UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises
Toxicológicas

**Redistribuição *postmortem* de barbitúricos em
tecidos biológicos humanos**

Rafael Menck de Almeida

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Mauricio Yonamine

São Paulo
2012

Rafael Menck de Almeida

Redistribuição *postmortem* de barbitúricos em tecidos biológicos humanos

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Mauricio Yonamine
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

A447d Almeida, Rafael Menck de
Redistribuição *postmortem* de barbitúricos em tecidos biológicos humanos
/ Rafael Menck de Almeida. – São Paulo, 2012.
143p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade
de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Yonamine, Mauricio

1. Toxicologia 2. Toxicologia forense 3. Medicina legal I. T.
II. Yonamine, Mauricio, orientador.

615.9 CDD

APOIO FINANCEIRO

CAPES – COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR.

CNPq – CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO.

FAPESP – FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO.

PRP-USP - PRÓ-REITORIA DE PESQUISA – UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS NO PROJETO

LAT/FCF/USP – Laboratório de Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Prof. Dr. Mauricio Yonamine

Msc. Rafael Menck de Almeida

Dra. Carolina Rodrigues Dizioli de Oliveira

Saskia Carolina Seulin

Diógenes Saulo Lima

FMUSP - Departamento de Medicina Legal, Ética Médica e Medicina Social e do Trabalho da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Profa. Dra. Vilma Leyton

Ligia Goes Endo

SVO/USP - Serviço de Verificação de Óbitos da Capital – Universidade de São Paulo.

Prof. Dr. Carlos Augusto G. Pasqualucci

Centre for Forensic Sciences of Bournemouth University – United of Kingdom

Prof. Dr. M David Osselton

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo que Ele tem feito em minha vida, pelas oportunidades, pela saúde, pelos momentos difíceis e alegres.

Aos meus pais, **Rita e Xexéu**, por terem batalhado muito trabalhando dia e noite para que eu e meus irmãos pudéssemos estudar. Vocês são responsáveis pelo que tem acontecido em minha vida. Muito Obrigado!!

A minha companheira de todas as horas, **Yarinha**, por ter estado sempre ao meu lado por esses 10 anos e ser a maior incentivadora para a realização dessa etapa.

Aos meus irmãos Dido e Rogéria pelo carinho.

Ao Donizetti, Jane, Mayra e Zenaide pelo carinho, incentivo e paciência.

Agradeço também ao **Prof. Dr. Mauricio Yonamine**. Não sei como expressar a gratidão que tenho por você. Lembro-me quando o caipira aqui veio para São Paulo para fazer mestrado, eu estava bastante perdido e atordoado com essa cidade grande. Lembro quando comecei no laboratório, eu nunca tinha visto um GC-MS na minha vida e mesmo assim você me aceitou como aluno, se dispôs a me orientar e me ensinar a trabalhar com esses

equipamentos. Sou muito grato pela oportunidade e pela nossa amizade.

Agradeço a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas pela oportunidade de realizar esse projeto.

As amigas **Carolina Dizioli e Cínthia Mantovani** pela amizade e parceria no laboratório.

Ao amigo **Tiago O. Franco**, pela edição de todas as figuras, pela amizade e parceria nos treinos de jiu-jitsu.

À **Profa. Dra. Vilma Leyton** pela amizade e conselhos.

Às meninas do Instituto Oscar Freire da Faculdade de Medicina, **Ligia Endo, Juliana Takitane, Saskia Seulin e Daniele Mayumi** pela colaboração, amizade, viagens e também pelos momentos de diversão.

Aos colegas **Daniel, Vânia Rodrigues, Fabiana, Eric Barioni, José e Isabel, Livia Dati, Livia Sanches, Carine, Ana Lúcia, Lorena Pantaleão, Marcelo Filonzi, Mariah Ultramari, Natália Figueiredo, Raphael Caio, Sarah Carobini, Thaísa Sandini, Simone, Wallace, Luma e Ângelo**. Agradecimento em especial a **Dona Luzia e Dona Dalva**, sem elas o prédio não funcionaria.

Aos membros da Banca de qualificação, **Prof. Dra. Tânia Marcourakis**, **Prof. Dr. Bruno Spinosa** e a **Prof. Dra. Vilma Leyton** pelas valiosas contribuições em meu trabalho.

Aos meus colegas da República Solar dos Príncipes, por terem me acolhido quando cheguei a São Paulo e pelos laços de amizade que perduram por sete anos.

Muito obrigado a todos que de alguma forma ajudaram ou participaram no desenvolvimento deste trabalho.

*Dedico esse trabalho a **Yarinha** minha esposa e companheira, pois foi a maior incentivadora para que eu retornasse a academia para cursar o Doutorado.*

*.....hoje me sinto mais forte, mais feliz quem
sabe. Só levo a certeza de que muito pouco
eu sei, ou nada sei.....cada um de nós
compõe a sua própria história
cada ser em si carrega o dom de ser capaz
e ser feliz.....*

Almir Sater e Renato Teixeira

Os resultados desse trabalho foram publicados no
Journal Separations Science (2012) e no *Journal Forensic
Toxicology* (2012) (ambos em anexo)

RESUMO

MENCK, R. A. **Redistribuição *postmortem* de barbitúricos em tecidos biológicos humanos**. 2012. Tese de Doutorado – Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2012.

Os barbitúricos são fármacos com atividade depressora do sistema nervoso central e estão relacionados com elevados números de casos de intoxicações e uso não-médico em vários países. No Brasil, a droga antiepiléptica mais encontrada em casos de intoxicação é o fenobarbital, pois os pacientes relatam que “essa é uma substância com ação forte no cérebro”. De fato, os barbitúricos estão altamente relacionados com tentativa de suicídio e homicídio. Nesses casos existe a necessidade da quantificação dessas substâncias para correlacionar com a causa *mortis*. No entanto, as análises toxicológicas *postmortem* são de difícil execução e interpretação, pois a concentração de agentes tóxicos encontrados é bastante complexa e afetada não só pela condição de deterioração do corpo, mas também por um processo conhecido como redistribuição *postmortem*. Em geral, concentrações mais elevadas são encontradas no sangue situado nos sítios centrais (como o sangue coletado da cavidade cardíaca) em comparação aos níveis verificados nos vasos periféricos (como a veia femoral). Em outros casos, o tempo entre a morte e o exame *postmortem* é suficiente para que algumas substâncias que normalmente estariam presentes no sangue não estejam mais disponíveis neste fluido biológico. Há ainda um agravante, pois não existem valores de referências para a maioria das amostras biológicas não-convencionais, dificultando assim a interpretação dos resultados. Os exames toxicológicos devem ser realizados em amostras biológicas e tem como objetivo a avaliação da intoxicação como circunstância qualificadora do delito, como causa de periculosidade ou imputabilidade. O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento e aplicação de métodos de identificação de barbitúricos (butalbital, secobarbital, pentobarbital e fenobarbital) em amostras *postmortem* (sangue cardíaco, sangue femoral e fígado). Os analitos foram extraídos das amostras utilizando a micro extração em fase líquida (LPME), identificados e quantificados por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). Após o desenvolvimento e validação, os métodos analíticos foram aplicados em amostras *postmortem* de onze cadáveres necropsiados pelo Serviço de Verificação de Óbito da Cidade de São Paulo (SVO (SVO-USP), com suspeita de envolvimento de barbitúricos. Nove casos apresentaram resultado positivo para fenobarbital. A média da razão sangue femoral/sangue cardíaco foi de 0,91 com o desvio padrão de 0,23. Para a correlação fígado/sangue femoral a média foi de 1,17 com desvio padrão de 1,29. Os barbitúricos foram escolhidos como modelo de estudo devido à grande incidência de casos de intoxicação aguda com estes fármacos no Brasil.

Palavras chave: Barbitúricos, toxicologia forense, redistribuição *postmortem*, LPME

ABSTRACT

MENCK, R. A. **Postmortem redistribution of barbiturates in human biological tissues**. 2012. Tese de Doutorado – Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2012.

Barbiturates are a class of drugs that act as central nervous system depressant and are associated with high numbers of poisoning cases and non-medical use in several countries. In Brazil, phenobarbital is the most related antiepileptic drug involved in intoxication cases. Patients report that "this drug is a substance with strong action in the brain." In fact, barbiturates are highly related to attempted suicide and homicide cases, in which quantification of these substances to correlate with the possible cause of death is necessary. However, postmortem toxicological analyses are difficult to perform and interpret, because the concentration of toxic agents found is quite complex and affected not only by deterioration condition of the body but also by a process known as postmortem redistribution. In general, higher concentrations are found in the blood located in central sites (e.g. heart cavity) compared with the levels found in peripheral vessels (such as the femoral vein). In other cases, the time between death and postmortem examination is enough for some substances that would normally be present in the blood are no longer available in this biological fluid. Besides, there are few reference values for most non-conventional biological samples, making it difficult to interpret the results. The objective of this work was the development and application of methods for identification of barbiturates (butalbital, secobarbital, pentobarbital and phenobarbital) in postmortem samples (heart blood, femoral blood and liver). The analytes were extracted by using liquid-phase micro extraction (LPME) and quantified by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). After the development and validation, analytical methods were applied in real cases of eleven corpses autopsied by Death Verification Service of São Paulo City (USP-SVO), with suspected of barbiturates involvement. Nine cases were positive for phenobarbital. The mean ratio of blood femoral / cardiac blood was 0.91 with a standard deviation of 0.23. For the correlation liver / femoral blood the average was 1.17 with a standard deviation of 1.29. Barbiturates were chosen as model for this study because the high incidence of cases of acute poisoning with these drugs in Brazil.

Keywords: Barbiturates, forensic toxicology, postmortem redistribution, LPME

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1. Estrutura química, (A) fenobarbital, (B) butalbital, (C) pentobarbital e (D) secobarbital.</i>	<i>7</i>
<i>Figura 2. Locais de coleta de sangue para análises toxicológicas postmortem. Adaptado de (BRITANNICA, 2012).</i>	<i>26</i>
<i>Figura 3. Representação da microextração em fase líquida e suas modalidades. (A) Gota única suspensa. (B) Configuração em “U”. (C) Configuração em haste. Adaptado de Oliveira et al. (2008).</i>	<i>34</i>
<i>Figura 4. Imagem de seção transversal de fibra oca LPME. Autorizada por Pedersen-Bjergaard, S. 1999.</i>	<i>35</i>
<i>Figura 5. LPME no sistema bifásico.</i>	<i>37</i>
<i>Figura 6. LPME no sistema trifásico.</i>	<i>37</i>
<i>Figura 7. Reação de derivatização do ácido barbitúrico com Hidróxido de Trimetilanelina</i>	<i>56</i>
<i>Figura 8. Cromatograma (GC-MS) obtido através da análise de uma amostra sangue total adicionada de butalbital (A), pentobarbital (B), secobarbital (C) e fenobarbital (D). Os íons usados para a geração do cromatograma foram: 196+201+184+232.</i>	<i>57</i>
<i>Figura 9. Espectros de massa (GC-MS) obtidos dos padrões metilados de butalbital (A), pentobarbital (B), secobarbital (C) e fenobarbital (D).</i>	<i>58</i>
<i>Figura 10. Avaliação da concentração de NaOH na fase aceptora para a microextração em fase líquida.</i>	<i>59</i>
<i>Figura 11. Avaliação do decanol, éter diexílico e octanol na extração do fenobarbital por LPME.</i>	<i>60</i>
<i>Figura 12. Avaliação do pH da fase doadora.</i>	<i>60</i>
<i>Figura 13. Avaliação do tempo de agitação na extração do fenobarbital por LPME.</i>	<i>61</i>
<i>Figura 14. Análise superfície de resposta que demonstra a concentração de NaOH em mol/L da fase aceptora e a concentração de HCl em mol/L da fase doadora.</i>	<i>62</i>
<i>Figura 15. Análise superfície de resposta que demonstra o tempo de agitação da amostra à concentração de NaOH em mol/L.</i>	<i>62</i>
<i>Figura 16. Estudo da linearidade do butalbital em sangue total (faixa 1-10 µg/mL).</i>	<i>64</i>
<i>Figura 17. Estudo da linearidade do secobarbital em sangue total (faixa 1-10 µg/mL).</i>	<i>64</i>
<i>Figura 18. Estudo da linearidade do pentobarbital em sangue total (faixa 1-10 µg/mL).</i>	<i>65</i>
<i>Figura 19. Estudo da linearidade do fenobarbital em sangue total (faixa 1-10 µg/mL).</i>	<i>65</i>

Figura 20. (A) cromatograma obtido de amostra de sangue adicionada com: butalbital-d5 (1), butalbital (2), pentobarbital (3), secobarbital-d5 (4), secobarbital (5) e fenobarbital (6) na concentração de 1,0 µg/mL. (B) Amostra branco adicionado os PI. (C) sangue cardíaco do caso 1 contendo 5,9 µg/mL de fenobarbital. Os íons usados para a geração do cromatograma foram: 196+201+184+232. Picos sobrepostos são íons comuns em alguns analitos.	70
Figura 21. Análise comparativa da recuperação dos barbitúricos com diferentes óleos.....	72
Figura 22. Cromatogramas comparando os diferentes óleos testados para LPME.	73
Figura 23. Cromatograma obtido com a extração de amostra de sangue utilizando óleo essencial de eucalipto. (A) TIC (B) íons extraídos. Os padrões adicionados foram: butalbital (1 – m/z=196), pentobarbital (2 - m/z=184), secobarbital (3 - m/z=196) e fenobarbital (4 - m/z=232).	74
Figura 24. Estudo da digestão enzimática de fígado humano para aumentar a eficiência da recuperação de fenobarbital.....	75
Figura 25. Estudo da linearidade do butalbital em amostra de fígado (faixa 1-10µg/g).	76
Figura 26. Estudo da linearidade do secobarbital em amostra de fígado (faixa 1-10µg/g).	76
Figura 27. Estudo da linearidade do pentobarbital em amostra de fígado (faixa 1-10µg/g).....	77
Figura 28. Estudo da linearidade do butalbital em amostra de fígado (faixa 1-10µg/g).	77
Figura 29. (A) cromatograma obtido de amostra de fígado adicionada com: butalbital (1), pentobarbital (2), secobarbital (3), fenobarbital-d5 (4) e fenobarbital (5) na concentração de 5 µg/g. (B) Amostra branco adicionado o PI. (C) Fígado humano do caso 3 contendo 9,3 µg/g de fenobarbital. Os íons usados para a geração do cromatograma foram: 196+184+237+232. Picos sobrepostos são íons comuns em alguns analitos.....	80
Figura 30. Configuração em “U” da LPME, utilizando seringas, agitador magnético e barras de agitação.	85
Figura 31. Emprego da micropipeta e ponteira de eletroforese para inserir a fase aceptora no lúmen da fibra.....	86
Figura 32. Configuração em “U” para LPME.....	87
Figura 33. Fragmentação do N,N-dimetilfenobarbital (A) e do N,N-dimetilfenobarbital d5 (B).	90
Figura 34. Fenobarbital-d5 com os átomos de deutério no anel fenólico.	94
Figura 35. Espectro de massas do N,N-dimetilfenobarbital (A) e do N,N-dimetilfenobarbital d5 (B). ..	95
Figura 36. Fluxograma para atestado de óbito adaptado de (WONG, 2011).....	100

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1. Barbitúricos mais utilizados e suas concentrações sanguíneas terapêuticas e tóxicas (MEIER e THORMANN, 1991; ALBERTSON, 2004; MCNAMARA, 2011; MOFFAT, OSSELTON et al., 2011).</i>	<i>16</i>
<i>Tabela 2. Lista recomendada de espécimes para serem coletadas para exames toxicológicos postmortem (DRUID, 2006; SOCIETY OF FORENSIC TOXICOLOGY, 2006)</i>	<i>27</i>
<i>Tabela 3. Valores de precisão intra e interensaios e exatidão obtidos com a aplicação do método proposto em amostras de sangue.....</i>	<i>66</i>
<i>Tabela 4 – Resultados do estudo de exatidão realizado em três dias consecutivos.</i>	<i>67</i>
<i>Tabela 5. Valores de recuperação obtidos com a aplicação do método proposto em amostras sangue postmortem.....</i>	<i>67</i>
<i>Tabela 6. Resultados do estudo da robustez do método analítico proposto.</i>	<i>68</i>
<i>Tabela 7. Resultados do estudo da estabilidade do método analítico proposto.</i>	<i>69</i>
<i>Tabela 8. Concentração de fenobarbital (µg/mL) encontrada em amostras reais de sangue cardíaco e femoral.....</i>	<i>71</i>
<i>Tabela 9. Valores de precisão intra e interensaio obtidos com a aplicação do método proposto em amostras de fígado.....</i>	<i>78</i>
<i>Tabela 10. Estudo de exatidão realizada em três dias consecutivos em amostras de fígado</i>	<i>78</i>
<i>Tabela 11. Valores de recuperação obtidos com a aplicação do método proposto em amostras de fígado.....</i>	<i>79</i>
<i>Tabela 12. Concentração de fenobarbital em amostras de fígado humano.</i>	<i>81</i>
<i>Tabela 13. Concentração de fenobarbital em amostras de sangue cardíaco, sangue femoral e fígado humano e suas razões.</i>	<i>82</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
2. GENERALIDADES	15
2.1. Barbitúricos	15
2.2. Redistribuição <i>postmortem</i>	20
2.3. Técnicas de preparação de amostras <i>postmortem</i> em análises toxicológicas	29
2.3.1. <i>Microextração em fase líquida</i>	32
3. OBJETIVO E PLANO DE TRABALHO	40
4. MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1. Material.....	42
4.1.1. Reagentes e fibra oca	42
4.1.2. Soluções-padrão	42
4.1.3. Equipamentos e acessórios	42
4.1.4. Amostras	43
4.1.4.1. Amostras biológicas para o desenvolvimento dos métodos	43
4.1.4.2. Amostras biológicas humanas provenientes do SVO-USP	43
4.2. Métodos.....	44
4.2.1. Condições cromatográficas utilizadas no GC-MS	44
4.2.2. Determinação de barbitúricos em sangue total	45
4.2.2.1. Análise quantitativa por GC-MS	45
4.2.2.2. Preparação das amostras de sangue total	45
4.2.2.3. Otimização do método de extração	46
4.2.2.4. Avaliação da solução aceptora.....	46
4.2.2.5. Avaliação do solvente orgânico.....	46

4.2.2.6. Avaliação da solução doadora	46
4.2.2.7. Avaliação do tempo de agitação das amostras	47
4.2.2.8. Planejamento fatorial (Análise de superfície de resposta).....	47
4.2.2.9. Validação do método.....	47
4.2.2.9.1. Limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ).....	48
4.2.2.9.2. Linearidade.....	48
4.2.2.9.3. Precisão e exatidão	48
4.2.2.9.4. Recuperação	49
4.2.2.9.5. Validação da diluição das amostras	49
4.2.2.9.6. Estudo de robustez.....	50
4.2.2.9.7. Estudo da estabilidade	50
4.2.3. Aplicação do método em amostra de sangue total postmortem	50
4.2.4. Determinação de barbitúricos em fígado humano	51
4.2.4.1. Análise quantitativa por GC-MS	51
4.2.4.2. Preparação das amostras de fígado humano.....	51
4.2.4.3. Otimização do método de extração	52
4.2.4.5. Estudo de hidrólise enzimática para determinação de fenobarbital em amostras de fígado humano.....	52
4.2.4.6. Validação do método.....	53
4.2.5. Aplicação do método em amostra de fígado humano	53
5. RESULTADOS.....	56
5.1. Determinação de barbitúricos em sangue total por GC-MS e LPME	56
5.1.2. Cromatograma característico e espectros de massa butalbital, secobarbital, pentobarbital e fenobarbital.....	57
5.1.3. Otimização do método de extração	58

5.1.3.1. Avaliação da concentração de NaOH empregada na fase acceptora em agitador orbital.....	59
5.1.3.2. Avaliação do solvente orgânico.....	59
5.1.3.3. Avaliação da solução doadora	60
5.1.3.4. Avaliação do tempo de agitação das amostras	61
5.1.3.5. Análise superfície de resposta.....	61
5.1.4. Validação do método.....	63
5.1.4.1. Limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ).....	63
5.1.4.2. Linearidade.....	63
5.1.4.3. Precisão e exatidão	66
5.1.4.4. Recuperação	67
5.1.4.5. Validação da diluição das amostras	68
5.1.4.6. Robustez	68
5.1.4.7. Estudo da estabilidade	68
5.1.5. Aplicação do método em amostra de sangue total postmortem.....	69
5.2. Determinação de barbitúricos em amostras de fígado utilizando LPME e GC-MS.....	71
5.2.1. Avaliação do melhor óleo para ser utilizado na extração	72
5.2.2. Estudo da digestão enzimática para determinação de fenobarbital em amostras de fígado humano.....	74
5.2.3. Validação do método.....	75
5.2.3.2. Linearidade.....	76
5.2.3.3. Precisão e exatidão	77
5.2.3.4. Recuperação	79
5.2.3.5. Validação da diluição das amostras	79

5.2.4. Aplicação do método em amostra de fígado humano	79
5.3. Análise comparativa dos resultados de fenobarbital em amostras de sangue total e fígado humano.....	81
6. DISCUSSÃO	84
6.1. Desenvolvimento de técnica de LPME para determinação de barbitúricos em sangue total por CG-MS.....	84
6.2. Validação do método de LPME para determinação de barbitúricos em sangue total por CG-MS	89
6.3. Validação do método de LPME para determinação de barbitúricos em fígado <i>postmortem</i> por CG-MS	93
6.4. Interpretação dos resultados <i>postmortem</i> encontrados com a aplicação dos métodos desenvolvidos	97
7. CONCLUSÕES	105
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
Anexos	117

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A Toxicologia Forense é a área da toxicologia relacionada diretamente com os processos judiciais, pois a palavra *forensis*, originalmente do latim, significa “relativo aos tribunais”. A toxicologia forense, a aplicação de técnicas analíticas para a detecção de compostos tóxicos e as autópsias, tiveram seu início com o austríaco Joseph Jacob Plenck, que em seu texto *Elementa Medicinae et Chirurgiae Forensis*, expõe que a única prova de intoxicação se dá através da identificação do agente tóxico em órgãos do indivíduo exposto. Este é o princípio básico de toxicologia forense, porém só foi aceito após o trabalho de Mathieu Joseph Bonaventura Orfila (1787-1853). O espanhol Orfila, considerado pai da Toxicologia Forense, estudou medicina em Paris e era professor particular de química. Com apenas 26 anos ele publicou o famoso livro: *Tratado de Toxicologia*, uma combinação de toxicologia forense, toxicologia clínica e química analítica. Seus estudos foram precursores da moderna toxicocinética e toxicodinâmica (ECKERT, 1996; LANGMAN e KAPUR, 2006; LANE e BORZELLECA, 2008; HAYES e GILBERT, 2009).

