ANDRÉ RINALDI FUKUSHIMA

**Desenvolvimento de métodos analíticos com finalidade forense aplicados à
medicina veterinária legal: ênfase na identificação de agentes
anticolinesterásicos**

São Paulo

2015

ANDRÉ RINALDI FUKUSHIMA

**Desenvolvimento de métodos analíticos com finalidade forense aplicados à
medicina veterinária legal: ênfase na identificação de agentes
anticolinesterásicos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Patologia Experimental e Comparada,
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo para a obtenção do
título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Patologia

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientadora:

Prof. Dra. Helenice de Souza Spinosa

SÃO PAULO

2015

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3226
FMVZ

Fukushima, André Rinaldi
Desenvolvimento de métodos analíticos com finalidade forense aplicados à medicina veterinária legal: ênfase na identificação de agentes anticolinesterásicos / André Rinaldi Fukushima. -- 2015.
142 p. il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientadora: Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa.

1. Análises toxicológicas. 2. Validação. 3. Praguicidas. 4. Perfil de dissolução. 5. Método. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Desenvolvimento de métodos analíticos com finalidade forense aplicados à medicina veterinária legal: ênfase na identificação de agentes anticolinesterásicos", protocolado sob o nº 3006/2013, utilizando amostras biológicas, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 15/5/2013.

We certify that the Research "Development of analytical methods applied with forensic purpose in veterinary medicine: emphasis on the identification of anticholinesterase agents", protocol number 3006/2013, under the responsibility Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 5/15/2013.

São Paulo, 16 de outubro de 2015.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: FUKUSHIMA, André Rinaldi

Título: **Desenvolvimento de métodos analíticos com finalidade forense aplicados à medicina veterinária legal: ênfase na identificação de agentes anticolinesterásicos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Aos meus pais, **Vittoria Rinaldi Fukushima** e **Gaspar Minoru Fukushima** e padrinhos **Lidia Rinaldi** e **José Henrique Flôr** por compreender a minha ausência durante a elaboração deste trabalho e colaborarem na minha formação pessoal, intelectual e moral formando quem sou hoje.

In memoriam aos meus avós **Guiseppe Rinaldi e Cristina Rinaldi**, **Hiroshi Fukushima e Mitsuko Fukushima** e tios **Mario Antônio Rinaldi e Domênico Rinaldi** e amiga **Adelaide José Vaz** que com certeza zelaram por mim.

À Prof^a Dra. **Helenice de Souza Spinosa** pela orientação e conselhos durante todo o desenvolvimento desse trabalho e pelo exemplo de ética, honestidade e responsabilidade.

Aos Dr(s). Luís Antônio Baffile Leoni, Elizabeth Mieko Egashira, Débora Gonçalves de Carvalho e Virginia Martins Carvalho pela amizade conquistada e que reforçaram o sentido desta mesma palavra.

À **Gabriella Manfredi Salomone** pelo companheirismo nos momentos difíceis e pela valorosa ajuda nas discussões referentes este trabalho, bem como na confecção dos índices

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, em especial ao Departamento de Patologia (VPT) por proporcionar docentes de qualidade e estrutura para formação.

À Universidade São Judas Tadeu pela formação acadêmica concedida.

À Radcrom em especial ao amigo Roberto Harakawa que colaborou ativamente nesse trabalho com conselhos e inúmeras conversas sobre toda a parte analítica desenvolvida.

Aos Ex. professores e atuais colegas de trabalho Alice A. Da Matta Chasin, Sergio Mengardo, Hamilton Bavutti Fortes, Julio Fernantes, Roberto Ferraboli, Marco Aurélio Lamolha, Leila Senna, Iguatã de Melo Costa, Carlos Leandro Firmo, Maria Raquel Manhani, Cristiane Rocha de Farias, Eduardo Baboim Govato Tânia Govato, Tania Akiko, Erasmo Soares e todos que contribuíram por formação.

Ao prof. Jorge Camilo Flório, pelos conselhos, pelas orientações, enfim, por toda ajuda prestada durante meu mestrado e doutorado.

Ao prof. Dawson Rodrigues, pelo auxílio e questionamentos sobre o Capítulo III dessa dissertação.

À professora Maria Marta Bernardi, pelo eterno incentivo e injeções de ânimo.

Ao prof. Elias Pozenato, pelas conversas e sugestões.

A todos os meus tios, tias e primos e parentes em geral, que torceram pelo meu sucesso pessoal e profissional.

À todos os amigos do Núcleo Acadêmico da UNIMONTE em especial Edmir, Jullieta, Daniela, Cintia, Agenor, Solange e Flávio, que colaboraram muito com conselhos em momentos difíceis.

Ao amigo Julio de Carvalho Ponce pela amizade e todos os socorros prestados nos momentos difíceis.

Aos Ex alunos e amigos Fernando Ponce e Everton Bertaglia pela amizade e auxílio na conferência das referências bibliográficas.

Aos funcionários e amigos da Universidade São Judas Tadeu, André Hahne, Welington França, Regina Celia França, Rafael Pereira, Silvana Cardoso, Toninho, Maria das Graças, Elvira e todos os funcionários dos laboratórios, Leandro Cardial Dias e todos os funcionários do marketing, Wilton, Raimundo, Ronaldo, Ítalo e todos os amigos do DTI da São Judas.

Agradeço as secretárias do nosso departamento: Adriana, Cristina e Milena, toda à atenção prestada, assim como todas as vezes que abriram a porta quando esqueci o meu cartão!

Agradeço a cada um dos funcionários do biotério: Aline, Claudia, Idalina, Luciana, Mauro e Nelsinho pelos cuidados e amizade.

Agradeço aos técnicos do laboratório: Herculano, Nicolle e Vagner, por toda atenção, ajuda prestada e conhecimento compartilhado. Obrigado pelas conversas de bancada e pelos cafezinhos na copa! Agradeço a Nicolle pelo auxílio e colaboração dos ensaios realizados no capítulo II dessa dissertação e ao amigo Mariano Valio Gonzalez Domingues pelo auxílio no capítulo III dessa dissertação.

Aos amigos do VPT: Daniel, Eduardo, Fernando Pipolli, Esther Ricci, Thaísa, Natalia, Sayuri, Gabi., Julia, Maysa, Paulinha, Stella, Thaísa, Thiago Marinho, Wanderley, Adriana de Siqueira e Atilio Calefii. Agradeço toda ajuda nos estudos e pelo conhecimento, pelas referatas, pela paciência, pelas conversas e risadas na sala dos pós, pelos almoços na bandeirão ou em qualquer outro local.

Aos amigos do Instituto Lucas Dias de Souza, em especial a Arlete e Celio, pelo companheirismo e compreensão nos momentos de ausência.

À Dr^a. Neide S. F. de Oliveira da diretora do Instituto Médico Legal, pela gentil permissão no uso das instalações e equipamentos e pela confiança em mim depositada.

Aos amigos do Obreiros do Amor e Misericórdia, em especial ao Nilton Sérgio Zebrak, amigo e eterno pediatra.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES pela bolsa concedida.

À banca de qualificação composta pelas professoras Dr^{as}. Tânia Akiko Anazawa, Cristina Mazoco Sales e Helenice de Souza Spinoza e os professores Lucinano Felicio, Maria Raquel Manhani, Paulo Maiorka e Silvana Gorniak pelas importantes sugestões, acatadas em sua maioria.

À todos os amigos que conquistei ao longo da minha vida, agradeço o companheirismo, incentivo, amizade, por compartilharmos nossas angústias, e melhor ainda por compartilharmos nossas alegrias, sorrisos e abraços. Agradeço por estarem juntos comigo em mais uma etapa da minha vida.

“... Mas, hey mãe!

Por mais que a gente cresça

Há sempre coisas que a gente

não pode entender ...”

(Engenheiros do Hawaï -Humberto Gessinger)

RESUMO

FUKUSHIMA, A. R. **Desenvolvimento de métodos analíticos com finalidade forense aplicados à medicina veterinária legal:** ênfase na identificação de agentes anticolinesterásicos. [Development of analytical methods applied to forensic purpose veterinary forensics: emphasis on identifying anticholinesterase agents.]. 2015. 142 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

As intoxicações letais, via de regra, estão comumente relacionadas com a área médico-legal; alguns agentes tóxicos ocupam lugar de destaque como os principais responsáveis pela ocorrência desses óbitos. Em medicina legal, tanto humana quanto animal, o grande desafio enfrentado é a elucidação da *causa mortis* e do tempo da ocorrência da morte quando os cadáveres são encontrados, indicando possível exposição aos agentes tóxicos, os quais são adicionados intencionalmente, na maior parte das vezes, com a finalidade de causar danos irreversíveis à vítima. No último relatório do Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX), no ano de 2012, foram relatadas no Brasil 102.854 intoxicações envolvendo seres humanos e animais, sendo que desse total 1.199 (1,17%) intoxicações foram relatadas em animais. Dentre os principais agentes responsáveis por intoxicação, tanto em seres humanos, como em animais, estão os praguicidas e, em particular, os anticolinesterásicos, sendo importante causa de óbitos intencionais e não intencionais em animais. Métodos de análises toxicológicas envolvendo intoxicações em seres humanos são amplamente estudados e divulgados, o que é menos usual na medicina veterinária legal. Portanto, a existência de laboratórios que atendam as legislações relacionadas as análises toxicológicas forenses, bem como a pesquisa das características da forma de apresentação e do potencial toxicológico dos anticolinesterásicos e o desenvolvimento e validação de técnicas analíticas mais sofisticadas se fazem necessária e contribuirão para os avanços nesse aspecto forense da toxicologia veterinária. Assim, o presente trabalho foi distribuído em quatro capítulos distintos. No primeiro capítulo discute-se o recebimento de amostras e um modelo de formulário de Requisição de Análise Toxicológica num laboratório veterinário de análises toxicológicas que recebe amostras biológicas de interesse forense. O segundo capítulo apresenta a possibilidade de utilização de uma técnica enzimática com a finalidade de avaliar o potencial de inibição dos praguicidas anticolinesterásicos; o método se mostrou eficiente para avaliar a inibição da atividade da acetilcolinesterase (AChE) causada pelo aldicarbe e pelo seu metabólito, o aldicarbe-sulfona. O terceiro capítulo trata-se do teste de dissolução *in vitro* da forma acabada do grânulo comercial do praguicida aldicarbe (Temik 150[®]), a fim de avaliar a cinética de liberação do princípio ativo tóxico, bem como a cinética de formação dos seus principais metabólitos ativos, considerando que cães e gatos encontrados mortos com suspeita de intoxicação exógena apresentam “chumbinho” no conteúdo estomacal. O perfil de dissolução dos grânulos do Temik 150[®] em meio ácido foi capaz mostrar a presença *in vitro* dos metabólitos aldicarbe-sulfóxido e o aldicarbe-sulfona, o que não ocorre quando apenas o princípio ativo passou pelo mesmo perfil de dissolução, mostrando que essa forma disponível no comércio contribui para a toxicidade deste praguicida. O quarto capítulo apresenta o desenvolvimento de um método para determinação de praguicidas anticolinesterásicos, bem como os seus produtos biotransformados em diversas matrizes biológicas, baseada em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por arranjo de diodos (DAD). Foi, então, desenvolvido e validado um método de extração e identificação de praguicidas anticolinesterásicos em matrizes biológicas, cujas figuras de mérito atendem a RDC 27 de 2012 da ANVISA (Brasil, 2012). O método permitiu a extração e identificação de aldicarbe e seus metabólitos (aldicarbe-sulfóxido e aldicarbe-sulfona), carbofurano e seu metabólito (3-OH

carbofurano), forato e seu metabólito (forato-sulfóxido) e aldicarbe. Esse método foi aplicado em amostras reais encaminhadas ao Laboratório de Diagnóstico Toxicológico (LADTOX) e se mostrou eficiente para identificação de aldicarbe.

Palavras Chave: Análises toxicológicas. Validação. Praguicidas. Perfil de dissolução. Método.

ABSTRACT

FUKUSHIMA, A. R. **Development of analytical methods applied to forensic purpose veterinary forensics:** emphasis on identifying anticholinesterase agents. [Desenvolvimento de métodos analíticos com finalidade forense aplicados à medicina veterinária legal: ênfase na identificação de agentes anticolinesterásicos.]. 2015. 142 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Lethal poisonings, as a rule, are commonly related to the forensic area; some toxic agents are commonly found as the main agent responsible for these deaths. In forensic medicine, both human and animal, the major challenge faced is the elucidation of cause of death and the time elapsed when the bodies are found, indicating possible exposure to toxic agents, which are intentionally added, most of the times in order to cause irreversible damage to the victim. In the latest report of the Toxic-Pharmacologic National Information System (SINITOX) in the year 2012, 102 854 poisonings involving humans and animals were reported in Brazil, and of this total 1,199 (1.17%) poisonings have been reported in animals. Among the main agents responsible for toxicity, both in humans and in animals, pesticides are common and, in particular, cholinesterase inhibitors, which is important because of intentional and unintentional deaths in animals. Methods of toxicological analyzes involving poisoning in humans are widely studied and published, but less so in legal veterinary medicine. Therefore, the existence of laboratories that meet the legislation related to forensic toxicological analysis and research of the characteristics of the presentation and toxicological potential of cholinesterase inhibitors and the development and validation of more sophisticated analytical techniques are necessary and can contribute to advances in the forensic aspect of veterinary toxicology. Thus, this work was distributed into four distinct chapters. The first chapter discusses the receipt of samples and a Request Form template for Toxicological analysis in a Toxicological analysis veterinary laboratory that receives biological samples of forensic interest. The second section presents the possibility of using an enzymatic technique in order to assess the potential inhibition of cholinesterase inhibitors pesticides; the method was efficient to evaluate the inhibition of the activity of acetylcholinesterase (AChE) caused by aldicarb and its metabolite, aldicarb sulfone. The third chapter it is the in vitro dissolution test of the finished form of commercial bead pesticide aldicarb (Temik 150[®]) in order to assess the kinetics of release of toxic active ingredient, as well as the formation kinetics of its main metabolites assets, whereas dogs and cats found dead with suspected exogenous intoxication present "pellets" in the stomach contents. The dissolution profile of the Temik 150[®] beads in acid was able to show the presence of in vitro metabolites aldicarb sulfoxide and aldicarb sulfone, which does not occur when only the active ingredient went through the same dissolution profile, showing that this market-available form contributes to the toxicity of this pesticide. The fourth chapter presents the development of a method for determining cholinesterase inhibitors pesticides, as well as their biotransformation products in various biological matrices, based on high-performance liquid chromatography (HPLC) with diode array detection (DAD). Then, a method of extraction and identification of anticholinesterase pesticides in biological matrices was developed and validated, meeting current standards RDC 27, 2012 ANVISA (Brazil, 2012). The method allowed the extraction and identification of aldicarb and its metabolites (aldicarb sulfoxide and aldicarb sulfone), carbofuran and its metabolite (3-OH carbofuran), phorate and its metabolite (phorate sulfoxide) and aldicarb. This method was applied to real samples sent to the Toxicology Laboratory Diagnostics (LADTOX) and was efficient in aldicarb identification.

Keywords: Toxicological analysis. Validation. Pesticides. Dissolution profile. Methods.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	18
2	CAPÍTULO I – Recebimento de amostras biológicas e modelo de formulário de Requisição de Análise Toxicológica para um laboratório veterinário de análises toxicológicas de interesse forense.....	24
2.1	INTRODUÇÃO.....	24
2.2	REVISÃO DA LITERATURA.....	29
2.2.1	Coleta de amostras biológicas.....	29
2.2.2	Escolha das amostras biológicas a serem coletadas.....	29
2.2.3	Recebimento das amostras biológicas no laboratório de análises toxicológicas.....	36
2.2.4	Procedimentos para a extração em amostras biológicas.....	36
2.2.5	Procedimentos para a análise de amostras biológicas.....	38
2.2.6	Interpretação dos resultados da análise toxicológica.....	38
2.2.7	Tempo médio para conclusão de uma análise.....	39
2.3	OBJETIVOS.....	40
2.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	41
2.4.1	Proposta para os procedimentos no laboratório de diagnóstico toxicológico (LADTOX) e de elaboração de formulário de requisição de análise toxicológica.....	41
2.4.2	Proposta de Folheto para divulgação dos procedimentos de coleta e armazenamento de materiais biológicos a serem encaminhados ao laboratório de diagnóstico toxicológico (LADTOX).....	48
2.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
2.6	CONCLUSÕES.....	51
3	CAPÍTULO II - Proposta de utilização de um método enzimático de triagem rápido, seguro e de baixo custo para avaliar o poder de inibição da acetilcolinesterase promovido pelo praguicida aldicarbe e seus metabólitos.....	52
3.1	INTRODUÇÃO.....	52
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	54
3.2.1	Ensaio enzimático.....	54
3.3	RESULTADOS.....	55
3.4	DISCUSSÃO.....	57
3.5	CONCLUSÕES.....	58
4	CAPÍTULO III - Perfil de dissolução da forma acabada do grânulo comercial do aldicarbe (Temik 150®).....	60
4.1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	70
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	70
4.2.1	Perfil de Dissolução.....	71
4.2.2	Análise cromatográfica.....	72
4.3	RESULTADO E DISCUSSÃO.....	73
4.4	CONCLUSÃO.....	76
5	CAPÍTULO IV – Desenvolvimento e validação de um método analítico para quantificação de praguicidas anticolinesterásicos em matrizes biológicas oriundas de animais.....	77

5.1	INTRODUÇÃO.....	77
5.2	REVISÃO DA LITERATURA.....	80
5.2.1	Sobre os parâmetros de segurança (figuras de mérito).....	84
5.2.1.1	Linearidade.....	84
5.2.1.2	Precisão.....	89
5.2.1.3	Exatidão.....	90
5.2.1.4	Seletividade.....	91
5.2.1.5	Efeito residual e de matriz.....	91
5.2.1.6	Recuperação.....	92
5.2.1.7	Limite inferior de quantificação (LIQ).....	93
5.2.1.8	Limite Superior de Quantificação (LSQ).....	93
5.2.1.9	Homogeneidade (Fidelidade).....	93
5.2.1.10	Estabilidade.....	94
5.2.1.11	Robustez.....	94
5.3	OBJETIVOS.....	95
5.3.1	Objetivos específicos.....	95
5.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	95
5.4.1	Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica para Análise de Praguicidas Anticolinesterásicos.....	95
5.4.1.1	Otimização das condições cromatográficas.....	99
5.4.1.2	Teste para interferentes na corrida cromatográfica.....	99
5.4.1.3	Padronização para CLAE-DAD.....	99
5.4.2	Preparação das curvas analíticas.....	100
5.4.2.1	Curvas analíticas para o método de CLAE-DAD.....	100
5.4.2.2	Preparo das soluções de Controle de Qualidade (CQs).....	100
5.4.2.3	Especificidade/seletividade.....	101
5.4.2.4	Repetibilidade e reprodutibilidade.....	101
5.4.2.5	Homogeneidade de amostra.....	101
5.4.2.6	Determinação do tempo de retenção de cada substância.....	102
5.4.3	Preparação das amostras.....	102
5.4.3.1	Matrizes.....	102
5.4.3.2	Materiais utilizados para extração.....	103
5.4.3.3	Técnicas de extração.....	103
5.4.3.4	Análises estatística.....	104
5.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	105
5.5.1	Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para análise de praguicidas anticolinesterásicos.....	105
5.5.1.1	Linearidade.....	106
5.5.1.2	Precisão.....	116
5.5.1.3	Exatidão.....	117
5.5.1.4	Seletividade (efeito residual e de matriz).....	117
5.5.1.5	Recuperação.....	120
5.5.1.6	Limite inferior de quantificação (LIQ).....	121
5.5.1.6	Limite Superior de Quantificação (LSQ).....	122
5.5.1.7	Homogeneidade (Fidelidade).....	123
5.5.1.8	Robustez.....	123
5.6	ANÁLISE DE PRAGUICIDAS ANTICOLINESTERÁSICOS EM AMOSTRA REAL.....	124
5.7	CONCLUSÕES.....	126
6	CONCLUSÕES FINAIS.....	127

REFERÊNCIAS.....	128
-------------------------	------------

1 INTRODUÇÃO GERAL

A história da toxicologia acompanha e faz parte da história da humanidade, passando por diversas etapas ao longo dos séculos. No início, saber distinguir o que era tóxico estava relacionado à necessidade de separar aquilo que podia ser utilizado como fonte de alimento, daquilo que não podia. Posteriormente, o que se sabia ser tóxico passou a ser empregado nas ferramentas de caça, como agente bélico e, também, com fins políticos na Idade Média, fase dos envenenadores nas cortes dos reis, fato esse amplamente descrito na história da humanidade. Neste sentido, refere-se que na Idade Média houve o “aprimoramento da arte de envenenar”, recorrendo-se aos “venenos” com finalidades política e econômica.

O médico e químico espanhol Mathieu Joseph Bonaventura Orfila (1787–1853), considerado o “Pai da Toxicologia”, foi um pioneiro no século XIX, em particular, da medicina forense, ao criar certos preceitos relacionados às intoxicações intencionais (GALLO, 2001).

Alguns preceitos relacionados às análises químicas que foram criados no século XIX são atuais até hoje. São eles: a experiência (*expertise*) do analista como fator determinante de uma análise forense; o histórico completo do fato; a criação de uma cadeia de custódia, com a finalidade de assegurar a integridade da amostra, e a impossibilidade de uma adulteração da mesma antes que a análise ocorra; a observação dos resultados que devem ser avaliados no momento da análise, considerando a estabilidade do teste; os reagentes que devem ser adequados às análises; a utilização de uma matriz isenta do agente tóxico para comprovar que nenhum dos constituintes da mesma interferia nas análises; e a necessidade de um teste controle positivo e a repetibilidade do teste assegurando, assim, a qualidade da análise (GALLO, 2001, SOFT, 2006, BRASIL, 2012).

Ressalte-se que são importantes ferramentas nos laudos periciais e poderosos argumentos na elucidação de uma questão judicial, as análises químicas sistemáticas quando validadas de acordo com os *guidelines* (diretrizes) internacionais e/ou resoluções e legislações que as normatizam.

No Brasil, até o ano de 2012, os métodos utilizados em toxicologia analítica seguiam a Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), referente ao “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. Em 17 de maio de 2012 a ANVISA publicou a Resolução a RDC 27 de 2012 da ANVISA (Brasil, 2012), que “dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados

em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos”, fixando novos critérios para os estudos bioanalíticos, isto é, aqueles que empregam materiais biológicos, como, por exemplo sangue e plasma.

As análises toxicológicas com finalidade forense ocorrem independentemente do tipo de intoxicação (acidentais ou intencionais) e têm como finalidade estabelecer um nexos causal e temporal que são importantíssimos no processo judicial e na elucidação do fato ocorrido; para tanto é necessário que se realize uma análise forense, seguindo os critérios necessários para que essa possua validade judicial, obedecendo alguns preceitos básicos já estabelecidos, como a criação de uma cadeia de custódia da amostra, para assegurar integridade da amostra, a validação dos métodos analíticos, o método empregado de forma correta, entre outras características.

O último relatório, referente ao ano de 2010, emitido pelo *National Poison Data System*, vinculado ao *American Association of Poison Control Centers*, apontou que 2.384.825 seres humanos foram expostos a algum tipo de substância que causou intoxicação, enquanto 94.823 animais foram expostos a agentes tóxicos; esses dados mostram que existe uma notória diferença no número de notificações de casos de intoxicações entre os seres humanos e os animais, possivelmente em virtude da diferenciação entre valores da vida de um ser humano e um animal. O mesmo foi observado no Brasil pelo Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX), que no último relatório divulgado, referente ao ano de 2012, mostrou a ocorrência de 102.854 intoxicações envolvendo seres humanos e animais, sendo que desse total, 1.199 (1,17%) intoxicações foram relatadas em animais (SINITOX, 2015). No município de São Paulo foram relatados 8.261 casos de intoxicação, sendo que desse total, 185 (2,24%) casos ocorreram em animais (SINITOX, 2015).

Dentre os principais agentes responsáveis por intoxicação, tanto em seres humanos, como em animais, estão os praguicidas. Praguicida é uma denominação comum para inúmeros agentes que são classificados com base no padrão de uso e organismo alvo, sendo classificados como herbicida, inseticida, nematicida, rodenticida, dentre outros (ECOBICHON, 2001). Os praguicidas são responsáveis por intoxicações exógenas intencionais ou não intencionais em virtude de sua ampla toxicidade e dificuldade para realização rotineira de análises toxicológicas em amostras biológicas.

Em Medicina Veterinária os praguicidas ocupam o lugar de destaque entre as substâncias utilizadas com finalidade criminosa de intoxicação de animais. Neste sentido, Xavier et al. (2002) relataram intoxicação em animais oriunda desse tipo de fonte ilícita num Hospital

Veterinário da cidade de São Paulo, no período de 1998 a 2000, em cães e gatos. Esses autores observaram que em um universo de 203 cães, 39,3% foram intoxicados por organofosforados e 35,7% por carbamatos; e em um total de 47 gatos intoxicados, 46,1% dessas intoxicações estavam relacionadas com os carbamatos e 38,5% com organofosforados.

Os organofosforados e carbamatos são agentes inibidores das colinesterases que possuem risco elevado de causar toxicidade em sistemas biológicos, podendo levar a danos irreversíveis (MORAES, 1999; XAVIER, SPINOSA, 2008).

No Brasil é amplamente descrita a existência de vários casos de crimes contra animais (XAVIER et al., 2002; BULCÃO et al., 2010), bem como em seres humanos os homicídios, os suicídios e as tentativas destes crimes registrados nas Delegacias Policiais, mostrando o praguicida carbamato aldicarbe como o xenobiótico de maior importância (CAZENAVE et al, 2005).

O aldicarbe foi comercializado no Brasil com o nome de Temik 150[®] (da empresa Bayer Cropsciences) até o ano de 2012. Em junho de 2012, a ANVISA cancelou o informe de avaliação toxicológica do aldicarbe e, em outubro de 2012, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) publicou o cancelamento do registro do Temik 150[®]; com a decisão, estão proibidos no Brasil a produção, a comercialização e o uso de qualquer praguicida à base de aldicarbe.

Esse praguicida foi introduzido no mercado no ano de 1970, cinco anos após sua síntese ser realizada por Payne e Weiden, e como o aldicarbe pertence ao um grupo de praguicidas carbamatos, apresenta menor toxicidade aguda para mamíferos quando comparados aos organofosforados (LARINI, 1999).

