

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas

RAPHAEL RODRIGUES SOARES

**DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE CARBAMAZEPINA, FENITOÍNA E
FENOBARBITAL EM AMOSTRAS DE SANGUE SECO EM PAPEL, COLETADAS
POST-MORTEM, POR CROMATOGRÁFIA GASOSA ACOPLADA A
ESPECTROMETRIA DE MASSAS.**

Belo Horizonte
2017

RAPHAEL RODRIGUES SOARES

DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE CARBAMAZEPINA, FENITOÍNA E FENOBARBITAL EM AMOSTRAS DE SANGUE SECO EM PAPEL, COLETADAS *POST-MORTEM*, POR CROMATOGRÁFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS.

Dissertação apresentada como requisito parcial, para obtenção do grau de mestre em Análises Clínicas e Toxicológicas, submetida ao Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientadora: Profa. Dra. Leiliane Coelho André

Coorientadora: Profa. Dra. Josianne Nicácio Silveira

Belo Horizonte
2017



FOLHA DE APROVAÇÃO

DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE CARBAMAZEPINA, FENITOÍNA E FENOBARBITAL EM AMOSTRAS DE SANGUE SECO EM PAPEL, COLETADAS POST-MORTEM, POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

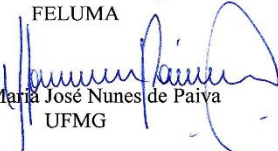
RAPHAEL RODRIGUES SOARES

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, área de concentração ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS.

Aprovada em 31 de outubro de 2017, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Leiliane Coelho Andre - Orientadora
UFMG


Prof. Ana Paula Drummond Lage Wainstein
FELUMA


Prof. Maria José Nunes de Paiva
UFMG

Belo Horizonte, 31 de outubro de 2017.

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes na minha vida:

Mãe, a melhor e mais bondosa pessoa que conheço.

Pai, por ser o exemplo de pessoa que sempre tentarei seguir, te amo sempre.

Meus irmãos, Saulo e Thiago, por fazerem sempre partem de todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Inicio agradecendo, sobretudo a Deus, que me deu a força necessária para chegar até este momento com saúde e que junto à Nossa Senhora Aparecida colocou pessoas maravilhosas na minha vida.

A meus pais, Elza e Nilsinho, o meu mais sincero agradecimento. Pois foi com vocês que aprendi a correr atrás dos meus objetivos, com força e garra sem perder a essência. Pois foi através do grande esforço dos dois, que pude conseguir uma formação e assim com o grande incentivo pude trilhar este caminho. Muito obrigado pelo amor incondicional.

Agradeço ao meu irmão Saulo, que como um irmão mais velho, fez Justiça a denominação de pai, já que estava ao meu lado em todos os casos de felicidade e necessidade. Sem você irmão, com certeza esta etapa da minha vida não teria existido.

A meu irmão Thiago, que mesmo sem a presença física por todos estes anos, com sua presença espiritual consegue nos dar a força e proteção que sempre necessitamos. Agradeço-te infinitamente irmão.

Aos meus grandes amigos e amigas, que fazem parte da minha família e que suportaram e entenderam minhas ausências nestes dois anos. Aos meus amigos que sempre estiveram ao meu lado, me ajudando e me incentivando nos momentos em que pensei não ter mais forças pra continuar. Sempre agradecerei pelos “puxões de orelha”.

Aos meus familiares, que sempre estiveram ao meu lado, desde a minha aprovação até este momento, me proporcionando momentos de felicidade e de incentivos. Muito obrigado.

As minhas colegas de serviço, muito obrigado pelo companheirismo de sempre. Agradeço também a todos os colegas do Labtox, que com incentivos e disponibilidade de transferir conhecimentos me ajudaram a concluir esta etapa.

As professoras, Leiliane e Josiane, que me ensinaram o que é ser um mestre. Vocês sempre serão minhas grandes referências de professor. Obrigado pela demonstração de profissionalismo impecável.

Agradeço a todos os colegas, funcionários e professores do PPGACT, pois todos estiveram sempre abertos a me ajudar, desde conhecimentos repassados nas disciplinas até na conclusão final da dissertação. O meu muito obrigado a todos.

Agradeço finalmente, a faculdade de farmácia e a UFMG por terem me proporcionado, estes dois anos de mudanças e aperfeiçoamento profissional e ao Instituto Médico Legal (BH) que além de autorizar a pesquisa disponibilizou as amostras que foram utilizadas neste estudo.

RESUMO

Os exames realizados em amostras biológicas, no âmbito da medicina legal, têm como objetivo a identificação da intoxicação como circunstância qualificadora do delito ou 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 à necropsia, seguida da retirada de material biológico para a perícia químico-toxicológica. A presença, ou ausência, do fármaco antiepiléptico pode ser um elemento chave na determinação da causa de morte de um indivíduo, ou da explicação do comportamento de um indivíduo ligado a um evento de investigação de entidades competentes. De acordo com alguns estudos realizados por grupos de peritos do Instituto Médico Legal de Belo Horizonte (IML-BH), foi possível observar que, os fármacos antiepilépticos com maior incidência em periciados *post-mortem* no instituto são: carbamazepina, fenitoína e fenobarbital. Este estudo otimizou um método analítico, utilizando mancha de sangue seco, para quantificar o fenobarbital, carbamazepina e fenitoína simultaneamente. Os analitos foram separados por cromatografia gasosa e identificados por espectrometria de massas. O tempo de execução da análise cromatográfica foi de 15 minutos e foi possível obter uma precisão intra-ensaio e inter-ensaio na faixa de 6,1 – 13,1 % e de 5,0 -14,7 % respectivamente. A exatidão apresentou uma faixa de 61,5 – 84,7 %. Os limites de detecção e quantificação foram respectivamente de 2,98 e 9,80 µg/mL para o fenobarbital, 1,77 µg/mL e 5,90 µg/mL para a carbamazepina e de 5,46 µg/mL e 18,20 µg/mL para a fenitoína. O método apresentou os parâmetros de mérito adequados aos objetivos propostos, quando foi verificado um conjunto de 10 amostras anônimas de sangue *post-mortem*, que tinham sido detectadas qualitativamente no Labtox (IML/BH) fenobarbital, carbamazepina e/ou fenitoína. Em determinação destas amostras na metodologia proposta neste estudo, foi apresentada concentração de 71,6 µg/mL; 52,8 µg/mL e 61,8 µg/mL para o fenobarbital e 27,1µg/mL para carbamazepina, outra amostra apresentou detecção para a carbamazepina, mas com área abaixo do limite de quantificação, todas as outras amostras apresentaram resultados abaixo do limite de detecção para este método.

Palavras-chaves: Sangue *post-mortem*. Fenobarbital. Carbamazepina. Fenitoína. Mancha de sangue seco.

ABSTRACT

The examinations carried out in biological samples, in the scope of legal medicine, have the purpose of identifying intoxication as a qualifying circumstance of the offense or as a cause of danger or imputability. In cases of suspected death from intoxication, this will be framed within the framework of violent deaths. For this type of death there is a legal obligation to perform necropsy, followed by the withdrawal of biological material for the chemical-toxicological expertise. The presence or absence of the antiepileptic drug may be a key element in determining the cause of death of an individual or the explanation of the behavior of an individual linked to an event investigated by the competent entity. According to some studies carried out by expert groups of the Belo Horizonte Medical Institute (IML-BH), it was possible to observe that the antiepileptic drugs with the higher incidences in *post-mortem* individuals in the institute are: carbamazepine, phenytoin and phenobarbital. This study optimized an analytical method using dried blood spot to quantify phenobarbital, carbamazepine and phenytoin simultaneously. The analytes were separated by gas chromatography and identified by mass spectrometry. The running time of the chromatographic analysis was 15 minutes and it was possible to obtain intra-assay and inter-assay precision in the range of 6.1 – 13,16% and 5,0 – 14,7% respectively. The accuracy presented a range of 61,5 – 84,7%. The limits of detection and quantification were respectively 2,98 and 9,80 µg/mL for phenobarbital, 1,77 and 5,90 µg/mL for carbamazepine and 5,46 µg/mL and 18,2 µg/mL for phenytoin. The method presented the merit parameters appropriate to the proposed objectives, when a set of 10 anonymous samples of postmortem blood were detected, which had been qualitatively detected in Labtox (IML / BH) phenobarbital, carbamazepine and phenytoin. In the determination of these samples in the methodology proposed in this study, a concentration of 71.6 µg / mL was presented; 52.8 µg / mL and 61.8 µg / mL for phenobarbital and 27.1 µg / mL for carbamazepine, another sample showed detection for carbamazepine, but with an area below the limit of quantification, all other samples presented results below limit of detection for this method.

Key-words: *Postmortem* blood. Phenobarbital. Carbamazepine. Phenytoin. Dried blood spot.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da carbamazepina, fenitoína e fenobarbital.....	25
Figura 2. Cartão de coleta com a impregnação de sangue na área do círculo 2.	37
Figura 3. Suporte para secagem das amostras de MSS.....	38
Figura 4. Remoção dos discos de MSS com perfurador de 8 mm.	38
Figura 5. Discos de MSS em microtubo, utilizados para o procedimento de extração.	39
Figura 6. Fluxograma de com descrição do método desenvolvido para determinação das FAES envolvidas neste estudo.....	56
Figura. 7 Cromatograma dos analitos associados com o PI no modo SIM	58
Figura 8. Espectro de Massa com seleção dos íons do fenobarbital	59
Figura 9. Espectro de Massa com seleção dos íons da carbamazepina.....	59
Figura 10. Espectro de Massa com seleção dos íons da fenitoína	59
Figura 11. A Comparação dos cromatogramas. (A): Cromatograma obtido com os analitos, submetidos ao procedimento de extração 01; (B): Cromatograma dos analitos obtidos com a extração 02	60
Figura 12 Cromatograma da amostra branca.....	61
Figura 13 Áreas relativas com as medianas da FNB, CBZ e FNT	62
Figura 14. Curva de calibração com reta de regressão do fenobarbital	63
Figura 15. Curva de calibração com reta de regressão da carbamazepina	64
Figura 16 Curva de calibração com reta de regressão da fenitoína	64
Figura 17 Mancha de sangue seco obtidas para a determinação das amostras post- mortem	70
Figura 18.0 Fluxograma de sugestão para aplicação da metodologia desenvolvida neste estudo: [OBJ]	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Parâmetros analíticos do CG-EM utilizados no métodos	57
Tabela 2 Tempo de retenção e íons selecionados para cada analito estudado.....	58
Tabela 3 Faixa de trabalho utilizado na curva de calibração.....	62
Tabela 4 Testes T e F realizados para análise das áreas do FNB. (A): Teste T. (B): Teste F	65
Tabela 5 Testes T e F realizados para análise das áreas do CBZ. (A): Teste T. (B): Teste F	66
Tabela 6 Testes T e F realizados para análise das áreas do FNT. (A): Teste T. (B): Teste F	67
Tabela 7 Valores obtidos no teste de exatidão do FNB.....	68
Tabela 8 Valores obtidos no teste de exatidão da CBZ.....	68
Tabela 9 Valores obtidos no teste de exatidão da FNT.....	68
Tabela 10 Valores obtidos dos coeficientes de variação dos teste intra e inter ensaio do fenobarbital (n=6).	68
Tabela 11 Valores obtidos dos coeficientes de variação dos teste intra e inter ensaio da carbamazepina (n=6).	69
Tabela 12 Valores obtidos dos coeficientes de variação dos testes intra e inter ensaio da fenitoína (n=6).	69
Tabela 13 Limites de detecção e quantificação obtidos para o FNB, CBZ e FNT	69
Tabela 14 Determinação das amostras de sangue post-mortem para FNB, CBZ e FNT.	70

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN - Acetoonitrila

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BSTFA - N-metil-trimetilsiltriofluoracetamide

Ca⁺⁺ - Íon Cálcio

CBZ - Carbamazepina

CCIH-SP - Centro de Controle de Intoxicações da cidade de São Paulo

CEATOX-SP - Centro de Assistência Toxicológica do Hospital das Clínicas de São Paulo

CG - Cromatografia gasosa

CG-EM - Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas

CI - Ionização química

CIT-GO - Centro de Intoxicações de Goiás

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

CONEP - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

CP - Código Penal

CPP - Código de Processo Penal

CV - Coeficiente de variação

DAE - Drogas antiepilépticas

EI - Impacto de elétrons

EM - Espectrometria de massas

EUA - Estados Unidos da América

EUROCHEM - *A Focus for Analytical Chemistry in Europe*

ev - Elétrons- volts

FAES - fármacos antiepilépticos

FDA - *Food and Drug Administration*

FNB - Fenobarbital

FNT - Fenitoína

GABA - ácido gama-aminobutírico

ICH – International Conference on Harmonisation

IML-BH - Instituto Médico Legal de Belo Horizonte

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry*

ISO - *International Organization for Standardization*

K+ - Íon Potássio

Kq - Fator 10

Labtox - Laboratório de Toxicologia do IML-BH

LD - Limite de detecção

LQ - Limite de quantificação

L/Kg - Litros por Kilogramas

MMQO - Métodos dos mínimos quadrados ordinários

mg/L - Miligrama por Litro

mg/Kg - Micrograma por Quilograma

MSS - Machas de sangue seco

m/z - massa/carga

N - número de replicatas

Na+ - Íon Sódio

Pka - Constante de dissociação ácida

PKU - fenilcetonúria

Ph - Potencial de hidrogênio

PI - Padrão Interno

PPN - Propranolol

RDS - Desvio padrão relativo

RPM - Rotação por minuto

SIM - Monitoramento do íon Selecionado

Sinitox - Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas

SNC - Sistema nervoso central

DP - desvio padrão

T - valor da abscissa

µg/mL - Microgramas por Mililitros

USP - United States Pharmacopeia

U- voltagem de corrente contínua

VIM - Segundo o vocabulário internacional de metrologia

Xg - Força centrífuga máxima

Wt - Voltagem de corrente alternada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA - ESTADO DA ARTE.....	21
2.1. Aspectos farmacocinéticos e farmacodinâmicos dos medicamentos antiepilépticos	21
2.1.1. Carbamazepina.....	22
2.1.2. Fenitoína.....	23
2.1.3. Fenobarbital.....	24
2.2. Aspectos Toxicológicos.....	25
2.3. Amostragem post-mortem.....	26
2.4. O uso de papel filtro com mancha de sangue seco em análise post-mortem.....	28
3. OBJETIVO	31
3.1 . Objetivo Geral	31
3.2. Objetivos Específicos	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1. Materiais	32
4.1.1. Reagentes e padrões analíticos.....	32
4.1.2. Sistema cromatográfico	32
4.1.3. Amostragem.....	34
4.2. Métodos	35
4.2.1. Otimização das condições cromatográficas.....	35
4.2.2. Preparação das amostras de sangue seco em papel	36
4.2.3 Processos de extração analítica	39
4.2.4. Estudo dos parâmetros de mérito analítico.....	41
4.2.4.1. Seletividade e especificidade.....	42
4.2.4.2. Faixa de trabalho e linearidade.....	43
4.2.4.3. Efeito matriz.....	49
4.2.4.4. Exatidão.....	50
4.2.4.5. Precisão.....	52
4.2.4.6. Limites de detecção e quantificação	53
4.2.5. Aplicação do método de análise simultânea dos medicamentos fenobarbital, carbamazepina e fenitoína em amostras de periciados post-mortem.	55

5. RESULTADOS.....	57
5.1. Otimização das condições cromatográficas.....	57
5.2. Processo de extração analítico.....	60
5.3. Estudo dos parâmetros de mérito analítico.....	61
5.3.1 Seletividade.....	61
5.3.2 Linearidade e faixa de trabalho.....	62
5.3.2.1. Análise estatística da faixa de trabalho e linearidade.....	62
5.3.3. Análise estatística do efeito de matriz.....	65
5.3.4 Exatidão.....	67
5.3.5. Precisão.....	68
5.3.6. Limites de quantificação e de detecção.....	69
5.4. Aplicações do método.....	70
6. DISCUSSÃO.....	71
7. CONCLUSÕES.....	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

1. INTRODUÇÃO

A toxicologia é uma ciência multidisciplinar que abrange várias áreas de conhecimentos científicos, sendo desenvolvida por especialistas com diferentes formações profissionais e técnicas. Foi Orfila quem deu à toxicologia a dimensão de ciência e a fez disciplina acadêmica em 1828, assumindo assim um lugar de muito destaque. Isto porque a toxicologia não se restringe apenas ao estudo da origem das propriedades e do modo de agir das substâncias tóxicas, mas também na contribuição da prevenção e do tratamento da ação nociva de determinados agentes sobre o homem, sobre os seres vivos e sobre o meio ambiente. (FRANÇA, 2015; PASSAGLI, 2009).