Atualmente, a Toxicologia Forense abrange as perícias no indivíduo vivo e morto, até mesmo em circunstâncias próprias de saúde pública, como falsificação ou adulteração de medicamentos e acidentes com substâncias químicas em massa. Os exames realizados em amostras biológicas têm como objetivo a avaliação da intoxicação como circunstância qualificadora do delito, como causa de periculosidade ou imputabilidade. Em casos de suspeita de morte por intoxicação, esta será enquadrada no âmbito das mortes violentas. Para este tipo de morte existe a obrigatoriedade legal de proceder a necrópsia, seguida da retirada de material biológico para a perícia químico-toxicológica, de acordo com o Código Processo

Penal (Decreto Lei n. 3.639/1941 e o Código Penal (Decreto Lei n. 2.848/1940) (PASSAGLI, 2009).

Em Toxicologia Forense, a gravidade ou letalidade de uma intoxicação é geralmente avaliada através da determinação da concentração sanguínea do agente tóxico envolvido, para a qual existem valores de referência, classificados como “terapêutico”, “tóxico” ou “letal”. Entretanto, em amostras coletadas *postmortem*, essa avaliação nem sempre pode ser feita por simples comparação. A principal razão para isso é que as concentrações obtidas nessas amostras não necessariamente refletem a concentração sanguínea no tempo da morte, devido a uma série de alterações que podem ocorrer, principalmente em virtude do local de amostragem e tempo da coleta. Esta variação dependente do local e do tempo é chamada “redistribuição *postmortem*” (PELISSIER-ALICOT, GAULIER et al., 2003; FERNER, 2008).

A redistribuição *postmortem* envolve o movimento de toxicantes no organismo após a morte a favor de gradiente de concentração. Ela tem seu início em cerca de uma hora após a morte. De fato, a cinética de diversas substâncias no corpo humano após a morte não tem sido bem caracterizada. Esse fenômeno é dependente de vários fatores, incluindo o peso molecular, a lipofilicidade, o pKa, o transporte ativo e a afinidade aos tecidos. É assumido que, após a morte, todas as funções se cessam e o corpo se torna um elemento estático. Mudanças na integridade da membrana, pH, força iônica intra e extracelular, características de ligação a tecidos são observados, alterando significativamente o padrão de distribuição dessas substâncias. A liberação *postmortem* de órgãos que concentram compostos, como o fígado e pulmões, pode aumentar dramaticamente a concentração destes em vasos locais como as artérias e veias pulmonares e a veia

cava. O movimento do sangue induzido pela putrefação e *rigor mortis* também podem ter influência na redistribuição (SHEPHERD, LAKE et al., 1992; PELISSIER-ALICOT, GAULIER et al., 2003; YAREMA e BECKER, 2005).

A amostra de sangue coletada de cadáveres, a mais comumente utilizada em investigações toxicológicas forenses, não é um fluido biológico homogêneo. É recomendável na prática forense ter múltiplas amostras disponíveis, ou pelo menos, amostras de sangue oriundas de dois diferentes locais do corpo, devido às potenciais dificuldades em interpretar resultados toxicológicos *postmortem*. O sangue proveniente da cavidade cardíaca é o mais frequente espécime escolhido devido à relativa facilidade da coleta e ao fato que grandes volumes podem ser obtidos para análise. Entretanto, as concentrações do sangue cardíaco tendem a ser afetadas pelo fenômeno de redistribuição *postmortem*. O sangue periférico é um fluido menos provável de ser sujeito a elevações *postmortem* do que o sangue coletado da cavidade cardíaca (JONES, 2008a).

Em alguns casos forenses, contudo, o sangue não está disponível para coleta, como por exemplo, em situações de decomposição extrema, fogo e exsanguinação. Nestes casos, outros tecidos como fígado, encéfalo e músculo esquelético podem ser coletados para determinação dos níveis de agentes tóxicos *postmortem*. Dentre essas amostras, o fígado tem sido classificado como a segunda amostra de importância na interpretação de casos em Toxicologia Forense. Relativamente grandes quantidades de amostra são disponíveis e existe um banco de dados de valores de referência para esse espécime biológico, esse banco está disponível para membros do *The International Association of Forensic Toxicologists* (TIAFT) (DRUID e HOLMGREN, 1998).

Além disso, as concentrações de substâncias no fígado são relativamente estáveis após a morte, ocorrendo, em geral, pequena queda por difusão (JONES, 2007; 2008a).

As amostras biológicas *postmortem* apresentam especial dificuldade comparada com amostras coletadas para ensaios clínicos. De fato, não se podem aplicar métodos validados para ensaios clínicos em amostras *postmortem* devido à alteração da natureza do espécime pelos fenômenos imediatos à morte (DRUMMER e GEROSTAMOULOS, 2002). Por exemplo, o sangue obtido *postmortem* é uma amostra bastante variável. A hemólise é comum nesses casos e, por essa razão, o sangue total é empregado para a análise. A sedimentação de células e/ou a formação de coágulos também podem ocorrer antes da coleta (FLANAGAN, TAYLOR et al., 2007). Para a determinação de drogas em fígado, métodos analíticos devem inicialmente contemplar a homogeneização do tecido. Algumas vezes existe a necessidade do emprego de enzimas para a digestão dos tecidos e também realizar um procedimento de *clean up* para remover proteínas e outros interferentes presentes nesse espécime antes da extração (HUANG, CHEN et al., 1996).

Os barbitúricos são uma classe de fármacos utilizados na terapêutica como ansiolíticos, sedativo, hipnóticos e anestésicos. Apesar dos levantamentos apontarem que o uso dos barbitúricos diminuiu consideravelmente no mundo após o lançamento da classe dos benzodiazepínicos, vários trabalhos vem sendo publicados sobre estatísticas de casos de intoxicações ou uso não-médico dos barbitúricos (BRASIL, 2007). Um levantamento realizado em Nova York (período de 1990-2007) constatou que os barbitúricos são utilizados nas tentativas de suicídio entre adultos jovens e idosos (11,8 % dos casos envolviam adultos jovens e 27,2 % dos casos envolviam idosos) (ABRAMS, LEON et al., 2011). No Japão, Kudo et al.

(2010) relataram que o fenobarbital foi o principal fármaco detectado em casos de intoxicação entre 2003 e 2006 (KUDO, ISHIDA et al., 2010).

De acordo com o relatório de 2007 do SAMSHA (The Substance Abuse and Mental Health Services Administration), os barbitúricos foram responsáveis por 9.877 visitas às unidades de emergência compreendidas pelo SAMSHA, o que representa cerca de 1,2% do total de visitas classificadas como uso não médico de medicamentos nos Estados Unidos (UNITED STATES, 2007). No Brasil, mais especificamente na cidade de São Paulo, o fenobarbital é o antiepilético que mais aparece nos casos de intoxicações (10,75%). Dentre as circunstâncias relatadas, inclui-se tentativa de suicídio, acidentes e uso incorreto ou prescrição incorreta do medicamento. Além da cidade de São Paulo, trabalhos originários do estado do Paraná e do Distrito Federal têm relatado casos de intoxicação envolvendo barbitúricos (BONILHA, COLLARES et al., 2005; BERNARDES, SARA SANTOS, TURINI, CONCEIÇÃO APARECIDA et al., 2010; CAMPELO e CALDAS, 2010).

Relativamente poucos trabalhos foram publicados com relação à redistribuição *postmortem* da classe dos barbitúricos. Em um trabalho desenvolvido a partir de um modelo animal (ratos), concentrações de fenobarbital *antemortem* e *postmortem* não apresentaram diferenças significativas. No entanto, modelos animais têm valor limitado no estudo de redistribuição *postmortem* (PARKER, WINEK et al., 1971; HILBERG, ROGDE et al., 1999). Não há como se concluir que amostras de sangue de diferentes regiões do corpo humano (coração e/ou periférico) podem ser utilizadas para a quantificação de barbitúricos e que não sofrerão a redistribuição *postmortem*.

Portanto, o grande desafio para estudar a redistribuição *postmortem* é desenvolver metodologias apropriadas para determinar barbitúricos em amostras

postmortem (sangue periférico, sangue cardíaco e fígado) e correlacionar à concentração dos barbitúricos em diferentes espécimes biológicos. Os barbitúricos de interesse neste trabalho foram o fenobarbital, o butalbital, o pentobarbital e o secobarbital, cujas estruturas químicas são apresentadas na Figura 1. A microextração em fase líquida (LPME), técnica recente de preparação de amostras, cuja principal característica é a praticidade e baixo consumo de solventes orgânicos, foi utilizada para o desenvolvimento dos métodos analíticos para detecção dos barbitúricos em sangue total e amostras de fígado (PEDERSEN-BJERGAARD e RASMUSSEN, 1999; RASMUSSEN, PEDERSEN-BJERGAARD et al., 2000; GRONHAUG HALVORSEN, PEDERSEN-BJERGAARD et al., 2001; OLIVEIRA, MAGALHÃES et al., 2008).

Figura 1. Estrutura química, (A) fenobarbital, (B) butalbital, (C) pentobarbital e (D) secobarbital.

Generalidades

2. GENERALIDADES

2.1. Barbitúricos

A epilepsia é uma séria doença que afeta aproximadamente 1% da população mundial. Em recente estudo realizado no Brasil, demonstrou-se que a incidência desta doença é de 18,6/1000 habitantes, onde a estimativa é que três milhões de pessoas tenham alguma forma de epilepsia. Para o tratamento dessa doença são empregados fármacos antiepiléticos como os medicamentos da classe dos barbitúricos (BONILHA, COLLARES et al., 2005).

Barbitúrico é nome dado aos compostos orgânicos derivados do ácido barbitúrico. O ácido barbitúrico foi sintetizado em 1864 por Adolf von Baeyer, porém o processo de síntese foi desenvolvido e aperfeiçoado pelo químico francês Edouard Grimaux em 1879. A partir de então, houve o desenvolvimento subsequente de vários derivados do ácido barbitúrico. O barbital foi o precursor dos barbitúricos, lançado em 1903 no mercado com o nome comercial de Veronal®. O fenobarbital surgiu alguns anos mais tarde (em 1912) e foi comercializado com o nome de Luminal®. Com o passar dos anos foi-se introduzindo mudanças na estrutura química dos barbitúricos com o objetivo de melhorar seu efeito terapêutico como ansiolítico, sedativo, hipnótico e anestésico, gerando assim a síntese de mais de 2.500 barbitúricos. Destes, cerca de 50 foram comercializados. Entre 1920-1950, somente os barbitúricos era empregados como hipnóticos e sedativos (BONILHA, COLLARES et al., 2005; LOPEZ-MUNOZ, UCHA-UDABE et al., 2005; BRASIL, 2007).

Barbitúricos são substâncias depressoras não-seletivas do sistema nervoso central (SNC), capazes de produzir todos os graus de depressão, desde leve sedação e hipnose até anestesia geral, coma e morte. O grau de depressão do SNC

varia de acordo com a via de administração, dose e as características farmacocinéticas de cada barbitúrico (CHARNEY, MIHIC et al., 2001; MCNAMARA, 2011).

Os barbitúricos são divididos em quatro classes. Os chamados de ação ultracurta, curta, intermediária e longa (Tabela 1). Essa classificação é baseada no tempo de meia-vida e lipossolubilidade dos compostos. Os barbitúricos mais utilizados na terapêutica são: amobarbital, butalbital, pentobarbital, fenobarbital, secobarbital e tiopental (JOHNSON e GARG, 2010). A concentração sanguínea terapêutica para os barbitúricos varia de 1 a 134 mg/L (Tabela 1) (ALBERTSON, 2004).

Tabela 1. Barbitúricos mais utilizados e suas concentrações sanguíneas terapêuticas e tóxicas (MEIER e THORMANN, 1991; ALBERTSON, 2004; MCNAMARA, 2011; MOFFAT, OSSELTON et al., 2011).

Barbitúricos	Classificação ($\frac{1}{2}$ vida em h.)	Concentração sanguínea terapêutica	Concentração sanguínea tóxica
tiopental	<i>ultracurta (8-10)</i>	1 a 134 mg/L	>5 mg/L
secobarbital	<i>curta (15-40)</i>	2 a 10 mg/L	>8 mg/L
pentobarbital	<i>curta (15-50)</i>	1 a 10 mg/L	> 8 mg/L
amobarbital	<i>intermediária (10-40)</i>	2 a 12 mg/L	> 9 mg/L
butalbital	<i>intermediária (35)</i>	1 a 10 mg/L	10-25 mg/L
fenobarbital	<i>longa (80-120)</i>	2 a 30 mg/L	>30 mg/L

O mecanismo de ação dos barbitúricos acontece através da interação com receptores GABA_A presentes nas membranas neuronais do sistema nervoso central. Esse receptor ionotrópico é ativado pelo neurotransmissor inibitório ácido gama-aminobutírico (GABA) (MCNAMARA, 2011).

O secobarbital é um barbitúrico de ação curta (meia vida entre 15-40h) e seus efeitos são: hipnose basal para anestesia geral (raquidiana) utilizado para facilitar procedimentos de intubação traqueal e para induzir anestesia em crianças. Concentrações plasmáticas de secobarbital entre 1-5 mg/L estão relacionadas com sedação; concentrações superiores a 10 µg/mL pode produzir coma e níveis plasmáticos acima de 30 µg/mL são potencialmente letais (QUINONES-TORRELO, MARTIN-BIOSCA et al., 2000). O butalbital e o pentobarbital são barbitúricos de ação intermediária. Embora o butalbital seja utilizado em associação com ácido acetilsalicílico, acetaminofeno e cafeína para enxaqueca, existem controvérsias sobre a eficácia deste uso. Na Alemanha, por exemplo, o butalbital foi banido devido ao seu potencial uso abusivo. A absorção total de butalbital por via oral ocorre em torno de 2 horas. Concentrações plasmáticas entre 10-20 mg/L têm sido associadas com intoxicação (SILBERSTEIN e MCCRORY, 2001). O tiopental é um barbitúrico classificado de ultracurto e tem sido muito empregado como anestésico intravenoso, sendo amplamente utilizado no Brasil com esta finalidade. Seu tempo de meia vida está entre 8-10 h e sua concentração terapêutica varia de 1 a 134 mg/L (MEIER e THORMANN, 1991; ALBERTSON, 2004; MOFFAT, OSSELTON et al., 2011).

O fenobarbital é o barbitúrico com a maior meia vida (80-120h) e sua absorção oral é completa, mas um pouco lenta. O pico máximo plasmático ocorre várias horas após a administração de uma única dose. Em casos de intoxicação, o fenobarbital pode ser encontrado no estômago até 12 horas após a ingestão, devido a sua circulação entero-hepática (CHARNEY, MIHIC et al., 2001; BRASIL, 2007; MCNAMARA, 2011). A distribuição do fenobarbital é rápida por todos os tecidos e líquidos corporais, atingindo maior concentração no cérebro, fígado e rins. A ligação com proteínas plasmáticas varia entre 40% a 60%, sendo a taxa de ligação com os

tecidos, incluindo o cérebro, similar à plasmática. O fenobarbital atravessa a barreira placentária, distribui-se pelos tecidos do feto e acumula-se na placenta, cérebro e fígado, correspondendo à concentração sanguínea da mãe (MCNAMARA, 2011).

A excreção do fenobarbital por via renal é de 25% na forma inalterada. O restante da dose é biotransformado por enzimas microssomais hepáticas, principalmente pela CYP2C9, e em menor proporção pelas CYP2C19 e CYP2E1. O fenobarbital é um indutor enzimático e induz a uridina-difosfato glucuronosiltransferase (UGT), bem como as subfamílias CYP2C e CYP3A (MCNAMARA, 2011).

Todos os barbitúricos citados fazem parte da lista B1 da portaria 344/1998 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 1998). Porém, o pentobarbital, tiopental e o fenobarbital são comercializados e utilizados no Brasil.

A incidência de intoxicação por barbitúricos diminuiu acentuadamente nos últimos anos, em grande parte devido à diminuição da sua utilização como sedativo-hipnótico, substituído ao longo dos anos pelos benzodiazepínicos. No entanto, intoxicações com barbitúricos ainda são um problema clínico significativo, embora a morte ocorra em uma pequena porcentagem dos casos. A maioria dos casos de intoxicação é devido às tentativas de suicídio; porém alguns casos são de intoxicações acidentais em crianças ou em usuários de drogas. A dose letal de barbitúricos varia de 6 a 10 g (dose terapêutica: 60 a 250 mg). Se houver o uso concomitante com fármacos depressores do SNC, as concentrações que podem causar a morte são menores (CHARNEY, MIHIC et al., 2001).

No Brasil, os barbitúricos eram usados de maneira até irresponsável. Vários medicamentos para enxaqueca, além do ácido acetilsalicílico, continham também

um barbitúrico em associação. Os medicamentos que apresentavam essas associações eram: Cibalena®, Veramon®, Optalidom®, Fiorinal® etc. que continham butabarbital ou secobarbital em suas fórmulas (BRASIL, 2007).

Em estudo realizado pelo Centro de Controle de Intoxicações da cidade de São Paulo (CCI-SP), constatou-se que 36% dos casos de intoxicações atendidos envolvem medicamentos que agem no SNC. Destes, 44% estão relacionados aos antiepiléticos. O fenobarbital é o antiepilético mais encontrado nos casos de intoxicações (10,75%). Dentre as circunstâncias relatadas, inclui-se tentativa de suicídio, acidentes e uso incorreto ou prescrição incorreta do medicamento. Segundo Bonilha et al., 2005, os antiepiléticos são medicamentos conhecidos como de “ação forte no cérebro”. Por essa razão o fenobarbital está bastante envolvido nos casos de tentativa de suicídio com adultos jovens. De fato, o autor ainda afirma que em uma cidade como São Paulo, há uma estimativa de três casos de intoxicações envolvendo fenobarbital por dia (BONILHA, COLLARES et al., 2005).

O Centro de Controle de Intoxicações da cidade de Londrina, Paraná, realizou estudo retrospectivo (1997-2007) sobre o perfil das tentativas de suicídio. Foram encontrados altos índices de intoxicações envolvendo o fenobarbital, corroborando, assim, com os dados apresentados pelo CCI da cidade de São Paulo. As classes dos medicamentos mais encontradas nas tentativas de suicídio foram os tranquilizantes (25,5%), antidepressivos (17%) e anticonvulsivantes (15%). O princípio ativo mais comum de cada grupo, na mesma ordem, foi o diazepam (38,9%), a amitriptilina e/ou suas associações (61,7%) e o fenobarbital (43,4%) (BERNARDES, S. S., TURINI, C. A. et al., 2010).

2.2. Redistribuição *postmortem*

O fenômeno da redistribuição *postmortem* em humanos foi observado inicialmente em 1960, devido ao grande uso abusivo de barbitúricos. CURRY e SUNSHINE (1960) descobriram uma correlação entre a concentração de barbitúricos no fígado e veia periférica, tentando assim correlacionar com o tempo de morte (CURRY e SUNSHINE, 1960). Parker et al. (1971) utilizaram modelo animal para estudar a possível difusão passiva do estômago para o fígado. Os pesquisadores administraram secobarbital por via intragástrica em ratos mortos. Após uma série de experimentos, eles concluíram que os níveis de secobarbital no fígado dos ratos aumentaram após 216 h, indicando assim uma cinética *postmortem* (PARKER, WINEK et al., 1971; YAREMA e BECKER, 2005).

HOLT e BENSTEAD (1975) relataram o comportamento *postmortem* da digoxina, constatando-se que amostras de sangue coletadas de três locais distintos (ventrículo direito, veia femoral, veias do pescoço) apresentaram concentrações significativamente diferentes para digoxina. O sangue coletado da cavidade cardíaca foi o que apresentou maior concentração de digoxina, por outro lado sangue da veia femoral apresentou a menor concentração. A partir desses achados, iniciaram-se recomendações sobre coletas de sangue para a avaliação da concentração da digoxina em amostras de sangue *postmortem* (HOLT e BENSTEAD, 1975).

Em 1985 esse fenômeno que era observado em amostras biológicas de cadáveres foi denominado “*redistribuição postmortem*” por KOREN e MACLEOD (1985), tendo em vista as suas observações na alteração das concentrações de digoxina em ratos, após a morte. Passados mais de 30 anos das primeiras investigações da redistribuição *postmortem*, uma série de dificuldades na interpretação de concentrações de agentes tóxicos em amostras biológicas ainda

persiste e o fenômeno tem sido completamente justificado pela descrição de POUNDER e JONES (1990) como sendo um “pesadelo toxicológico” (KOREN e PARKER, 1985; POUNDER e JONES, 1990; QUATREHOMME, BOURRET et al., 1990; YAREMA e BECKER, 2005)

A redistribuição *postmortem* envolve o movimento de toxicantes no organismo após a morte. Ela tem seu início cerca de uma hora após a morte. As mais importantes alterações quantitativas nas concentrações sanguíneas ocorrem nas primeiras 24 horas e são dependentes da região de coleta do corpo (JONES, 2007). Os mecanismos bioquímicos responsáveis pela morte celular são complexos. Inicialmente a respiração aeróbica cessa, a produção de ATP diminui e o metabolismo anaeróbico se inicia. Consequentemente, ácido láctico e fosfato inorgânico acumulam-se no interior das células, causando assim diminuição do pH intracelular. Por sua vez, o cálcio elevado ativa uma série de enzimas, com efeitos celulares potencialmente deletérios. As enzimas que são ativadas pelo cálcio incluem fosfolipases (desse modo promovendo a lesão da membrana), proteases (que degradam proteínas do citoesqueleto), ATPases (acelerando assim a depleção de ATP) e endonucleases (que estão associadas à degradação da cromatina). Os componentes celulares então são progressivamente degradados e liberados para o espaço extracelular (SHEPHERD, LAKE et al., 1992; PELISSIER-ALICOT, GAULIER et al., 2003; YAREMA e BECKER, 2005).

Após a morte, ocorre a formação de sedimentos e coágulos no sangue. O coágulo normalmente aprisiona um grande número de células vermelhas do sangue, podendo influenciar na concentração da substância devido à distribuição desigual entre as células vermelhas do sangue. Algumas horas após a morte, a hipóstase ocorre por sedimentação de sangue e de plasma para as partes inferiores do corpo.

Esse processo de sedimentação tem relação direta com a posição do cadáver. A hipóstase induz variações na percentagem de eritrócitos por volume, dependendo da parte do corpo. Esta percentagem diminuiu mais de 50% durante as primeiras 9 horas após a morte (THOMSEN, KAATSCH et al., 1999; PELISSIER-ALICOT, GAULIER et al., 2003).