Atualmente, existem aproximadamente 25 praguicidas carbamatos formulados em vários tipos de produtos com finalidades diversas, tendo o aldicarbe como um dos de maior importância toxicológica, em virtude da sua elevada utilização no mercado lícito (até o ano de 2012) e ilícito (PLAA, 2003; OGA, 2003).

A indicação principal da utilização do aldicarbe era como inseticida, acaricida e nematocida com aplicabilidade em diversas culturas vegetais (LARRINI, 1999; XAVIER et al., 2007a, b). Ainda existe uma utilização clandestina e ilícita do aldicarbe como raticida conhecida no mercado negro como “chumbinho”, nome esse empregado em decorrência de sua forma granulada apresentar características macroscópicas de pequenos grãos, de coloração cinza escuro compatíveis com o chumbo utilizado em espingardas. Essa forma granulada diminui as intoxicações relacionadas com o uso agrícola por diminuir a sua mobilidade e retardar a

liberação do princípio ativo, porém o “chumbinho” ficou consagrado por suposta eficácia e letalidade para os roedores, o que tem exposto a população a importantes riscos de intoxicações graves, muitas vezes fatais (OGA, 2003).

As principais vias de exposição ao aldicarbe são oral, dérmica e respiratória. Possui uma cinética de absorção e distribuição rápida, que o torna extremamente letal em alguns casos. É extensamente biotransformado em aldicarbe-sulfóxido e aldicarbe-sulfona, sendo esses eliminados em 80% pela via urinária e nas fezes, em um período de 48 horas (ELLENHORN, 1997; OGA, 2003).

Após ser prontamente absorvido por qualquer uma das vias de exposição, o aldicarbe é, inicialmente, oxidado a aldicarbe-sulfóxido e uma porção deste é lentamente degradada a aldicarbe-sulfona, antes de ser hidrolisado a metabólitos sem atividade anticolinesterásica (BARON, 1994; HARPER et al., 1998; XAVIER et al., 2007). Estes compostos têm sido apontados como indicadores da exposição ao aldicarbe, embora sejam estáveis por, no máximo, dois dias em animais vivos ou mortos (HARPER et al., 1998; COBB et al., 2001).

O mecanismo de ação desse praguicida é a inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) devido a carbamilação do sítio esteárico da enzima, o que o classifica como um agente anticolinesterásico. Devido ao aumento das concentrações de acetilcolina nas fendas sinápticas colinérgicas muscarínicas e nicotínicas, também é classificado como colinomimético de ação indireta (PAPPANO, 2003).

A síndrome colinérgica ou colinomimética desencadeada é caracterizada pela exacerbação colinérgica, caracterizada pelos seguintes sinais e sintomas: diarreia, náusea, vômito, cólica abdominal, sialorréia, sudorese, cefaleia, ataxia, letargia, labilidade emocional, confusão mental, perda de memória, visão borrada, miose, bradicardia, hipotensão, fasciculação muscular, dispneia, convulsão, coma e óbito (ELLENHORN, 1997; ECOBICHON, 2001).

Estima-se que a Ingestão Diária Aceitável (IDA) do aldicarbe esteja entre 0,003 e 0,005 mg/kg/dia e dose letal 50% (DL50) oral para ratos é 0,49 a 1,41 mg/kg (XAVIER et al., 2007), o que o torna especialmente procurado para indução de envenenamentos intencionais em indivíduos humanos e animais (HAYES, 1975; PLAA, 2003).

O carbofurano é outro praguicida pertencente ao grupo dos carbamatos, empregado como inseticida e nematicida em agricultura, que em virtude das suas características serem semelhantes ao do aldicarbe tem sido associado também a quadros de intoxicação.

Já o forato é um praguicida pertence ao grupo químico dos organofosforados, que é empregado como inseticida, acaricida e nematicida na agricultura; é inibidor irreversível da

acetilcolinesterase, causando os mesmos efeitos tóxicos dos praguicidas carbamatos sobre os seres vivos expostos (EDWARDS; TCHOUNWOU, 2005).

Devido a semelhança entre os grânulos do aldicarbe com os do carbofurano, bem como do forato, além de possuir mecanismo de ação semelhante, inibindo a acetilcolinesterase, são comercializados ilegalmente como “chumbinho”, podendo causar também graves intoxicações que se confundem com aquelas do aldicarbe.

Sob o ponto de vista da detecção e quantificação da presença do aldicarbe em amostras biológicas, este praguicida representa um desafio analítico para o toxicologista, devido a sua rápida biotransformação em aldicarbe-sulfona e aldicarbe-sulfóxido, reduzindo a concentração de aldicarbe inalterado disponível para detecção por cromatografia em camada delgada (CCD), método utilizado rotineiramente nos laboratórios de análises toxicológicas brasileiros, incluindo os laboratórios oficiais (TRACQUI et al, 2001).

A técnica de CCD possui limitações, como a baixa sensibilidade e especificidade, e o fato de não ser uma técnica quantitativa; essas limitações comprometem a sua aplicabilidade para a elaboração de laudos periciais. Por outro lado, técnicas como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou a cromatografia a gás (CG) são ferramentas mais sofisticadas e aplicáveis na detecção e quantificação do aldicarbe e seus metabólitos, bem como dos praguicidas carbofurano e forato.

Considerando que esses praguicidas anticolinesterásicos são importante causa de óbitos intencionais e não intencionais em animais, a validação e o estudo de estabilidade desses praguicidas em matrizes biológicas como conteúdo estomacal, sangue total, fígado e humor vítreo, bem como a detecção de metabólitos se fazem necessários no contexto da medicina veterinária legal e são o foco do presente trabalho.

Optou-se nesta tese apresentá-la na forma de capítulos. No primeiro capítulo discute-se o recebimento de amostras e um modelo de formulário de Requisição de Análise Toxicológica num laboratório veterinário de análises toxicológicas que recebe amostras biológicas de interesse forense.

O segundo capítulo apresenta a possibilidade de utilização de uma técnica enzimática com a finalidade de avaliar o potencial de inibição dos praguicidas anticolinesterásicos. Desta forma, mostrando o potencial tóxico dos metabólitos do aldicarbe, bem como sugerindo a possibilidade de criação de um teste enzimático que teria a finalidade de auxiliar nas análises referentes aos achados toxicológicos, podendo ser empregada como uma técnica complementar no algoritmo de trabalho do laboratório de análises toxicológicas com finalidade forense.

O terceiro capítulo trata-se do teste de dissolução *in vitro* da forma acabada do grânulo comercial do aldicarbe (Temik150[®]), a fim de avaliar a cinética de liberação do princípio ativo tóxico, bem como a cinética de formação dos seus principais metabólitos ativos, considerando que cães e gatos encontrados mortos com suspeita de intoxicação exógena apresentam “chumbinho” no conteúdo estomacal.

No quarto e último capítulo apresenta o desenvolvimento de uma metodologia para determinação de praguicidas anticolinesterásicos, bem como os seus produtos biotransformados em diversas matrizes biológicas, baseada em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por arranjo de diodos (DAD). Foram estudados parâmetros como a composição da fase móvel, tipo de coluna a ser utilizada, além de determinar a melhor técnica de extração dos analitos.

Finaliza-se o trabalho com as considerações finais.

2 **CAPÍTULO I – Recebimento de amostras biológicas e modelo de formulário de Requisição de Análise Toxicológica para um laboratório veterinário de análises toxicológicas de interesse forense**

2.1 **INTRODUÇÃO**

Historicamente o principal período que remete às intoxicações¹ e aos envenenamentos² foi à Idade Média. Os agentes tóxicos como arsênio, chumbo, alcaloides vegetais, dentre outros, foram amplamente utilizados para eliminar pessoas, visando obter vantagens políticas e/ou econômicas (FUKUSHIMA; AZEVEDO, 2008; GALLO, 2001).

O médico e químico espanhol Mathieu Joseph Bonaventura Orfila foi um pioneiro no século XIX ao criar certos preceitos relacionados às intoxicações intencionais. Orfila ficou consagrado por ser o primeiro toxicologista a mostrar a importância do aspecto forense, pois reuniu profundos conhecimentos de química analítica sistemática à área biológica, realizando análises químicas em vísceras oriundas de pessoas com morte suspeita submetidas à necropsia, pesquisando xenobióticos que pudessem relacionar a causa mortis.

Conta a história que, em 1840, Marie LaFarge foi julgada pelo assassinato de seu marido com arsênio. Misteriosamente, embora o arsênio estivesse sido encontrado no alimento, não foi encontrado no corpo da vítima. Orfila foi chamado pelo tribunal para investigar o caso; ele descobriu que o teste de Marsh, utilizado para pesquisar a presença do arsênio, tinha sido realizado de forma incorreta, e que havia, de fato, o arsênio no corpo da vítima, possibilitando que LaFarge fosse considerada culpada³. Orfila instituiu a interdisciplinaridade entre as esferas de conhecimento, as ciências exatas, humanas e biológicas, condenando, assim, madame LaFarge a pena de morte utilizando uma análise pericial (GALLO, 2001).

¹ Intoxicação é estado mórbido causado pela exposição a um agente tóxico.

² Envenenamento é um termo associado a veneno, que, por sua vez, remete a animais venenosos, os quais produzem o veneno, mas não possuem um aparelho inoculador (como, por exemplo, dentes ou ferrões), enquanto os animais peçonhentos têm glândulas que produzem o veneno e um aparelho inoculador que injeta o veneno com facilidade e de maneira ativa.

³ O relato de caso de foi baseado no texto presente site *Visible Proofs: Forensic viwes of the body* disponível em: <http://www.nlm.nih.gov/visibleproofs/galleries/cases/orfila.html>

As provas periciais encontradas *in loccu* aliadas às análises laboratoriais são também importantes nos processos de litígio e soluções de crimes. Um exemplo disso é o relato de um dos primeiros casos envolvendo vestígios biológicos que ocorreu em Paris, no ano de 1868, no qual Pierre Voirbo foi acusado de assassinato, quando manchas de sangue secas foram encontradas embaixo de ladrilhos de sua casa tempos depois do crime; as análises laboratoriais realizadas tempos após a descoberta foram de fundamental importância em sua condenação pelo assassinato de Desiré Bodasse (EVANS, 1996).

Alguns conceitos relacionados à análise toxicológica criados no século XIX são ainda bastante atuais, como o conhecimento do histórico completo do fato, a experiência (*expertise*) do analista como fator determinante de uma análise forense, a criação de uma cadeia de custódia com a finalidade de assegurar a integridade da amostra e a impossibilidade da adulteração da mesma antes que a análise ocorra; no laboratório de análises toxicológicas, os resultados devem considerar a estabilidade da amostra, os reagentes necessitam ter qualidade adequada às análises, a utilização de uma matriz isenta de contaminantes para comprovar que nenhum dos constituintes da mesma interfira na análise, a necessidade de um controle positivo assegurando a eficácia da análise, dentre outros (GALLO, 2001; SOFT, 2006; BRASIL, 2012).

As análises toxicológicas, bem como as análises dos vestígios biológicos deixados em um local de crime ou mesmo achados necroscópicos quando atendem aos procedimentos validados de acordo com as diretrizes (*guidelines*) nacionais e internacionais são importantes ferramentas nos laudos periciais e poderosos argumentos na elucidação de uma questão judicial, bem como da possível autoria de crimes cometidos.

A amostra biológica (ou amostra em estudo ou ainda objeto de análise), portanto, é o que se obtém no procedimento da necropsia. São passíveis de extração de material genético o sangue, o sêmen, cabelos com bulbos, unhas, entre outras que possibilitem uma correlação do perfil genético do (s) suspeito (s) com o crime. Existem também outras amostras biológicas que podem ser coletadas como vísceras, humor vítreo e fluidos corporais, comumente empregadas nas análises toxicológicas. Portanto, essas amostras são muitas vezes peças-chaves na condução de uma investigação criminal, bem como para a futura acusação e processo criminal (OTSUKA et al., 2009). Já a matriz biológica, segundo a Resolução RDC Nº 27 de 17 de maio de 2012 (BRASIL, 2012) é o meio de origem biológica no qual os analitos em estudo são quantificados. Dessa forma, a amostra biológica passa a ser matriz biológica, uma vez que lhe é atribuída uma cadeia de custódia e a mesma é recebida em laboratório com a finalidade de ser analisada.

No Brasil, não existe nenhuma normatização nacional que recomende procedimentos referentes à coleta e preservação de material biológico encontrado em locais de crime ou mesmo orientações a médicos legistas ou a médicos veterinários sobre coletas provenientes de necropsias. A maior parte dos Estados brasileiros adotam a Resolução SSP-194, de 2 de junho de 1999, do Estado de São Paulo, que traz recomendações para coleta e exame de materiais biológicos para identificação humana (OTSUKA et al., 2009). Ressalte, ainda, que não existe um órgão governamental responsável pelas análises periciais locais, bem como as laboratoriais no caso dos crimes contra animais.

Em relação aos crimes contra os animais, o Art. 32 da Lei de Crimes Ambientais - Lei 9.605/98 que “dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências”, dispõe:

Art. 32. Praticar ato de abuso, maus-tratos, ferir ou mutilar animais silvestres, domésticos ou domesticados, nativos ou exóticos:

Pena - detenção, de três meses a um ano, e multa.

§ 1º Incorre nas mesmas penas quem realiza experiência dolorosa ou cruel em animal vivo, ainda que para fins didáticos ou científicos, quando existirem recursos alternativos.

§ 2º A pena é aumentada de um sexto a um terço, se ocorre morte do animal.

Neste contexto, a fim de contribuir com as questões judiciais relacionadas com crimes contra animais, é importante para a medicina veterinária legal o estabelecimento de uma **cadeia de custódia**, para fornecer, assim, laudos periciais confiáveis.

Segundo Tomlison, Elliott-Smith e Radosta (2006), cadeia de custódia é definida como um conjunto de registros que permite um controle quase que absoluto sobre documentos, dados totais e amostras, desde a sua coleta inicial até o final da análise. Portanto, os procedimentos de protocolar, documentar e acompanhar as amostras recebidas são fundamentais em laboratórios que trabalham com amostras regulamentadas por instruções normativas ou legais, como os laboratórios forenses.

A cadeia de custódia também pode ser definida como o conjunto de procedimentos que tem o objetivo de garantir a fidedignidade dos materiais que serão analisados, desde a sua coleta até o final da análise realizada, incluindo toda a documentação necessária, fotográfica e escrita,

de modo a permitir a rastreabilidade das amostras em todas as fases de seu manuseio; pode ser dividida em duas fases (BONACCORSO, 2007):

- **custódia externa:** consiste na documentação da amostra, desde a sua descoberta até o procedimento de entrada no laboratório de análise;
- **custódia interna:** consiste na documentação e armazenamento das amostras, desde o recebimento pelo laboratório até seu destino final, podendo compreender exames e/ou contraperícia.

O objetivo de se manter uma cadeia de custódia de uma determinada amostra laboratorial é o de garantir a segurança do laudo final, bem como manter a veracidade da informação fornecida pelo laboratório ao solicitante da análise, seja ele particular ou um órgão oficial; para tanto, nos registros devem constar os locais físicos de armazenamento, identidade das pessoas responsáveis pela sua posse, as circunstâncias em que ocorreu a coleta, a duração de cada custódia, as condições de armazenamento e transporte e a identificação dos lacres utilizados para sua embalagem (BONACCORSO, 2005).

Judicialmente a cadeia de custódia garante a seguridade, principalmente, de informações como localização geográfica e temporal, tutoria legal, rastreabilidade e acesso em relação à amostra.

Um dos entraves de manter uma cadeia de custódia é a necessidade de documentar (em papel) os procedimentos que envolvem a amostra, o que normalmente gera um volume grande de documentos elaborados e mantidos pelo administrador do laboratório forense, embora, com o advento tecnológico, a tendência atual é a utilização de meios eletrônicos que permitam a rastreabilidade, que vão desde a simples atribuição de um número identificador, como códigos de barras até o uso de aparatos de radiofrequência (TOMLISON; ELLIOT-SMITH; RADOSTA, 2006).

Os laboratórios responsáveis pela realização de análise que empregam esses meios tecnológicos devem apresentar soluções para evitar a falsificação, perda, deterioração e/ou contaminação das amostras recebidas (SÃO PAULO, 1990).

Em virtude da dificuldade de armazenamento das provas periciais, em meados de 2001, no Estado de São Paulo, cogitou-se a criação de um centro de custódia, que teria a função de “um organismo centralizador de segurança destinado a guarda de materiais, substâncias, instrumentos e objetos a serem periciados, já periciados ou com perícias em andamento”. Sua

idealização surgiu da necessidade de solucionar problemas como a guarda de materiais que havia sido solicitado perícia e que muitas vezes sofriam extravios, bem como a dificuldade de obter espaço físico nos laboratórios (BONACCORSO; PERIOLI, 2001). Atualmente, o material de contraperícia é armazenado nos próprios laboratórios e fica sob a responsabilidade do analista responsável pelo caso.

A cadeia de custódia é de fundamental importância para qualquer laboratório que realize análises, que, por ventura, possam ter finalidade forense, pois qualquer dúvida quanto à custódia de um material periciado pode inutilizar todo o trabalho do analista que efetuou a análise requisitada, somando-se a isso o desperdício de recursos e tempo (BONACCORSO; PERIOLI, 2001).

Ressalte-se, ainda, que a cadeia de custódia se torna necessária para melhorar a qualidade da análise, além de funcionar como um facilitador na comunicação entre a sala de necropsia (médicos veterinários legistas) e o laboratório de análises (analistas do laboratório de toxicologia).

Cabe ao médico veterinário legista conhecer os fatores que podem alterar ou até impossibilitar determinados exames toxicológicos, bem como as melhores amostras a serem coletadas durante o procedimento de necropsia, colaborando, otimizando e garantindo a qualidade das análises laboratoriais. O fornecimento de informações sobre o caso é de extrema valia para o analista, podendo contribuir para o sucesso ou fracasso das análises toxicológicas laboratoriais.

Para tanto, objetivou-se nesse capítulo auxiliar na normatização e padronização de todas as etapas envolvidas num exame laboratorial que possa ser utilizado como prova pericial, enfocando os cuidados relacionados à coleta, envio e procedimentos em amostras biológicas no laboratório veterinário de análises toxicológicas, bem como a elaboração de formulário de requisição de análise toxicológica e de um folheto informativo sobre coleta de material para envio ao laboratório de análise toxicológica. Essa proposta foi embasada nas atividades do Laboratório de Diagnóstico Toxicológico (LADTOX) e do Serviço de Patologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP).

2.2 REVISÃO DA LITERATURA

Os procedimentos que antecedem a obtenção da amostra biológica (na cena do crime ou na sala de necropsia) devem ser acompanhados de documentação adequada, a fim de se estabelecer uma cadeia de custódia externa ao laboratório, constando de documentação, histórico, local de encontro da carcaça, iscas ou outros materiais, sinais de maus tratos como lesões ou ferimentos sugestivos, sinais de alterações patológicas instaladas e qualquer outra informação relevante; na dúvida da importância da informação, a mesma deve ser relatada ao analista (LEE; LADD, 2001).

2.2.1 Coleta de amostras biológicas

A realização da coleta deve ocorrer de maneira que garanta a integridade do material biológico, evitando contaminações durante o seu acondicionamento, as quais podem resultar em artefatos de análise, propiciando interpretação errônea dos resultados obtidos.

Erros ou equívocos na documentação da amostra biológica coletada compromete a cadeia de custódia, podendo ser questionada quanto sua origem. Da mesma forma, acondicionamento e estocagem incorretos comprometem a preservação da amostra biológica, o que origina resultados imprecisos ou questionáveis do ponto de vista legal (WAGGONER, 2007). Isso pode gerar contestação dos resultados obtidos nas análises laboratoriais e desacreditar seu valor na investigação criminal (LEE; LADD, 2001).

2.2.2 Escolha das amostras biológicas a serem coletadas

As amostras biológicas mais comumente utilizadas para análises toxicológicas forenses, em seres humanos, são: sangue (de eleição para análises toxicológicas), urina, saliva, conteúdo gástrico (enviar, de preferência, o estômago completo), humor vítreo e tecidos (fragmentos representativos de fígado, rins, pulmões etc.). De maneira mais incomum podem ser utilizados também: fios de cabelo, pelos, unhas, dentes, ossos, sêmen, medula óssea, conteúdo biliar e

fezes. Em medicina veterinária se empregam, em geral, as mesmas amostras biológicas, como: sangue, tecidos (fígado, rins, pulmões, tecido adiposo), conteúdo estomacal e intestinal; e dentre as amostras ambientais, empregam-se: alimentos, forragens, iscas e plantas (XAVIER et al., 2007 a, b).

O quadro 2.1 mostra as sugestões de amostras biológicas a serem coletadas para análises toxicológicas, considerando-se normatizações e artigos tanto nacionais como estrangeiros. É importante ressaltar que apenas uma recomendação voltada à medicina veterinária foi encontrada em literatura consultada.

Quadro 2.1 – Sugestão de matrizes a serem coletadas para análises laboratoriais.

Origem da amostra	Tipo de amostra	Quantidade	Cuidados	Referência
Humana	Sangue	Não consta	Guia para coleta de material biológico para análise de DNA. A coleta deve ser realizada utilizando kits estéreis, e o material deve ser resfriado a 2 a 8 °C e transportado o mais rápido possível ao laboratório. Durante o transporte a temperatura não deve exceder 25 °C. As amostras podem ser armazenadas em freezer a -18 °C por até 12 meses.	Forensic Services Guide, (2014)
	Sêmen	Não consta		
	Urina	Não consta		
	Saliva	Não consta		
	Fezes	Não consta		
Humana	Sangue líquido	Não consta	Refrigeração ou congelamento	NISTIR (2013)
	Urina	Não consta	Congelamento	
	Material biológico seco	Não consta	Temperatura controlada	
	Material sujo em sangue fresco	Não consta	Congelamento	
	Ossos	Não consta	Temperatura controlada	
	Cabelo	Não consta	Temperatura controlada	
	Swab com material biológico	Não consta	Temperatura controlada (seco)	
	Manchas vaginais	Não consta	Temperatura controlada	
	Fezes	Não consta	Congelado	
	Swab com material oral.	Não consta	Temperatura controlada.	

(Continuação)

Origem da amostra	Tipo de amostra	Quantidade	Cuidados	Referência
Humana	Urina	Coletado em até 5 dias após o crime no mínimo 50 mL	<p>Guia para coleta de material biológico para análise de DNA e toxicológico. A coleta deve ser realizada utilizando kits estéreis, e o material deve ser resfriado a 2 a 8 °C e transportado o mais rápido possível ao laboratório. Durante o transporte a temperatura não deve exceder 25 °C. As amostras podem ser armazenadas em freezer a -18 °C por até 12 meses.</p> <p>*Quantificação comprometida, pois a cinética nesses pelos não é bem estabelecida.</p>	UNODC (2009)
	Sangue total	Coletado em até 2 dias após o crime em seringa sem etanol ou outro solvente. No mínimo 2 tubos com 5 mL contendo fluoreto de sódio 2,5 g/L e oxalato de potássio 2g/L		
	Cabelo	Deve ser coletado no mínimo 4 semanas após o crime; no caso de eliminação pode ser utilizado pelos *pubianos, *axilares, das *pernas ou *peito		
	Outras amostras biológicas (vômitos ou roupas)	Todo o disponível		
	Outras amostras (copos de bebidas, alimentos, garrafas de bebidas, produtos farmacêuticos, prescrições)	Todo o disponível		

(Continuação)

Origem da amostra	Tipo de amostra	Quantidade	Cuidados	Referência
Humana	Fluidos corporais	Não consta	Armazenar em potes de vidro a -15 °C, rotulagem acompanhada de duas pessoas.	GTFCH (2009)
	Material extraído	Não consta		
Animal	Sangue total	5/10 mL de soro/sangue	As matrizes que tiverem condição de serem homogeneizadas deverão ser. A refrigeração deve ser a mais rápida possível. Este é o único material em literatura voltado para medicina veterinária legal.	SPINOSA <i>et al.</i> (2008)
	Urina	50 mL		
	Fezes	250 g		
	Vômito	250 g		
	Pelos	5 a 10 g		
	Fígado	50 a 100 g		
	Rins	50 a 100 g		
	Conteúdo estomacal	150 a 500 g		
	Conteúdo ruminal	150 a 500 g		
	Tecido adiposo	500 a 100 g		
	Encéfalo	Inteiro		
	Alimentos	200 a 500 g		
	Forragens	200 a 500 g		
	Iscas	Toda se possível		
	Plantas tóxicas	Não consta		
	Água/Solo	0,5 a 1 L/1kg		

(Continuação)

Origem da amostra	Tipo de amostra	Quantidade	Cuidados	Referência
Humana	Cérebro	50 mg	Com contaminação, refrigeração rápida de coleta com fluoreto (apenas para o sangue cardíaco e periférico)	SOFT (2006)
	Fígado	50 mg		
	Rins	50 mg		
	Sangue cardíaco	25 mL		
	Sangue periférico	10 mL		
	Humor vítreo	Todo o disponível		
	Bile	Todo o disponível		
	Urina	Todo o disponível		
	Conteúdo gástrico	Todo o disponível.		

(Continuação)

Origem da amostra	Tipo de amostra	Quantidade	Cuidados	Referência
Humana	Sangue	Coletar esfregaço apropriado	Com contaminação, pois a normatização versa sobre análise de DNA. Acondicionamento imediato a -20°C	SÃO PAULO (1999)
	Manchas de sangue	Coletar esfregaço apropriado		
	Ossos	Não consta		
	Sêmen	Coletar esfregaço apropriado		
	Manchas de sêmen	Não consta		
	Órgãos	Não consta		
	Tecidos	Não consta		
	Dentes	Não consta		
	Fios de cabelo	Não consta		
	Pelos	Não consta		
	Unhas	Não consta		
	Saliva	Não consta		
	Urina	Não consta		
Humana	Sangue total	Não consta	Armazenar a 4 °C ou sobre refrigeração, in natura ou com citrato em recipientes de vidro, alumínio ou plástico Zip-loc.	DIERAUF (1994)
	Soro			

(Conclusão)

2.2.3 Recebimento das amostras biológicas no laboratório de análises toxicológicas

O material deve ser recebido no laboratório de análises toxicológicas, preferencialmente, por no mínimo dois funcionários, na presença do solicitante/portador deste material, verificando-se o estado do seu acondicionamento, a integridade do lacre, a quantidade da amostra, se está armazenada e preservada de acordo com as normas adotadas no laboratório ou diretrizes nacionais ou internacionais, e se foi encaminhado um material para confronto, bem como histórico elaborado com letra legível ou digitado.