A toxicologia pode ser dividida em várias áreas de acordo com a natureza do agente ou como este é introduzido pelo organismo. Dentre as distintas áreas da toxicologia, o enfoque deste estudo foi a toxicologia forense, a qual tem como principal objetivo estudar, identificar e quantificar as substâncias químicas causadores de efeitos adversos e intoxicações graves ou letais nos organismos *in vitam* ou *post mortem*.

As atividades ligadas à toxicologia forense estão relacionadas com situações de questões judiciais, para as quais importa reconhecer, identificar e quantificar o risco relativo da exposição humana a agentes tóxicos (FRANÇA, 2015). A identificação da substância química na investigação toxicológica é um instrumento de suma importância para elucidação de vários tipos de casos judiciais, como mortes violentas (suicídios) ou em pessoas vivas, como nos casos de violência sexual com o uso de drogas facilitadoras de estupro.

No século XIV Paracelsus escreveu “todas as substâncias são venenos, não existe nenhuma que não seja. A dose correta diferencia um remédio de um veneno”. Mesmo sendo hoje a definição de substância tóxica mais complexa, o conceito de Paracelsus ainda permanece atual. Com isso pode-se definir como tóxico, toda substância que tenha a capacidade de provocar uma lesão no organismo, quer destruindo-o, reversível ou irreversivelmente, quer afetando as suas funções vitais (CASARETT, 2013).

Até o século XX, a toxicologia forense limitava-se a estabelecer a origem tóxica de um determinado crime, assim o toxicologista atuava diretamente no exame

cadavérico apenas com a intenção da pesquisa e identificação do tóxico. Atualmente o campo de atuação desta ciência é mais amplo, estendendo-se desde as perícias no vivo e no cadáver até circunstâncias de saúde pública (RANGEL, 2004).

Os exames no vivo e no morto têm como objetivo a avaliação da intoxicação como circunstância qualificadora do delito, como causa de periculosidade ou inimputabilidade. Nos casos de suspeitas de morte por intoxicação, esta será enquadrada no âmbito das mortes violentas, e para ela existe a obrigatoriedade legal nesta hipótese de proceder à necrópsia, seguida da retirada de material biológico para perícia químico-toxicológica, de acordo com o CPP (Código de Processo Penal), Decreto Lei número 3639/1941, e CP (Código Penal), Decreto Lei número 2848/1940 (PASSAGLI, 2009). Dessa forma, torna-se necessário não somente a identificação, mas também a quantificação da substância para que possa afirmar a causa da morte.

As substâncias potencialmente tóxicas podem ser divididas de acordo com as suas características químicas ou tipo de ação. Dessa maneira, cabe ao toxicologista forense colaborar na obtenção de respostas às várias perguntas possíveis que surgem durante uma investigação criminal ou em procedimentos judiciais (MARCOS, 2011).

Em determinadas situações, até mesmo os alimentos e os medicamentos podem ser prejudiciais a vida ou à saúde, especialmente quando sua nocividade sofre profundas modificações em face da dosagem posta, da resistência individual, da maneira de ministração e do veículo utilizado. Pode-se usar como exemplo a estricnina, que usada em pequenas doses serve de estimulante, porém, em dosagem excessiva, é mortal (FRANÇA, 2015).

Com isso o medicamento que possui finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico, pode ser um potencial causador de dano e óbito (ANVISA, 2002; MOTA *et al.*, 2012). Neste sentido, vários estudos abordam o medicamento como um dos principais agentes responsáveis por intoxicações resultando em atendimento, nas emergências toxicológicas, hospitalização e óbitos em diferentes países (MOGHADAMMIA; ABDOLHAHI, 2002; MOTA *et al.*, 2012; VALIENTE *et al.*, 2000).

A intoxicação é caracterizada como a manifestação de sinais e sintomas clínicos que revelam o desequilíbrio homeostático do organismo decorrente do efeito nocivo produzido como resultado da interação de um agente tóxico com o sistema biológico. E a toxicidade se refere à propriedade intrínseca que o agente tóxico apresenta em causar os efeitos nocivos ao organismo, a qual dependente da dose ou concentração, das propriedades físico-químicas da substância, da via de administração, tempo e frequência de exposição, além dos fatores relacionados à suscetibilidade orgânica (CASARETT, 2013).

O Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (Sinitox), responsável pela consolidação e divulgação anual dos dados de intoxicação e envenenamento notificados no país, em seu relatório de 2012 apresentou a incidência de 27.008 casos de intoxicação por medicamentos, sendo que 40,27% (10.877) destes casos foram causados por tentativa de suicídio (SINITOX, 2012).

Um estudo, realizado pelo Centro de Controle de Intoxicações da cidade de São Paulo (CCI-SP), constatou-se que 36% dos casos de intoxicações atendidos envolviam medicamentos que agem no sistema nervoso central. Destes, 44% estão relacionados à fármacos antiepilépticos (FAE), sendo o fenobarbital o antiepiléptico mais encontrado nos casos de intoxicações (10,75%), seguido da carbamazepina (9,42%). Dentre as circunstâncias relatadas, inclui-se tentativa de suicídio, acidentes e uso incorreto ou prescrição incorreta do medicamento (BONILHA *et al.*, 2005).

A presença, ou ausência, do fármaco antiepiléptico pode ser um elemento chave na determinação da causa morte de um indivíduo, ou da explicação do comportamento de um indivíduo ligado a um evento de investigação de entidades competentes. Contudo, é de grande necessidade a utilização de técnicas quantitativas em Toxicologia Forense, pois o exame toxicológico pode fornecer evidências importantes sobre as circunstâncias da morte, fornecendo por meio do laudo toxicológico a concentração de uma determinada substância em níveis acima do tolerável, sendo assim, suficiente para causar morte ou sequelas.

De acordo com estudo realizado por Lemos (2017) no Instituto Médico Legal de Belo Horizonte (IML-BH), foi possível observar que, dentre as intoxicações causadas por medicamentos, os fármacos antiepilépticos (FAES) tiveram maior incidência nos

periciados *post-mortem* ligados ao suicídio. Os FAEs que mais aparecem nas intoxicações foram a carbamazepina, fenitoína e fenobarbital.

Um aspecto importante nas análises forenses *post-mortem* é em relação à amostragem. Segundo estudos de Magalhães (2012), a concentração de compostos orgânicos no sangue total apresenta uma avaliação direta da exposição dos tecidos a esses compostos. No entanto, amostras de sangue cadavéricas apresentam especial dificuldade comparada com amostras coletadas para ensaios clínicos.

Os FAEs pertencem a uma classe de medicamentos quimicamente heterogênea e, por essa razão, é difícil a obtenção de um método analítico capaz de quantificar todas (MARCOS, 2011).

Diante disso, torna-se necessário desenvolver um método analítico com especificidade na área forense, para subsidiar as investigações que envolvem processos de intoxicações medicamentosas. O método deve ser eficiente com boa especificidade e capaz de determinar quantitativamente estes três fármacos em uma mesma análise.

Nos últimos anos, a utilização de sangue impregnado em papel, mancha de sangue seco (MSS), recebeu considerável atenção em função de algumas vantagens como, redução do tempo de coleta da amostra, maior facilidade no transporte, estabilidade da matriz e também por reduzir a manipulação de amostras contaminadas com doenças infecciosas (QURAIISHI; JAIN; AMBEKAR, 2013).

Encontrar amostras coaguladas e heterogêneas em exames de periciados *post-mortem* no Laboratório de Toxicologia do IML-BH (Labtox) é muito comum, e com esses problemas a quantificação das substâncias, se torna ainda mais complexa. Como o Labtox recebe pedidos de exames de periciados vindos de todo o Estado de Minas Gerais, algumas amostras enfrentam a grande distância de percurso no transporte e o tempo até a determinação analítica, podendo assim prejudicar a estabilidade de alguns fármacos. O uso do papel com mancha de sangue seco como mencionado neste estudo pode manter a estabilidade dos analitos e conceder resultados mais confiáveis. Visando conseguir uma padronização das amostras e uma melhoria nos resultados de quantificação dos FAEs, a coleta de sangue em papel cartão, poderá permitir amostras mais homogêneas e sem coágulos.

Dessa forma, este trabalho propõe o desenvolvimento de um método analítico que possibilite a quantificação simultânea dos medicamentos carbamazepina (CBZ), fenitoína (FNT) e fenobarbital (FNB) em amostras de sangue coletadas em papel cartão, denominado com mancha de sangue seco (MSS) de periciados atendidos no IML-BH.

2. REVISÃO DE LITERATURA - ESTADO DA ARTE

2.1. Aspectos farmacocinéticos e farmacodinâmicos dos medicamentos antiepilépticos

Medicamentos antiepilépticos compreendem aproximadamente 3 % de casos de intoxicações nos EUA. Como os FAES são geralmente depressores do sistema nervoso central (SNC), intoxicações envolvendo estas substâncias podem levar a ocorrência de um estado clínico potencialmente perigoso e alto risco de consequências fatais (BONILHA *et al.*, 2005; LITOVITZ *et al.*, 2002).

Os FAES podem atuar com eficiência em casos de epilepsias parciais, ou em casos de epilepsias generalizadas e até no tratamento de distúrbios afetivos bipolares, neuralgia do trigêmeo, entre outros. O medicamento deve atuar de forma a possibilitar melhora das crises sem, contudo, produzir efeitos adversos significativos no sistema nervoso central (SNC) ou em outros órgãos. Porém não é sempre o que ocorre, pois efeitos adversos são observados principalmente quando se trata de pacientes que possuem como fator de risco a idade avançada, além de comorbidade e polifarmácia (DELUCIA; FILHO; PLANETA, 2007; MEDEIROS-SOUZA; SANTOS-NETO; KUSANO, 2007; PERUCCA; BERLOWITZ; BIRNBAUM, 2006).

Os fármacos antiepilépticos atuam no SNC na excitabilidade neuronal, condutância do Na^+ , K^+ ou Ca^{++} , ou atividade do ácido gama-aminobutírico (GABA), glutamato ou outros neurotransmissores (VASCONCELOS; GOMES; OLIVEIRA, 2002).

Atualmente, considera-se que o neurotransmissor inibitório, o ácido GABA, desempenha um papel fundamental no controle dos eventos epilépticos. Ao se alterar experimentalmente os níveis desse neurotransmissor, observou-se, pela sua diminuição, manifestações do tipo convulsivas e, pelo aumento, ação antiepiléptica em geral. Agentes como os barbitúricos por ação direta nos receptores, alteram os níveis do neurotransmissor GABA, aumentando os níveis desse neurotransmissor. Com relação à inibição das funções dos canais de Na^+ e Ca^{++} , a análise eletrofisiológica de neurônios individuais durante convulsões parciais exhibe um padrão de disparo neuronal caracterizado por despolarização e disparo de potenciais de ação de alta frequência. Fármacos antiepilépticos como

carbamazepina e fenitoína inibem os potenciais de ação de frequência (DELUCIA; FILHO; PLANETA, 2007).

Foi em 1939 a introdução dos primeiros antiepilépticos para uso clínico, a fenitoína e fenobarbital, seguidos pela carbamazepina e ácido valpróico sendo estas drogas consideradas de primeira geração (GUNAYDIN *et al.*, 2015).

2.1.1. Carbamazepina

Desde 1968 a carbamazepina é utilizada como FAE e como estabilizador de humor. É o principal fármaco antiepiléptico de primeira linha utilizado no tratamento de crises parciais e crises generalizadas tônico-clônicas. É um composto tricíclico, também utilizado no tratamento da doença bipolar, entre outras patologias, como por exemplo, no tratamento da hiperatividade e da esquizofrenia. O principal modo de ação da carbamazepina é por meio do bloqueio dos canais de sódio dependentes de voltagem, uma vez que apresenta uma estrutura química capaz de se ligar aos canais, logo após a sua abertura, impedindo o influxo de íons sódio. Conseqüentemente, as membranas neuronais excitadas são estabilizadas, as descargas neuronais repetitivas são inibidas e a propagação sináptica dos impulsos excitatórios em neurônios despolarizados é restringida, fazendo com que os neurônios exibam uma menor frequência de disparo, diminuindo a sua atividade (GUIMARÃES; MOURA; SILVA, 2006; MARCOS, 2011; MARTIN, 2010).

A absorção da CBZ por via oral é lenta e possui larga variação. A concentração máxima de carbamazepina é atingida em aproximadamente 6 h (2- 24h) após a administração oral. A ligação da carbamazepina às proteínas plasmáticas é de 70 a 80%. O volume aparente de distribuição da carbamazepina é de aproximadamente 1,4 L/kg (0,8-1,9L/kg) (MOREAU; SIQUEIRA, 2008).