A redistribuição física de substâncias para diferentes compartimentos vasculares pode ocorrer devido ao movimento do sangue dentro dos vasos sanguíneos, o que ocorre logo após a morte. A extensão desse movimento é influenciada pela pressão e mudanças na fluidez do sangue. O *rigor mortis*, que ocorre durante as primeiras 24 horas, induz a contração sistólica ventricular com pequenos movimentos do sangue cardíaco na veia cava superior e nas veias do pescoço. Devido ao aumento da pressão intra-abdominal há um refluxo de sangue da aorta abdominal para a aorta torácica; a partir da veia cava inferior para o átrio direito e veia cava superior; a partir das câmaras esquerdas cardíacas para as veias pulmonares. Mais tarde, no início do processo de putrefação, ocorre o desaparecimento do *rigor mortis*. Gases distendem a parede abdominal e o diafragma, provocando assim refluxo do sangue periférico. Esse fenômeno, que é incorretamente chamado "*circulação postmortem*", é de fraca amplitude (POUNDER e JONES, 1990; PELISSIER-ALICOT, GAULIER et al., 2003; YAREMA e BECKER, 2005).

Em investigações toxicológicas forenses, o sangue é a amostra mais comumente coletada de cadáveres. Como relatado anteriormente, o sangue *postmortem* não é um fluido biológico homogêneo. É recomendável na prática forense coletar múltiplas amostras, ou pelo menos, amostras de sangue

provenientes de duas regiões diferentes do cadáver. (DRUMMER e GEROSTAMOULOS, 2002; DRUMMER, 2004; JONES, 2007; KENNEDY, 2010).

O sangue proveniente da cavidade cardíaca é o mais frequente espécime escolhido devido à relativa facilidade da coleta e ao fato de que grandes volumes podem ser obtidos para análise. Entretanto, as concentrações do sangue cardíaco tendem a ser afetadas pelos seguintes fatores:

- redistribuição de substâncias oriundas de tecidos vizinhos;
- difusão de substâncias presentes no estômago que poderiam conter grandes quantidades em casos de ingestão;
- difusão *postmortem* de substâncias através da traqueia associada com aspiração agonal ou vômito (MORIYA e HASHIMOTO, 1999; PELISSIER-ALICOT, GAULIER et al., 2003).

O sangue cardíaco e o sangue proveniente da cavidade torácica podem sofrer redistribuição dos pulmões, estômago e fígado. A liberação *postmortem* de órgãos que concentram compostos, como o fígado e pulmões, podem aumentar drasticamente a concentração destes em vasos locais como as artérias e veias pulmonares e a veia cava. O movimento do sangue induzido pela putrefação e *rigor mortis* também pode ter influência na redistribuição. Os pulmões são órgãos bastante irrigados e acumulam muitas substâncias; essa distribuição começa nas primeiras horas após a morte, induzindo assim um aumento na concentração das substâncias na cavidade cardíaca e veia torácica. Essa redistribuição parece ser mais intensa do que a gastrointestinal. Esse fenômeno pode ocorrer dos pulmões para o fígado através do diafragma, pois esse músculo é que divide a cavidade torácica da abdominal. Quando existe a redistribuição é esperada que a

concentração da substância seja maior na porção do fígado que fica em contato com o diafragma (PELISSIER-ALICOT, GAULIER et al., 2003).

Substâncias não totalmente absorvidas podem ficar no sistema gastrointestinal e serem redistribuídas após a morte através de vasos que circundam estes órgãos. As moléculas difundem-se para as câmaras cardíacas esquerdas e direitas, aorta e veia cava inferior. A difusão passiva do conteúdo gástrico também pode atingir órgãos que o medeiam como, por exemplo, o lobo inferior esquerdo do pulmão e o lobo esquerdo do fígado, sendo essa difusão também dependente da posição do cadáver. Além disso, a redistribuição é influenciada por fatores físicos como a concentração da droga no conteúdo gastrointestinal, o volume deste conteúdo, a temperatura do cadáver, e o tempo entre a morte e a amostragem. Como esperado, ele é retardado por refrigeração e aumenta com o atraso entre a morte e a autópsia (POUNDER e JONES, 1990; POUNDER e SMITH, 1995; DRUMMER e GEROSTAMOULOS, 2002; YAREMA e BECKER, 2005).

A redistribuição *postmortem* pode ocorrer no fígado e o mecanismo é bastante complexo. Os compostos podem ser sequestrados por esse órgão e podem ser redistribuídos através das veias hepáticas para a veia cava inferior e posteriormente para as câmaras cardíacas direitas e vasos pulmonares ou ainda para o sangue venoso periférico. No entanto, este processo não é tão intenso e precoce como a redistribuição dos pulmões. Em segundo lugar, as substâncias poderiam ser redistribuídas diretamente aos órgãos adjacentes, pois a posição anatômica do fígado humano proporcionaria essa redistribuição para o estômago, o piloro, o duodeno proximal e a vesícula biliar. Porém não é tão importante como a redistribuição através dos vasos hepáticos. O fenômeno de difusão passiva do estômago para o fígado é muito variável. O lobo esquerdo do fígado é o que mais

sofre essa redistribuição, devido à proximidade com o estômago. No entanto, é particularmente difícil interpretar corretamente a evolução da concentração hepática (POUNDER e JONES, 1990; HILBERG, ROGDE et al., 1999; YAREMA e BECKER, 2005).

Em geral, o sangue da cavidade cardíaca e torácica não é espécime indicada para casos forenses, principalmente para análises quantitativas. Recomenda-se, então, para análise quantitativa *postmortem* utilizar o sangue periférico, pois este é um fluido biológico menos provável de sofrer redistribuição *postmortem* (Figura 2). A veia femoral é o local recomendado para coleta do sangue periférico, porém, é recomendado que no momento da amostragem não colete sangue proveniente da veia ilíaca e veia cava (YAREMA e BECKER, 2005; JONES, 2007). Uma compilação de concentração de sangue femoral *postmortem* observado em casos fatais foi publicado por DRUID e HOLMGREN (1998). Um banco de dados de concentrações de substâncias em sangue/plasma também é disponível *on-line* para membros do *The International Association of Forensic Toxicologists* (TIAFT) (DRUID e HOLMGREN, 1998).

Figura 2. Locais de coleta de sangue para análises toxicológicas *postmortem*.

Adaptado de (BRITANNICA, 2012).

Devido à particularidade de alguns casos forenses, como por exemplo, decomposição extrema, fogo e exsanguinação, amostras de sangue podem não estar disponível para coleta. Nestes casos, outros tecidos podem ser coletados para determinação dos níveis de agentes tóxicos *postmortem*. O fígado tem sido classificado como a segunda amostra de importância na interpretação de casos em Toxicologia Forense. As concentrações de substâncias no fígado são relativamente estáveis após a morte, ocorrendo, em geral, pequena variação por difusão. Grandes quantidades de amostra são disponíveis para a coleta e existe um banco de dados

de valores de referência para esse espécime biológico (JONES, 2008b). Como descrito anteriormente, existe a possibilidade da difusão *postmortem* que pode elevar as concentrações de compostos que se encontravam no estômago, por exemplo, após *overdose*. Desta forma, recomenda-se a coleta de alíquota da região anatomicamente mais distante do estômago, que é parte posterior do lobo direito do fígado (JONES, 2007). Existem recomendações internacionais para se proceder com a coleta em casos *postmortem*, como por exemplo, como coletar, quais amostras coletar e qual a quantidade preconizada para cada amostra (Tabela 2) (SOCIETY OF FORENSIC TOXICOLOGY, 2006; JONES, 2011).

Tabela 2. Lista recomendada de espécimes para serem coletadas para exames toxicológicos *postmortem* (DRUID, 2006; SOCIETY OF FORENSIC TOXICOLOGY, 2006)

Espécime	Quantidade
Sangue (Ventrículo direito)	25-100 mL
Sangue (Veia femoral)	5-10 mL por perna
Humor vítreo	Todo disponível
Lobo direito do fígado	50 g
Encéfalo	50 g
Urina	Toda disponível (acima de 50 mL)
Bile	Toda disponível
Conteúdo estomacal	Todo disponível*

*Pode-se coletar 100g e reservar o restante do conteúdo gástrico

O humor vítreo, apesar do limitado volume possível de ser coletado (3 a 6 mL), é um espécime também importante em análises *postmortem*. Tem sido utilizado por anos para verificar a concentração *postmortem* de etanol, uma vez que a fermentação (produção endógena de etanol) não ocorre em extensão significativa no

olho. Adicionalmente, o humor vítreo também tem sido útil para análise de certo número de fármacos como fenobarbital, cocaína, morfina, antidepressivos tricíclicos e benzodiazepínicos. Devido ao fato que o olho está anatomicamente afastado da cavidade corpórea central, tem sido sugerido que o humor vítreo possa ser útil especialmente nos casos de substâncias sujeitas à redistribuição (MCKINNEY, PHILLIPS et al., 1995). A difusão *postmortem* de substâncias do encéfalo para o humor vítreo, especialmente em casos onde o corpo se encontra de bruços por longo período de tempo, pode ser uma possível fonte de erro (JONES, 2007).

O cérebro é o principal local de ação de muitas substâncias de importância forense, como os antidepressivos, estimulantes e narcóticos. Desta forma, é um espécime potencialmente muito útil para a medida e interpretação das concentrações de fármacos psicoativos, pois se encontra distante do compartimento central do corpo e não é afetado pela difusão *postmortem* (JONES, 2008b). Entretanto, relativamente poucos dados de referência para diferentes substâncias foram acumulados durante os anos para esse espécime biológico, o que tem limitado sua utilização em análises forenses (JONES, 2008b).

O músculo esquelético também tem grande potencial para ser um espécime útil na determinação de agentes tóxicos, particularmente onde o corpo se encontra severamente decomposto, ou onde a redistribuição *postmortem* tenha afetado a medida no sangue e outros órgãos. Da mesma forma, o potencial da utilização da medula óssea também tem sido explorado em análises forenses. Pode ser útil em casos de extrema decomposição, fogo ou a ação de animais selvagens que tornaram o sangue e órgãos indisponíveis. Assim como o encéfalo e o músculo esquelético, é necessária a criação de um banco de dados de valores de referência para esse espécime biológico (MCGRATH e JENKINS, 2009).

Relativamente poucos trabalhos foram publicados com relação à redistribuição *postmortem* dos barbitúricos. Em trabalho desenvolvido a partir de um modelo animal (ratos), concentrações de fenobarbital *antemortem* e *postmortem* não apresentaram diferenças significativas (HILBERG, RIPEL et al., 1999). Entretanto, modelos animais têm valor limitado no estudo de redistribuição *postmortem*. Uma das limitações está na disposição anatômica dos órgãos dos animais quando comparado com humanos. Lewis et al. (2003) relatam um caso de determinação de butalbital em várias amostras *postmortem* do piloto e copiloto vítimas de acidente aéreo. Devido à natureza do acidente, amostras de sangue não estavam disponíveis para coleta. O desafio dos pesquisadores era tentar estimar a concentração sanguínea dos indivíduos no momento da morte utilizando as concentrações em diferentes amostras e se o piloto e o copiloto poderiam ter tido seu desempenho afetado pelo uso do fármaco (QUATREHOMME, BOURRET et al., 1990; LEWIS, JOHNSON et al., 2003). Outro caso relatado em literatura onde não houve sangue para ser coletado foi publicado por Giusiani et al. (2012) onde foi identificado e quantificado fenobarbital em um corpo do sexo masculino de aproximadamente 56 anos de idade que estava mumificado há mais de 10 anos. Esse estudo demonstra a necessidade de se ter métodos apropriados para determinar substâncias em amostras alternativas *postmortem*, pois nesses tipos de estudos, além de correlacionar a ocorrência de intoxicação, pode-se estudar também sobre antropologia e paleopatologia (GIUSIANI, CHERICONI et al., 2012).

2.3. Técnicas de preparação de amostras *postmortem* em análises toxicológicas

A detecção de substâncias em espécimes biológicos forenses possui especial dificuldade comparada com amostras coletadas para ensaios clínicos. A alteração da

natureza do espécime pelos fenômenos subsequentes à morte limita a direta aplicabilidade de métodos validados para esses ensaios (DRUMMER e GEROSTAMOULOS, 2002). O sangue obtido *postmortem*, por exemplo, é uma amostra bastante variável. A hemólise é comum nesses casos e, por essa razão, o sangue total é analisado normalmente. A sedimentação de células e/ou a formação de coágulos também podem ocorrer antes da coleta (FLANAGAN, TAYLOR et al., 2007).

Uma fase de preparação de amostras de *clean-up* para substâncias básicas, como a re-extração em meio ácido e novamente uma terceira extração em meio alcalino tem sido usada para remover interferentes da matriz (DRUMMER e GEROSTAMOULOS, 2002). Procedimentos de *clean-up* têm sido especialmente úteis nos casos de homogenatos de fígado ou amostras de sangue putrefeitas (KOVES e WELLS, 1992).

A direta precipitação com acetonitrila tem sido empregada em métodos por HPLC/DAD, apesar de a sensibilidade ser menor do que em métodos que envolvam procedimentos de concentração. Esse procedimento é geralmente dirigido para substâncias de caráter ácido. O uso de cloreto de amônio com acetato de etila seguido por uma fase de lavagem com hexano parece ser efetivo para extrair substâncias de caráter ácido em sangue *postmortem* e outros tecidos (LO, CHAO et al., 1997).

A extração em fase sólida (SPE) também tem sido empregada em procedimentos de preparação de uma série de amostras *postmortem* incluindo cérebro, fígado, intestino, rins, músculo e tecido adiposo (SCHEURER e MOORE, 1992; HUANG, CHEN et al., 1996). Resinas de troca iônica têm sido usadas para extração de substâncias ácidas em sangue total e outros fluidos (KOVES, 1995).

O princípio da SPE baseia-se na adsorção do analito em adsorvente fixado entre dois filtros em um tubo de polipropileno denominado cartucho. Existe um grande número de adsorventes disponíveis no mercado, como por exemplo, os de fase reversa, de fase normal e de troca iônica. O termo fase reversa é empregado para descrever o modo cromatográfico no qual a fase móvel apresenta maior polaridade do que a fase sólida e reterá os analitos menos polares presentes em solventes polares. Isso envolve interações não polares entre o analito e o adsorvente, por meio de forças de van der Waals. Nos adsorventes de fase normal, compostos polares dissolvidos em solventes não polares como o éter dietílico ou o n-hexano são extraídos por adsorção ao adsorvente polar. Existem também os chamados trocadores iônicos, constituindo de um trocador forte de cátions do tipo $[\text{SO}_3]^-$, aprisionado à estrutura básica da sílica para extração de compostos básicos, enquanto os compostos ácidos são retidos por trocadores fortes de ânions, do tipo $[\text{N}(\text{CH}_3)_3]^+$ (LANÇAS, 2004).

A combinação de adsorventes de fase reversa com grupos de troca iônica é conhecida como cartucho de fase mista. Nesse caso, o analito é retido por dois mecanismos, uma interação iônica com o grupo catiônico e uma adsorção da fase reversa com a parte lipofílica da molécula (LANÇAS, 2004).

Novas tendências no preparo de amostras têm buscado métodos de extração que não utilizam solventes, ou que empregam um volume reduzido dos mesmos. Assim, a miniaturização de técnicas de preparo de amostra tem desempenhado papel importante na química analítica nos últimos anos. As técnicas denominadas microextração em fase sólida (SPME) e a microextração em fase líquida (LPME) têm se tornando bastante popular, devido à facilidade de uso e a baixa utilização de solventes orgânicos tóxicos (VALENTE e AUGUSTO, 2000; OLIVEIRA,

MAGALHÃES et al., 2008; GARRIDO FRENICH, ROMERO-GONZALEZ et al., 2011).

A SPME foi introduzida por Arthur e Pawliszyn no início da década de 1990. O dispositivo básico de SPME consiste de uma fibra de 100 µm de diâmetro e com a extremidade recoberta com um filme fino de um polímero ou de um sólido adsorvente. Quanto maior a afinidade do analito pela fase extratora em relação à matriz, maior será a quantidade extraída. Resumidamente, a utilização do dispositivo de SPME seria inserir o dispositivo no frasco de extração e expor a fibra diretamente na amostra (forma direta), ou utilizar a extração por *headspace* (forma indireta), que consiste em expor a fibra do dispositivo aos vapores da amostra submetida a aquecimento, extraíndo assim apenas substâncias voláteis (VALENTE e AUGUSTO, 2000; LANÇAS, 2004). Após um tempo pré-estabelecido, a fibra é retraída e a agulha do dispositivo é inserida diretamente no injetor do cromatógrafo. Devido às altas temperaturas que esses injetores trabalham, os analitos presentes na fibra são dessorvidos e introduzidos na coluna cromatográfica pelo gás de arraste. Após um tempo pré-estabelecido no injetor do cromatógrafo, a fibra é recolhida e o dispositivo está pronto para realizar outra extração (LORD e PAWLISZYN, 2000). As principais limitações da SPME são: alto custo, fragilidade da fibra e os baixos valores de recuperação na extração dos analitos. Devido à recuperação ser normalmente baixa, a SPME necessita ser utilizada conjuntamente com aparelhos de alta sensibilidade (LORD e PAWLISZYN, 2000).

2.3.1. Microextração em fase líquida

Outra tendência na busca por novas técnicas de preparação de amostras é a miniaturização do método tradicional da extração líquido-líquido. Essa miniaturização tem como principal objetivo a redução da razão volumétrica entre a fase aquosa

(amostra), e a fase orgânica (extratora). Isto pode ser obtido utilizando tanto fases líquidas imiscíveis (microextração em gota suspensa) quanto membranas, separando as fases aceptora e doadora (extração em membrana) (PEDERSEN-BJERGAARD e RASMUSSEN, 1999; RASMUSSEN, PEDERSEN-BJERGAARD et al., 2000; GRONHAUG HALVORSEN, PEDERSEN-BJERGAARD et al., 2001; ANDERSEN, HALVORSEN et al., 2002; OLIVEIRA, MAGALHÃES et al., 2008; ESRAFILI, ALI, YAMINI, YADOLLAH et al., 2011; ESRAFILI, A., YAMINI, Y. et al., 2011).

Os sistemas de LPME são baseados na extração de analitos em amostras aquosas, por exemplo, a *single drop microextraction* - SDME. Neste sistema, uma gota de solvente orgânico é suspensa a partir da ponta de uma microseringa e colocada em solução aquosa para a extração. Existem mais duas formas de LPME, porém com a utilização de fibra porosa oca de polipropileno. Nesta forma, as fibras podem ser configuradas na forma de “U” ou na configuração de haste, sendo chamada de *hollow fiber liquid microextraction* (HF-LPME ou LPME) (Figura 3) (PEDERSEN-BJERGAARD e RASMUSSEN, 1999; XU, PAN et al., 2007; NERIN, SALAFRANCA et al., 2009; ESRAFILI, A., YAMINI, Y. et al., 2011).

Figura 3. Representação da microextração em fase líquida e suas modalidades. (A) Gota única suspensa. (B) Configuração em “U”. (C) Configuração em haste. Adaptado de Oliveira et al. (2008).

Durante a extração, os analitos são extraídos da amostra pela gota suspensa com base na difusão passiva, e a recuperação da extração é fundamentalmente determinada pelo coeficiente de partição entre o solvente orgânico empregado e a água. Após um período determinado, a gota é recolhida com a microseringa e, posteriormente, injetada no equipamento de cromatografia em fase gasosa (JEANNOT e CANTWELL, 1996; XU, BASHEER et al., 2007). Embora a LPME na modalidade gota suspensa seja simples e reduza o consumo de solventes orgânicos, esta técnica ainda é muito pouco explorada e é utilizada apenas para fins de pesquisas. Uma das dificuldades encontradas nessa técnica é a baixa estabilidade da gota suspensa que é facilmente perdida no interior da amostra durante a agitação da amostra para a extração (PEDERSEN-BJERGAARD e RASMUSSEN, 1999; 2008).

Como uma solução para melhorar a estabilidade e a confiabilidade da LPME, Pedersen-Bjergaard e Rasmussen (1999) adaptaram o sistema utilizando uma fibra oca. Neste novo conceito, a fase de extração é colocada dentro do lúmen de uma fibra porosa oca de polypropileno, com 600 μm diâmetro interno, 200 μm espessura de parede, 0,2 μm tamanho do poro (*Membrana®*), a qual é mantida em contato direto ou indireto com a amostra. A Figura 4 ilustra os poros das fibras ocas (PEDERSEN-BJERGAARD e RASMUSSEN, 1999; 2008; NERIN, SALAFRANCA et al., 2009).

Figura 4. Imagem de seção transversal de fibra oca LPME. Autorizada por Pedersen-Bjergaard, S. 1999.

Na Figura 3B é possível visualizar também os dois sistemas de extração utilizando a LPME com fibra oca: a configuração em “U”, onde duas microseringas são utilizadas como suporte nas extremidades da fibra e a configuração tipo haste, onde se utiliza apenas uma seringa como suporte (Figura 3C). Em ambas as configurações, a microseringa também é utilizada para se adicionar ou remover a fase aceptora. A agitação através de barras magnéticas é o mecanismo mais utilizado para microextração em fase líquida (HO, PEDERSEN-BJERGAARD et al.,

2002; OLIVEIRA, MAGALHÃES et al., 2008; PEDERSEN-BJERGAARD e RASMUSSEN, 2008).

A LPME empregando a fibra oca pode ser utilizada basicamente de dois modos: o sistema bifásico e o trifásico. No sistema bifásico, o solvente orgânico é impregnado na membrana e no lúmen. O dispositivo formado é inserido na amostra e a extração ocorre da mesma por difusão (Figura 5) (FLANAGAN, MORGAN et al., 2006; OLIVEIRA, MAGALHÃES et al., 2008; SIMOES, DE OLIVEIRA et al., 2011). No sistema trifásico, o solvente orgânico (ou óleo essencial ou óleo fixo de plantas) é depositado nos poros da membrana e uma fase aquosa com pH definido é inserida no lúmen da fibra. Esta solução é denominada fase aceptora. Em seguida essa membrana é adicionada na amostra para a extração (Figura 6). Em nosso caso, o fenobarbital é um ácido fraco e para ser extraído por LPME é necessário que a fase doadora seja ácida e a fase aceptora básica. O analito que se encontra na amostra está na forma molecular devido o pH ser ácido. Ao atravessar a membrana da fibra, o analito adquire carga devido ao meio encontrar-se alcalino, impossibilitando assim o retorno para o fluido amostral (PEDERSEN-BJERGAARD, RASMUSSEN et al., 2005; RAYNIE, 2006; PEDERSEN-BJERGAARD e RASMUSSEN, 2008; KATAOKA, 2010; RAYNIE, 2010).