Esse material deve ser identificado com etiqueta inviolável, atribuindo um número que fica atrelado ao analista responsável; esse número é então registrado em livro ata juntamente com nome, data e assinatura dos dois funcionários que acompanharam a entrega e do solicitante/portador do material. Em seguida esse material deve ser levado imediatamente ao refrigerador, preferencialmente, trancado com chave para, posteriormente, ser analisado pelas técnicas preconizadas no laboratório

2.2.4 Procedimentos para a extração em amostras biológicas

A análise toxicológica tem início com os procedimentos de extração e purificação das amostras biológicas, de modo que esse extrato possa ser utilizado nos equipamentos, ou mesmo, para que os inúmeros constituintes das amostras biológicas minimizem suas interferências durante o processo analítico.

O local do laboratório onde se processa a extração é considerado uma área suja ou contaminada, uma vez que todo o material biológico a ser extraído, é verificado e alíquotado, seja por peso ou por volume, para que os procedimentos de extração possam ser realizados.

Em geral, esse local do laboratório é equipado com uma capela (Figura 2.1) ou uma coifa, que são utilizadas no processo inicial de observação cuidadosa do material; durante esse processo o analista deve, de maneira atenta, verificar as características macroscópicas do material, anotando-as em prontuário próprio, sempre acompanhado do número atribuído

inicialmente no recebimento do mesmo, bem como fotografando esse material, a fim de garantir a rastreabilidade, bem como a cadeia de custódia.

Figura 2.1 – Capela utilizada nos procedimentos de extração e cuba cromatográfica usada na triagem de amostras biológicas recebidas para as análises toxicológicas realizadas no Laboratório de Diagnóstico Toxicológico (LADTOX) do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Fonte: Fukushima (2015)

A amostra biológica (Figura 2.2) não deve estar desacompanhada, em hipótese alguma, do analista; caso o analista precise se ausentar, é necessário conduzir a amostra novamente ao refrigerador, ficando trancada no mesmo até o momento do retorno do analista.

Figura 2.2 – Amostras biológicas diversas encaminhadas ao Laboratório de Diagnóstico Toxicológico (LADTOX) do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, as quais serão submetidas ao procedimento de extração.

Fonte: Fukushima (2015)

2.2.5 Procedimentos para a análise de amostras biológicas

Em geral, os ensaios a serem utilizados são definidos de acordo com a experiência do analista, uma vez que não existe uma única técnica analítica inequívoca, capaz de desvendar qual xenobiótico estaria atrelado ao efeito tóxico ou mesmo a causa da morte do indivíduo. Porém, nas análises toxicológicas, em geral, os métodos cromatográficos usualmente são eleitos para a realização da pesquisa dos toxicantes (OTSUKA et al., 2009).

As análises toxicológicas com finalidade forense, por convenção mundial, são realizadas em três etapas: uma análise de triagem que geralmente envolve um imunoensaio, podendo ser o ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) ou o imunoensaio de fluxo lateral (IFL), e duas posteriores análises confirmatórias que, normalmente, envolvem as análises cromatográficas, sendo essas realizadas por métodos físicos e químicos diferentes entre si, sempre todos validados (SOFT, 2006)

2.2.6 Interpretação dos resultados da análise toxicológica

A interpretação dos resultados provenientes das análises toxicológicas sistemáticas com finalidade forense certamente é um dos pontos críticos do processo de um laudo seguro e confiável.

Vale ressaltar que a *expertise* do analista, bem como sua fé pública e sua honestidade são de fundamental importância no processo de garantia da análise. Um laboratório sem técnicos treinados de maneira adequada certamente estará fadado ao fracasso, mesmo que esse possua equipamentos modernos de elevada sensibilidade e especificidade.

A experiência do analista é essencial para a interpretação dos achados analíticos, uma vez que os resultados das análises, tanto da triagem quanto as confirmatórias obtidos das amostras, devem ser cuidadosamente interpretados, considerando as limitações dos métodos empregados e a possibilidade de ocorrência de falso positivo ou falso negativo.

Nos laboratórios forenses existe a necessidade de implementar um espaço separado com refrigeradores para o armazenamento das amostras de casos já resolvidos, para o caso de ocorrer a necessidade de uma nova perícia, isto é, a contraprova.

A contraprova é prevista no Decreto-Lei nº 986/69 (“institui normas básicas sobre alimentos”), no seu Art. 34; e a Lei nº 6.437/77 (“configura infrações à legislação sanitária federal, estabelece as sanções respectivas, e dá outras providências”), no parágrafo 4, do Art.27 que trata sobre a tomada de procedimentos que antecedem à realização da análise de contraprova, tanto pelos órgãos de Vigilância Sanitária, como pelo titular do produto.

A contraprova pode ser solicitada quando o resultado das análises do Laudo de Análise emitido pelo laboratório for questionado judicialmente pela figura do assistente técnico geralmente solicitado pela parte acusada (defesa), pois a legislação confere ao acusado o direito de defesa, garantido pela Constituição Federal, que poderá ser utilizado, caso assim o queira.

Desta forma, uma vez cumprido os requisitos legais descritos em lei (responsabilidades pela coleta e envio de amostras e pela execução da análise laboratorial), será realizada a análise de contraprova, correspondendo, ao menos, teoricamente, à repetição exata da análise cujo resultado foi contestado, realizada sobre outra alíquota de amostra idêntica.

Não existe um consenso normatizando o tempo de armazenamento da contraprova, devendo essa ser armazenada maior tempo possível, uma vez que o laudo de análise poderá ser questionado a qualquer momento.

2.2.7 Tempo médio para conclusão de uma análise

O tempo estipulado para conclusão de uma análise, em geral, pelos laboratórios de toxicologia humana é de 30 a 90 dias, segundo a Resolução SSP nº 194/99, porém o código de processo penal não estabelece um prazo para esse tipo de análise.

Usualmente, prevalece o bom senso, ou seja, análises mais complexas analiticamente ou amostras em pior estado de conservação demandam tempo maior, enquanto amostras que estejam em melhor estado ou exames mais simples do ponto de vista analítico demandem menor tempo.

A figura 2.3 ilustra, sucintamente, o fluxograma das etapas envolvidas numa análise toxicológica, desde o recebimento das amostras até a análise final.

Figura 2.3 – Fluxograma sucinto das etapas envolvidas numa análise toxicológica.

Fonte: Fukushima (2015)

2.3 OBJETIVOS

Estabelecer os procedimentos para o recebimento de amostras biológicas no Laboratório de Diagnóstico Toxicológico (LADTOX), bem como a elaboração de formulário de requisição de análise toxicológica e de um folheto informativo sobre coleta de material para envio ao laboratório.

2.4 MATERIAL E MÉTODOS

2.4.1 Proposta para os procedimentos no laboratório de diagnóstico toxicológico (LADTOX) e de elaboração de formulário de requisição de análise toxicológica

O LADTOX realiza análises toxicológicas de amostras biológicas obtidas de animais ou em amostras ambientais que envolvam intoxicação animal, as quais são requisitadas diretamente pelos proprietários desses animais, em amostras biológicas oriundas de necropsias executadas no Serviço de Patologia do Departamento de Patologia da FMVZ/USP, bem como em amostras encaminhadas por órgãos oficiais. O Serviço de Patologia, além de necropsias, elabora laudos anatomopatológicos, atendendo solicitação de particulares ou de órgãos oficiais, e alguns desses laudos contemplam também análises toxicológicas realizadas pelo LADTOX.

Para facilitar a comunicação entre o LADTOX e o Serviço de Patologia, bem como garantir a cadeia de custódia interna no LADTOX, foi elaborado um novo formulário de Requisição de Análise Toxicológica (RAT), conforme ilustrado na figura 2.4.

Figura 2.4 – Modelo do formulário de Requisição de Análise Toxicológica (RAT) proposto para a aplicação no Laboratório de Diagnóstico Toxicológico (LADTOX) do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP).

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA
LABORATÓRIO ANÁLISES TOXICOLÓGICAS – LADTOX

Requisição de Análise Toxicológica (RAT)

Protocolo nº: _____

DADOS DO SOLICITANTE

Interno à FMVZ: ☐ HOVET - prontuário nº _____ ☐ Serviço de Patologia Animal - laudo nº _____ ☐ Departamento: _____	Externo à FMVZ: ☐ Órgão público: Qual? _____ ☐ Particular	
Médico Veterinário/Solicitante: _____	CRMV/RG: _____	Telefone: _____
Endereço: _____		
Data da ocorrência: _____	Data de entrada: _____	
Assinatura do solicitante: _____		

Uso exclusivo do LADTOX

DADOS DO RECEPTOR

Nome: _____	
Função/Cargo: _____	Nº USP: _____
Assinatura _____	Data: _____

DADOS DA AMOSTRA BIOLÓGICA

Cadeia de Custódia interna (número do laço): _____	Data do recebimento: _____
Responsável pela recepção do material: _____	
Condições do material: ☐ de acordo ☐ prejudicado	
Registro Fotográfico do material: ☐ presente ☐ ausente	

DESCRIÇÃO DA AMOSTRA BIOLÓGICA

Av. Orlando Marques de Paiva, nº 87 - Cidade Universitária - CEP 05508-270 - São Paulo - SP

Fone: (011) 3091-7933

Fonte: Fukushima (2015)

DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA
LABORATÓRIO ANÁLISES TOXICOLÓGICAS – LADTOX

--

HISTÓRICO DECLARADO

Nome do Proprietário:	RG:
Endereço:	
Nome do animal:	
Espécie/Raça:	
Lesões observadas:	
Estado geral da carcaça:	
Histórico (dados sobre a ocorrência, sinais clínicos, morte súbita, descrição das lesões, descrição do ambiente onde o animal vivia, tratamentos recentes e demais informações que julgar importantes):	
Suspeita clínica: _____	

TIPO DE OCORRÊNCIA

() intoxicação	() exposição	() reação adversa	() outros
-----------------	---------------	--------------------	------------

DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA
LABORATÓRIO ANÁLISES TOXICOLÓGICAS – LADTOX

CIRCUNSTÂNCIA

☐ acidental	☐ criminosa	☐ ignorada	☐ outras
------------------------------------	------------------------------------	-----------------------------------	---------------------------------

EXAMES REQUISITADOS (listar os exames requisitados para o laboratório):

--

FOTOGRAFIA DA(S) AMOSTRA(S)

Fotografia do material lacrado	Fotografia da abertura do lacre

Uso exclusivo do LADTOX

Assinatura do responsável pela análise	Assinatura do responsável pelo Laboratório.
Data:	Data:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA
LABORATÓRIO ANÁLISES TOXICOLÓGICAS – LADTOX

Protocolo do Formulário de Requisição de Análise Toxicológica (RAT)

1ª via do receptor

Protocolo nº: _____

DADOS DO RECEPTOR

Nome:	
Função/Cargo:	Nº USP:
Assinatura	Data:

DADOS DO SOLICITANTE

Solicitante:	Telefone:
Assinatura:	Data:

RESULTADO DA ANÁLISE

2ª via do solicitante

Protocolo nº: _____

DADOS DO RECEPTOR

Nome:	
Função/Cargo:	Nº USP:
Assinatura	Data:

DADOS DO SOLICITANTE

Solicitante:	Telefone:
Assinatura:	Data:

RESULTADO DA ANÁLISE

Esse novo modelo simples de requisição de análise toxicológica será disponibilizado aos médicos veterinários do Serviço de Patologia de forma impressa ou via intranet, interligando o Serviço de Patologia ao LADTOX e facilitando a comunicação dos médicos veterinários que necessitam de exames toxicológicos.

Este modelo é de fácil preenchimento, podendo ser manual ou digitado. Apresenta flexibilidade nos campos de preenchimento, motivo pelo qual não se admite que o documento contenha rasuras ou campos em branco. Assim, todos os campos devem ser preenchidos com letra legível ou digitados, em língua pátria, sem erros ortográficos e sem rasuras.

O formulário de requisição de análise toxicológica (RAT), que faz parte da cadeia de custódia interna do LADTOX, possui 5 partes. A primeira parte do formulário possui um campo no qual é colocado um número controle do LADTOX (por exemplo, 01/2015), que acompanha a análise desde a entrada no laboratório até o final, garantindo, assim, rastreabilidade dos dados, bem como da amostra biológica armazenada para a contraprova.

A segunda parte do formulário refere-se à identificação do solicitante e do receptor no laboratório. No caso de solicitante interno da FMVZ, deve constar o número do prontuário do HOVET ou do prontuário atribuído pelo Serviço de Patologia Animal (Cadeia de Custódia Interna) ou indicação do Departamento solicitante, o nome completo do médico veterinário, bem como o número do seu cadastro no conselho regional de medicina veterinária (CRMV), a data em que ocorreu o óbito e a data de entrada no serviço. No caso de solicitante externo à FMVZ, deve-se indicar o órgão público externo solicitante ou se trata de um particular, deve constar o nome completo e o registro geral (RG) do portador da amostra, telefone, bem como a data e hora de entrada. O solicitante deve também assinar no campo específico.

Vale destacar que como o LADTOX recebe solicitação de análise de amostras tanto do público interno da FMVZ/USP, como externo, optou-se por indicar no formulário, de forma clara e objetiva, o solicitante da análise. Isso facilita, no caso de órgão público externo, a remessa do resultado final da análise para este órgão.

Essa parte do formulário permite também identificar o receptor da amostra no LADTOX, que também é o responsável pelo preenchimento do formulário de RAT, dando continuidade à cadeia de custódia interna do laboratório. O nome do responsável pelo recebimento, bem como seu número USP deverão constar nesse campo, bem como a assinatura e data.

A terceira parte do formulário refere-se ao material biológico. Inicia-se com a indicação do número do lacre, seguida das condições do material e se há ou não registro fotográfico.

Posteriormente, preenche-se o campo relativo a descrição da amostra; esses dados reafirmam àqueles sobre as condições do material, que se estiver prejudicado comprometerão o resultado da análise. Nesta parte do formulário há um campo específico para o histórico declarado, cujo preenchimento reveste-se de importância, particularmente, nos casos de intoxicação criminosa do animal. As informações aí contidas são importantes para o analista do laboratório, pois proporciona a ele melhor compreensão do fato, auxiliando-o na escolha do método analítico ou mesmo norteando as análises solicitadas. Nesta parte deve constar o nome e registro geral do proprietário, nome, espécie, raça, sexo e idade do animal; se lesões foram observadas durante o procedimento de necropsia, qual o estado geral da carcaça, ou seja, se ela se apresenta em decomposição ou não, descrição do ambiente onde o animal vivia, tratamentos recentes e demais informações julgadas relevantes; há espaço também para indicar a suspeita clínica, se houver.

Nesta terceira parte do formulário, há ainda campos para indicar o tipo de ocorrência e circunstância, bem como os exames solicitados. Todas essas informações auxiliam o analista na escolha dos métodos analíticos a serem empregados. Segue, ainda, um espaço para inclusão de registros fotográficos, nos casos em que esse procedimento foi efetuado, assim garantido os cuidados tomados nesta situação. Em caso do pedido de uma contraprova, o material fotográfico poderá ser confrontado com a fotografia tirada no dia do recebimento. Isso abre a possibilidade do analista ilustrar seu resultado com fotografias do material e, também, é mais um fator de garantia da cadeia de custódia do laboratório, ao permitir que o material recebido possa ser conferido novamente com as fotografias ilustrativas.

A quarta parte do formulário possui dois campos, nos quais se identificam o responsável pela análise e o responsável pelo laboratório.

A última parte trata-se do protocolo da RAT que é preenchido em duas vias, sendo a primeira do receptor da amostra e a segunda do solicitante. Após o preenchimento, a primeira via fica de posse do laboratório comprovando a entrada do material e o início da cadeia de custódia interna.

Vale ressaltar novamente que nenhum campo desse formulário poderá ser deixado em branco, devendo ser preenchido com um traço o campo que não houver informação pertinente. Rasuras de qualquer tipo invalidam essa requisição, impossibilitando de ser recebida pelo LADTOX.

2.4.2 Proposta de Folheto para divulgação dos procedimentos de coleta e armazenamento de materiais biológicos a serem encaminhados ao laboratório de diagnóstico toxicológico (LADTOX)

No LADTOX não é raro o encaminhamento de amostras biológicas que não reúne condições de serem analisadas, pelo fato de haver erros na coleta do material. A fim de minimizar erros de coleta, padronizar essa atividade e facilitar o trabalho do médico veterinário que realiza a necropsia, se faz necessário uma maior divulgação dos procedimentos de coleta e armazenamento de material biológico a ser encaminhado para a análise toxicológica.

Os procedimentos para coleta de material biológico que envolve a espécie humana estão regulamentados pela Resolução SSP nº 194/99 (que “Estabelece normas para coleta e exame de materiais biológicos para identificação humana”), porém não existe ainda uma normatização dessa coleta para material biológico voltado ao serviço médico veterinário legal.

Na rotina laboral de um laboratório de análises toxicológicas, durante o procedimento de recebimento e acondicionamento das amostras biológicas, é notório a falta de padrão de coleta, uma vez que algumas amostras biológicas vem acondicionada em recipientes ou invólucros inapropriados, como luvas de procedimentos, sacos plásticos inadequados, “pote” de alimentos impróprios, ou mesmo, apresentando vazamentos que podem levar a contaminações que causaram artefatos de análise, conduzindo, muitas vezes, a um resultado equivocado e invalidando o resultado analítico.

Para evitar esse tipo de problema, foi elaborado um folheto contendo as principais informações sobre os procedimentos de coleta de diferentes tipos de amostras biológica, conforme mostra a Figura 2.5 e 2.6 Deve ser salientado que no folheto há indicação de um contato, caso haja dúvidas na coleta do material.

Recomenda-se que este folheto fique à disposição de todos que estejam interessados em encaminhar amostras biológicas para o LADTOX.

Figura 2.5 – Folheto para divulgação dos procedimentos e cuidados na coleta e armazenamento de amostras biológicas a serem encaminhadas ao Laboratório de Diagnóstico Toxicológico (LADTOX) do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo.

Envio de amostras biológicas para FMVZ-USP LADTOX:

Coleta de das amostras biológicas

1º - Colete as amostras, acondicione cada uma delas em frasco limpo e devidamente identificado (indicação do material coletado e data). Lembre-se: apenas um tecido por frasco;

2º - Mantenha as amostras refrigeradas ou congeladas. Lembre-se: não adicione nenhum conservante e evite contaminação durante a coleta ;

3º - Encaminhe o material resfriado ou congelado o mais rápido possível ao LADTOX.

Documentos necessários

1º - Requisição de análise toxicológica preenchida adequadamente e sem rasuras.

Endereço e dúvidas

Entre em contato com o Laboratório de toxicologia (LADTOX-USP).

TEL: (11) 3091-7933

Av. Orlando Marques de Paiva, nº 87 - Cidade Universitária - CEP 05508-270 - São Paulo - SP
Fone: (011) 3091-7933

Fonte: Fukushima (2015)

Figura 2.6 – Verso do folder para divulgação das normas e recomendações acerca da coleta e armazenamento de vestígios biológicos.

O que coletar ?

<p>Sangue total cardíaco 25 mL Sangue periférico 10mL <small>*animal de pequeno porte coletar todo o disponível</small></p>	<p>Fígado 50 a 100g <small>*animal de pequeno porte coletar todo o disponível</small></p>
<p>Urina coletar o máximo</p>	<p>Rins 50 a 100g <small>*caso animal pequeno coletar todo o disponível</small></p>
<p>Fezes 250 g <small>*animal de pequeno porte coletar todo o disponível</small></p>	<p>Encéfalo coletar inteiro</p>
<p>Vômito 250 g <small>*animal de pequeno porte coletar todo o disponível</small></p>	<p>Pelos com bulbo 5 a 10 g</p>
<p>Conteúdo Estomacal/ Ruminal 150 a 500g <small>*animal de pequeno porte coletar todo o disponível</small></p>	<p>Tecido adiposo 100 a 500g <small>*animal de pequeno porte coletar todo o disponível</small></p>

-Alimentos, água, forragens, iscas, plantas próximos ao local coletar 500g ou todo o possível.
-Fármacos rotineiramente utilizados coletar todo o possível.

Av. Orlando Marques de Paiva, nº 87 - Cidade Universitária - CEP 05508-270 - São Paulo - SP
 Fone: (011) 3091-7933

Fonte: Fukushima (2015)

2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O formulário de RAT proposto visa atender as características e necessidades do LADTOX, um laboratório vinculado a uma instituição de ensino e, como tal, recebe alunos de graduação e pós-graduação, bem como profissionais interessados na área. A introdução desse formulário facilitará a comunicação entre o Serviço de Patologia e entre os outros setores internos da FMVZ, como o HOVET, bem como externos a FMVZ, enfatizando os cuidados e responsabilidades de cada ator, em particular, nos casos que envolvam amostras de interesse forense. O folheto informativo, objetiva, principalmente, a minimização dos equívocos que possam ocorrer durante a coleta, configurando um guia de consulta simples, rápida e eficaz para o médico veterinário que trabalha em serviços de necropsia diversos, ou seja, tanto nas salas de necropsia, bem como a necropsia realizada a campo. Ao melhorar a comunicação entre a sala de necropsia e o laboratório de análises toxicológicas, qualquer que seja ele, certamente impactará de maneira significativa na qualidade dos resultados das análises toxicológicas feitas no laboratório, uma vez que a garantia da qualidade da coleta da amostra biológica é o primeiro passo para assegurar uma análise inequívoca, permitindo a elaboração de um laudo irrefutável.

2.6 CONCLUSÕES.

A análise de praguicidas e de metabólitos em matrizes biológicas, se fazem importante no contexto médico-legal, veterinário. Neste sentido, o panorama apresentado, mostra a real importância para a medicina veterinária legal a presença de um laboratório que cumpra com as exigências voltadas a área judicial e que realize exames toxicológicos voltados a área veterinária que confirmem real validade pericial no diagnóstico laboratorial diferencial.

3 **CAPÍTULO II** - Proposta de utilização de um método enzimático de triagem rápido, seguro e de baixo custo para avaliar o poder de inibição da acetilcolinesterase promovido pelo praguicida aldicarbe e seus metabólitos

3.1 INTRODUÇÃO

Os praguicidas organofosforados e carbamatos são agentes anticolinesterásicos largamente empregados na agricultura como inseticidas para o controle das pragas agrícolas, em medicina veterinária para o controle de endo- e ectoparasitas e também são utilizados em saúde pública para eliminação e controle de vetores transmissores de enfermidades endêmicas.

O aldicarbe, em particular, é um praguicida carbamato de uso agrícola comercializado no Brasil até outubro de 2012, quando, então, teve o seu registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) cancelado (Ato 54 de 9 de outubro de 2012). Isso ocorreu devido ao seu uso irregular como raticida doméstico (“chumbinho”), causando intoxicações graves e letais, tanto em seres humanos como em animais (MOLINA, 2012).

Embora tenha sido retirado do comércio, a ocorrência de óbitos de animais causados pelo aldicarbe ainda é observada no Serviço de Patologia Animal do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), o que pode configurar como crime contra os animais, devido às intoxicações tanto acidentais quanto propositas relacionados com esse praguicida. Para o toxicologista envolvido nestas situações, os testes de triagem são importantes para nortear as análises toxicológicas e contribuir para a confirmação dos achados necroscópicos, sendo amplamente utilizados nos laboratórios de toxicologia. Ainda, os testes de triagem são de grande importância clínica no pronto atendimento emergencial que requer um resultado rápido e confiável, auxiliando o clínico no tratamento correto e urgente, além de contribuir para o bom prognóstico do quadro de intoxicação. A avaliação da atividade das colinesterases tem se mostrado útil como teste de triagem rápida para indicar exposição aos agentes anticolinesterásicos, como os praguicidas organofosforados e carbamatos (LESSENGER; REESE, 1999).

Os agentes anticolinesterásicos, por inibir a enzima acetilcolinesterase (AChE), promovem o acúmulo de acetilcolina na fenda sináptica, causando a potencialização da neurotransmissão colinérgica (BALLARD et al., 2005). A inibição enzimática se dá através da ligação do agente anticolinesterásicos com a porção esteárica da enzima por meio da esterificação da hidroxila da serina e/ou interação com o domínio ativo da porção alfa aniônica (WEINER et al., 2009).

Um dos métodos mais utilizados para a determinação da atividade da AChE é o método de *Ellman* (ELLMAN et al., 1961), por ser um método rápido, simples, preciso e com medição direta da atividade enzimática, seja em sangue ou tecidos (ASKAR; KUDI; MOODY, 2011). Este método é baseado na reação entre a tiocolina, um dos produtos da hidrólise enzimática do substrato sintético iodeto de acetiltiocolina (ACTI) ou iodeto de butiriltiocolina (BTCl), com o grupo sulfidril do cromógeno ácido 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB ou reagente de *Ellman*). Ocorre, então, a formação do 5-tioácido-2-nitrobenzoico que promove a formação de um composto de coloração amarela, o qual pode ser mensurado através da quantificação da absorbância a 410 nm (ELLMAN et al., 1961; SINKO et al., 2007).

Há disponível no comércio *kits* para avaliação direta da atividade da AChE endógena (Colinesterase K049 - *Boclin*; Sistema de teste colinesterase – CMW Saúde&Tecnologia; H *QuantiChrom*TM acetilcolinesterase-kit colorimétrico – Gênese). Por outro lado, há também *kits* que utilizam a AChE para auxiliar a quantificação de outras substâncias, como, por exemplo, a testosterona; é o caso do *kit* Cayman *Chemicals*. Esse *kit*, em particular, emprega a AChE de enguia elétrica que possui a característica de ser uma enzima de ultrarrápida ação (ELLMAN et al., 1961).

A AChE pode ser empregada também com bioindicador da presença de anticolinesterásicos tanto em amostras simples (água), como complexas (matrizes biológicas). A utilização de um biossensor amperométrico, que tem como princípio a imobilização da AChE em um eletrodo do tipo *screen-printing*, mostrou-se bastante eficiente na investigação de teores de praguicidas carbamatos em águas (MARQUES, MARQUES & NUNES, 2006). Esse mesmo princípio foi empregado para avaliação da presença de praguicidas anticolinesterásicos em frutas e legumes (PICÓ, 2014).