A Carbamazepina é extensivamente biotransformada no fígado e tem a capacidade de induzir a sua própria biotransformação, bem como a de outros fármacos antiepilépticos. A principal via de biotransformação ocorre por epoxidação ao 10,11-epóxido de carbamazepina, que é o produto de biotransformação ativo, e a 10,11-trans-di-hidrodiol, um produto de biotransformação inativo. A meia-vida de eliminação é de aproximadamente 36 horas e é afetada pelo fato da carbamazepina

induzir sua própria biotransformação (GUIMARÃES; MOURA; SILVA, 2006; MOREAU; SIQUEIRA, 2008).

2.1.2. Fenitoína

A Fenitoína, ou Difenhidantoína, foi introduzida no mercado em 1938. É um dos fármacos antiepilépticos mais utilizados em terapia coadjuvante, embora apresente um perfil de interações farmacológicas bastante problemáticas, em parte devido ao fato de se ligar às proteínas plasmáticas e também por sofrer biotransformação via citocromo P450. É uma substância lipofílica, o que lhe permite atravessar as membranas plasmáticas com relativa facilidade e tem características de um ácido fraco (pka entre 8,3 e 9,2), sendo por isso solúvel em soluções alcalinas (GUIMARÃES; MOURA; SILVA, 2006).

Quando administrada por via oral é lentamente absorvida em função da limitada solubilidade no fluido do trato gastrointestinal. A concentração máxima desta FAE é atingida em 3-12 horas após administração oral. Aproximadamente 90 % da fenitoína no plasma encontram-se ligada a albumina. O volume aparente de distribuição é de aproximadamente 0,65 L/Kg em pacientes com função renal normal e com concentrações séricas de albumina dentro dos limites da normalidade (MOREAU; SIQUEIRA, 2008).

A principal reação de biotransformação da fenitoína é a hidroxilação pelo citocromo P450. A presença de um polimorfismo genético do citocromo, ou o uso simultâneo com substâncias cuja biotransformação necessita do citocromo P450 pode predispor a intoxicações, apesar do uso de doses habituais (MILLER, 2010)

A meia vida de eliminação da fenitoína é de aproximadamente 22 h, embora a meia-vida não seja um valor constante em função de o *clearance* variar de acordo com a concentração plasmática de fenitoína (MOREAU; SIQUEIRA, 2008).

O mais importante mecanismo de ação associado à fenitoína é a interferência no transporte de sódio através da membrana neuronal. O seu mecanismo de ação é no bloqueio de sódio dependente da tensão, limitando a propagação de descargas e convulsões (MILLER, 2010).

2.1.3. Fenobarbital

O Fenobarbital, o fármaco antiepiléptico mais vendido no século XX, pertence ao grupo dos barbitúricos e é um potente anticonvulsivante, com um largo espectro de ação. O fenobarbital é considerado um forte indutor das enzimas microssômicas do fígado. A sua taxa de absorção é influenciada pelo consumo de álcool (aumenta a taxa de absorção) e a sua distribuição é afetada pelas variações de pH (em condições de pH ácido a concentração de fenobarbital aumenta) (GUIMARÃES; MOURA; SILVA, 2006).

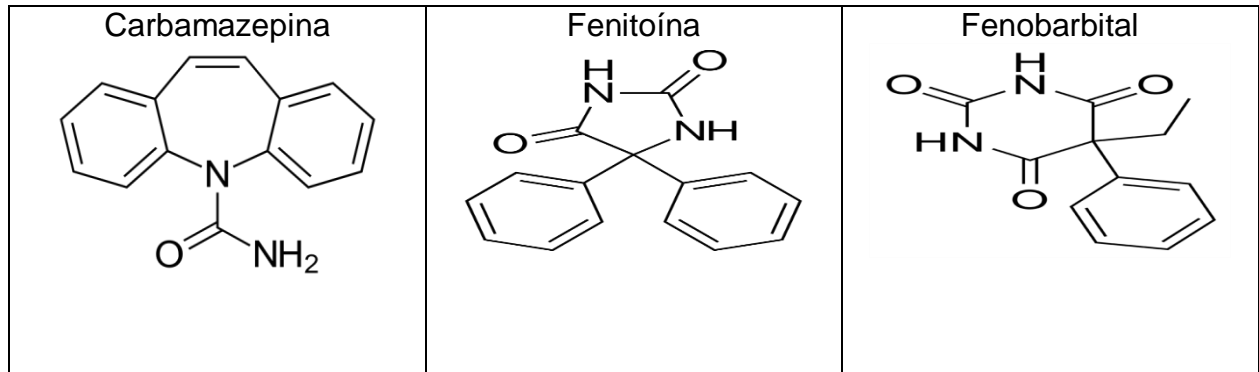
De acordo com Moreau & Siqueira (2008) a biodisponibilidade absoluta do fenobarbital administrado por via oral é próxima a 100%. A ligação do fenobarbital às proteínas plasmáticas é baixa, com valores próximos a 50%. O volume de distribuição deste barbitúrico é de aproximadamente 7L/Kg. Aproximadamente 30 a 35% da dose do fenobarbital é recuperada na urina sob forma inalterada.

Este fármaco possui uma meia-vida de eliminação muito longa (entre 75 a 120 horas, podendo atingir 400 horas em crianças) e sofre biotransformação hepática, sendo o seu principal metabolito o p-hidroxifenobarbital. O fenobarbital está sujeito a uma intensa reabsorção renal, a qual poderá ser reduzida pela alcalinização da urina (GUIMARÃES; MOURA; SILVA, 2006).

A sua ação é complexa e ocorre ao nível dos canais de cálcio reduzindo o seu influxo, e são potenciadores dos receptores GABA, aumentando acentuadamente a duração de abertura dos canais de cloro onde se fixa no local específico de ligação dos barbitúricos (GUIMARÃES; MOURA; SILVA, 2006).

A figura 1 apresenta as estruturas químicas da carbamazepina, fenitoína e do fenobarbital.

Figura 1. Estrutura Química da Carbamazepina, fenitoína e fenobarbital



Fonte: Clark, 2016.

2.2. Aspectos Toxicológicos

Medicamentos desempenham função essencial nos sistemas de saúde, porém seu uso inadequado e sem acompanhamento pode representar um risco para a saúde (ALMEIDA, 2012).

Rios e colaboradores (2005) fizeram um levantamento de casos de suicídios com o uso de medicamentos registrados pelo Centro de Intoxicações de Goiás (CIT-GO) nos anos de 2003 e 2004 e demonstraram que os anticonvulsivantes foram o segundo grupo de maior incidência nas tentativas de auto-extermínio em 2004 e o terceiro em 2003. Neste período, só a incidência da carbamazepina foi de 6,28% em 2003 e 10,47% em 2004. Em outro estudo realizado por Gandolfi & Andrade (2006), o qual veio corroborar com o estudo realizado por Rios e colaboradores (2005), onde foi demonstrado que os medicamentos estavam relacionados a 35,9% (6.673) dos 18.592 casos de intoxicações do banco de dados do Centro de Assistência Toxicológica do Hospital das Clínicas de São Paulo (CEATOX-SP), representando o grupo mais expressivo dentre todos os tipos de agentes tóxicos, sendo que os medicamentos ignorados representaram 7,7%. Ficou demonstrado também que os dez princípios ativos mais frequentes, fenobarbital foram: diazepam, haloperidol, carbamazepina, bromazepam, fenilpropanolamina, benzodiazepínicos não identificados, paracetamol, fenilefrina e dipirona, aparecem de forma semelhante nos eventos, envolvendo ambos os sexos.

Em um estudo realizado por Gunadyn e colaboradores (2015), foi possível perceber que os antiepiléticos de primeira geração são mais tóxicos do que os de segunda

geração e possuíam uma maior prevalência na população estudada, sendo a carbamazepina, causadora do maior número de intoxicações. Neste mesmo estudo chegou-se a conclusão de que 30 ug/mL de carbamazepina no soro seria o suficiente para causar sintomas de intoxicações como distúrbios metabólicos, perda de consciência e problemas cardiovasculares.

Em contrapartida, em um estudo com 1028 casos de intoxicações por medicamento realizado por Bonilha e seus colaboradores em 2005, no estado de São Paulo, foi possível constatar que o FAE mais freqüentemente envolvido nas intoxicações era o fenobarbital, seguido da carbamazepina. Neste estudo verificou-se que além dos dois FAE citados, a Fenitoína juntamente com o diazepam e clonazepam foram os medicamentos mais frequentes encontrados nos casos de intoxicação, sendo somente os cinco fármacos responsáveis por 89,4% das intoxicações.

A American Association of Poison Control Centers é uma organização Americana nacional voluntária de saúde fundada desde 1958, que representa os 55 centros de envenenamento do EUA e relatou 5645 casos de intoxicação causada pela carbamazepina, corroborando com o estudo realizado por Gunaydine e colaboradores (2015), o qual teve a carbamazepina como a principal causadora de intoxicações.

Em um levantamento realizado por Lemos 2017 no IML/BH em 2017, verificou-se que os FAEs identificados com maior frequência em mortes suspeitas de suicídio, foram a carbamazepina, fenobarbital e fenitoína, ratificando assim os estudos citados neste trabalho.

2.3. Amostragem *post-mortem*

Segundo Linden e colaboradores (2007) a identificação de substâncias de interesse toxicológico em amostras biológicas representa um desafio significativo, considerando a grande e crescente quantidade de substâncias potencialmente presentes, bem como a complexidade das matrizes e, frequentemente, a disponibilidade de quantidades limitadas de amostra.

Tratando-se de sangue post-mortem, as análises toxicológicas apresentam uma maior complexidade do que as análises toxicológicas de sangue clínico. Como

mencionados por Jones (2008) em seu livro de toxicológica analítica forense, o sangue post-mortem apresenta uma heterogeneidade, que dificulta as análises. Em consequência disso, quantificar as amostras post-mortem se torna um desafio ainda maior do que somente detectá-las. Sendo assim, a mancha de sangue seco poderia ser uma alternativa possível, que poderia minimizar os problemas inerentes as amostras de sangue *post-mortem*.

Aliado ao que é descrito por Jones(2008), Drumer (2008) relata que a detecção de substâncias em matrizes biológicas forenses possui especial dificuldade comparada com amostras coletadas para ensaios clínicos. As alterações que ocorrem nos indivíduos subsequentes à morte limitam a direta aplicabilidade de métodos validados para esses ensaios.

Uma distribuição desequilibrada das substâncias pelos tecidos pode conduzir a alterações na concentração destas no sangue, após a morte. Este processo designa-se por redistribuição *post-mortem* e ocorre, sobretudo, por meio de um processo de difusão dos tecidos ou órgãos adjacentes para a corrente sanguínea. Este processo adquire elevada importância para compostos com grande solubilidade lipídica, pois esses tendem a apresentar concentrações díspares em tecidos e sangue (MARCOS, 2011).

A redistribuição *post mortem* 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 (ALMEIDA, 2012; JONES, 2008).

Em investigações toxicológicas forenses, o sangue é a amostra mais comumente coletada de cadáveres. Recomenda-se para determinação quantitativa dos FAEs em indivíduos *post-mortem*, utilizar o sangue periférico, pois este é o fluido biológico menos provável de sofrer redistribuição. A veia femoral e subclávia são os locais mais adequados para a coleta do sangue periférico, pois são menos suscetíveis aos fenômenos *post-mortem* que podem interferir nos resultados da análise toxicológica (FLANAGAN *et al.*, 2007).

Em concordância com a afirmação de Flanagan e colaboradores (2007), Passagli (2009) descreve que os locais mais adequados para coleta de sangue *post-mortem* são a veia subclávia e femoral, havendo preferência por esta última em função de ser menos suscetível a alguns fenômenos *post mortem* que interferem nos resultados da análise toxicológica. A coleta de sangue da veia femoral é realizada por punção, sendo importante que seja bloqueado a comunicação da veia ilíaca com a femoral ou que sejam colhidos volumes não superiores a cerca de 5 mL por cada veia.

Um dos fenômenos que ocorre, após a morte, e que pode ser prejudiciais as análises toxicológicas quantitativas é a ocorrência de 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 essas células vermelhas (ALMEIDA, 2012; PELISSIER-ALICOT *et al.*, 2003).

Como já relatado anteriormente, o sangue *post-mortem* 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 (ALMEIDA, 2012; DRUMER, 2008; JONES, 2008; KENNEDY, 2010).

2.4. O uso de papel filtro com mancha de sangue seco em análise *post-mortem*

A instabilidade dos fármacos em amostras biológicas durante transporte e armazenamento é um grande desafio na interpretação dos resultados da análise. Além disso, como já citado, amostras coaguladas interferem diretamente na mensuração da concentração de várias substâncias. Em consequência disso, para conseguir resultados mais exatos, é necessário, trabalhar com amostras mais homogêneas e livres de coágulos.

A MSS é uma técnica já utilizada nas análises clínicas por muito tempo, como em casos de teste de triagem neonatal, contudo é um procedimento que vem crescendo na área da toxicologia, em casos de identificação de motoristas usuários de drogas ilícitas ou em monitoramentos terapêuticos.

Qurairishi (2013) fez um estudo, onde abordava o uso de MSS no rastreio de drogas de abuso. Neste mesmo estudo o autor cita que as MSS podem minimizar vários problemas, como risco de infecção e aumento na estabilidade de algumas drogas, já que muitos desses compostos possuem meia vida curta no sangue e em muitos lugares entre a coleta do sangue até a análise pode levar certo tempo, portanto o uso da MSS manteria a estabilidade destas drogas.

Ingels e colaboradores (2012) também relatam em seus estudos que a técnica de MSS é procedimento que garante facilidade na obtenção e no manuseio, com especial facilidade em casos que seja necessário transporte e armazenamento.

Alfazil & Anderson (2008) concluíram em seu estudo que o uso da manchas de sangue seco (MSS) consegue manter a estabilidade de várias substâncias, substituindo o uso de conservantes usuais e anticoagulantes.

Em alguns estudos realizados por Holmgren e colaboradores (2004), Alfazil & Anderson (2008) foi demonstrado que desidratações das amostras de sangue sobre o papel cartão minimizam a hidrólise de algumas drogas que são susceptíveis a degradação.

Alfazil & Anderson (2008) também concluíram que a técnica de mancha de sangue seco, proporciona um procedimento adequado para armazenamento e análise de amostras de toxicologia forense, pois são fáceis de manusear, de serem transportadas e armazenadas dentro do laboratório, mesmo na ausência de refrigeração.

Kong e seus colaboradores (2014) constataram que papel com mancha de sangue seco pode ser considerada uma alternativa apropriada aos plasmas convencionais na determinação de drogas antiepilépticas de pacientes com epilepsia e que necessitam de monitoramento terapêutico constante destes medicamentos.

Jantos (2013) conclui em seus estudos que a amostragem por papel com MSS não traz apenas benefícios na triagem neonatal, ou no monitoramento de medicamentos antiepilépticos, mas também pode ser empregada como um valioso método na coleta e transporte em toxicologia forense.