Figura 5. LPME no sistema bifásico

Figura 6. LPME no sistema trifásico

A LPME empregando fibra oca é bastante robusta e apresenta alto grau de seletividade, que possibilita a obtenção de extratos livres de interferentes, grande capacidade de concentrar os analitos, permitindo a análise de substâncias em níveis de traços em matrizes complexas e a significativa redução no consumo de solventes orgânicos (PEDERSEN-BJERGAARD e RASMUSSEN, 1999; HO, PEDERSEN-BJERGAARD et al., 2002; ESRAFILI, ALI, YAMINI, YADOLLAH et al., 2011).

Objetivo

3. OBJETIVO E PLANO DE TRABALHO

O objetivo do trabalho foi o desenvolvimento e a aplicação de métodos para a detecção e quantificação de butalbital, secobarbital, pentobarbital e fenobarbital em amostras biológicas *postmortem*. Amostras de cadáveres com suspeita de exposição a barbitúricos foram submetidas ao método desenvolvido. Os resultados foram avaliados quanto à correlação das concentrações encontradas entre os tipos de matrizes analisadas. Para obtenção deste objetivo, o seguinte plano de trabalho foi seguido:

- Revisão bibliográfica sobre: Toxicologia forense, técnicas recentes de preparo de amostras, amostras biológicas não convencional e redistribuição *postmortem*.
- Desenvolvimento de métodos analíticos empregando LPME trifásico para a determinação de barbitúricos em amostras de sangue e tecido *postmortem*.
- Validação dos métodos analíticos, avaliando-se parâmetros como limite de detecção e quantificação, linearidade, precisão intra e interensaio, recuperação, robustez e estabilidade.
- Aplicação dos métodos validados em amostras *postmortem* provenientes de casos com suspeita de envolvimento de barbitúricos atendidos no Serviço de Verificação de Óbito da cidade de São Paulo – SVO-USP.
- Interpretação dos resultados forenses.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Reagentes e fibra oca

Reagentes de uso geral no laboratório (solventes, sais) foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). A enzima proteinase Carlsberg CAS-9014-01-1 foi adquirida da Sigma Aldrich (Milwaukee, EUA). Óleos essenciais de eucalipto (*eucalyptus globulus*), cravo e menta foram obtidos da Mapric – Produtos Farmacocosméticos (São Paulo, Brasil). Os óleos de canola e soja foram obtidos em supermercado local. Fibras de polipropileno para microextração em fase líquida (LPME) (600 µm diâmetro interno, 200 µm espessura de parede, 0.2 µm tamanho do poro) foram obtidas da Membrana (Wuppertal, Alemanha).

4.1.2. Soluções-padrão

Soluções-padrões de butalbital, pentobarbital, secobarbital, fenobarbital (1 mg/mL em metanol), butalbital- d_5 , secobarbital- d_5 , fenobarbital- d_5 (*deutérios no anel*) e fenobarbital- d_5 (*deutérios cadeia lateral*) (100 µg/mL em metanol) foram obtidos da Cerilliant Corporation (Round Rock, Texas, EUA).

Soluções de trabalho foram preparadas em metanol nas concentrações de 100 µg/mL, 10 µg/mL e 5 µg/mL, para cada padrão, obtidas pela diluição em metanol das soluções-padrão.

4.1.3. Equipamentos e acessórios

Equipamento de cromatografia em fase gasosa (GC) modelo 6850 acoplado a espectrômetro de massas (MS) quadrupolo modelo MSD 5975, ambos da Agilent Technologies (Wilmington, DE, EUA), equipado com coluna capilar de sílica fundida

HP-5MS – Agilent (5% fenil / 95% dimetilpolisiloxano) com as seguintes dimensões: 30m x 0,25mm x 0,10µm.

Homogeneizador de facas, modelo TE 102 Tecnal (Piracicaba, Brasil).

Ponteira universal para aplicação de eletroforese em gel (0,5mm; 1-200µL), Costar (Corning, NY, EUA).

Teste Imunocromatográfico para exame de triagem em urina para barbitúricos (Triage™, Biosite, San Diego, CA, EUA).

4.1.4. Amostras

4.1.4.1. Amostras biológicas para o desenvolvimento dos métodos

Para o desenvolvimento e validação do método analítico, amostras de sangue total foram doadas pelo serviço de hemoterapia do banco de sangue do Hospital Sírio Libanês. As amostras foram testadas negativa para HBsAG, anti-Hbc, HBV-DNA (NAT), anti-HCV, HCV-RNA (NAT), HIV RNA (NAT), antiHIV1/2, antiHTLV-I/II, Sífilis e doença de Chagas.

A amostra de fígado bovino utilizada para o desenvolvimento e validação do método analítico foi obtida em açougue local e mantida congelada (-20°C).

4.1.4.2. Amostras biológicas humanas provenientes do SVO-USP

Amostras de sangue (cardíaco e femoral) e fígado humano foram obtidas de cadáveres necropsiados pelo SVO-SP. Antes de se coletar as amostras de sangue e tecido, amostras de urina foram coletadas dos cadáveres para o exame de triagem. O exame de triagem foi efetuado no próprio SVO-SP, pois se trata de um teste imunocromatográfico específico, rápido e prático. Os cadáveres que apresentaram resultados positivos para barbitúricos tiveram amostras coletadas por médicos e/ou

auxiliares de necropsia, armazenadas em frascos de plástico e mantidas congeladas (-20°C) até o momento da análise. Os frascos foram identificados apenas com códigos por motivos sigilosos.

Dados relativos aos cadáveres foram coletados como idade, gênero, histórico. O Projeto foi aprovado pelos seguintes Comitês de Ética em Pesquisa: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (CEP/FCF/134/2009), Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da USP (0352/09), Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da USP. Autorização do Serviço de Verificação de Óbito da USP para análises das amostras também foi obtido. Todos os pareceres estão em anexo.

4.2. Métodos

4.2.1. Condições cromatográficas utilizadas no GC-MS

As seguintes condições foram padronizadas para análise dos barbitúricos.

-*Injetor*: - temperatura: 250°C.

- Modo *splitless*

-*Coluna*: - fluxo de hélio constante: 0,6 mL/minuto;

- temperatura inicial do forno: 90°C por 1 minuto;

- rampa: 32°C por minuto até 170°C mantidos por 2 min;

- rampa: 20°C por minuto até 270°C;

- temperatura final do forno: 270°C por 1,5 min.

-*Tempo de análise*: 12,0 min.

-*Temperatura da Interface*: 280°C.

-*Gás de arraste*: Hélio

-*Detector*: espectrômetro de massa tipo quadrupolo (modo de operação: full scan 50-300m/z).

- *Fragmentação*: Ionização eletrônica a 70eV.

-Volume de injeção: 1 µL

4.2.2. Determinação de barbitúricos em sangue total

4.2.2.1. Análise quantitativa por GC-MS

Um método foi desenvolvido para a determinação de butalbital, pentobarbital, secobarbital e fenobarbital em sangue total por GC-MS. A LPME foi a técnica de extração utilizada. Butalbital-d₅ e secobarbital-d₅ foram utilizados como padrão interno.

4.2.2.2. Preparação das amostras de sangue total

Em tubos de vidro de 1 mL foram adicionados 0,05 mL de sangue total e 0,950 mL de uma solução de HCl 0,1 mol/L, 10 µL de butalbital-d₅ e secobarbital-d-5 a 10 µg/mL. Para o procedimento de microextração em fase líquida (LPME), foram utilizados 9 cm de fibra oca. As fibras foram imersas em decanol por 30 segundos e em seguida imersas por 5 segundos em água destilada sob banho de ultrassom para a retirada do excesso de decanol. O lúmen da fibra foi preenchido com 100 µL de uma solução com NaOH a 0,1 mol/L (fase aceptora). A fibra foi inserida dentro do tubo de vidro que continha a amostra previamente diluída.

Após agitação de 5 minutos em banho ultrassônico, o conteúdo interno da fibra foi recolhido e concentrado sob nitrogênio gasoso a 40°C. O resíduo obtido foi ressuspensionado com 10 µL de hidróxido de trimetilfenilalanilina (TMAH) e 90 µL de acetato de etila. Foi injetado 1,0 µL no GC-MS.

4.2.2.3. Otimização do método de extração

Antes de se efetuar os ensaios necessários para validação do método, alguns testes preliminares foram feitos para verificar a situação ótima para cada parâmetro que compõe o método. Cada um dos parâmetros analisados foi feito em triplicata, observando a abundância absoluta obtida no GC-MS.

4.2.2.4. Avaliação da solução aceptora

As concentrações de NaOH testadas como solução aceptora foram: 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001 e 0,00001 mol/L as quais foram submetidas ao procedimento descrito no item **4.2.2.2**. A eficiência da extração também foi avaliada através da área absoluta formada pelos analitos frente a diferentes concentrações de NaOH. Para cada concentração de NaOH, as análises foram conduzidas em triplicata.

4.2.2.5. Avaliação do solvente orgânico

Os solventes testados nesta etapa foram: octanol, decanol e éter diexílico. As amostras foram submetidas ao procedimento descrito no item **4.2.2.2**. A eficiência da extração foi avaliada através da área absoluta formada pelos analitos frente a diferentes solventes orgânicos. Para cada solvente orgânico, as análises foram conduzidas em triplicata.

4.2.2.6. Avaliação da solução doadora

As soluções doadoras testadas foram: tampão acetato pH 3,0, HCl a 1,0 mol/L ou HCl a 0,1 mol/L. As amostras foram submetidas ao procedimento descrito no item **4.2.2.2**. A eficiência da extração foi avaliada através da área absoluta

formada pelos analitos frente a diferentes soluções utilizadas. Para cada solução, as análises foram conduzidas em triplicata.

4.2.2.7. Avaliação do tempo de agitação das amostras

Foram testados os seguintes tempos de agitação: 30, 60, 90, 120, 180 e 240 minutos / 1000 RPM. As amostras foram submetidas ao procedimento descrito no item **4.2.2.2**. A eficiência da extração foi avaliada através da área absoluta formada pelos analitos frente aos diferentes tempos de agitação. Para cada solução, as análises foram conduzidas em triplicata.

4.2.2.8. Planejamento fatorial (Análise de superfície de resposta)

Para esse estudo, utilizou-se o programa *Design Expert 8.0* e o experimento escolhido foi o de Box-Benhken. Este experimento é caracterizado por delineamentos com três níveis de fatores (baixo, médio, alto), e por modelos de segunda ordem (FERREIRA, BRUNS, DA SILVA et al., 2007; FERREIRA, BRUNS, FERREIRA et al., 2007).

Nessa etapa avaliou-se três variáveis, a fase doadora (HCl 0,01; 0,1 e 1,0 mol/L), fase aceptora (NaOH 0,0001; 0,0015 e 0,1 mol/L) e tempo de agitação (30; 135 e 240 min.). O experimento foi realizado utilizando a área absoluta do fenobarbital como variável dependente.

4.2.2.9. Validação do método

A validação do método foi realizada estabelecendo-se os valores de recuperação, linearidade, precisão intra e interensaio, limite de detecção e limite de

quantificação segundo a *United Nations Office on Drugs and Crime* (UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME, 2009).

4.2.2.9.1. Limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)

LOD é a menor concentração de um analito que pode ser detectado e identificado com um determinado grau de certeza. O LOD também é definido como a menor concentração que pode ser distinguido do sinal-ruído com certo grau de confiança. Existem vários métodos para estimar o LOD, todos os quais dependem da análise de branco de amostras análise da relação sinal-ruído. O método utilizado neste trabalho foi o calculo do sinal-ruído, ou seja 3 vezes o sinal ruído para o LOD e 10 vezes o sinal ruído para o LOQ (UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME, 2009).

4.2.2.9.2. Linearidade

Linearidade é a capacidade de um método analítico demonstrar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. O estudo de linearidade foi realizado pela análise das amostras de sangue submetidas ao método em sextuplicatas nas seguintes concentrações de butalbital, secobarbital, pentobarbital e fenobarbital: (1,0; 2,0; 4,0; 6,0 8,0 e 10,0 µg/mL).

4.2.2.9.3. Precisão e exatidão

A precisão foi estudada para intra e interensaio e foi determinada indiretamente pelo cálculo de precisão através da determinação do coeficiente de variação do método (CV). O estudo foi conduzido analisando-se amostras de sangue

e em três dias diferentes, fortificadas com as seguintes concentrações de butalbital, secobarbital, pentobarbital e fenobarbital (2,0; 4,0 e 6,0 µg/mL). Conjuntamente foram realizadas três curvas de calibração em dias consecutivos para se determinar a exatidão. As análises foram realizadas em triplicata para cada concentração.

4.2.2.9.4. Recuperação

Para o estudo da recuperação do método, dois grupos de amostras de sangue contendo diferentes concentrações foram analisados. No primeiro grupo, consistindo de três concentrações das substâncias pesquisadas (2,0; 4,0 e 6,0 µg/mL) padrões de butalbital, secobarbital, pentobarbital, fenobarbital e padrão interno foram adicionados às amostras, as quais foram submetidas à extração conforme procedimento **4.2.2.2** em cinco replicatas para cada concentração. No segundo grupo, consistindo também de cinco replicatas para cada concentração (2,0; 4,0 e 6,0 µg/mL) padrões de butalbital, secobarbital, pentobarbital e fenobarbital foram adicionados somente após a extração. O padrão interno foi adicionado antes da extração. A recuperação absoluta foi avaliada pela área relativa média obtida no segundo grupo em relação à área relativa média obtida no primeiro.

4.2.2.9.5. Validação da diluição das amostras

Devido às concentrações terapêuticas e tóxicas serem maiores que a faixa de concentração definida no estudo de linearidade, realizou o estudo para validar a diluição. O estudo foi conduzido analisando-se amostras de sangue e em triplicata na concentração de 40 µg/mL. Realizou-se uma curva de calibração e a amostra foi diluída seis vezes e analisada por GC-MS.

4.2.2.9.6. Estudo de robustez

Nesta etapa foi avaliada a habilidade do método de não se afetar com pequenas mudanças que podem ocorrer durante as análises. Neste caso comparou-se os resultados obtidos por dois analistas diferentes, sendo um experiente e o outro não experiente. Dois grupos de amostras de sangue total contendo concentrações conhecidas de barbitúricos (butalbital, secobarbital, pentobarbital e fenobarbital) 2,0; 4,0 e 6,0 µg/mL foram processadosvsegundo o item **4.2.2.2.**

4.2.2.9.7. Estudo da estabilidade

A estabilidade dos analitos em sangue foi testada em três níveis de concentração (2,0; 4,0 e 6,0 µg/mL) em três condições diferentes: Ciclo de congelamento e descongelamento (24h; 12h e 12h), 4°C (24h) e a temperatura ambiente (20°C/8h). Foi também testada a estabilidade dos analitos pós-processamento no injetor automático do GC-MS por um período de 24 horas. Os testes de estabilidade foram realizados em triplicatas.

4.2.3. Aplicação do método em amostra de sangue total postmortem

Foram coletadas amostras de sangue cardíaco e femoral de 11 cadáveres necropsiados pelo SVO-SP que apresentaram resultados positivo (triagem) para barbitúricos. As amostras foram coletadas por médicos e/ou auxiliares de necropsia, armazenadas em frascos de plástico e mantidas congeladas (-20) até o momento da análise.

4.2.4. Determinação de barbitúricos em fígado humano

4.2.4.1. Análise quantitativa por GC-MS

Um método foi desenvolvido para a determinação de butalbital, pentobarbital, secobarbital e fenobarbital em amostras de fígado por GC-MS e a LPME foi a técnica de extração empregada no método. Fenobarbital- d_5 foi utilizado como padrão interno.

4.2.4.2. Preparação das amostras de fígado humano

Uma porção de 10g de fígado foi homogeneizada com 30 mL de água destilada. Foram transferidos para tubos de 1,0 mL 200 μ L do homogeneizado (0,05 g de fígado) e acrescido de 0,950 mL de uma solução de HCl 0,1 mol/L juntamente com 20 μ L de solução de fenobarbital- d_5 em concentração de 5 μ g/mL.

Para o procedimento de microextração em fase líquida (LPME), foi utilizado 9 cm de fibra oca. As fibras foram imersas em óleo essencial de eucalipto por 30 segundos e em seguida imersa por 5 segundos em água destilada sob banho ultrassônico para a retirada do excesso de óleo de eucalipto. O lúmen da fibra foi preenchido com aproximadamente 30 μ L de uma solução com NaOH a 0,1 mol/L (fase aceptora). A fibra foi inserida dentro do tubo de 1 mL que continha a amostra previamente diluída.

Após agitação de 5 minutos em banho ultrassônico, o conteúdo interno da fibra foi recolhido e concentrado sob nitrogênio gasoso a 40°C. O resíduo obtido foi ressuspensionado com 10 μ L de hidróxido de trimetilfenilalanina (TMAH) e 90 μ L de acetato de etila e injetado 1 μ L no GC-MS.

4.2.4.3. Otimização do método de extração

Os parâmetros utilizados no método para determinar barbitúricos em sangue total foram os mesmos utilizados para determinar barbitúricos em amostras de fígado humano. Nesta etapa otimizou-se qual seria o tipo de óleo, fixo ou essencial para a extração dos analitos. O teste foi feito em triplicata, observando a abundância absoluta obtida no GC-MS.

4.2.4.4. Avaliação do óleo (fixo e essencial)

Os óleos testados nesta etapa foram: óleo essencial de menta, óleo essencial de eucalipto, óleo essencial de cravo, óleo de canola e óleo de oliva. As amostras foram submetidas ao procedimento descrito no item **4.2.4.2**. A eficiência da extração foi avaliada através da área absoluta formada pelos analitos frente a diferentes óleos. Para cada solvente orgânico, as análises foram conduzidas em triplicata e o mesmo experimento foi realizado com decanol para comparação.

4.2.4.5. Estudo de hidrólise enzimática para determinação de fenobarbital em amostras de fígado humano

Devido ao fenobarbital apresentar altas taxas de ligação às proteínas plasmáticas e a tecidos similares, incluindo o cérebro (40% a 60%) (MIHIC e HARRIS, 2011) decidiu-se então estudar a hidrólise enzimática do fígado e assim verificar se a recuperação do fenobarbital aumentaria com esse processo.

Para este estudo foram utilizados 2 mg da enzima proteinase Carlsberg por grama de fígado humano previamente analisado e confirmada a presença de fenobarbital.

Para o processo de homogeneização do fígado foram utilizados 10 g de fígado humano e 40 mL de tampão *tris-HCl* 1 mg/mL pH 10,5. Uma alíquota de 250 µL desse homogeneizado foi transferida para um tubo *eppendorff* e a enzima foi adicionada. Utilizou-se 55°C para a incubação e os tempos de 0, 30, 60 e 180 minutos foram testados para saber a eficiência da digestão enzimática. Após o tempo de incubação, as amostras foram extraídas segundo o item **4.2.4.2**. Os parâmetros foram baseados em um estudo de digestão enzimática publicado por Osselton et al. (1978) (OSSELTON, SHAW et al., 1978).

O estudo de digestão enzimática foi realizado com os três casos de fígado humano coletados do SVO.

4.2.4.6. Validação do método

A validação do método para determinação de barbitúricos em fígado humano foi realizada estabelecendo-se os mesmos valores de recuperação, linearidade, precisão intra e interensaio, limite de detecção e limite de quantificação segundo a *United Nations Office on Drugs and Crime* (UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME, 2009).

4.2.5. Aplicação do método em amostra de fígado humano

As amostras de fígado foram coletadas de indivíduos que deram entrada no Serviço de Verificação de Óbito da cidade de São Paulo- SVO-SP. Após a análise dos documentos do cadáver, realizou-se o teste de triagem para identificar a presença de barbitúrico. As amostras positivas foram coletadas por médicos e/ou auxiliares de necropsia, armazenadas em frascos de plástico e mantidos sob refrigeração até o momento da análise.

Dados relativos aos cadáveres foram coletados como idade e gênero.

Resultados

5. RESULTADOS

5.1. Determinação de barbitúricos em sangue total por GC-MS e LPME

Nesta seção são apresentados, o desenvolvimento, otimização e validação do método analítico desenvolvido para determinação de butalbital, secobarbital, pentobarbital e fenobarbital em amostras de sangue total por GC-MS utilizando LPME. Em seguida são mostrados os resultados obtidos com as análises de amostras de casos forenses.

Devido à polaridade dos barbitúricos, utilizou-se o recurso da derivatização para melhorar o desempenho das análises por GC-MS. Essa reação de metilação, denominada *flash methylation*, ocorre dentro do injetor do GC-MS a 250°C (Figura 7). A *flash methylation* ocorre no anel barbitúrico, estrutura essa comum para todos os barbitúricos analisados nesse trabalho (OSIEWICZ, AGGARWAL et al., 1974; MULE e CASELLA, 1989; POCCI, DIXIT et al., 1992; RANZ e LANKMAYR, 2006; JOHNSON e GARG, 2010).

Figura 7. Reação de derivatização do ácido barbitúrico com Hidróxido de Trimetilalanilina

5.1.2. Cromatograma característico e espectros de massa butalbital, secobarbital, pentobarbital e fenobarbital

A Figura 8 ilustra um perfil cromatográfico obtido com a análise de uma amostra de sangue total adicionada de butalbital, secobarbital, pentobarbital e fenobarbital submetida ao método proposto. Na Figura 9 são apresentados os espectros de massa do dimetilbutalbital, dimetilsecobarbital, dimetilpentobarbital e dimetilfenobarbital (formados pela metilação dos barbitúricos pela reação de derivatização).

Figura 8. Cromatograma (GC-MS) obtido através da análise de uma amostra sangue total adicionada de butalbital (A), pentobarbital (B), secobarbital (C) e fenobarbital (D). Os íons usados para a geração do cromatograma foram:

196+201+184+232.

Figura 9. Espectros de massa (GC-MS) obtidos dos padrões metilados de butalbital (A), pentobarbital (B), secobarbital (C) e fenobarbital (D).

5.1.3. Otimização do método de extração

No presente trabalho foi proposto o desenvolvimento e aplicação da LPME e a GC-MS para a determinação de barbitúricos em amostras *postmortem*. Inicialmente, partiu-se do pressuposto que o meio da fase doadora teria que ser ácido (pH 3) para que o fenobarbital se mantivesse em sua forma molecular. O solvente escolhido para ser impregnado na fibra foi o octanol e a fase aceptora foi um tampão básico (pH 11) (UGLAND, KROGH et al., 2003).

Foi verificado então que a extração sucedeu-se e que havia a necessidade de otimizar alguns parâmetros como: pH da fase extratora, pH da fase doadora, tipo do solvente orgânico e tempo de agitação.

5.1.3.1. Avaliação da concentração de NaOH empregada na fase aceptora em agitador orbital

Na Figura 10 observa-se que a melhor fase aceptora para extração do fenobarbital foi a concentração de 0,001 mol/L. Pode-se observar que concentrações acima de 0,001 mol/L ou abaixo tiveram valores de área absoluta inferiores.