Considerando que a AChE de enguia elétrica possui ultrarrápida ação e que pode ser empregada como bioindicador da presença de anticolinesterásicos em diferentes amostras, o objetivo do presente trabalho é propor um método de triagem rápido, seguro

e de baixo custo, utilizando o *kit* Cayman *Chemicals* como fonte de AChE, para indicar a presença do aldicarbe e seus metabólitos.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foi empregado o *kit* Cayman. *Chemical's ACE™ EIA* (Cayman Chemicals®). O reagente *tracer* – testosterona marcada com acetilcolinesterase de enguia elétrica – foi aplicado como fonte de AChE, enquanto o cromógeno revelador, DTNB, foi aplicado tanto como substrato enzimático e como revelador. O reagente de *Ellman* bem como a testosterona marcada foram reconstituídos seguindo as recomendações do *kit*.

A leitura foi feita em um espectrofotômetro da marca *Thermo Scientific* do modelo *Multiskan EX*, a 410 nm.

3.2.1 Ensaio enzimático

O ensaio enzimático foi feito em triplicada, empregando uma microplaca de 96 poços, sendo pipetados em cada cavidade 200 µL de reagente de *Ellman* nos poços A1, B1, C1 e D1 (Fig.3.1). Nos poços das colunas subsequentes (2 - 12) foram pipetados 125 µL do reagente de *Ellman*. Em seguida, nos poços A1, B1, C1 e D1 foram pipetados 50 µL dos reagentes testes, ou seja, aldicarbe, aldicarbe-sulfona, aldicarbe-sulfóxido e acetilcolina, respectivamente. A seguir, foi feita uma diluição seriada, com o ponto máximo da curva de concentração de 200 µg/mL de cada reagente teste e proporções de 1:2 de um poço para outro até o décimo segundo poço, conforme mostra a figura 3.1.

O *tracer* foi diluído no reagente de *Ellman* de maneira que a cada 30 µL pipetados contivessem 5 µL de *tracer*. Todos os poços receberam *tracer* exceto os indicados por C- (controle negativo). Após isso, ocorreu a incubação em um agitador (DAIGGER – modelo *multi-microplate genie*) com velocidade de 500 rpm, a temperatura ambiente e a absorbância foi mensurada em espectrofotômetro com filtro de 410 nm, em 60 e 90 minutos.

Figura 3.1 – Esquema de diluições seriadas utilizadas numa microplaca de 96 poços para a realização do ensaio enzimático de inibição da atividade da colinesterase. O ponto máximo da curva de concentração é de 200 µg/mL e proporções de 1:2 de um poço para outro até o décimo segundo poço.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	200	100	50	25	12,50	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,20	0,10
B	200	100	50	25	12,50	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,20	0,10
C	200	100	50	25	12,50	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,20	0,10
D	200	100	50	25	12,50	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,20	0,10
F				C+	C+							
G		C-	C-									
H												
I												

C+ = controle positivo; C- = controle negativo

Fonte: Fukushima (2015)

3.3 RESULTADOS

A figura 3.2 mostra uma microplaca com 96 poços após 90 minutos de incubação, utilizando o reagente de *Ellman* como cromorreagente. Note que a medida que reduz a concentração do aldicarbe e de seus metabólitos, aumenta a intensidade da cor amarela, indicando menor inibição enzimática.

Figura 3.2 – Fotografia da microplaca após 90 minutos de incubação, utilizando o reagente de *Ellman* para avaliar a atividade da acetilcolinesterase submetida à exposição ao aldicarbe e aos seus metabólitos.

Fonte: Fukushima (2015)

A figura 3.3 representa a atividade da enzima AChE medida em absorbância (em porcentagem) em função da concentração do aldicarbe e de seus metabólitos. Note que o aldicarbe-sulfóxido pouco interferiu na atividade da AChE, enquanto o aldicarbe-sulfona apresenta redução da atividade enzimática mais evidente a partir da concentração de 12,5 μL .

Figura 3.3 – Atividade da acetilcolinesterase (AChE) em absorbância expressa em porcentagem, em função da variação de concentração do aldicarbe e de seus metabólitos.

Fonte: Fukushima (2015)

3.4 DISCUSSÃO

Muito embora existam testes utilizando o reagente de Ellman robotizados e miniaturizados (JÄRVINEN et. al, 2010) para a avaliação da atividade das colinesterases, não foi encontrado em literatura nenhum que utilizasse a AChE de enguia elétrica. Nesse sentido, o emprego desta enzima teria a vantagem de execução simples e oferecer resultado rápido da suspeita de intoxicação, com baixo custo e aplicável em laboratórios e clínicas de pequeno porte, como método de triagem.

No presente estudo a medida da atividade da AChE foi avaliada na presença do aldicarbe, bem como seus dois principais metabólitos ativos, o aldicarbe-sulfóxido e o aldicarbe-sulfona. Esse método se mostrou eficiente para avaliar a inibição da atividade da AChE causada, em particular, pelo aldicarbe e pelo aldicarbe-sulfona.

Embora os resultados encontrados, referente a inibição do aldicarbe-sulfóxido não mostrem uma potente inibição enzimática causada por este metabólito no período de até 90 minutos, sabe-se que sua toxicidade se deve a inibição mais tardia da AChE (BURGESS et al., 1994), prolongando assim esse efeito sobre o organismo do animal exposto ao aldicarbe.

Em relação a custos, essa técnica enzimática, quando comparada a outros métodos de triagem como a cromatografia em camada delgada (CCD), a primeira apresenta menor custo e menor impacto ao meio ambiente, uma vez que não são utilizados solventes orgânicos, os quais necessitam de descarte apropriados para evitar danos ambientais.

Vale destacar que os testes enzimáticos são valorosas ferramentas de triagem em análises forenses, porém é necessária a padronização de todas as figuras de mérito sugeridas pelos instrumentos legais, uma vez que pequenas alterações nas concentrações da enzima, pode causar respostas diferente a um mesmo agente inibidor. Essa padronização pode ser realizada, utilizando enzimas de diferentes fontes em várias condições com características diversas.

O presente trabalho é o primeiro passo para o estudo de amostras fortificadas em soro ou plasma, bem como outras matrizes simples ou complexas, validando este método de triagem para indicar a presença de agentes anticolinesterásicos, o que auxiliaria no monitoramento da presença destes agentes tóxicos, contribuindo para um diagnóstico rápido, norteando o clínico quanto ao tratamento do animal intoxicado e, no caso de óbito, auxiliando na detecção da *causa mortis*.

3.5 CONCLUSÕES

As análises enzimáticas são poderosas ferramentas no diagnóstico de intoxicações, bem como importantes instrumentos na área forense, em virtude de suas características, como o baixo custo, rápida execução da análise e gerar mais um resultado em direção ao resultado da análise.

O método utilizando foi eficiente na avaliação da inibição da atividade da AChE causada, em particular, pelo aldicarbe e pelo aldicarbe-sulfona, sendo possível concluir

que o aldicarbe-sulfóxido pouco interferiu na atividade da AChE, enquanto o aldicarbe-sulfona apresenta redução da atividade enzimática mais evidente a partir da concentração de 12,5 µL mostrando o potencial de toxicidade tardio quando comparada ao aldicarbe.

Existe potencial para o desenvolvimento de um método de triagem com a finalidade de sugerir a presença de agentes anticolinesterásicos, contribuindo para um diagnóstico rápido, bem como em casos de morte suspeita de intoxicação, auxiliando no diagnóstico da causa da morte.

4 **CAPÍTULO III** - Perfil de dissolução da forma acabada do grânulo comercial do aldicarbe (Temik 150[®])

4.1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.

O aldicarbe, Temik 150[®], é um praguicida de uso agrícola que foi comercializado no Brasil até o ano de 2012, quando teve seu registro cancelado em função do seu uso ilícito como raticida, o que favorecia a ocorrência de intoxicações graves e fatais em animais não alvo, e até mesmo em seres humanos (BULCÃO et al., 2010, XAVIER et al., 2007a, b, c, d; CAZENAVE et al., 2005, LOBO-JUNIOR, 2003). A forma comercial do aldicarbe é vulgarmente conhecida como “chumbinho”, em função da sua cor (cinza escura) e formato (granulado). Essa forma de apresentação visa dar melhor eficiência e segurança no seu uso agrícola e, em tecnologia farmacêutica, pode ser classificada como um *pellet*, isto é, pequena unidade esférica constituída de aglomeração de pós finos contendo a (s) substância (s) ativa (s) e os excipientes (MOSER, 2004). Em especial, no caso do Temik 150[®], é uma estrutura que contém um núcleo rígido de gesso, que, por sua vez, foi impregnado em uma solução de aldicarbe a 15% (Bayer CropScience, 2010).

Durante as análises de conteúdo estomacal de animais intoxicados e necropsiados pelo Serviço de Patologia Animal do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP) é comum encontrar os grânulos de coloração cinza, os quais se mostraram positivo para aldicarbe na análise química (XAVIER et al., 2007 a,b,c,d) e, no presente trabalho (Capítulo 3), curiosamente encontrou-se também os seus metabólitos aldicarbe-sulfóxido (ASX) – que apresenta dose letal 50% (DL50) oral para ratos equivalente a 0,49 mg/kg – e aldicarbe-sulfona (ASN) – que apresenta uma DL50 oral para ratos de 27,0 mg/kg –, sendo que o primeiro metabólito é 10 vezes mais tóxico que o próprio aldicarbe (DL50 oral para ratos de 5,0 mg/kg)⁴. Em função disto, neste Capítulo propõe-se avaliar a

⁴ Dados provenientes do banco de dados *Chemidplus* – disponível em: <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>

cinética de liberação do princípio ativo tóxico da forma acabada dos grânulos de Temik 150[®], utilizando o perfil de dissolução, a fim de avaliar a formação *in vitro* de seus metabólitos em meio ácido.

A seguir, são apresentados sucintamente noções sobre biodisponibilidade, sistemas de liberação e perfil de dissolução para introduzir o leitor nesses temas, a fim de traçar um paralelo com o praguicida Temik 150[®], considerando que ele pode ser ingerido por um animal, por desvio de uso.

Existem vários fatores que podem alterar a biodisponibilidade de um produto, seja ele fármaco ou praguicida, que possa entrar em contato com um sistema biológico qualquer. Didaticamente, são três os principais:

Fatores relacionados à natureza química, como a solubilidade, tamanho de partícula, polimorfismo, instabilidade ou estabilidade química;

Fatores associadas à formulação, tais como, tipo e quantidade de excipientes, forma farmacêutica e sistema de liberação (por exemplo, rápido, controlado);

Fatores ligados ao processo de fabricação, tais como técnica de granulação e compressão, tempo de mistura e tipo de secagem dentre outros parâmetros.

Para avaliar a liberação do ativo presente nas formulações farmacêuticas foi criado um sistema de classificação biofarmacêutica, sendo este aplicável aos produtos que possuam formas de liberação semelhantes às formas farmacêuticas usuais, como ou sem desvio de uso.

O primeiro sistema de classificação biofarmacêutica foi introduzido por Amidon et al. (1995). Posteriormente, essa classificação, que agrupa os fármacos com base em sua solubilidade e permeabilidade no trato gastrointestinal, foi incorporada aos protocolos internacional (UNITED STATES, 2000) e nacional (BRASIL, 2002). Foi criada inicialmente para ser aplicada a fármacos administrados pela via oral utilizando-se formas farmacêuticas de liberação imediata.

A classificação biofarmacêutica propõe:

Classe 1: alta solubilidade e alta permeabilidade;

Classe 2: baixa solubilidade e alta permeabilidade;

Classe 3: alta solubilidade e baixa permeabilidade;

Classe 4: baixa solubilidade e baixa permeabilidade.

No trabalho pioneiro de Amidon et al. (1995) foi proposto que um fármaco possui alta solubilidade quando, em um meio aquoso, a mais alta dose se dissolve em uma quantidade inferior ou igual a 250 mL de tampões aquosos, ao longo da faixa de pH de 1,0 a 7,5. No Brasil o limite de pH estudado é de 6,8, considerando que alta permeabilidade pode ser equivalente a absorção de 90% ou mais da dose administrada em seres humanos, baseada na determinação do balanço de massa ou em comparação com uma dose de referência intravenosa (BRASIL, 2010).

Este sistema de bioclassificação ajuda estabelecer correlações entre a dissolução do produto *in vitro* com a biodisponibilidade do mesmo *in vivo* (AMIDON et al., 1995).

Vale, neste momento, comentar sucintamente fatores envolvidos no desenvolvimento de sistemas de liberação.

Desenvolver formas de liberação de substâncias químicas é uma tarefa relativamente complexa, principalmente quando se deseja controlar ou prever a cinética de liberação envolvida. Assim, pode demandar tempo e conhecimentos específicos sobre diversas características físico-químicas do agente químico estudado. A Tabela 4.1 descreve os principais fatores envolvidos na elaboração de um sistema de liberação.

Os fatores descritos no Tabela 4.1 são rotineiramente considerados no desenvolvimento de novas formas farmacêuticas, muito embora isso não exclua o seu aproveitamento na criação de novas formas de aplicação de praguicidas ou outras substâncias químicas que possam vir a ter uma utilização pelo homem.

A absorção de fármacos a partir de formas farmacêuticas sólidas administradas por via oral depende da sua liberação, da dissolução ou solubilização do fármaco em condições fisiológicas e de sua permeabilidade através das membranas do trato gastrointestinal. Neste contexto, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), nas recomendações para realização de perfil de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata (ANVISA, 2015) expressa: “Devido à natureza crítica dos dois primeiros (isto é, liberação e dissolução), a dissolução *in vitro* pode ser relevante para prever o desempenho *in vivo*. Com base nestas considerações gerais, os perfis de dissolução *in vitro* para formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata, tais como comprimidos e cápsulas, são utilizados para garantir a qualidade lote a lote, orientar o desenvolvimento de novas formulações e assegurar a uniformidade da qualidade e do desempenho do medicamento depois de determinadas alterações. ”

O perfil de dissolução de um fármaco é definido como sendo um teste de natureza destrutiva que mede a porcentagem de fármaco que se solubiliza a partir da forma farmacêutica intacta ou após a desintegração da mesma (CHOWDARY; RAJYALAKSHMI, 1987; THE United States Pharmacopeia: USP36-NF31, 2013).

Quadro 4.1 – Fatores envolvidos no desenvolvimento de sistemas de liberação.

Fator	Descrição	Referência
Pré-formulação	Estudo crítico das características físicas, químicas biofarmacotécnicas do princípio ativo.	(STORPITIS, GONÇALVES; CHIANN; GAI, 2009)
Determinação da qualidade do fármaco	Determinação do teor do princípio ativo recebido, caracterização da estrutura química e enantiomérica, determinação de potência, pureza, descrições físicas tais como cor, aspecto, pH e ponto de fusão e características reológicas.	(AULTON, 2005)
Determinação da qualidade dos excipientes	Avaliação das características microbiológicas e físico-químicas descritas em compêndios oficiais (como as farmacopeias, dados do fornecedor e outros compêndios), bem como em suas características reológicas.	(BUENO; RECH, 2009; GENNARO, 2004; ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009)
Ponto de fusão	Garantir a qualidade do princípio ativo, estando relacionado com a pureza e estado cristalino. Comumente diversos compêndios trazem a faixa de fusão para comparação.	(FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010)
Estrutura interna do cristal	O estado cristalino é um arranjo ou disposição organizada de suas moléculas ou átomos formando estrutura tridimensional regular. A diferença na posição espacial das estruturas cristalinas gera modificações nas forças de coesão entre os átomos ou moléculas interferindo no ponto de fusão, bem como no fenômeno de nucleação, formando um processo de dissolução reverso.	(FLORENCE; ATTWOOD, 2003; BUCKTON, 2005)

(Continuação)

Fator	Descrição	Referência
Polimorfismo	<p>Surge devido possibilidade de molécula ou átomo assumir no estado sólido uma ou mais forma cristalina com diferentes conformações moleculares. Condições de cristalização diferentes, tais como, diferentes processos de sublimação ou recristalização, variação de solventes, modificação na agitação, temperatura, presença de impurezas podem levar a formação de diferentes estruturas internas. Os polimorfos apresentam diferentes propriedades físicas, como ponto de fusão, solubilidade, além de existir em diferentes hábitos cristalinos, densidade, dureza, compressibilidade, propriedades de fluxo, compactação, índice de refração. Diferentes polimorfos poderem impactar na biodisponibilidade de um princípio ativo, pois alguns facilitam a dissolução e outros possuem uma dissolução mais demorada. Portanto, formas polimórficas devem ser bem estudadas e avaliadas para garantir biodisponibilidade adequada e idêntica, desde quando o produto é preparado, e longo do prazo de validade.</p>	(BUENO; RECH, 2009; AULTON, 2005; BUCKTON, 2005; FLORENCE; ATTWOOD, 2003; VIPPAGUNTA <i>et al.</i> , 2001; STORPITIS <i>et al.</i> , 2009)
Solubilidade do fármaco em água	<p>A solubilidade dos princípios ativos no sistema biológico está interligada com a fase farmacêutica, pois o mesmo precisa estar em solução para ser absorvido e adentre a circulação sistêmica. A escolha de um princípio ativo adequado é fundamental para atingir o objetivo de biodisponibilidade do princípio ativo.</p>	(ANSEL <i>et al.</i> , 2000); (AULTON, 2005),

(Continuação)

Fator	Descrição	Referência
pKa e coeficiente de partição	Informação sobre os valores de pKa estão interligadas com a solubilidade e, consequentemente, a absorção. Assim, um fármaco ácido tende a ser mais solúvel em valores de pH maiores que o seu pKa e o contrário ocorre com fármacos básicos. Já o coeficiente de partição também é uma interessante informação a ser obtida para ajudar a prever absorção de princípios ativos, pois permite inferir sobre a permeabilidade por difusão passiva.	(BABIC <i>et al.</i> , 2007) AULTON (2005.) (ANSEL <i>et al.</i> , 2000)
Higroscopicidade e características físico-químicas do fármaco	Características físico-químicas dos princípios ativos, como grupos ionizantes, pKa, grupos funcionais e características ácidas, básicas ou anfóteras e higroscopicidade devem ser avaliadas, a fim de relacionar incompatibilidade de formulação, processos produtivos e embalagem.	(AULTON, 2005; BRITISH PHARMACOPEIA, 2011; GENNARO 2004)

(Conclusão)

Fonte: Fukushima (2015)

O perfil de dissolução possui várias aplicações, como, por exemplo, para o controle de qualidade de formas farmacêuticas já estabelecidas no mercado, no auxílio do desenvolvimento de novas formulações (CDER, 1997; SHAH, 2001), ou mesmo, avaliação da liberação de formas farmacêuticas de produtos que, por ventura, possam ser utilizados com outros objetivos. Pode ser utilizado também na mensuração da velocidade de liberação de diversas formas farmacêuticas, como os comprimidos (de liberação imediata, liberação modificada, sublingual, desintegração oral, mastigável, dentre outros), as cápsulas duras e as cápsulas de gelatina de conteúdo líquido, *pellets*, pós e granulados para suspensões, suspensões administradas por quaisquer vias de administração, adesivos transdérmicos, supositórios, implantes, microparticulados injetáveis. Já para formas como gomas de mascar, pomadas, géis, loções e cremes, o perfil de dissolução é aplicado mais comumente durante a etapa de desenvolvimento ou em mudanças pós-registro. Esse tipo de ensaio possui limitação para formulações como soluções pós e granulados usados em soluções, e não é empregado para *sprays* nasais de ação imediata e pós ou suspensões de ação pulmonar (MARQUES, 2009).

Em particular, os perfis de dissolução são bastante úteis na avaliação de alterações de formulações – incluindo processos produtivos ou parâmetros do processo, tais como força de compressão, tempo de secagem, faixa de umidade, dureza –, para determinar equivalência farmacêutica e/ou na busca de bioisensões, que pode ser definida, segundo a (BRASIL, 2011), como sendo isenção e substituição de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência. Para a realização do perfil de dissolução emprega-se um aparelho chamado dissolutor (Figura 4.1). Há diferentes modelos de dissolutor com 6, 8 ou 12 cubas, geralmente com capacidade nominal de 2 L, nas quais são introduzidas pás para homogeneização do líquido que é coletado em diferentes tempos para avaliar a quantidade liberada do princípio ativo em uma determinada forma farmacêutica. As alíquotas coletadas em diferentes tempos são analisadas, empregando-se método de quantificação validados, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou, mais comumente, a utilização de espectrofotômetro (no UV/VIS).

Figura 4.1 – Fotografia ilustrativa de um dissolutor semelhante ao, aparelho empregado nos ensaios de dissolução, que possui seis cubas, acoplado ao aparato dois (pá).

Fonte: Fukushima (2015)

No perfil de dissolução vários parâmetros devem ser considerados, como duração do ensaio, tipo de filtro, meio e volume empregado, velocidade de rotação e temperatura para que a análise seja bem-sucedida, atendendo a legislação vigente no país (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010; BRITISH PHARMACOPEIA, 2011; THE UNITED STATES PHARMACOPEIA: USP36-NF31, 2013).

Para as formulações de liberação imediata, o ensaio é conhecido como de ponto único, indicando que somente uma alíquota é coletada de cada cuba do dissolutor ao término do ensaio. Existem também ensaios nos quais são coletadas mais de uma alíquota, dependendo da característica da forma farmacêutica, porém esses são menos comuns (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010; BRITISH PHARMACOPEIA, 2011; THE UNITED STATES PHARMACOPEIA: USP36-NF31, 2013).

Em relação às formas de liberação retardada, é necessário avaliar duas etapas de dissolução: o meio ácido e o meio tampão. Esses estágios podem ser avaliados individualmente ou sequencialmente dependendo do que se deseja avaliar (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010; BRITISH PHARMACOPEIA, 2011; THE UNITED STATES PHARMACOPEIA: USP36-NF31, 2013).

A solução ácida mais comum em perfil de dissolução é a de ácido clorídrico com um pH menor ou igual a 3,0. Em geral, nessa condição a cuba avalia a ação do ácido clorídrico sobre a forma farmacêutica, é importante ressaltar que outros meios podem ser utilizados ou até mesmo alguns solventes para essa avaliação. Enzimas também podem ser utilizadas nesses ensaios (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010; BRITISH PHARMACOPEIA, 2011; THE UNITED STATES PHARMACOPEIA: USP36-NF31, 2013).

Ao final do tempo de cada coleta, alíquotas das soluções de cada cuba são retiradas para quantificação da porção dissolvida. Em seguida esse volume removido para a análise, é substituído pela respectiva solução que está sendo utilizada para que o fármaco continue sendo liberado da forma farmacêutica (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010; BRITISH PHARMACOPEIA, 2011; THE UNITED STATES PHARMACOPEIA: USP36-NF31, 2013).

É recomendado que se realize um ensaio com o padrão para a verificação da estabilidade sobre variações de pH; o padrão deve ser preparado considerando a mesma condição da substância em estudo (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010; BRITISH PHARMACOPEIA, 2011; THE UNITED STATES PHARMACOPEIA: USP36-NF31, 2013).

Os dados obtidos no perfil de dissolução são usualmente apresentados na forma de uma curva tempo em função da porcentagem dissolvida de uma média de 6 cubas; a Resolução RDC Nº 31, de 11 de agosto de 2010 (BRASIL, 2011), que “dispõe sobre a realização dos estudos de equivalência farmacêutica e de perfil de dissolução comparativo”, disciplina as normas desses ensaios no Brasil.

Considerando que é comum encontrar no conteúdo estomacal de animais intoxicados grânulos de coloração cinza semelhantes ao Temik 150[®], os quais se mostraram positivo para aldicarbe na análise química, e que encontrou-se os seus metabólitos, o aldicarbe-sulfóxido (ASX) e o aldicarbe-sulfona (ASN) no conteúdo estomacal de animais intoxicados, propõe-se avaliar o perfil de dissolução do princípio ativo tóxico da forma acabada dos grânulos desse praguicida, utilizando o perfil de dissolução, a fim de avaliar a formação *in vitro* de seus metabólitos em meio ácido.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliados os grânulos de Temik 150[®] (Bayer Cropsciences) adquiridos no comércio. Para a validação foram utilizados padrões de aldicarbe (Sigma[®]), aldicarbe-sulfóxido (Sigma[®]) e aldicarbe-sulfona (Sigma[®]), bem como de carbofurano (Sigma[®]), forato (Sigma[®]) e forato sulfóxido (Sigma[®]), metanol (grau HPLC, Merck[®]), ácido fosfórico (Merck[®]) e ácido clorídrico (Merck[®]), acetonitrila (Merck[®]), água ultrapurificada utilizando um sistema Millipore (Merck Millipore[®] *lab water* modelo milli-q direct 8 ultrapurificada).

Para o perfil de dissolução foram utilizados, solução de ácido clorídrico (Merck[®]) a 0,1 N água ultrapurificada e balança analítica do modelo AUW series (Shimadzu[®]) e pH (Marconi[®] modelo PA 200).

Foram utilizados um dissolutor e um cromatógrafo. O aparelho de dissolução foi um Varian modelo VK7010 *Dissolution System*, equipado com seis cubas, as quais possuía uma pá em cada uma delas; cada cuba recebeu 900 mL de ácido clorídrico 0,1 N, a pH 3,0. O cromatógrafo foi um Agilent modelo 1200 Series High G1316A, constituído por uma bomba binária G1312B, degaseificador G1379B e forno de coluna G1316B, amostrador automático ASL G1329A, compartimento da coluna termostetizado G1315A e detector de arranjo de diodos G1315D, acoplado a um sistema de integração Agilent *OpenLAB CDS ChemStation Edition*. Utilizou-se uma coluna *Zorbax Extend - C18*, 150 X 4,6 mm, 5 µm de tamanho de partícula, 100 Å de tamanho de poro (Agilent USA). O volume de injeção foi de 50 µL para evitar que a coluna fosse sobrecarregada, prejudicando a corrida cromatográfica. O comprimento de onda selecionado para a quantificação foi de 213 nm. A fase móvel utilizada foi composta por acetonitrila e água utilizando o modo de eluição gradiente

Para o preparo da fase móvel e das soluções tampão utilizadas foi utilizado bomba de vácuo (Merck Millipore modelo *High Output / Chemical Duty Pumps*, com fluxo de 37 litros). Para a filtração a vácuo utilizou-se um filtro resistente a solventes orgânicos de 0,45 µm de tamanho de poro. Utilizou-se também um medidor de pH com agitador magnético. Vidrarias, como balões volumétricos para a diluição e copos de bequer, bem como pipetas automáticas e tradicionais, ponteiros também foram utilizados.

