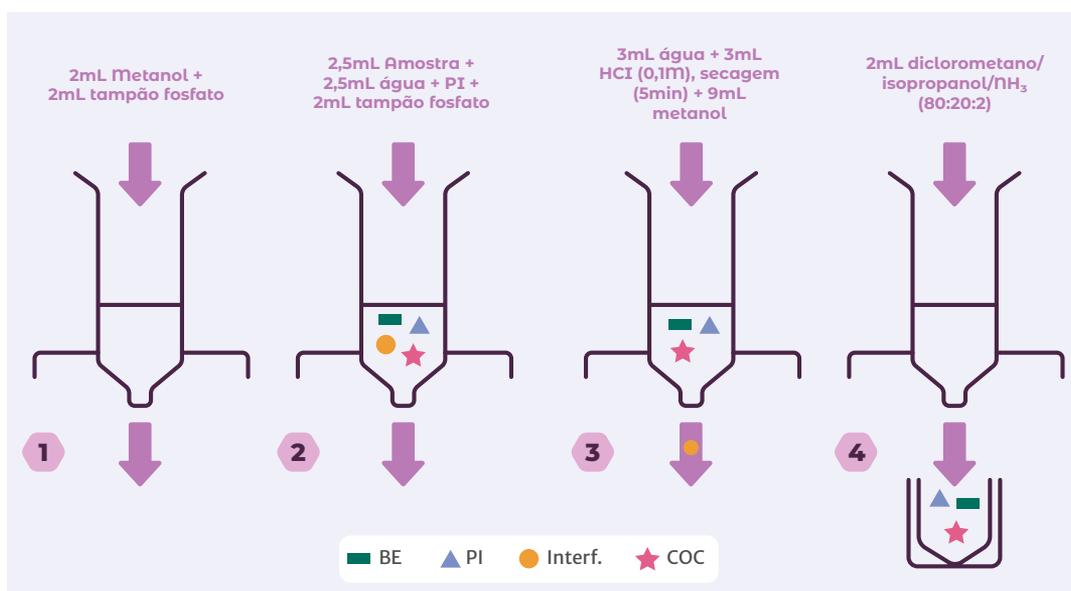


Figura 5. Representação esquemática da extração em fase sólida (SPE).

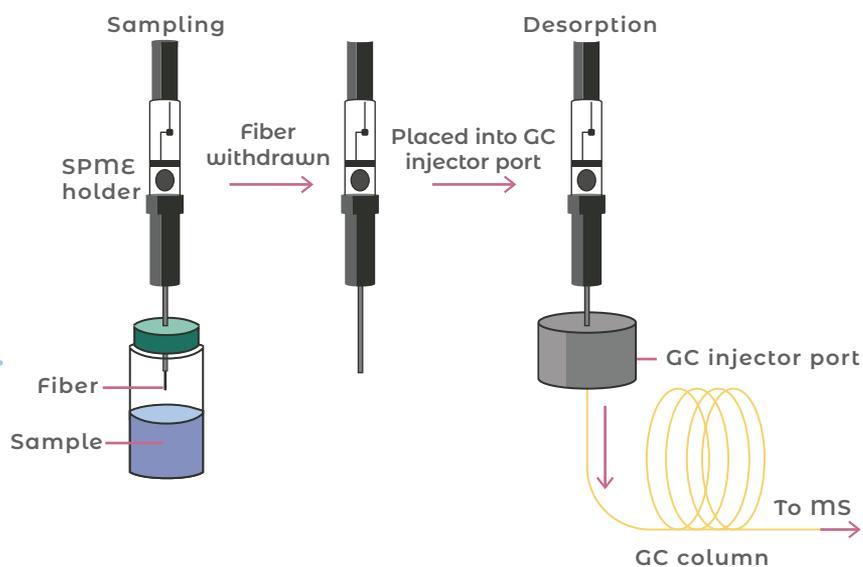
O MEPS segue os fundamentos da extração por SPE, mas em escala em miniatura e, dessa forma, possibilita a redução do volume de amostras e de solventes orgânicos utilizados. Os mesmos tipos de sorventes utilizados em SPE são adaptados para o MEPS, podendo citar entre eles os baseados em sílica (C8, C18), o de troca catiônica (SCX). Este sorvente, entre 1 e 4 mg, é acoplado a uma seringa para que durante a aspiração e dispensação do volume a amostra entre em contato com este e ocorra a extração. É possível ser realizado de forma manual, semiautomatizada (Figura 6) e automatizada com acoplamento direto ao GC ou LC (ABDEL-Rehim, 2011). Para a análise de 21 drogas de abuso e produtos de biotransformação, 300 µL de fluido oral coletados com Salivette® foram extraídos de forma semiautomatizada com 4 mg de uma mistura de sorventes C8 e SCX. A eluição ocorreu com 90 µL de uma mistura de diclorometano/2-propanol/hidróxido de amônio (78:20:2, v/v). Os limites de quantificação ficaram entre 0,5 e 1 ng/mL (ARES *et al.*, 2017).

Figura 6. Micropipeta semiautomática eVol® para uso em microextração por sorvente empacotado (MEPS).
Fonte: <https://www.fishersci.fi/shop/products/sge-evol-xchange-syringes-3/12977586>.

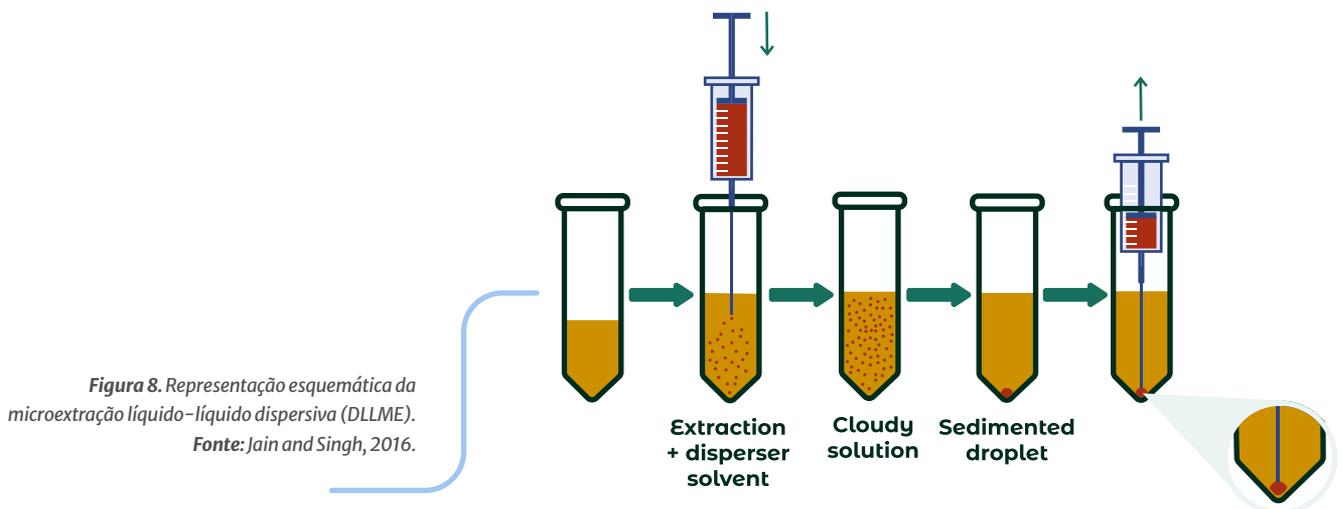


A SPME utiliza uma seringa acoplada a amostra durante o procedimento. Uma fibra conectada a seringa é exposta ao vial para que a extração possa ocorrer (Figura 7). Diversos são os materiais disponíveis na composição da fibra, entre eles, polidimetilsiloxano (PDMS), poliacrilato (PA), carboxeno/polidimetilsiloxano (PDMS/DVB). Devido a sua estrutura, a SPME é mais associada a análises por GC, e a dessorção ocorrerá na porta de injeção (He and Concheiro-Guisan, 2019). Em análise de THC, CBD e CBN em fluido oral, 100 µL de amostra foram usados na extração por SPME usando fibra PDMS exposta por 30 min e analisada no GC-MS. O limite de detecção e de quantificação do THC foram de 0,5 ng/mL e 2 ng/mL, respectivamente (ANZILLOTTI *et al.*, 2014).

Figura 7. Aparato da técnica de extração SPME.
Fonte: He and Concheiro-Guisan, 2019.



A DLLME é baseada em um sistema ternário. Um dos solventes terá o papel extrator e o outro dispersor, de modo que a adição deles na amostra é auxiliada por uma seringa e deve ser feita rapidamente para formar uma nuvem na solução, que se dispersam pela fase aquosa, promovendo uma alta superfície de troca para uma extração eficaz e rápida (Figura 8). O solvente orgânico dispersor deve ser miscível na fase aquosa, como é o caso da acetona, acetonitrila e metanol, por exemplo. Já o solvente orgânico extrator deve possuir densidade maior que a fase aquosa para que ocorra sua deposição no fundo do frasco após centrifugação da amostra (KAHL *et al.*, 2021; REZAEI *et al.*, 2006). Para análise de 6 canabinoides sintéticos por DLLME, 500 µL de fluido oral foi usado tendo acetonitrila como solvente dispersor e clorofórmio como extrator e analisado por LC-MS/MS. Os limites de quantificação foram entre 0,004 e 0,035 ng/mL (TOMAI *et al.*, 2021).



A técnica de extração por QuEChERS é baseada na dispersão de sais que facilitarão a extração dos analitos da fase aquosa para a fase orgânica (efeito *salting out*). Em uma segunda etapa ocorre a extração em fase sólida dispersiva (d-SPE) para reduzir os possíveis interferentes da matriz (Figura 9). Tem por vantagem requerer reduzido volume de amostra e solvente orgânico, gerando, conseqüentemente, menores volumes de resíduos, o que vai de acordo com os princípios da Química Verde ou, neste caso, Toxicologia Analítica Verde (GAT).

A técnica ainda teve evolução para o denominado micro-QuEChERS, onde há redução ainda maior da amostra, sais e solvente utilizados. A redução pode ser aplicada para uma única etapa de adição dos sais. (PERESTRELO *et al.*, 2019). Para análise de metilfenidato, ácido ritalínico e etilfenidato, 100 µL de fluido oral coletados com QuantisalTM foram extraídos com 50 mg de sal de QuEChERS Q150 (uma mistura de sulfato de magnésio e acetato de sódio 4:1, m/m). O limite de quantificação foi de 0,5 ng/mL (CHINAGLIA *et al.*, 2022).

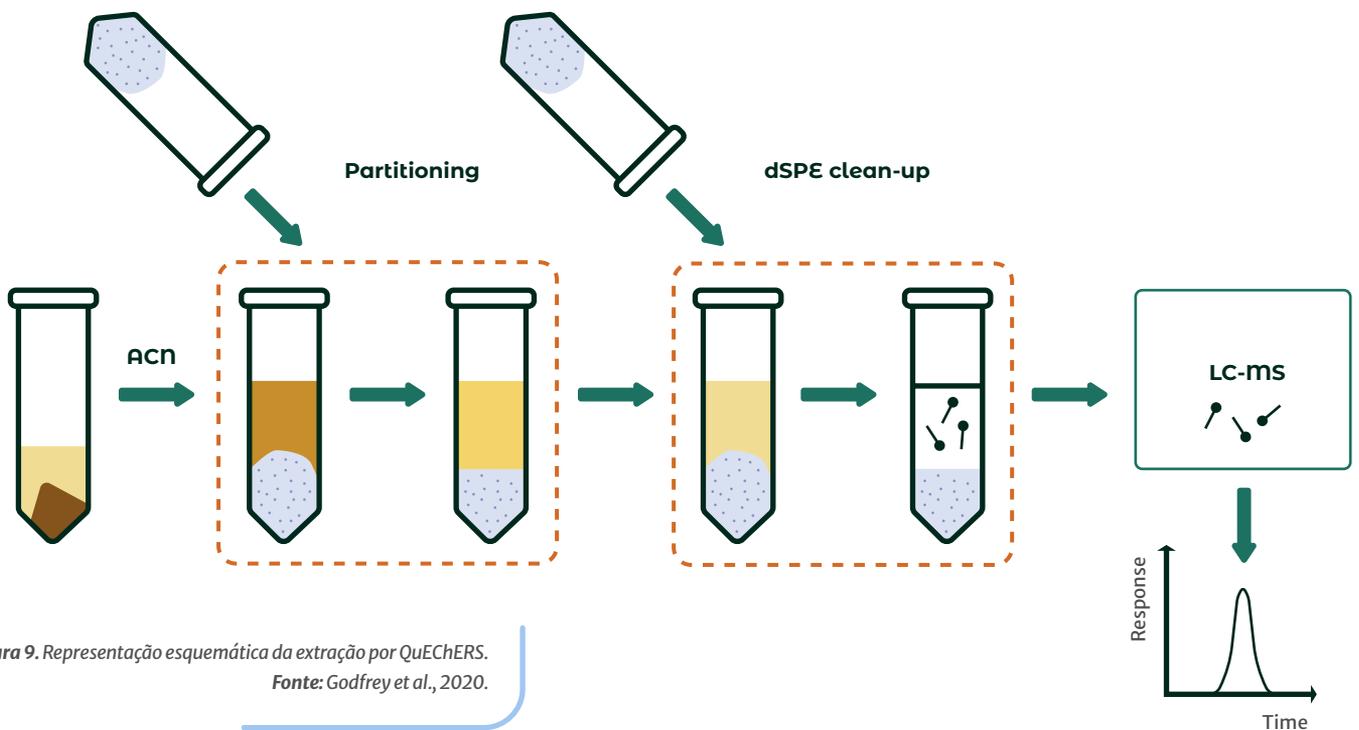


Figura 9. Representação esquemática da extração por QuEChERS.
Fonte: Godfrey et al., 2020.

5.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE OU HPLC)

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica de separação de compostos em solução, que emprega uma fase fixa chamada de fase estacionária e uma fase móvel (líquido). O HPLC de maneira geral apresenta os seguintes componentes (Figura 10):

- Reservatório de fase móvel: são utilizadas garrafas de vidro para acondicionamento de fase móvel e soluções de lavagem. A captação da fase móvel é através de um filtro na ponta de uma linha, filtro o qual tem capacidade de reter partículas que podem prejudicar o sistema.
- Sistema de degaseificação (*Solvent degasser*): o uso de solventes, principalmente os polares, tem tendência de causarem bolhas que afetam o sistema, para evitar isso é utilizado um sistema de degaseificação.
- Bomba (*HPLC pump*): o HPLC necessita de uma bomba de alta pressão para que seu fluxo seja eluído pela coluna. Através de um sistema de bombas, a fase móvel é bombardeada pelo HPLC com vazão constante.
- Amostrador (*autosampler*): local para acondicionamento de amostras (vial ou placas) e sistema de injeção, que pode ser manual ou automático, com volume de injeção determinado pelo usuário. Através de uma válvula, é possível determinar o destino da injeção (para coluna ou para o descarte).

- Forno de coluna (*column oven*): local para acondicionamento da fase estacionária (colunas recheadas com materiais quimicamente preparados).

As moléculas possuem afinidades diferentes com a fase estacionária e a fase móvel, onde a fase móvel é responsável pela eluição do analito na fase estacionária. Os analitos da amostra são adsorvidos (interação com a superfície) na fase estacionária através do processo de adsorção. A adsorção ocorre por um período (tempo de retenção – RT), até que a fase móvel seja capaz de eluir gradativamente os compostos. Um fator importante na separação cromatográfica é a resolução. A resolução é uma medida quantitativa de separação entre 2 picos consecutivos, calculada pela distância entre dois tempos de retenção e a largura da base dos picos. Uma resolução ideal é de no mínimo 1,5. A cromatografia líquida pode ocorrer em:

- Fase normal: A fase estacionária é mais polar e o solvente (FM) é menos polar.
- Fase reversa: A fase estacionária é apolar ou pouco polar e o solvente (FM) é mais polar.



Figura 10. Componentes gerais de um HPLC.

Fatores como comprimento da coluna, diâmetro da coluna, recheio da coluna e tamanho da partícula devem ser considerados na escolha da fase estacionária (coluna cromatográfica) de acordo com o tipo de análise a ser realizada.

- Diâmetro da coluna: diâmetros menores garantem picos mais finos, o que resulta em melhor sensibilidade. Neste caso, para a escolha do diâmetro deve-se considerar a vazão de trabalho do equipamento.

- Comprimento da coluna: o comprimento influencia diretamente no volume morto, tempo de corrida e volume de fase móvel. Ao utilizar colunas menores (50, 75 ou 100 mm de comprimento) se obtém uma maior resolução dos picos cromatográficos e reduz o tempo de corrida das análises.
- Tamanho de partícula: o tamanho da partícula tem relação direta com a eficiência da separação cromatográfica. Tamanhos menores de partículas trazem maior eficiência (melhor separação e picos mais finos), porém acarreta uma maior pressão da coluna no sistema.
- Tipo de fase estacionária: para se escolher o tipo de fase estacionária deve-se estudar o tipo de molécula a ser analisada, sua estrutura e seus grupos funcionais. A Figura 11 a seguir mostra um esquema de escolha do tipo de coluna a ser utilizada de acordo com a molécula de interesse.

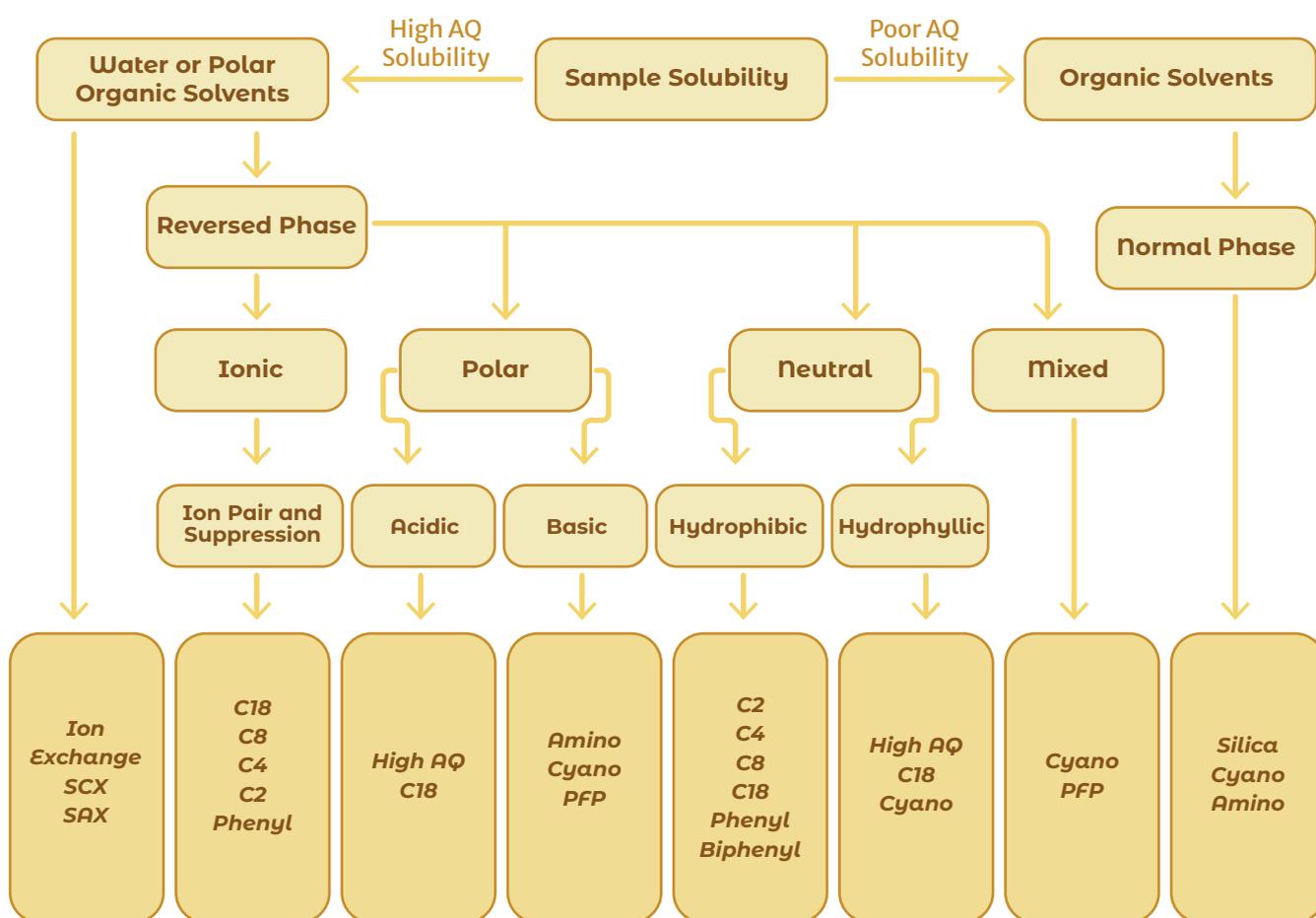


Figura 11. Esquema geral para escolha do tipo de enchimento de coluna cromatográfica. Disponível em: <https://www.ssi.shimadzu.com/products/liquid-chromatography/knowledge-base/hplc-basics.html>.

O modo de eluição cromatográfica pode ser isocrático, quando a proporção de fase móvel permanece constante durante toda a corrida cromatográfica, podendo ser utilizado um único solvente ou uma mistura de solventes. Na eluição por gradiente, a composição da fase móvel é alterada ao longo da separação (corrida) cromatográfica (Figura 12). Nesse tipo de eluição, é necessário que haja um período

de reequilíbrio da coluna. Nas análises toxicológicas é comumente utilizada eluição por gradiente, para garantir que tantos os compostos polares quanto apolares provenientes da matriz não fiquem retidos na coluna cromatográfica e diminua o seu tempo de vida útil.

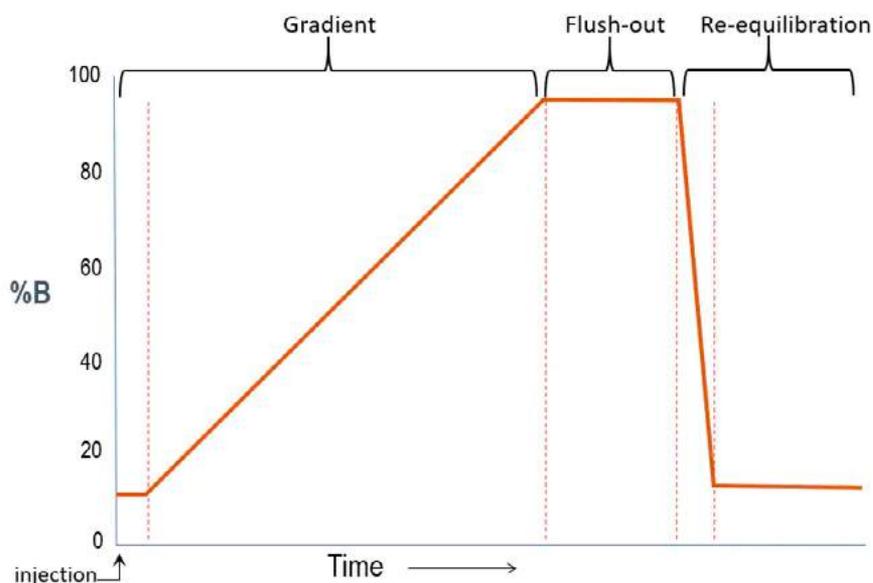


Figura 12. Eluição em modo gradiente, com aumento da proporção de fase móvel B (fase orgânica) durante a análise cromatográfica. Disponível em: <https://www.ssi.shimadzu.com/products/liquid-chromatography/knowledge-base/hplc-basics.html>.

A escolha da fase móvel em cromatografia líquida será fundamental no processo de separação dos analitos enquanto percorrem a coluna cromatográfica, além da função de transporte deles pelo sistema. Para a escolha da fase móvel é necessário considerar as suas características físico-químicas, força cromatográfica e seletividade.

A fase móvel deve ser de alto grau de pureza (grau cromatográfico), dissolver a amostra sem decompor os seus componentes, possuir baixa viscosidade e ponto de ebulição, ser compatível com o detector utilizado e garantir completa miscibilidade quando for usada mistura de solventes (COLLINS *et al.*, 2014).

Quanto maior a pureza da água e dos solventes orgânicos usados no preparo da fase móvel, menor será a interferência da linha de base em decorrência da fase móvel, o que ajuda na detecção de analitos a baixas concentrações, principalmente nas análises realizadas por acoplamento com espectrometria de massas.

A força cromatográfica da fase móvel está relacionada a sua capacidade de interagir com os componentes da amostra e está intrinsecamente relacionada a polaridade dos solventes (série eluotrópica, Figura 13) (Collins *et al.*, 2014).

Polaridade

● Hexano
● Tolueno
● Clorofórmio
● Diclorometano
● Éter dietílico
● Acetato de etila
● MBTE
● Acetonitrila
● Acetona
● 2-propanol
● Metanol

Figura 13. Série eluotrópica para diversos solventes orgânicos.