Figura 10. Avaliação da concentração de NaOH na fase aceptora para a microextração em fase líquida.

5.1.3.2. Avaliação do solvente orgânico

Na Figura 11 é possível visualizar que o decanol foi o solvente orgânico que apresentou melhor resultado na extração do fenobarbital.

Figura 11. Avaliação do decanol, éter diexílico e octanol na extração do fenobarbital por LPME.

5.1.3.3. Avaliação da solução doadora

Devido às características químicas do fenobarbital, a solução doadora deve ser um ácido o que nos levou a avaliar o tampão acetato pH 3,0, HCl 0,1 mol/L e 1 mol/L. Na Figura 12 é possível visualizar que o HCl 0,1 mol/L foi a melhor fase aceptora dentre as testadas.

Figura 12. Avaliação do pH da fase doadora.

5.1.3.4. Avaliação do tempo de agitação das amostras

O melhor tempo de agitação encontrado para o sistema de extração foi de 2 horas (Figura 13).

Figura 13. Avaliação do tempo de agitação na extração do fenobarbital por LPME.

5.1.3.5. Análise superfície de resposta

As avaliações citadas anteriormente possuem um enfoque univariado e que não permite avaliar o conjunto dos fatores ao mesmo tempo. Ou seja, não é possível avaliar como os fatores influenciam simultaneamente em uma variável dependente, no caso a variável dependente é a quantidade que se extrai da amostra. No entanto a combinação dos fatores somente pode ser avaliada empregando um planejamento fatorial. Para esse estudo, utilizou-se o programa *Design Expert 8.0* e o experimento foi o de Box-Behnken (FERREIRA, BRUNS, DA SILVA et al., 2007; FERREIRA, BRUNS, FERREIRA et al., 2007).

Nas Figuras 14 e 15, é possível observar que a melhor condição para a LPME seria utilizar a fase aceptora a 0,1mol/L e os demais fatores não foram estatisticamente significantes, no entanto as condições da fase aceptora e tempo de

agitação testados não são determinantes para nosso experimento, o que demonstra que o emprego de um planejamento fatorial é de suma importância e nos possibilita a análise de como os fatores influenciam na variável em estudo.

Figura 14. Análise superfície de resposta que demonstra a concentração de NaOH em mol/L da fase aceptora e a concentração de HCl em mol/L da fase doadora

Figura 15. Análise superfície de resposta que demonstra o tempo de agitação da amostra à concentração de NaOH em mol/L.

5.1.4. Validação do método

A validação do método foi realizada estabelecendo-se os valores de recuperação, linearidade, precisão intra e interensaio, limite de detecção e limite de quantificação segundo à *United Nations Office on Drugs and Crime* (UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME, 2009).

5.1.4.1. Limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) dos analitos obtidos para o método proposto para determinação de butalbital, secobarbital, pentobarbital e fenobarbital em amostras de sangue total foram de 0,5 µg/mL para LOD e 1,0 µg/mL para LOQ.

5.1.4.2. Linearidade

Para o estudo de linearidade, a faixa de trabalho estudada foi de 1 a 10 µg/mL. Para todos os analitos estudados a curva de calibração foi apropriada com r^2 superior a 0,99 (Figuras 16, 17, 18 e 19).

Figura 16. Estudo da linearidade do butalbital em sangue total (faixa 1-10 $\mu\text{g/mL}$).

Figura 17. Estudo da linearidade do secobarbital em sangue total (faixa 1-10 $\mu\text{g/mL}$).

Figura 18. Estudo da linearidade do pentobarbital em sangue total (faixa 1-10 µg/mL).

Figura 19. Estudo da linearidade do fenobarbital em sangue total (faixa 1-10 µg/mL).

5.1.4.3. Precisão e exatidão

Os resultados de precisão intra-ensaio e interensaio obtidos para a determinação dos barbitúricos em sangue total são apresentados na Tabela 3. Os valores encontrados são adequados para métodos cromatográficos.

Tabela 3. Valores de precisão intra e interensaios e exatidão obtidos com a aplicação do método proposto em amostras de sangue.

	butalbital	secobarbital	pentobarbital	fenobarbital
Precisão intra-dia (CV%)				
CQ1	10,3	8,6	11,5	11,7
CQ2	6,3	6,9	7,0	6,7
CQ3	5,0	5,1	5,9	6,6
Precisão interdia (CV%)				
CQ1	8,7	7,4	13,7	16,3
CQ2	5,3	6,4	4,6	5,7
CQ3	3,3	3,4	5,3	8,9

CQ1 – 2,0 µg/mL, CQ2 – 4,0 µg/mL e CQ3 – 6,0 µg/mL

Os resultados de exatidão realizados em 3 dias consecutivos estão demonstrados na Tabela 4.

Tabela 4 – Resultados do estudo de exatidão realizado em três dias consecutivos.

		butalbital	secobarbital	pentobarbital	fenobarbital
1 dia (%)	CQ1	99	97	109	117
	CQ2	100	103	102	102
	CQ3	102	103	108	97
2 dia (%)	CQ1	99	82	85	114
	CQ2	107	96	104	90
	CQ3	108	100	109	92
3 dia (%)	CQ1	105	107	104	116
	CQ2	112	115	113	117
	CQ3	107	109	109	114

CQ1 – 2,0 µg/mL, CQ2 – 4,0 µg/mL e CQ3 – 6,0 µg/mL

5.1.4.4. Recuperação

Os valores de recuperação obtidos para a determinação dos barbitúricos em amostras de sangue total são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Valores de recuperação obtidos com a aplicação do método proposto em amostras sangue *postmortem*.

	butalbital	secobarbital	pentobarbital	fenobarbital
CQ1 (%)	12	15	13	6
CQ2 (%)	13	15	17	7
CQ3 (%)	15	19	16	11

CQ1 – 2,0 µg/mL, CQ2 – 4,0 µg/mL e CQ3 – 6,0 µg/mL

5.1.4.5. Validação da diluição das amostras

Devido à faixa de trabalho ser até 10 µg/mL, houve a necessidade de se validar a diluição das amostras devido à faixa terapêutica dos barbitúricos ser bastante ampla, podendo chegar a 40 µg/mL. A faixa de trabalho não contempla concentrações acima de 10 µg/mL devido necessidade de se economizar padrões analíticos. Os valores de exatidão encontrados foram entre 90-103%

5.1.4.6. Robustez

Neste estudo avaliou-se a capacidade do método em se sustentar mesmo com pequenas mudanças no procedimento. Comparou-se então o preparo de dois grupos de amostras de sangue total contendo concentrações conhecidas de barbitúricos preparadas por dois analistas distintos (um experiente e um pouco experiente). O método se manteve dentro dos parâmetros aceitáveis de robustez para validação analítica com variações entre 80,0 – 117,1% (Tabela 6).

Tabela 6. Resultados do estudo da robustez do método analítico proposto.

	butalbital	secobarbital	pentobarbital	fenobarbital
CQ1 (%)	104,0	99,6	87,1	117,1
CQ2 (%)	97,5	100,3	80,4	104,4
CQ3 (%)	98,4	98,7	80,0	108,6

CQ1 – 2,0 µg/mL, CQ2 – 4,0 µg/mL e CQ3 – 6,0 µg/mL

5.1.4.7. Estudo da estabilidade

A estabilidade dos analitos foi determinada em diferentes condições: estabilidade pós-processamento (24h no auto injetor), ciclo de congelamento e descongelamento (24, 12 e 12 h), temperatura ambiente (8 h) e estabilidade em

refrigeração (24h). Todos os barbitúricos se mantiveram estáveis sob as condições estudadas (Tabela 7).

Tabela 7. Resultados do estudo da estabilidade do método analítico proposto.

	butalbital	secobarbital	pentobarbital	fenobarbital
<i><u>8 Horas a temperatura ambiente (bancada) (%)</u></i>				
CQ1	110,5	98,7	89,6	116,2
CQ2	106,3	105,7	120,3	115,5
CQ3	98,1	96,0	81,0	109,2
<i><u>24 horas a 5°C (%)</u></i>				
CQ1	101,4	94,9	86,9	88,1
CQ2	107,3	112,0	118,8	105,6
CQ3	97,0	93,5	99,9	93,8
<i><u>3 ciclos de congelamento e descongelamento (24h, 12h e 12h) (%)</u></i>				
CQ1	94,2	98,3	80,4	112,3
CQ2	94,1	104,7	105,8	101,3
CQ3	88,5	88,5	90,8	99,8
<i><u>Pós-processamento - 24 horas no injetor (GC-MS) a temperatura ambiente(%)</u></i>				
CQ1	97,7	94,8	94,5	110,8
CQ2	100,9	103,8	101,4	98,5
CQ3	106,1	112,0	104,7	109,6

CQ1 – 2,0 µg/mL, CQ2 – 4,0 µg/mL e CQ3 – 6,0 µg/mL

5.1.5. Aplicação do método em amostra de sangue total postmortem

O método foi aplicado em amostras reais de indivíduos que vieram a óbito e foram atendidos no SVO-SP. A Figura 20 ilustra o perfil cromatográfico de uma amostra de sangue total de um cadáver, uma amostra de sangue adicionada dos padrões de barbitúricos e uma amostra negativa apenas adicionada dos padrões internos.

Figura 20. (A) cromatograma obtido de amostra de sangue adicionada com: butalbital- d_5 (1), butalbital (2), pentobarbital (3), secobarbital- d_5 (4), secobarbital (5) e fenobarbital (6) na concentração de $1,0 \mu\text{g/mL}$. (B) Amostra branco adicionado os PI. (C) sangue cardíaco do caso 1 contendo $5,9 \mu\text{g/mL}$ de fenobarbital. Os íons usados para a geração do cromatograma foram: $196+201+184+232$. Picos sobrepostos são íons comuns em alguns analitos.

Os resultados das análises de sangue total cardíaco e sangue total femoral estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Concentração de fenobarbital ($\mu\text{g/mL}$) encontrada em amostras reais de sangue cardíaco e femoral.

Casos	Gênero	Idade	Sangue cardíaco $\mu\text{g/mL}$ (C)	Sangue femoral $\mu\text{g/mL}$ (F)
1	M	54	5,9	5,3
2	M	39	13,0	9,9
3	F	38	7,4	8,1
4	M	63	6,4	4,4
5	F	80	2,1	2,0
6	M	89	Neg	Neg
7	M	62	Neg	Neg
8	M	67	Neg	Neg
9	M	70	12,5	14,0
10	*	*	3,5	1,9
11	M	48	1,0	1,2

* Dados não informados. **Neg.** resultado negativo

5.2. Determinação de barbitúricos em amostras de fígado utilizando LPME e GC-MS

Um método foi desenvolvido e validado para a determinação de barbitúricos em amostras de fígado humano por LPME e GC-MS.

As condições cromatográficas foram as mesmas descritas para determinar barbitúricos em amostras de sangue total, assim como o tamanho da fibra, o pH da fase doadora e da fase aceptora e o tempo de agitação em banho ultrassônico. O padrão interno empregado nesta validação foi o fenobarbital- d_5 (com deutérios no anel fenólico). Os parâmetros de validação foram os mesmos utilizados na validação do sangue segundo recomendações estabelecidas pela *United Nations Office on Drugs and Crime* (UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME, 2009).

5.2.1. Avaliação do melhor óleo para ser utilizado na extração

Na Figura 21 é possível verificar que o óleo de eucalipto foi o que apresentou melhor resultado. Na Figura 22 são apresentados cromatogramas para ilustrar a eficácia dos óleos essenciais e fixo na extração de barbitúricos em amostras de fígado. Na Figura 23 mostra um perfil cromatográfico obtido com a análise de uma amostra de sangue adicionado dos barbitúricos e submetido ao método proposto.

Figura 21. Análise comparativa da recuperação dos barbitúricos com diferentes óleos.

Figura 22. Cromatogramas comparando os diferentes óleos testados para LPME.

Figura 23. Cromatograma obtido com a extração de amostra de sangue utilizando óleo essencial de eucalipto. (A) TIC (B) íons extraídos. Os padrões adicionados foram: butalbital (1 – $m/z=196$), pentobarbital (2 - $m/z=184$), secobarbital (3 - $m/z=196$) e fenobarbital (4 - $m/z=232$).

5.2.2. Estudo da digestão enzimática para determinação de fenobarbital em amostras de fígado humano.

A digestão enzimática é uma técnica empregada em métodos analíticos para melhorar a recuperação, pois alguns fármacos têm altas taxas de ligações com proteínas (OSSELTON, SHAW et al., 1978; DICKSON, CLEARY et al., 1980). Porém os resultados encontrados não foram os esperados, pois a aplicação da enzima não aumentou a recuperação do fenobarbital, conforme pode ser visualizado na Figura

24. A utilização do procedimento de digestão enzimática está descartada do nosso trabalho.

Figura 24. Estudo da digestão enzimática de fígado humano para aumentar a eficiência da recuperação de fenobarbital.

5.2.3. Validação do método

A validação do método foi realizada estabelecendo-se os valores de recuperação, linearidade, precisão intra e interensaio, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação, seguindo o modelo de estudo da validação em sangue total (UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME, 2009).

5.2.3.1. Limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) dos analitos obtidos para o método proposto para determinação de butalbital, secobarbital, pentobarbital e fenobarbital em amostras de fígado foram de 0,5µg/g para LOD e 1,0µg/g.

5.2.3.2. Linearidade

Para o estudo de linearidade, a faixa de trabalho estudada foi de 1 a 10 µg/g. Para todos os analitos estudados a curva de calibração foi apropriada com r^2 superior a 0,99 (Figuras 25, 26, 27 e 28).

Figura 25. Estudo da linearidade do butalbital em amostra de fígado (faixa 1-10µg/g).

Figura 26. Estudo da linearidade do secobarbital em amostra de fígado (faixa 1-10µg/g).

Figura 27. Estudo da linearidade do pentobarbital em amostra de fígado (faixa 1-10 $\mu\text{g/g}$).

Figura 28. Estudo da linearidade do butalbital em amostra de fígado (faixa 1-10 $\mu\text{g/g}$).

5.2.3.3. Precisão e exatidão

Os resultados de precisão intra-ensaio e interensaio obtidos para a determinação dos barbitúricos em sangue total são apresentados na Tabela 9. Os valores encontrados são adequados para métodos cromatográficos.

Tabela 9. Valores de precisão intra e interensaio obtidos com a aplicação do método proposto em amostras de fígado

	butalbital	secobarbital	pentobarbital	fenobarbital
Precisão intra-dia (CV%)				
CQ1	7,7	6,0	11,5	11,7
CQ2	10,3	13,7	7,3	5,7
CQ3	7,5	14,1	5,2	8,9
Precisão inter-dia (CV%)				
CQ1	6,8	16,1	12,8	5,4
CQ2	8,7	9,6	7,7	4,8
CQ3	10,4	10,5	9,3	6,1

CQ1 – 2,0 µg/g, CQ2 – 4,0 µg/g e CQ3 – 6,0 µg/g

Os resultados de exatidão realizados em 3 dias consecutivos estão demonstrados na Tabela 10.

Tabela 10. Estudo de exatidão realizada em três dias consecutivos em amostras de fígado

		butalbital	secobarbital	pentobarbital	fenobarbital
1 dia	CQ1 (%)	98	95	112	92
	CQ2 (%)	98	102	113	87
	CQ3 (%)	99	94	110	89
2 dia	CQ1 (%)	103	111	113	99
	CQ2 (%)	91	102	100	86
	CQ3 (%)	90	103	102	86
3 dia	CQ1 (%)	115	105	87	89
	CQ2 (%)	101	97	97	101
	CQ3 (%)	102	91	91	91

CQ1 – 2,0 µg/g, CQ2 – 4,0 µg/g e CQ3 – 6,0 µg/g

5.2.3.4. Recuperação

Os valores de recuperação obtidos para a determinação dos barbitúricos em amostras de sangue total são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Valores de recuperação obtidos com a aplicação do método proposto em amostras de fígado

	butalbital	secobarbital	pentobarbital	fenobarbital
CQ1 (%)	24	13	18	26
CQ2 (%)	20	18	21	21
CQ3 (%)	23	14	19	23

CQ1 – 2,0 µg/g, CQ2 – 4,0 µg/g e CQ3 – 6,0 µg/g

5.2.3.5. Validação da diluição das amostras

Devido à faixa de trabalho ser até 10µg/g, houve a necessidade de se validar a diluição das amostras devido à faixa terapêutica dos barbitúricos ser bastante ampla, podendo chegar a 40µg/g. A faixa de trabalho não contempla concentrações acima de 10µg/g devido necessidade de se economizar padrões analíticos. Desta forma, realizou-se o preparo de amostras de 40 e 50µg/g de fígado e diluíram-se as amostras dez vezes. Os resultados variam entre 100-115%.

5.2.4. Aplicação do método em amostra de fígado humano

O método foi aplicado em amostras de fígado *postmortem* de indivíduos que vieram a óbito e foram atendidos no SVO-SP (Tabela 12). A Figura 29 ilustra o perfil cromatográfico de uma amostra fígado de um cadáver contendo 9,3 µg/g de fenobarbital, uma amostra de fígado adicionada dos padrões de barbitúricos e de uma amostra negativa adicionada do padrão interno.

Figura 29. (A) cromatograma obtido de amostra de fígado adicionada com: butalbital (1), pentobarbital (2), secobarbital (3), fenobarbital- d_5 (4) e fenobarbital (5) na concentração de 5 $\mu\text{g/g}$. (B) Amostra branco adicionado o PI. (C) Fígado humano do caso 3 contendo 9,3 $\mu\text{g/g}$ de fenobarbital. Os íons usados para a geração do cromatograma foram: 196+184+237+232. Picos sobrepostos são íons comuns em alguns analitos.

Tabela 12. Concentração de fenobarbital em amostras de fígado humano.

Casos	Gênero	Idade	Fenobarbital concentração (µg/g)
1	M	54	11,6
2	M	39	9,5
3	F	38	9,3
4	M	70	1,3
5	F	80	16,7
6	M	89	Neg
7	M	62	Neg
8	M	67	Neg

Neg. resultado negativo

5.3. Análise comparativa dos resultados de fenobarbital em amostras de sangue total e fígado humano

A correlação da concentração de fenobarbital encontrada em sangue femoral e sangue cardíaco estão demonstradas na Tabela 13. Para a razão sangue femoral/sangue cardíaco, obteve-se a média de 0,91 com o desvio padrão de 0,23. Para a correlação fígado/sangue femoral a média foi de 1,17 com desvio padrão de 1,29.

Tabela 13. Concentração de fenobarbital em amostras de sangue cardíaco, sangue femoral e fígado humano e suas razões.

Casos	Sangue femoral µg/mL (F)	Sangue cardíaco µg/mL (C)	Razão C/F	Fígado (µg/g)	Razão Fig/F
1	5,3	5,9	1,1	11,6	0,46
2	9,9	13,0	1,3	9,5	1,04
3	8,1	7,4	0,9	9,3	0,87
4	4,4	6,4	1,4	1,3	3,38
5	2,0	2,1	1,0	16,7	0,12
6	Neg	Neg		Neg	
7	Neg	Neg		Neg	
8	Neg	Neg		Neg	
9	14,0	12,5	0,9	N/D	
10	1,9	3,5	1,7	N/D	
11	1,2	1,0	0,8	N/D	

N/D – amostra não disponível

Neg. resultado negativo

Razão C/F = razão concentração sangue cardíaco / concentração sangue femoral

Razão Fig/F = razão concentração fígado / concentração sangue femoral

Discussão

6. DISCUSSÃO

6.1. Desenvolvimento de técnica de LPME para determinação de barbitúricos em sangue total por CG-MS

A LPME é uma técnica bastante promissora para ser aplicada em amostras biológicas, pois proporciona a capacidade de concentrar os analitos e promover uma microfiltração devido aos tamanhos dos poros. Além disso, soma-se ao baixo custo, praticidade e o emprego de solventes orgânico ser praticamente nulo (PEDERSEN-BJERGAARD e RASMUSSEN, 2008).

Quando se manipula espécimes biológicos complexos, como o sangue total, seus constituintes naturais interferem nos métodos analíticos, principalmente quando se utiliza técnicas convencionais de preparo de amostras. A aplicação da LPME em análise de sangue total mostrou ser bastante eficiente, pois devido ao tamanho dos poros é possível realizar uma microfiltração e bloquear a passagem de macromoléculas, resultando assim em um extrato bastante limpo (OLIVEIRA, MAGALHÃES et al., 2008).

O que é bastante atrativo na técnica de LPME é o custo da fibra: nos métodos desenvolvidos, o custo da fibra para cada extração foi em torno de R\$ 0,20 (9 cm). O que deve ser levado em consideração também é a não existência de *carryover*, pois cada dispositivo (fibra) é utilizado apenas uma vez e é posteriormente descartado, o que não ocorre com outra técnica miniaturizada, a SPME.

A LPME é uma forma miniaturizada da consagrada extração líquido-líquido, porém ao contrário da extração convencional, na LPME empregam-se quantidades muito pequenas de solventes orgânicos. Existe ainda a possibilidade da substituição dos solventes orgânicos por óleos essenciais ou óleos fixos de plantas, tornando,

assim, a LPME uma técnica de extração livre de solvente orgânico (PEDERSEN-BJERGAARD e RASMUSSEN, 2004; MENCK, OLIVEIRA et al., 2012).

Classicamente, o procedimento da LPME era bastante laborioso e necessitava-se de seringas, suporte universal, agitadores e barras magnéticas, além da possibilidade de processar uma única amostra por vez. Na Figura 30 é possível visualizar um procedimento de LPME tradicional empregando seringas na configuração em “U”. Após analisarmos os mecanismos de extração, pudemos aperfeiçoar esse processo aplicando algumas mudanças na técnica.

Figura 30. Configuração em “U” da LPME, utilizando seringas, agitador magnético e barras de agitação.

Em nosso estudo desenvolvemos outra maneira de se preparar as fibras, de inserir a fase aceptora e o modo de agitação. A inserção da fase aceptora no lúmen da fibra não foi mais realizada com seringas de cromatografia, e sim, utilizando

micropipetas acopladas a uma ponteira de ponta fina (utilizada normalmente para aplicação de eletroforese em gel) (Figura 31).

Figura 31. Emprego da micropipeta e ponteira de eletroforese para inserir a fase aceptora no lúmen da fibra.

A seringa de cromatografia, além de ser utilizada para o preenchimento do lúmen da fibra, era também utilizada como suporte, para segurar a fibra. Porém, em nosso método não empregamos mais nenhum suporte para segurar a fibra. A fibra foi colocada em forma de “U” diretamente dentro do frasco com o auxílio de uma pinça metálica observando o volume da amostra para que as extremidades da fibra não ficassem submersas no líquido (Figura 32).

Figura 32. Configuração em “U” para LPME.