4.2.1 Perfil de Dissolução

O Perfil de dissolução dos grânulos do Temik 150[®] seguiu as recomendações da *United States Pharmacopeia* 38 (USP 38), uma vez que não existe monografia preconizando a forma acabada do aldicarbe. Para tanto, foi adicionado em cada uma das seis cubas do dissolutor, 900 mL de ácido clorídrico a 0,1 N, previamente filtrado, como meio de dissolução. A seguir, esse foi aquecido no próprio dissolutor, com leve agitação, a aproximadamente 45°C, sendo seguido de imediata filtração sob vácuo, por meio de filtro de membrana de 0,45 µm de tamanho de poro, com vigorosa e continua agitação, por 5 minutos. Após a filtragem, o meio dissolutor foi mantido a temperatura de 37°C ± 0,5. As pás foram mantidas dentro das cubas para homogeneização a velocidade constante de 50 rotações por minuto (rpm), uma vez que era o mais indicado para a forma de grânulos.

Os intervalos de tempo utilizados para a coleta das alíquotas foram de 0, 20, 40, 60 e 120 minutos. Em cada tempo foi retirada uma alíquota de 1 mL, com o auxílio de uma pipeta automática, introduzida na zona média de cada cuba (metade da distância entre o topo do aparato e a superfície do meio e no mínimo a 1 cm de distância da parede cuba e da pá), para a quantificação dos princípios ativos dissolvidos no meio de dissolução. Idêntico volume retirado foi repostado com líquido de dissolução, a fim de se manter o volume total (900 mL). Para a análise cromatográfica, essa alíquota coletada da zona média e filtrada em filtros com membrana de 0,45 µm foi injetada no cromatógrafo.

A tabela 4.2 mostra as condições empregadas no dissolutor para a realização do ensaio de dissolução.

Tabela 4.1 – Condições adotadas no dissolutor para o ensaio de dissolução dos grânulos de aldicarbe.

Requisitos	Condições de análise
Número de pás por cuba	2
Meio de dissolução	Ácido clorídrico 0,1 N
Volume	900 mL
Rotação total	50 rpm
Tempos de dissolução	0, 20, 40, 60 e 120 minutos
Filtro	Filtro de membrana de 0,45 µm

Fonte: Fukushima (2015)

4.2.2 Análise cromatográfica

Existem vários métodos para a análise de aldicarbe baseados em cromatografia gasosa e líquida (NUNES *et al.*, 1998); contudo, levando em consideração que os praguicidas carbamatos, em geral, são moléculas termolábeis, justifica-se assim que maioria dos estudos acaba por envolver a análise fazendo uso da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A detecção por fluorescência com derivação pós-coluna supera a detecção por ultravioleta (UV) em sensibilidade e especificidade, sendo então o método de eleição para aldicarbe. A detecção por arranjo de diodos, apesar de pouco estudado para a detecção de carbamatos, tem a versatilidade, pois permite comparação com bibliotecas de espectro, e apresentando vantagens como simplicidade e baixo custo em relação a outros tipos de detectores, muito embora na atualidade a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas seja o método padrão ouro para análises em geral. (STEFAN *et al.*, 2011).

As amostras foram analisadas por CLAE usando como fase móvel água e acetonitrila utilizando-se um gradiente iniciando com 0% de acetonitrila e chegando a 80% de acetonitrila em 40 minutos; posteriormente foi criado um gradiente de limpeza que se inicia em 40,01 minutos, chegando a 100% de acetonitrila em 45 minutos. Posteriormente, em 45,01 minutos, a condição inicial é retomada com 0% de acetonitrila, permanecendo assim até 50 minutos. A figura 4.2 ilustra a curva de gradiente do método cromatográfica. A separação ocorreu através de uma coluna contendo fase reversa composta de uma sílica C18, sendo realizada a comparação com biblioteca de espectros específica para a confirmação do achado.

Figura 4.2 – Programação da eluição utilizada no modo gradiente para análise de aldicarbe por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Fonte: Fukushima (2015)

4.3 RESULTADO E DISCUSSÃO

A figura 4.3 mostra o perfil de dissolução dos grânulos de Temik 150[®] e concomitante formação dos seus metabólitos, aldicarbe-sulfóxido e aldicarbe-sulfona, no perfil de dissolução em meio ácido, ambiente semelhante ao estomacal; o ensaio foi conduzido até os 120 minutos, por ser esse tempo compatível como o esvaziamento gástrico em carnívoros (COELHO et al., 2008).

Figura 4.3 – Perfil de dissolução do grânulo do praguicida Temik 150®, utilizando ácido clorídrico a 0,1 N como meio de dissolução ($37 \pm 0,5$ °C), com aparato 2 (pá), velocidade de agitação de 50 rpm e quantificação cromatográfica usando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), em 213 nm.

Fonte: Fukushima (2015)

Sabe-se que no organismo do animal a cinética de absorção e distribuição do aldicarbe é rápida, o que o torna extremamente letal em alguns casos. Após ser prontamente absorvido por qualquer uma das vias de exposição (oral, dérmica, respiratória), o aldicarbe é, inicialmente, oxidado a aldicarbe-sulfoxido e uma porção deste é lentamente degradada a aldicarbe-sulfona, antes de ser hidrolisado a agentes não-colinérgicos (BARON, 1994; HARPER et al., 1998; XAVIER et al., 2007 a, b, c); esses metabólitos são eliminados 80% pela via urinária e fezes, em um tempo de eliminação de 48 horas (ELLENHORN, 1997; OGA, 2003). Estes metabólitos têm sido apontados como indicadores da exposição ao aldicarbe, embora sejam estáveis por, no máximo, dois dias em animais vivos ou mortos (HARPER et al., 1998; COBB et al., 2001).

No presente estudo foi possível observar *in vitro* a formação dos metabólitos do aldicarbe; esse achado pode ser consequência da presença do núcleo de gesso (sulfato de cálcio hidratado – $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; cerca de 820 g/kg) empregado para elaboração do grânulo do Temik 150® (BAYER CROPSCIENCE, 2010). Esse grânulo é constituído por essa estrutura de gesso juntamente com o aldicarbe, tingido com um corante negro, a fim de conferir à forma de aplicação uma aparência repugnante, bem como duas outras substâncias, um emético e outra de odor repulsivo. O aldicarbe fica intimamente em contato com o núcleo de gesso, e este como possui a característica química de ser um forte agente oxidante, seria capaz de oxidar o grupamento sulfeto do aldicarbe, convertendo-o inicialmente em aldicarbe-sulfoxido e, posteriormente, realizando uma segunda oxidação no grupamento sulfoxido, convertendo-o em uma sulfona.

Esse mecanismo explicaria a presença dos dois metabólitos, tanto no perfil de dissolução aqui empregado, como no conteúdo estomacal de animais intoxicados pelo aldicarbe (Capítulo III). Assim, no instante em que o grânulo entra em contato com o meio aquoso do estômago ocorre uma oxidação do grupamento sulfeto em sulfóxido e sulfona, favorecido pelo gesso presente na formulação, formando os metabólitos nos primeiros minutos de contato com o meio aquoso ácido

Outra hipótese plausível para a presença dos metabólitos é que estaria ocorrendo uma síntese em fase sólida, por meio de um mecanismo mais complexo, no qual após a confecção do grânulo, durante a sua estocagem, o gesso que está em contato íntimo com a molécula de aldicarbe dentro do grânulo, estaria oxidando as camadas mais próximas do mesmo e, assim, os metabólitos seriam formados; estes, por sua vez, seriam apenas liberados no estômago dos indivíduos que ingeriram o Temik 150[®].

Foi realizado um perfil de dissolução do padrão puro de aldicarbe, nas mesmas condições estabelecidas no ensaio anterior e não foi observada a formação do metabolito nos tempos de 0, 20, 40, 60 e 120 minutos.

O presente achado, isto é, a formação dos metabólitos do aldicarbe tanto *in vitro* como *in vivo* (Capítulo III), se mostra bastante importante, pois o aldicarbe-sulfóxido apresenta DL50, por via oral, em ratos dez vezes inferior à do aldicarbe⁵, o que o torna especialmente mais tóxico que a molécula de origem. Assim, num quadro de intoxicação pela ingestão do Temik 150[®], no ambiente ácido do estômago haveria a formação do aldicarbe-sulfóxido, que aliado a presença do próprio aldicarbe contribuiria para exacerbar a toxicidade deste praguicida.

⁵ Dados provenientes do banco de dados *Chemidplus* – disponível em: <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>

4.4 CONCLUSÃO

O perfil de dissolução dos grânulos do Temik 150[®] em meio ácido foi capaz mostrar a presença *in vitro* dos metabólitos aldicarbe-sulfóxido e o aldicarbe-sulfona, diferentemente quando apenas o princípio ativo puro do aldicarbe passou pelo mesmo perfil de dissolução. Considerando que o metabólito aldicarbe-sulfóxido apresenta maior toxicidade que a molécula de origem, este achado deve ser considerado quando se avalia a toxicidade deste praguicida.

5 **CAPÍTULO IV** – Desenvolvimento e validação de um método analítico para quantificação de praguicidas anticolinesterásicos em matrizes biológicas oriundas de animais

O procedimento de validação dos métodos pode ser tedioso, porém a consequência de não fazê-lo é, com certeza, um desperdício de tempo, dinheiro e recursos (J. Mark Green, 1996)

5.1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda por análises laboratoriais e a necessidade cada vez maior de garantir qualidade e confiabilidade nas medições obtidas através da operação de equipamentos pelo homem, bem como a comparabilidade e a rastreabilidade estão sendo cada vez mais reconhecidas e exigidas nas mais diversas esferas.

A credibilidade de uma análise química é garantida pelo cuidado com que o analista se cerca, a fim de gerar um resultado que expresse a medida mais próxima possível do valor real (CHASIN et al., 1998).

Resultados analíticos errados ou mesmo não confiáveis podem levar a conclusões equivocadas, culminando, assim, em prejuízos financeiros, acadêmicos ou judiciais irreparáveis. Portanto, para que um método analítico possa ser confiável, seguro e permita gerar informações interpretáveis sobre a amostra, obrigatoriamente, este deve ser submetido a uma avaliação denominada validação, aferição ou verificação, que contempla figuras de mérito como linearidade, sensibilidade, limite de detecção, limite de quantificação e precisão (RIBANE et al., 2004; CHASIN et al., 1998; SOFT, 2006; UNODC, 2009, os quais devem ser documentados para serem utilizados em uma rotina analítica. O Quadro 5.1 mostra alguns conceitos do que é validação.

Quadro 5.1 – Conceito de validação.

Referência	Conceito
USP, 2014	“A validação de métodos assegura a credibilidade destes durante o uso rotineiro, sendo algumas vezes mencionado como o “processo que fornece uma evidência documentada de que o método realiza aquilo para o qual é indicado para fazer”
ANVISA, 2012	“A validação é confirmação por ensaio e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos; podem ser subdivididas em validação parcial que é realização de parte dos ensaios da validação total em decorrência de modificação no método bioanalítico validado, visando demonstrar a manutenção do desempenho e confiabilidade do método; e validação total que é realização de todos os ensaios de validação de um método bioanalítico.”
Eurachem Working Group, 2012	“Validação é o processo de definir uma exigência analítica e confirmar que o método sob investigação tem capacidade de desempenho consistente com o que a aplicação requer”
MAPA, 2011	“A validação de determinado procedimento analítico objetiva demonstrar que o mesmo é adequado aos objetivos propostos, ou seja, que os parâmetros de desempenho avaliados atendem aos critérios de aceitação preconizados. Trata-se de e um estudo experimental e integralmente documentado. A validação visa garantir a qualidade metrológica dos resultados analíticos, conferindo-lhes rastreabilidade, comparabilidade e confiabilidade para a tomada de decisões”.
WHO, 2011	“A validação sistemática de um procedimento analítico é para demonstrar que está sob as condições nas quais deve ser aplicado”
ISO/IEC 17025, 2005	“Confirmação por testes e apresentação de evidências objetivas de que determinados requisitos são preenchidos para um dado uso intencional”
ANVISA, 2003	“A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados”.

Fonte: Fukushima (2015)

Os órgãos reguladores brasileiros, bem como de outros países, atualmente, exigem que os laboratórios realizem validação de seus métodos analíticos de acordo com seus documentos oficiais que estabelecem as figuras de mérito exigidas no processo (RIBANE et al, 2004).

Sucintamente, a validação de um método é um dos elementos básicos em sistemas de qualidade, integrando os programas de boas práticas de laboratório. O planejamento de um processo de validação inicia com o desenvolvimento analítico e pode ser transferido por um processo de convalidação (RIBANE et al., 2004; CHASIN et. al, 1998).

A validação objetiva garantir que o método utilizado durante a análise seja adequado na identificação e quantificação do alvo analítico, sendo não estático, dependendo do desafio analítico a ser solucionado (RIBANE et al., 2004; CHASIN et al., 1998). Aplica-se em diversas áreas como análises químicas, análises biológicas, questionários, observações, ou em qualquer situação que possa vir a quantificar um parâmetro.

Em análises toxicológicas com finalidade forense, a *Society of Forensic Toxicologists* (SOFT, 2006) estabeleceu as figuras de mérito necessárias para realizar a validação de métodos analíticos quantitativos. São eles: especificidade/seletividade, limite de detecção (LD), precisão (intra-laboratórios-repetibilidade e/ou inter laboratórios-reprodutibilidade), linearidade, intervalo de aplicação, exatidão, recuperação, incerteza da medição, estabilidade e, ainda, alguns parâmetros como limite de quantificação e robustez também podem ser utilizados nas análises qualitativas e quantitativas. Essa recomendação é também empregada por outros órgãos reguladores nacionais e estrangeiros (IMETRO, 2003; UNODC, 2009; BRASIL,2012, BRASIL, 2003).

As técnicas cromatográficas de separação, como, por exemplo, a cromatografia gasosa (GC), a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a eletroforese capilar (CE), são amplamente utilizadas nas análises químicas laboratoriais, principalmente as relacionadas com a toxicologia, pois possuem a capacidade de fornecerem dados qualitativos (identificando o agente pesquisado), bem como dados quantitativos (mensurando a concentração do agente pesquisado), em vários tipos de matrizes, sejam elas provenientes do meio ambiente, de alimentos, de produtos farmacêuticos, de matrizes biológicas, dentre outras (RIBANE et. al, 2004).

Um processo de validação bem estabelecido e documentado garante evidências objetivas e inequívocas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado, em particular, para as agências reguladoras e o poder judiciário, fornecendo um resultado confiável suficiente para se tomar uma decisão.

Uma vez que os processos de validação são essenciais nas rotinas laboratoriais e que métodos analíticos com finalidade forense aplicados a medicina veterinária legal são importantes para a elucidação de quadros de intoxicação por praguicidas carbamatos, o objetivo do presente trabalho é o desenvolvimento e a validação de um método de extração e identificação do praguicida aldicarbe e seus metabolitos, bem como sua quantificação em diversas matrizes biológicas.

5.2 REVISÃO DA LITERATURA

Existem vários métodos para a análise de aldicarbe baseados em cromatografia gasosa e líquida (NUNES et al. ,1998), contudo, considerando que essa molécula é termolábil, a maioria dos estudos envolve análise utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Em relação ao tipo de detecção que pode ser hifenizada a técnica cromatográfica, a detecção por fluorescência supera a detecção por ultravioleta (UV) em sensibilidade e especificidade, sendo então, o método de CLAE com derivação pós-coluna e detecção de fluorescência, o método de eleição para aldicarbe (GARCIA DE LLASERA, 1940). A detecção por arranjo de diodos (DAD), apesar de pouco empregada para detecção de aldicarbe, é uma forma de detecção mais simples e de menor custo, permitindo comparação com bibliotecas de espectro (GARCIA DE LLASERA, 1940).

O Quadro 5.2 apresenta técnicas de extração e métodos de análise possíveis de utilização ou modificação empregada para detecção de aldicarbe em diferentes matrizes.

Há várias diretrizes internacionais e nacionais, bem como legislações e normatizações que sugerem os parâmetros de segurança ou figuras de mérito que devem ser adotadas para as análises químicas. O Quadro 5.3 apresenta sucintamente as figuras de mérito que devem ser avaliadas em análises químicas, segundo as diretrizes sugeridas por algumas agências normativas internacionais e nacional.

Quadro 5.2 – Técnicas de extração e métodos de análise possíveis de utilização ou modificação empregada para detecção de aldicarbe em diferentes matrizes

Matriz	Extração	Método de análise	Referência
Conteúdo gástrico e alimentos que contem grânulos pretos ou acinzentados	Líquido-líquido empregando-se solução de diclorometano: acetona:éter de petróleo (1:1:1) e filtração c/ sulfato de sódio anidro	Cromatografia em camada delgada utilizando o revelador iodoplatina.	Xavier et al., 2007
Cérebro, 50 mg Fígado, 50 mg Rins, 50 mg Sangue cardíaco, 25 mL Sangue periférico, 10 mL Humor vítreo, todo o disponível. Bile, todo o disponível. Urina, todo o disponível. Conteúdo gástrico, todo o disponível.	Tipo de extração aplicada as necessidades da matriz estudada	Tipo de método de análise aplicada as necessidades da matriz estudada	Soft, 2006
Comida infantil a base de maçã	Acetonitrila Centrifugação, evaporação com nitrogênio e ressuspensão com acetato de amônia. Fase sólida: Oásis HLB com metanol e acetato de amônia Centrifugação, evaporação e ressuspensão com tampão	Cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas pela técnica de <i>eletron spray ionization</i>	Wang, Cheung, Grant, 2005
Cereais, frutas e vegetais	Acetato de amônio e metanol Ultrasonicação e centrifugação	Cromatografia líquida – espectrometria de massas em tandem	Granby, Andersen, Christensen, 2004
Frutas e vegetais	Acetato de etila Centrifugação e ressuspensão com metanol	Cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas pela técnica de <i>eletron spray ionization</i>	Ortelli, Edder, Corvi, 2004

(Continua)

Águas subterrâneas	Fase sólida: SepPak C18	Cromatografia a gás acoplado a detector eletroquímico.	Blanco, Grande, Gándara, 2003
Água	Fase sólida: Vac Ellut SPS24 Acetonitrila, água e diclorometano	Cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas pela técnica de eletron spray ionization	Makihata, Kawamoto, Teranishi, 2003
Frutas e vegetais	PHWE Água quente pressurizada	Cromatografia líquida acoplada a um detector de fluorescência com uma derivatização pós-coluna	Herrera et al., 2002
Sangue periférico de pacientes	Líquido-líquido com CHCl ₃ tampão fosfato pH 5,5 + MeOH	Analisado por HPLC-DAD, Fluorescência e GC-MS	Tracqui et al., 2001
Águas	Fase sólida: C18	Cromatografia líquida acoplada a um detector de fluorescência com uma derivatização pós-coluna	Llasera e González, 2001
Urina humana	Fase sólida condicionada com acetato de etila, água e acetonitrila	Cromatografia líquida acoplada a detector de arranjo de diodos.	Vazquez, Vidal, Fernandez, 2000
Matrizes diversas	Hexano:Acetato de etila Evaporação com nitrogênio e ressuspensão com acetonitrila	Cromatografia líquida acoplada a detector de arranjo de diodos.	Ward, May, Branch, 1987
Batatas	Metanol Fase sólida: alumina ácida	Cromatografia líquida acoplada a detector de UV fixo a 236 nm	Wilson e Bushway, 1981
Amostras coletadas de arquipélagos gregos	Fase sólida: PLRP-S <i>polymeric</i>	Cromatografia líquida acoplada a detector de arranjo de diodos.	Liska e Biliková, 1998

(Conclusão)

Quadro 5.3 – Figuras de mérito que são avaliadas em análises químicas, segundo as diretrizes sugeridas por algumas agências normativas internacionais e nacional

Figuras de Mérito														Referência
Linearidade	Precisão	Exatidão	Seletividade	Efeito matriz	Recuperação	LIQ ¹	LSQ ²	LD ³	LQ ⁴	Homogeneidade	Estabilidade	Robustez	Incerteza de medição	
X	X	X	X	-		-	-	X	X	-	-	-	-	USP, 2014
X	X	X	X	X	X	X	X	-	-	X	X	-	-	ANVISA,2012
X	X	X	X	X	X	-	-	-	-	X	X	X	X	Eurachem Working Group, 2012
X	X	X	X	X	X	-	-	X	X	-	-	X	X	MAPA,2011
X	X	X	X	-		-	-	X	X	-	-	-	-	WHO, 2011
X	X	X	-	X	X	X	X	-	-	-	X	X	-	UNODC, 2011
X	X	X	X	X	X	-	-	X	X	-	X	-	X	GTFCh,2009
X	X	X	X	X	X	-	-	X	X	X	X	X	-	SOFT, 2006
X	X	X	X	X	X	-	-	X		-	X	X	X	ISO/IEC 17025, 2005
X	X	X	X	-	X	X	X	X	X	-	X	X	-	LANÇAS,2004
X	X	X	X	-	-	-	-	X	X	-	-	X	-	ANVISA,2003
X	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	Dierauf,1994

¹ Limite Inferior de Quantificação² Limite Superior de Quantificação³ Limite de Detecção⁴ Limite de Quantificação

Fonte: Fukushima (2015)

5.2.1 Sobre os parâmetros de segurança (figuras de mérito)

A seguir, são apresentados os diferentes parâmetros de segurança ou figuras de mérito empregadas em análises químicas.

5.2.1.1 Linearidade

A linearidade é definida como sendo a capacidade de um método gerar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, a qual dever ser estudada em um intervalo apropriado. Isso possibilita estabelecer a relação entre uma variável dependente “medida” em função de uma variável independente “concentração” (CHASIN et al. 2001; CHASIN et al., 1998; CHASIN et al., 1994).

Para avaliar experimentalmente a linearidade é necessário construir gráficos utilizando o método dos mínimos quadrados (regressão linear), que, na maioria dos casos, são chamados de **curvas de calibração**; a IUPAC (2002) recomenda o uso da denominação de gráfico linear, intervalo linear ou intervalo dinâmico. Já a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) por meio das Resoluções de Diretoria Colegiada (RDC – BRASIL, 2012) e das Resoluções (RE – BRASIL, 2003) que versam, respectivamente, sobre validação de métodos analíticos e bioanalíticos no Brasil, utilizam a denominação curva de calibração, bem como a maioria das demais agências internacionais (CHASIN, 2001; CHASIN et al., 1998; CHASIN et al., 1994).

A curva de calibração é o método de quantificação frequentemente utilizado na determinação da concentração de um dado analito (CHASIN et al, 1998; BARROS; PIMENTAL, ARAUJO, 2002). A construção da curva de calibração, na maior parte dos casos, é realizada através da medida do sinal emitido pelo equipamento empregado, em função da massas ou concentrações do analito pesquisado na matriz (CUSTODIO, DE ANDRADE, AUGUSTO, 1997).

A curva de calibração obtida pelo método de regressão linear é expressa pela equação de uma reta:

$$y = \alpha x + b$$

$$r = 1$$

$$r^2 = 1$$

Onde:

y = variável dependente (resposta do método)

x= variável independente (medida)

α = Coeficiente angular (inclinação da reta; indica a sensibilidade do método)

b = Coeficiente linear (expressa intersecção da reta com os eixos x e y)

r = Coeficiente de correlação (indica a linearidade)

r^2 = Coeficiente de determinação (indica a linearidade)

A expressão matemática dessa reta traçada é apresentada pelos coeficientes angular, linear, de correlação e de determinação normalmente obtidos pela regressão linear e descritos na forma da equação da reta (CUSTODIO, DE ANDRADE, AUGUSTO, 1997).

Uma reta pode ser construída a partir de apenas um ponto no espaço (RIBANE et al, 2004), porém nos processos de validação analítica, o número de pontos aceitos no gráfico para se traçar essa reta varia entre cinco (THOMPSON et. al, 2002) e seis pontos (CHASIN,1998, ANVISA, 2012), dos quais não deve incluir o ponto zero na curva, devido aos possíveis erros associados. A construção dessa reta, na prática, ocorre pela análise seriada de calibradores, ou seja, soluções de diferentes concentrações que contemplem a **faixa de concentração** de interesse no trabalho (RIBANE et al, 2004), portanto varia em função da finalidade da análise.

Segundo Chasin (1994; 1998), para análises em material biológico que envolvam intoxicações, a faixa de concentração recomendada deve abranger o intervalo que vai do limite de quantificação (LQ) a 1.000 $\mu\text{g/mL}$; por outro lado, para análises de resíduos a faixa de concentração de interesse pode abranger apenas uma ordem de magnitude.

Se a faixa de concentração estabelecer linearidade com um coeficiente de determinação (r^2) de até 0,980 para matriz biológica e de 0,999 para produtos farmacêuticos, esta pode ser chamada de intervalo dinâmico (BRASIL, 2012, CHASIN, 2001, LANÇAS, 1993; RIBANE et. al, 2004). Assim, a verificação da significância estatística da equação da reta é avaliada pelo coeficiente de determinação (SHABIR, 2003; JENKE, 1998; GREEN, 1996).

O coeficiente angular (α) é um parâmetro que avalia a sensibilidade do método; pode ser empregado, por exemplo, para a comparação entre dois métodos analíticos diferentes. Aquele que possuir maior valor de α , em módulo, possui maior inclinação da reta e, conseqüentemente, apresenta maior sensibilidade. A Figura 5.1 mostra a influência do coeficiente angular sobre a sensibilidade do método analítico. Assim, nota-se que o método B é mais sensível que o A, pois uma mesma faixa de variação da concentração, o método B é capaz de apresentar uma maior resposta.

Figura 5.1 – Coeficiente angular (α) dos métodos analíticos A e B, equação das retas e coeficientes de determinação (r^2)

Fonte: Fukushima (2015)

Outro parâmetro relacionado com a linearidade é a **faixa de aplicação**, que é o intervalo entre o valor superior e inferior de concentração da substância em exame, desde que atenda aos requisitos de precisão e exatidão (SWARTZ; KRULL, 1998). Não existe um consenso quanto a utilização de uma faixa de aplicação entre as várias normativas, como pode ser observado no Quadro 5.4.