Para análises toxicológicas por LC-MS/MS será utilizada frequentemente o sistema de fase reversa, onde a fase estacionária é mais apolar que a fase móvel.

Dessa forma, os solventes fortes são os mais apolares e os fracos, mais polares. Solventes fortes diminuem a retenção, enquanto os solventes fracos aumentam a retenção. O ideal é que o analito tenha alguma retenção na coluna cromatográfica, mas que consiga eluir sem exigir análises demasiadamente longas e/ou que gere alargamento do pico (COLLINS *et al.*, 2014).

O nomograma (Figura 14) ajuda a estimar a composição de uma fase móvel que levará a uma mesma retenção quando da substituição do solvente orgânico. A troca da fase móvel pode levar a um aumento na resolução cromatográfica e, em alguns casos, até inversão da ordem de eluição dos compostos (Figura 15).

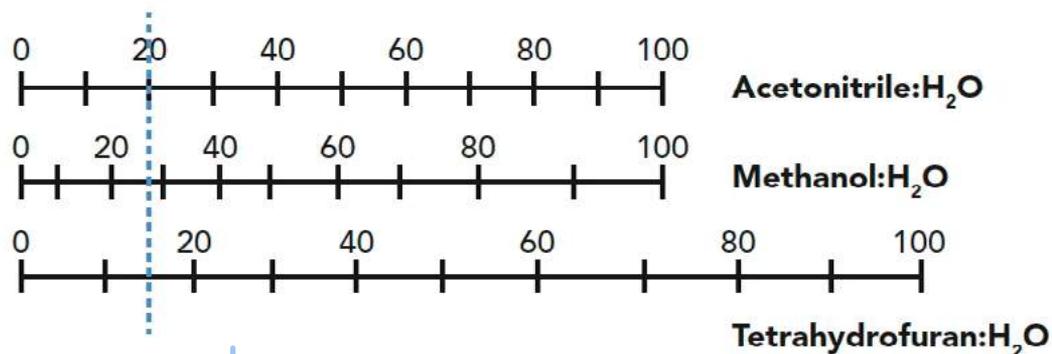


Figura 14. Nomograma entre acetonitrila, metanol e tetrahidrofurano. Disponível em: <https://www.chromatographyonline.com/view/essentials-of-ic-troubleshooting-part-ii-misbehaving-retention-times>.

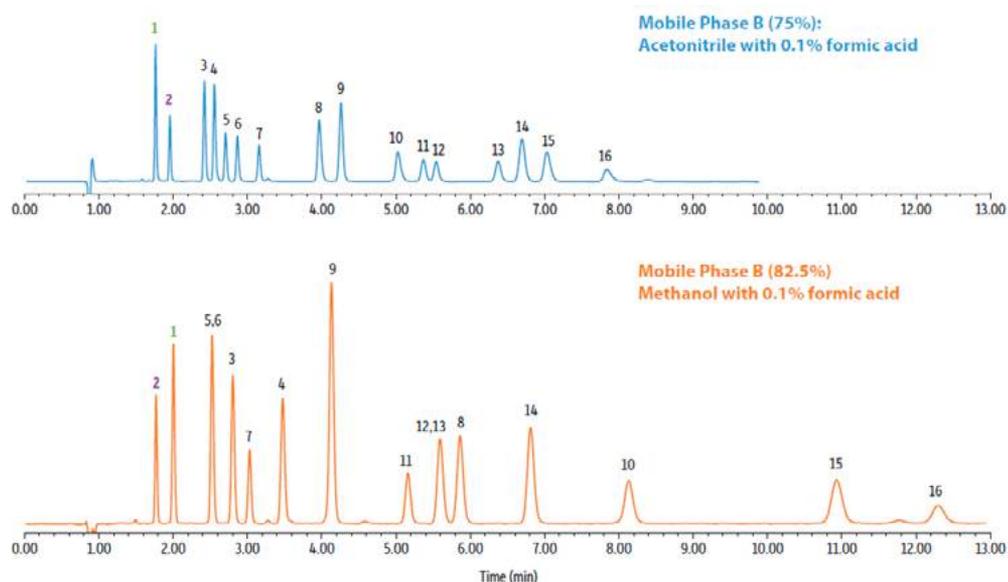


Figura 15. Exemplo de alteração da seletividade na separação cromatográfica em fase reversa para diferentes composições de fase móvel. Observação: força de eluição metanol/acetonitrila foi ajustada para separações em tempos de análise equivalentes. Disponível em: <https://www.restek.com/row/technical-literature-library/articles/effect-of-organic-solvent-on-selectivity-in-LC-separations/>.

Os aditivos e tampões usados na fase móvel tem o objetivo de manter o tempo de retenção das corridas cromatográfica mais reprodutíveis, além de promover a ionização dos compostos iônicos presentes na amostra. Alguns dos aditivos voláteis comumente empregados em LC-MS/MS são o ácido fórmico, formiato de amônio, acetato de amônio, ácido acético e ácido trifluoroacético (MALLETT *et al.*, 2004).

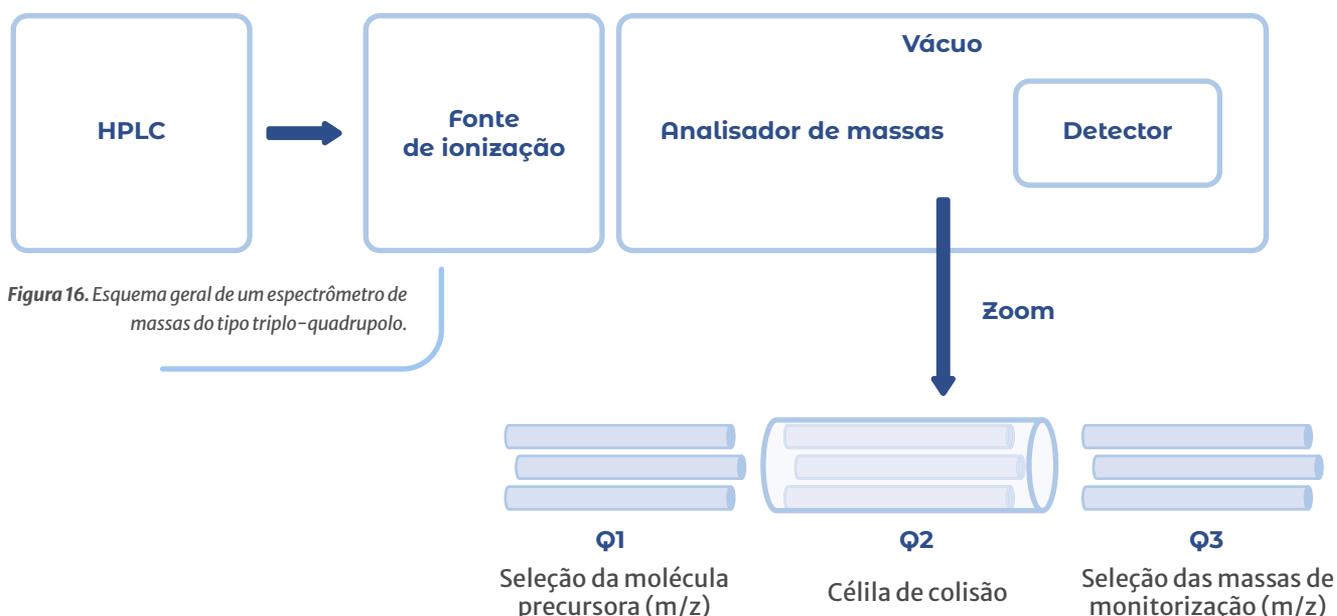
O preparo da fase móvel deve seguir o mesmo procedimento para evitar flutuações no desempenho cromatográfico devido a diferenças no preparo. O ideal é possuir frascos de vidro separados para armazenamento apenas de fase móvel, assim como um balão volumétrico e béquer separados para o preparo da fase a fim de

evitar contaminação com outras soluções do laboratório. A lavagem (“rinsagem”) deve ser feita apenas com água ultrapura e solvente orgânico, sem o uso de detergentes.

5.5 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A espectrometria de massas é uma técnica analítica, baseada em criação de íons em fase gasosa, que detecta e identifica moléculas através da medição da relação massa/carga (m/z) dos compostos, representados por um espectro de massa que condiz com a m/z e/ou fragmentos do composto. As massas dos fragmentos e a sua abundância relativa fornecem informações acerca da estrutura da molécula.

Os espectrômetros de massas são compostos por uma fonte de ionização, analisador de massas e detector (que devem estar sob vácuo) e geralmente são acoplados a outras técnicas analíticas, como a cromatografia líquida. A Figura 16 representa a composição geral de um espectrômetro de massas do tipo triplo-quadrupolo.



Diferentes fontes de ionização podem ser aplicadas, de acordo com a necessidade de análise, sendo a ionização por elétrons, ionização química, *electrospray* (ESI), ionização química a pressão atmosférica (APCI) e ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) as mais comuns. Algumas fontes de ionização trabalham em pressão atmosférica, enquanto outras dependem de vácuo, como demonstra a Tabela 10 abaixo. As fontes de ionização por elétrons (EI) e ionização química (CI) são comumente acopladas à técnica de cromatografia gasosa, enquanto ESI e APCI à cromatografia líquida.

| TABELA 10 - DIFERENTES FONTES DE IONIZAÇÃO

Ionização sob vácuo	Ionização em pressão atmosférica
Ionização por elétrons (EI)	<i>Electrospray</i> (ESI)
Ionização química (CI)	Ionização química a pressão atmosférica (APCI)
MALDI	Ionização química por fotoionização (APPI)

Nesta unidade, a ênfase será dada a fonte de ionização por ESI, uma das principais técnicas utilizadas para LC-MS/MS na toxicologia. Essa técnica é abrangente, permitindo a ionização de ampla gama de compostos, de baixa a alta massa molecular, para análise de ácidos e bases fracas, e é compatível com diferentes vazões de fase móvel (sendo mais eficiente em baixas vazões). É uma ionização suave, onde um *spray* eletrostático da solução (analito) é bombeada por um fluxo em um capilar metálico, submetido a um campo elétrico, formando um *electrospray*.

A aplicação desse campo induz ao acúmulo de cargas na superfície do líquido, produzindo uma deformação na gota (cone de Taylor) e acarretando a liberação de gotículas carregadas. O solvente da gota, aos poucos, é evaporado com o auxílio de gases nebulizantes e seccantes, onde ocorre a explosão Coulômbica devido à quebra da tensão superficial da gota, produzindo gotículas cada vez menores. Este processo ocorre até evaporação completa do solvente, liberando para o analisador de massas apenas as moléculas ionizadas em fase gasosa.

Os principais analisadores de massas são: quadrupolo (Q), *Ion trap* (IT), tempo de voo (TOF) e FT-ICR, os quais podem ser do tipo sequencial (*tandem*) e híbridos (como por exemplo IT-TOF).

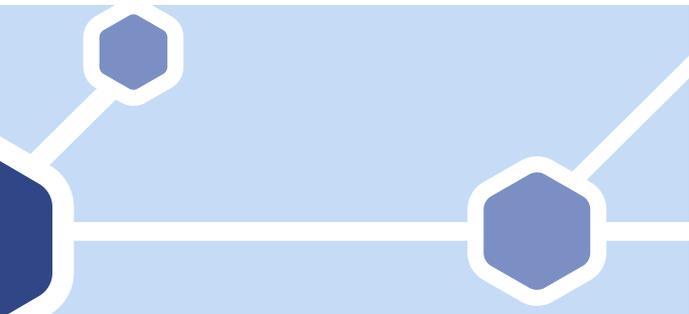
O analisador do tipo quadruplo consiste em um conjunto de 4 polos com sinais opostos, que alternam sinais de radiofrequência entre pares, permitindo a passagem e seleção dos íons para o detector. O tipo triplo quadrupolo é muito utilizado na espectrometria de massas, pois permite a análise de misturas complexas, com alta precisão, exatidão e especificidade. A baixa resolução é uma das desvantagens desta técnica, que pode ser minimizada com uma boa separação cromatográfica.

O triplo quadrupolo permite a análise em modo *fullscan* (TIC), monitoramento de íons selecionados (*selected ion monitoring*, SIM) e monitoramento de múltiplas reações (MRM). O modo de aquisição em *fullscan* é a análise de uma faixa extensa da amostra (definida pelo usuário), sem seleção de um íon específico, enquanto o modo SIM analisa íons especificados pelo usuário. A aquisição em modo MRM é a mais complexa, sensível e seletiva, pois envolve a seleção de um íon precursor (que é selecionado no Q1), a fragmentação deste íon (na cela de colisão, Q2) e seleção destes fragmentos (seleção no Q3).

A fragmentação ocorre através da dissociação induzida por colisão (CID), onde o íon colide com um gás (geralmente argônio), induzindo a fragmentação. O número de fragmentos e sua proporção é dependente da energia de colisão aplicada.

5.5.1 CUIDADOS E MANUTENÇÕES EM INSTRUMENTOS LC-MS/MS

Tenha uma lista de checagem diária, semanal, mensal, semestral e anual dos itens a serem verificados para bom funcionamento do equipamento. Abaixo apresentamos um *check list* para servir de modelo dos itens a serem verificados e respectivas frequências. O volume contido nos frascos de fase móvel e de limpeza do injetor devem ser checados diariamente, assim como o do descarte para evitar extravasamento no chão do laboratório. Os frascos de fase móvel e de limpeza devem ter volume sempre acima do filtro da linha. Para cada *batch* a ser analisado, o volume nos frascos deve ser suficiente para o número de injeções, mais esse volume sobressalente para manter o filtro submerso. Caso contrário, haverá formação de bolhas na linha, que poderá se estender para o sistema, além de forçar a bomba. Em alguns casos a purga da linha não é suficiente para remover todas as bolhas, necessitando remoção manual com auxílio de seringa.



Realizar a purga com frequência das linhas referentes às fases móveis, assim como do injetor ajuda a eliminar possíveis bolhas e/ou possíveis contaminantes no sistema. Caso não seja utilizada durante a semana, é recomendado que a fase aquosa seja descartada e nova seja preparada devido ao risco de produzir fungos.

O *tuning* do espectrômetro de massas deve ser avaliado após abertura da fonte para limpeza ou troca de peças, assim como semestralmente para garantir a calibração do equipamento.

O tipo de amostra analisada e o preparo da amostra vai influenciar na frequência de limpeza da fonte do espectrômetro de massas. O tipo e quantidade de aditivo usado na fase móvel também pode influenciar, como é o caso do acetato de amônio que possui baixa solubilidade em

acetonitrila e pode precipitar na fonte em concentrações acima de 10 mmol/L. Além disso, é preciso se atentar aos valores de pH suportados pela coluna cromatográfica utilizada. Fases com pH extremos podem degradar a coluna mais rapidamente. Ainda, podem levar a fenômeno de supressão do sinal dos íons.

Ao final das análises é prudente que a coluna cromatográfica passe por um método de limpeza, onde as fases móveis são trocadas pelas mesmas, mas sem a presença do aditivo. Ligar a bomba na condição inicial do método (geralmente 5% de fase B), manter por, pelo menos, 5 min após estabilização da linha da pressão e aumentar gradativamente até atingir 100% e finalizar a limpeza e guarda da coluna em 80% de fase B.

O frasco de descarte do gerador de nitrogênio precisa ser esvaziado com frequência, além de sempre checar a pressão do equipamento e se alguma luz de emergência tenha se acendido. A seguir são apresentadas recomendações de verificações periódicas do sistema LC-MS/MS:

● **Diário**

- Verificar os níveis de fase móvel.
- Verificar os níveis de solvente de lavagem.
- Checar a pressurização dos gases (N₂ e ar sintético) do gerador e mostradores de funcionamento.
- Checar a pressurização do argônio no regulador.

● **Semanal**

- Balance da bomba à vácuo.
- Troca da solução dos pistões das bombas - solução de isopropanol: água (90:10).
- Purga dos canais R0 e R3.
- Descarte do reservatório de água do gerador de nitrogênio.
- Aperto de conexões (*mixer*).
- Verificação do nível de óleo da bomba a vácuo.
- Verificação de vazamentos na fonte.
- Verificação dos níveis de descarte.

● **Mensal**

- Limpeza do filtro de espuma do sistema de ventilação do MS.
- Limpeza do cone.

- **Semestral (junho e dezembro)**

- *Tuning.*
- Limpeza da DL e da fonte.
- *Backup* dos dados gerados.

- **Anual (janeiro)**

- Limpeza das lentes.

5.6 OTIMIZAÇÃO DOS ANALITOS DE INTERESSE NO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS

5.6.1 AQUISIÇÃO DE DADOS EM MODO DE ESCANEAMENTO DE MASSAS (*FULLSCAN*)

O desenvolvimento de métodos de análises toxicológicas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (em inglês, *liquid chromatography–tandem mass spectrometry*, LC–MS/MS) começa pela otimização das transições de monitoramento de reação múltipla (MRM, modo de aquisição mais utilizado em equipamentos triplo quadrupolo) no espectrômetro de massas.

Antes de iniciar as atividades, verificar os seguintes itens:

- Checar se os gases estão conectados e ligados (no caso de gerador de nitrogênio).
 - Verificar se pressões de nitrogênio, ar zero e argônio estão adequadas.
- No LC–MS/MS, verificar a posição da fonte de ionização.
 - A distância de 5 mm é recomendada para análises toxicológicas.
 - Valores menores do que 5 mm podem ser testados durante o processo de desenvolvimento de um método, quando houver necessidade de melhor sensibilidade.
- Ligar o LC (módulos).
- Conferir a composição e a quantidade de fase móvel disponível.
 - Caso seja necessário realizar a troca, não deixar o filtro encostar na mão/luva para evitar contaminação.
 - No caso de troca de fase móvel é necessário purgar o sistema por, pelo menos, 3 minutos.

- Conferir o volume de solventes utilizados para lavagem do sistema.
 - Caso seja necessário realizar a troca, não deixar o filtro encostar na mão/luva para evitar contaminação.

Antes de iniciar a otimização é necessário **remover a coluna cromatográfica**. Para este processo deve-se:

- Desligar a vazão de fase móvel no software.
- Retirar primeiro a tubulação de saída da coluna (pode ser retirada desrosqueando com as mãos, sem necessidade de ferramenta).
- Retirar a tubulação conectada na entrada da coluna cromatográfica, com o auxílio das ferramentas corretas. Observação: para desrosquear realizar **apenas 1/4** de volta com as ferramentas e o restante com as mãos.
- Para guardar a coluna deve-se colocar as tampas rosqueáveis nas extremidades desta para evitar secagem da coluna e colocá-la dentro da caixa correspondente. Não deixar coluna que não está em uso dentro do forno do LC, ou sobre a bancada.
- Unir os tubos com o conector de volume zero, primeiro colocando o tubo de entrada da fase (com as chaves necessárias, **apertando inicialmente com as mãos e finalizando com apenas 1/4 de volta** com auxílio das ferramentas) e depois o tubo de saída (apenas com as mãos). Encaixar a conector no suporte do forno.

No computador, abrir *software LabSolutions* (abrir *instrument* e escolher a opção LC-MS). Abrir a pasta que será utilizada:

- Para nova pasta clicar em *create new folder* e desmarcar as opções (*method files, report format files e batch files*).
- Para abrir uma pasta já existente, clicar em *File - select - pasta_X*.
- Para facilitar o processo abrir um método já pronto para utilizar como modelo.
 - *File - open* (selecionar método antigo) - *file - save as* (pasta criada).

Para configurar o novo método, clicar em *edit instrument parameters* - zerar método - *LC time prog* - excluir todas as opções, deixando apenas a quinta linha (*controller*) - deixar em 0,6 min (pois retirou-se a coluna, então esse tempo é suficiente para a injeção chegar no MS) - (Figura 17).

- Na aba *pump*, ajustar para a proporção de 50% de fase B, e vazão 0,4 mL/min (Figura 18).

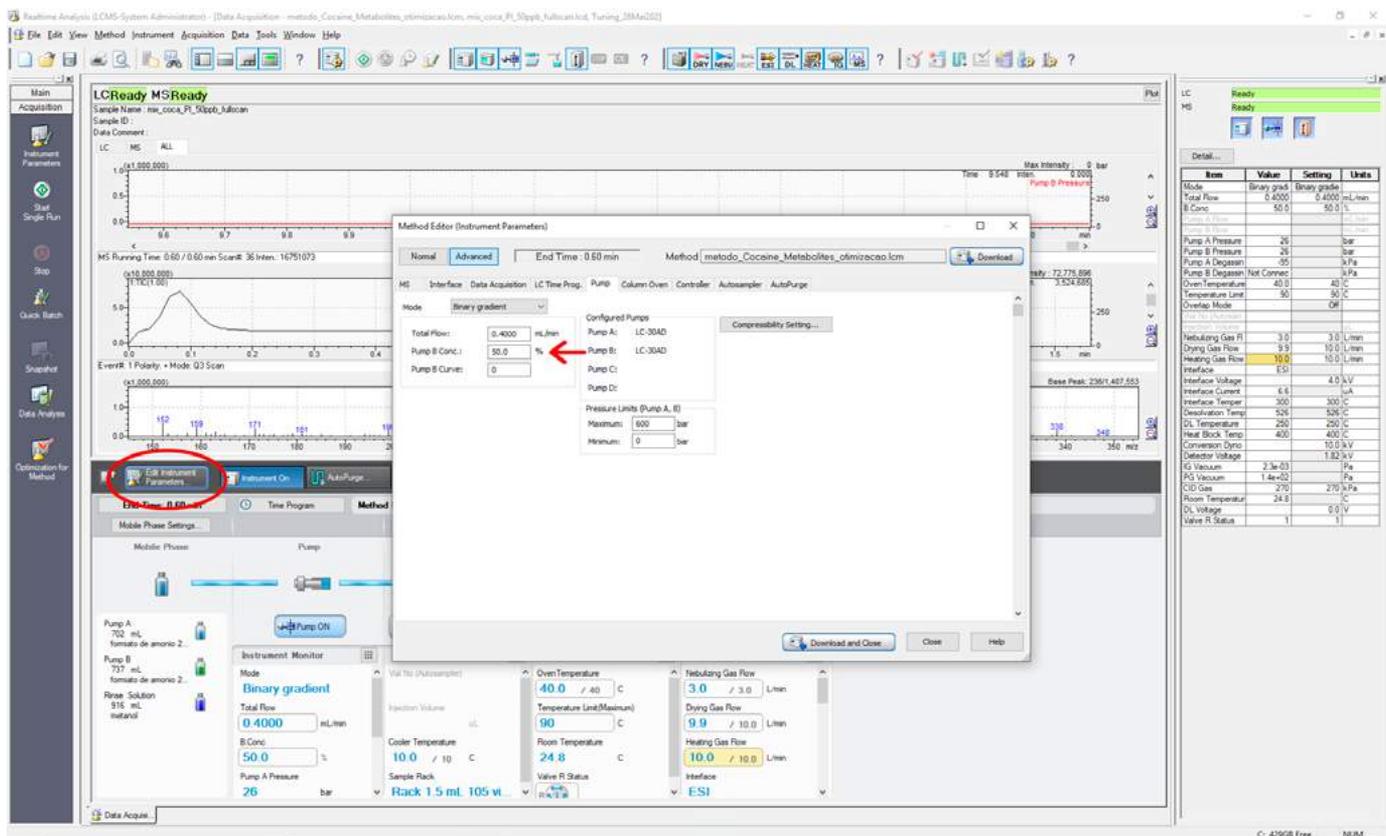


Figura 18. Aba “pump” para programação da vazão e proporção de fase móvel.