Passagli (2009) reforça a idéia de que os procedimentos relacionados à fase pré-analítica (coleta, identificação e conservação no transporte da amostra), sem os devidos cuidados e sem observação de condições mínimas de segurança, podem acarretar na falta de integridade da prova, provocando danos irreversíveis no material coletado, comprometendo a idoneidade do processo.

Além disso, na área forense é necessário que o laboratório armazene as amostras analisadas por um longo período, pois os resultados poderão ser questionados judicialmente, podendo assim haver necessidade de uma nova análise. Para armazenagem dessas contraprovas de sangue em potes convencionais, são necessários compartimentos que ocupam grandes espaços. Com o uso do papel cartão, este espaço pode ser reduzido e as amostras podem ficar disponíveis para a justiça por um período maior, facilitando assim a integralização e eficácia da cadeia de custódia.

A cadeia de custódia assegura a memória de todas as fases do processo, constituindo um protocolo legal que permite garantir a idoneidade do resultado e rebater os possíveis questionamentos, reforçando as questões da qualidade das perícias e os cuidados do ponto de vista legal (PASSAGLI, 2009).

Quraish e colaboradores (2013) descrevem em seu estudo que para garantir bons resultados das análises com o uso de MSS é necessário trabalhar com papéis cartão de boa qualidade e conseguir uma padronização das coletas. Neste mesmo estudo o autor afirma que o uso de papel com mancha de sangue seco é uma técnica útil e com grande potencial para detecção de drogas de abuso. Porém, a MSS apresenta certa desvantagem, devido ao pequeno volume de amostra, sendo necessário o uso de técnicas de alta sensibilidade.

Para garantir uma boa sensibilidade analítica frente à pequena quantidade de amostra coletada com a utilização do papel com mancha de sangue seco, é necessária uma técnica analítica eficiente como a técnica de Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM). Esta técnica combina as vantagens da cromatografia que é de alta seletividade e eficiência de separação, com as vantagens da espectrometria de massas que são obtenção de informações estruturais, massa molar e aumento adicional de seletividade (VEKEY, 2001).

Dessa forma, o uso de papel cartão com mancha de sangue seco, pode contribuir para melhoria das técnicas analíticas forenses, pois pode manter uma maior integridade da amostra, evitando problemas com heterogeneidade do sangue e degradação de muitas drogas, além de proporcionar um ganho no prazo de armazenamento das amostras sem a necessidade de refrigeração.

3. OBJETIVOS

3.1 . Objetivo Geral

Otimizar e validar método analítico para determinação simultânea de carbamazepina, fenitoína e fenobarbital utilizando como amostra mancha de sangue seco em papel e utilizando a técnica analítica de Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM).

3.2. Objetivos Específicos

- Otimizar as condições cromatográficas para validação do método analítico;
- Estabelecer o procedimento do volume de sangue para obter a mancha de sangue seco em papel e a melhor técnica de extração;
- Estabelecer as figuras de mérito analítico;
- Determinar a concentração de carbamazepina, fenitoína e fenobarbital nas amostras de periciados *post-mortem*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. Reagentes e padrões analíticos

Foram utilizados padrões analíticos dos medicamentos Fenobarbital (FNB), Fenitoína (FNT) e Carbamazepina (CBZ) da marca United States Pharmacopeia (USP). O Padrão interno utilizado foi o propranolol (PPN) também da marca USP.

Os solventes utilizados foram metanol, acetonitrila (grau HPLC), ácido clorídrico 37% adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha); tolueno foi adquirido do Grupo Química (Penha, Rio de Janeiro); heptano adquirido da empresa Synth e o agente derivatizante N-metil-trimetilsiltriofluoracetamida (BSTFA) adquirido da Sigma Brasil. O papel cartão utilizado foi o Whatman 903, adquirido da Mbiolog Diagnósticos (Contagem, Minas Gerais). As soluções estoque foram preparadas individualmente para cada analito estudado, com concentrações de 8.000 µg/mL para CBZ, 15.000 µg/mL para FNT e 16.000 µg/mL para FBN. Soluções de trabalho foram preparadas para cada analito, sendo suas concentrações de 800 µg/mL, 1.500 µg/mL e 1.600 µg/mL respectivamente. A solução estoque do PI foi preparada em uma concentração de 10.000 µg/mL, sendo sua solução de trabalho 1.000 µg/mL.

4.1.2. Sistema cromatográfico

O equipamento utilizado foi um cromatógrafo a gás, modelo 7890 C, equipado com um sistema injetor automático *CombiPal*, acoplado ao espectrômetro de massas modelo 5975 C, com analisador de massas tipo quadrupolo, com ajuste automático dos parâmetros para ionização por impacto de elétrons (EI) e para ionização química (CI), marca Agilent. A coluna cromatográfica utilizada foi a DB-5ms (30 m x 0.25 mm x 0.25µm) da marca AGILENT.

Considerando o pouco volume de sangue necessário para o desenvolvimento do presente estudo, optou-se por trabalhar com a técnica analítica de CG-EM, pois como já citado, é uma técnica de alta seletividade e de grande detectabilidade.

O princípio básico da cromatografia de fase gasosa envolve volatilização da amostra em um orifício de entrada aquecido (injetor), a separação dos componentes ocorre por meio de uma coluna especialmente preparada, e a detecção de cada

componente por um detector. Uma parte importante do cromatógrafo de fase gasosa (CG) é a utilização de um gás transportador (hidrogênio ou hélio) que transfere a amostra a partir do injetor, através da coluna até o detector. A coluna contém um revestimento de fase estacionária e a separação dos componentes é determinada pela distribuição de cada componente entre o gás de arraste (fase móvel) e a fase estacionária (coluna). Um espectrômetro de massa (EM) é um instrumento que mede a relação massa/carga (m/z) de íons em fase Gasosa (KITSON; LARSEN; McEWEN, 1996). A combinação da cromatografia gasosa (CG) com a espectrometria de massas (EM) é relativamente simples, uma vez que as características de funcionamento do cromatógrafo a gás são suficientemente compatíveis com a necessidade de alto vácuo do espectrômetro de massas (ARDEY, 2003).

Para que o acoplamento seja possível, idealmente, é necessário que as características de cada instrumento não sejam afetadas pela sua conexão, assim como não devem ocorrer modificações químicas não controladas do analito e perda de amostra durante a sua passagem do cromatógrafo para o espectrômetro de massas (ARDEY, 2003).

A interface do CG com EM é um dispositivo para transportar o analito do CG para EM. Isto deve ser realizado de tal forma que o analito não condense e nem se decomponha antes de entrar na fonte de íons do EM. Além disso, a carga de gás que entra na fonte de íons deve estar dentro da capacidade de bombeamento do EM (KITSON; LARSEN; McEWEN, 1996).

Os métodos de ionização mais empregados em CG-EM são ionização por impacto de elétrons (IE) e a ionização química (IQ). Na IE o analito de interesse, em fase gasosa, é bombardeado com elétrons de alta energia (geralmente 70 eV). As moléculas do analito são ionizadas pela remoção de um único elétron. Este processo requer tipicamente 10 eV e o restante da energia gera fragmentação dos analitos. Na IQ, as moléculas do analito, em fase gasosa, são introduzidas na câmara de ionização do espectrômetro de massas, que contém um gás reagente. Esta mistura (moléculas do analito + gás reagente) é bombardeada com elétrons, assim como na IE. Mas, como o gás reagente está em excesso em relação ao analito (geralmente em proporção maior que 1000:1), ele é ionizado quase que

exclusivamente e passam a ocorrer reações entre íons em fase gasosa do gás reagente e as moléculas neutras do analito, dando origem aos íons pseudo-moleculares do analito (KITSON; LARSEN; McEWEN, 1996).

A CG-EM é aplicável a compostos voláteis e termicamente estáveis nas temperaturas relativamente elevadas empregadas durante o processo de separação cromatográfica. Estes requisitos são semelhantes àqueles necessários para que compostos sejam ionizados por meio de IE e IQ (ARDEY, 2003).

O CG-EM utilizado neste estudo possui um analisador do tipo quadrupolo, o qual consiste em quatro barras paralelas, arranjadas em dois pares opostos. Um dos pares apresenta um potencial elétrico aplicado de $(U+V\cos(wt))$ e o outro par apresenta um potencial elétrico aplicado de $-(U+V\cos(wt))$, onde U é uma voltagem de corrente contínua e o termo $V\cos(wt)$ é uma voltagem de corrente alternada ou de radiofrequência. A aplicação destas duas voltagens afeta a trajetória centralizada dos íons. Em se fazendo variar estas voltagens, somente íons com uma razão m/z determinadas irão atravessar no centro do quadrupolo, enquanto que os outros íons serão desviados da trajetória central. O espectro de massa é obtido em se fazendo variar as voltagens do quadrupolo, de maneira a se realizar uma varredura em toda a faixa de m/z desejada (KITSON; LARSEN; McEWEN, 1996).

4.1.3. Amostragem

Na validação do método analítico, foram utilizadas 20 amostras de sangue de indivíduos *post-mortem* fornecidas pelo Labtox IML-BH após terem sido liberados os respectivos laudos, 10 destas amostras constavam no laudo que não foi detectada nenhuma substância química. As outras 10 amostras constavam no CG-EM a descrição de que foi identificado FNB, CBZ e/ou FNT. As amostras já estavam em processo de descarte, portanto não foi necessário o levantamento de dados pessoais e histórico clínico dos periciados.

Para realizar o plano de seleção das amostras, foi necessário conhecer a rotina do Labtox (IML/BH) nos procedimentos de rastreabilidade das mesmas. O Labtox IML/BH trabalha com um sistema interno que através de uma numeração identifica cada amostra dos periciados recebida pelo laboratório. Este número de identificação segue todas as etapas envolvidas na análise de cada amostra, inclusive na

identificação das substâncias pelo CG-EM do Labtox. Sendo assim, através do software do CG-EM consegue-se rastrear o resultado de muitas amostras analisadas.

A seleção das amostras neste projeto foi realizada pelo rastreio no CG-EM de sangues com resultados de não detecção de nenhuma substância química e com detecção para FNB, CBZ e FNT. Todo esse processo de seleção contou com o auxílio da ferramenta do sistema interno do Labtox, o qual auxiliava na rastreabilidade da amostra e conhecimento do status de liberação do laudo pericial. Depois de selecionada cada amostra, estas foram utilizadas somente após aprovação expressa do seu uso pela chefia do Labtox.

Este estudo foi aprovado pela Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP), com o parecer de número 2092812, e possui também a autorização da diretoria do IML/BH.

4.2. Métodos

4.2.1. Otimização das condições cromatográficas

Para identificar as melhores condições cromatográficas neste estudo, foi realizado testes de otimização das condições estabelecidas por Kong e colaboradores (2014). Sendo assim, os parâmetros de temperatura do forno, condições do injetor e do quadrupolo em um primeiro momento foram parecidos com as relatadas pelo autor.

Dessa forma, foram preparadas soluções padrões diluídas em metanol com concentrações estabelecidas para cada composto, a fim de analisar os tempos de retenção (TR) de cada analito individualmente. Em outro momento foi preparado solução em metanol dos analitos associados, com a intenção de verificar-se co-eluição. Com o propósito de conseguir uma maior resolução dos picos obtidos e um melhor desempenho cromatográfico, foram realizados ajustes nas temperaturas do forno e outras adequações pertinentes ao método em questão. Com isso, após a identificação de cada composto de interesse com picos de boa resolução, foram determinados os respectivos tempos de retenção e assim estabelecidas às condições cromatográficas ideais.

Cada composto gerou um espectro de massa que foi analisado individualmente. As análises iniciais de cada pico obtido, foram realizadas através do modo FullScan, o qual analisa todos os íons presentes em uma determinada amostra, através de um sistema de varredura. A partir disso, para cada pico de interesse, fez-se uma seleção dos três íons de maior intensidade. Posteriormente, fez-se alteração no método analítico de modo FullSan para o modo de Monitoramento de íon selecionado (SIM), o qual diferencia do modo Scan por detectar apenas os íons selecionados pelo operador. A partir disso, foi realizada uma nova injeção dos analitos associados diluídos em metanol no Modo SIM, com a finalidade de verificar o íon alvo (íon mais abundante) de cada composto.

4.2.2. Preparação das amostras de sangue seco em papel

A utilização da MSS para coleta e análise de sangue humano teve origem no início dos anos 1960, quando Robert Guthrie usou o método para demonstrar que a fenilcetonúria (PKU) poderia ser precocemente detectada pela determinação em amostras de sangue seco colhido dos recém-nascidos em papel cartão (permeável). Desde então, vários programas de triagem neonatal foram implantados em todo o mundo, tornando-se parte fundamental dos programas de saúde pública (BOTLER; CAMACHO; CRUZ, 2012; CARAN, 2016; MAGALHÃES *et al.*, 2009).

Este teste tornou-se obrigatório em todo o país para crianças nascidas em hospitais e maternidades seja na rede pública ou privada e prevê o diagnóstico de quatro doenças: hipotireodismo congênito, PKU, anemia falciforme e fibrose cística (MAGALHAES *et al.*, 2009).

Em geral, a maioria dos cartões de papéis utilizados é composta por uma parte externa que serve de proteção, fechamento e anotação de dados dos indivíduos analisados e a parte interna, onde se encontram impressas as marcações que delimitam o espaço para depósito da amostra.

Existe um procedimento padrão recomendado para a coleta de amostras de sangue, no qual a gota de sangue, assim que formada, deve ser aplicada na marcação impressa no papel do cartão, permitindo que a quantidade de sangue seja o suficiente para absorver e encher completamente o círculo. Cada círculo impresso deve ser preenchido com uma única aplicação de sangue. O sangue deve penetrar

uniformemente e saturar o papel na área delimitada para assegurar resultados confiáveis (CARAN, 2016).

Dessa forma, o método analítico constitui algumas etapas, que são apresentadas a seguir:

1ª Etapa: Inserção do sangue na área demarcada no papel, como já descrito acima (Figura 2).

Figura2. Cartão de coleta com a impregnação de sangue na área do círculo 2.



2ª Etapa: Secagem das amostras

O tempo de secagem das amostras varia de 2 a 3 horas, o papel deve ser deixado na posição horizontal em temperatura ambiente, não deve ser seco na estufa e nem no sol (Figura 3). Após a secagem completa, as amostras de sangue que antes apresentavam uma coloração vermelha viva, passam a ter uma cor marrom-avermelhada (Manual de coleta do serviço de referência em triagem neonatal do estado de Mato Grosso, 2013).

Figura 3. Suporte, para secagem das amostras de MSS.