Tabela 5.1 – Critério de escolha da faixa de aplicação

Recomendação	Níveis de calibração	Referência
Concentração nominal no Limite Inferior de Quantificação (LIQ) maior ou igual a 20% e a concentração nominal para os demais pontos da calibração maior ou igual a 15%.	6	ANVISA, 2012
Desde 50 – 150% do valor esperado, dependendo de qual destas duas opções for mais adequada.	5 ou 6	LANÇAS, 2004
Intervalo compreendido entre 80-120% da concentração teórica para fármacos e medicamentos e de até 120% do limite máximo especificado para determinação de impurezas.	5	ANVISA, 2003
Pontos da curva analítica devem ser igualmente espaçados sobre a faixa de concentração de interesse e que esta faixa compreenda 0 – 150% ou 50 – 150% do valor esperado, dependendo de qual destas duas opções for mais adequada.	6	IUPAC, 2002
Valores variando entre a metade e o quádruplo da concentração do Limite de Quantificação (LQ).	5	GARP, 1999
Para material biológico do LQ a 1.000 µg/mL e, para análises de resíduos, apenas uma ordem de magnitude.	6	CHASIN, 1998
Para produtos formulados, a, entre outros, recomenda uma variação de $\pm 20\%$ do valor declarado ou esperado	5	ICH, 1995

Fonte: Fukushima (2015)

Em métodos cromatográficos, para construir a curva de calibração pode-se empregar três técnicas distintas: padronização externa, padronização interna e superposição de matriz com adição padrão.

A padronização externa relaciona a resposta que se deseja quantificar na matriz (área da substância) com as respostas obtidas a partir de soluções preparadas com o padrão analítico de concentrações conhecidas. Assim, a curva de calibração é obtida a partir de múltiplas diluições de um padrão em um solvente. Para obter a concentração da substância problema presente na matriz, esta é obtida comparando-se com a curva de calibração (KRULL e SWARTZ, 1998, CUADROS-RODRÍGUEZ et. al, 2001, LANÇAS, 1996). Curvas históricas não são comumente utilizadas para esse tipo de padronização por serem sensíveis a erros durante o preparo das amostras e diluição dos padrões (KRULL e SWARTZ, 1998, CUADROS-RODRÍGUEZ et al, 2001, LANÇAS, 1996).

A padronização interna utiliza uma substância chamada de padrão interno com características físicas e químicas semelhante aos analitos pesquisados. Estes são adicionados à amostra em concentração ou massa conhecida de forma que não interfira na análise. Portanto, o padrão interno deve necessariamente ser isento da matriz pesquisada, estar disponível em elevado grau de pureza, ser adicionado à amostra em concentração semelhante às concentrações das substâncias a serem analisadas e ter uma boa resolução cromatográfica (LANÇAS, 2004).

A construção da curva utilizando padronização interna é feita realizando o cálculo da razão entre as respostas obtidas do padrão interno (constante) pelo analito (variável) em função das razões entre as concentrações estabelecidas pela faixa de aplicação. A amostra é analisada da mesma maneira, ou seja, adicionando a quantidade fixa de padrão interno. A construção da curva é realizada utilizando-se a razão das respostas obtidas no método em função da leitura da concentração da substância na amostra (KRULL; SWARTZ, 1998, CUADROS-RODRÍGUEZ et al, 2001). Esse tipo de padronização é recomendada para métodos que possuam pequenas variações de seus parâmetros, sendo muito utilizada para corrigir injeção no método de cromatografia a gás (LANÇAS, 1996).

A superposição de matriz é a adição do padrão do analito em diversas concentrações em uma matriz idêntica ou semelhante à da amostra, isenta da substância. A construção do gráfico de calibração relaciona as áreas obtidas com as concentrações dos padrões. Portanto, tanto a padronização interna quanto a externa podem ser aplicadas à superposição de matriz, sendo utilizada para avaliar o efeito que possíveis interferentes

presentes na matriz gerariam sobre o método analítico (CUADROS-RODRÍGUEZ et al., 2001).

Os parâmetros avaliados na superposição de matriz são: a recuperação de extração e a seletividade ou a detecção da substância de interesse, as quais fornecem uma melhor correspondência em relação à composição da amostra, uma vez que se mimetiza uma situação real de análise da mesma (CUADROS-RODRÍGUEZ et. al, 2001). Por vezes, existem inconvenientes, como o elevado custo de análise, bem como a subestimação dos efeitos de co-extratos (EGEA-GONZÁLEZ, et. al, 2002).

Embora a calibração avaliando o efeito de matriz seja confiável, ela avalia apenas o efeito de uma única matriz; porém há situações analíticas na qual deve ser considerada a diferença de composição entre as matrizes (CUADROS-RODRÍGUEZ, et. al, 2003).

Quando não se é possível obter matriz isenta do analito de interesse, é recomendado utilizar a técnica de adição de padrão (CUADROS-RODRÍGUEZ et al, 2003), no qual se adicionam concentrações conhecidas do analito de interesse em quantidades conhecidas na matriz antes do seu preparo. Estas são utilizadas para a obtenção da resposta do método, pela construção de uma curva de calibração relacionando as quantidades da substância adicionada à amostra com as respectivas áreas obtidas. O ponto onde a reta corta o eixo das ordenadas corresponde a resposta do método analítico da substância que está sendo determinada sem qualquer adição do padrão. Já a concentração da substância analisada é definida pela extrapolação do eixo das abscissas (BERG et. al, 1988). Essa técnica é complexa e envolve inúmeras etapas, embora seja a mais apropriada para matrizes complexas impossíveis de serem obtidas isentas do analito, bem como quando há dificuldade de se encontrar um padrão interno adequado para a análise (SNYDER et. al, 1997).

5.2.1.2 Precisão

Segundo a Resolução 27 de 2012 da ANVISA (Brasil, 2012), a determinação da precisão deve ser avaliada de duas maneiras: em uma mesma corrida (precisão intracorrída) e em, no mínimo, três corridas diferentes (precisão intercorridas).

Para avaliar a precisão em cada corrida é necessário realizar no mínimo cinco replicatas dos pontos analisados, com no mínimo cinco concentrações que compreendam

o limite inferior de quantificação (LIQ), o controle de qualidade baixo, o controle de qualidade médio, o controle de qualidade alto e o controle de qualidade de diluição. O ensaio para avaliação da precisão intercorridas deve abranger corridas em dias distintos.

A precisão deve ser demonstrada matematicamente por meio do coeficiente de variação (CV%), não se admitindo valores superiores a 15% (quinze por cento), exceto para o LIQ, cujos valores são menores ou iguais a 20% (vinte por cento); o cálculo do CV é feito pela seguinte equação matemática:

$$CV = \frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Média} \times 100}$$

O cálculo do CV tanto da precisão intracorrida como das intercorridas deve levar em consideração todos os valores obtidos. Caso as variações estejam acima do regulamentado na legislação é necessária a repetição do ensaio.

5.2.1.3 Exatidão

Para a avaliação da exatidão, deve-se proceder um experimento semelhante ao da precisão, avaliando-se de duas maneiras: em uma mesma corrida (exatidão intracorrida) e em, no mínimo, três corridas diferentes (exatidão intercorridas).

Para a avaliação da exatidão em cada corrida é necessário realizar no mínimo cinco replicatas dos pontos analisados, com no mínimo cinco concentrações que compreendam o limite inferior de quantificação, o controle de qualidade baixo, o controle de qualidade médio, o controle de qualidade alto e o controle de qualidade de diluição. A realização do ensaio de exatidão intercorridas deve abranger corridas em dias distintos.

A exatidão é matematicamente apresentada por meio do cálculo do Erro Padrão Relativo (EPR), sendo o cálculo realizado pela seguinte fórmula:

$$EPR = \frac{(Concentração\ média\ experimental - Valor\ nominal) \times 100}{Valor\ nominal}$$

A exatidão deve ser demonstrada matematicamente por meio do EPR, não se admitindo valores superiores a 15% (quinze por cento), exceto para o LIQ, cujos valores são menores ou iguais a 20% (vinte por cento).

O cálculo do EPR da exatidão intracorrida e das intercorridas deve levar em consideração todos os valores obtidos. Caso as variações estejam acima do regulamentado na legislação é necessário a repetição do ensaio.

5.2.1.4 Seletividade

Segundo a Resolução 27 de 2012 da ANVISA (BRASIL, 2012), para avaliar a seletividade deve-se considerar a existência de coeluições de substâncias que poderiam ser comuns nas matrizes biológicas. Para a aceitação da seletividade adota-se o critério de resolução cromatográfica de no mínimo 2% em relação ao tempo de retenção entre os analitos.

Nos ensaios de seletividade é recomendada a análise de amostras da matriz biológica obtidas de, no mínimo, seis fontes distintas; contudo, no caso de sangue total devem ser empregadas cinco amostras normais e uma lipêmica. Caso sejam utilizadas outras matrizes biológicas, suas características devem ser avaliadas e testadas.

5.2.1.5 Efeito residual e de matriz

A seletividade pode ser dividida em ensaios de efeito residual e ensaios de efeito matriz.

Para avaliação do efeito residual recomenda-se realizar, no mínimo, três injeções no cromatógrafo da mesma matriz branco (matriz extraída sem adição de padrão), sendo uma antes e duas logo após a injeção de uma ou mais matrizes processadas do limite

superior de quantificação. Esses resultados devem ser comparados com os resultados das análises do limite inferior de quantificação.

Para a aceitação do efeito residual, o tempo de retenção do analito deve ser inferior a 20% da resposta do analito quando comparadas as matrizes processadas no limite inferior de quantificação. Contudo, para o padrão interno admitem-se picos interferentes no tempo de retenção inferiores a 5 % de sua resposta. Caso o efeito de matriz seja inevitável, devem-se tomar providências analíticas para corrigir esse efeito de maneira que o mesmo não interfira na precisão e exatidão do método.

Para a realização do teste de efeito de matriz recomenda-se a análise de amostras de matrizes biológicas processadas e posteriormente adicionadas de analito e padrão interno (PI), bem como soluções nas mesmas concentrações das amostras de ponto de controle de dose baixa e ponto de controle de dose alta.

Quando a matriz biológica for sangue total devem ser analisadas seis amostras de fontes distintas, sendo quatro normais e duas lipêmicas. Em relação a outras matrizes biológicas utilizadas, devem ser analisadas seis amostras de fontes distintas.

Para avaliar a aceitabilidade para cada amostra deve ser calculado o fator de matriz (FMN), conforme a fórmula:

$$\text{FMN} = \frac{\text{Resposta do analito em matriz} / \text{Resposta do PI em matriz}}{\text{Resposta do analito em solução} / \text{Resposta do PI em solução}}$$

O coeficiente de variação (CV) dos FMNs relativos a todas as amostras deve ser inferior a 15% para a aceitação.

5.2.1.6 Recuperação

A recuperação é utilizada para medir a eficiência do procedimento de extração dentro de um limite de variação. Os testes de recuperação devem ser feitos comparando-se os resultados dos analitos de matrizes extraídas a partir de três concentrações (baixa,

média e alta) contemplando a faixa de linearidade do método. Os resultados obtidos devem ser comparados com os resultados provenientes das análises de soluções padrão não extraídas, que representam 100% de recuperação. O cálculo da recuperação deve ser feito em função da relação de área do padrão extraído e não extraído, tanto para o analito quanto para o padrão interno, separadamente.

5.2.1.7 Limite inferior de quantificação (LIQ)

O LIQ é a menor quantidade de analito na matriz que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão aceitáveis. Usualmente, considera-se o LIQ como a menor concentração da curva de calibração.

5.2.1.8 Limite Superior de Quantificação (LSQ)

O LSQ é definido como a maior quantidade de analito na matriz que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão aceitáveis. Usualmente, considera-se o LSQ é a maior concentração da curva de calibração.

5.2.1.9 Homogeneidade (Fidelidade)

As matrizes heterogêneas são um desafio para o analista, uma vez que garantir um resultado quantitativo confiável é premissa básica das análises toxicológicas. Para tanto é necessário realizar testes para verificar se a amostra a ser analisada é considerada homogênea ou heterogênea no tocante ao analito que será pesquisado. Assim, se faz uma amostragem de seis pontos distintos em triplicata, realizando a análise quantitativa, a fim de se verificar as variações de concentrações entre os pontos da amostragem.

Caso o resultado não apresente precisão, essa matriz é considerada heterogênea e deverá ser analisada como um todo caso seja possível, ou deve-se realizar um processo de homogeneização, dentro de sua possibilidade, a fim de garantir um resultado confiável, refletindo os valores reais de quantificação no todo.

5.2.1.10 Estabilidade

A estabilidade do analito em matriz biológica deve ser demonstrada através de ciclos de congelamento e descongelamento para obtenção da estabilidade de curta duração, da estabilidade de longa duração e da estabilidade pós-processamento, variando-se apenas o tempo ou o estágio de processamento da matriz (Brasil, 2012).

Para realizar os estudos de estabilidade propostos pela a RDC 27 de 2012 da ANVISA (Brasil, 2012) devem ser reproduzidas as condições de armazenamento, preparo e análise das amostras em estudo, utilizando-se um conjunto de amostras de matriz biológica adicionadas de soluções do analito e do padrão interno. Para tanto deve ser utilizada no mínimo três amostras de Controle de Qualidade Baixo (CQB) e três de Controle de Qualidade Alto (CQA), as quais devem ser analisadas imediatamente após sua preparação e após serem submetidas às condições de ensaio aplicáveis.

O parâmetro de aceitação é a utilização de apenas amostras cujo resultado da análise imediatamente após sua preparação estiver dentro de $\pm 15\%$ do valor nominal do analito e do padrão interno.

5.2.1.11 Robustez

Pode ser definida como robustez de um método analítico a capacidade do mesmo em resistir a variações nos resultados quando pequenas modificações são realizadas nas condições experimentais inicialmente descritas. Portanto, um método pode ser considerado robusto se os seus resultados não são afetados por pequenas modificações em suas passagens analíticas (IMETRO, 2003; LANÇAS, 2004; UNODC, 2009).

5.3 OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver e validar um método de extração e identificação do praguicidas anticolinesterásicos em matrizes biológicas, empregando a RDC 27 de 2012 da ANVISA (Brasil, 2012).

5.3.1 Objetivos específicos

Desenvolvimento e validação um método de extração e identificação de:

- ✓ aldicarbe e seus metabólitos (aldicarbe-sulfóxido e aldicarbe-sulfona);
- ✓ carbofurano e seu metabólito (3-OH carbofurano);
- ✓ forato e seu metabólito (forato-sulfóxido);
- ✓ quantificação do aldicarbe;
- ✓ aplicação do método em amostras reais;

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

5.4.1 Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica para Análise de Praguicidas Anticolinesterásicos

Foi desenvolvido um método analítico para identificação dos praguicidas anticolinesterásicos aldicarbe e seus metabólitos (aldicarbe-sulfona e aldicarbe-sulfóxido), carbofurano e seu metabólito (3-OH-carbofurano) e forato e seu metabólito (forato-sulfóxido); as características dessas substâncias podem ser vistas na Tabela 5.2. A quantificação foi realizada apenas para o aldicarbe. Como padrão interno foi utilizado a terbutilazina. O método de escolha foi a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD). O método desenvolvido foi

validado de acordo com a RDC 27 de 2012 da ANVISA (BRASIL, 2012), por essa ser a que mais se aproxima da realidade analítica dos laboratórios de toxicologia, pois não existe uma normatização nacional específica para o tipo de análise que foi proposta no presente trabalho.

As amostras foram analisadas por CLAE usando como fase móvel água e acetonitrila, em um gradiente, iniciando a rampa com 0% de acetonitrila e chegando a 80% de acetonitrila em 40 minutos; posteriormente, foi criado um gradiente de limpeza que se inicia em 40,01 minutos, chegando a 100% de acetonitrila em 45 minutos. A seguir, em 45,01 minutos, a condição inicial é retomada com 0% de acetonitrila, permanecendo assim até 50 minutos. A separação ocorreu através de uma coluna contendo fase reversa composta de uma sílica C18, sendo realizada a comparação com biblioteca de espectros específica para a confirmação do achado.

Foram utilizados padrões (Sigma[®]) de aldicarbe, aldicarbe-sulfóxido, aldicarbe-sulfona, carbofurano, 3-OH-carbofurano, forato e forato-sulfóxido.

Tabela 5.2 – Praguicidas e seus metabólitos analisados, considerando o nome químico, a marca comercial, empresa fabricante, a classe à qual pertence/metabólito, o grupo químico, a classificação toxicológica, a concentração referente a apresentação comercial, o pKa e a estrutura química.

Empresa	Marca comercial	Nome químico	Classe	Grupo químico	Classificação toxicológica	Concentração	pKa	Estrutura química
Aventis	Temik 150®	Aldicarbe	Acaricida, inseticida, nematicida (Aplicado no solo)	Metilcarbamato de oxima	Classe I (Extremamente tóxico)	150 g kg-1	14,40
		Aldicarbe-sulfóxido	Metabólito tóxico				14,00
		Aldicarbe-Sulfona	Metabólito tóxico				13,78
Fersol/Rohm Haas e FMC	Ralzer 50/350 GR/SC Ou Furadan 50/350 GR/ SC	Carbofurano	Acaricida, inseticida, nematicida (Aplicado no solo)		Classe I (Extremamente tóxico)	50 g kg-1 ou 350 g L-1	11,90

(Continuação)

Fonte: Fukushima (2015)

		3-hidroxi-carbofurano	Metabólito tóxico			12,29
Basf	Granutox	Forato	Acaricida, inseticida, nematocida (Aplicado no solo)	Classe I (Extremamente tóxico)	50 g kg-1	1,10
		Forato-sulfóxido	Metabólito tóxico			1,10

(Conclusão)

Fonte: Fukushima (2015)

5.4.1.1 Otimização das condições cromatográficas

Foram realizadas mudanças do tipo de coluna, temperatura do forno, composição de fase móvel, bem como o tipo da fase móvel, o fluxo da fase móvel com a finalidade de otimizar a técnica, visando diminuir o tempo de retenção com a melhor resolução dos picos cromatográficos entre os analitos de interesse e o padrão interno.

5.4.1.2 Teste para interferentes na corrida cromatográfica

O teste para a verificação de interferentes foi realizado avaliando duas situações, que por ventura poderiam ocorrer simultaneamente, sendo elas: a coeluição de possíveis xenobióticos, os quais o animal poderia ter entrado em contato, e avaliação de interferentes nas matrizes, que por ventura poderiam prejudicar a análise.

Para tanto, foram preparadas soluções-padrão de ivermectina, abamectina, dexametazona, fipronil, atropina, prilocaína e amoxicilina, na concentração de 100 µg/mL para cada analito, em metanol, e adicionados aos extratos das matrizes biológicas isentas de qualquer analito.

Após isso, procedeu-se a injeção de 10 µL no CLAE-DAD. Foi registrado o tempo de retenção individual de cada substância interferente e observado se existiam tempos de retenção muito próximos ou em uma faixa de identificação de 10% em relação ao tempo de retenção dos analitos pesquisados.

5.4.1.3 Padronização para CLAE-DAD

Foi utilizada a padronização interna para a realização das análises. Consistiu-se na construção de uma curva de calibração, lançando no gráfico as áreas relativas (quociente entre a área do analito de interesse e a área do padrão interno) dos picos obtidos em função das massas dos padrões que as geraram; a seguir injetou-se uma amostra cuja

massa era desconhecida. Determinou-se sua área relativa e lançou-se na equação da reta a área relativa obtida da análise. A resultante desse cálculo gerou a concentração do analito em questão em unidades utilizadas para a construção da curva de calibração.

5.4.2 Preparação das curvas analíticas

5.4.2.1 Curvas analíticas para o método de CLAE-DAD

A quantificação do aldicarbe foi realizada através do método de CLAE-DAD. Para isso foram construídas três curvas de calibração em diferentes dias para as faixas de concentração entre 32,5 µg/mL e 1.000 µg/mL. Inicialmente foi preparada uma solução estoque em acetonitrila na concentração de 10.000 µg/mL de aldicarbe. A seguir, foi realizada a diluição do padrão analítico para obter a concentração de 1.000 µg/mL, sendo esse o calibrador mais alto das curvas analíticas.

Após a obtenção do maior calibrador da curva, foram realizadas sucessivas diluições, todas realizadas em vidrarias volumétricas calibradas com a finalidade de se obterem calibradores nas concentrações de 500, 250, 125, 62,5, 31,25 µg/mL.

Os resultados obtidos foram tratados com regressão linear e construídas seis curvas de calibração, sendo uma para cada matriz e obtidos os respectivos coeficientes de determinação (r^2). A equação da reta foi obtida pelo *software Excel professional 2013*.

5.4.2.2 Preparo das soluções de Controle de Qualidade (CQs)

Foi diluída em acetonitrila a solução estoque descrita no item 5.6.1, de forma a se obterem as concentrações de 60, 200 e 900 µg/mL, respectivamente CQ₁ (baixo), CQ₂ (médio) e CQ₃ (alto). Novas soluções de trabalho dos CQs nas mesmas concentrações foram preparadas por outros analistas, a fim de se avaliar variações intra-operadores.

5.4.2.3 Especificidade/seletividade

Estes parâmetros foram avaliados através de diversas injeções no cromatógrafo das seguintes substâncias: ivermectina, abamectina, dexametazona, fipronil, atropina, atropina, prilocaina e amoxicilina, a fim de verificar a possível coeluição dessas substâncias com os demais analitos pesquisados.

5.4.2.4 Repetibilidade e reprodutibilidade

Os ensaios para a determinação de repetibilidade e reprodutibilidade foram realizados nas amostras controle (CQs) de 60, 200 e 900 µg/mL, em seis determinações, para a repetibilidade intra-ensaio, ou seja, as seis determinações foram realizadas no mesmo dia. A avaliação da reprodutibilidade foi realizada em outro dia. Os CQs foram expressos em termos de imprecisão, sendo calculados através do coeficiente de variação (CV) intradia e interdia.

5.4.2.5 Homogeneidade de amostra

Este procedimento foi realizado retirando-se da amostra (tecido/órgão utilizado) três fragmentos, os quais foram homogeneizados (Mixer) isoladamente. Logo após esse processamento foram extraídas e injetadas no cromatógrafo em triplicata. A homogeneidade foi realizada através da verificação da precisão de resultados dos três fragmentos, calculada através do coeficiente de variação (CV).

5.4.2.6 Determinação do tempo de retenção de cada substância

Foram preparadas soluções de aldicarbe, aldicarbe-sulfóxido, aldicarbe-sulfona, carbofurano, 3-hidroxicarbofurano, forato e forato-sulfóxido, na concentração de 100 µg/mL, para cada analito, em acetonitrila. Após seis injeções de 10 µL no CLAE-DAD, foi observado o tempo de retenção individual de cada uma das substâncias analisadas e verificado o coeficiente de variação (CV).

5.4.3 Preparação das amostras

5.4.3.1 Matrizes

As matrizes biológicas de trabalho eleitas foram o sangue total, conteúdo estomacal, fígado, rins, pulmão, encéfalo e humor vítreo.

As matrizes biológicas isentas dos analitos pesquisados para a validação, compreenderam quatro espécies de animais diferentes (gatos, cães, ratos e frangos). Também foram utilizadas matrizes biológicas que sugeriam intoxicação pelos agentes tóxicos pesquisados. Tanto as matrizes isentas quanto as suspeitas da intoxicação foram provenientes do Serviço de Necropsia (Protocolo CEU N° 3006/2013) ou pesquisas (Protocolo CEU N° 2301/2011e N° 3071/2013) realizadas no Departamento de Patologia (VPT) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP).

5.4.3.2 Materiais utilizados para extração

Foram empregados os padrões analíticos dos praguicidas e seus metabólitos (5.3.1.) da Sigma, com pureza maior que 97%.

Foram utilizados reagentes para a extração, como éter grau para análise (PA) da (Tédia), clorofórmio grau cromatográfico (Merck), cloreto de sódio PA (Vetec), sulfato de sódio anidro (Vetec), acetonitrila grau cromatográfico (Merck), fosfato de sódio (Vetec) e hidróxido de sódio (Vetec). Ainda foi utilizada água proveniente de osmose reversa do tipo I obtida pelo sistema de filtração (Milipore).

Alguns consumíveis, vidrarias e instrumentos foram utilizados no processo, sendo eles papel de filtro qualitativo (Nalgon) e filtros de seringa de 0,22 µm (Milipore), béqueres de vidro, funis de filtração de vidro, tubos plásticos com tampa de rosca com volume de 50 ml (Falcon), bem como agitador mecânico da marca (DAIGGER – modelo *multi-microplate genie*) e centrífuga refrigerada (Ependorff).

5.4.3.3 Técnicas de extração

A extração denominada *Quick Easy Cheap Effective Rugged* (QuEChERS) se aplicou a realidade das matrizes utilizadas, mediante algumas modificações. Para tanto foi realizada inicialmente uma extração líquido-líquido, e após esta foi empregada a técnica QuEChERS com o objetivo de realizar uma maior limpeza do analito.

A extração tem como princípio a utilização de um solvente extrator imiscível na matriz de análise, baseando-se no coeficiente de partição óleo/água da molécula. Conforme sua lipofilicidade, essa migra ou não para a porção oleosa após exaustiva agitação. Neste caso foi utilizada uma mistura de éter : clorofórmio na proporção de 1:1.

Essa técnica se baseia na precipitação de proteínas utilizando acetonitrila sobre a matriz biológica, com posterior centrifugação e utilização do sobrenadante na análise cromatográfica direta. O método empregado pode ser visualizado no fluxograma da Figura 5.2.

Figura 5.2 – Fluxograma aplicado na extração e preparo das amostras para análise.

Fonte: Fukushima (2015)

5.4.3.4 Análises estatística

Para a realização das análises estatísticas e cálculos propostos pela RDC 27 de 2012 da ANVISA (BRASIL, 2012) foi empregado o *software Excel professional 2013*.

5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi empregada a RDC 27 de 2012 da ANVISA (BRASIL, 2012) para a validação do método analítico, uma vez que essa se adequava melhor a um laboratório de análises toxicológicas e pelo fato de não existir outra normatização nacional que se destinem a análises com finalidades forenses. Deve ser enfatizado que a validação é um processo dinâmico e adaptável a realidade e necessidades do analista (RIBANE et al., 2004; CHASIN et al., 1998).