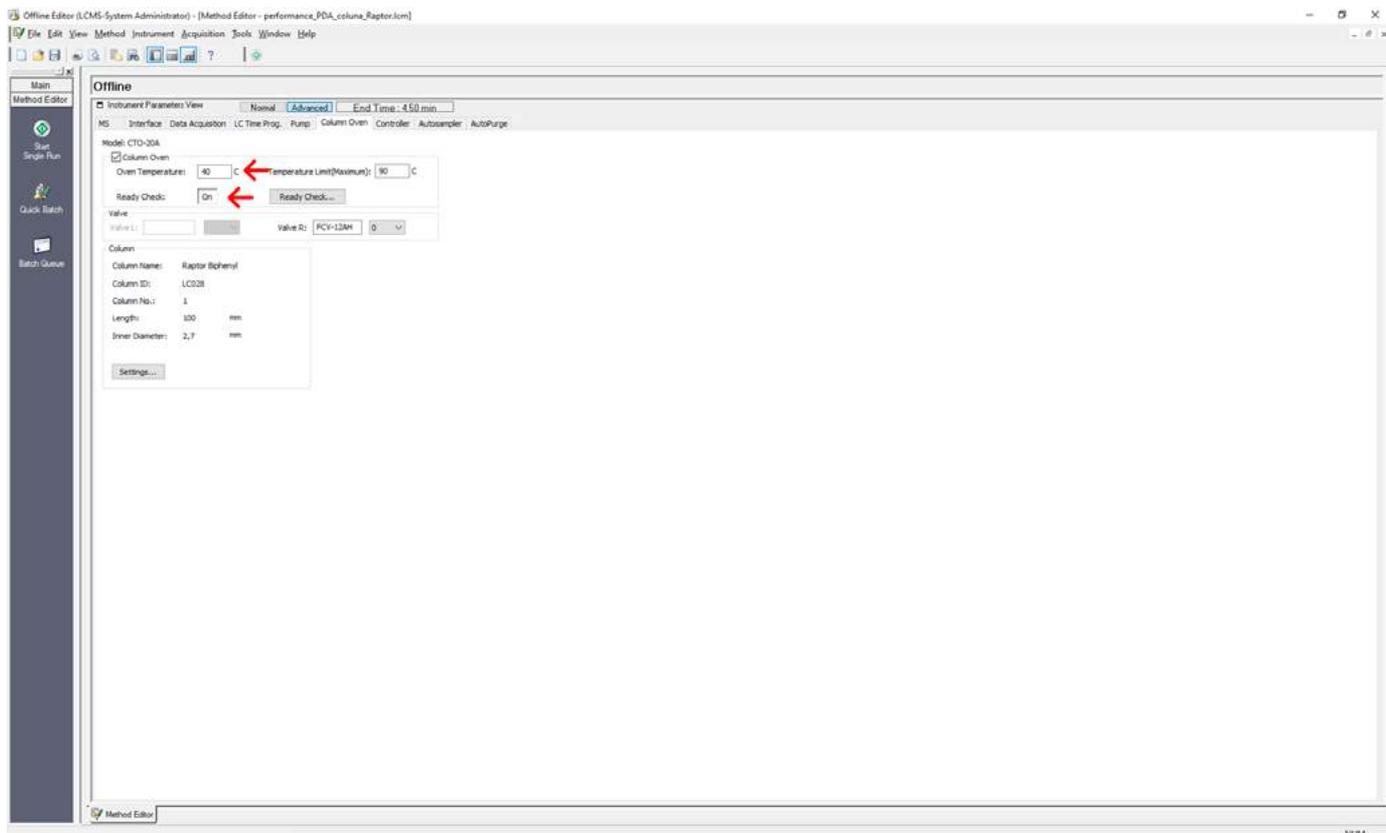


Figura 19. Aba “column oven” (forno de coluna) para programação do valor e checagem da temperatura.

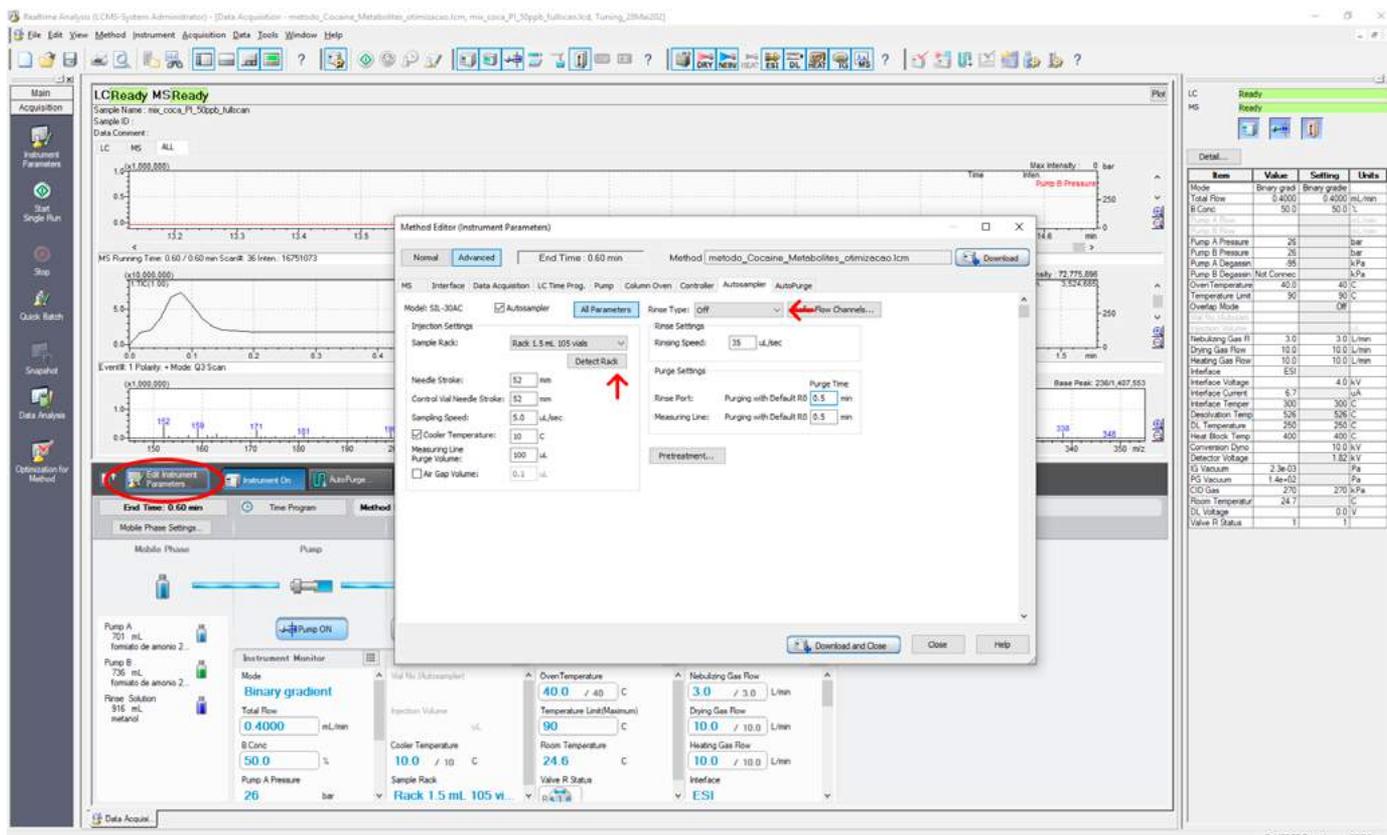


Figura 20. Aba "autosampler" para seleção da rack e programação do sistema de lavagem.

Caso tenha sido trocada a fase móvel, ao início do processo, ajustar a purga do sistema LC (Figura 21), da seguinte forma:

- *Edit method - auto purge* – pelo menos 3 min para cada fase móvel colocada.
- *purge settings - autosampler* – pelo menos em 1 min.

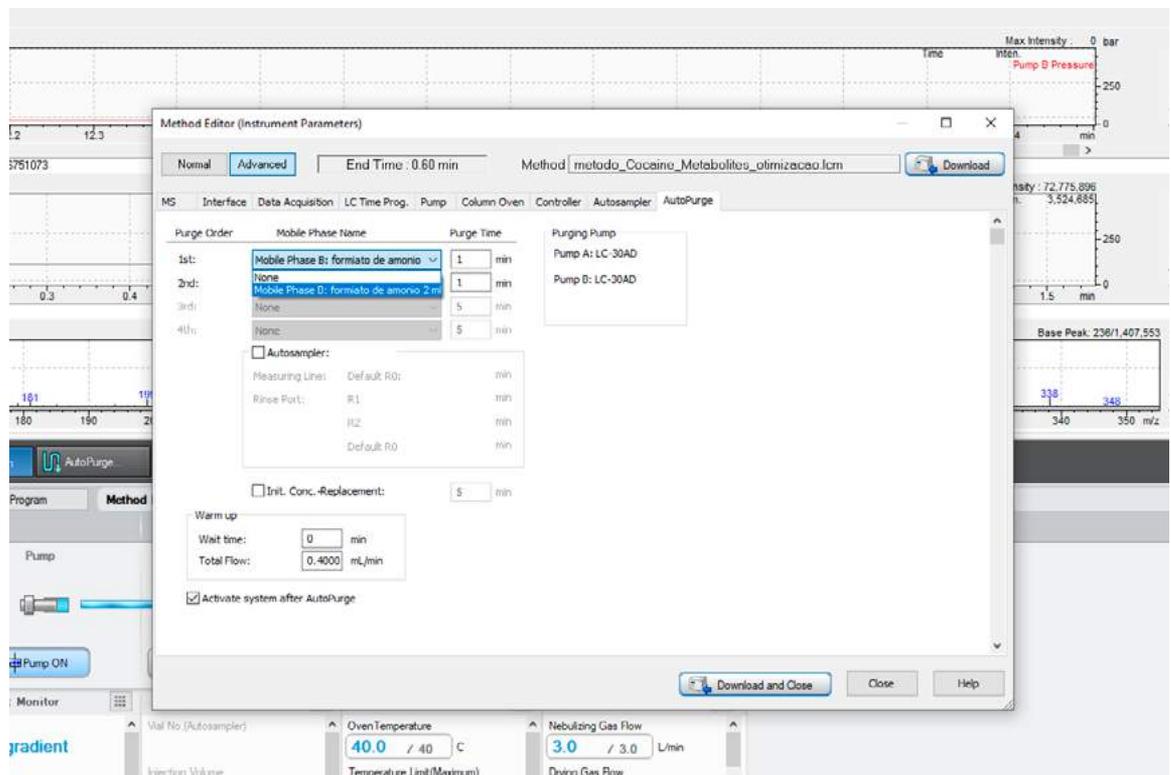


Figura 21. Aba “autopurge” para setar purga.

Na aba **MS**, deletar todas as linhas e selecionar o método **fullscan**, em modo positivo ou negativo, a depender dos analitos que serão otimizados (Figura 22).

- *acq. time*, colocar o tempo de 0 a 0,6 min,
- Em *Start m/z*: inserir o valor de “100”. Em *End m/z*: inserir valor pelo 50 unidades de massa maior do que a massa molecular da substância que será estudada,
- Clicar em *Download and Close*. Isto transmitirá as informações ajustadas do método no software para o instrumento LC-MS/MS,
- Ativar forno de coluna (*oven*) e o sistema de bombeamento (*pump*). Se houve troca de fase móvel, clicar o ícone “*AutoPurge*” para iniciar a purga do sistema.

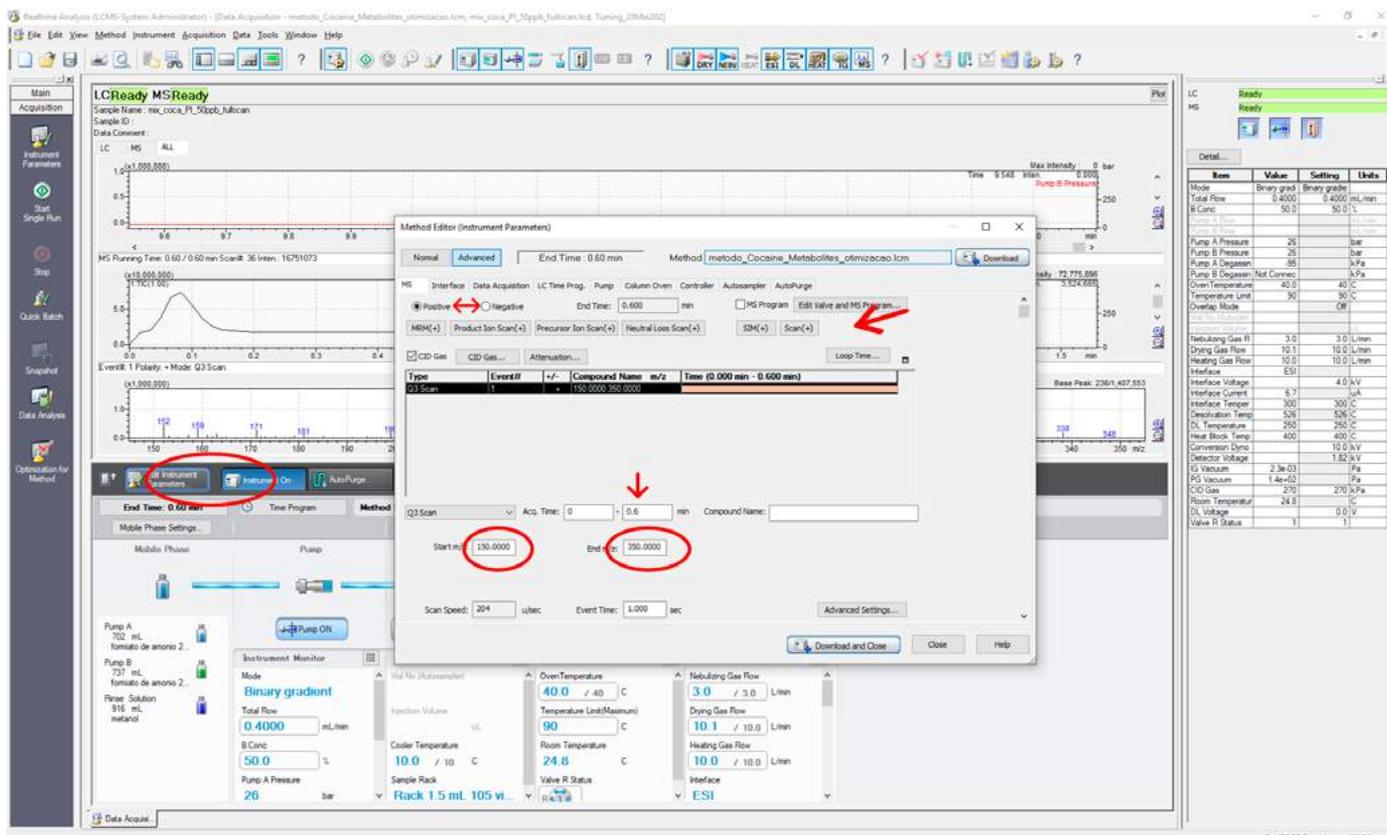


Figura 22. Aba "MS" para ajustar parâmetros relacionados a aquisição de espectros de massas.

A concentração da solução padrão a ser utilizada na otimização do método dependerá do modelo de instrumento utilizado. Por exemplo, para otimizações no equipamento LCMS8060, a concentração utilizada para otimização é na ordem de 50 ng/mL ou menor; para o modelo LCMS8040, a concentração utilizada pode ser na ordem de 200 a 500 ng/mL. As diferenças de concentração/sensibilidade podem ser ajustadas, até certo ponto, pelo volume de injeção.

É possível otimizar diferentes analitos com uma mesma mistura de padrões de maneira simultânea, exceto em casos de analitos de mesma massa molecular. Nesse caso, é necessário realizar otimização individual dos analitos.

Para iniciar uma análise, clicar no ícone corrida *Start Single Run* na lateral esquerda da tela (Figura 23).

- Em *Sample Name*: identificar a substância a ser analisada (nome, concentração).
- Em *Data File*: selecionar pasta para salvar arquivo e inserir o nome do arquivo (pode repetir o nome utilizando em *Sample Name*).
- Colocar o número da bandeja (*tray*) e posição em que está seu *vial* ou posição na placa.
- Em *Injection Volume*: ajustar para que seja injetado 1 µL.

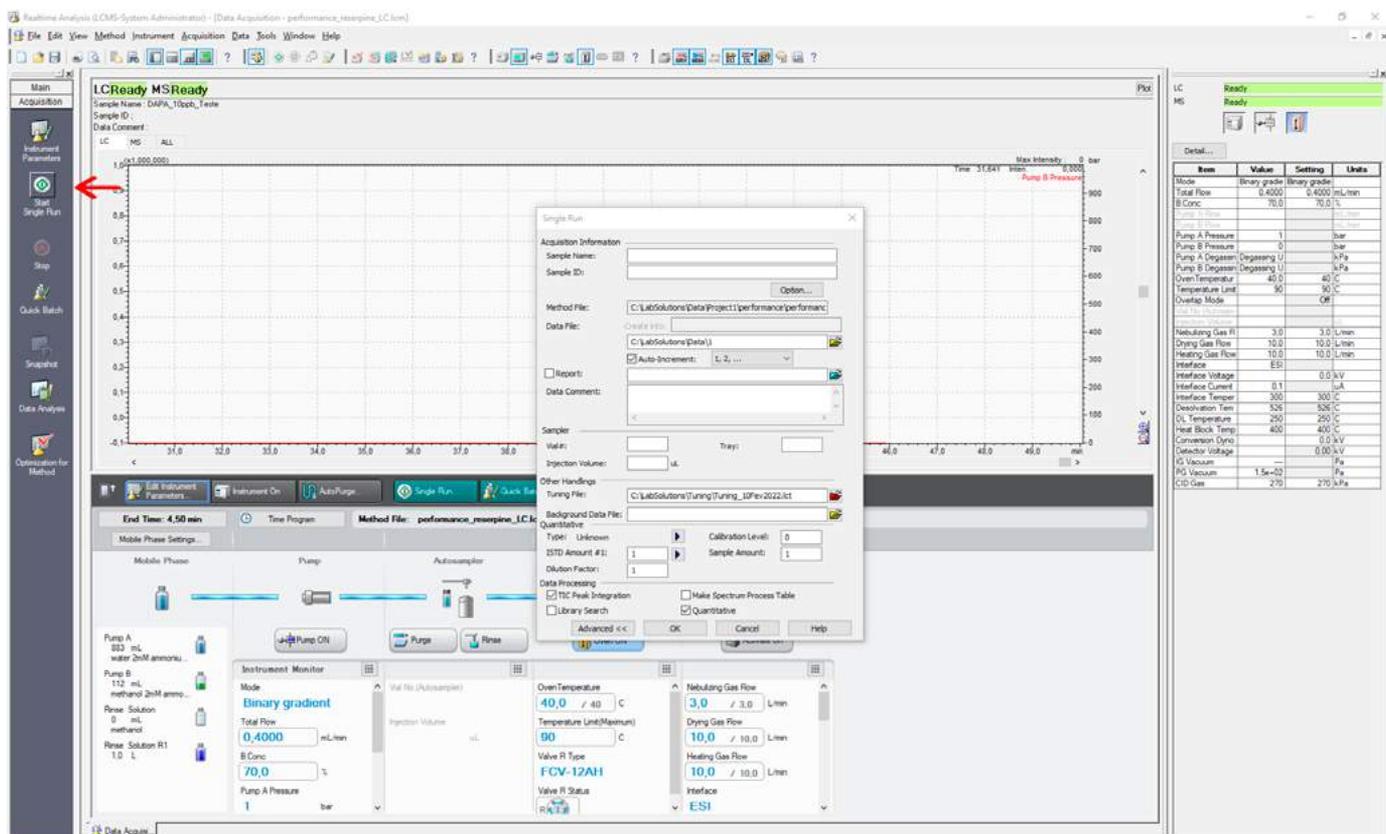


Figura 23. Tela de injeção única (“single run”).

Conferir a análise em tempo real (Figura 24). Para análise do resultado, clicar no ícone “Data Analysis” na barra lateral esquerda.

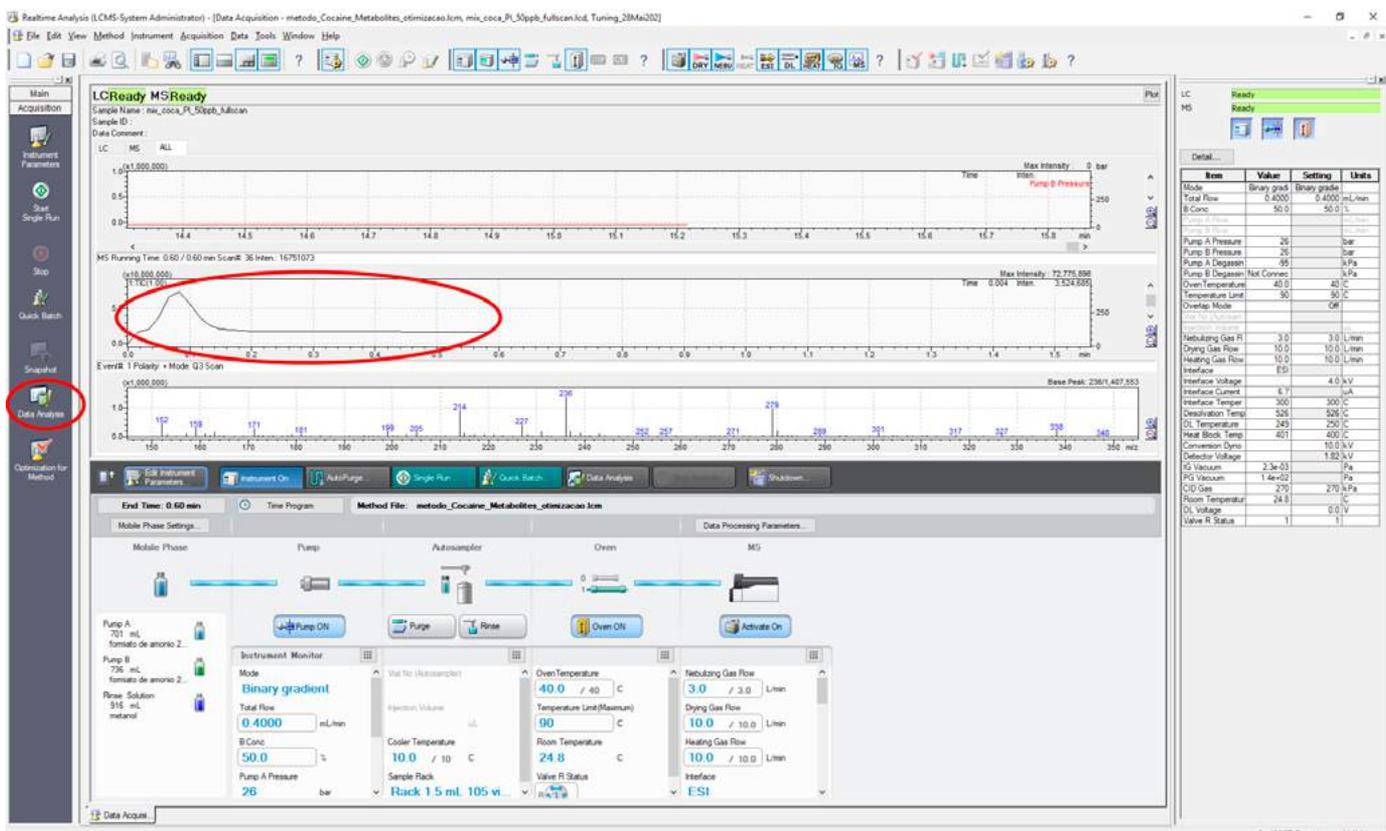


Figura 24. Aquisição de dados em tempo real, e ícone “Data Analysis” utilizado para análise dos resultados.

Quando abrir os resultados no *Postrun* (vide Figura 25), primeiro selecionar a visualização em modo qualitativo (seta azul) e em seguida em “*average spectrum +*” (seta vermelha), selecionar as extremidades do pico (linhas vermelhas). Em “*subtraction spectrum -*” (seta verde) selecionar a linha de base para subtração dela em região onde não houver sinal analítico (por exemplo a região entre as linhas verdes). No espectro de massas é possível observar os sinais detectados em modo *fullscan*.

A Figura 26 apresenta um exemplo de espectro de massas em *fullscan* de mistura de cocaína e seus produtos de biotransformação, na concentração de 50 ng/mL. É possível observar a presença dos íons precursores: AEME (m/z 182), metilecgonina (m/z 200), benzoilecgonina (m/z 290), cocaína (m/z 304) e cocaetilenol (m/z 318).