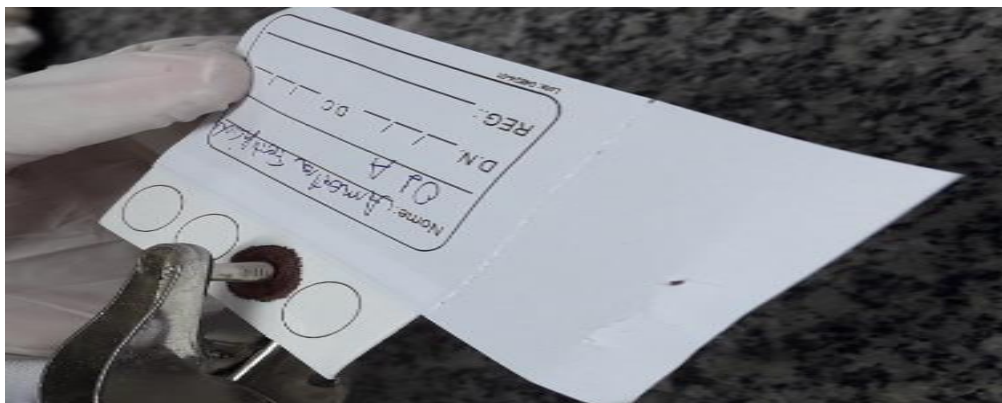
Fonte: Caran, 2016.

3ª Etapa: Extração da amostra de sangue contendo os analitos de interesse

Após secagem, o material de sangue contido no papel cartão deve ser extraído. Existem vários métodos citados na literatura para a extração do sangue e dos analitos do papel cartão, sendo assim, deve ser levado em consideração o tipo de analito que se deseja ser extraído juntamente com o sangue. Em razão da complexidade das análises toxicológicas em amostras de sangue *post-mortem*, no presente estudo viu-se a necessidade de realizar mais de uma técnica, com metodologias distintas, a fim de avalia-se qual resultaria em um melhor desempenho.

Na figura 4, pode ser observado a remoção de 8 mm de sangue, com um perfurador adequado para o procedimento.

Figura 4. Remoção dos discos de MSS com perfurador de 8 mm.



Segundo Kong e colaboradores (2014), para obter bons resultados com a técnica de MSS é imprescindível o uso de papel de boa qualidade, com tamanho de poro e espessura adequado. Por essa razão trabalhamos com o papel Whatman 903, que é descrito pelo próprio estudo do Kong e por outros estudos como de boa qualidade.

As concentrações inseridas em cada papel foram de 50 uL e 100 uL de sangue. Obteve-se um melhor resultado com a utilização de 100 uL de sangue inseridos em cada papel, pois foi com este volume que foi preenchido todo o espaço exigido para análise. Em seguida foi utilizado para perfuração e obtenção do disco de MSS, um perfurador com punção de 8 mm, equivalente a 20 ul de sangue, sendo utilizado na extração inicialmente 1 disco apenas. Posteriormente, julgou-se necessário a utilização de 2 discos de 8 mm para cada extração (Figura 5). Assim ficou determinado a remoção do disco primeiramente na área central do papel e a segunda na parte periférica. Portanto, foi extraído do papel cerca de 40 uL de sangue.

Figura 5. Discos de MSS em microtubo, utilizados para o procedimento de extração.



Fonte: A autoria própria

4.2.3 Processos de extração analítica

Os processos para otimização e retirada do sangue do papel cartão foram descritos por Lima e colaboradores (2014) e Kong e colaboradores (2014). Cada método foi adaptado e otimizado de acordo com a rotina e metodologia adequadas para este estudo.

Foram realizados testes com dois procedimentos distintos, tendo uma das técnicas etapa de derivatização e a outra sem derivatização. O intuito de derivatizar uma amostra é melhorar o seu desempenho frente às análises realizadas por CG-EM, onde ocorre uma reação de metilação nos anéis de algumas estruturas, dando ao composto mais estabilidade

O método descrito por Lima e colaboradores (2014) foi denominado como extração 01. Este método consistiu na utilização de um solvente extrator para retirada do sangue adsorvido no papel, sendo este solvente a mistura de Metanol e ACN (3:1). Após a padronização da quantidade de sangue inseridas em cada papel, foram perfurados do papel dois discos de MSS e colocados em microtubo de polipropileno (1), ao qual foi adicionado 500 μ L do solvente extrator com 50 μ L de solução tampão ácida (pH: 4,9) e 50 μ L do PI. Essa mistura foi homogeneizada em uma mesa agitadora por 30 minutos a 120 rpm em temperatura ambiente. Após a agitação o sobrenadante foi transferido para um microtubo de polipropileno (2) esse processo foi realizado mais uma vez. Após isso o extrato do microtubo (2) foi evaporado sob fluxo laminar, em temperatura ambiente. Posteriormente o extrato do microtubo (2) foi ressuspendido com 500 μ L de ACN e colocado para centrifugação, com 3500 xg por 5 minutos. Foi retirado 200 μ L do sobrenadante e colocado em um tubo especial (insert) para injeção cromatográfica.

O método descrito por Kong e colaboradores (2014) foi denominado como extração 02. Neste método, também foi utilizado 500 μ L do solvente extrator para retirada dos analitos de interesse do papel, sendo o solvente extrator ACN adicionado de hidróxido de sódio 1molar (24:1) e 50 μ L do PI. Igualmente ao método de extração 01, o solvente e dois discos perfurados de sangue foram inseridos em um microtubo de polipropileno e colocados para agitação por 30 minutos. Posteriormente essa amostra foi centrifugada a 6000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi retirado e colocado em um Béquer de 1 mL para evaporação do solvente em fluxo laminar, com temperatura ambiente. O extrato já seco foi retomado com 150 μ L de tolueno e colocado em outro microtubo para derivatização. A derivatização do extrato foi alcançada com adição de 50 μ L de BSTFA em 70°C por 40 minutos. Após a etapa de derivatização foi inserido 100 μ L de heptano, com intuito de diluição do extrato,

seguido de agitação em vórtex por 1 minuto. Foi retirado do material obtido, 100 µL e colocado em um tubo especial (insert) para injeção cromatográfica.

A concentração utilizada nas duas técnicas para o FNT, PI, CBZ e FNT foi de 50 µg/mL.

Os critérios de avaliação para escolha do processo mais apropriado a ser utilizado neste estudo foram: (I) Tempo; (II) Custo; (III) Desempenho cromatográfico dos procedimentos. Neste último critério, foi avaliado o desempenho das duas técnicas frente às análises cromatográficas

4.2.4. Estudo dos parâmetros de mérito analítico

Na toxicologia forense, o procedimento técnico de validação de ensaios aplicado baseia-se no conjunto de normas e guias, desenvolvidos por entidades como a EUROCHEM, a ISO, a ICH, entre outras, que auxiliam na definição de critérios de aceitação e na avaliação dos procedimentos aplicados (TRUTA, 2012).

No Brasil, há duas agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). Estes órgãos disponibilizam guias para procedimentos de validação de métodos analíticos, respectivamente, a Resolução ANVISA RE nº 899, de 29/05/2003 e o documento INMETRO DOQ-CGCRE- 008, de 03/2003 (RIBANI *et al.*, 2004). No presente estudo, trabalhamos com os parâmetros exigidos pela ANVISA, que são: (I) Seletividade e especificidade; (II) Linearidade; (III) Efeito matriz; (IV) Exatidão; (V) Precisão e (VI) limites de detecção e Quantificação.

Para realização da otimização e realização das figuras de mérito, foi preparado um pool de sangue, utilizando 10 amostras de indivíduos post-mortem fornecidas pelo Labtox IML-BH após terem sido liberados os respectivos laudos, com a descrição de que não foi detectado nenhuma substância química. Para produção de 50 mL do Pool de sangue, foi necessária a utilização de 5,0 mL de cada amostra real branca (livres dos analitos de interesse) seguido de homogeneização. Foi avaliada a quantidade de sangue contida em cada amostra e somente foram utilizadas as amostras que ainda permaneciam com um volume maior do que 20mL.

4.2.4.1. Seletividade e especificidade

Os termos seletividade e especificidade são frequentemente usados indistintamente ou de forma errada, especialmente na área dos métodos cromatográficos, que são dos poucos métodos analíticos que podem ser considerados verdadeiramente específicos (ERMER, 2001; INMETRO, 2003; TRUTA, 2012).

Para Ribani e colaboradores (2004) e a convenção da Farmacopéia Americana (1999), seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. A seletividade avalia o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares de degradação e também outros compostos de propriedades similares que possam estar, porventura, presentes. A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse. O termo especificidade tem sido utilizado com o mesmo significado. Para que não gere situações de confusão desnecessária, a “International Union of Pure and Applied Chemistry” (IUPAC) sugere que seja utilizado somente o termo de seletividade.

Para a ANVISA (2003) os termos Especificidade e Seletividade têm o mesmo conceito, sendo ambos a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz.

A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental de separação e deve ser reavaliada continuamente durante a validação e subsequente uso do método. A seletividade pode ser obtida de várias maneiras. A primeira forma de se avaliá-la é comparando a matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada com esta substância (padrão), sendo que nesse caso, nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção da substância de interesse, que deve estar bem separada dos demais compostos presentes na amostra. Uma segunda maneira é através da avaliação com detectores modernos (arranjo de diodos, espectrômetro de massas), que comparam o espectro do pico

obtido na separação com o de um padrão e utiliza-se isto como uma indicação da presença do composto puro (RIBANI *et al.*, 2004; US-FDA, 2001).

A seletividade neste estudo foi alcançada usando o método de comparação da matriz de sangue (periciados *post-mortem*), isenta da carbamazepina, fenitoína, fenobarbital e do propranolol com a matriz de sangue adicionada das soluções padrões de cada analito. Cada pico encontrado nos dois cromatogramas foi estudado e assim analisado os seus espectros, por detector de massas. Foi realizada também uma comparação entre os tempos de retenção dos analitos injetados com a fortificação do sangue e dos analitos diluídos somente em metanol.

Para realização do estudo da seletividade foi retirado do pool de sangue preparado, duas alíquotas com um volume total de 2,0 mL para ambas. Uma alíquota foi fortificada com as soluções em metanol dos três FAEs de interesse juntamente com o PI e foi denominada de “amostra fortificada”, a outra alíquota foi destinada ao procedimento de extração sem adição dos padrões e foi denominada de “amostra branca”. Dessas alíquotas foi retirado 100 µL para impregnação do papel cartão. Após isso, foram realizadas extrações para as duas amostras, sendo inseridos 50 µL do PI nos dois materiais no momento da extração. Finalizada as extrações seguiu-se para análises pelo CG-EM com as condições analíticas já estabelecidas por este estudo. A concentração utilizada para a fortificação do sangue do fenobarbital, carbamazepina, fenitoína e do PI foram de 30 µg/mL e a técnica de extração utilizada para as das duas alíquotas foi à extração 01. Para avaliar a seletividade do método, foram estabelecidos dois critérios de avaliação.

- Tempo de retenção: Comparação entre os analitos diluídos somente em solventes e da amostra fortificada.
- Relação da linha de base: Neste item foi realizada comparação do cromatograma da amostra fortificada e da amostra branca, com o intuito de verificar algum interferente.

4.2.4.2. Faixa de trabalho e linearidade

O presente estudo teve como objetivo quantificar os principais FAEs envolvidos em intoxicações no IML/BH em amostras *post-mortem*. Portanto para escolha da faixa

de trabalho, foi necessário conhecer as doses tóxicas e letais dos três analitos encontrados na literatura.

Behneish, Bazim e Taghadd (2009) relataram em seus estudos que devido à faixa terapêutica da carbamazepina ser estreita, ela pode causar intoxicação aguda ou crônica grave, podendo ser originada por situações acidentais ou em tentativas de suicídio.

Já Brahmin, Kouraichi e Abderrazek (2008) cita em seus estudos que os níveis terapêuticos e tóxicos da carbamazepina são de 4-12 ug/mL e 20 ug/mL respectivamente. Em contrapartida nos estudos realizados por Mehmet e colaboradores (2016), ficou evidenciado que a média da concentração da carbamazepina em soro de pacientes com complicações hemodinâmicas foi de 26,4 µg/mL. Neste mesmo estudo é relatada morte por intoxicação da CBZ com uma concentração de 58 µg/mL, 12 horas após a ingestão do medicamento.

Sendo assim, para a montagem da faixa de trabalho da CBZ foi avaliado a dose tóxica inicial da CBZ (acima de 20 µg/mL) juntamente com relato da dose letal (58µg/mL).

Com relação à fenitoína, Moreau & Siqueira (2008) citam em sua obra que a faixa terapêutica deste medicamento é de 10-20 µg/mL. A FNT pode causar uma série de efeitos adversos relacionados com a dose, desde alterações dérmicas reversíveis leves até sintomas neurotóxicos (sonolência, ataxia e dificuldades cognitivas). Os sintomas neurotóxicos são mais prováveis de acontecer quando se encontra uma concentração plasmática do fármaco acima de 20 µg/mL (LUDERS *et al.*, 1998). Contudo em alguns casos, mesmo com o nível sérico alto, os sinais clínicos não correspondem à concentração sérica encontrada deste medicamento.

Avcil e colaboradores (2015) relatam um caso de uma paciente com nível sérico de fenitoína de 124 µg/mL sem os sintomas correspondentes a concentração encontrada. De acordo com SEZAK (2008) essa controvérsia pode ser explicada por existir distúrbios genéticos no nível do receptor entre o metabolismo da droga e sua atividade.

Entretanto LAUBSHER (1996) relata em seus estudos que efeitos tóxicos aparecem em pacientes com concentrações maiores que 20µg/mL, com efeitos tóxicos graves em concentrações acima de 40 µg/mL, relatando mortes associadas com concentrações acima de 70 µg/mL. Em consequência desse processo farmacocinético não-linear da fenitoína, optou-se por trabalhar com uma faixa de trabalho com intervalo entre 30 - 130 µg/mL.

Segundo Hoyland e colaboradores (2013) o fenobarbital é um importante medicamento com facilidade para o uso abusivo e tem como consequência a overdose. É considerado um medicamento com potencial significativo para morbidade e mortalidade.

Moreau & Siqueira (2008) citam em sua obra que a faixa terapêutica do FNB é de 15-40 µg/mL. THORTON (2003) esclarece que a dose letal do FNB varia de acordo com muitos fatores, mas provável que intoxicações graves ocorram com a ingestão de uma só vez de doses dez vezes maiores que a dose hipnótica total. Contudo existem casos de ingestão de doses muito maiores que a dose letal mínima estimada para FNB, com recuperação total do paciente. Isto deve ser provavelmente ao fato de desenvolvimento de tolerância, fenômeno que dificulta o estabelecimento da relação entre dose resposta.

A intoxicação por FNB provoca alteração da consciência e depressão dos centros respiratórios e vasomotores e, em casos agudos, cerca de 6 % dos pacientes apresentam lesões na pele e talvez o seu principal sinal seja o coma (THORTON, 2003).

Aliado a afirmação de THORNTON (2003) em 2007 Thompson & Aks relatou o caso de um anestesista, que tentou suicídio com o uso de fenobarbital. Neste caso o paciente foi encontrado em um estado gravíssimo em casa, porém não chegou ao óbito, devido à terapêutica que o paciente obteve, sendo a concentração sérica de FNB encontrada neste paciente de 151,5 µg/mL.