5.5.1 Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para análise de praguicidas anticolinesterásicos

O desenvolvimento do método para análise dos agentes anticolinesterásicos propostos se iniciou pelo estudo teórico dos compostos que seriam analisados (Tabela 5.2). A partir do conhecimento das características físico-químicas e estruturais dos analitos foram tomadas decisões referentes ao tipo de coluna cromatográfica a ser empregada, a fase móvel e os principais comprimentos de onda elencados para a identificação e quantificação, a fim de obter os melhores resultados para a análise.

As matrizes escolhidas a serem validadas seguiram alguns critérios de escolha, com a finalidade de atingir os objetivos propostos. Assim, o sangue foi eleito por ser uma matriz forense consagrada em inúmeros estudos e considerada por unanimidade dentro da área forense como matriz forense de eleição para análises toxicológicas, uma vez que sua função biológica é transporte, tanto do agente tóxico quanto seus produtos de biotransformação. O uso do conteúdo estomacal está relacionado com a maioria das intoxicações que ocorreram por via oral em virtude da ingestão de aldicarbe com envolvimento médico-legal, incluindo as intoxicações propositais no que tange a medicina veterinária legal.

A biotransformação do aldicarbe ocorre principalmente no compartimento hepático; devido a esse fato o fígado foi elencado como uma das matrizes analíticas de

interesse, podendo representar uma inovação como matriz de análise para aldicarbe e/ou seus metabólitos.

O humor vítreo se apresenta como uma inovação relacionada às análises toxicológicas veterinárias, uma vez que não é usual na literatura estudos utilizando essa matriz em medicina veterinária legal.

As demais matrizes biológicas utilizadas, (pulmão, encéfalo e rim) tiveram o objetivo de verificar a distribuição pós mortal nesses animais, a fim de se verificar, se as mesmas poderiam ser utilizadas como matrizes de referência nas análises que envolvam intoxicação por aldicarbe.

As técnicas foram desenvolvidas, testadas e otimizadas com o objetivo de obter uma técnica única que atenda satisfatoriamente as diversas matrizes analisadas, no que tanger os parâmetros relacionados com as legislações que versam sobre validação e as respectivas diretrizes da área, considerando a literatura pesquisada e apresentada sucintamente no Quadro 5.2.

A técnica QuEChERS é consagrada e muito utilizada em matrizes alimentícias (PRESTES et al, 2009). Em virtude das nossas matrizes biológicas serem derivados provenientes muitas vezes de produtos cárneos, esse tipo de extração também foi considerado como possibilidade. Para tanto, após alguns testes realizados, a técnica de extração que apresentou melhor desempenho foi uma técnica híbrida entre a extração líquido-líquido, seguida da aplicação da técnica QuEChERS, sendo essa denominada QuEChERS modificada.

As figuras de mérito avaliadas no processo de validação foram a linearidade realizada pelo método de padronização interna, precisão, exatidão, seletividade (efeito residual e de matriz), recuperação, limite inferior de quantificação (LIQ), limite superior de quantificação (LSQ), homogeneidade (fidelidade), estabilidade (ainda em andamento) e robustez.

5.5.1 1 Linearidade

A linearidade é a característica que o método tem de estabelecer uma regra de proporcionalidade direta em função da concentração do analito em questão. Para esse

ensaio, as análises procederam com a amostra branco (matriz biológica isenta de padrão dos analitos e de padrão interno), a amostra zero (matriz biológica adicionada de padrão interno) e cinco amostras contendo as concentrações da curva de calibração estabelecida, conforme a necessidade do analista com a adição de 100 µg/mL do padrão interno terbutilazina. Todas as curvas resultaram em parâmetros matemáticos como o coeficiente de correlação linear (r^2), o coeficiente angular (alfa) e o intercepto da reta.

Para a aceitação da curva de calibração foram usados os seguintes limites estabelecidos na RDC 27 de 2012 da ANVISA (Brasil, 2012): desvio menor ou igual a 20% para o LIQ em relação a concentração nominal; desvio menor ou igual a 15% para os demais pontos em relação a concentração nominal; no mínimo quatro de cinco concentrações da curva de calibração devem cumprir com os critérios anteriores; e o coeficiente de correlação linear (r^2) deve ser igual ou superior a 0,98.

As equações da reta e o coeficiente de correlação linear nas diferentes matrizes são apresentados nas tabelas 5.3 a 5.10; as figuras 5.7 a 5.21 ilustram as curvas de calibração para as diferentes matrizes.

Tabela 5.3 - Equações da reta e coeficiente de correlação (r^2) das curvas de calibração para aldicarbe em sangue.

Curvas	Equação da reta	r^2
Padrão	$y = 0,0011x + 0,0019$	0,9922
1	$y = 0,0011x - 0,0027$	0,9823
2	$y = 0,0011x - 0,013$	0,9826
3	$y = 0,0011x - 0,0045$	0,9839
4	$y = 0,0011x - 0,0053$	0,9881
5	$y = 0,0011x - 0,0047$	0,9861
6	$y = 0,0011x - 0,013$	0,9826

Fonte: Fukushima (2015)

Figura 5.3 – Representação gráfica das cinco replicadas da curva de calibração do aldicabe em sangue e em padrão.

Fonte: Fukushima (2015)

Tabela 5.4 - Equações da reta e coeficiente de correlação (r^2) das curvas de calibração para aldicarbe em conteúdo estomacal.

Curvas	Equação da reta	r^2
Padrão	$y = 0,001x + 0,007$	0,9999
1	$y = 0,0011x - 0,0023$	0,9993
2	$y = 0,0011x + 0,0111$	0,9996
3	$y = 0,0011x + 0,016$	0,9988
4	$y = 0,0011x + 0,0198$	0,9979
5	$y = 0,0011x + 0,0104$	0,9996
6	$y = 0,0011x - 0,0022$	0,9994

Fonte: Fukushima (2015)

Figura 5.4 – Representação gráfica das cinco replicadas da curva de calibração do aldicarbe em conteúdo estomacal e em padrão

Fonte: Fukushima (2015)

Tabela 5.5 - Equações da reta e coeficiente de correlação (r^2) das curvas de calibração para aldicarbe em encéfalo.

Curvas	Equação da reta	r^2
Padrão	$y = 0,0011x - 0,0065$	0,9993
1	$y = 0,001x + 0,0098$	0,9996
2	$y = 0,0011x + 0,0091$	0,9997
3	$y = 0,0011x + 0,0081$	0,9998
4	$y = 0,0011x + 0,0073$	0,9999
5	$y = 0,0011x + 0,0056$	0,9999
6	$y = 0,0011x + 0,0042$	0,9999

Fonte: Fukushima (2015)

Figura 5.5 – Representação gráfica das cinco replicadas da curva de calibração do aldicarbe em encéfalo e em padrão.

Fonte: Fukushima (2015)

Tabela 5.6 - Equações da reta e coeficiente de correlação (r^2) das curvas de calibração para aldicarbe em coração

Curvas	Equação da reta	r^2
Padrão	$y = 0,0009x + 0,0162$	0,9999
1	$y = 0,001x - 0,03850$	0,9805
2	$y = 0,0009x + 0,0182$	0,9989
3	$y = 0,0011x + 0,016$	0,9988
4	$y = 0,001x + 0,0099$	0,9994
5	$y = 0,0012x + 0,0289$	0,9983
6	$y = 0,001x - 0,0385$	0,9805

Fonte: Fukushima (2015)

Figura 5.6 – Representação gráfica das cinco replicadas da curva de calibração do aldicabe em padrão e em coração.

Fonte: Fukushima (2015)

Tabela 5.7 - Equações da reta e coeficiente de correlação (r^2) das curvas de calibração para aldicarbe em fígado.

Curvas	Equação da reta	r^2
Padrão	$y = 0,0013x - 0,0418$	0,9913
1	$y = 0,0013x - 0,0409$	0,988
2	$y = 0,0013x - 0,0466$	0,9886
3	$y = 0,0013x - 0,0409$	0,988
4	$y = 0,0014x - 0,0326$	0,9942
5	$y = 0,0013x - 0,0405$	0,9905
6	$y = 0,0013x - 0,0418$	0,9913

Fonte: Fukushima (2015)

Figura 5.7 – Representação gráfica das cinco replicadas da curva de calibração do aldicarbe em fígado e em padrão.

Fonte: Fukushima (2015)

Tabela 5.8 - Equações da reta e coeficiente de correlação (r^2) das curvas de calibração para aldicarbe em Humor Vítreo.

Curvas	Equação da reta	r^2
Padrão	$y = 0,0012x + 0,0146$	0,9978
1	$y = 0,0013x + 0,0028$	0,9997
2	$y = 0,0013x + 0,0138$	0,9981
3	$y = 0,0011x + 0,0312$	0,9929
4	$y = 0,0012x + 0,0087$	0,9997
5	$y = 0,0012x + 0,0142$	0,9991
6	$y = 0,0012x + 0,0146$	0,9978

Fonte: Fukushima (2015)

Figura 5.8 – Representação gráfica das cinco replicadas da curva de calibração do aldicabe em humor vítreo e em padrão

Fonte: Fukushima (2015)

Tabela 5.9 - Equações da reta e coeficiente de correlação (r^2) das curvas de calibração para aldicarbe em pulmão

Curvas	Equação da reta	r^2
Padrão	$y = 0,0012x + 0,0199$	0,9922
1	$y = 0,0011x + 0,0195$	0,9877
2	$y = 0,0011x + 0,0325$	0,9907
3	$y = 0,0011x + 0,0238$	0,9924
4	$y = 0,0012x + 0,0248$	0,992
5	$y = 0,0011x + 0,0241$	0,9918
6	$y = 0,0011x + 0,0195$	0,9877

Fonte: Fukushima (2015)

Figura 5.9 – Representação gráfica das cinco replicadas da curva de calibração do aldicarbe em pulmão e em padrão

Fonte: Fukushima (2015)

Tabela 5.10 - Equações da reta e coeficiente de correlação (r^2) das curvas de calibração para aldicarbe em rim

Curvas	Equação da reta	r^2
Padrão	$y = 0,0012x + 0,0126$	0,9921
1	$y = 0,0011x + 0,0223$	0,9970
2	$y = 0,0012x + 0,0006$	0,9943
3	$y = 0,0011x + 0,0144$	0,9978
4	$y = 0,0012x + 0,015$	0,9963
5	$y = 0,0012x + 0,013$	0,9981
6	$y = 0,0012x + 0,0126$	0,9921

Fonte: Fukushima (2015)

Figura 5.10 – Representação gráfica das cinco replicadas da curva de calibração do aldicabe em rim e em padrão

Fonte: Fukushima (2015)

Assim, é possível notar que todas as curvas de calibração nas diferentes matrizes apresentaram o coeficiente de correlação (r^2) superior a 0,98, atendendo o critério da legislação

5.5.1.2 Precisão

A precisão foi avaliada por meio do Controle de Qualidade Baixo (CQB), Controle de Qualidade Médio (CQM) e Controle de Qualidade Alto (CQA), em triplicatas, contemplando o intervalo linear do método (corridas intradia e interdía). O coeficiente de variação (CV) não deve ser superior a 15%, exceto para o LIQ, para o qual são admitidos CV inferior a 20%, seguindo as recomendações da RDC 27 de 2012 da ANVISA (Brasil, 2012).

A tabela 5.11 mostra os resultados da precisão, indicando que o coeficiente de variação em todas as matrizes estudadas nos CQB, CQM e CQA atendem a legislação utilizada que estabelece até 15% de variação para o LIQ e para as demais variáveis até 20%.

Tabela 5.11 – Precisão, em cada matriz, avaliada por meio do coeficiente de variação (CV%) do limite inferior de quantificação (LIQ), controle de qualidade baixo (CQB), controle de qualidade médio (CQM) e controle de qualidade alto (CQA), bem como o critério de aceitação, segundo a RDC 27 de 2012 da ANVISA (Brasil, 2012).

Matriz Biológica	LIQ %	CQB %	CQM %	CQA %
Sangue	8,1	5,0	3,7	3,2
Conteúdo Estomacal	5,9	5,5	8,5	0,64
Encéfalo	4,3	5,1	5,4	3,4
Coração	15,0	20,0	15,3	13,9
Fígado	10,2	3,9	8,6	1,5
Humor Vítreo	9,3	5,6	4,5	4,6
Pulmão	4,0	4,5	8,6	4,2
Rim	6,0	4,7	7,5	5,6

Fonte: Fukushima (2015)

5.5.1.3 Exatidão

A exatidão foi medida avaliando-se três concentrações dos analitos (baixa, média e alta), dentro da faixa de variação do método, em triplicata, intracorrida e intercorrida, sendo expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, conforme sugerido pela RDC N° 27 da ANVISA (Brasil, 2012). A Tabela 5.12 mostra os resultados obtidos nas diferentes matrizes biológicas. Assim, nota-se que todos os parâmetros das diferentes matrizes atende a Resolução que estabelece até 15% de variação para o LIQ e para as demais variáveis até 20%.

Tabela 5.12 – Exatidão avaliada pelo Limite Inferior de Quantificação (LIQ), Controle de Qualidade Baixo (CQB), Controle de Qualidade Médio (CQM) e Controle de Qualidade Alto (CQA) em cada matriz, em triplicata, intracorrida e intercorrida.

Matriz Biológica	LIQ	CQB	CQM	CQA
Sangue	6,97	2,16	11,34	3,20
Conteúdo Estomacal	1,82	5,77	10,58	8,72
Encéfalo	11,53	4,28	0,67	1,27
Coração	14,09	11,59	13,94	11,27
Fígado	12,13	17,36	9,89	3,31
Humor Vítreo	11,69	9,60	3,74	1,55
Pulmão	7,32	6,47	6,28	9,14
Rim	10,20	19,32	10,34	2,44

Fonte: Fukushima (2015)

5.5.1.4 Seletividade (efeito residual e de matriz)

A seletividade foi avaliada analisando-se matrizes oriundas de quatro espécies de animais diferentes obtidas *post-mortem*. Cada *pool* de amostras branco foi confirmado utilizando os mesmos procedimentos de extração e as mesmas condições cromatográficas anteriormente descritas. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos com a

solução alcoólica de padrão, em concentração próxima ao LIQ. Como parâmetro de aceitação foi adotado uma variação de 20 % inferior a resposta do padrão em comparação a resposta do padrão adicionado à matriz e 5% nas demais concentrações avaliadas, conforme estabelecido na RDC 27 de 2012 da ANVISA (Brasil, 2012). As figuras 5.22 a 5.23 mostram os cromatogramas das amostras branco, zero e dos padrões adicionados, bem como de uma amostra real. Assim, pode ser observado que foram atendidos os critérios de aceitação estabelecidos pela RDC 27 de 2012 da ANVISA (Brasil, 2012).

Figura 5.11 – Cromatogramas das amostras branco, zero (amostra branco adicionado do padrão interno) e adicionado dos padrões (aldicarbe-sulfóxido, aldicarbe-sulfona, aldicarbe, 3-hidrocarbofurano – 3-OH –, carbofurano, padrão interno e forato, respectivamente) obtidos em um *pool* de todas as matrizes avaliadas

Fonte: Fukushima (2015)

Figura 5.12 – Cromatogramas da amostra do branco adicionado do padrão interno e do padrão de aldicarbe obtidos em um *pool* de todas as matrizes avaliadas e a amostra real

Fonte: Fukushima (2015)

5.5.1.5 Recuperação

Essa figura de mérito, avalia a eficiência do procedimento de extração dentro de um limite de variação. No presente estudo, o ensaio consistiu na comparação dos resultados analíticos de amostras extraídas a partir de três concentrações (baixa, média e alta) dentro da faixa de linearidade do método, com os resultados obtidos com soluções padrão, sendo essas o 100% da recuperação. O cálculo da recuperação procedeu-se como recomendado pela RDC 27 de 2012 da ANVISA (Brasil, 2012), na qual se subtrai a relação de área do padrão extraído e não extraído, sendo o resultado expresso em porcentagem. A tabela 6.2 mostra a recuperação média (RM) em porcentagem obtida nas diferentes matrizes biológicas, indicando que a faixa de recuperação variou entre 30

(coração) e 70% (conteúdo estomacal). Esses dados sugerem que o conteúdo estomacal e o sangue são as matrizes mais adequadas para indicar a presenças do aldicarbe; as demais matrizes podem ser empregadas na ausência das primeiras.

Tabela 5.13 – Apresentação dos dados de recuperação média (RM) em % do aldicarbe e diferentes matrizes biológicas

Matriz Biológica	Recuperação média em %
Sangue	60
Conteúdo Estomacal	70
Encéfalo	46
Coração	30
Fígado	57
Humor Vítreo	32
Pulmão	31
Rim	48

Fonte: Fukushima (2015)

5.5.1.6 Limite inferior de quantificação (LIQ)

O LIQ adotado foi a menor concentração da curva de calibração. Os critérios de aceitação para LIQ foram expressos na forma do CV, como o recomendado pela Resolução RDC N° 27 (BRASIL, 2012). A tabela 6.2 mostra os CV (s) do LIQ, bem como as médias dos CV dos demais pontos da curva de calibração (CV médio) e do PI nas diferentes matrizes. Assim, nota-se que o CV do LIQ nas diferentes matrizes se mostra $\leq 15\%$, atendendo a Resolução. Além disso, o CV médio é inferior a 20%, atendendo a Resolução, e o CV médio do PI apresenta baixa variação (inferior a 5%).

Tabela 5.14 – Coeficiente de variação (CV) do Limite Inferior de Quantificação (LIQ), bem como CV médio (média dos CV dos demais pontos da curva de calibração) e do padrão interno (PI) nas diferentes matrizes, em porcentagem.

Matriz Biológica	CV do LIQ (%)	CV médio (%)	CV médio do PI (%)
Sangue	8,1	4,7	4,0
Conteúdo Estomacal	5,9	5,2	5,0
Encéfalo	4,3	4,7	4,0
Coração	15,0	10,2	4,0
Fígado	10,2	7,1	4,0
Humor Vítreo	9,3	5,0	5,0
Pulmão	4,0	4,5	4,0
Rim	6,0	5,9	5,0

Fonte: Fukushima (2015)

5.5.1.6 Limite Superior de Quantificação (LSQ)

O LIQ adotado foi a maior concentração da curva de calibração. Os critérios de aceitação para LIQ foram expressos na forma do CV, como o recomendado pela Resolução RDC N° 27 (BRASIL, 2012). A tabela 6.3 mostra os CV (s) do LIQ, bem como as médias dos CV dos demais pontos da curva de calibração (CV médio) e do PI nas diferentes matrizes. Assim, nota-se que o CV do LIQ nas diferentes matrizes se mostra $\leq$ 20%, atendendo a Resolução. Além disso, o CV médio é inferior a 20%, atendendo a Resolução, e o CV médio do PI apresenta baixa variação (inferior a 5%).

Tabela 5.15 – Coeficiente de variação (CV) do Limite Superior de Quantificação (LIQ), bem como CV médio (média dos CV dos demais pontos da curva de calibração) e do padrão interno (PI) nas diferentes matrizes, em porcentagem.

Matriz Biológica	CV do LSQ (%/0)	CV médio (%)	CV médio do PI (%)
Sangue	3,2	4,7	4,0
Conteúdo Estomacal	8,7	5,2	5,0
Encéfalo	1,2	4,7	4,0
Coração	11,2	10,2	4,0
Fígado	3,3	7,1	4,0
Humor Vítreo	1,5	5,0	5,0
Pulmão	9,1	4,5	4,0
Rim	2,4	5,9	5,0

Fonte: Fukushima (2015)

5.5.1.7 Homogeneidade (Fidelidade)

A fim de garantir a homogeneidade dos ensaios, foi adotado o procedimento de homogeneização física das matrizes, utilizando um homogeneizador de tecidos (mixer). Todos os tecidos analisados foram homogeneizados exaustivamente, para posteriormente serem submetidos os processos de extração.

5.5.1.8 Robustez

Os ensaios de robustez foram conduzidos variando-se a temperatura do forno da coluna em 1°C para mais ou para menos, bem como variou-se as marcas de solventes utilizadas, o executor da análise e a marca de coluna cromatográfica. Nenhum desses fatores avaliados foi capaz de prejudicar as análises. Outros fatores não foram avaliados.

5.6 ANÁLISE DE PRAGUICIDAS ANTICOLINESTERÁSICOS EM AMOSTRA REAL

A tabela 6.3 mostra a casuística de suspeita de intoxicação causa por praguicidas carbamatos em animais cujas amostras de tecidos e ração foram encaminhadas ao LADTOX no período de 2010 a junho de 2015. Assim, nota-se que o total de amostras analisadas no período variou de 12 a 48, sendo que dentre as amostras positivas a variação foi de 6 a 42.

Tabela 5.16 - Casuística de suspeita de intoxicação por praguicidas carbamatos (aldicarbe e carbofurano) em animais cujas amostras de tecidos e ração foram encaminhadas ao Laboratório de Diagnóstico Toxicológico (LADTOX), no período de 2010 a junho de 2015.

Amostras	Anos					
	2010	2011	2012	2013	2014	2015^a
Cães	12	11	11	18	07	07
Positivo	07	07	08	12	06	04
Negativo	04	11	03	06	01	03
Felinos	05	25	11	22	19	03
Positivo	05	22	06	16	14	02
Negativo	-	03	05	06	05	01
Ração		01	01		01	
Positivo		01	-		01	
Negativo		-	01		-	
Aves		08				
Positivo		08				
Negativo		-				
Bovinos	01		01		01	01
Positivo	-		-		01	-
Negativo	01		01		-	01
Outros		01 ^a	01 ^b			
Positivo		01	01			
Negativo		-	-			
Total	18	48	26	40	28	12
Positivo	12	42	14	28	23	06
Negativo	06	06	12	12	05	06

^aaté junho, ^bgambá, ^ccavalo

Fonte: Fukushima (2015)

No período de 2014 até junho de 2015 foi introduzido o método aqui descrito para avaliar os casos suspeito de intoxicação por praguicidas carbamato. A tabela 6.4 mostra

os resultados referentes a esse período, sendo que o material 1 ao 30 refere-se ao ano de 2014 e de 31 a 51 ao ano de 2015. Assim, nota-se que durante esse período foram recebidos 86 materiais no LADTOX, sendo 33 amostras foram positivas e 53 negativo para aldicarbe

Tabela 5.17 - Casuística de suspeita de intoxicação pelo praguicida aldicarbe em animais cujas amostras de tecidos e ração foram encaminhadas ao Laboratório de Diagnóstico Toxicológico (LADTOX), no período de 2014 a junho de 2015.

Material	Conteúdo estomacal	Fígado	Sangue	Ração	Espécie
1		+		+	Cão
2	-				Gato
3		+			Gato
4	-	-			Gato
5	-	-			Cão
6	+	+			Gato
7			+		Cão
8	+				Cão
9	-				Cão
10	+				Gato
11	-				Cão
12	+	+			Gato
13	+	+			Gato
15	+				Gato
16				+	Cão
17	-	-	-		Gato
18	+	+			Cão
19	-	-			Gato
20	+	+			Gato
21	-	-			Gato
22	+	+			Gato
23	+				Boi
24					Gato
25	+	-			Gato
26	+	-			Gato
27	+	-			Gato
28	+				Gato
29	+				Cão
30	+				Gambá
31	-	-			Cão
32	-	-			Cão
33	-	-			Gato
34	+	+			Cão
35	+	-			Cão
36	-	-			Cão
37	-	-			Cão

(Continuação)

38	-	-			Cão
39	-	-	-		Boi
40	-	+			Gato
41	-	-			Cão
42	-	-			Cão
43	-	-			Felino
44	-	-			Felino
45	+	-		+	Cão
46	-	-			Gato
47	-	-			Gato
48	-	-			Frango
49	-	-			Frango
50	-	-			Frango
51	-	-			Cão
Positivo	19	10	01	03	-
Negativo	25	26	02	0	-
Total	44	36	03	03	-

+ positivo para aldicarbe; - negativo para aldicarbe

(Conclusão)

Fonte: Fukushima (2015)

5.7 CONCLUSÕES

Foi desenvolvido e validado um método de extração e identificação de praguicidas anticolinesterásicos em matrizes biológicas, cujas figuras de mérito atendem a RDC 27 de 2012 da ANVISA (Brasil, 2012). O método permitiu a extração e identificação de aldicarbe e seus metabólitos (aldicarbe-sulfóxido e aldicarbe-sulfona), carbofurano e seu metabólito (3-OH carbofurano), forato e seu metabólito (forato-sulfóxido) e aldicarbe.

Esse método foi aplicado em amostras reais encaminhadas ao LADTOX e se mostrou eficiente para identificação de aldicarbe.

6 CONCLUSÕES FINAIS

No atual cenário em que as análises toxicológicas voltadas a medicina veterinária se encontram no Brasil, um laboratório que cumpra com as exigências voltadas a área judicial e que realize exames toxicológicos voltados a área veterinária que confirmem real validade pericial no diagnóstico laboratorial diferencial se faz necessário, uma vez que, existe uma demanda real desse tipo de análise. A proposta de adequação do laboratório, e a criação do material com essa finalidade foi realizada no capítulo I desse trabalho e a implementação será certamente trará benefícios a todos.

No que tange o capítulo II, referente as análises enzimáticas o método utilizando foi eficiente para avaliar a afinidade que o aldicarbe e seus metabolitos possuem pela enzima AChE. Pode ser observado que o aldicarbe e o aldicarbe sulfona apresentaram um elevado potencial de inibição enzimática em até 60 minutos, ainda foi observado que o aldicarbe-sulfóxido interferiu muito pouco na atividade da AChE, enquanto o aldicarbe-sulfona apresenta redução da atividade enzimática mais evidente a partir da concentração de 12,5 µg/mL mostrando o potencial de toxicidade tardia quando comparada ao aldicarbe.

Em relação ao perfil de dissolução dos grânulos do Temik 150[®] em meio ácido, apresentado no capítulo III, foi possível de detectar a presença *in vitro* dos metabólitos aldicarbe-sulfóxido e o aldicarbe-sulfona, diferentemente quando apenas o princípio ativo puro do aldicarbe passou pelo mesmo perfil de dissolução. Considerando que o metabólito aldicarbe-sulfóxido apresenta maior toxicidade que a molécula de origem, este achado deve ser considerado quando se avalia a toxicidade deste praguicida.