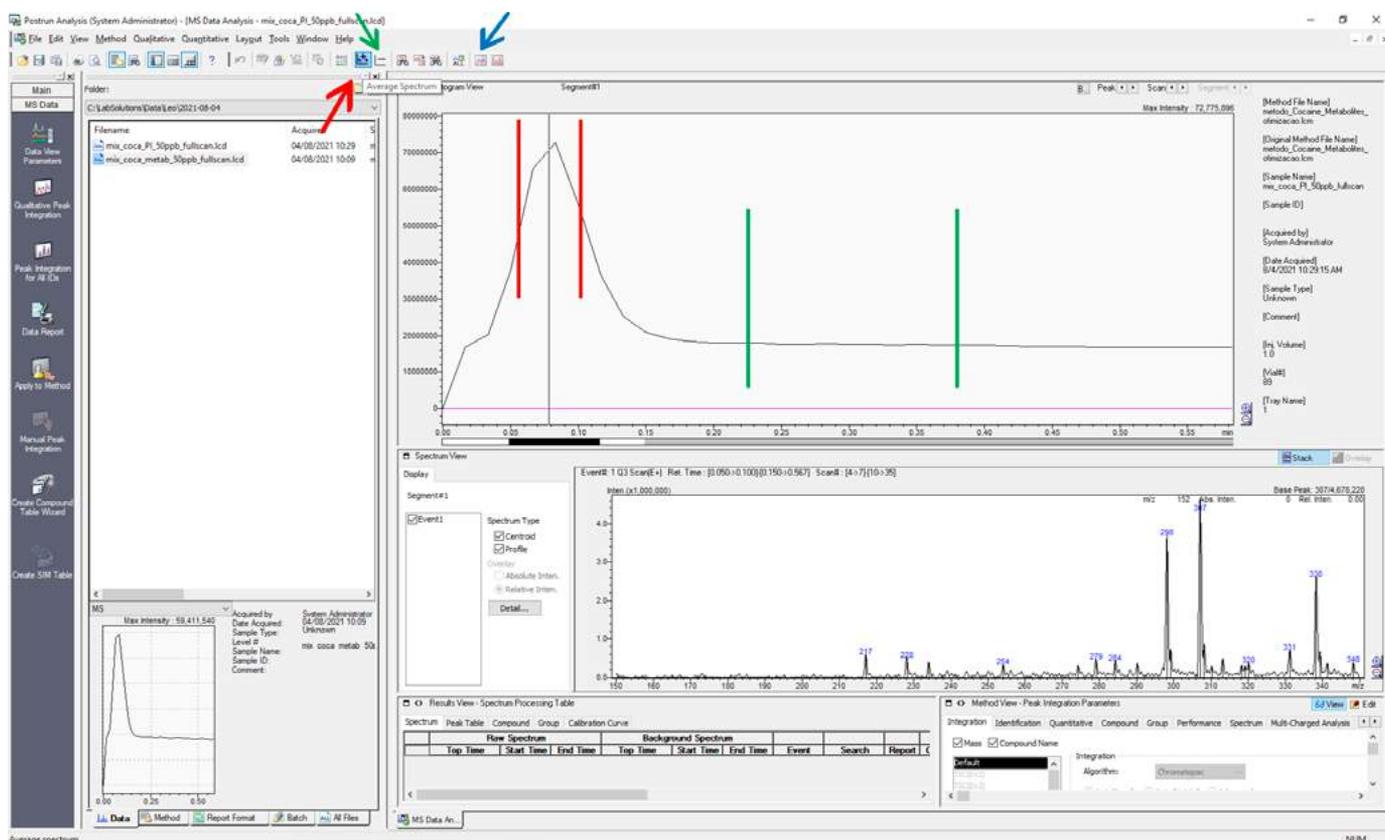


Figura 25. Processamento em modo de análise qualitativa da aquisição em *fullscan*. Primeiro selecionar a visualização em modo qualitativo (seta azul) e em seguida, em “*average spectrum +*” (seta vermelha), selecionar as extremidades do pico (linhas vermelhas). Em “*subtraction spectrum -*” (seta verde) selecionar a linha de base para subtração dela (linhas verdes).

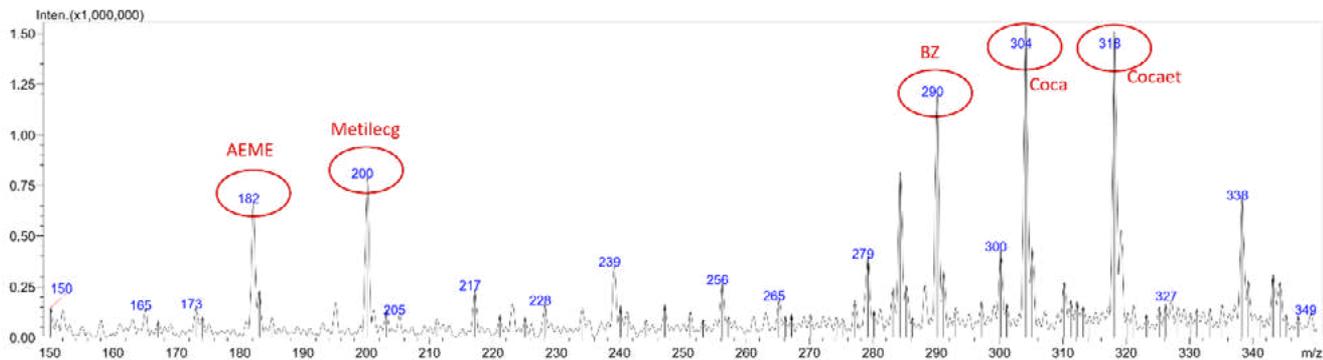


Figura 26. Exemplo de espectro de massas obtido na otimização de cocaína e seus produtos de biotransformação em fullscan.

Após detecção da relação massas/carga (m/z) esperada para o analito a ser otimizado (ou para analitos, se estiver otimizando vários simultaneamente) no modo *fullscan*, passar para a otimização da fragmentação do(s) analito(s).

5.6.2 AQUISIÇÃO DE DADOS EM MODO DE MS/MS (PRODUCT ION SCAN, PIS)

Após método em *fullscan*, realizar leitura em modo *Product Ion Scan* para avaliar os fragmentos gerados com diferentes energias de colisão (em geral, testar 10, 25 e 40 eV). Devem ser realizados testes para todos os analitos, **separadamente (Figura 27)**.

- No campo *Product Ion m/z*, adicionar a massa do analito ionizado (geralmente $M+1$ em modo positivo, e $M-1$ em modo negativo).
- Em *Start m/z*, ajustar o valor para 50; em *End m/z*, ajustar o valor para 20 unidades acima do valor m/z do analito.
- Energia de colisão: 10, 25 e 40 eV (deverá alterar o método a cada experimento com energia diferente).
- Observar quais são os fragmentos que aparecem em cada energia de colisão e qual deles é mais intenso.
- Se necessário, testar outras energias de colisão.
- A melhor energia será aquela em que se obtém, pelo menos 3 fragmentos com intensidades semelhantes (>25% do maior pico).

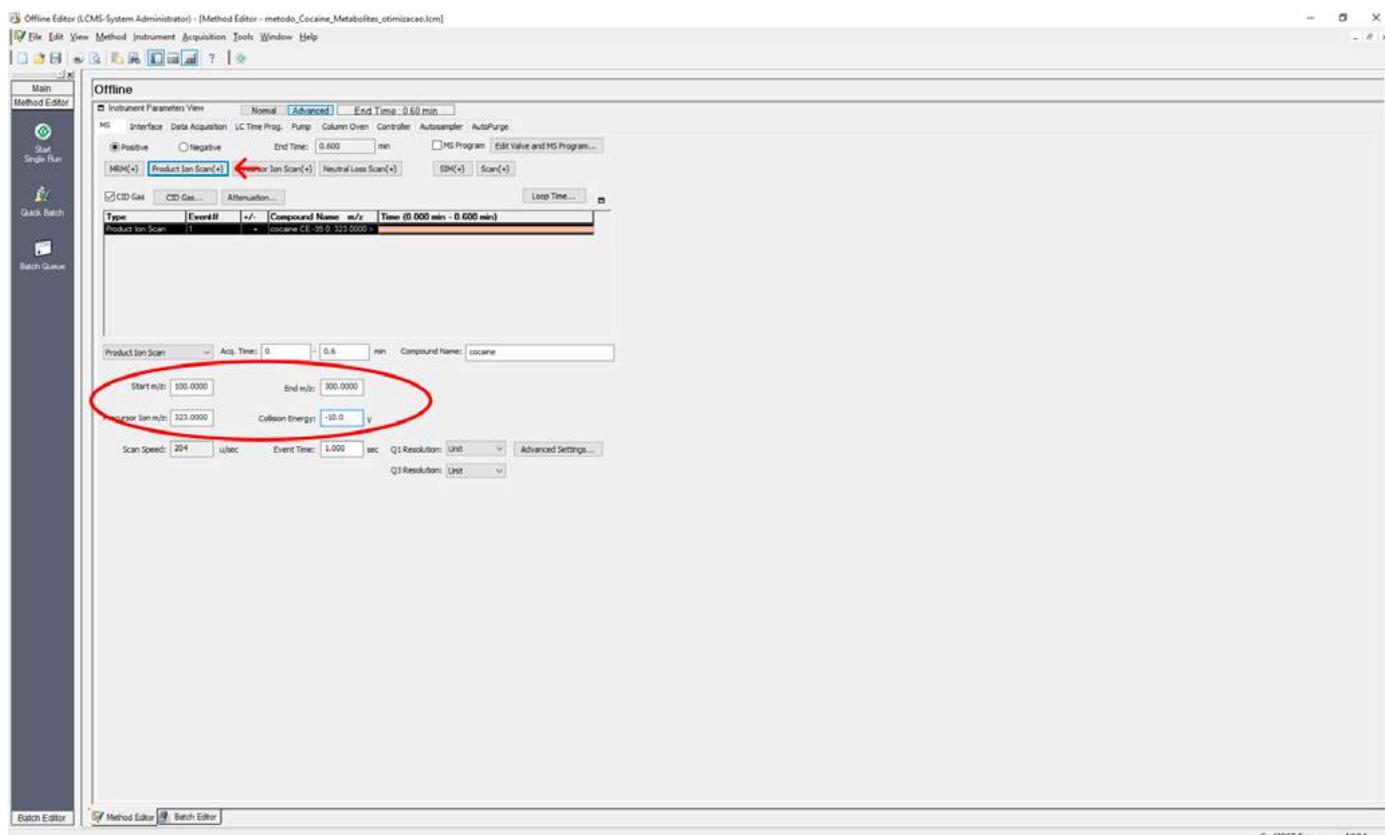


Figura 27. Tela para ajustar os experimentos de Product Ion Scan.

A Figura 28 mostra o espectro de massa em modo PIS com energia de colisão de 10 eV, onde pode ser observada que esta energia é baixa para fragmentação da cocaína.

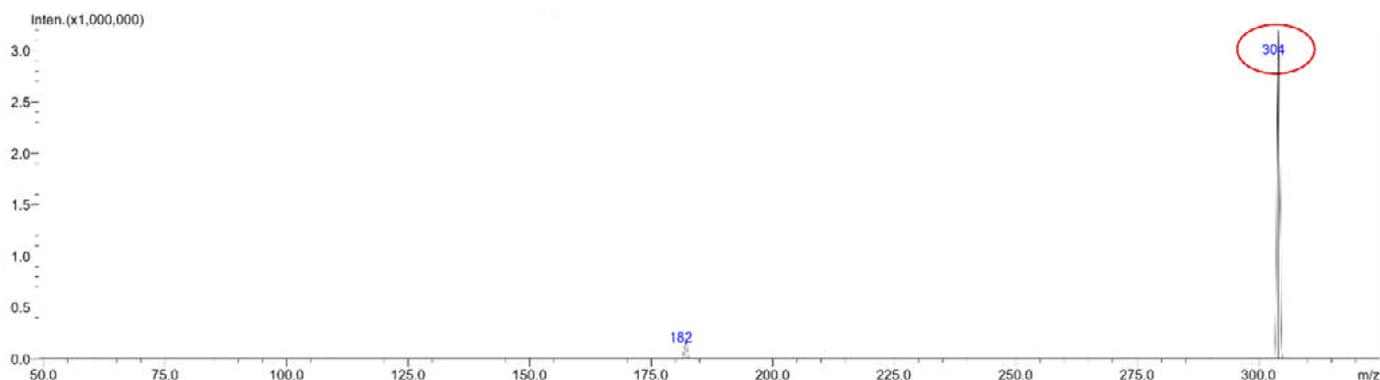


Figura 28. Espectro de massas da cocaína com ionização em modo positivo e aquisição de dados em modo PIS cocaína (CE 10 eV).

Usando energia de colisão de 25 eV, é possível observar diminuição da intensidade o íon precursor (m/z 304) com consequente obtenção de diferentes fragmentos, com pico base do fragmento m/z 182 (Figura 29).

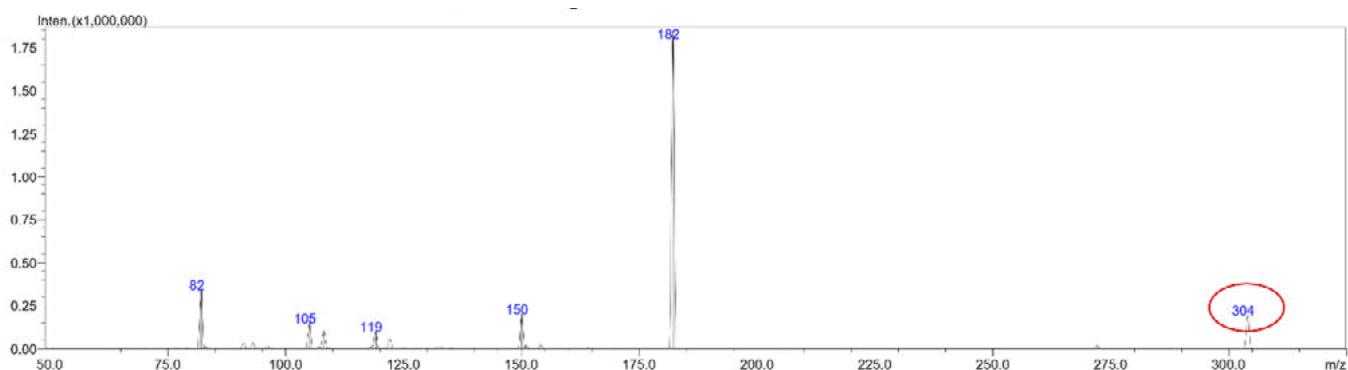


Figura 29. Espectro de massas da cocaína com ionização em modo positivo e aquisição de dados em modo PIS (CE 25 eV).

Quando a energia de colisão é ajustada para 40 eV, já não mais possível observar a presença do íon precursor da cocaína, e observa-se maior população de íons de menor relação m/z (Figura 30).

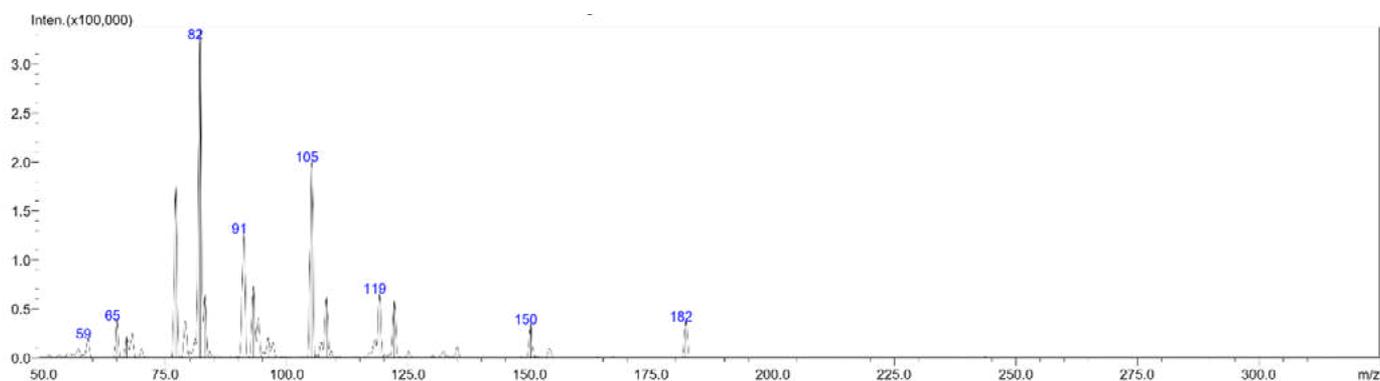


Figura 30. Espectro de massas da cocaína com ionização em modo positivo e aquisição de dados em modo PIS (CE 40 eV).

Como foi possível obter diferentes íons após a fragmentação da cocaína com diferentes energias de colisão, o próximo passo é escolher as melhores energias de colisão para gerar íons com maior intensidade. Para isto o *software* possui uma otimização automática.

5.6.3 OTIMIZAÇÃO AUTOMÁTICA DE MRM

Antes de utilizar esta função, deve ser montado um método em modo MRM com as massas dos precursores e seus íons produto (identificados na aquisição em modo PIS) – Figura 31.

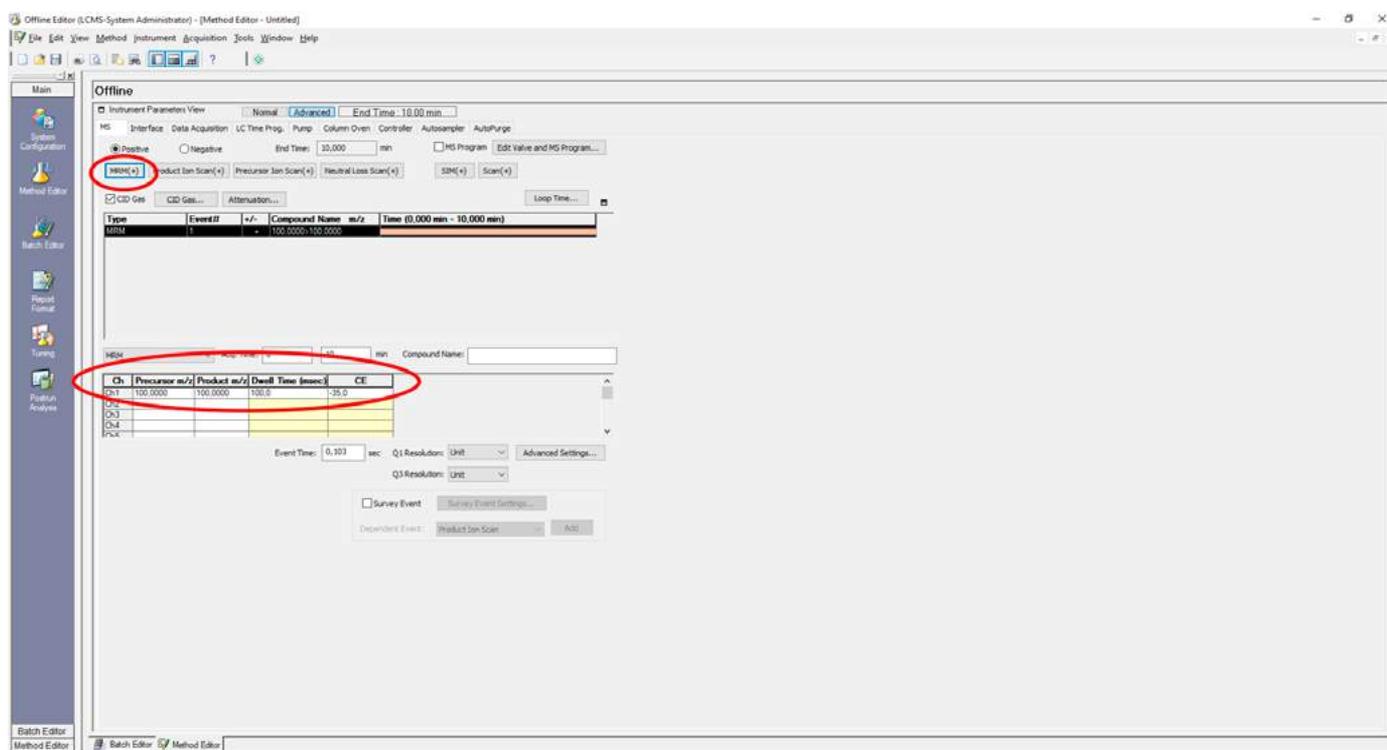


Figura 31. Ajustes para elaboração do método em MRM (montar com dados obtidos no PIS) antes da otimização automática.

Selecionar no canto esquerdo a opção “*optimization for method*” e selecionar “*optimize voltage*” na tela da otimização automática (Figura 32).

Selecionar para ajustar a m/z do precursor e dos produtos, além da otimização de voltagem. Adicionar o *tray* e *vial* correspondente a amostra, e seu volume de injeção. O arquivo de otimização pode ser adicionado no método em uso ou em um novo método. Ao iniciar a otimização (clicando em *start*), a otimização é feita de maneira automática e pode ser colocado para a máquina desligar após a análise (*shutdown*).

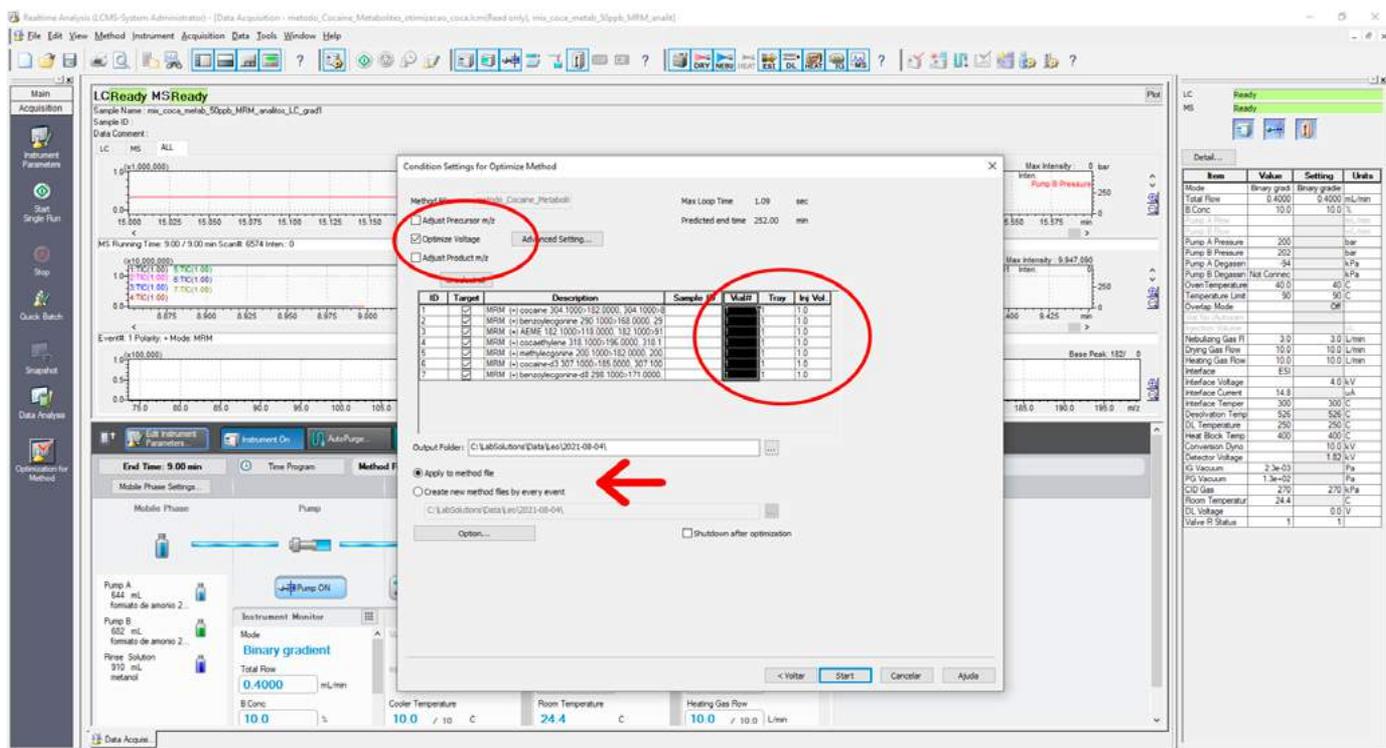
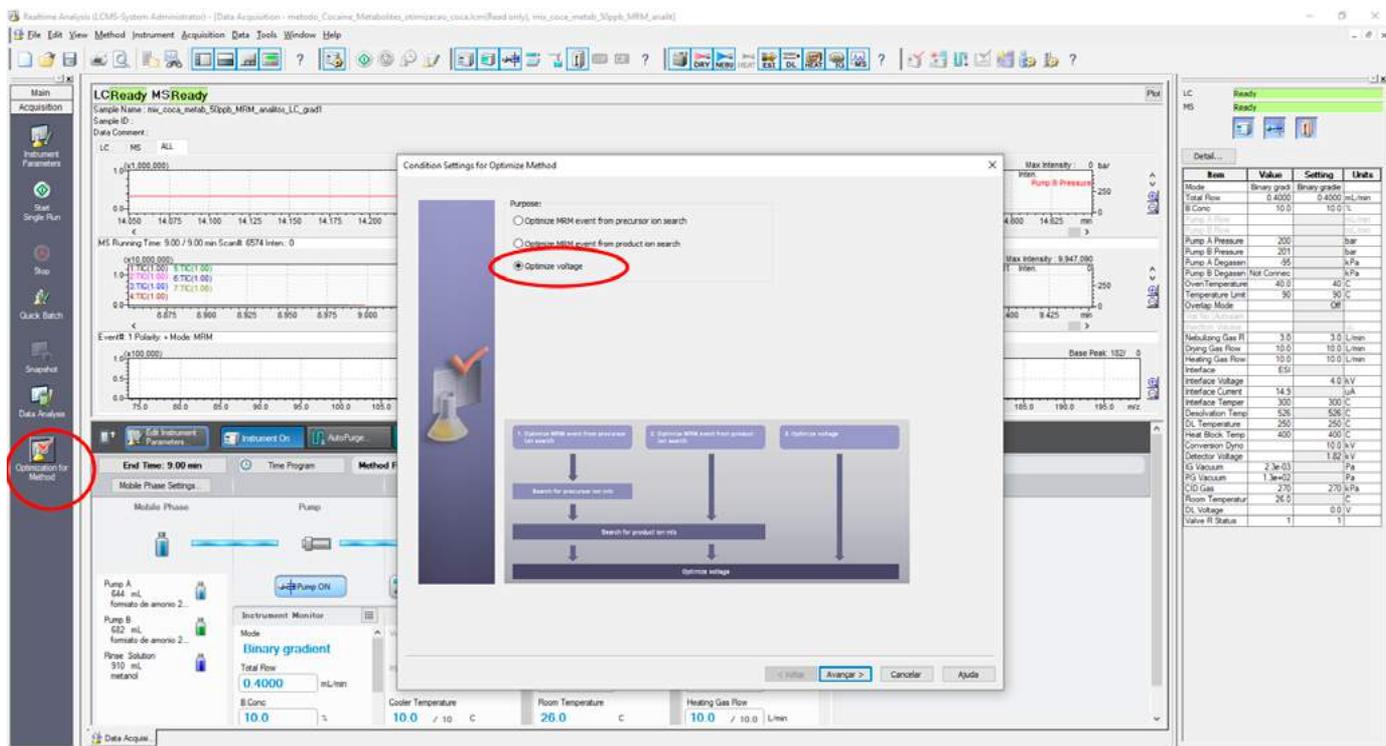


Figura 32. Otimização automática de método MRM.