A utilização de um agitador magnético era necessária, porém devido a não utilização de suportes para a técnica desenvolvida, utilizou-se, então, um banho ultrassônico para agitação do sistema. A eficácia da extração na LPME (sistemas em três fases) é dependente da passagem do analito da fase aquosa através dos poros da fibra (impregnado com solvente orgânico) para a fase aceptora aquosa. No entanto, não é um equilíbrio, pois esse sistema funciona como uma espécie de armadilha. Ou seja, as moléculas de interesse quando chegam ao lúmen da fibra encontram um meio o qual as tornará um íon, impossibilitando assim o seu retorno à fase doadora. É sabido que o tempo de extração é um fator fundamental para a extração, porém estabelecemos o mínimo de tempo (5 min) em banho ultrassônico para realizar uma análise rápida. O aperfeiçoamento dessa técnica em nossos experimentos nos permitiu, assim, o processamento de várias amostras simultaneamente (MENCK, LIMA et al., 2012; MENCK, OLIVEIRA et al., 2012).

No presente trabalho foi proposto o desenvolvimento de um método analítico empregando a LPME e GC-MS para a determinação de barbitúricos em amostras *postmortem*. Inicialmente, partiu-se do pressuposto que o meio da fase doadora teria que ser ácido (pH 3) para que o fenobarbital se mantivesse em sua forma molecular. O solvente escolhido para ser impregnado na fibra foi o octanol e a fase aceptora foi um tampão básico (UGLAND, KROGH et al., 2003).

Verificou-se então que a extração sucedeu-se e que havia a necessidade de otimizar alguns parâmetros como: pH da fase extratora, pH da fase doadora, tipo do solvente orgânico e tempo de agitação.

Nesta avaliação pôde-se observar que o pH 11 da solução da fase aceptora foi melhor. O pH mais alto demonstrou melhor desempenho na extração devido ao valor do pKa dos barbitúricos ser em torno de 7,4 (Figura 10).

Após a avaliação do pH para a fase aceptora, passamos para a avaliação do solvente orgânico. Neste momento fixamos o valor de pH da fase aceptora em 11 e pH 3 para fase doadora. O melhor resultado obtido foi com o emprego do decanol e este foi o escolhido para prosseguir com a otimização do método.

Foi definido então o pH ideal da fase aceptora, o solvente orgânico e partiu-se então para a avaliação do tempo de agitação (agitador orbital) e observamos que o melhor tempo para a LPME foi de 2 horas. Devido à característica ácida dos barbitúricos testamos as seguintes soluções ácidas como fase doadora: tampão acetato pH 3,0, HCl 0,1 mol/L e 1 mol/L. No entanto o HCl 0,1 mol/L apresentou melhor resultado.

Entretanto, as avaliações abordadas anteriormente possuem um enfoque univariado e que não permite avaliar o conjunto dos fatores ao mesmo tempo. Ou seja, não é possível avaliar como os fatores influenciam simultaneamente em uma

variável dependente. No entanto a combinação dos fatores somente pode ser avaliada empregando um planejamento fatorial. Para esse estudo, utilizou-se o programa *Design Expert 8.0* e o experimento foi o de Box-Behnken (FERREIRA, BRUNS, DA SILVA et al., 2007; FERREIRA, BRUNS, FERREIRA et al., 2007).

Nas Figuras 14 e 15, é possível observar que a melhor condição para a LPME seria a fase aceptora a 0,1 mol/L e os demais fatores não foram estatisticamente significantes, no entanto as condições da fase aceptora e tempo de agitação testados não são determinantes para nosso experimento, o que demonstra que o emprego de um planejamento fatorial é de suma importância e nos possibilita a análise de como os fatores influenciam na variável em estudo.

Após a definição dos parâmetros de preparo de amostra, decidiu-se testar a utilização um banho ultrassônico para agitação do sistema e assim diminuir o tempo de agitação que era de 30 minutos em agitador orbital para 5 minutos em banho ultrassônico. Com o aperfeiçoamento dessa técnica em nossos experimentos nos permitiu assim o processamento de várias amostras simultaneamente.

6.2. Validação do método de LPME para determinação de barbitúricos em sangue total por CG-MS

O padrão interno deuterado é amplamente utilizado em métodos analíticos utilizando a espectrometria de massas, porém, em nossas análises foi verificado que a utilização do fenobarbital- d_5 com deutérios na cadeia lateral era inviável, pois, quando este reagia com os elétrons da fonte de íons do equipamento, percebeu-se que o analito perdia precisamente a porção deuterada da estrutura, fragmentando-se como o fenobarbital e impossibilitando a diferenciação entre o composto deuterado e o sem os deutérios (Figura 34).

Figura 33. Fragmentação do N,N-dimetilfenobarbital (A) e do N,N-dimetilfenobarbital d_5 (B).

Devido à impossibilidade de se utilizar o fenobarbital- d_5 (deutérios na cadeia lateral) como padrão interno, foi utilizado o secobarbital- d_5 como padrão interno para o secobarbital. O butalbital- d_5 foi utilizado como padrão interno para butalbital, pentobarbital e fenobarbital.

A recuperação dos barbitúricos foi baixa, entre 6-19%, porém, é satisfatória em técnicas miniaturizadas. Esse valor de recuperação poderia ser maior se as amostras fossem submetidas a maior tempo de agitação. No entanto, decidiu-se não

aumentar o tempo de extração, pois os valores encontrados para a recuperação foram aceitáveis. Dessa maneira o método apresentou-se mais rápido.

Portanto, a recuperação sendo satisfatória foi possível atingir bons valores de LOD e LOQ no método desenvolvido 0,5 µg/mL e 1,0 µg/mL respectivamente. Estes valores de LOQ e LOD são suficientes e capazes de determinar concentrações sub e terapêuticas dos barbitúricos e estão de acordo com outros métodos analíticos similares descritos na literatura científica (POCCI, DIXIT et al., 1992; ELISA CAPELLA-PEIRO, GIL-AGUSTI et al., 2002; SAKA, UEMURA et al., 2008; JOHNSON e GARG, 2010; FRITCH, BLUM et al., 2011).

Tanto a precisão interensaio como a intra-ensaio produziram valores adequados para métodos cromatográficos, obtendo-se valores de coeficientes de variação menores que 15% para a precisão intra-ensaio e menores que 20% para a precisão interensaio. O método se mostrou ser exato nos três dias estudados, com variação entre 90-117% (UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME, 2009).

Para o estudo de linearidade, a faixa de trabalho escolhida foi 1-10 µg/mL. Essa faixa de trabalho não contempla a janela terapêutica de alguns barbitúricos, como por exemplo, a do fenobarbital (1-30 µg/mL). No entanto houve a necessidade da economia de padrões analíticos certificados. Desta forma, para contemplar maiores concentrações, realizou-se a validação da diluição das amostras. Foram preparadas seis amostras de sangue total na concentração de 40 µg/mL e diluíram-se as amostras para verificar a exatidão. Os resultados variam entre 90-103%, demonstrando que amostras com concentrações acima da faixa de trabalho podem ser diluídas e analisadas com confiabilidade.

O conceito de robustez de um método analítico é definido como a capacidade do método se manter inalterado mesmo com pequenas variações em seus parâmetros (PETERS e MAURER, 2002). Em nosso caso, optou-se por comparar as diferenças entre as análises realizadas por um analista experiente e por um analista não-experiente. Ambos os analistas procederam a série de amostras de sangue com concentrações conhecidas de 2,0, 4,0 e 6,0 $\mu\text{g/mL}$ de todos os barbituratos. Os resultados encontrados variaram entre 80,4-117,1%, o que é aceitável pelos guias de validação analítica (UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME, 2009).

A estabilidade dos barbitúricos em sangue total foi estudada através do: ciclo de congelamento e descongelamento teste a temperatura ambiente e à estabilidade dos analitos pós-processamento, ou seja, no injetor automático do GC-MS. Os resultados encontrados estão dentro dos aceitáveis 80-120% (PETERS e MAURER, 2002).

As condições cromatográficas empregadas foram adequadas, possibilitando boa separação e resolução dos picos de interesse e sem a presença de interferentes. O tempo empregado para cada análise foi de 12 min. Para a detecção dos analitos no espectrômetro de massas, utilizou-se o método de varredura (*full scan*). Neste modo, o equipamento gera um espectro completo ($50\text{-}300m/z$), fornecendo melhor informação quando se deseja identificar a substância.

O método proposto consiste basicamente no emprego da técnica de microextração em fase líquida. Após a extração, as amostras foram evaporadas (concentradas) em nitrogênio, ressuspendidas com 90 μL de acetato de etila e 10 μL do agente derivatizante e injetadas no GC-MS, a reação de metilação ocorre dentro

do injetor (*flash methylation*), ou seja, esse procedimento não é um passo a mais no preparo das amostras.

O método desenvolvido permitiu a determinação e confirmação do butalbital, pentobarbital, secobarbital e fenobarbital em amostras de sangue total *postmortem* utilizando LPME. Essa técnica de preparo de amostras é bastante relevante em análises toxicológicas *postmortem*, uma vez que permite analisar amostras de sangue total.

6.3. Validação do método de LPME para determinação de barbitúricos em fígado *postmortem* por CG-MS

Um método foi desenvolvido e validado para a determinação de barbitúricos em amostras de fígado humano por LPME e GC-MS.

As condições cromatográficas foram as mesmas descritas para determinar barbitúricos em amostras de sangue total, assim como o tamanho da fibra, o pH da fase doadora e da fase aceptora, tempo de agitação em banho ultrassônico e as condições cromatográficas. O padrão interno empregado nesta validação foi o fenobarbital- d_5 (com deutérios no anel fenólico). Os parâmetros de validação foram os mesmos utilizados na validação do método em sangue segundo recomendações estabelecidas pela *United Nations Office on Drugs and Crime* (UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME, 2009).

Neste método de extração decidimos não mais utilizar solvente orgânico (decanol) no processo de microextração em fase líquida, embora na LPME empregam-se quantidades mínimas de solventes orgânicos, substituímos então o decanol por óleo essencial de eucalipto. Essa substituição nos permitiu desenvolver um método analítico com um enfoque em *green chemistry* ou “química verde” em

português (PEDERSEN-BJERGAARD e RASMUSSEN, 2008; MENCK, OLIVEIRA et al., 2012).

O problema encontrado com a utilização do padrão interno deuterado de fenobarbital foi solucionado com a aquisição do padrão interno deuterado no anel e não na cadeia lateral (Figura 35).

Figura 34. Fenobarbital-d₅ com os átomos de deutério no anel fenólico.

Com a aquisição deste composto, conseguiu-se aplicá-lo como padrão interno na validação do método em amostras de fígado humano. Na Figura 35 é possível visualizar a diferença entre o espectro de massas do fenobarbital-d₅ (deutérios no anel) com m/z 237,1 e o não deuterado com m/z 232,1, o que não ocorria quando tentamos utilizar o fenobarbital com os deutérios na cadeia lateral. Antes da análise destes compostos, os analitos foram submetidos à reação de derivatização com TMAH, formando, assim, o dimetilfenobarbital.

Figura 35. Espectro de massas do N,N-dimetilfenobarbital (A) e do N,N-dimetilfenobarbital d₅ (B).

Como relatado anteriormente, neste método decidimos não mais utilizar solvente orgânico (decanol) no processo de microextração em fase líquida. Após estudarmos alguns óleos (fixos e essenciais), o óleo essencial de eucalipto foi escolhido, pois foi o que apresentou melhor recuperação dos analitos em amostras de fígado e também por apresentar um cromatograma mais limpo visualmente.

Antes de se iniciar a validação analítica deste método, aplicou-se teste de digestão enzimática. A digestão enzimática é um procedimento empregado em métodos analíticos para melhorar a recuperação, pois alguns fármacos têm altas taxas de ligações com proteínas (OSSELTON, SHAW et al., 1978; DICKSON,

CLEARY et al., 1980). O método de digestão enzimática foi utilizado para avaliar se esse procedimento aumentaria o desempenho da extração do fenobarbital. Porém, os resultados encontrados não foram os esperados, pois a aplicação da enzima não aumentou a recuperação do fenobarbital (Figura 24). Portanto, a utilização do procedimento de digestão enzimática foi descartada do trabalho.

A recuperação dos barbitúricos foi baixa, entre 13-26% o que é satisfatória para essa técnica. O que se percebe é que a porcentagem extraída utilizando óleo essencial de eucalipto foi maior quando comparada com decanol utilizado para as amostras de sangue total. Esse valor de recuperação poderia ser maior se as amostras fossem submetidas a maior tempo de agitação. Porém, como os valores encontrados foram satisfatórios, optou-se por realizar um método mais rápido (PEDERSEN-BJERGAARD e RASMUSSEN, 2008).

Para o estudo de linearidade, a faixa de trabalho escolhida foi 1-10 μ g/g. Assim como ocorreu nas análises em amostras de sangue, essa faixa de trabalho também não contempla a janela terapêutica dos barbitúricos, mas foi utilizada devido a necessidade de se economizar padrões analíticos. Desta forma, realizou-se o preparo de amostras de 40 e 50 μ g/g de fígado e diluíram-se as amostras dez vezes. Os resultados variam entre 100-115%.

Tanto a precisão interensaio como a intra-ensaio produziram valores adequados para métodos cromatográficos, obtendo-se valores de coeficientes de variação menores que 15% para a precisão interensaio e menores que 20% para a precisão intra-ensaio. A utilização do fenobarbital-d₅ como PI deve ter contribuído para obtenção desses valores. O método se mostrou exato nos três dias estudados com variação entre 85-115%.

As condições cromatográficas empregadas foram adequadas, possibilitando uma boa separação e resolução dos picos de interesse e sem a presença de interferentes. O tempo empregado para cada corrida cromatográfica foi de 12 min. Para a detecção dos analitos no espectrômetro de massas, utilizou-se o método de varredura (*full scan*). Neste modo, o equipamento gera um espectro completo (50-300m/z), fornecendo melhor informação quando se deseja identificar a substância.

O método desenvolvido e validado permitiu a determinação e confirmação do fenobarbital em amostras de fígado *postmortem* utilizando LPME. Essa técnica de preparo de amostras é bastante relevante em análises toxicológicas *postmortem*, pois permite analisar amostras de sangue total.

6.4. Interpretação dos resultados *postmortem* encontrados com a aplicação dos métodos desenvolvidos

Na grande maioria, um caso chega ao laboratório de toxicologia forense com suspeita de que droga/fármaco estejam presentes. Os exames toxicológicos forenses devem ser realizados para auxiliar na investigação judicial. Em muitos casos os exames toxicológicos são decisivos para o desfecho de uma investigação (OSSELTON, MOFFAT et al., 2011). Devido ao aumento recorrente de fármacos e drogas de abuso, a toxicologia forense vem se tornando cada vez mais importante em caso de investigação médico-legal. A introdução de novas substâncias no mercado demanda um alto nível de conhecimento entre patologistas e toxicologistas. Assim como no desenvolvimento de tecnologias para a determinação dessas substâncias em amostras biológicas (DRUID, 2006).

A correta interpretação de resultados em toxicologia *postmortem* é baseada na experiência de patologistas forenses, pois os mesmos são os responsáveis por

determinar a causa da morte. No entanto, toxicologistas forenses podem ser consultados em caso de achados analíticos. O ideal é que esses dois profissionais troquem informações sobre os casos e achados, pois existem muitos fatores que devem ser levados em consideração para a interpretação de um resultado (KOSKI, 2005).

Para a correta interpretação de um resultado toxicológico *postmortem*, o toxicologista deve levar em consideração: o histórico do caso, o local onde foram coletadas as amostras biológicas e se elas são adequadas, realizar as análises toxicológicas e por último interpretar esses resultados. Essas etapas são mais detalhadas na Figura 36 (KOSKI, 2005; WONG, 2011). Conhecer o volume de distribuição (Vd), o índice terapêutico, e as doses potencialmente letais de drogas/fármacos podem ajudar os toxicologistas na seleção das amostras adequadas que serão colhidas para análise toxicológica, assim como os métodos analíticos (OSSELTON, MOFFAT et al., 2011). Em caso de se coletar amostras de sangue, deve-se lembrar que a concentração *postmortem* de fármacos em amostras de sangue pode variar de um local do corpo para outro e normalmente é mais elevada em sangue da cavidade cardíaca. Sempre que possível, amostras de sangue devem ser coletadas de dois locais diferentes, cavidade cardíaca e região periférica. Caso não haja necrópsia do cadáver, somente sangue periférico deve ser coletado. Devido à alta possibilidade de contaminação, sangue da cavidade torácica e cavidade abdominal devem ser evitados, a menos que o sangue dessas regiões sejam os únicos disponíveis. Deve-se sempre identificar a região que foi coletada a amostra de sangue, pois a região de coleta, em alguns casos, é determinante na interpretação dos casos (SKOPP, 2004; DRUID, 2006). Portanto, o sangue femoral é a matriz biológica recomendada para a quantificação de fármacos, porém muitos

patologistas ainda persistem em submeter sangue cardíaco ou pior ainda, fluido do tórax ou da cavidade pleural como substituinte da amostra de sangue adequada (KUGELBERG e JONES, 2007).

O fígado é a segunda amostra de escolha em casos forenses, porém, deve-se coletar a uma porção do lobo direito para assim evitar a contaminação por compostos ainda não absorvidos pelo estômago. No entanto, é particularmente difícil interpretar de forma correta a evolução da concentração hepática (POUNDER e JONES, 1990; HILBERG, ROGDE et al., 1999; YAREMA e BECKER, 2005).

Figura 36. Fluxograma para atestado de óbito adaptado de (WONG, 2011)

Os casos que foram estudados nesse trabalho (11) eram em sua maioria do sexo masculino (63,3%), com idade média de 61,5 anos. Houve apenas dois casos envolvendo mulheres, um caso de 38 e outro com 80 anos de idade. Dos 11 casos estudados, oito apresentaram resultados positivos para fenobarbital. A concentração média de fenobarbital foi de 4,7 µg/mL (1-13 µg/mL) para amostras de sangue cardíaco e de 4,2 µg/mL (1,2-9,9 µg/mL) para amostras provenientes da veia femoral. A média da razão da concentração de sangue femoral/sangue cardíaco foi de 0,91 (DP 0,23 – N=11). Nesses casos qualquer uma das duas amostras de sangue (cardíaco e/ou femoral) poderia ser utilizada para a quantificação de fenobarbital em casos *postmortem*. No entanto, apesar de não ser um estudo controlado, observou-se que o tempo entre a morte e necropsia, a quantidade da droga administrada e o tempo entre a última administração da droga e o momento da morte não demonstraram ser um fator limitante ou que altere a concentração da substância em questão. Hilberg et al. (1999) relatam que, em seu estudo de redistribuição *postmortem* com ratos, não se observou diferenças significativas entre sangue femoral e cardíaco (HILBERG, RIPEL et al., 1999).

Apesar da não ter se observado redistribuição *postmortem* para fenobarbital (concentrações encontradas no sangue do coração e sangue femoral foram bastante semelhantes), mais amostras reais devem ser analisadas para confirmar estes resultados. De fato, dados *postmortem* de redistribuição de barbitúricos em humanos são escassos na literatura científica, porém, todos os casos apresentaram concentrações dentro do índice terapêutico para o fenobarbital.

A média das concentrações encontradas em amostras de fígado foi 9,7 µg/g (1,3-16,7 µg/g). A média da razão entre a concentração de fenobarbital em fígado comparada com a concentração de fenobarbital em amostras de sangue femoral foi

de 1,17 (DP = 1,29, N=5). Mesmo observando diferença acentuada na razão fígado/sangue femoral, todos os casos apresentaram concentrações de fenobarbital em fígado dentro do índice terapêutico. A grande dificuldade seria interpretar os resultados toxicológicos, caso alguma amostra apresentasse concentrações tóxicas em um dos espécimes utilizados nesse trabalho. O que vale ressaltar também é que caso fossemos utilizar apenas a amostra de fígado para extrapolar para a concentração sanguínea (caso 5), a concentração seria superestimada mais de oito vezes.

Ao contrário que se observou na comparação das concentrações de fenobarbital entre amostras de sangue (cardíaco e femoral), quando se compara sangue femoral com fígado, não há homogeneidade nos resultados. Portanto pode-se afirmar que o tempo entre a morte e necropsopia, a quantidade da droga administrada e o tempo entre a última administração e o momento da morte demonstraram influenciar na concentração da substância estudada. Em nosso estudo a concentração encontrada no fígado foi maior que a concentração encontrada em sangue femoral. Exceto para um caso (2), esses resultados corroboram com os achados apontados por Parker et al. (1971). Em seu estudo com ratos, os autores observaram que a concentração de secobarbital aumentou principalmente no fígado durante as primeiras 24 horas após a morte e, desta forma, concluíram que a absorção gastrointestinal do secobarbital continua ocorrendo mesmo após a morte (PARKER, WINEK et al., 1971).

A interpretação de concentrações de substâncias em fígado é bastante complexa. A cinética das substâncias (absorção e distribuição) e a relação entre a concentração sanguínea e a hepática raramente é suficiente para permitir extrapolar e concluir a concentração sanguínea no momento da morte. O grande pesadelo

toxicológico ocorre quando as concentrações estão discrepantes, ou seja, concentração tóxica é encontrada em uma amostra e concentração terapêutica é encontrada em outra amostra, o que não ocorreu em nosso trabalho (POUNDER e JONES, 1990; DRUMMER e GEROSTAMOULOS, 2002; DRUMMER, 2007; JONES e SINGER, 2008).

Quatrehomme et al. (1990) estudaram a cinética *postmortem* do secobarbital em ratos para tentar estabelecer o tempo entre a necropsopia e a morte analisando fígado, sangue e baço. Os animais foram sacrificados e tiveram suas amostras coletadas, enquanto um segundo grupo de animais tiveram as amostras coletadas sete dias após a morte. Os resultados apontaram a existência de redistribuição *postmortem*: as concentrações no fígado variaram de 79,10 a 1134 µg/mL. Os valores encontrados na necropsopia, sete dias após o sacrifício, não corresponderam aos valores encontrados no momento da morte. Esses dados demonstram a existência da redistribuição *postmortem* para o secobarbital, porém extrapolar esses dados para humanos é bastante complicado, haja vista que a redistribuição também é influenciada pela posição anatômica dos órgãos (QUATREHOMME, BOURRET et al., 1990).

Os dados presentes na literatura não correlacionam à concentração de barbitúricos no sangue cardíaco com a concentração do sangue femoral, nem tão pouco com a concentração de barbitúricos em fígado em casos humanos.

O método desenvolvido permitiu a determinação e confirmação de fenobarbital em amostras de sangue e fígado *postmortem*. O método desenvolvido demonstrou que preenche todos os requisitos de uma análise toxicológica forense, podendo assim ser aplicado em casos forenses.