Contudo Thompson & Aks (2007) discute em seu caso clínico, que existem relatos na literatura de casos fatais com concentrações acima de 80 µg/mL, já Parker e colaboradores (1970) relatou que doses tóxicas podem acontecer com

concentrações de FNB acima de 45 $\mu\text{g/mL}$ e que fatalidades podem ocorrer em concentrações acima de 86 mg/L .

Determinada a faixa de trabalho, foi necessário realizar estudos para determinação da linearidade deste método.

De acordo com a resolução 899/2003 da ANVISA, linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. É descrito na resolução que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes.

A correlação entre o sinal medido (área ou altura do pico) e a massa ou concentração da espécie a ser quantificada muito raramente é conhecida em um primeiro momento. Na maior parte dos casos, a relação matemática entre o sinal e a concentração ou massa da espécie de interesse deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para massas ou concentrações conhecidas dessa espécie. Essa relação matemática, muitas vezes, pode ser expressa como uma equação de reta chamada curva analítica (BARROS; PIMENTEL; ARAÚJO, 2002; RIBANI *et al.*, 2004).

Esse gráfico analítico deve apresentar os dados estatísticos de intersecção, da equação da regressão, o coeficiente de correlação ou de determinação e a concentração estimada das soluções-padrão. Assim, torna-se necessário o uso de números suficientes de soluções-padrão para definir adequadamente a relação entre a concentração e a resposta. O gráfico analítico pode ser construído usando-se, no mínimo, seis valores de concentrações enquadrados no intervalo definido (EURACHEN, 2014).

Matematicamente, a estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuada usando o método matemático conhecido como regressão linear. Além dos coeficientes de regressão **a** e **b**, também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação **r**. Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos

experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimado (CHUI; ZUCCHINI; LICHTIG, 2001).

A linearidade é obtida por padronização interna ou externa e formulada com expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real. Sendo a equação da reta que relaciona as duas variáveis de: $y = ax + b$. Onde

Y= resposta medida (absorbância, altura ou área do pico, etc.)

X= concentração

a= inclinação da curva analítica (sensibilidade)

b= interseção com o eixo y, quando x=0

A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito ou então calculados a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método do mínimo quadrado (INMETRO, 2011).

Especialmente em técnicas de cromatografia gasosa, como CG-EM, é freqüente a adição de uma quantidade fixa de um padrão (PI), que tem por fim a comparação relativa com o analito, sem interferir com a resposta do mesmo. Esse procedimento elimina as flutuações inerentes ao processo experimental, como erros ou alterações no volume de amostra injetado, variações na resposta do detector, e alterações da coluna cromatográfica que possam ocorrer ao longo de toda análise. Atenua ainda, os efeitos causados pela matriz, originando resultados mais exatos e precisos, sem evidência de erros sistemáticos. O PI utilizado deve atender um conjunto de requisitos, que são: (I) não estar presente na amostra, (II) possuir tempo de retenção próximo do analito, (III) ser detectável, estável e quantificável sob as mesmas condições de análise, (IV) ser quimicamente similar ao analito, de modo a não interferir com a amostra ou coeluir com os componentes que a constituem (MOFFAT; OSSELTON; WIDDOP, 2004; REPETTO; REPETTO, 2009; TRUTA, 2012).

A faixa de aplicação corresponde ao intervalo entre o valor superior e inferior da substância em análise, que atenda aos requisitos da precisão e exatidão. A ANVISA

especifica um intervalo compreendido entre 80- 120% da concentração teórica para fármacos e medicamentos e de até 120% do limite máximo especificado para determinação de impurezas (RIBANI *et al.*, 2004). O método de padronização interna foi o escolhido para a quantificação da carbamazepina, fenitoína e fenobarbital, e assim a curva de calibração foi construída, utilizando soluções padrão com concentrações conhecidas para cada analito. O propranolol, escolhido como o PI, foi adicionado em todas as amostras no momento da extração, com a finalidade de compensar erros aleatórios e sistemáticos. A curva de calibração foi preparada com um pool de amostras de sangue de periciados *post-mortem* livres dos analitos em questão e com a adição das soluções padrão de cada analito estudado em concentrações distintas, seguido do procedimento da Extração 1.

Dessa forma, as curvas de calibração foram construídas em função da área relativa ao PI. A equação da reta e o coeficiente de determinação foram fornecidos pelo programa EXCEL.

Para análise da linearidade foi preparado uma curva com os analitos adicionados na matriz (sangue), sendo seis níveis de concentração distinta para cada analito e triplicata para cada nível. O branco da curva também foi preparado em triplicata, como ferramenta de controle de qualidade.

Para montar a curva de calibração foi realizada a fortificação do sangue branco, utilizando o pool da matriz já preparado. Foi separado uma alíquota deste pool de sangue para cada uma das 6 concentrações e suas triplicatas, assim cada alíquota (livre dos analitos de interesse) foi fortificada, com a concentração escolhida do analito correspondente. Em seguida a fortificação de cada amostra, foi retirado deste material 100 uL do sangue e inseridos no papel cartão. Após isso o papel foi colocado para secagem em temperatura ambiente por 3 horas.

As manchas de sangues secas foram submetidas ao procedimento de extração 01 com adição de 50 µL do PI com uma concentração de 50 µg/mL. Com isso após o procedimento de extração de todos os extratos, os mesmos foram submetidos à análise cromatográfica.

Foi realizada a análise de cada extrato e conseqüentemente de cada pico encontrado para identificação e certificação de que o pico seria dos analitos de

interesse juntamente com o PI. Assim, foi identificado cada um dos três íons já determinados de cada analito e também foram analisadas suas abundâncias.

Realizado a identificação dos analitos, fez-se a integração de cada pico, a fim de avaliar sua respectiva área. Optou-se por trabalhar com a integração manual de cada pico. Com isso cada integração foi seguida dos mesmos preceitos e também foi realizado pelo mesmo analista. Para análise da integração foi determinado que o início do pico fosse onde ele estaria saindo da linha de base e o seu fim seria o retorno do pico para a linha de base, respeitando a calda que o pico pudesse sofrer. Depois de integrados todos os picos incluindo o PI manualmente, foram realizadas as análises das áreas dos mesmos, através do software do CG-EM denominado chemstation, onde o próprio sistema calculava o resultado da área de cada pico já integralizado.

Integrados todos os picos, as suas áreas foram todas anotadas, nível após nível e assim foi realizada a análise estatística no programa Excel.

A análise estatística do teste de linearidade foi obtida com a realização de uma análise por regressão e uma estimativa dos parâmetros pelos métodos dos mínimos quadrados ordinários (MMQO), com inspeção visual dos dados, gráficos e tratamento de valores dispersos (outliers) e análise do coeficiente de determinação (r^2) a fim de determinar a qualidade do modelo.

4.2.4.3. Efeito matriz

O delineamento experimental para testes de efeitos de matriz consiste do preparo de curvas analíticas simples (curva de analito em solvente) e curvas de materiais de referência ou de adição de analito em amostras brancas ou não (curva de analito em matriz), com concentrações idênticas ou abrangendo a mesma faixa de concentração (VITORINO, 2007).

Estudos de efeitos de matriz se espelham nos experimentos de avaliação da linearidade. Assim, as considerações sobre delineamento experimental para comprovação da linearidade também são válidas para o preparo das curvas de calibração destinadas às verificações dos efeitos de matriz (VITORINO, 2007).

Com isso, para o estudo do efeito matriz neste experimento, foram preparadas três curvas de calibração em seis níveis distintos com os analitos nos solventes, sendo cada nível feito em triplicatas independentes e analisadas em ordem aleatória no mesmo dia. A concentração da curva em solventes abrangia a mesma faixa de concentração da curva matrizada. Brancos da curva também foram preparados para ajustar o zero instrumental.

Os parâmetros de regressão foram estimados e as premissas ao MMQO também foram verificadas.

Para análise do efeito matriz foi realizada uma comparação da curva matrizada, utilizada para análise da linearidade, com uma curva feita somente em solventes. A curva realizada somente com a diluição de solventes, continha a mesma faixa de concentração teórica determinada para realização da curva com a matriz. Realizada a análise de cada curva, foram realizados os testes estatísticos para identificar a diferença entre os dois grupos. Todas as premissas avaliadas na curva de calibração (linearidade) também foram checadas para estas curvas. Para análise dos dados, o teste t é recomendado para comparação entre as médias obtidas nos ensaios com e sem matriz. O teste f é indicado para avaliação da variância dos grupos. Dessa maneira, os dois testes t e f foram utilizados para análise de comparação dos dois grupos. (BRUCE; MINKKINEN; RIEKKOLA,1998; INMETRO,2011).

4.2.4.4. Exatidão

Representa o grau de concordância entre os resultados individualmente encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito com verdadeiro. A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança, ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão (RIBANI *et al.*, 2003).

A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de, no mínimo, 9 determinações contemplado o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 concentrações baixa, média e alta, com 3 réplicas cada (ANVISA, 2003).

Thompson e colaboradores (2002) relatam que para realização dos estudos da exatidão no delineamento experimental, utilizam-se valores de referência para os experimentos de exatidão, que podem ser obtidos com matérias de referência certificados, materiais de referência, métodos de referência ou uso de adição/recuperação. Por motivos financeiros, não foi possível trabalhar com materiais certificados, o que seria ideal para esta análise, então a opção foi por trabalhar com adição/recuperação.

Os termos adição ou fortificação de amostras para ensaios de recuperação aparente são utilizados de forma equivalente. Entretanto, alguns autores sugerem que a fortificação seja restrita á adição do analito de interesse enquanto a adição pode ser relacionada ao analito ou outros compostos conhecidos como interferentes. (EURACHEM, 2014).

Thompson e Colaboradores (2002) descrevem que estudos de recuperação somente permitem avaliar a tendência devida a efeitos dos analito adicionado. Os mesmos efeitos não são necessariamente aplicáveis na mesma extensão ás amostras naturais. Enquanto boas recuperações não são garantias de exatidão, pobres recuperações são certamente indicativas de falta de exatidão

Vitorino (2007) referência os critérios estabelecidos pelo United States Food and Drug Administration (FDA) de 80 a 110% e 60 a 100% para concentrações maiores que 0,1 mg/Kg e menores ou iguais a 0,1 mg/kg, respectivamente.

Para validações de testes intra-laboratoriais, deve-se utilizar um mínimo de três níveis de concentração, com três a dez replicatas por nível (EURACHEM, 2014; INMETRO, 2003; THOMPSON *et al.*, 2002).

De acordo com a portaria 899 da ANVISA a exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente.

A análise da exatidão neste estudo foi possível após realização do teste de linearidade do método. Foram estabelecidas três concentrações distintas para cada analito, sendo uma concentração de qualidade baixa (CQB), média (CQM) e outra de nível mais alto (CQA).

Para realização da análise, foram retiradas do Pool de sangue branco, nove alíquotas de sangue, as quais foram fortificadas com as três concentrações distintas dos três analitos, todos os três níveis também foram realizados em triplicatas e assim foram denominados de amostra fortificada. Cada amostra foi inserida em um papel permeável, seguido da metodologia já estabelecida e descrita neste estudo, para extração do sangue de MSS.

Utilizando a concentração teórica, que estaria sendo extraídas da MSS, alíquotas das amostras de concentrações teóricas foram preparadas com as soluções padrões diluídas em metanol e foram denominadas de “amostras teóricas”. Para cada analito foi preparado três níveis, sendo todos em triplicatas, estes extratos foram denominados de “concentração teórica”. Esses tubos foram colocados para evaporação em fluxo laminar e após a secagem completa dos solventes, os mesmos foram ressuspensos com o mesmo volume de ACN utilizado para ressuspender às amostras fortificadas da MSS.

Realizada análise pelo CG-EM dos dois procedimentos, foi realizada uma comparação entre os dois resultados, analisando a razão das áreas dos extratos da “concentração teórica” (100%) com os “extratos fortificados”. O cálculo utilizado para esta análise está exemplificado abaixo.

$$\text{Cálculo: } \frac{\text{Extrato fortificado}}{\text{Concentração teórica}} \times 100\%$$

4.2.4.5. Precisão

A precisão de um dado método analítico avalia o grau de concordância entre uma série de medições obtidas a partir de uma mesma amostra homogênea, de acordo, com determinadas condições definidas que caracterizam o tipo de previsão avaliada (TRUTA, 2012).

A precisão é avaliada pelo desvio padrão absoluto, que utiliza um número significativo de medições. Na prática, em validação de métodos, o número de determinações é geralmente pequeno e o que se calcula é a estimativa do desvio padrão absoluto (s). Ou através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV). Cálculo $CV = \frac{DP}{Média} \times 100\%$ (EURACHEN, 2014; RIBANI *et al.*, 2004).

Segundo o vocabulário internacional de metrologia (VIM) de 2012, precisão de medição é utilizada para definir a repetibilidade de medição, a precisão intermediária e a reprodutibilidade de medição.

Repetibilidade da medição e medição da reprodutibilidade representam os dois extremos de medidas de precisão que podem ser obtidos. Documentos de métodos padronizados como a ISO, normalmente incluirão dados de repetibilidade, reprodutibilidade ou ambos onde seja aplicável. Para a repetibilidade é esperado dar uma menor variação nos resultados, quando uma medição é realizada por um único analista usando o mesmo equipamento em um curto período. Já na reprodutibilidade é esperada uma variação maior dos resultados, é uma medida da variabilidade em resultados entre laboratórios. Entre esses dois extremos, tem-se a precisão intermediária que mede a estimativa de variação nos resultados, quando a medição é realizada no mesmo laboratório, porém em condições variáveis. “A precisão intermediária às vezes pode ser referida como variação inter-ensaio” (EURACHEN, 2014).

Para os testes de medição da repetibilidade e de precisão intermediária, a Eurachen (2014) preconiza que sejam realizadas de 6 a 15 replicatas para o mesmo material.

Para os estudos de precisão foram realizados testes de repetibilidade e de precisão intermediária. As medições foram denominadas de teste intra-ensaio para a medição da repetibilidade e inter-ensaio para medição da precisão intermediária. O teste intra-ensaio foi realizado no mesmo dia, pelo mesmo analista e equipamento, respeitando as mesmas condições. Já o teste Inter-ensaio foi realizado pelo mesmo analista e equipamento, porém em dois dias diferentes. Foi preparado 3 níveis diferentes de concentração em sextuplicata.

Os resultados obtidos foram avaliados por meio dos cálculos de desvio padrão e do coeficiente de variação (CV).

4.2.4.6. Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental (RIBANI *et al.*, 2003).

Segundo resolução da ANVISA (2003), nos casos de métodos instrumentais (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, GC, absorção atômica), a estimativa do LD pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base.