Após a otimização automática (Figura 33), é gerado arquivo de método com as melhores voltagens de transmissão de íons e melhores energias de colisão para cada MRM. As condições otimizadas são salvas no método selecionado na tela de otimização automática.

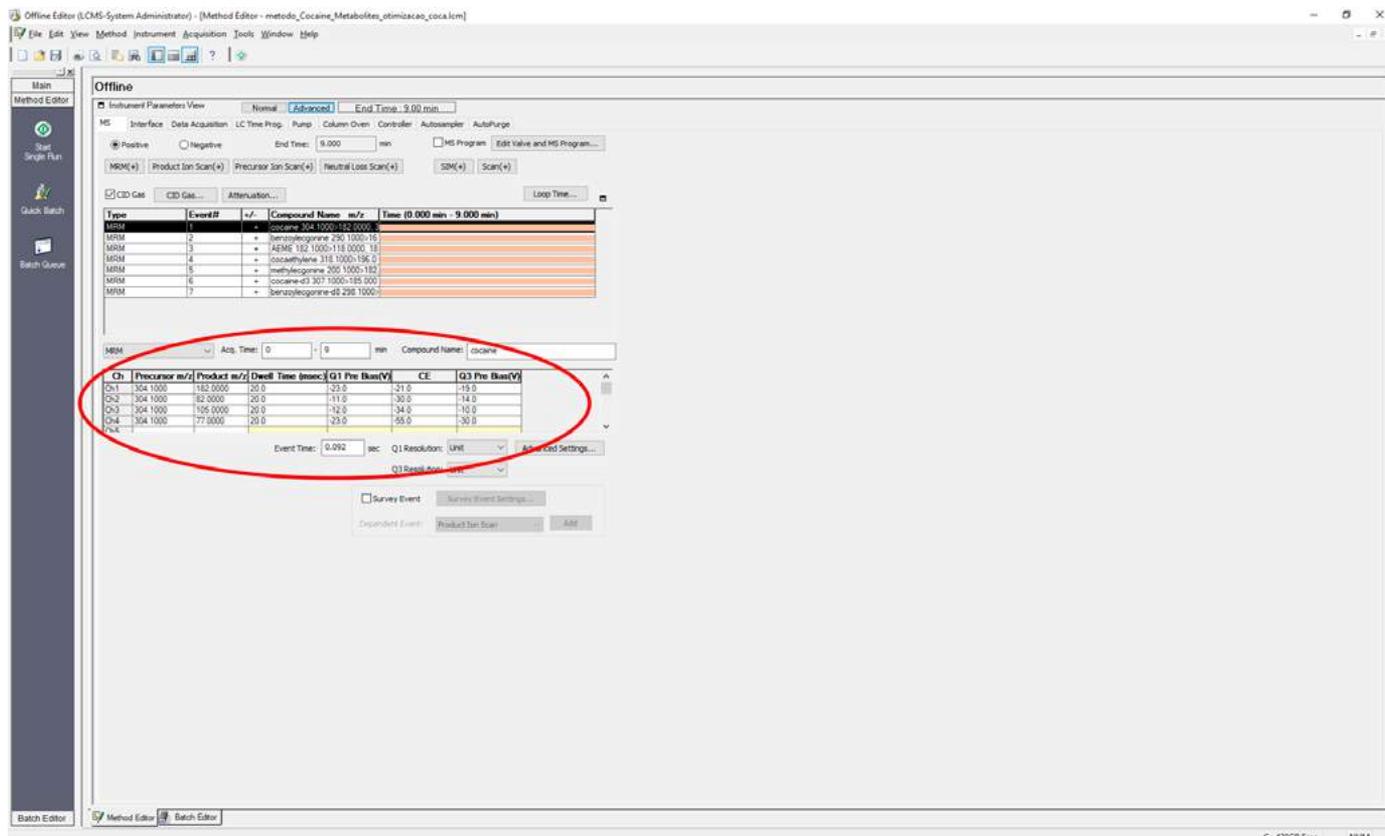


Figura 33. Resultado da otimização automática, com melhores voltagens e energias de colisão para cada MRM.

5.7 CONSIDERAÇÕES SOBRE O DISPOSITIVO DE FLUIDO ORAL A SER USADO E PROCEDIMENTO DE COLETA

Os protocolos de coleta de fluido oral apresentados abaixo consideram o uso do dispositivo Quantisal™, da empresa Immunalysis (Pomona, CA, EUA), que atualmente faz parte da empresa Abbott. Conforme apresentado anteriormente na fundamentação teórica, a amostra de fluido oral coletada com este dispositivo pode ser usada para as análises de triagem e confirmatória, uma vez que existe a mensuração do volume de fluido oral coletado ($1 \pm 0,1$ mL de fluido oral) que será diluído em volume fixo de solução preservante (3 mL de tampão Quantisal™). Desta forma, é possível obtenção de resultados quantitativos adequados.

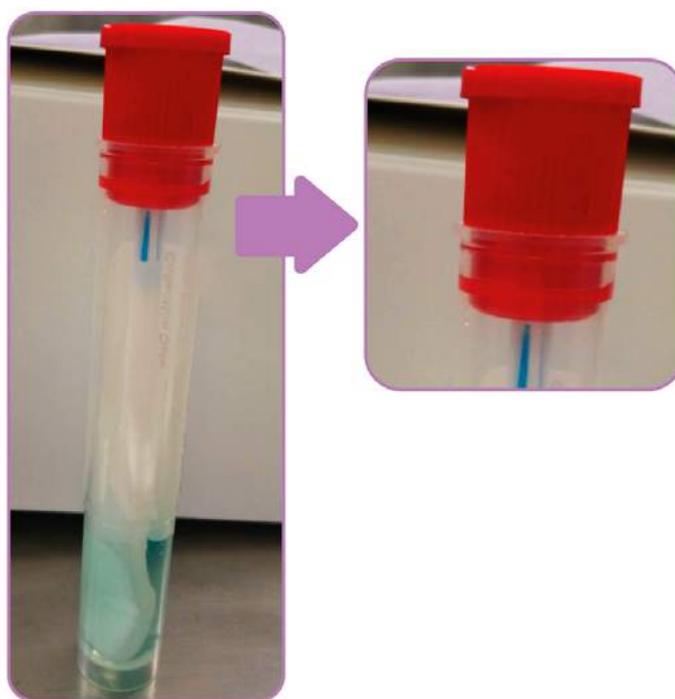
O kit para coleta de amostra vem selado de modo individualizado e é composto por haste contendo almofada absorvente em uma das pontas (em embalagem selada) e dispositivo de armazenamento contendo 3 mL de tampão Quantisal™, conforme apresentado na Figura 34.

Figura 34. Dispositivo de coleta de fluido oral Quantisal™ (Immunalysis, Pomona, CA, EUA).
Foto do autor.



Para a coleta é necessário que o doador esteja a pelo menos 10 minutos sem comer, beber e fumar. O doador deve segurar a haste pelo lado contrário ao da almofada, posicionar a mesma embaixo da língua e pode fechar a boca. Durante a coleta, o doador não deve conversar ou morder a almofada e é aconselhado manter a cabeça abaixada para facilitar a coleta. A coleta é encerrada quando o indicador na ponta da haste fica azul (Figura 35), o que leva cerca de 2-5 min, podendo se estender até 10 min. A haste é acondicionada no dispositivo de armazenamento (tampa vermelha), evitando o derramamento de qualquer volume do tampão preservante e fechando a tampa em seguida até ouvir o travamento desta. Agite levemente a amostra, de modo que o tampão entre em contato com toda a almofada coletora.

Figura 35. Amostra de fluido oral coletado com dispositivo Quantisal™. Seta direciona para ampliação do indicador de volume, que fica azul assim que o volume adequado de fluido oral é coletado (1±0,1 mL).
Foto do autor.



O transporte pode ser realizado sem necessidade de temperatura controlada, mas é aconselhável que seja refrigerada (4 °C). Em dados apresentados pela fornecedora, foi testado o transporte de ida e volta da amostra da costa oeste à leste dos Estados Unidos em modo de envio noturno, com embalagem regulada, mas sem mecanismo adicional de resfriamento. A porcentagem de variação da concentração foi de -10% para o THC. Demais analitos avaliados foram anfetamina, metanfetamina, morfina, oxicodona, fenciclidina (PCP) e benzoilecgonina (Immunoanalysis, 2017).

Os ensaios de recuperação dos analitos, descritos na literatura (da CUNHA *et al.*, 2020), demonstram a capacidade do dispositivo de coleta reter o analito após a coleta. Quanto menor o valor de recuperação, menos adequado é o dispositivo para a realização das análises toxicológicas pois os analitos coletados ficam presos no coletor e não são liberados. O dispositivo Quantisal™ apresentou valores adequados, acima de 89,7% para anfetamínicos, canabinoides e cocaína. Os valores de cada analito são apresentados na Tabela 11.

Os analitos são estáveis no fluido oral coletado com Quantisal™ se a amostra for armazenada em temperatura ambiente por 15 dias, por até 60 dias quando mantida a 4 °C e até 90 dias em temperatura de -20 °C, com exceção da anfetamina que foi estável até 60 dias de armazenamento (Tabela 12). Tempos superiores a esses não foram estudados no trabalho apresentado, portanto não é possível assegurar a manutenção ou decaimento da estabilidade após esse período. Ainda assim, é aconselhável que a amostra seja mantida em temperatura de -20 °C após a realização da análise.

| TABELA 11 - RECUPERAÇÃO DOS ANALITOS DO DISPOSITIVO QUANTISAL™ (CUNHA ET AL., 2020)

Analito	Recuperação no Quantisal™ (%, n=5)
Anfetamina	97,8
Metanfetamina	97,2
Cocaína	n.a.
Benzoilecgonina	n.a.
THC	89,7

	Analito	Recuperação no Quantisal™ (%, n=5)
	Anfepramona	99,0
	Clobenzorex	n.a.
<i>n.a. Não avaliado.</i>	Femproporex	97,3

TABELA 12 - ESTABILIDADE (% DIFERENÇA EM RELAÇÃO AO DIA INICIAL) DE ANALITOS EM 3 TEMPERATURAS DE ARMAZENAMENTO, POR ATÉ 90 DIAS DE AMOSTRAS DE FLUIDO ORAL E COLETADAS COM O DISPOSITIVO QUANTISAL™ (DA CUNHA ET AL., 2020)

Analito	Estabilidade (%)		
	25 °C 15 dias	4 °C 15 / 60 dias	-20 °C 15 / 60 / 90 dias
Anfetamina	-4,3	-0,7 / 6,8	-1,7 / 11,6 / -26,0
Metanfetamina	-1,6	-0,2 / 1,4	-1,2 / 4,9 / -4,5
Cocaína	n.a.	n.a.	n.a.
Benzoilecgonina	n.a.	n.a.	n.a.
THC	1,0	16,0 / -3,9	9,1 / -3,0 / 7,7
Anfepramona	-1,7	-1,9 / 9,8	-2,0 / 17,3 / 16,6

Analito	Estabilidade (%)		
	25 °C 15 dias	4 °C 15 / 60 dias	-20 °C 15 / 60 / 90 dias
Clobenzorex	n.a.	n.a.	n.a.
Femproporex	10,1	13,1 / 12,3	13,4 / 16,1 / -11,4

n.a. Não avaliado.

Da chegada da amostra no laboratório, deve-se observar a integridade do lacre (quando aplicável) e da amostra, assim como seu volume. Caso haja coleta de duas amostras de um mesmo doador (p. ex.: prova e contraprova), confira se as duas amostras são visualmente correspondentes (p. ex.: cor). Conferir as informações presentes na ficha de coleta do material correspondente, coletar alíquota do material para teste de viabilidade da amostra (quando aplicável) ou para o teste de triagem.

5.8 EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO PARA ANÁLISE DROGAS DE ABUSO EM FLUIDO ORAL

O protocolo de extração a seguir foi adaptado de método desenvolvido e validado para análise de *screening* de mais de 100 drogas de abuso e novas substâncias psicoativas (NSP) e do método desenvolvido e validado para análise de benzodiazepínicos, antidepressivos e opioides em fluido oral, disponíveis na literatura (ARANTES *et al.*, 2021; CUNHA *et al.*, 2020). Devido à polaridade do solvente extrator MTBE e hidrofobicidade da benzoilecgonina, sua recuperação é prejudicada e por isso não é incluída nesse protocolo de análise.

5.8.1 DESCRIÇÃO DO PROTOCOLO

Este procedimento descreve o material, o preparo da curva analítica, dos controles, da amostra e os parâmetros cromatográficos do método utilizados para análise de drogas de abuso em fluido oral por cromatografia líquida acoplado a espectrometria de massas (LC-MS/MS).

Método para análise quantitativa de 7 analitos: anfetamina, metanfetamina, femproporex, anfepramona, cocaína, clobenzorex, tetrahydrocannabinol (THC) através de extração líquido-líquido.

A extração líquido-líquido tem o princípio de uso de dois líquidos imiscíveis entre si, sendo um aquoso representado pela matriz biológica (neste caso, fluido oral) e o outro um solvente orgânico ou mistura de solventes orgânicos, que idealmente terá maior seletividade aos analitos de interesse, deixando o máximo possível de proteínas, sais e outros interferentes na fração aquosa. A ELL tem a vantagem de ser uma técnica simples e barata, com moderada capacidade de limpeza do extrato (PETERS *et al.*, 2018).

5.8.2 SIGLAS

- CAL – Calibrador
- CE – Energia de colisão (do inglês, *collision energy*)
- CQA – Controle de qualidade alto
- CQB – Controle de qualidade baixo
- CQM – Controle de qualidade médio
- ESI – ionização por eletrospray (do inglês, *electrospray ionization*)
- LC-MS/MS – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (do inglês, *liquid chromatography tandem mass spectrometry*)
- MRM – Monitoramento de reações múltiplas
- MTBE – éter metil-terc-butílico (do inglês, *methyl tert-butyl ether*)
- PI – Padrão Interno
- TBS – Tetraborato de sódio saturado
- THC – tetraidrocanabinol
- N₂ – nitrogênio

5.8.3 MATERIAL

● Reagentes

Material certificado de referência de anfetamina, metanfetamina, femproporex, anfepramona, cocaína, clobenzorex, tetraidrocanabinol (THC), anfetamina-d₅, metanfetamina-d₅, MDMA-d₅, cocaína-d₃ e THC-d₃ foram adquiridos da Cerilliant (Round Rock, Texas, EUA). Metanol, éter metil-terc-butílico (MTBE), formiato de amônio e ácido fórmico foram adquiridos da Merck (Darmstadt,

Alemanha) e tetraborato de sódio foi adquirido do LS Chemicals (Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil). Os dispositivos de coleta de fluido oral Quantisal™ e o tampão preservante foram adquiridos da Immunoanalysis Corporation (Pomona, EUA). A água ultrapura deionizada foi purificada pelo Milli-Q da Millipore (Billerica, Massachusetts, EUA). Todos os solventes empregados no procedimento de extração devem ser grau HPLC.

● Preparação das soluções padrão

As soluções estoques devem ser preparadas por meio da diluição do material certificado de referência em metanol. A partir das soluções estoque, serão preparadas soluções de trabalho a 10, 30, 100, 250, 500, 750 e 1000 ng/mL.

A partir das soluções estoque também serão preparadas as soluções de controle de qualidade no nível baixo (CQB) na concentração de 30 ng/mL, no nível médio (CQM) na concentração de 400 ng/mL e no nível alto (CQA) na concentração de 800 ng/mL.

A solução de trabalho de padrão interno (PI) deve ser preparada na concentração de 50 ng/mL em metanol de cada substância isotopicamente marcada, a partir da diluição das soluções estoque de anfetamina-d₅ (para quantificação da anfetamina), metanfetamina-d₅ (para quantificação da metanfetamina e femproporex), MDMA-d₅ (para quantificação da anfepramona e clobenzorex), cocaína-d₃ (para quantificação da cocaína) e THC-d₃ (para quantificação da THC). Todas as soluções devem ser diluídas em metanol e armazenadas em frasco âmbar a -20 °C.

Uma alíquota das soluções de trabalho e controles de qualidade devem ser adicionadas a 500 µL de amostras (tampão Quantisal™ e fluido oral) para atingir concentrações finais em matriz, apresentadas na Tabela 13.

| TABELA 13 - CONCENTRAÇÕES FINAIS DOS ANALITOS EM MATRIZ NOS CALIBRADORES (CAL 1 A 7) E DOS CONTROLES BAIXO (CB), MÉDIO (CM) E ALTO (CA)

ng/mL Analito	Cal 1	Cal 2	Cal 3	Cal 4	Cal 5	Cal 6	Cal 7	CB	CM	CA
Clobenzorex	1	3	10	25	50	75	100	3	40	80
Anfepramona	1	3	10	25	50	75	100	3	40	80
Anfetamina	1	3	10	25	50	75	100	3	40	80
Cocaína	1	3	10	25	50	75	100	3	40	80
Femproporex	1	3	10	25	50	75	100	3	40	80
Metanfetamina	1	3	10	25	50	75	100	3	40	80
THC	1	3	10	25	50	75	100	3	40	80

5.8.4 PREPARO DA AMOSTRA

As amostras negativas de fluido oral devem ser coletadas de voluntários que não fizeram uso de nenhuma das substâncias investigadas neste método e serão utilizadas para realização da extração.

1. Transferir 500 µL de amostra (composto por 375 µL de tampão Quantisal™ e 125 µL de fluido oral) para tubo cônico de polipropileno de 5 mL.
2. Adicionar 12,5 µL da solução de trabalho dos calibradores e controles (adicionar 12,5 µL de metanol na amostra negativo).
3. Agitar no vórtex por 5 segundos.
4. Adicionar 25 µL da solução de trabalho de padrão interno.
5. Adicionar 500 µL de tetraborato de sódio saturado (TBS).

6. Adicionar 2 mL de MTBE.
7. Agitar a 2500 rpm por 10 min.
8. Centrifugar a 4500 rpm por 5 minutos.
9. (SE DISPONÍVEL: colocar no freezer -80°C por 20 min, em seguida verter o sobrenadante em tubo cônico de polipropileno de 2 mL, IMEDIATAMENTE após retirada do freezer -80°C).
10. Transferir o sobrenadante em tubo cônico de polipropileno de 2 mL;
11. Secar o sobrenadante a 40°C sob fluxo de N_2 .
12. Ressuspender com 100 μL de mistura de fase móvel A:B (50:50).
13. Injetar no sistema LC-MS/MS.

5.8.5 PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS

Se desejar, utilize o modelo abaixo para registrar suas análises. Lembre-se, no entanto, que este é um material complementar, autoinstrucional, e não haverá correção ou análise dos seus testes.

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido _____ acoplado a espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo modelo _____ (Shimadzu, Kyoto, Japão). A separação cromatográfica foi realizada com coluna _____ mantida a _____ $^{\circ}\text{C}$. A fase móvel foi composta por água ultrapura (A) e metanol (B), ambas contendo ácido fórmico (0,1 %, v/v) e formiato de amônio (2 mmol/L). O gradiente de eluição foi estabelecido como a seguir: _____

_____ com vazão da fase móvel de _____ mL/min e volume de injeção de _____ μL .

O espectrômetro de massas foi equipado com uma fonte de ionização por electrospray (ESI) operando em modo de ionização positivo. Os parâmetros da fonte foram: vazão do gás de nebulização (N_2) a _____ L/min; vazão do gás de aquecimento (ar seco a _____ L/min; temperatura da interface a _____ $^{\circ}\text{C}$; temperatura da linha de dessolvatação a _____ $^{\circ}\text{C}$; temperatura de dessolvatação a _____ $^{\circ}\text{C}$; temperatura do bloco de aquecimento a _____ $^{\circ}\text{C}$; vazão do gás de secagem (N_2) a _____ L/min; e a pressão do gás (Ar) de colisão induzido por dissociação a _____ kPa. As análises foram realizadas em modo de monitorização de reações múltiplas (MRM), na qual foram escolhidas duas transições para cada analito (uma para quantificação e a outra para qualificação).

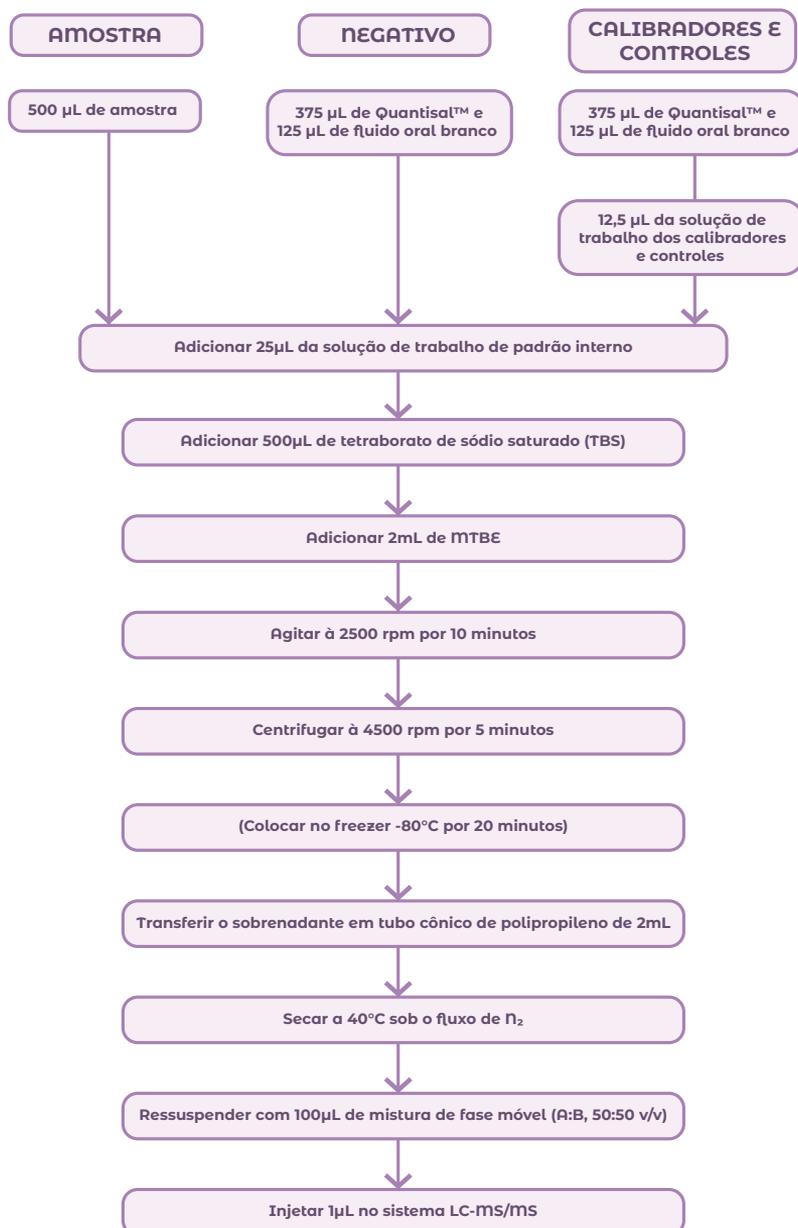
A Tabela 14 apresenta as condições otimizadas do método, contendo as transições de MRM (transições utilizadas para quantificação foram sublinhadas). Os dados foram adquiridos e processados pelo _____ software.