Conclusão

"Obtaining a quantitative result is not the endpoint of the analytical process"

Irving Sunshine

7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que:

- A técnica de LPME mostrou-se adequada para determinar barbitúricos em amostras biológicas complexas (fígado e sangue total). As fibras utilizadas nesta técnica são resistentes a diversas condições como: solventes; valores extremos de pH. O custo por amostra para extração é muito menor quando comparada com outras técnicas (SPME e SPE), por volta de R\$ 0,30 (somente o valor de 9 cm de fibra).
- Os métodos desenvolvidos neste trabalho são aplicáveis para quantificação e confirmação de barbitúricos (butalbital, secobarbital, pentobarbital e fenobarbital) em amostras de sangue total e fígado.
- Os métodos apresentaram limites de detecção de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ e limites de quantificação de 1,0 $\mu\text{g/mL}$ para sangue. Para amostras de fígado, os limites de detecção foram de 0,5 $\mu\text{g/g}$ e limites de quantificação de 1,0 $\mu\text{g/g}$. Os resultados obtidos na validação dos métodos mostram que se trata de métodos rápidos, precisos, práticos e lineares, que podem ser aplicados para determinações quantitativas e confirmatórias de barbitúricos caso haja suspeita do envolvimento de barbitúricos.
- Foi detectado fenobarbital em algumas amostras reais; a concentração encontrada nas amostras de sangue e fígado apresentaram valores dentro da faixa terapêutica.
- Há uma correlação entre as concentrações de fenobarbital encontradas nas amostras de sangue da cavidade cardíaca e veia femoral, portanto ambas as

amostras poderiam ser utilizadas para a quantificação do fenobarbital em casos *postmortem*.

- Não se observou correlação entre a concentração de fenobarbital em fígado com a concentração encontrada em amostras de sangue. Caso não haja amostras de sangue disponível para a quantificação de fenobarbital em casos *postmortem*, amostras de fígado não podem ser empregadas para a quantificação. No entanto, deve-se ter cautela na interpretação, pois a extrapolação simples para tentar estimar a concentração sanguínea no momento da morte deve ser evitada.

Referências Bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMS, R.C.; LEON, A.C.; TARDIFF, K.; MARZUK, P.M.; SANTOS, R.L. Suicidal overdoses of psychotropic drugs by elderly in New York City: comparison with younger adults. **Psychiatry Research**, v.188, n.3, p.459-461, 2011.

ALBERTSON, T.E. Barbiturates. In: OLSON, K.R., ed. **Poison & drug overdose**. 6.ed. New York: McGraw-Hill, 2004. p.124-129.

ANDERSEN, S.; HALVORSEN, T.G.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K.E. Liquid-phase microextraction combined with capillary electrophoresis, a promising tool for the determination of chiral drugs in biological matrices. **Journal of Chromatography, A**, v.963, n.1/2, p.303-312, 2002.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Portaria n.344, de 12 de maio de 1998**. Regulamento técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial. Brasília. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/344_98.htm. Acesso em: 10 de agosto de 2012.

BERNARDES, S.S.; TURINI, C.A.; MATSUO, T. Perfil das tentativas de suicídio por sobredose intencional de medicamentos atendidas por um Centro de Controle de Intoxicações do Paraná, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.26, p.1366-1372, 2010.

BERNARDES, S.S.; TURINI, C.A.; MATSUO, T. Profile of suicide attempts using intentional overdose with medicines, treated by a poison control center in Parana State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.26, n.7, p.1366-1372, 2010.

BONILHA, L.; COLLARES, C.F.; AMARAL, D.A.; DANTAS BARCIA, S.; ALMEIDA OLIVEIRA, A.M.; LI, L.M. Antiepileptic drugs: a study of 1028 cases registered by the Sao Paulo Intoxication Control Center. **Seizure**, v.14, n.3, p.170-174, 2005.

BRASIL. Ministério da Justiça. **II Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil 2005**. Brasília: Ministério da Justiça, 2007. Disponível em: http://www.obid.senad.gov.br/portais/OBID/biblioteca/documentos/Dados_Estatisticos/populacao_brasileira/II_1_levantamento_nacional/Substancia/326825.pdf. Acesso em: 07 de agosto de 2012.

BRITANNICA. **Jugular vein**: human circulatory system, organ arterial supply and venous drainage. Chicago: Britannica Academic Edition, 2012. Disponível em: <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/118406/circulatory-system>. Acesso em: 17 set. 2012.

CAMPELO, E.L.; CALDAS, E.D. Postmortem data related to drug and toxic substance use in the Federal District, Brazil, from 2006 to 2008. **Forensic Science International**, v.200, n.1/3, p.136-140, 2010.

CAPELLA-PEIRÓ, M.E.; GIL-AGUSTÍ, M.; MARTINAVARRO-DOMÍNGUEZ, A.; ESTEVE-ROMERO, J. Determination in serum of some barbiturates using micellar liquid chromatography with direct injection. **Analytical Biochemistry**, v.309, n.2, p.261-268, 2002.

CHARNEY, D.S.; MIHIC, S.J.; HARRIS, R.A. Hypnotics and sedatives. In: GOODMAN, L.S.; GILMAN, A.G.; HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E., eds. **Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 10.ed. New York: McGraww-Hill, 2001. cap.17, p.399-428.

CURRY, A.S.; SUNSHINE, I. The liver: blood ratio in cases of barbiturate poisoning. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.2, n.5, p.602-606, 1960.

DICKSON, S.J.; CLEARY, W.T.; MISSEN, A.W.; QUERÉE, E.A.; SHAW, S.M. The relative efficiency of drug extraction procedures for enzyme digested livers. **Journal of Analytical Toxicology**, v.4, n.2, p.74-77, 1980.

DRUID, H. Post-mortem toxicology. In: KARCH, S.B., ed. **Handbook drug abuse**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 2007. cap.12, p.961-1085. (alterei a data de 2006 para 2007)

DRUID, H.; HOLMGREN, P. Compilations of therapeutic, toxic, and fatal concentrations of drugs. **Journal of Toxicology, Clinical Toxicology**, v.36, n.1/2, p.133-134; author reply 135-136, 1998.

DRUMMER, O.H. Postmortem toxicology of drugs of abuse. **Forensic Science International**, v.142, n.2/3, p.101-113, 2004.

DRUMMER, O.H. Post-mortem toxicology. **Forensic Science International**, v.165, n.2/3, p.199-203, 2007.

DRUMMER, O.H.; GEROSTAMOULOS, J. Postmortem drug analysis: analytical and toxicological aspects. **Therapeutic Drug Monitoring**, v.24, n.2, p.199-209, 2002.

ECKERT, W.G., ed. **Introduction to forensic sciences**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 1996. 390p.

ESRAFILI, A.; YAMINI, Y.; GHAMBARIAN, M.; MORADI, M.; SEIDI, S. A novel approach to automation of dynamic hollow fiber liquid-phase microextraction. **Journal of Separation Science**, v.34, n.8, p.957-964, 2011.

FERNER, R.E. Post-mortem clinical pharmacology. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v.66, n.4, p.430-443, 2008.

FERREIRA, S.L.; BRUNS, R.E.; SILVA, E.G.; SANTOS, W.N.; QUINTELLA, C.M.; DAVID, J.M.; ANDRADE, J.B.; BREITKREITZ, M.C.; JARDIM, I.C.; BARROS NETO, B. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. **Journal of Chromatography, A**, v.1158, n.1/2, p.2-14, 2007.

FERREIRA, S.L.; BRUNS, R.E.; FERREIRA, H.S.; MATOS, G.D.; DAVID, J.M.; BRANDÃO, G.C.; SILVA, E.G.; PORTUGAL, L.A.; REIS, O.S.; SOUZA, A.S.; SANTOS, W.N. Box-behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta**, v.597, n.2, p.179-186, 2007.

FLANAGAN, R.; TAYLOR, A.A.; WATSON, I.D.; WHELPTON, R. **Fundamentals of analytical toxicology**. Chichester: John Wiley, 2007. 505p.

FLANAGAN, R.J.; MORGAN, P.E.; SPENCER, E.P.; WHELPTON, R. Micro-extraction techniques in analytical toxicology: short review. **Biomedical Chromatography**, v.20, n.6/7, p.530-538, 2006.

FRITCH, D.; BLUM, K.; NONNEMACHER, S.; KARDOS, K.; BUCHHALTER, A.R.; CONE, E.J. Barbiturate detection in oral fluid, plasma, and urine. **Therapeutic Drug Monitoring**, v.33, n.1, p.72-79, 2011.

GARRIDO FRENICH, A.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; MARTÍNEZ VIDAL, J.L.; MARTÍNEZ OCAÑA, R.; BAQUERO FERIA, P. Comparison of solid phase microextraction and hollow fiber liquid phase microextraction for the determination of pesticides in aqueous samples by gas chromatography triple quadrupole tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.399, n.6, p.2043-2059, 2011.

GIUSIANI, M.; CHERICONI, S.; DOMENICI, R. Identification and quantification of phenobarbital in a mummified body 10 years after death. **Journal of Forensic Sciences**, v.57, n.5, p.1384-1387, 2012.

GRONHAUG HALVORSEN, T.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K.E. Reduction of extraction times in liquid-phase microextraction. **Journal of Chromatography, B: Biomedical Sciences and Applications**, v.760, n.2, p.219-226, 2001.

HALL, B.J.; BRODBELT, J.S. Determination of barbiturates by solid-phase microextraction (SPME) and ion trap gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography, A**, v.777, n.2, p.275-282, 1997.

HAYES, A.N.; GILBERT, S.G. Historical milestones and discoveries that shaped the toxicological sciences. In: LUCH, A., ed. **Molecular, clinical and environmental toxicology**. Basel: Birkhäuser, 2009. v.1, p.1-35. (Molecular Toxicology Series: Experientia supplementum, v.99).

HILBERG, T.; RIPEL, A.; SLØRDAL, L.; BJØRNEBOE, A.; MØRLAND, J. The extent of postmortem drug redistribution in a rat model. **Journal of Forensic Sciences**, v.44, n.5, p.956-962, 1999.

HILBERG, T.; ROGDE, S.; MORLAND, J. Postmortem drug redistribution--human cases related to results in experimental animals. **Journal of Forensic Sciences**, v.44, n.1, p.3-9, 1999.

HO, T.S.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K.E. Recovery, enrichment and selectivity in liquid-phase microextraction comparison with conventional liquid-liquid extraction. **Journal of Chromatography, A**, v.963, n.1/2, p.3-17, 2002.

HOLT, D.W.; BENSTEAD, J.G. Postmortem assay of digoxin by radioimmunoassay. **Journal of Clinical Pathology**, v.28, n.6, p.483-486, 1975.

HUANG, Z.P.; CHEN, X.H.; WIJSBEEK, J.; FRANKE, J.P.; ZEEUW, R.A. An enzymic digestion and solid-phase extraction procedure for the screening for acidic, neutral, and basic drugs in liver using gas chromatography for analysis. **Journal of Analytical Toxicology**, v.20, n.4, p.248-254, 1996.

IWAI, M.; HATTORI, H.; ARINOBU, T.; ISHII, A.; KUMAZAWA, T.; NOGUCHI, H.; NOGUCHI, H.; SUZUKI, O.; SENO, H. Simultaneous determination of barbiturates in human biological fluids by direct immersion solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.806, n.1, p.65-73, 2004.

JEANNOT, M.A.; CANTWELL, F.F. Solvent microextraction into a single drop. **Analytical Chemistry**, v.68, n.13, p.2236-2240, 1996.

JOHNSON, L.L.; GARG, U. Quantitation of amobarbital, butalbital, pentobarbital, phenobarbital, and secobarbital in urine, serum, and plasma using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). **Methods in Molecular Biology**, v.603, p.65-74, 2010.

JONES, G. Postmortem toxicology. In: JICKELLS, S.; NEGRUSZ, A.; MOFFAT, A.C.; OSSELTON, M.D.; WIDDOP, B., eds. **Clarke's analytical forensic toxicology**. 4.ed. London: Pharmaceutical Press, 2011. v.1, cap.10, p.176-189.

JONES, G.R. Interpretation of postmortem drug levels. In: KARCH, S.B., ed. **Postmortem toxicology of abused drugs**. Boca Raton: CRC Press, 2007. cap.6, p.113-129.

JONES, G.R. Postmortem toxicology. In: JICKELLS, S.; NEGRUSZ, A., ed. **Clarke's analytical forensic toxicology**. London: Pharmaceutical Press, 2008a. cap.7, p.191-217.

JONES, G.R. Postmortem toxicology. In: JICKELLS, S.; NEGRUSZ, A., ed. **Clarke's analytical forensic toxicology**. London: Pharmaceutical Press, 2008b. cap.7, p.191-217.

JONES, G.R.; SINGER, P.P. Drugs of abuse in liver drug testing in alternate biological specimens. In: JENKINS, A.J.; CAPLAN, Y.H., eds. **Drug testing in alternate biological specimens**. Totowa: Humana Press; London: Springer, 2008. p.139-156. (Forensic Science and Medicine).

KATAOKA, H. Recent developments and applications of microextraction techniques in drug analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.396, n.1, p.339-364, 2010.

KENNEDY, M.C. Post-mortem drug concentrations. **Internal Medicine Journal**, v.40, n.3, p.183-187, 2010.

KOREN, G.; PARKER, R. Interpretation of excessive serum concentrations of digoxin in children. **American Journal of Cardiology**, v.55, n.9, p.1210-1214, 1985.

KOSKI, A. **Interpretation of postmortem toxicology results**. Helsinki, 2005. 56p. Dissertação de Mestrado – Department of Forensic Medicine – Faculty of Medicine - University of Helsinki.

KOVES, E.M. Use of high-performance liquid chromatography-diode array detection in forensic toxicology. **Journal of Chromatography, A**, v.692, n.1/2, p.103-119, 1995.

KOVES, E.M.; WELLS, J. Evaluation of a photodiode array/HPLC-based system for the detection and quantitation of basic drugs in postmortem blood. **Journal of Forensic Sciences**, v.37, n.1, p.42-60, 1992.

KUDO, K.; ISHIDA, T.; HIKIJI, W.; USUMOTO, Y.; UMEHARA, T.; NAGAMATSU, K.; TSUJI, A.; IKEDA, N. Pattern of poisoning in Japan: selection of drugs and poisons for systematic toxicological analysis. **Forensic Toxicology**, v.28, n.1, p.25-32, 2010.

KUGELBERG, F.C.; JONES, A.W. Interpreting results of ethanol analysis in postmortem specimens: a review of the literature. **Forensic Science International**, v.165, n.1, p.10-29, 2007.

LA MARCA, G.; MALVAGIA, S.; FILIPPI, L.; LUCERI, F.; MONETI, G.; GUERRINI, R. A new rapid micromethod for the assay of phenobarbital from dried blood spots by LC-tandem mass spectrometry. **Epilepsia**, v.50, n.12, p.2658-2662, 2009.

LANÇAS, F.M. **Extração em fase sólida (SPE)**. São Carlos: RiMa, 2004. 96p. (Métodos cromatográficos de análise, 4).

LANE, R.W.; BORZELLECA, J.F. Harming and helping through time: the history of toxicology. In: HAYES, A.W., ed. **Principles and methods of toxicology**. 5.ed. Boca Raton: CRC Press, 2008. cap.1, p.2-41.

LANGMAN, L.J.; KAPUR, B.M. Toxicology: then and now. **Clinical Biochemistry**, v.39, n.5, p.498-510, 2006.

LEWIS, R.J.; JOHNSON, R.D.; SOUTHERN, T.L.; CANFIELD, D.V. Distribution of butalbital in postmortem tissues and fluids from non-overdose cases. **Journal of Analytical Toxicology**, v.27, n.3, p.145-148, 2003.

LO, D.S.; CHAO, T.C.; NG-ONG, S.E.; YAO, Y.J.; KOH, T.H. Acidic and neutral drugs screen in blood with quantitation using microbore high-performance liquid chromatography-diode array detection and capillary gas chromatography-flame ionization detection. **Forensic Science International**, v.90, n.3, p.205-214, 1997.

LOPEZ-MUNOZ, F.; UCHA-UDABE, R.; ALAMO, C. The history of barbiturates a century after their clinical introduction. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v.1, n.4, p.329-343, 2005.

LORD, H.; PAWLISZYN, J. Microextraction of drugs. **Journal of Chromatography, A**, v.902, n.1, p.17-63, 2000.

MCGRATH, K.K.; JENKINS, A.J. Detection of drugs of forensic importance in postmortem bone. **American Journal of Forensic Medicine and Pathology**, v.30, n.1, p.40-44, 2009.

MCKINNEY, P.E.; PHILLIPS, S.; GOMEZ, H.F.; BRENT, J.; MACINTYRE, M.; WATSON, W.A. Vitreous humor cocaine and metabolite concentrations: do postmortem specimens reflect blood levels at the time of death? **Journal of Forensic Sciences**, v.40, n.1, p.102-107, 1995.

MCNAMARA, J.O. Drugs effective in the therapy of the epilepsies. In: **GOODMAN, L.S.; BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.; KNOLLMANN, B.C.**, ed. **Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 12.ed. New York: McGraw-Hill Medical, 2011. cap.21, p.583-607.

MEIER, P.; THORMANN, W. Determination of thiopental in human serum and plasma by high-performance capillary electrophoresis—micellar electrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography, A**, v.559, n.1/2, p.505-513, 1991.

MENCK, R.A.; de LIMA, D.S.; SEULIN, S.C.; LEYTON, V.; PASQUALUCCI, C.A.; MUÑOZ D.R.; OSSELTON, M.D.; Yonamine M. Hollow-fiber liquid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry of barbiturates in whole blood samples. **Journal of Separation Science**, v.35, n.5, p.3361-8, 2012.

MENCK, R.A.; OLIVEIRA, C.D.R.; LIMA, D.S.; GOES, L.E.; LEYTON, V.; PASQUALUCCI, C.A.; MUÑOZ, D.R.; YONAMINE, M. Hollow fiber–liquid phase microextraction of barbiturates in liver samples. **Forensic Toxicology**, 2012 [No prelo].

MIHIC, S.J.; HARRIS, R.A. Hypnotics and sedatives. In: **GOODMAN, L.S.; BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.; KNOLLMANN, B.C.**, ed. **Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 12.ed. New York: McGraw-Hill Medical, 2011. cap.17, p.457-480.

JICKELLS, S.; NEGRUSZ, A.; MOFFAT, A.C.; OSSELTON, M.D.; WIDDOP, B., eds. **Clarke's analytical forensic toxicology**. 4.ed. London: Pharmaceutical Press, 2011. 648p.

MORIYA, F.; HASHIMOTO, Y. Redistribution of basic drugs into cardiac blood from surrounding tissues during early-stages postmortem. **Journal of Forensic Sciences**, v.44, n.1, p.10-16, 1999.

MULE, S.J.; CASELLA, G.A. Confirmation and quantitation of barbiturates in human urine by gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of Analytical Toxicology**, v.13, n.1, p.13-16, 1989.

NERIN, C.; SALAFRANCA, J.; AZNAR, M.; BATLLE, R. Critical review on recent developments in solventless techniques for extraction of analytes. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.393, n.3, p.809-833, 2009.

OLIVEIRA, A.R.M.D.; MAGALHÃES, I.R.S.; SANTANA, F.J.M.; BONATO, P.S. Microextração em fase líquida (LPME): fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Química Nova**, v.31, n.3, p.637-644, 2008.

OSIEWICZ, R.; AGGARWAL, V.; YOUNG, R.M.; SUNSHINE, I. Quantitative-analysis of phenobarbital with Trimethylanilinium hydroxide. **Journal of Chromatography, A**, v.88, n.1, p.157-164, 1974.

OSSELTON, M.D.; MOFFAT, A.C.; WIDDOP, B. Forensic toxicology. In: JICKELLS, S.; NEGRUSZ, A.; MOFFAT, A.C.; OSSELTON, M.D.; WIDDOP, B., eds. **Clarke's**

analytical forensic toxicology. 4.ed. London: Pharmaceutical Press, 2011. cap.9, p.160-175.

OSSELTON, M.D.; SHAW, I.C.; STEVENS, H.M. Enzymic digestion of liver tissue to release barbiturates, salicylic acid and other acidic compounds in cases of human poisoning. **Analyst**, v.103, n.1232, p.1160-1164, 1978.

PARKER, J.M.; WINEK, C.L.; SHANOR, S.P. Post-mortem changes in tissue levels of sodium secobarbital. **Clinical Toxicology**, v.4, n.2, p.265-272, 1971.

PASSAGLI, M. **Toxicologia forense: teoria e prática**. 2.ed. Campinas: Millennium, 2009. 388p. (Tratado de perícias criminalísticas).

PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K.E. Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v.71, n.14, p.2650-2656, 1999.

PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K.E. Liquid-phase microextraction utilising plant oils as intermediate extraction medium-towards elimination of synthetic organic solvents in sample preparation. **Journal of Separation Science**, v.27, n.17/18, p.1511-1516, 2004.

PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K.E. Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid-liquid extraction. **Journal of Chromatography, A**, v.1184, n.1/2, p.132-142, 2008.

PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K.E.; BREKKE, A.; HO, T.S.; HALVORSEN, T.G. Liquid-phase microextraction of basic drugs--selection of extraction mode based on computer calculated solubility data. **Journal of Separation Science**, v.28, n.11, p.1195-1203, 2005.

PELISSIER-ALICOT, A.L.; GAULIER, J.M.; CHAMPSAUR, P.; MARQUET, P. Mechanisms underlying postmortem redistribution of drugs: a review. **Journal of Analytical Toxicology**, v.27, n.8, p.533-544, 2003.

PETERS, F.T.; MAURER, H.H. Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology: a review. **Accreditation and Quality Assurance**, v.7, n.11, p.441-449, 2002.

POCCI, R.; DIXIT, V.; DIXIT, V.M. Solid-phase extraction and GC/MS confirmation of barbiturates from human urine. **Journal of Analytical Toxicology**, v.16, n.1, p.45-47, 1992.

POUNDER, D.J.; JONES, G.R. Post-mortem drug redistribution--a toxicological nightmare. **Forensic Science International**, v.45, n.3, p.253-263, 1990.

POUNDER, D.J.; SMITH, D.R. Postmortem diffusion of alcohol from the stomach. **American Journal of Forensic Medicine and Pathology**, v.16, n.2, p.89-96, 1995.

QUATREHOMME, G.; BOURRET, F.; ZHIOUA, M.; LAPALUS, P.; OLLIER, A. Post mortem kinetics of secobarbital. **Forensic Science International**, v.44, n.2/3, p.117-123, 1990.