A Eurachem (2014) descreve que para identificar o limite de detecção devem-se avaliar dez amostras brancas independentes, fortificadas na menor concentração aceitável (concentração mais baixa para a qual um grau aceitável de incerteza pode ser alcançado). Para analisar estes dados é necessário calcular o desvio padrão s dos valores das amostras fortificadas. Expressar o limite de detecção como a concentração do analito correspondente a $3 \cdot s$ (desvio padrão). Já para o INMETRO (2011) o delineamento experimental deve seguir de uma análise com sete ou mais amostras brancas com adição da menor concentração aceitável do analito (concentração mais baixa para a qual um grau aceitável de incerteza pode ser alcançado).

Na metodologia deste estudo, para obtenção dos limites de detecção e quantificação teórico foram utilizadas um total de 10 amostras fortificadas com a menor concentração obtida para os três analitos.

Para determinação do LD com os dados obtidos, foi utilizado a equação descrita por Ribani (2003) onde:

LD= $3,3 \times s$: desvio padrão obtido com as áreas

S

S: coeficiente angular da curva analítica

O Limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental (RIBANI *et al.*, 2003).

Para Eurachem (2014) o limite de quantificação (LQ) é o nível mais baixo do analito que pode ser determinado com um desempenho aceitável. No entanto, na prática o LQ é calculado pela concentração do desvio padrão obtido (s) correspondente ao nível mais baixo encontrado do analito multiplicado por um fator $Kq = 10$. Para este estudo, a equação utilizada para calcular o LQ teórico, seguiu a descrição realizada por Ribani (2003) onde: LQ= $10 \times s$: desvio padrão obtido com as áreas

S

S: coeficiente angular da curva analítica

Para análise do limites de detecção e quantificação, foram preparadas três concentrações para cada analito em amostras brancas, com concentrações abaixo do limite inferior da curva de calibração de cada analito. Esta análise seguiu o mesmo procedimento descrito para montagem da curva de calibração, onde foi inserido 100 uL de sangue fortificado em papel permeável com concentrações conhecidas e distintas. Todos os três níveis foram preparados em 10 replicatas seguidos de extração e análise cromatográfica. Com isso, foi detectado o cromatograma que apresentava o menor sinal dos analitos e realizado os cálculos descritos acima, para identificação dos LDs e LQs teóricos.

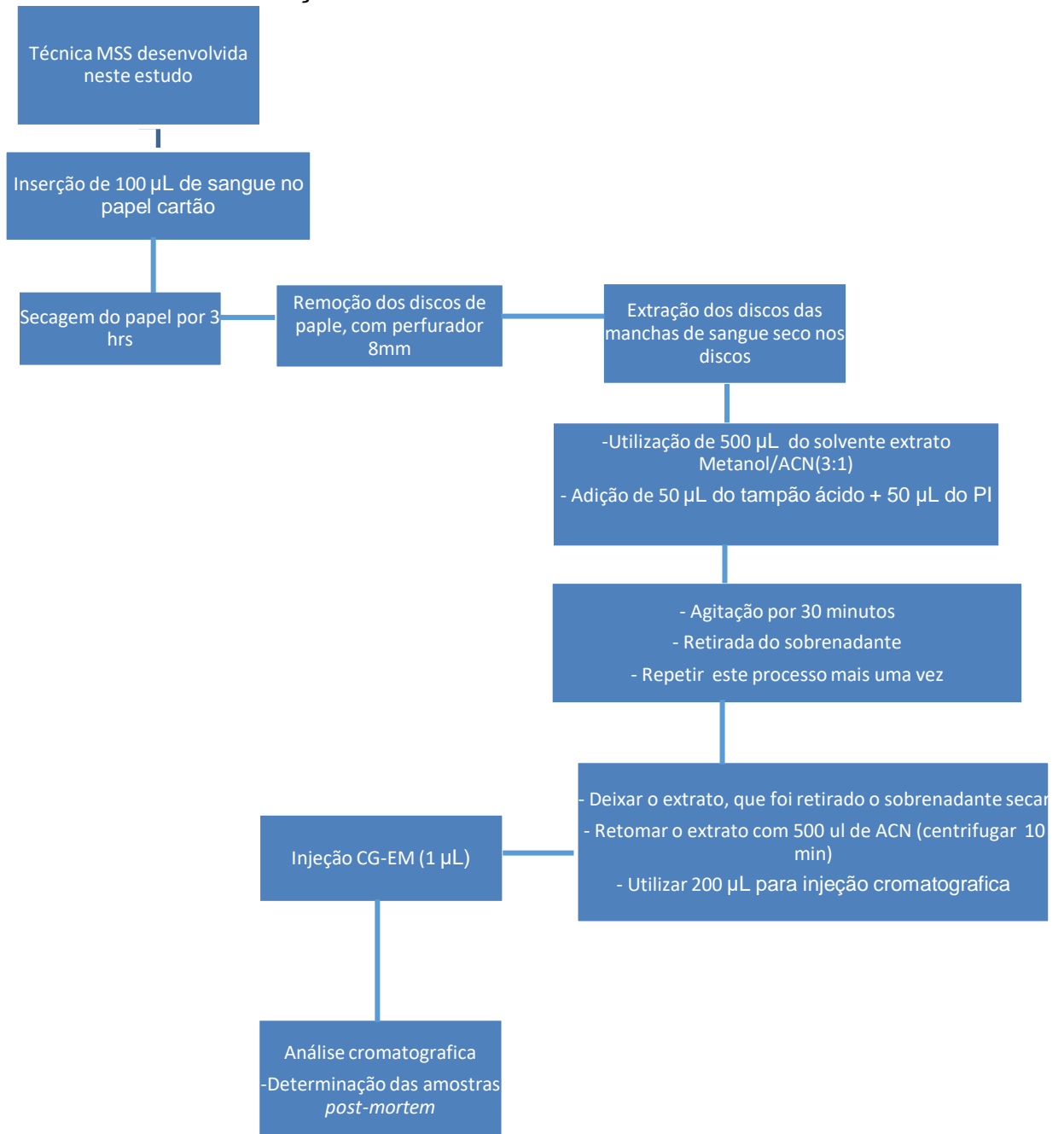
4.2.5. Aplicação do método de análise simultânea dos medicamentos fenobarbital, carbamazepina e fenitoína em amostras de periciados post-mortem.

Para avaliar a aplicabilidade do método desenvolvido, foram testadas 10 amostras de sangue, que na análise qualitativa realizada pelo Labtox (IML/BH) detectaram a presença dos analitos trabalhados neste estudo. Foi avaliado um total de 10 amostras, sendo 04 já com detecção do fenobarbital; 03 da carbamazepina e 03 da fenitoína.

Não será divulgado nenhum registro pessoal dos periciados doadores das amostras, pois deve ser respeitado o preceito de sigilo que envolve cada indivíduo que foi submetido à necropsia. Sendo assim, as amostras serão enumeradas por ordem aleatória, sem identificação do seu número de registro.

Dessa forma, para determinação das amostras já detectadas dos analitos qualitativamente, seguiu-se todo o procedimento da metodologia desenvolvida neste método. Abaixo segue um fluxograma com a utilização da técnica padronizada para este estudo (Figura 6).

Figura 6. Fluxograma com a descrição do método desenvolvido para determinação das FAES envolvidas neste estudo



5. RESULTADOS

5.1. Otimização das condições cromatográficas

A tabela 1.0 apresenta os resultados obtidos com as análises realizadas, para obtenção das melhores condições cromatográficas a serem utilizadas neste estudo.

Tabela 1.0 Parâmetros Analíticos do CG-EM utilizados no métodos

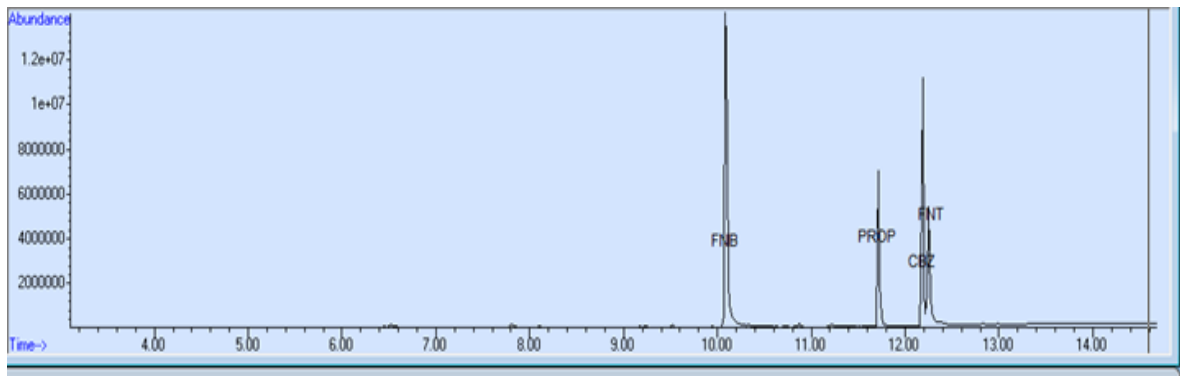
Injetor	Temperatura	250 °C
	Volume da amostra	1uL
	Modo de Injeção	Split
	Pressão	12.307
Coluna	Capilar, DBS-MS	30 m x 250 µm x 0.25 µm
	Fluxo constante	(He) 1,2 mL/min
Forno	Temperatura inicial	90 °C por 0,2 min
	Rampa da corrida	Rampa 115°C por min até atingir 225 °C
		Rampa 2 18°C por min até atingir 291 °C
Tempo total de corrida	15.567 min	
EM	Temperatura do Quadrupolo	280°C
	Solvente delay	3,00
	Modo de ionização	EI
	Temperatura da fonte de ionização	250°C
	Parâmetros de aquisição	SIM

A tabela 2.0 apresenta cada composto estudado, juntamente com o PI, onde especifica a fórmula química e a massa molecular de cada analito, juntamente com a concentração utilizada nos teste de otimização das condições cromatográficas. Os resultados dos tempos de retenção de cada analito de interesse, juntamente com os seus respectivos íons de maior intensidade, também estão relacionados nesta tabela.

Tabela 2.0 Tempo de retenção e íons selecionados para cada analito estudado

Analito	Fórmula química	Massa molecular	Concentração Analito	Tempo de retenção	Íons selecionados (modo SIM) Íons
FNB	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₃	232,235	30 ug/mL	10.058 min	204 (íon qualificador), 117, 232
PPN	C ₁₆ H ₂₁ NO ₂	259,34	30 ug/mL	11.725 min	72 (íon qualificador), 115, 149
CBZ	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O	236,26	30 ug/mL	12.330 min	193 (íon qualificador), 165, 236
FNT	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	252,26	30 ug/mL	12.475	180 (íon qualificador), 223, 252

A figura 7 demonstra o cromatograma obtido com a injeção das soluções padrões diluídas em metanol associados em uma mesma corrida, juntamente com o PI, no modo SIM. O 1 pico é do fenobarbital (FNB), o 2 pico é do propranolol (PI), o 3 pico é da carbamazepina e o 4 pico corresponde a fenitoína.

Figura.7 Cromatograma dos analitos associados com o PI no modo SIM

A detecção de cada pico foi possível em virtude da identificação dos íons de cada composto estudado. As figuras abaixo apresentam os três íons mais abundantes de cada analito. Os íons selecionados do fenobarbital estão apresentados na Figura 8, da carbamazepina na Figura 9 e a da fenitoína na Figura 10. Nas três figuras, para melhor visualização os três íons mais abundantes foram destacados com um círculo.

A coloração vermelha especifica o íon qualificador, o qual consiste em ser o de maior abundância.

Figura 8. Espectro de Massa com seleção dos íons do fenobarbital

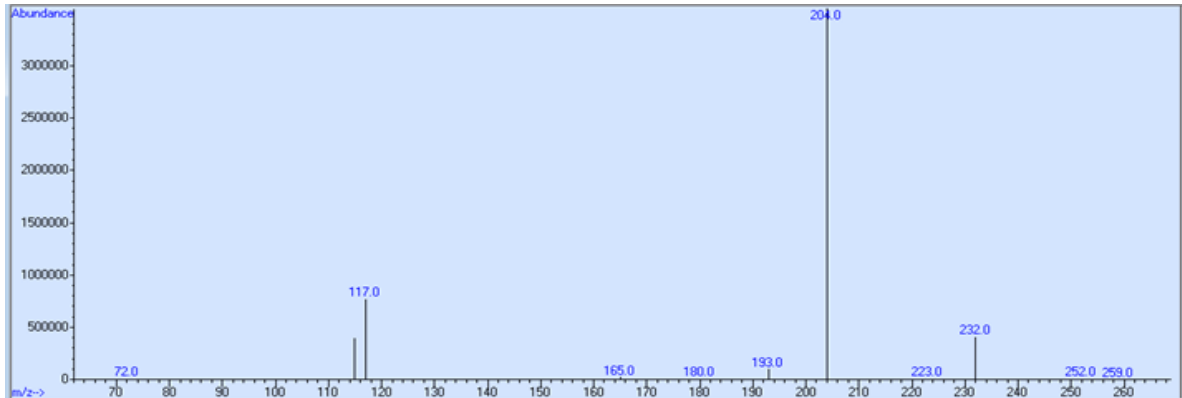


Figura 9. Espectro de Massa com seleção dos íons da carbamazepina

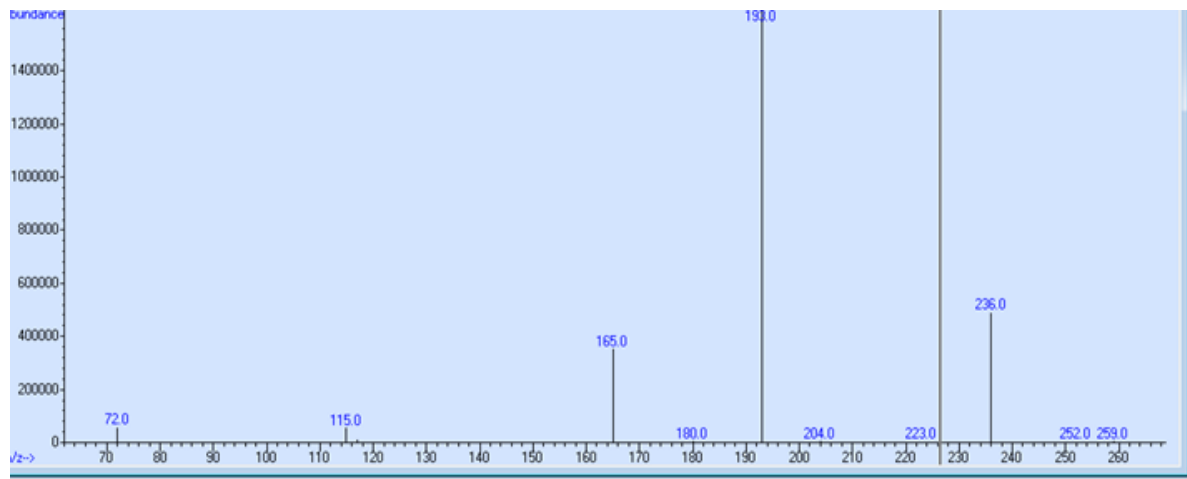
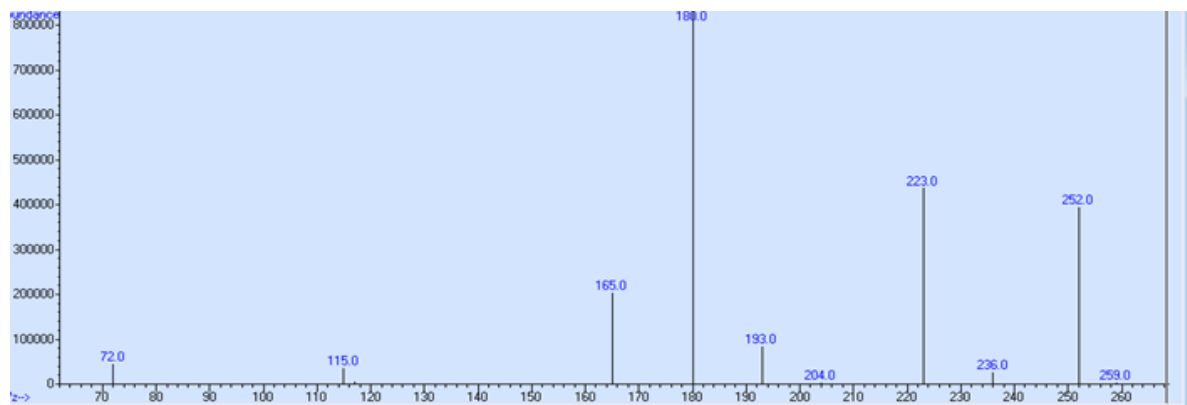