TABELA 14 - CONDIÇÕES OTIMIZADAS DAS TRANSIÇÕES PARA ANÁLISE DE 7 SUBSTÂNCIAS (E 5 PADRÕES INTERNOS) EM AMOSTRAS DE FLUIDO ORAL USANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (LC-MS/MS)

Analito	Transições MRM (m/z)	Dwell time (msec)	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)	Padrão interno
Anfetamina-d ₅						
Anfetamina						
Metanfetamina-d ₅						
Metanfetamina						
Femproporex						
MDMA-d ₅						
Anfepramona						

Analito	Transições MRM (m/z)	Dwell time (msec)	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)	Padrão interno
Cocaína-d ₃						
Cocaína						
Clobenzorex						
THC-d ₃						
THC						

5.8.6 FLUXOGRAMA



5.9 EXTRAÇÃO MICRO-QUECHERS PARA ANÁLISE DE DROGAS DE ABUSO EM FLUIDO ORAL

5.9.1 PROCEDIMENTO

Este procedimento descreve o material necessário, o preparo da curva analítica, dos controles, da amostra e os parâmetros cromatográficos do método utilizados para análise de drogas de abuso em fluido oral por cromatografia líquida acoplado a espectrometria de massas (LC-MS/MS).

O método para análises quantitativas de 7 analitos: anfetamina, metanfetamina, femproporex, anfepramona, cocaína, clobenzorex, benzoilecgonina através de extração por micro-QuEChERS.

A técnica de extração por micro-QuEChERS é baseada na dispersão de sais que facilitarão a extração dos analitos da fase aquosa para a fase orgânica (efeito salting out. Tem por vantagem requerer reduzido volume de amostra e solvente orgânico, gerando, conseqüentemente, menores volumes de resíduos, o que vai de acordo com os princípios da Química Verde ou, neste caso, Toxicologia Analítica Verde (GAT) (PERESTRELO *et al.*, 2019).

5.9.2 MATERIAL

● Reagentes

Material certificado de referência de anfetamina, metanfetamina, femproporex, anfepramona, cocaína, clobenzorex, benzoilecgonina, anfetamina-d5, metanfetamina-d5, MDMA-d5, cocaína-d3 e benzoilecgonina-d8 foram adquiridos da Cerilliant (Round Rock, Texas, EUA). Metanol, Acetonitrila, formiato de amônio e ácido fórmico foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Os dispositivos de coleta de fluido oral Quantisal™ e o tampão preservante foram adquiridos da Immunalysis Corporation (Pomona, EUA). A água ultrapura deionizada foi purificada pelo Milli-Q da Millipore (Billerica, Massachusetts, EUA). Todos os solventes empregados no procedimento de extração devem ser de grau HPLC.

● Preparação das soluções padrão

As soluções estoque foram preparadas por meio da diluição do material certificado de referência em metanol. A partir das soluções estoque, foram preparadas soluções de trabalho a 50, 100, 250, 500, 750 e 1000 ng/mL.

A partir das soluções estoque também foram preparadas as soluções de controle de qualidade no nível baixo (CQB) na concentração de 15 ng/mL, no nível médio (CQM) na concentração de 400 ng/mL e no nível alto (CQA) na concentração de 800 ng/mL.

A partir da diluição das soluções estoque de anfetamina-d5 (para quantificação da anfetamina), metanfetamina-d5 (para quantificação da metanfetamina e femproporex), MDMA-d5 (para quantificação da anfepramona e clobenzorex), cocaína-d3 (para quantificação da cocaína) e benzoilecgonina-d8 (para quantificação da benzoilecgonina) foi feita uma solução de trabalho de padrão interno (PI) na concentração de 50 ng/mL de cada analito. Todas as soluções foram diluídas em metanol e armazenadas em frasco âmbar a -20 °C.

Uma alíquota das soluções de trabalho e controles de qualidade foi adicionada a 500 µL de amostras (tampão Quantisal™ e fluido oral) para atingir as concentrações finais em matriz, apresentadas na Tabela 15 abaixo.

| TABELA 15 - CONCENTRAÇÕES FINAIS DOS ANALITOS EM MATRIZ NOS CALIBRADORES (CAL 1 A 6) E DOS CONTROLES BAIXO (CB), MÉDIO (CM) E ALTO (CA)

ng/mL Analito	Cal 1	Cal 2	Cal 3	Cal 4	Cal 5	Cal 6	CB	CM	CA
Metanfetamina	5	10	25	50	75	100	15	40	80
Anfetamina	5	10	25	50	75	100	15	40	80
Femproporex	5	10	25	50	75	100	15	40	80
Anfepramona	5	10	25	50	75	100	15	40	80
Clobenzorex	5	10	25	50	75	100	15	40	80
Cocaína	5	10	25	50	75	100	15	40	80
Benzoilecgonina	5	10	25	50	75	100	15	40	80

5.9.3 AMOSTRAS

As amostras negativas de fluido oral foram coletadas de voluntários que não fizeram uso de nenhuma das substâncias investigadas neste trabalho e foram utilizadas para realização do desenvolvimento e validação do método.

◆ Preparo de amostra

1. Transferir 400 µL de amostra (composto por 300 µL de tampão Quantisal™ e 100 µL de fluido oral) em tubo cônico de polipropileno de 2 mL.
2. Adicionar 10 µL da solução de trabalho dos calibradores e controles (adicionar 10 µL de metanol na amostra negativo);

3. Agitar no vórtex por 5 segundos.
4. Transferir 100 µL da mistura acima (ou 100 µL de amostra) em tubo cônico de polipropileno de 2 mL contendo 100 mg de sal de QuEChERS (composto por sulfato de magnésio e acetato de sódio).
5. Adicionar 25 µL da solução de trabalho de padrão interno.
6. Adicionar 300 µL acetonitrila gelada (armazenada em freezer -20 °C);
7. Agitar em moinho-agitador durante 3 ciclos de 20 segundos cada a 7 m/s com pausa de 10 segundos entre os ciclos.
8. Centrifugar à 14.000 rpm por 5 minutos.
9. Transferir 100 µL do sobrenadante para vial (ou microplaca), diluir com 100 µL fase móvel A.
10. Injetar no sistema LC-MS/MS

5.9.4 PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS DO MÉTODO

Se desejar, utilize o modelo abaixo para registrar suas análises. Lembre-se, no entanto, que este é um material complementar, autoinstrucional, e não haverá correção ou análise dos seus testes.

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido _____
 _____ acoplado a espectrômetro de massas do tipo
 triplo quadrupolo modelo _____.
 A separação cromatográfica foi realizada com coluna _____
 _____ mantida a
 _____ °C. A fase móvel foi composta por água ultrapura (A) e
 metanol (B), ambas contendo ácido fórmico (0,1 %, v/v) e formiato
 de amônio (2 mmol/L). As soluções de lavagem do sistema cromatográfico
 foram uma mistura dos seguintes solventes acetonitrila/
 isopropanol/metanol/água ultrapura (50:20:15:15, v/v) e metanol/
 água ultrapura (70:30, v/v). O gradiente de eluição foi estabelecido
 como a seguir: _____

 _____,
 com vazão da fase móvel de _____ mL/min e volume de injeção
 de _____ µL.

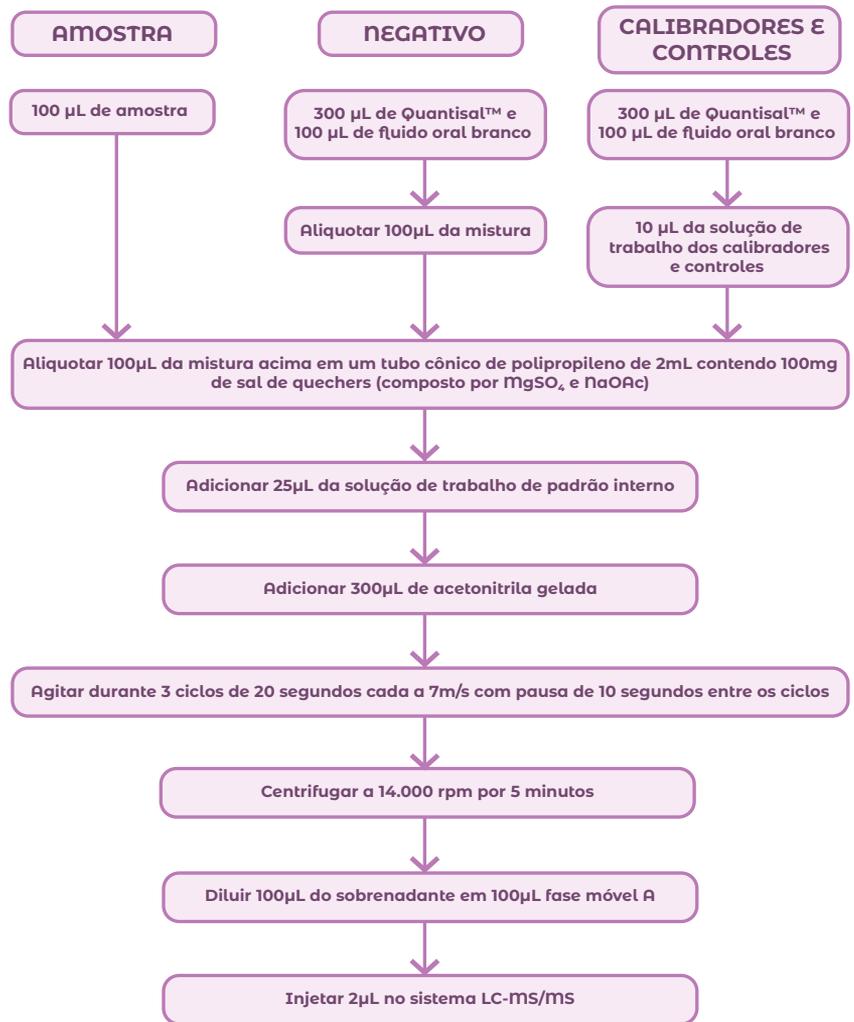
O espectrômetro de massas foi equipado com uma fonte de ionização por *electrospray* (ESI) operando em modo de ionização positivo. Os parâmetros da fonte foram: vazão do gás de nebulização (N₂) a _____ L/min; vazão do gás de aquecimento (ar seco) a _____ L/min; temperatura da interface a _____ °C; temperatura da linha de dessolvatação a _____ °C; temperatura de dessolvatação a _____ °C; temperatura do bloco aquecido a _____ °C; vazão do gás de secagem (N₂) a _____ L/min; e a pressão do gás (Ar) de colisão induzido por dissociação a _____ kPa. As análises foram realizadas em modo de monitorização de reações múltiplas (MRM), na qual foram escolhidas duas transições para cada analito (uma para quantificação e a outra para qualificação). A Tabela 16 apresenta as condições otimizadas do método, contendo as transições de MRM (transições utilizadas para quantificação foram sublinhadas). Os dados foram adquiridos e processados pelo _____ software.

| TABELA 16 - CONDIÇÕES OTIMIZADAS DAS TRANSIÇÕES PARA ANÁLISE DE 7 SUBSTÂNCIAS (E 5 PADRÕES INTERNOS) EM AMOSTRAS DE FLUIDO ORAL USANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (LC-MS/MS)

Analito	Transições MRM (m/z)		Dwell time (msec)	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)	Padrão interno
Anfetamina-d ₅							
Anfetamina							
Metanfetamina-d ₅							
Metanfetamina							

Analito	Transições MRM (m/z)		Dwell time (msec)	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)	Padrão interno
Femproporex							
MDMA-d ₅							
Anfepramona							
Cocaína-d ₃							
Cocaína							
Clobenzorex							
Benzoilecgonina-d ₈							
Benzoilecgonina							

5.9.5 FLUXOGRAMA



5.10 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE FLUIDO ORAL

Antes da injeção das amostras, confira o volume de fase móvel disponível e do solvente de limpeza do injetor, de modo que haja volume suficiente para as análises a serem realizadas e que o filtro da linha continue completamente imerso. Confira ainda o volume do frasco de descarte para evitar o seu extravasamento, a coluna que está conectada no forno do cromatógrafo líquido e ligue o gerador de nitrogênio.

Na tela de aquisição do LabSolutions (*"Realtime Analysis"*), abra o arquivo do método a ser usado para análise das amostras (*"File"* – *"Open method file"*) e faça o download das condições iniciais do método (*"download and close"*, Figura 36). Clique no ícone do "Forno" para que a temperatura seja ajustada para o do método e ative o ícone da "Bomba de fase móvel". Enquanto a coluna cromatográfica vai condicionando, monte o *batch* de amostras a ser injetado. Vale ressaltar que esse processo é possível quando a coluna cromatográfica conectada ao equipamento já era a de uso na análise em discussão.

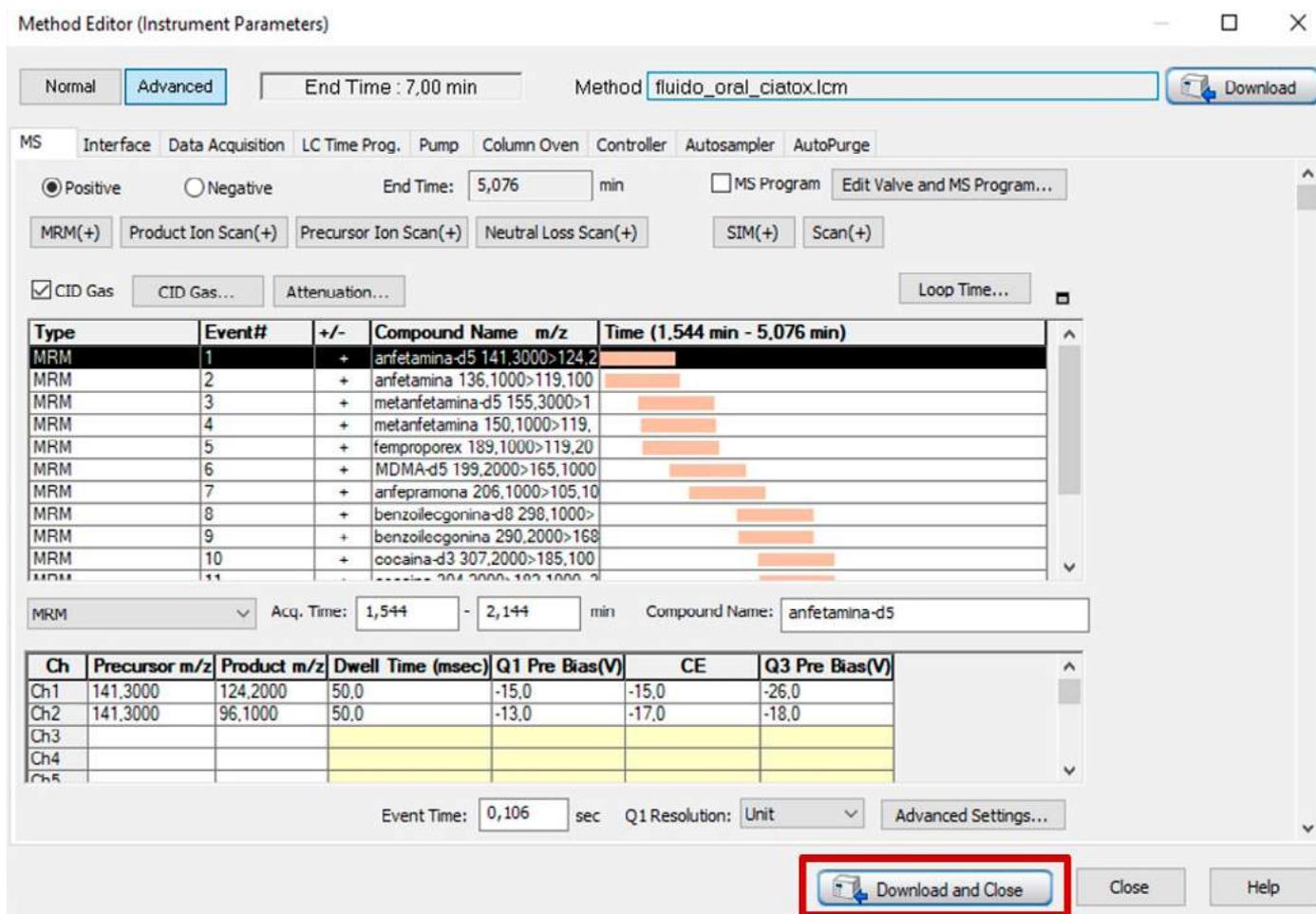


Figura 36. Tela do método de análise. Clique no botão "Download e close" para aplicar os parâmetros do método. Software LabSolutions (Shimadzu, Kyoto, Japão, versão 5.109).

Na coluna da esquerda, guia principal ("Main"), selecione o ícone "Realtime batch" e em seguida no ícone correspondente a um novo arquivo ("New"), clique com o botão direito do mouse sob a primeira linha do batch e selecione para adicionar amostras ("Add row"). Coloque o número correspondente ao de análises para aquele batch. As colunas a serem preenchidas são: posição do vial ("Vial#"), número da bandeja ("Tray name"), nome da amostra ("Sample name"), identificação da amostra ("Sample ID"), tipo de análise ("Analysis type"), método de análise ("Method file"), nome do arquivo ("Data file") e volume de injeção ("Inj. volume").

É possível padronizar o nome do arquivo para ser gerado de forma automática clicando com o botão direito do mouse em cima da primeira célula dessa coluna, clicando nas configurações ("Settings") e definindo na guia de nome dos dados ("Data file name"). Salve o arquivo do batch gerado ("File" – "Save batch file" ou "Save batch file as" caso esteja editando um arquivo de batch já existente). As colunas de tipo de amostra ("Sample type") e nível ("Level#") serão usadas no momento do processamento das amostras.

Recomendamos que a sequência de injeção (batch) seja iniciado com a injeção de metanol puro apenas, seguida de uma solução metanólica contendo uma mistura dos padrões a uma baixa concentração para servir de controle de adequabilidade do sistema (denominado

no inglês de *System Suitability*), nova injeção de metanol, amostra negativa, calibradores, reinjeção da amostra negativa, controles de qualidade, amostra negativa ou metanol, amostras autênticas, finalizando com metanol, reinjeção da solução metanólica com os padrões do método, e encerrando com novo metanol.

A Tabela 17 representa as colunas editadas do *batch*. Lembrando que os nomes das amostras são apenas uma sugestão. É recomendado que a mesma solução do *System Suitability* seja injetada periodicamente e que uma carta controle das áreas dos analitos seja mantida. Assim, além de verificar uma possível variação durante o *batch*, é possível observar as flutuações do sistema ao longo do tempo e devidas ações corretivas, quando necessário.

Antes de iniciar as injeções do *batch*, verifique a pressão inicial da coluna para ver se corresponde ao observado para esse método. Verifique ainda se a linha da pressão da bomba está estável e contínua por pelo menos 5 min, e clique no ícone de início (“Start”) e selecione a opção de injeção de todas as amostras do *batch* (“All rows”).

| TABELA 17 - EXEMPLO DE SEQUÊNCIA DE INJEÇÃO DE CALIBRANTES, CONTROLES E AMOSTRAS PARA ANÁLISE POR LC-MS/MS

Vial#	Tray name	Sample name	Sample ID	Analysis type	Method file	Data file ^a	Inj. volume
1	1	Metanol	Solvente	MIT MQT ILT STT	Pasta/ fluido_oral. lcm	Análise_1	2
2	1	System suitability	Solvente	MIT MQT ILT STT	Pasta/ fluido_oral. lcm	Análise_2	2
1	1	Metanol	Solvente	MIT MQT ILT STT	Pasta/ fluido_oral. lcm	Análise_3	2
3	1	Negativo	Fluido oral	MIT MQT ILT STT	Pasta/ fluido_oral. lcm	Análise_4	2
4	1	Cal_1ngmL	Fluido oral	MIT MQT ILT STT	Pasta/ fluido_oral. lcm	Análise_5	2
5	1	Cal_3ngmL	Fluido oral	MIT MQT ILT STT	Pasta/ fluido_oral. lcm	Análise_6	2
6	1	Cal_10ngmL	Fluido oral	MIT MQT ILT STT	Pasta/ fluido_oral. lcm	Análise_7	2

Vial#	Tray name	Sample name	Sample ID	Analysis type	Method file	Data file ^a	Inj. volume
7	1	Cal_25ngmL	Fluido oral	MIT MQT ILT STT	Pasta/ fluido_oral.lcm	Análise_8	2
8	1	Cal_50ngmL	Fluido oral	MIT MQT ILT STT	Pasta/ fluido_oral.lcm	Análise_9	2
9	1	Cal_100ngmL	Fluido oral	MIT MQT ILT STT	Pasta/ fluido_oral.lcm	Análise_10	2
3	1	Negativo	Fluido oral	MIT MQT ILT STT	Pasta/ fluido_oral.lcm	Análise_11	2
10	1	CB_1	Fluido oral	MIT MQT ILT STT	Pasta/ fluido_oral.lcm	Análise_12	2
11	1	CB_2	Fluido oral	MIT MQT ILT STT	Pasta/ fluido_oral.lcm	Análise_13	2
12	1	CM_1	Fluido oral	MIT MQT ILT STT	Pasta/ fluido_oral.lcm	Análise_14	2
13	1	CM_2	Fluido oral	MIT MQT ILT STT	Pasta/ fluido_oral.lcm	Análise_15	2
14	1	CA_1	Fluido oral	MIT MQT ILT STT	Pasta/ fluido_oral.lcm	Análise_16	2
15	1	CA_2	Fluido oral	MIT MQT ILT STT	Pasta/ fluido_oral.lcm	Análise_17	2
3	1	Negativo	Fluido oral	MIT MQT ILT STT	Pasta/ fluido_oral.lcm	Análise_18	2
16	1	001_2022_1	Fluido oral	MIT MQT ILT STT	Pasta/ fluido_oral.lcm	Análise_19	2
17	1	001_2022_2	Fluido oral	MIT MQT ILT STT	Pasta/ fluido_oral.lcm	Análise_20	2

Vial#	Tray name	Sample name	Sample ID	Analysis type	Method file	Data file ^a	Inj. volume
18	1	002_2022_1	Fluido oral	MIT MQT ILT STT	Pasta/fluido_oral.lcm	Análise_21	2
19	1	002_2022_2	Fluido oral	MIT MQT ILT STT	Pasta/fluido_oral.lcm	Análise_22	2
1	1	Metanol	Solvente	MIT MQT ILT STT	Pasta/fluido_oral.lcm	Análise_23	2
2	1	System suitability	Solvente	MIT MQT ILT STT	Pasta/fluido_oral.lcm	Análise_24	2
1	1	Metanol	Solvente	MIT MQT ILT STT	Pasta/fluido_oral.lcm	Análise_25	2

^a A coluna ficará amarela e, inicialmente, sem qualquer texto, caso seja configurado para os nomes dos arquivos serem gerados automaticamente.

Selecione o ícone de “Shutdown” para que os equipamentos (LC e MS) sejam desligados e não ocorra consumo sobressalente dos consumíveis. A tela apresentada na Figura 37 deve surgir, mostrando o nome do *batch* que está em análise no momento e demais na sequência de análise, se for o caso, a estimativa do dia e hora que o *batch* deve terminar, finalizando com o desligamento do sistema (“Shutdown”).

N..	Batch File	Operator	Date Registered	Waiting	Estimated End Ti...	Startup/Shutdown
1	2022-04-12_cong e descon...	System Administra...	12/04/2022 20:02	Waiting	12/04/2022 23:45	
2	2022-04-12_cong e descon...	System Administra...	12/04/2022 20:02	Waiting	13/04/2022 03:15	
3	ShutDown3202204122002...	System Administra...	12/04/2022 20:02	Waiting	13/04/2022 03:15	Shutdown

Figura 37. Exemplo de tela de estimativa do dia e hora do final das análises em andamento e programação do “Shutdown”. Software LabSolutions (Shimadzu, Kyoto, Japão, versão 5.109).

Não encerre o dia antes de conferir a injeção, pelo menos, da amostra negativa para averiguar se não houve qualquer falha na extração e/ou na injeção, a partir da observação dos padrões internos e suas áreas.

Para o processamento das amostras será trabalhado inicialmente na janela do *LabSolutions* em “*PostRun*”. Na pasta onde os arquivos das amostras foram salvos, abra o arquivo do *batch* e selecione em cada uma das linhas o tipo de amostra (coluna “*Sample type*”) correspondente a cada uma delas (desconhecida, padrão ou controle), conforme Figura 38. O primeiro ponto da curva precisa ser indicado também nessa janela (“*Initialize Calibration Curve*”). Na coluna de níveis (“*Level#*”), complete o número correspondente a concentração teórica na matriz do calibrador ou controle de qualidade conforme estabelecido no método (“*Compound table*”).

A Tabela 18 representa parcialmente a tabela encontrada na edição do método (“*Method view*” – “*Compound table*”). Caso essa padronização não tenha sido feita anteriormente, ou alguma edição precise ser feita, não esqueça de salvar no arquivo do método para que seja aplicado aos arquivos durante o processamento. Sugere-se que as concentrações sejam colocadas na ordem crescentes da curva de calibração, seguidas das concentrações dos controles baixo, médio e alto. A Tabela 19 representa como o arquivo de *batch* ficará após adicionados esses parâmetros.