QUINONES-TORRELO, C.; MARTÍN-BIOSCA, Y.; SAGRADO, S.; VILLANUEVA-CAMAÑAS, R.M.; MEDINA-HERNÁNDEZ, M.J. Determination of amobarbital and secobarbital in plasma samples using micellar liquid chromatography. **Biomedical Chromatography**, v.14, n.5, p.287-292, 2000.

RANZ, A.; LANKMAYR, E. Screening and optimization of the derivatization of polar herbicides with trimethylanilinium hydroxide for GC-MS analysis. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v.69, n.1/2, p.3-14, 2006.

RASMUSSEN, K.E.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; KROGH, M.; UGLAND, H.G.; GRØNHAUG, T. Development of a simple in-vial liquid-phase microextraction device for drug analysis compatible with capillary gas chromatography, capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography, A**, v.873, n.1, p.3-11, 2000.

RAYNIE, D.E. Modern extraction techniques. **Analytical Chemistry**, v.78, n.12, p.3997-4004, 2006.

RAYNIE, D.E. Modern extraction techniques. **Analytical Chemistry**, v.82, n.12, p.4911-4916, 2010.

SAKA, K.; UEMURA, K.; SHINTANI-ISHIDA, K.; YOSHIDA, K. Determination of amobarbital and phenobarbital in serum by gas chromatography-mass spectrometry with addition of formic acid to the solvent. **Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.869, n.1/2, p.9-15, 2008.

SCHEURER, J.; MOORE, C.M. Solid-phase extraction of drugs from biological tissues: a review. **Journal of Analytical Toxicology**, v.16, n.4, p.264-269, 1992.

SHEPHERD, M.F.; LAKE, K.D.; KAMPS, M.A. Postmortem changes and pharmacokinetics: review of the literature and case report. **Annals of Pharmacotherapy**, v.26, n.4, p.510-514, 1992.

SILBERSTEIN, S.D.; MCCRORY, D.C. Butalbital in the treatment of headache: history, pharmacology, and efficacy. **Headache**, v.41, n.10, p.953-967, 2001.

SIMÕES, R.A.; DE OLIVEIRA, A.R.; BONATO, P.S. Hollow fiber-based liquid-phase microextraction (HF-LPME) of isradipine and its main metabolite followed by chiral HPLC analysis: application to an *in vitro* biotransformation study. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.399, n.7, p.2435-2443, 2011.

SKOPP, G. Preanalytic aspects in postmortem toxicology. **Forensic Science International**, v.142, n.2/3, p.75-100, 2004.

SOCIETY OF FORENSIC TOXICOLOGY. **Forensic toxicology laboratory guidelines**: 2006. Disponível em: http://www.soft-tox.org/files/Guidelines_2006_Final.pdf. Acesso em: 15 de junho de 2011.

THOMSEN, H.; KAATSCH, H.J.; KRISCH, B. How and why does the platelet count in postmortem blood change during the early postmortem interval? **Forensic Science International**, v.101, n.3, p.185-194, 1999.

UGLAND, H.G.; KROGH, M.; REUBSAET, L. Three-phase liquid-phase microextraction of weakly basic drugs from whole blood. **Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.798, n.1, p.127-135, 2003.

UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Substance Abuse and Mental Health Services Administration. **Drug abuse warning network, 2007: National Estimates of Drug-Related Emergency Department visits**. Rockville: Office of Applied Studies, Substance Abuse and Mental Health Services Administration, 2010. Disponível em: <http://www.samhsa.gov/data/2k10/DAWN/ED2007/DAWN2k7ED.htm>. Acesso em: 10 de junho de 2011.

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**. New York: United Nations Publication, 2009. Disponível em: http://www.unodc.org/documents/scientific/validation_E.pdf. Acesso em: 15 de março de 2011.

VALENTE, A.L.P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Química Nova**, v.23, p.523-530, 2000.

WONG, S.H.Y. Pharmacogenomics. In: JICKELLS, S.; NEGRUSZ, A.; MOFFAT, A.C.; OSSELTON, M.D.; WIDDOP, B., eds. **Clarke's analytical forensic toxicology**. 4.ed. London: Pharmaceutical Press, 2011. cap.25, p.401-416.

XU, H.; PAN, W.; SONG, D.; YANG, G. Development of an improved liquid phase microextraction technique and its application in the analysis of flumetsulam and its two analogous herbicides in soil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, n.23, p.9351-9356, 2007.

XU, L.; BASHEER, C.; LEE, H.K. Developments in single-drop microextraction. **Journal of Chromatography, A**, v.1152, n.1/2, p.184-192, 2007.

YAREMA, M.C.; BECKER, C.E. Key concepts in postmortem drug redistribution. **Clinical Toxicology**, v.43, n.4, p.235-241, 2005.

Anexos

Comitê de Ética – Faculdade de Farmácia - USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO

Parecer CEP/FCF/134/2009
Protocolo CEP/FCF/526
CAAE: 0026.018.015-09

I – Identificação:

Projeto de Pesquisa: Redistribuição postmortem de substâncias psicoativas em tecidos biológicos humanos

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Maurício Yonamine

Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP

Área Temática Especial: -

Patrocinadores: FAPESP

II - Sumário Geral do Protocolo:

A concentração de agentes tóxicos encontrada em amostras *postmortem* é complexa e afetada não só pela condição de deterioração do corpo, mas também por um processo conhecido como redistribuição *postmortem*, em que substâncias são transferidas, após a morte, de áreas de alta concentração para áreas de baixa concentração. Em geral, concentrações mais elevadas são encontradas no sangue situado nos sítios centrais (como o sangue coletado da cavidade cardíaca) em comparação aos níveis verificados nos vasos periféricos (como a veia femoral). Em outros casos, o tempo entre a morte e o exame *postmortem* é suficiente para que algumas substâncias que normalmente estariam presentes no sangue não estejam mais disponíveis neste fluido biológico. Exemplos incluem corpos exumados, casos de suicídio em que se levaram dias para encontrar o corpo e cadáveres já em processo de decomposição. Assim, quando amostras sanguíneas não estão disponíveis para coleta, os médicos legistas têm poucas alternativas além de coletar amostras de tecidos não convencionais, para análise toxicológica. Nesses casos, para interpretação dos resultados das análises, é fundamental que existam na literatura científica informações a respeito. Infelizmente, tais informações ainda são escassas e há necessidade de mais estudos sobre esse assunto. Desta forma, no presente projeto, será estudada a redistribuição *postmortem* de substâncias psicoativas (cocaína, opiáceos e barbitúricos) através da análise de espécimes biológicos (sangue, humor vítreo, encéfalo, músculo, fígado e medula óssea) coletados de vítimas atendidas pelo Instituto Médico Legal de São Paulo (IML-SP). Métodos analíticos serão desenvolvidos visando a detecção dessas substâncias nas diversas amostras citadas. Inicialmente, técnicas mais recentes de preparação de amostras como a extração acelerada por solvente (ASE) e a microextração em fase líquida (LPME) serão levadas em consideração. Os analitos serão identificados por cromatografia em fase-gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). Os resultados serão avaliados quanto às concentrações encontradas, histórico da vítima e tempo decorrido entre a morte e autópsia (coleta de amostras).

Os objetivos do presente estudo são: o desenvolvimento e aplicação de métodos de identificação de substâncias psicoativas (cocaína, opiáceos e barbitúricos) em amostras *postmortem* (sangue, humor vítreo, encéfalo, fígado e medula óssea). Serão avaliadas as

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS Comitê de Ética em Pesquisa

técnicas de microextração em fase líquida (LPME) e extração acelerada por solvente (ASE). Os analitos serão identificados e quantificados por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).

Tipo de estudo: transversal

Descrição da Casuística:

Amostras biológicas *postmortem* serão coletadas de cerca de 50 cadáveres atendidos no Instituto Médico Legal de São Paulo com histórico de morte suspeita com envolvimento das substâncias psicoativas de interesse (cocaína, morfina e fenobarbital). Esse número foi baseado na quantidade de casos analisados em trabalhos semelhantes reportados na literatura, os quais utilizam cerca de 9 a 13 casos por substância (LUCKENBILL *et al.*, 2008; RODDA & DRUMMER, 2006).

Os critérios de inclusão dos participantes são: pessoas de ambos os sexos, idade acima de 18 anos, com suspeita de que houve uso das substâncias psicoativas de interesse ou que a morte tenha ocorrido devido ao uso dessas substâncias.

Os critérios de exclusão são: pessoas com idade inferior a 18 anos ou sem histórico de uso das substâncias mencionadas.

Projeto com participação estrangeira (Centro de Ciências Forenses da Universidade de Boumemouth, Reino Unido).

III – Situação do Protocolo: APROVADO em reunião de 28/10/2009.

O pesquisador deverá aguardar a aprovação do presente protocolo da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, antes de iniciar a pesquisa.

Cabe ao pesquisador:

- Comunicar ao CEP:
 - eventuais modificações no projeto aguardando a apreciação e aprovação do CEP;
 - a interrupção do projeto.
- Apresentar relatórios: parcial (após 50% da execução do projeto) e final.

São Paulo, 29 de outubro de 2009.

Prof. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP/FCF/USP

Comitê de Ética – Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina - USP

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 07/10/2009, **APROVOU o(s) documento(s)** abaixo mencionado(s) no Protocolo de Pesquisa nº **0352/09**, intitulado: **"DISTRIBUIÇÃO POSTMORTEM DE SUBSTÂNCIAS PSICOATIVAS EM TECIDOS BIOLÓGICOS HUMANOS"** apresentado pelo Departamento de **ME DICINA LEGAL, ÉTICA MÉDICA, MEDICINA SOCIAL E DO TRABALHO**.

- Resposta do pesquisador responsável ao do Parecer CONEP 598/09 datado de 28.08.09 – Estruturação de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Pesquisador (a) Responsável: **Profa. Dra. Vilma Leyton**

CAPPesq, 07 de Outubro de 2009

Prof. Dr. Eduardo Massad
**Presidente da Comissão
de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa**

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo – SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

Comitê de Ética – Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina - USP

COMISSÃO DE PESQUISA PARA ANÁLISE DE PROJETOS DE PESQUISA

DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA - FMUSP

PARECER DO RELATOR

Projeto: Distribuição postmortem de substâncias psicoativas em tecidos biológicos humanos
Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Vilma Leyton
Pesquisador Executante:
Projeto 0352/09

Trata-se de projeto previamente aprovado pela CONEP (parecer no. 830/2009) que visa o estabelecimento da distribuição de drogas no organismo após a morte permitindo, assim, que os legistas possam valorar as concentrações que encontram nos diversos tecidos. Este projeto será desenvolvido em cooperação entre o Laboratório de Toxicologia do Departamento de Medicina Legal, Ética Médica, e Medicina Social da FMUSP, o Instituto Médico Legal, e o Centro de Ciências Forenses da Universidade de Bournemouth (Reino Unido).

Há, ainda, adendo datado de abril/2011, solicitando a inclusão da Profa. Thais Mauad, e sua declaração de concordância em participar como colaboradora, datada de 20 de abril de 2011, razão pela qual o projeto passa por esta Comissão de Pesquisa; inclusão de amostras a serem coletadas a partir de casos de óbitos provenientes do HC/FMUSP, que também ocorrerão, conforme a mesma declaração, sob responsabilidade da Profa. Mauad.

Considerando a relevância do projeto para o esclarecimento de mortes em que exista suspeita do uso de drogas, tendo-se em vista a análise favorável e anterior da CONEP, e que a solicitação para o adendo apenas inclui o acesso a novas fontes de material sob responsabilidade de docente efetivo deste departamento, recomenda-se a ratificação do presente pedido para o devido andamento do projeto.

SP. 27/05/2011

Ciência:

Profa. Dra. Marisa Dolhnikoff
Presidente da Comissão de Pesquisa
Departamento de Patologia - FMUSP

Carta de aceitação do Serviço de Verificação de Óbito - USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO SERVIÇO DE VERIFICAÇÃO DE ÓBITOS DA CAPITAL

**Manifestação prévia a respeito dos aspectos técnicos relacionados
à obtenção de material de estudo para pesquisa científica**

Título da Pesquisa: Distribuição postmortem de substâncias psicoativas em tecidos biológicos humanos

Pesquisador Executante: Saskia Carolina Seulin, Rafael Menck de Almeida, Marcelo Filonzi dos Santos, Livia Rentas Sanches e Victor Alexandre Percinio Gianvecchio

Pesquisador Responsável: Prof. Dra. Vilma Leyton, Prof. Dr. David Osselton e Prof. Dr. Mauricio Yonamine

Em relação aos aspectos técnicos relacionados à obtenção de material de estudo para pesquisa científica mencionada acima, informamos não haver impedimento do ponto de vista técnico e nem risco de mutilação.

São Paulo, 23 de março de 2011.

Prof. Dr. Carlos Augusto Pasqualucci
Diretor SVOC-USP

Prêmios recebidos com os resultados desse trabalho

II Encontro Nacional de Química Forense

Ribeirão Preto - 8 a 11 de dezembro / 2010

Certificado

certificamos que o trabalho :

Desenvolvimento de um método analítico empregando LPME e GC/MS para determinação de barbitúricos em amostras de fígado postmortem.

apresentado na forma de painel pelos autores:

Rafael Menck de Almeida, Silvia Satie Kawamura, Saskia Carolina Seulin, Vilma Leyton, Victor Alexandre Percinio Gianvecchio, Mauricio Yonamine

Recebeu "Menção Honrosa" no 2º Encontro Nacional de Química Forense (2º ENQFor).

Ribeirão Preto, 11 de dezembro de 2010.

Profa. Dra. Márcia A. M. S. Veiga
Comissão Organizadora

Prof. Dr. Marcelo Firmino de Oliveira
Comissão Organizadora

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Centro Acadêmico de Farmácia e Bioquímica

SUPFAB

XLVI SEMANA UNIVERSITÁRIA PAULISTA DE FARMÁCIA E BIOQUÍMICA

Apresentação de Pôster **Melhor Trabalho de Pós-Graduação - Doutorado**

Certificamos que o trabalho "BARBITURATES DETERMINATION IN POSTMORTEM WHOLE BLOOD SAMPLE BY LPME AND GC/MS" (FCF188), de autoria de RAFAEL MENCK DE ALMEIDA, SASKIA CAROLINA SEULIN, VILMA LEYTON, CARLOS AUGUSTO PASQUALUCCI e MICHAEL DAVID OSSELTON e MAURICIO YONAMINE, foi indicado como "**Melhor Trabalho de Pós-Graduação - Nível Doutorado**" exposto no Simpósio Anual de Pesquisas em Ciências Farmacêuticas, realizado no período de 17 a 21 de outubro de 2011, durante a XVI Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia.

São Paulo, 21 de outubro de 2011.

Sandra Helena Polisseli Farsky
 Prof.ª Sandra Helena Polisseli Farsky
 Presidente da Comissão
 Organizadora

Ana Campa
 Prof.ª Ana Campa
 Presidente da Comissão de Avaliação
 de Posteres

PAPER I

Hollow fiber–liquid phase microextraction of barbiturates in liver samples

Rafael Almeida Menck · Carolina Dizioli Rodrigues de Oliveira ·
Diógenes Saulo de Lima · Ligia Endo Goes · Vilma Leyton · Carlos Augusto Pasqualucci ·
Daniel Romero Muñoz · Mauricio Yonamine

Received: 27 July 2012 / Accepted: 5 September 2012
© Japanese Association of Forensic Toxicology and Springer 2012

Abstract Barbiturates, especially phenobarbital, are involved in intoxication cases in Brazil and other countries. Liver tissue can be a useful alternate specimen when blood is not available (decomposition, severe fire, and exsanguination cases). Because the liver is a very complex matrix, it is essential to eliminate potential interfering substances in this specimen before instrumental analysis of target compounds. In recent years, novel strategies for sample preparation have gained acceptance in the field of analytical toxicology. The objective of this work was to develop a gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) method using hollow fiber–liquid phase microextraction (HF–LPME) for determination of barbiturates (phenobarbital, secobarbital, pentobarbital, and butalbital) in liver samples. An aliquot of homogenized and acidified liver in aqueous solution (equivalent to 50 mg tissue) was submitted to extraction by the use of a 9-cm hollow fiber. The fiber was filled with eucalyptus oil in its pores and its lumen was filled with a NaOH solution (pH 13; acceptor phase). After extraction in an ultrasonic bath for 5 min, the

acceptor phase was withdrawn and derivatized in the injector port of the GC–MS with trimethylanilinium hydroxide for flash methylation. A totally “green chemistry” approach of the sample extraction was obtained, because relatively large amounts of organic solvent generally used for extraction could be substituted by an essential oil used as a supported liquid membrane for HF–LPME. This method was validated and successfully applied to liver samples collected from five deceased persons with previous history of exposure to barbiturates. Phenobarbital concentrations in the liver found in these actual cases ranged from 1.3 to 16.7 µg/g.

Keywords Hollow fiber–liquid phase microextraction (HF–LPME) · Barbiturates · GC–MS · Tissue (liver) samples · Phenobarbital · Secobarbital

Introduction

The liver is the major metabolic organ and has been used extensively as an important specimen in postmortem toxicology. Liver tissue can be a useful alternate specimen when blood is not available in some cases (decomposition, severe fire, and exsanguination) [1]. As a specimen, the liver has the advantage in that it is relatively unaffected by postmortem redistribution as compared with blood, although substance concentrations in the lobe proximal to the stomach (left lobe) may be affected by postmortem diffusion in cases of oral overdose [2]. For this reason, it is recommended that samples should be collected from the right lobe of the liver [3]. Even in cases in which blood samples are available for analysis, liver drug concentrations can provide useful additional information, when evaluated together with history and circumstances of

This article is for the special issue *TIAFT2012* edited by Osamu Suzuki.

R. A. Menck (✉) · C. D. R. de Oliveira ·
D. S. de Lima · M. Yonamine
Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo,
Av. Professor Lineu Prestes, 580 13B CEP, 05508-000 São
Paulo, SP, Brazil
e-mail: rafaelmenck@usp.br

L. E. Goes · V. Leyton · C. A. Pasqualucci · D. R. Muñoz
Faculty of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

C. A. Pasqualucci
Death Verification Service, University of São Paulo, São Paulo,
Brazil

PAPER II

Rafael Menck de Almeida¹
Diógenes Saulo de Lima¹
Saskia Carolina Seulin²
Vilma Leyton²
Carlos Augusto
Pasqualucci^{2,3}
Daniel Romero Muñoz²
Michael David Osselton⁴
Maurício Yonamine¹

¹Faculty of Pharmaceutical
Sciences, University of São
Paulo, Brazil

²Faculty of Medicine, University
of São Paulo, Brazil

³Death Verification Service,
University of São Paulo, Brazil

⁴Department of Forensic &
Biological Sciences,
Bournemouth University, UK

Received May 3, 2012

Revised July 27, 2012

Accepted August 2, 2012

Research Article

Hollow-fiber liquid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry of barbiturates in whole blood samples

Here, we present a method for measuring barbiturates (butalbital, secobarbital, pentobarbital, and phenobarbital) in whole blood samples. To accomplish these measurements, analytes were extracted by means of hollow-fiber liquid-phase microextraction in the three-phase mode. Hollow-fiber pores were filled with decanol, and a solution of sodium hydroxide (pH 13) was introduced into the lumen of the fiber (acceptor phase). The fiber was submerged in the acidified blood sample, and the system was subjected to an ultrasonic bath. After a 5 min extraction, the acceptor phase was withdrawn from the fiber and dried under a nitrogen stream. The residue was reconstituted with ethyl acetate and trimethylanilinium hydroxide. An aliquot of 1.0 μ L of this solution was injected into the gas chromatograph/mass spectrometer, with the derivatization reaction occurring in the hot injector port (flash methylation). The method proved to be simple and rapid, and only a small amount of organic solvent (decanol) was needed for extraction. The detection limit was 0.5 μ g/mL for all the analyzed barbiturates. The calibration curves were linear over the specified range (1.0 to 10.0 μ g/mL). This method was successfully applied to postmortem samples (heart blood and femoral blood) collected from three deceased persons previously exposed to barbiturates.

Keywords: Barbiturates / GC-MS / Liquid-phase microextraction / Whole blood
DOI 10.1002/jssc.201200444

1 Introduction

Barbiturates are reversible depressants of the central nervous system (CNS) that can produce different degrees of CNS depression, ranging from mild sedation to general anesthesia with sedative and hypnotic properties [1]. Although the abuse of barbiturates is relatively infrequent compared with others classes of psychoactive substances, their narrow margin of safety, risk of dependence, and clinical abuse liability remain a public health concern [2]. According to Substance Abuse and Mental Health Services Administration (2007 report), there were 9877 emergency department visits involving barbiturates, representing approximately 1.2% of the total visits for the nonmedical use of pharmaceuticals in the United States (www.samhsa.gov/data/2k10/DAWN/ED2007/DAWN2k7ED.htm) [3].

Phenobarbital is the antiepileptic drug most frequently involved in intoxication cases in Brazil [4]. It accounted for 3.83% (6535 cases) of all the drug intoxication cases registered by the Poison Control Center in a large urban area (São Paulo, Brazil) over the course of 1 year [4]. Bernardes

et al. also reported that phenobarbital was the most frequently used antiepileptic drug (43.8%) in intentional overdose cases (Paraná state, Brazil) [5]. This may be a consequence of the fact that this drug is still commonly prescribed to patients with epilepsy and is distributed by the Brazilian government health system [4].

Barbiturates exhibit toxic effects at blood concentrations greater than 30 μ g/mL for long-acting (e.g. phenobarbital) and 8 μ g/mL for intermediate- and short-acting drugs (e.g. butalbital, amobarbital, pentobarbital, and secobarbital). Even lower concentrations can be toxic in combination with alcohol or other depressants [6]. In forensic toxicology, blood is the sample of choice for detecting and interpreting drug levels in postmortem cases. A degree of hemolysis is common in these cases, and for this reason, whole blood is normally analyzed [7]. Postmortem blood presents special problems for plasma and serum analysis due to its higher viscosity and other variable properties [8].

Quantitative methods for the analysis of barbiturates in biological samples have been described in the scientific literature. Techniques such as micellar liquid chromatography [9, 10], liquid chromatography-MS [11], and GC-MS have been used [2, 12–14]. Conventional sample preparation techniques such as liquid-liquid extraction (LLE) and SPE have been used to extract barbiturates from biological specimens especially for gas chromatographic analysis [2, 12, 13]. Miniaturized techniques, such as solid-phase microextraction (SPME), have also been used in a few methods [15, 16].

Correspondence: Rafael Menck de Almeida, Av. Professor Lineu Prestes, 580 13B CEP: 05508-900, São Paulo, SP, Brazil
E-mail: rafaelmenck@usp.br

Abbreviations: HF-LPME, hollow-fiber liquid-phase microextraction; IS, internal standard; LLE, liquid-liquid extraction; LPME, liquid-phase microextraction; SPME, solid-phase microextraction; TMAH, trimethylanilinium hydroxide