E por fim no capítulo IV apresenta o desenvolvimento e validação um método de extração e identificação de praguicidas anticolinesterásicos em matrizes biológicas. Todas as figuras de mérito recomendadas pela RDC 27 de 2012 da ANVISA (Brasil, 2012) foram atendidas, tornando a metodologia validada conforme essas recomendações. Os analitos que foram extraídos e identificados foram; o aldicarbe e seus metabólitos (aldicarbe-sulfóxido e aldicarbe-sulfona), carbofurano e seu metabólito (3-OH carbofurano), forato e seu metabólito (forato-sulfóxido) e aldicarbe. Esse método foi aplicado em amostras reais encaminhadas ao LADTOX e se apresentando eficácia na identificação do aldicarbe e seus metabolitos.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, C. G.; XAVIER, F. G.; FERRANTE, T.; SPINOSA, H. S. Intoxicações em cães e gatos: uma análise de casuística. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v.12, n.67, p. 42-46, 2007.

AMIDON, G. L.; LENNERNÄS, H.; SHAH V. P.; CRISON J. R. A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v.12, n.3, p.413-420, 1995.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. **Farmacotécnica: Formas farmacêuticas & Sistemas de Liberação de Fármacos**. Tradução de Terezinha Oppido; Edí Gonçalves de Oliveira e Ivone Castilho Benedetti. 6º. ed. São Paulo: Editorial Premier, 2000. 568 p.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Recomendações para realização de ensaios de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata (FFSOLI)**, 2015. p 5. Disponível em:
<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/recomenda/recomenda_dissolucao2.pdf>.
Acesso em: 12 maio 2015.

ASKAR, K. A.; KUDI, A. C.; MOODY, A. J. Comparative analysis of cholinesterase activities in food animals using modified Ellman and Michel assays. **The Canadian Journal of Veterinary Research, Plymouth**, v.75, n.4, 201, p.261-270, 2011.

Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas (GARP); **Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos** (apostila), 1999.

AUGUSTO, F.; ANDRADE, J. C.; CUSTÓDIO. **Faixa linear de uma curva de calibração**. Chemkeys, Campinas, p 1-8.

AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. Tradução de George G. Ortega, 2º. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, p 677.

BABIC, S.; HORVAT, A. J. M.; PAVLOVIC, D. M.; KASTELAN-MACAN, M. Determination of pKa values of active pharmaceutical ingredients. **Trends in Analytical Chemistry**, Zagreb, v. 26, n. 11, p. 1043-1061, 2007.

BALLARD, C.G.; GREIG, N.H.; GUILLOZET-BONGAARTS, A.L.; ENZ, A.; DARVESH, S. Cholinesterases: roles in the brain during health and disease. **Current Alzheimer research**, London, vol. 2, n. 3, p. 307-318, 2005.

BARON, R.L. A carbamate insecticide: a case study of aldicarb. **Environmental Health Perspectives**, v.102, n.11, p. 23-27, 1994.

BARROS-NETO, B.; PIMENTEL, M. F.; ARAÚJO, M. C. U. **Recomendações para calibração em química analítica - Parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada)**. Química Nova, v.25, n.5, p. 856-865, 2002.

Bayer CropScience, **Material safety data sheet, Temik® 150G Insecticide/Nematicide**, 2010. Disponível em:
<http://www.bayercropscience.com.au/resources/uploads/msds/file7388.pdf>. Acesso em: 12 maio 2015.

BERG, R. G.; MURTA, A. L. M.; KUGLER, W. O método das adições padrão aplicado à análise cromatográfica quantitativa de fenóis em águas residuais. **Química nova**, São Paulo, v. 11, p. 288-291, 1988.

BONACCORSO, N. S. **Aplicação do Exame de DNA na Elucidação de Crimes**. São Paulo: Faculdade de Direito da Universidade de São Paulo. 2005. 156 f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Direito Penal, Medicina Forense e Criminologia – FD/Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

BONACCORSO, N.; 2007. Disponível em: <[http://www.ibb.unesp.br/eventos/erbm/erbm10/documentos/\(1\)_UNESP_BOTUCATU_ATIVIDADE_1.pdf](http://www.ibb.unesp.br/eventos/erbm/erbm10/documentos/(1)_UNESP_BOTUCATU_ATIVIDADE_1.pdf)>. Último acesso em: 11 ago. 2009.

BONACCORSO, N.; PERIOLI, C. **Centro de Custódia**. 2001. Disponível em <<http://www.peritocriminal.net/artigos/custodia.htm>>. Acesso em: 12 de maio de 2009.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária. RDC Nº37, 3 DE AGOSTO DE 2011. Dispõe sobre o guia para isenção e substituição de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência e dá outras providências. Dispõe sobre a realização dos estudos de equivalência farmacêutica e de perfil de dissolução comparativo. **Diário Oficial da União**, Brasília, p. 36, seção I, 12 de agosto de 2010. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0031_11_08_2010.html>. Acesso em: 10 jun. 2013.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 27, de 22 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**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/564310004b60537e891f9baf8fded4db/RDC+27+12+-Valida%C3%A7%C3%A3o+de+M%C3%A9todos+Bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES>> Acesso em: 04 mar. 2015.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 31, de 11 de agosto de 2012. Brasil. **Dispõe sobre a realização dos estudos de equivalência**. RESOLUÇÃO RDC nº 31 de 11 de agosto de 2010. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/89d63480474597439fb9df3fbc4c6735/RDC_31_2010_Dispo%C3%B5e+sobre+a+realiza%C3%A7%C3%A3o+dos+Estudos+de+Equival%C3%Aancia+Farmac%C3%AAutica+e+de+Perfil+de+Dissolu%C3%A7%C3%A3o+Comparativo.pdf?MOD=AJPERES> Acesso em: 04 mar. 2015.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da diretoria colegiada (RDC) nº 15. **Dispõe sobre requisitos de boas práticas para o processamento de produtos para saúde e dá outras providências**, de 15 de março de 2012. Brasília, DF. Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/7599770043e684468b198f45f4f7d4e4/rd_c0015_15_03_2012.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 17 maio 2015.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia brasileira**. Brasília, p. 546. v. 2, 2010.

BRASIL. INMETRO. Portaria n. 191, de 10 de dezembro de 2003. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 10 dez 2003. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br/legislacao/rtac/pdf/RTAC000871.pdf>>. Acesso em: 17 maio 2015.

BRASIL.MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa MAPA nº 51, de 04 de novembro de 2011. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 17 maio 2015. Seção 1, 55 p.

BRASIL.MS. Ministério da Saúde. Resolução nº 899, 29 de maio 2003. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”; fica revogada a resolução nº 475, de 19 de março de 2002. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 29 maio 2003. Seção 1, 15 p.

BRASIL. Presidência da República, Casa Civil – Subchefia para assuntos jurídicos. LEI nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998. **Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências**. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/19605.htm. Acesso em: 12 maio 2015.

BRASIL. ANVISA. **Resolução RE nº 476 de 19 de março de 2002**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/genericos/legis/resolucoes/2002/476_02re.htm. Acesso em: 12 dez. 2008.

BRAYNER, A. R. A.; MEDEIROS, C. B. Incorporação do tempo em SGBD orientado a objetos. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE BANCO DE DADOS, 9, 1994, São Paulo. **Anais...** São Paulo: USP, 1994. p. 112-117

BRITISH Pharmacopoeia 2007. London: The Stationary Office, 2007. v.1, v. 2.

BURGESS, J.L. BERNSTEIN, J.N.; HURLBUT, K. Aldicarb poisoning. A case report with prolonged cholinesterase inhibition and improvement after pralidoxime therapy. **Archives of Internal Medicine**, v.154, n.24, p.221-224, 1994.

BUCKTON, G.D.P. Assessment of disorder in crystalline powders – a review of analytical techniques and their application. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 179, p. 141–158, 1999.

AULTON, M.E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**, ed. Artmed, v. 2, p. 151-161, 2005.

BUENO, M. M.; RECH, N. **Insumos Farmacêuticos - Aspectos Técnicos, Científicos e Regulatórios**. In: STORPITIS, S.; GONÇALVES, J. E.; CHIANN, C.; GAI, M. N. Biofarmacotécnica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p. 12-20.

BULCÃO, R. P; TONELLO, R.; PIVA, S. J.; SCHMITT, G. C.; EMANUELLI, T.; DALLEGRAVE, E.; GARCIA, S. C. Intoxicação em cães e gatos: diagnóstico toxicológico empregando cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta pressão com detecção ultravioleta em amostras estomacais. **Ciência Rural**, v.40, n.5, p. 1109-1113, 2010.

CAZENAVE, S. O. S.; ITHO, S.; LANARO, R.; CHASIN, A. A. M. Aldicarb: uma possibilidade de análise com finalidade forense. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 18, n. 2, p. 105-111, 2005.

CHASIN, A. A. M. Parâmetros de confiança analítica e irrefutabilidade do laudo pericial em toxicologia forense. **Revista Brasileira de Toxicologia**, São Paulo, v.14, n.1, p.15-21, 2001.

CHASIN, A. A. M., CHASIN, M., SALVATORI, M. Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. **Revista de Farmácia e Bioquímica**. Universidade de São Paulo, São Paulo, v.30, n.2, p.49-53, 1994.

CHASIN, A. A. M.; NASCIMENTO, E. S.; RIBEIRO-NETO, L. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B.; ANDRAUS, M. H., SALVADORI, M. C.; FERNÍCOLA, N. A. G., GORNI, R., SALCEDO, S. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. **Revista Brasileira de Toxicologia**, São Paulo, v.11, n.1, p.1–6, 1998.

CHOWDARY, K. P. R.; RAJYALAKSHMI, Y. Dissolution rate in modern pharmacy. **East Pharm**, New Delhi, v. 30, n. 350, p. 51-4, 1987.

COBB, G.P. et al. Nonlethal method for forensic evaluation of aldicarb exposure in wildlife. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.40, p.77-88, 2001.

COELHO, B. M. P.; KOGIKA, M. M.; SPINOSA, H. S. **Conduta de urgência nas intoxicações**. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNI, S. L.; PALERMO-NETO, J. Toxicologia aplicada à Medicina Veterinária, Barueri, Manole, p. 89-116, 2008.

CUADROS-RODRÍGUEZ, L.; GÁMIZ-GRACIA, L.; ALMANSA-LÓPEZ, E. M.; BOSQUE- SENDRA, J. M. Calibration in chemical measurement processes. II. A methodological approach. **Trends in Analytical Chemistry**, Almería, v. 20, n. 11, 2001.

CUADROS-RODRIGUEZ, L.; GARCÍA-CAMPAÑA, A. M.; ALMANSA-LÓPEZ, E.; EGEA-GONZÁLEZ, F. J. CANO, M. L. C.; FRENICHM A. G.; MARTÍNEZ-VIDAL, J. Correction function on biased results due to matrix effects: Application to the routine analysis of pesticide residues. **Analytica chimica acta**, Granada, v. 478, n. 2, p. 281-301, 2003.

CUSTODIO, R.; ANDRADE, J. C.; AUGUSTO, F. O. O ajuste de funções matemáticas a dados experimentais. **Química Nova**, Campinas, v. 20, p. 219-225, 1997.

DE LLASERA, G. M. P., BERNAL-GONZÁLEZ, M. Presence of carbamate pesticides in environmental waters from the northwest of Mexico: determination by liquid chromatography. **Water research**, México D.F., v. 35, n. 8, p. 1933-1940, 2001.

DIERAUF, A. L. **Pinniped forensic, necropsy and tissue collection guide**. U.S. Department and Atmospheric Administration National Marine Fisheries Service, Washington, D.C., 1994.

DIERAUF, L.; GULLAND, F. M. D. (Ed.). **CRC handbook of marine mammal medicine: health, disease, and rehabilitation**, Boca Raton, F.L., CRC press, 2001.

EGEA-GONZÁLEZ, F. J.; TORRES, M. E. H.; LÓPEZ, E. A.; CUADROS-RODRÍGUEZ, L.; VIDAL, J. L. M.; Matrix-effects of vegetable commodities in electron-capture detection applied to pesticide multiresidue analysis. **Journal of Chromatography A**, Almería, v. 966, n.1, p. 155-165, 2002.

ELLENHORN, M. J. **Pesticides. In: Ellenhorn's medical toxicology: diagnosis and treatment of human poisoning**. 2. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1997 cap. 68 p. 1614 - 1631

ELLMAN, G.L.; COURTNEY, D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical pharmacology**, San Francisco, v. 7, n. 2, 88-95, 1961.

Working Group. **Key challenges in internal quality control**. Berlin, Eurachem 2012. Disponible en: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf

EVANS, C. **The Casebook of Forensic Detection**, The Berkley Publishing Group, New York, U.S., 1996.

FERNÁNDEZ, J. M.; VÁZQUEZ, P. P.; VIDAL, J. L. M. Application of restricted-access media column in coupled-column RPLC with UV detection and electrospray mass spectrometry for determination of azole pesticides in urine. **Journal Chromatographia A**, Almería, v. 53, n. 9-10, p. 503-509, 2001.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Princípios físico-químicos em farmácia.**

Tradução de Zuleika Rothschild (org.). São Paulo: EDUSP - Editora da Universidade de São Paulo, 2003. p. 732

FUKUSHIMA, A. R.; AZEVEDO, F. A. História da Toxicologia. Parte I – breve panorama brasileiro. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, São Paulo, v.1, p. 2-32, 2008.

GALLO, M. A. *History and scope of toxicology*. In: C. D. KLAASSEN (Ed). Casarett and Doull's Toxicology: the basic science of poisons, Mc Graw Hill, United States, v.1, p. 2-10, 2001.

GENNARO, A. R. (Ed.). Remington **A Ciência e a Prática da Farmácia**. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 2208 p.

GRANBY, K.; ANDERSEN, J. H.; CHRISTENSEN, H. B. Analysis of pesticides in fruit, vegetables and cereals using methanolic extraction and detection by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytical Chemical Acta**, Prague, v. 520, n. 1, p. 165-176, 2004.

GREBE, S. K. G.; SINGH, R. J. LC-MS/MS in the clinical laboratory – where to from here? **The Clinical Biochemist Reviews**, Rochester, vol. 32, p. 5-31, 2011.

GREEN, J. Mark. Peer Reviewed: a practical guide to analytical method validation. **Analytical Chemistry**, Honolulu, v. 68, n. 9, p. 305A-309A, 1996.

GTFCh **Scientific committee quality control. Guideline for quality control in forensic-toxicological analyses**. Toxichem Krimtech 76 (3), 142-176. Disponível em: <https://www.gtfch.org/cms/images/stories/files/Guidelines%20for%20quality%20control%20in%20forensic-toxicological%20analyses%20%28GTFCh%2020090601%29.pdf>. Acesso em: 17 maio 2015.

HARPER, F.D.; WEISSKOPF, C.P.; COBB, G.P. Extraction of aldicarb and its metabolites from excreta and gastrointestinal tissue. **Analytical Chemical**, v.70, p.3329-3332, 1998.

Huber, L.; LC-GC, **International**. 1998, *11*, 96.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). **A nova norma para laboratórios de ensaios e calibração**. ISO 17025. Genebra first edition n. 5, p.12-15, 2001

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). **Acreditação de laboratórios**. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/acre_lab.asp. Acesso em: 17 maio 2015.

JÄRVINEN, P.P.; FALLARERO, A.; GUPTA, S.; MOHAN, G.C.; HATAKKA, A.I.; VUORELA, P.M.; Miniaturization and validation of the Ellman's reaction based acetylcholinesterase inhibitory assay into 384-well plate format and screening of a chemical library. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**. v.3, p.278-84, 2010.

KRULL, I.; SWARTZ, M. Validation viewpoint: quantitation in method validation. **LC-GC**, v.16, p.1084-90, 1998.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia em Fase Gasosa**, São Carlos: Acta, v. 1, 1993.

LEE, H.C.; LADD, C. Preservation and Collection of Biological Evidence. **Croatian Medical Journal**, Zagreb, v.42, n.3, p. 225-228, 2001.

LESSENGER, J.E.; REESE, B.E. Rational use of cholinesterase activity testing in pesticide poisoning. **The journal of the American board of family practice/American board of family practice**. v.12, 307-314, 1999.

LIŠKA, I.; BÍLIKOVÁ, K.; Stability of polar pesticides on disposable solid-phase extraction precolumns. **Journal of Chromatography A**, Bratislava, v. 795, n. 1, p. 61-69, 1998.

LOBO-JUNIOR, J. E. S. **Possível intoxicação pelo “chumbinho” (aldicarb) em cães e gatos atendidos em uma clínica veterinária da Grande São Paulo: ocorrência da síndrome intermediária.** São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2003. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas – FCF/USP.

LÓPEZ-BLANCO, M. C.; CANCHO-GRANDE, B.; SIMAL-GÁNDARA, J. Comparison of solid-phase extraction and solid-phase microextraction for carbofuran in water analyzed by high-performance liquid chromatography–photodiode-array detection. **Journal of Chromatography A**, Ourense, v. 963, n. 1, p. 117-123, 2002.

MAKIHATA, N.; KAWAMOTO, T.; TERANISHI, K. Simultaneous analysis of carbamate pesticides in tap and raw water by LC/ESI/MS. **Analytical sciences**, Kobe, v. 19, n. 4, p. 543-550, 2003.

MARQUES, M. R. C. **Dissolução de Medicamentos.** In: STORPITIS, S. Biofarmacotécnica. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. Cap. 7, p. 96-107.

MARQUES, C. V. C. O.; MARQUES P. R. B. O.; NUNES, G. S. Biossensor amperométrico para detecção *screening* de inseticidas carbamatos em águas de abastecimento. **Pesticidas r. ecotoxicologia e meio ambiente** v. 16, p.81-92, 2006

MOSER, V C. **Aldicarb. Encyclopedia of toxicology**, Elsevier Science, New York, vol. 1, p. 123-125, 2004.

MOLINA, D. **Agrotóxico utilizado como chumbinho é retirado do mercado brasileiro**, ANVISA, 2012 Acesso em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/menu+-+noticias+anos/2012+noticias/agrotoxico+utilizado+como+chumbinho+e+retirado+do+mercado+brasileiro> Acesso em: 12 maio 2015.

NETO, B. B.; PIMENTEL, M. F.; ARAÚJO, M.C.U.; Recomendações para calibração em química analítica - parte i. Fundamentos e Calibração com um componente (calibração univariada) **Química Nova**, Vol. 25, n. 5, p.856-865, 2002

NISTIR 7829. **The Biological Evidence Preservation Handbook**: best practices for evidence handlers. U.S. Department of Commerce Rebecca Blank, Acting Secretary, 2013.

NUNES, G.S.; RIBEIRO, M.L.; POLESE, L.; BARCELÓ, D.; Comparison of different clean-up procedures for the determination of n-methylcarbamate insecticides in vegetable matrices by high performance liquid chromatography with UV detection. **Journal Chromatography A**, v.795, p.43-51, 1998.

OGA, Seizi. **Fundamentos de toxicologia**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2003.

ORTELLI, D; EDDER, P.; CORVI, C. Multiresidue analysis of 74 pesticides in fruits and vegetables by liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, Geneva, v. 520, n. 1, p. 33-45, 2004.

OTSUKA, H.; PONCE, J. C.; ALVES-JÚNIOR L. B.; NISHIO, S. R.; KAWASHITA, S. Y. **Integração dos serviços de atendimento de locais de crime e análises laboratoriais forenses: Laboratório de Biologia e Bioquímica**. São Paulo: Academia de Polícia de São Paulo, 2009. Trabalho de Conclusão de Curso para obtenção do título de perito criminal - Academia de Polícia do Estado de São Paulo.

PICÓ, Y. **Análise química de alimentos – técnicas** 1 ed. Campus- Grupo Elsevier, Paraná, p. 368, 2014.

PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M.B. and ZANELLA, R.; QuEChERS: um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova** [online]. 2009, vol.32, n.6, pp. 1620-1634. ISSN 1678-7064. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000600046>.

RODRÍGUEZ, L.; CUADROS CAMPAÑA, A.M.; GARCÍA ALMANSA-LÓPEZ, E. EGEA--GONZÁLES, FJ; CANO, MLC; FRENICH, AG; MARÍNEZ-VIDAL, JL. Correction function on biased results due to matrix effects: Application to the routine analysis of pesticide residues. **Analytica Chemical Acta**, Almería, v. 478, p. 281, 2003.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. (Eds.). **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6º. ed. Londres: Pharmaceutical Press, 2009.

SÃO PAULO (Estado). Resolução SSP 194 de 2 de junho de 1994. Estabelece normas para coleta e exame de materiais biológicos para identificação humana. **Diário Oficial do Estado**, São Paulo, 2 jun. 1999. Poder Exec., Seção I, p. 3.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of chromatography A*, Abingdon, v. 987, n. 1, p. 57-66, 2003.

SHAH, V. P. Dissolution: A Quality Control Test vs. A Bioequivalence Test. *Dissolution Technologies*, **Hockessin**, v. 8, n. 1, p. 1-2, Novembro 2001. Disponível em: http://www.dissolutiontech.com/DTresour/1101Art/DTNov01_art_1.pdf. Acesso em 13 maio 2015.

SINKO, G.; CÁLIC, M.; BOSAK, A.; ZRINKA, KOVARIK. Limitations of the *Ellman* method: cholinesterase activity measurement in the presence of oximes. **Analytical biochemistry**. Zagreb, v. 370, p. 223-227, 2007.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L.; **Practical HPLC Method Development**, 2. ed.; Wiley, New York, 1997, cap. 15.

SOFT / AAFS. **Forensic Laboratory Guidelines**: forensic toxicology laboratory guidelines. New York, 2006. Disponível em: http://www.soft-tox.org/files/Guidelines_2006_Final.pdf. Acesso em: 15 maio 2015.

SOFT/AAFS. **Forensic toxicology laboratory guidelines Committee Report. Society of Forensic Toxicologists and Toxicology Section of the American Academy of Forensic Science**, 2006. Disponível em: http://www.soft-tox.org/files/Guidelines_2006_Final.pdf. Acesso em: 13 maio 2015.

SPINOSA, H.S.; GORNIAC S. L.; PALERMO-NETO, J. **Toxicologia Aplicada à Medicina Veterinária**. Manole: Barueri, 2008, p. 960.

STORPITIS, S.; GONÇALVES, J. E.; CHIANN, C. GAI, M.N. **Biofarmacotécnicas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p. 321.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**. v. 2, n. 3, p. 12-20, 1998.

THE United States Pharmacopoeia: USP36-NF31. Rockville: The United States Pharmacopoeia Convention, 2013.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

TOMLINSON, J. J.; ELLIOTT-SMITH, W.; RADOSTA, T. Laboratory Information Management System Chain of Custody: Reliability and Security. **Journal of Automated methods and Management in Chemistry**, v. 2006, p. 1-4, 2006.

TRACQUI, A.; FLESCHE, F.; SAUDER, P.; RAUL, J. S.; GÉRAUT, A.; LUDES, B.; JAEGER, A. Repeated measurements organofosforados Aldicarb in blood and urine in a case organofosforados nonfatal poisoning. **Human & experimental toxicology**, v. 20, p.657-660, 2001.

UNITED STATES. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Center of Drug Evaluation and Research (CDER). **Guidance for industry: extended release oral dosage forms: development, evaluation, and application of in vitro in vivo correlations**, 1997. Disponível em: www.fda.gov.

gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070239.pdf. Acesso em: 12 maio 2015.

UNODC (United Nations Office on Drugs and Crime). **Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens, A commitment to quality and continuous improvement.** New York: United Nations, 2009. Disponível em: http://www.unodc.org/documents/scientific/validation_E.pdf. Acesso em: 13 maio 2015.

UNODC. **World Drug Report.** New York, 2009. Disponível em: http://www.unodc.org/documents/wdr/WDR_2009/WDR2009_eng_web.pdf. Acesso em: 17 maio 2015.

UNODC. **World Drug Report.** New York, 2011. Disponível em: http://www.unodc.org/documents/data-and-analysis/WDR2011/World_Drug_Report_2011_ebook.pdf. Acesso em: 17 maio 2015.

VIPPAGUNTA, S. R.; BRITTAIN, H. G.; GRANT, D. J. W. Crystalline solids. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Minneapolis, v. 48, n. 1, p. 3-26, 2001.

WAGGONER, K.. **Handbook of Forensic Services. Quantico, Virginia:** FBI Laboratory Publication, Federal Bureau of Investigation, 2007.

WARD, Stephen A.; MAY, Gail; BRANCH, R. A. Quantitative determination of carbaryl and carbaryl metabolites by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Nashville, v. 388, p. 462-466, 1987.

WEINER, L.; SHNYROV, V. L.; KONSTANTINOVSKII, L.; ROTH, ESTHER; ASHANI, Y.; SILMAN, I. Stabilization of *Torpedo californica* acetylcholinesterase by reversible inhibitors. **Biochemistry**, Rehovot, vol. 48, n. 3, 563-573, 2009.

XAVIER, F.G.; SPINOSA, H.S. **Toxicologia dos praguicidas anticolinesterásicos**. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; PALERMO-NETO, J. Toxicologia aplicada à Medicina Veterinária. Barueri, Manole, p. 291-311, 2008 d.

XAVIER, F. G.; RIGHI, D. A.; SPINOSA, H.S. Toxicologia do praguicida aldicarb (“chumbinho”): aspectos gerais, clínicos e terapêuticos em cães e gatos. **Ciência Rural** v.37, n.4, 1206-1211 p., 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782007000400051>. Acesso em: 17 maio 2015.

XAVIER, F. G.; RIGHI, D. A.; FLÓRIO, J.C.; SPINOSA, H. S. Cromatografia em camada delgada para o diagnóstico da intoxicação por aldicarb (“chumbinho”) em cães e gatos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.5, p.1231-1235, 2007c

XAVIER, F.G.; KOGIKA, M.M.; SPINOSA, H.S. Common causes of poisoning in dogs and cats in a Brazilian Veterinary Teaching Hospital from 1998 to 2000. **Veterinary and Human Toxicology**, v.44, n.1, 115-116 p., 2002.

XAVIER, F.G.; RIGHI, D.A.; SPINOSA, H.S. Toxicologia do praguicida aldicarb (“chumbinho”): aspectos gerais, clínicos e terapêuticos em cães e gatos. **Ciência Rural**, v.37, n.4, p. 1206-1211, 2007a.

XAVIER, F.G.; RIGHI, D.A.; SPINOSA, H.S. Fatal poisoning in dogs and cats – a 6-year report in a Veterinary Pathology Service. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.44, n.4, p. 304-309, 2007b.