Figura 38. Exemplo de tela de seleção do tipo de amostra analisada. Software *LabSolutions* (Shimadzu, Kyoto, Japão, versão 5.109).



| TABELA 18 - EXEMPLO DE TABELA DISPONÍVEL EM “COMPOUND TABLE” DO MÉTODO PARA INSERÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES TEÓRICAS NA MATRIZ DOS ANALITOS PRESENTES NO MÉTODO

ID#	Name	Type	Conc. (1)	Conc. (2)	Conc. (3)	Conc. (4)	Conc. (5)	Conc. (6)	Conc. (7)	Conc. (8)	Conc. (9)
1	Metanfetamina	Target	1	3	10	25	50	100	3	40	80
2	Anfetamina	Target	1	3	10	25	50	100	3	40	80
3	Metanfetamina-d5	ISTD	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	Anfetamina-d5	ISTD	1	1	1	1	1	1	1	1	1

| TABELA 19 - EXEMPLO DE COMO A TABELA DE SEQUÊNCIA DE INJEÇÃO (BATCH) FICARÁ APÓS INSERÇÃO DOS DADOS PARA PROCESSAMENTO E QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS

Vial#	Sample name	Sample type	Method file	Data file^a	Level#^a
1	Metanol	0:Unknown	Pasta/fluido_oral.lcm	Analise_1.lcm	0
2	System suitability	0:Unknown	Pasta/fluido_oral.lcm	Analise_2.lcm	0
1	Metanol	0:Unknown	Pasta/fluido_oral.lcm	Analise_3.lcm	0
3	Negativo	0:Unknown	Pasta/fluido_oral.lcm	Analise_4.lcm	0
4	Cal_1ngmL	1:Standard:(I)	Pasta/fluido_oral.lcm	Analise_5.lcm	1
5	Cal_3ngmL	1:Standard	Pasta/fluido_oral.lcm	Analise_6.lcm	2
6	Cal_10ngmL	1:Standard	Pasta/fluido_oral.lcm	Analise_7.lcm	3
7	Cal_25ngmL	1:Standard	Pasta/fluido_oral.lcm	Analise_8.lcm	4
8	Cal_50ngmL	1:Standard	Pasta/fluido_oral.lcm	Analise_9.lcm	5
9	Cal_100ngmL	1:Standard	Pasta/fluido_oral.lcm	Analise_10.lcm	6
3	Negativo	0:Unknown	Pasta/fluido_oral.lcm	Analise_11.lcm	0
10	CB_1	2:Control	Pasta/fluido_oral.lcm	Analise_12.lcm	7

Vial#	Sample name	Sample type	Method file	Data file ^a	Level# ^a
11	CB_2	2:Control	Pasta/fluido_oral.lcm	Analise_13.lcm	7
12	CM_1	2:Control	Pasta/fluido_oral.lcm	Analise_14.lcm	8
13	CM_2	2:Control	Pasta/fluido_oral.lcm	Analise_15.lcm	8
14	CA_1	2:Control	Pasta/fluido_oral.lcm	Analise_16.lcm	9
15	CA_2	2:Control	Pasta/fluido_oral.lcm	Analise_17.lcm	9
3	Negativo	0:Unknown	Pasta/fluido_oral.lcm	Analise_18.lcm	0
16	001_2022_1	0:Unknown	Pasta/fluido_oral.lcm	Analise_19.lcm	0
17	001_2022_2	0:Unknown	Pasta/fluido_oral.lcm	Analise_20.lcm	0
18	002_2022_1	0:Unknown	Pasta/fluido_oral.lcm	Analise_21.lcm	0
19	002_2022_2	0:Unknown	Pasta/fluido_oral.lcm	Analise_22.lcm	0
1	Metanol	0:Unknown	Pasta/fluido_oral.lcm	Analise_23.lcm	0
2	System suitability	0:Unknown	Pasta/fluido_oral.lcm	Analise_24.lcm	0
1	Metanol	0:Unknown	Pasta/fluido_oral.lcm	Analise_25.lcm	0

^a O número digitado nessa coluna deve ser correspondente ao da coluna que representa a concentração teórica na matriz daquela amostra, conforme exemplificado na Tabela 18.

Salve as alterações feitas no arquivo de *batch* e reprocesse todas as amostras. É possível visualizar o cromatograma MRM (Figura 39) de cada amostra injetada, assim como os cromatogramas extraídos e informações de integração e quantificação de cada analito. Apesar de ser possível ver a curva de calibração gerada nesse processamento, a visualização dos dados quantitativos é mais bem trabalhada na janela do *LabSolutions* em “*Browser*”.

Ainda assim, é possível gerar o relatório dessas análises clicando no ícone de “*Data Report*” na coluna à esquerda, e, caso tenha um template do laboratório, clicar na guia “*File*” e “*Open report format file*” para aplicar o *template* àquela amostra.

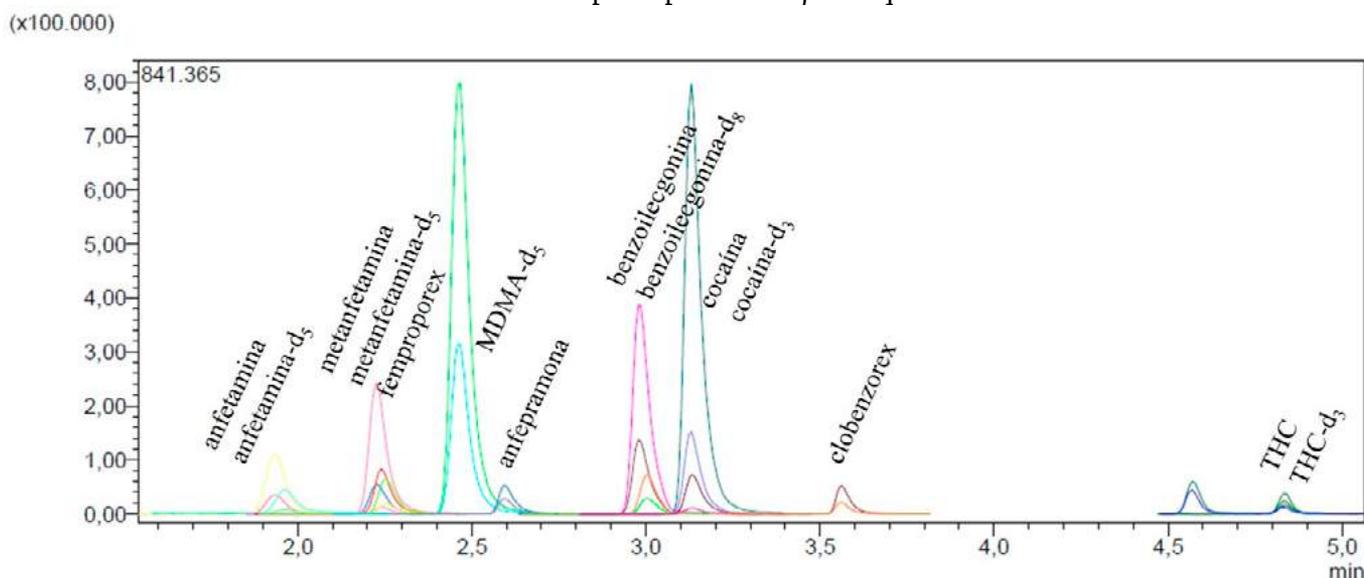


Figura 39. Exemplo de cromatograma MRM de amostra de fluido oral contendo 7 analitos a 15 ng/mL, extraído por micro-QuEChERS e analisado por LC-MS/MS.

5.11 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

5.11.1 CRITÉRIOS DE VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Após o desenvolvimento e otimização de um método analítico, é necessário realizar a validação. A validação consiste numa série de testes que fornecem informações sobre o desempenho do método, para determinar se o método está dentro dos parâmetros necessários para sua aplicação.

Um dos principais guias utilizados na toxicologia é o *Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology* ANSI/ASB Standard 036 de 2019, um guia específico para análises quantitativas em matrizes biológicas. Tratando-se de análise quantitativa em LC-MS, os critérios avaliados geralmente são: linearidade, limite inferior de quantificação (LQ), inexatidão, imprecisão, efeito matriz, recuperação (eficiência de extração) e contaminação cruzada (*carryover*). Para esta apostila, vamos utilizar este guia como exemplo de validação analítica (ANSI/ASB Standard 036, 2019).

5.11.2 CRITÉRIOS DE IDENTIFICAÇÃO

O método deve conter alguns critérios para a determinação de positividade. Neste caso, o guia citado acima determina alguns critérios de identificação, que são os critérios de “positividade”. Os critérios são: (i) picos cromatográficos simétricos, com tempo de retenção demonstrando variação limite de $\pm 2\%$ em relação à média de valores de tempo de retenção dos calibradores; (ii) razão sinal/ruído superior a 3 para íons qualificadores e quantificadores e (iii) uma variação de no máximo $\pm 30\%$ entre a razão das transições MRM monitoradas para cada um dos analitos da amostra quando comparadas às observadas durante a injeção do padrão analítico de referência. A variação máxima permitida varia de analito para analito e do equipamento utilizado, conforme apresentado na Tabela 20. Nas duas metodologias aqui abordadas foi usado o valor de 30%.

| TABELA 20 - TOLERÂNCIA ACEITÁVEL DE ACORDO COM A INTENSIDADE RELATIVA DO ÍON PARA IDENTIFICAR PICO POR DIFERENTES TÉCNICAS DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS (GTFCH, 2018)

Intensidade relativa do íon	GC-EI-MS	GC-CI-MS, GC-MS ⁿ , LC-MS, LC-MS ⁿ
>50%	20%	20%
>20-50%	20%	25%
>10-20%	25%	30%
≤10%	50%	50%

El ionização por elétrons, CI ionização química, n>1.

5.11.3 LINEARIDADE

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. A linearidade é avaliada com curvas de calibração na faixa definida no método, contendo pelo menos seis pontos, avaliadas em 5 dias diferentes, com ponderação para todos os analitos. A curva é considerada aceitável quando os valores obtidos dos calibradores apresentam inexatidão de no máximo $\pm 20\%$ da concentração teórica e coeficiente de correlação (r) superior a 0,98.

5.11.4 LIMITE INFERIOR DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)

O LQ é definido como a menor concentração da curva de calibração capaz de atender os critérios de identificação citados previamente, com imprecisão e inexatidão aceitáveis (inferiores a $\pm 20\%$). Caso amostra se apresente abaixo deste valor, não poderá ser quantificada. O LQ é avaliado em triplicata, em 3 dias distintos.

5.11.5 INEXATIDÃO

A inexatidão representa o grau de dispersão entre os resultados individuais encontrados num determinado ensaio e um valor de referência definido como o real. A inexatidão é avaliada em triplicata de amostras de fluido oral fortificadas com os analitos de interesse em 3 diferentes concentrações durante 5 dias. Considera-se a média das concentrações obtidas (experimental) em cada dia de estudo (intra-dia) ao longo dos cinco dias (inter-dia) e o valor de concentração esperado (teórico). O cálculo de inexatidão é realizado considerando as porcentagens de desvio da concentração teórica, não podendo ser superior a $\pm 20\%$.

5.11.6 IMPRECISÃO

A imprecisão é a medida da dispersão entre uma série de valores obtidos de múltiplas amostragens da mesma amostra homogênea. É expresso numericamente como o coeficiente de variação (%CV).

A imprecisão é avaliada empregando as mesmas réplicas utilizadas no ensaio de inexatidão. A imprecisão (intra e inter-dia) é calculada usando ANOVA de uma via (de fator único), com valor de p inferior a 0,05. Nessa abordagem, a imprecisão é o desvio padrão relativo entre as réplicas em um dia de análise ($n = 3$, intra-dia), e em 5 dias de análise ($n = 15$, inter-dia). A imprecisão intra e inter-dia é avaliada avaliando 3 diferentes concentrações (CQB, CQM e CQA), e valores inferiores a 20% são considerados aceitáveis.

5.11.7 EFEITO MATRIZ

O efeito matriz são componentes presentes na matriz que podem afetar a capacidade de detectar, identificar ou quantificar o analito de interesse. O efeito de matriz é avaliado comparando às áreas absolutas dos picos cromatográficos dos analitos, preparadas de formas distintas. Na primeira, dez amostras de fluido oral branco (devidamente diluídas em tampão Quantisal™, seguindo a proporção usualmente encontrada nas amostras) de diferentes fontes são fortificadas com os analitos de interesse após a extração. No segundo grupo, sextuplicata de padrões puros dos analitos estudados são analisadas, a fim de obter uma média das áreas obtidas de cada pico.

Para o cálculo do efeito de matriz, compara-se a média das áreas obtidas em ambas as condições e os resultados são expressos em porcentagem. Resultados negativos indicam supressão de sinal pela matriz e resultados positivos indicam aumento de sinal pela matriz. Para esse experimento, o valor de efeito matriz é avaliado em duas diferentes concentrações (CQB e CQA).

5.11.8 RECUPERAÇÃO (EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO)

O estudo de recuperação avalia a eficiência de extração, em relação ao valor considerado como o real. Para este estudo, é realizado comparando às áreas dos picos dos analitos em dois diferentes modos de preparo. O primeiro modo contendo 10 amostras de fluido oral em branco (devidamente diluídas em tampão Quantisal™) fortificadas com padrão contendo os analitos, extraídas e injetadas no LC-MS/MS. O segundo modo contendo uma sextuplicata de amostras em branco (também diluídas em tampão Quantisal™), extraídas pelo procedimento proposto e logo após fortificadas com as soluções de trabalho e injetadas no LC-MS/MS.

Assim a eficiência de extração é calculada em porcentagem considerando a razão entre a média das áreas das amostras preparadas do primeiro modo e a média das amostras do segundo modo, multiplicada por 100. Esse estudo também é realizado em 2 concentrações diferentes (CQB e CQA).

5.11.9 CONTAMINAÇÃO CRUZADA (CARRYOVER)

O *carryover* é o aparecimento de sinal de analito não intencional em amostras após a análise de uma amostra positiva. Essa contaminação pode ocorrer devido a injeção de uma amostra muito concentrada e ineficiência da lavagem do injetor. O *carryover* é avaliado analisando amostras de fluido oral branco imediatamente após o ponto mais alto da curva de calibração (100 ng/mL) ou uma concentração acima desta, em 3 dias distintos. O método é considerado ausente de *carryover* se quaisquer picos dos analitos presentes estiver abaixo dos valores de LQ.

5.11.10 ESTABILIDADE PÓS PROCESSAMENTO

A estabilidade pós processamento avalia o período nos quais os analitos, após extração, são considerados estáveis. Esse estudo é avaliado a partir da extração, análise e armazenamento dos controles alto e baixo no amostrador automático à uma temperatura definida pelo analista (geralmente 4 ou 10 °C). Após um período, definido pelo analista (geralmente 12 ou 24 horas), os controles (alto e baixo) são analisados empregando a curva de calibração do dia vigente (recém preparada). Os analitos são considerados estáveis caso a concentração dos controles armazenados apresentasse concentração dentro de $\pm 20\%$ da concentração inicial (obtida no dia anterior).

5.12 INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS ANALÍTICOS

Antes de verificar os resultados das amostras desconhecidas, é necessária verificação criteriosa dos calibradores e controles (CQ). Confira se os critérios de identificação (Figura 40) estabelecidos estão de acordo: pico simétrico, tempo de retenção, razão entre as transições MRM com variação máxima de 30% e, pelo menos, razão sinal/ruído maior que 3 – e maior que 10 para quantificação.

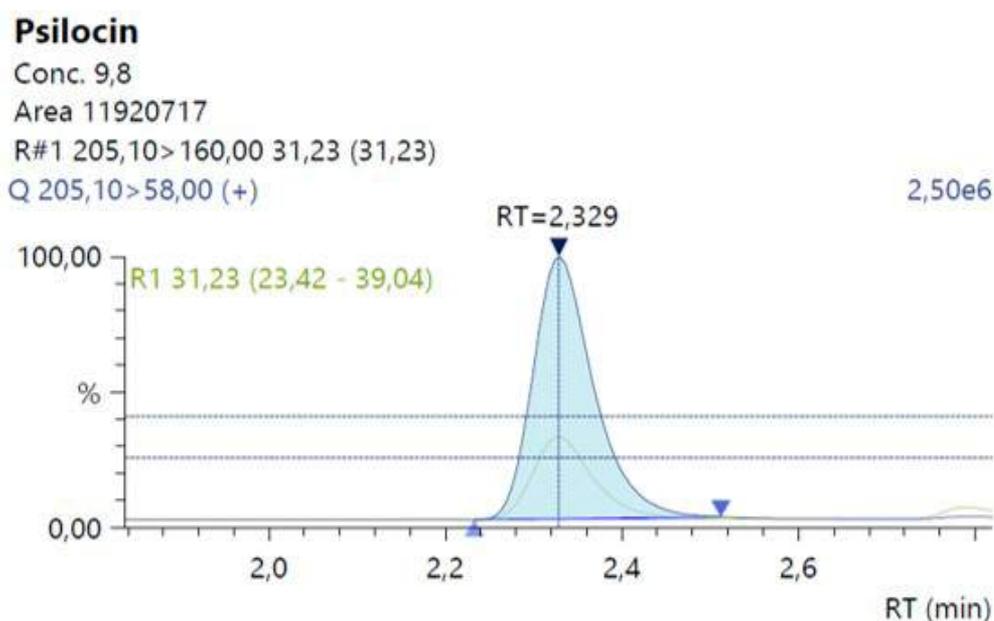


Figura 40. Exemplo de pico cromatográfico onde os critérios de identificação (e quantificação) foram atingidos para determinar a amostra como positiva para psilocina em sangue total. As duas linhas tracejadas representam o máximo de variação permitido para a segunda transição MRM. Software Insight (Shimadzu, Kyoto, Japão, versão 3.8).

Observar a linearidade da curva de calibração pelo seu coeficiente de correlação ($r > 0,98$) e, principalmente, pela avaliação da inexatidão dos calibradores (comparação entre a concentração teórica e a concentração obtida) – a inexatidão deve ser menor que $\pm 20\%$ para todos os calibradores.

As concentrações experimentais obtidas para os controles também dever apresentar erro menor do que $\pm 20\%$ da concentração teórica (inexatidão). É recomendado analisar a variação das áreas do

padrão interno ao longo do *batch*, incluindo das amostras autênticas. Além de corrigir pequenas variações passíveis de ocorrer durante a extração, o padrão interno ainda é um controle da injeção, já que a sua não identificação em uma amostra que deveria contê-lo pode ser devido ao esquecimento do analista durante o preparo da amostra ou de uma falha durante a injeção daquela amostra. Apesar de não ser um critério, é recomendado que essa variação seja a menor possível.

Uma vez verificado os critérios acima, os resultados das amostras podem ser analisados, observando tanto os critérios de identificação, quanto a concentração obtida para a duplicata. O laudo apresentará resultado “detectado” para uma ou mais substâncias presentes no método caso tenha sido detectado (concentração maior que o *cut off* estabelecido) durante a análise de triagem e confirmado (concentração maior que o *cut off* estabelecido) durante o teste confirmatório. Caso o teste confirmatório apresente um pico acima do limite de detecção do método, mas abaixo do valor de *cut off* estabelecido, apresentará resultado “não detectado”. Caso o valor seja muito próximo ao valor do *cut off*, será necessária avaliação caso a caso tendo como base os dados da validação do método, como imprecisão e inexactidão e da medida de incerteza (se disponível). Caso a concentração da amostra seja reportada no laudo, uma média dos valores obtidos pela duplicata é que deverá ser reportado.

Vale reforçar que, enquanto não houver legislação vigente no Brasil estabelecendo os valores de *cut off* para análises de triagem e confirmatório de fluido oral, recomenda-se estabelecer o guia internacional a ser usado de referência nas análises e na elaboração do laudo.

REFERÊNCIAS

ABDEL-REHIM, M. Microextraction by packed sorbent (MEPS): A tutorial. **Anal. Chim. Acta**, v. 701, n. 2, p. 119-128, set. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.05.037>. Acesso em: 18 abr. 2023.

ADATSI, F. K. Forensic Toxicology. In: **Encyclopedia of Toxicology**. Londres: Elsevier Academic Press, 2014. v. 2, p. 647-652.

AGGRAWAL, A. History of toxicology. In: PAYNE-JAMES, J. *et al.* **Encyclopedia of Forensic and Legal Medicine**. Londres: Elsevier Academic Press, 2016. v. 4, p. 587-601.

ALMEIDA, A. M.; CASTEL-BRANCO, M. M.; FALCÃO, A. C. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 774, n. 2, p. 215-222, 15 jul. 2002.

ANSI/ASB. **Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology**. Standard 036, 2019. Disponível em: https://www.aafs.org/sites/default/files/media/documents/036_Std_e1.pdf. Acesso em: abr. 2022.

ANZILLOTTI, L. *et al.* Cannabinoids determination in oral fluid by SPME-GC/MS and UHPLC-MS/MS and its application on suspected drivers. **Sci. Justice**, v. 54, 421-426, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2014.08.004>. Acesso em: 18 abr. 2023.

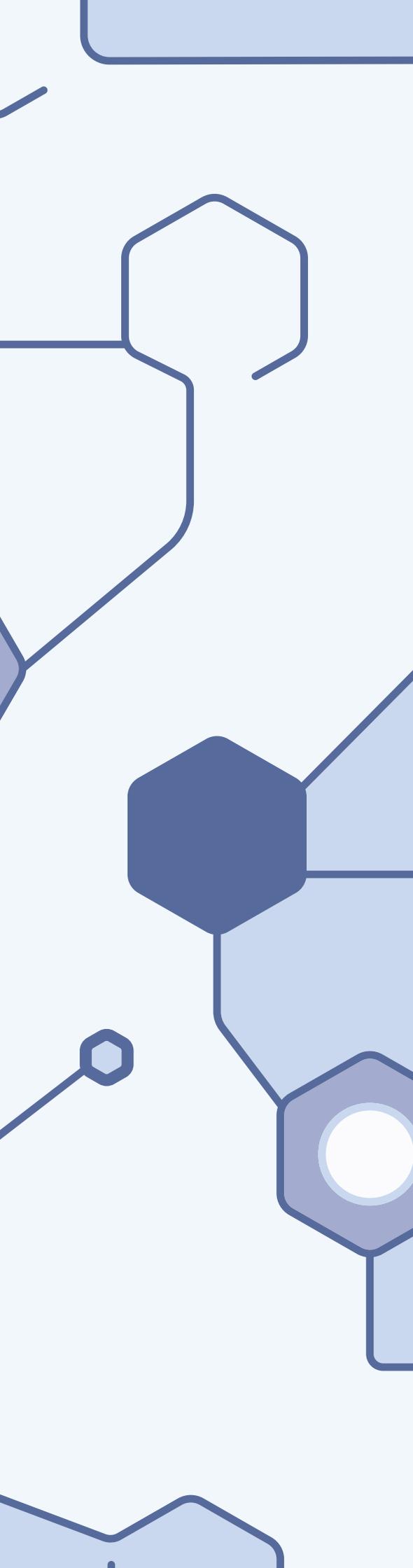
ARANTES, A. C. F. *et al.* Development and validation of quantitative analytical method for 50 drugs of antidepressants, benzodiazepines and opioids in oral fluid samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Forensic Toxicol.**, v. 39, p. 179-197, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11419-020-00561-8>. Acesso em: 18 abr. 2023.

ARES, A. M. *et al.* A fast bioanalytical method based on microextraction by packed sorbent and UPLC-MS/MS for determining new psychoactive substances in oral fluid. **Talanta**, v. 174, p. 454-461, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.06.022>. Acesso em: 18 abr. 2023.

BAHMANABADI, L. *et al.* Quantitative determination of methamphetamine in oral fluid by liquid-liquid extraction and gas chromatography/mass spectrometry. **Hum. Exp. Toxicol.**, v. 36, p. 195-202, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/0960327116638728>. Acesso em: 18 abr. 2023.

BARILE, F. A. **Principles of Toxicology Testing**. Nova York: CRC Press, 2008. 312 p.

BENET, L. Z. *et al.* Farmacocinética. In: HARDMAN, J. G. *et al.* **As bases farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. 9. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 1996. p 3-20.



BÉVALOT, F. *et al.* Vitreous humor analysis for the detection of xenobiotics in forensic toxicology: a review. **Forensic Toxicol**, v. 34, n. 1, p. 12-40, 2016.

BOMBANA, H. S. *et al.* Prevalence of drugs in oral fluid from truck drivers in Brazilian highways. **Forensic Sci. Int.**, v. 273, p. 140-143, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2017.02.023>. Acesso em: 18 abr. 2023.

BRASIL. Instituto Nacional de Metrologia, qualidade e Tecnologia. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**: DOQ-CGCRE-008 – Revisão 8. Brasília, DF: Coordenação Geral de Acreditação, INMETRO, 2020. 30 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC N° 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. Brasília, DF: ANVISA, 2012. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027_17_05_2012.html. Acesso em: 31 ago. 2021.

BRCAK, M. *et al.* European guidelines for workplace drug testing in oral fluid. **Drug Test. Anal.**, v. 10, p. 402-415, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/dta.2229>. Acesso em: 18 abr. 2023.

CASOLIN, A. Comparison of Urine and Oral Fluid for Workplace Drug Testing. **J. Anal. Toxicol.**, v. 40, p. 479-485, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jat/bkw055>. Acesso em: 18 abr. 2023.

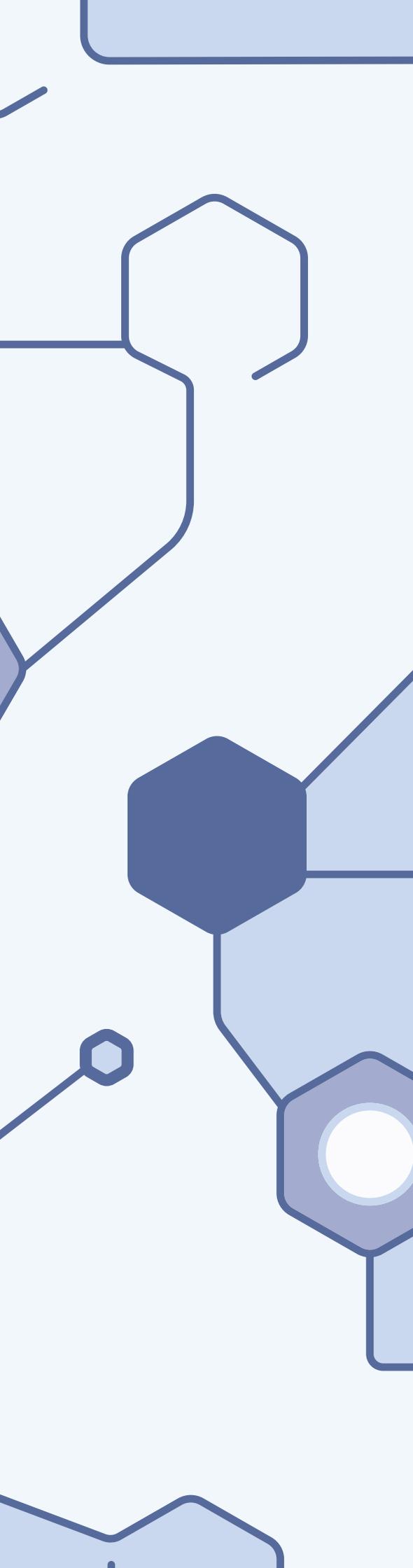
CHASIN A. A. M.; LIMA, I. V. Toxicologia Forense. In: S. O, A. CMM.; O. B. J. A (ed.). **Fundamentos da Toxicologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2021. p. 769-75.

CHASIN, A. A. M. Análises Forenses. In: MOREAU, R. L. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B. **Toxicologia Analítica**. Rio de Janeiro: Analítica Guanabara Koogan, 2008. p. 70-78.

CHINAGLIA, K. D. O. *et al.* Development of Analytical Method for the Determination of Methylphenidate, the Analog Ethylphenidate and Their Metabolite Ritalinic Acid in Oral Fluid Samples by Micro-Quenchers and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **SSRN Electron. J**, mar. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.2139/ssrn.4053445>. Acesso em: 18 abr. 2023.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. 5. ed.

COMIRAN, E. *et al.* Fenproporex and Amphetamine Pharmacokinetics in Oral Fluid After Controlled Oral Administration of Fenproporex. **Ther. Drug Monit.**, v. 34, p. 545-553, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/FTD.0b013e318263c6c5>. Acesso em: 18 abr. 2023.



CRESPO-FERNADEZ, J. A.; RODRIGUES, C. A. Bases neuroanatómicas, neurobiológicas y del aprendizaje de la conducta de adicción a la cocaína. **Revista Latinoamericana de Psicología**, Bogotá, v. 39, n. 1, p. 83-107, 2007.

CUNHA, K. F. da. Screening of 104 New Psychoactive Substances (NPS) and Other Drugs of Abuse in Oral Fluid by LC-MS-MS. **J. Anal. Toxicol.**, v. 44, n. 7, p. 697-707, set. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jat/bkaa089>. Acesso em: 18 abr. 2023.

CUNHA, K. F. *et al.* Prevalence of new psychoactive substances (NPS) in Brazil based on oral fluid analysis of samples collected at electronic music festivals and parties. **Drug Alcohol Depend**, v. 227, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2021.108962>. Acesso em: 18 abr. 2023.

DESROSIERS, N. A.; HUESTIS, M. A. Oral Fluid Drug Testing: Analytical Approaches, Issues and Interpretation of Results. **J. Anal. Toxicol.** v. 43, 415-443, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jat/bkz048>. Acesso em: 18 abr. 2023.

DORTA D. J. *et al.* **Toxicologia Forense**. São Paulo: Blucher, 2018. 750 p.

DRUMMER, O. H. Drug testing in oral fluid. **Clin. Biochem. Rev.**, v. 27, p. 147-59. 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17268583/>. Acesso em: 18 abr. 2023.

DRUMMER, O. H. Drug Testing in Oral Fluid. **The Clinical Biochemist Reviews**. Sidney, v. 27, n. 3, p. 146-159, 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1579288/>. Acesso em: 18 maio 2023.

DRUMMER, O. H. Pharmacokinetics and metabolism. In: JICKELLS, S.; NEGRUSZ, A. **Clarke's analytical toxicology**. Londres: Pharmaceutical Press, 2008. p. 13-42.

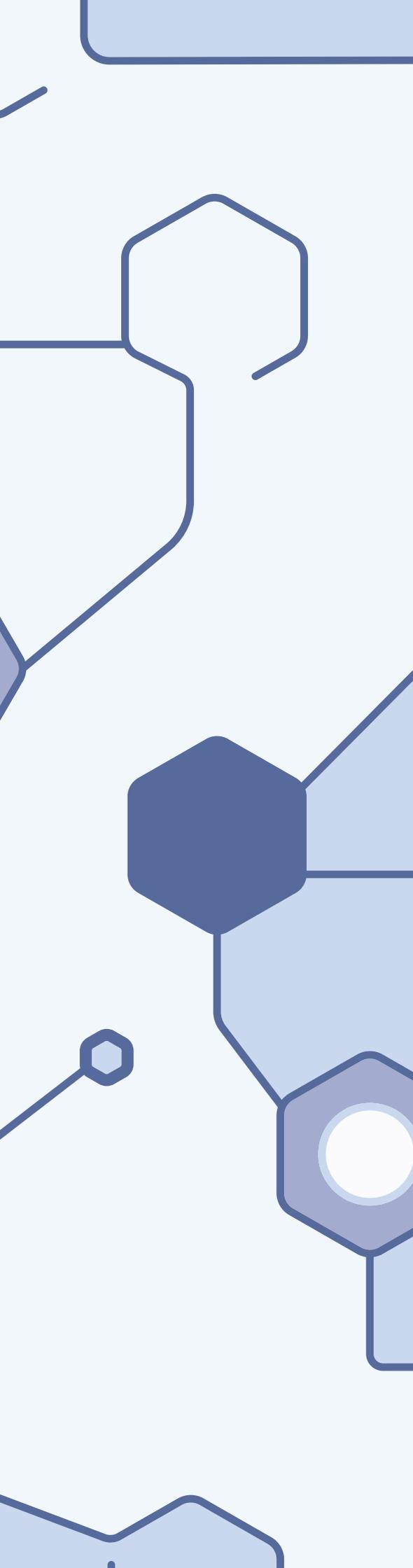
DRUMMER, O. H. Postmortem toxicology of drugs of abuse. **Forensic Science International**, Londres, v. 142, p. 101-113, 2004.

EMCDDA, 2012. **Driving Under the Influence of Drugs, Alcohol and Medicines in Europe: findings from the DRUID project**. Disponível em: https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/743/TDXA12006ENN_402402.pdf . Acesso em: 18 abr. 2023.

FAGIOLA, M. Current and Future Directions of High Resolution and Tandem Mass Spectrometry in Postmortem and Human Performance Toxicology. **Legal Medicine**, Tokyo, v. 37, p. 86-94, 2019.

FLANAGAN, R. J. *et al.* **Fundamentals of Analytical Toxicology: Clinical and Forensic**. 2. ed. New Jersey: Wiley, 2020. 648 p.

FRITCH, D. *et al.* Identification and Quantitation of Amphetamines, Cocaine, Opiates, and Phencyclidine in Oral Fluid by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **J. Anal. Toxicol.**, v. 33, 569-577, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jat/33.9.569>. Acesso em: 18 abr. 2023.



GARG, U.; COOLEY, C. Testing of Drugs of Abuse in Oral Fluid, Sweat, Hair, and Nail. *In: Critical Issues in Alcohol and Drugs of Abuse Testing*. Amsterdam: Elsevier, 2019. p. 405-427. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815607-0.00028-9>. Acesso em: 18 abr. 2023.

GODFREY, A. R. *et al.* **QuEChERS**: a simple extraction for monitoring quaternary ammonium biocide pollution in soils and antimicrobial resistance. *Anal. Methods.*, v. 12, p. 4387-4393, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/D0AY01324B>. Acesso em: 18 abr. 2023.

GREGUS, Z.; KLAASSEN, C. D. Mechanisms of Toxicity. *In: KLAASSEN, C. D. Casarett and Doull's Toxicology: the basic science of poisons*. 6. ed. Nova York: McGraw-Hill, 2001. p. 225-237.

GTFCH. **Guideline for quality control in forensic-toxicological analyses**. 2018. Disponível em: <https://www.gtfc.org/cms/images/stories/files/Guidelines-for-quality-control-in-forensic-toxicological-analyses-GTFCh-20090601-20180125.pdf>. Acesso em: abril 2022.

GUPTA, P. K. Principles and basic concepts of toxicokinetics. *In: GUPTA, P. K. Fundamentals of Toxicology Essential Concepts and Applications*. London: Elsevier Academic Press, 2016. p. 87-107.

HAYES, A. N.; TOUWAIDE, A. N. The History of Toxicology. *In: Encyclopedia of Toxicology*. Londres: Elsevier Academic Press, 2014. v. 4, p. 731-745.

HE, Y.; CONCHEIRO-GUISAN, M. Microextraction sample preparation techniques in forensic analytical toxicology. *Biomed. Chromatogr.*, v. 33, e44444, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bmc.4444>. Acesso em: 18 abr. 2023.

HEARN, W. L.; WALLS, H. C. Introduction to Postmortem Toxicology. *In: KARCH, S. B. Postmortem Toxicology of abused drugs*. Boca Raton: CRC Press, 2008. p. 1-11.

HODGSON, E. A. **Textbook of Modern Toxicology**. 3. ed. Nova Jersey: Wiley Interscience, 2004. 557 p.

IMMUNALYSIS. **Storage and Transportation of Drugs in Oral Fluid - Quantisal**. 2017. Disponível em: https://immunalysis.com/wp-content/uploads/2015/06/Quantisal_Poster2014_11x17_MKT-1019-RevC.pdf. Acesso em: abril 2022.

INSTITÓRIS, L. *et al.* A simple quantitation method for benzoylecgonine from oral fluid, blood, and urine samples used for determining 22 illicit and licit drugs by GC-MS with liquid-liquid extraction. *Forensic Toxicol.*, v. 30, p. 59-65, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11419-011-0128-z>. Acesso em: 18 abr. 2023.

JAIN, R.; SINGH, R. Applications of dispersive liquid-liquid micro-extraction in forensic toxicology. *TrAC Trends Anal. Chem.* v. 75, p. 227-237, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.07.007>. Acesso em: 18 abr. 2023.

JOHANSON, G. Toxicokinetics and Modeling. In: MCQUEEN, C. **Comprehensive Toxicology**. Amsterdam: Elsevier Science, 2017. p.165-187.

JONES, G. R. Interpretation of Postmortem Drug Levels. In: KARCH, S. B. **Postmortem Toxicology of abused drugs**. Boca Raton: CRC Press, 2008. p. 113-130.

KAHL, J. M. M. *et al.* Quantification of amphetamine and derivatives in oral fluid by dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 196, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.113928>. Acesso em: 18 abr. 2023.

KINTZ, P.; SPIEHLER, V.; NEGRUSZ, A. Alternative specimens. In: JICKELLS, S.; NEGRUSZ, A. (ed.). **Clarke's analytical forensic toxicology**. 3. ed. London: Pharmaceutical Press, 2008. p. 153-90.

KYLE, P. B. Laboratory methods in toxicology. In: KETHA, H.; GARG, U. **Toxicology Cases for the Clinical and Forensic Laboratory**. Londres: Elsevier, 2020. p. 19-26.

LANGEL, K.; *et al.* Comparison of drug concentrations between whole blood and oral fluid. **Drug Test. Anal.** v. 6, p. 461-471, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/dta.1532>. Acesso em: 18 abr. 2023.

LINDEN, R.; ANTUNES, M. V. Análise Toxicológica Sistemática. In: DORTA, D. J. *et al.* **Toxicologia Forense**. São Paulo: Blucher, 2018. p. 414-429.

LIZOT, L. L. F. *et al.* Simultaneous determination of cocaine, ecgonine methyl ester, benzoylecgonine, cocaethylene and norcocaine in dried blood spots by ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Forensic Science International**, Londres, v. 298, p. 408-416, 2019.

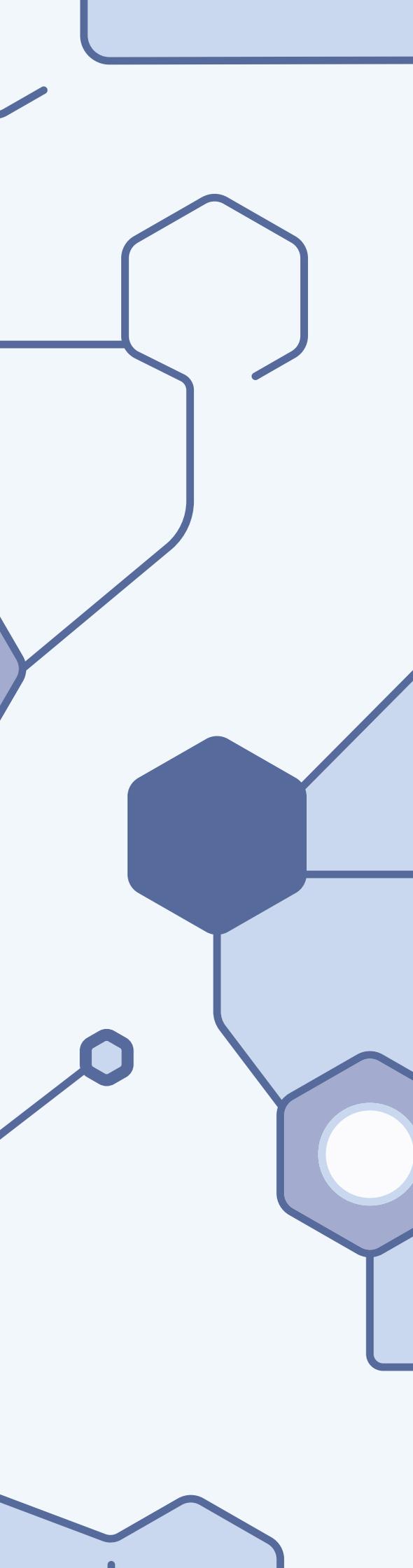
MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. UHPLC – Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. **Scientia Chromatographica**, São Carlos, v. 4, n. 3, p. 197-207, 2012.

MALLET, C. R.; LU, Z.; MAZZEO, J. R. A study of ion suppression effects in electrospray ionization from mobile phase additives and solid-phase extracts. **Rapid Commun in Mass Spectrom.**, v. 18, 49-58, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/rcm.1276>. Acesso em: 18 abr. 2023.

MARQUES, V. B. B. Toxicocinética. In: DORTA, D. J. *et al.* **Toxicologia Forense**. São Paulo: Blucher, 2018. p. 55-77.

MARQUET, P.; LACHÂTRE, G. Liquid chromatography-mass spectrometry: potential in forensic and clinical toxicology. **J Chromatogr B**, v. 733, p. 93-118, 1999.

MARTINIS, B. S. de *et al.* Toxicologia post mortem. In: DORTA D. J. *et al.* (ed.). **Toxicologia Forense**. São Paulo: Blucher Editora, 2018, p. 431-49.



MARTINIS, B. S. *et al.* Amostras Biológicas em Análises Forenses: matrizes biológicas alternativas. In: DORTA, D. J. *et al.* **Toxicologia Forense**. São Paulo: Blucher, 2018. p. 381-392.

MEDINSKY, M. A.; VALENTINE, J. L. Toxicokinetics. In: KLAASSEN, C. D. **Casarett and Doull's Toxicology: the basic science of poisons**. 6. ed. Nova York: McGraw-Hill, 2001. p. 225-237.

MILLER, B.; KIM, J.; CONCHEIRO, M. Stability of synthetic cathinones in oral fluid samples. **Forensic Sci. Int.** v. 274, p. 13-21, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.11.034>. Acesso em: 18 abr. 2023.

MONTESANO, C. *et al.* Determination of illicit drugs and metabolites in oral fluid by microextraction on packed sorbent coupled with LC-MS/MS. **Anal. Bioanal. Chem.** v. 407, p. 3647-3658, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8583-8>. Acesso em: 18 abr. 2023.

OLIVEIRA C. D. R. *et al.* Introdução à toxicologia forense e contexto histórico. In: DORTA D. J. (ed.) *et al.* **Toxicologia Forense**. São Paulo: Blucher Editora, 2018. p. 21-40.

OLIVEIRA, C. D. R. *et al.* Introdução à toxicologia forense e contexto histórico. In: PASSAGLI, M. F. **Toxicologia Forense: teoria e prática**. Campinas: Millennium, 2013. 544 p.

ØIESTAD, E.L.; JOHANSEN, U.; CHRISTOPHERSEN, A. S. Drug screening of preserved oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Clin. Chem.**, v. 53, p. 300-309, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2006.074237>. Acesso em: 18 abr. 2023.

PEREIRA, L. C. *et al.* Fundamentos em Toxicodinâmica. In: DORTA, D. J. *et al.* **Toxicologia Forense**. São Paulo: Blucher, 2018. p. 79-99.

PERESTRELO, R.; SILVA, P.; PORTO-FIGUEIRA, P.; PEREIRA, J. A. M.; SILVA, C.; MEDINA, S.; CÂMARA, J. S. QuEChERS - Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends. **Anal. Chim. Acta.**, v. 1070, p. 1-28, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.02.036>. Acesso em: 18 abr. 2023.

PETERS, F. T.; DRUMMER, O. H.; MUSSHOF, F. Validation of new methods. **Forensic Sci Int**, Londres, v. 165, n. 2-3, p. 216-224, 17 jan. 2007.

PETERS, F. T.; MAURER, H. H. Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology - A review. **Accreditation and Quality Assurance**, Berlim, v. 7, n. 11, p. 441-449, nov. 2002.

PETERS, F. T.; WISSENBACH, D. K.; BUSARDO, F. P.; MARCHEI, E.; PICHINI, S. Method Development in Forensic Toxicology. **Curr. Pharm. Des.** v. 23. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/138161282366617>

0622113331. Acesso em: 18 abr. 2023.

REZAEI, M. *et al.* Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. **J. Chromatogr.**, v. 1116, p. 1-9, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.03.007>. Acesso em: 18 abr. 2023.

RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROSS, E. M. Farmacodinâmica. In: HARDMAN, J. G. *et al.* **As bases farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman.**, 9. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 1996. p. 21-44.

SAMANO, K. L. *et al.* Recovery and Stability of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol Using the Oral-Eze[®] Oral Fluid Collection System and Intercept[®] Oral Specimen Collection Device. **J. Anal. Toxicol.**, v. 39, p. 648-654, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jat/bkv093>. Acesso em: 18 abr. 2023.

SAMHSA. Mandatory Guidelines For Federal Workplace Drug Testing Programs Using Oral Fluid Specimens. **Federal Register**, v. 84, n. 207, Oct. 2019. Disponível em: <https://www.govinfo.gov/content/pkg/FR-2019-10-25/pdf/2019-22684.pdf>. Acesso em: abril 2022.

SCIENTIFIC WORKING GROUP FOR FORENSIC TOXICOLOGY Standard practices for method validation in forensic toxicology. **Journal of Analytical Toxicology**, Oxônia, v. 37, n. 7, p. 452-474, 1 set. 2013. Disponível em: <http://jat.oxfordjournals.org/content/37/7/452.short>. Acesso em: 31 ago. 2021.

SHIN, S. S.; BORG, D.; STRIPP, R. Developing and Validating a Fast and Accurate Method to Quantify 18 Antidepressants in Oral Fluid Samples Using SPE and LC-MS-MS. **J. Anal. Toxicol.**, v. 44, p. 610-617. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jat/bkz117>. Acesso em: 18 abr. 2023.

SKOOP, G. Preanalytic aspects in postmortem toxicology. **Forensic Science International**, Londres, v. 142, p. 75-100, 2004.

SKOPP, G. Preanalytic aspects in postmortem toxicology. **Forensic Sci Int**. v. 142, n. 2-3, p. 75-100, 2004.

SOCIETY OF TOXICOLOGICAL AND FORENSIC CHEMISTRY. **Requirements for the validation of analytical methods**. Jena: GTFCH, 1 jun. 2009. Disponível em: <https://www.gtfch.org/cms/images/stories/files/Appendix%20B%20GTFCh%2020090601.pdf>. Acesso em: 31 ago. 2021.

SPIEHLER, V.; COOPER, G. Drug-of-abuse testing in saliva or oral fluid. In: JENKINS, A. J. (ed.). **Drug testing in alternate biological specimens**. New Jersey: Humana Press, 2008. p. 83-99.

SWGDRUG. **SCIENTIFIC WORKING GROUP FOR THE ANALYSIS OF SEIZED DRUGS (SWGDRUG) RECOMMENDATIONS**. 19 ago. 2019.

Disponível em: <http://swgdrug.org/approved.htm>. Acesso em: 31 ago. 2021.

TOENNES, S. W. *et al.* Screening for drugs of abuse in oral fluid – Correlation of analysis results with serum in forensic cases. **J Anal Toxicol.**, v. 29, n. 1, p. 22-7, 2005.

TOMAI, P. *et al.* Dispersive liquid-liquid microextraction, an effective tool for the determination of synthetic cannabinoids in oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **J. Pharm. Anal.**, v. 11, p. 292-298, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.11.004>. Acesso em: 18 abr. 2023.

UNODC. **Guidance for the validation of analytical methodology and calibration of equipment used for testing of illicit drugs in seized materials and biological specimens.** Nova York: UNODC, 2009. Disponível em: http://www.unodc.org/documents/scientific/validation_E.pdf. Acesso em: 31 ago. 2021.

WILLE, S. M. R. *et al.* Update of Standard Practices for New Method Validation in Forensic Toxicology. **Current Pharmaceutical Design**, Sharjah, v. 23, n. 36, p. 5442-5454, 2017.

UNDCP. United Nations International Drug Control Programme. **Guidelines for testing drugs under international control in hair, sweat and saliva.** Vienna: 2001. Disponível em: <http://www.unodc.org/pdf/publications/st-nar-30.pdf>. Acesso em: 18 abr. 2023.

VERSTRAETE, A. G. Detection Times of Drugs of Abuse in Blood, Urine, and Oral Fluid. **Ther. Drug Monit.**, v. 26, p. 200-205, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/00007691-200404000-00020>. Acesso em: 18 abr. 2023.

WHITE, R.; MOORE, C. **Detection of Drugs and Their Metabolites in Oral Fluid.** Londres: Elsevier, 2018. 119 p.

WOŹNIAKIEWICZ, M.; WIETECHE-POSŁUSZNY, R.; MOOS, A.; WIECZOREK, M.; KNIHNICKI, P.; KOŚCIELNIAK, P. Development of microextraction by packed sorbent for toxicological analysis of tricyclic antidepressant drugs in human oral fluid. **J. Chromatogr. A.**, v. 1337, p. 9-16, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.02.037>. Acesso em: 18 abr. 2023.

YONAMINE, M. **A saliva como espécime biológico para monitorar o uso de álcool, anfetamina, metanfetamina, cocaína e maconha por motoristas profissionais.** 2009. Tese (Doutorado em Toxicologia e Análises Toxicológicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/T.9.2004.tde-03072008-093347>. Acesso em: 18 abr. 2023.

REALIZAÇÃO



SECRETARIA NACIONAL DE
**POLÍTICAS SOBRE DROGAS
E GESTÃO DE ATIVOS**

MINISTÉRIO DA
**JUSTIÇA E
SEGURANÇA PÚBLICA**

**GOVERNO
FEDERAL**