Figura 10. Espectro de Massa com seleção dos íons da fenitoína



5.2. Processo de extração analítico

O resultado das análises dos critérios de escolha para a técnica mais adequada está descritos a seguir:

(I) **Tempo:** O método de **extração 01** (Sem derivatizar) teve uma duração média de 4 horas.

O método de **extração 02** (com derivatização) teve uma duração média de 7 horas.

Portanto o tempo de realização da **extração 01** foi menor do que da **extração 02**, tendo a extração **01** menos etapas e com maior simplicidade de execução.

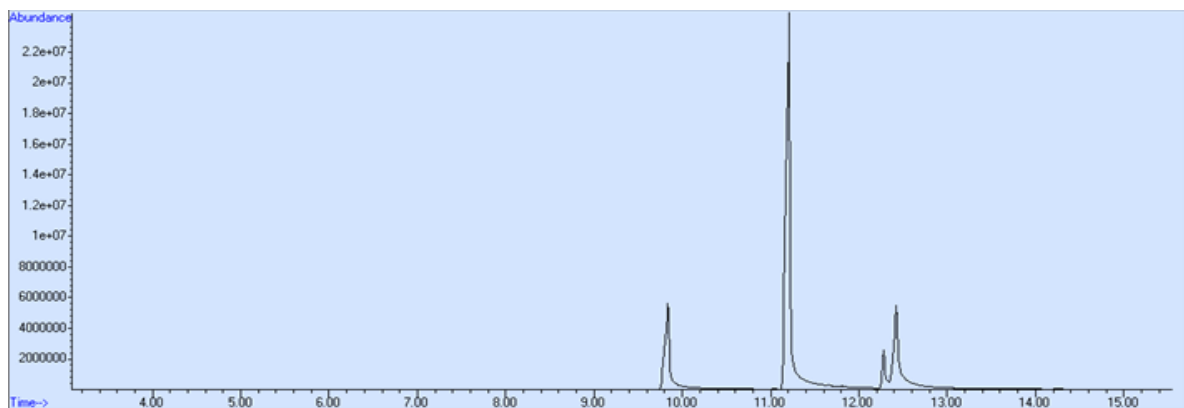
(II) **Custo:** Devido ao uso de um agente derivatizante na extração 02, esta técnica se apresentou um custo mais elevado.

(III) **Análise do cromatograma:** As duas técnicas apresentaram boa sensibilidade para a faixa de trabalho proposta neste estudo, apresentando a técnica de extração (2) uma maior quantidade de picos indesejados (Figura 11).

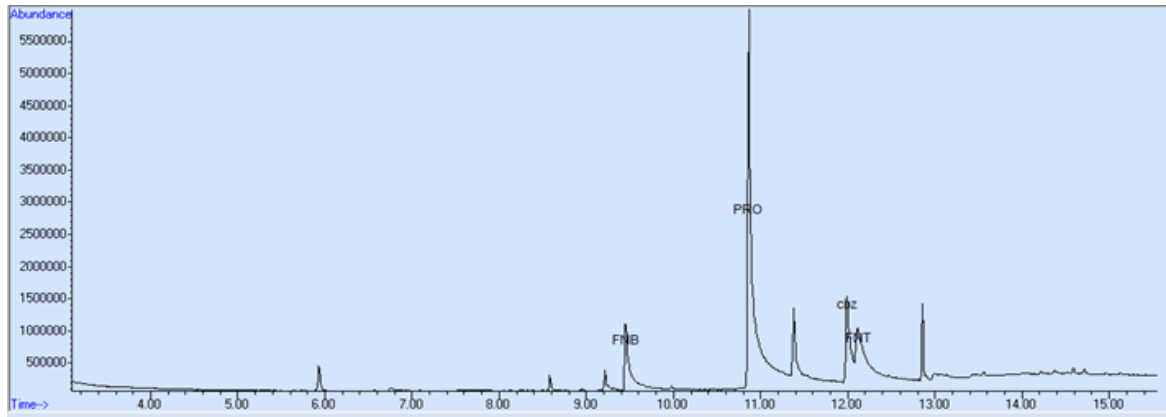
Com os resultados apresentados e análise dos critérios optou-se por utilizar a técnica de extração de sangue 01. Os critérios de avaliação de escolha da técnica serão externados no item de discussão.

Figura 11. A Comparação dos cromatogramas. (A): Cromatograma obtido com os analitos, submetidos ao procedimento de extração 01; (B): Cromatograma dos analitos obtidos com a extração 02

(A) Cromatograma obtido com os analitos, submetidos à extração 01



(B) Cromatograma obtido com os analitos, submetidos à extração 02



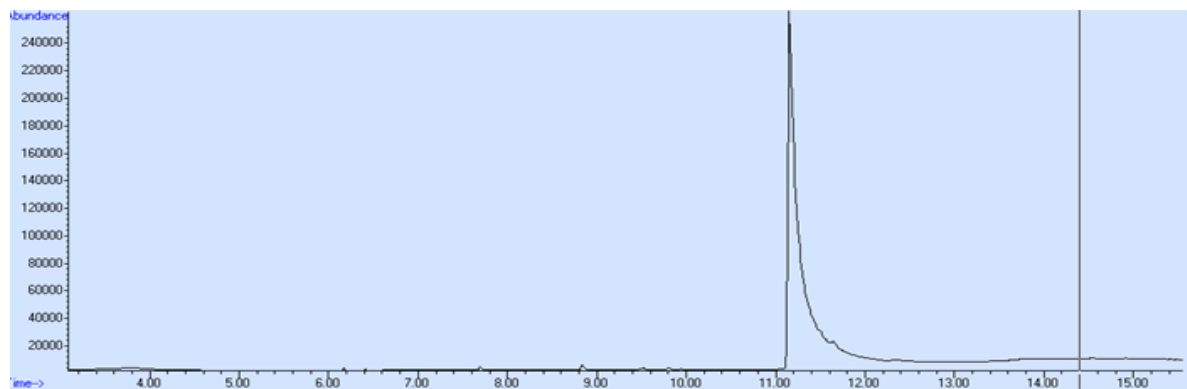
5.3. Estudo dos parâmetros de mérito analítico

5.3.1 Seletividade

(I) Tempo de retenção(TR) Ficou evidenciado uma variação no tempo de retenção menor do que 5 %, comparando o cromatograma da amostra fortifica com os TRs dos analitos injetados diretamente em solventes, sem adição da matriz.

(II) Relação da linha de base. Neste item foi realizada comparação do cromatograma da amostra fortificada e da amostra branca, com o intuito de verificar algum interferente. A figura 12 demonstra o cromatograma encontrado da amostra branca.

Figura 12 Cromatograma da amostra branca



5.3.2 Linearidade e faixa de trabalho.

O resultado da escolha da faixa de trabalho, para realização da curva de calibração esta descrito na tabela 3.0

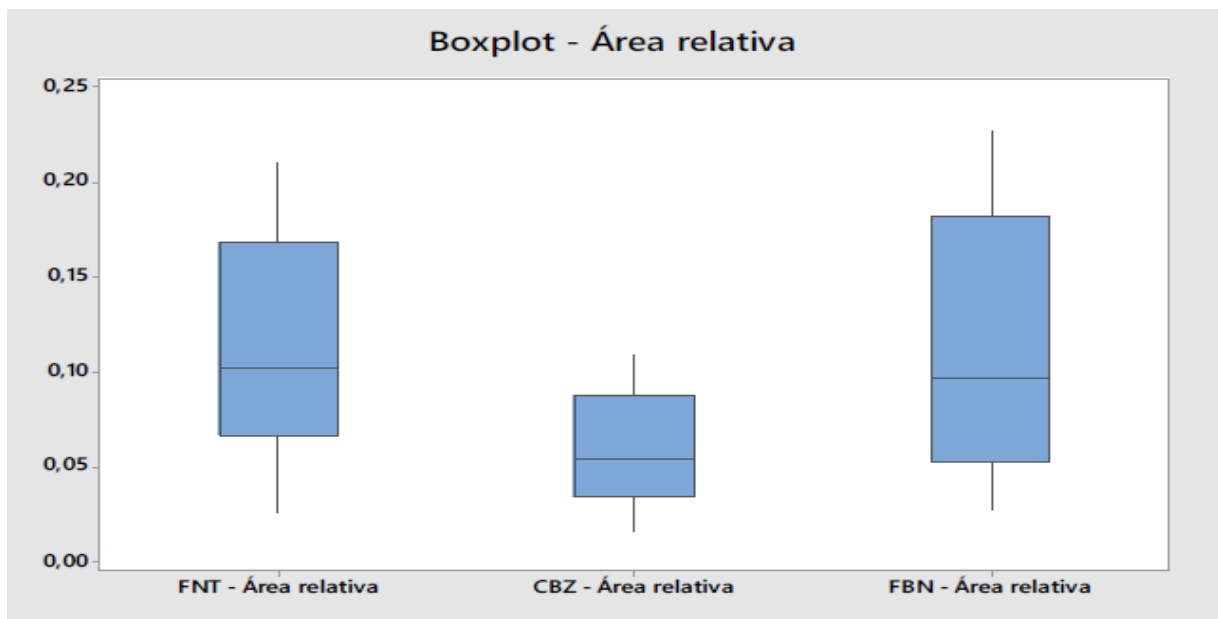
Tabela 3.0 Faixa de trabalho utilizada na curva de calibração

Analito	Concentração dos pontos da curva					
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6
FNB	60 µg/mL	80 µg/mL	100 µg/mL	120 µg/mL	140 µg/mL	160 µg/mL
PI	50 µg/mL	50 µg/mL	50 µg/mL	50 µg/mL	50 µg/mL	50 µg/mL
CBZ	24 µg/mL	36 µg/mL	48 µg/mL	60 µg/mL	72 µg/mL	84 µg/mL
FNT	30 µg/mL	50 µg/ml	70 µg/mL	90 µg/mL	110 µg/mL	130 µg/mL

5.3.2.1. Análise estatística da faixa de trabalho e linearidade

Observa-se a partir da figura 13, valores bem parecidos da área relativa entre o FNT e o FNB, pois possuem variabilidade e medianas praticamente iguais. A região da CBZ possui menor mediana e menor variabilidade do que as outras duas.

Figura 13 Áreas relativas com as medianas da FNB, CBZ e FNT

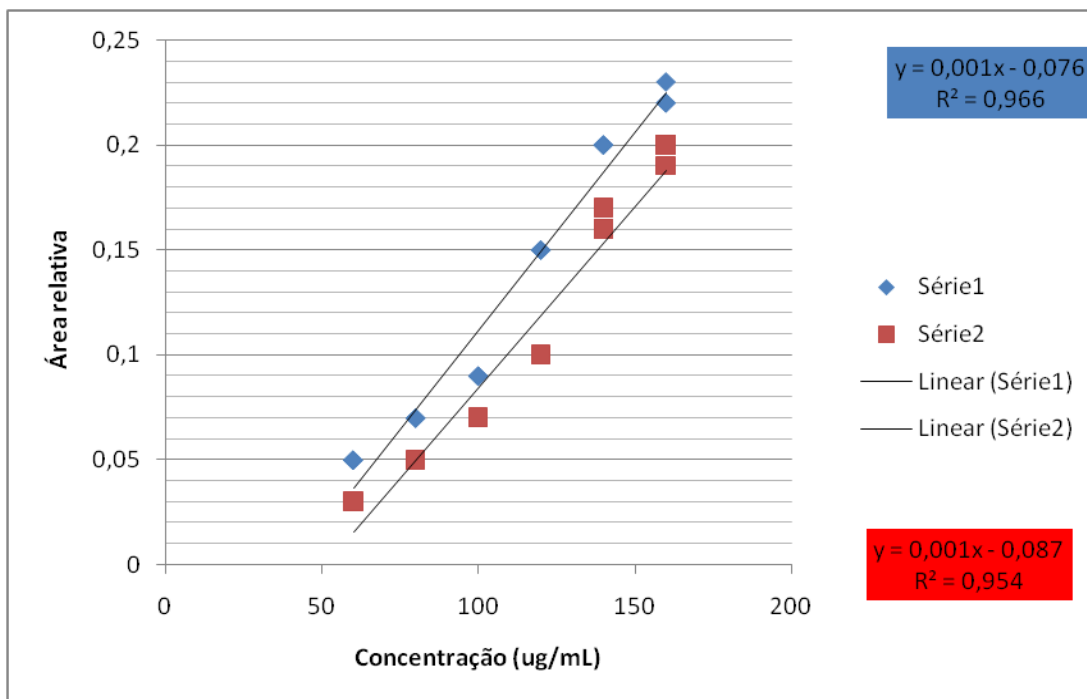


Fonte: Autoria própria

Abaixo estão apresentados os modelos de regressão para cada área do estudo. Para análise foi considerado o Grupo 0 (valores da curva somente por diluição dos analitos em solventes) e grupo 1 (valores da curva com sangue adicionado ou curva matrizada).

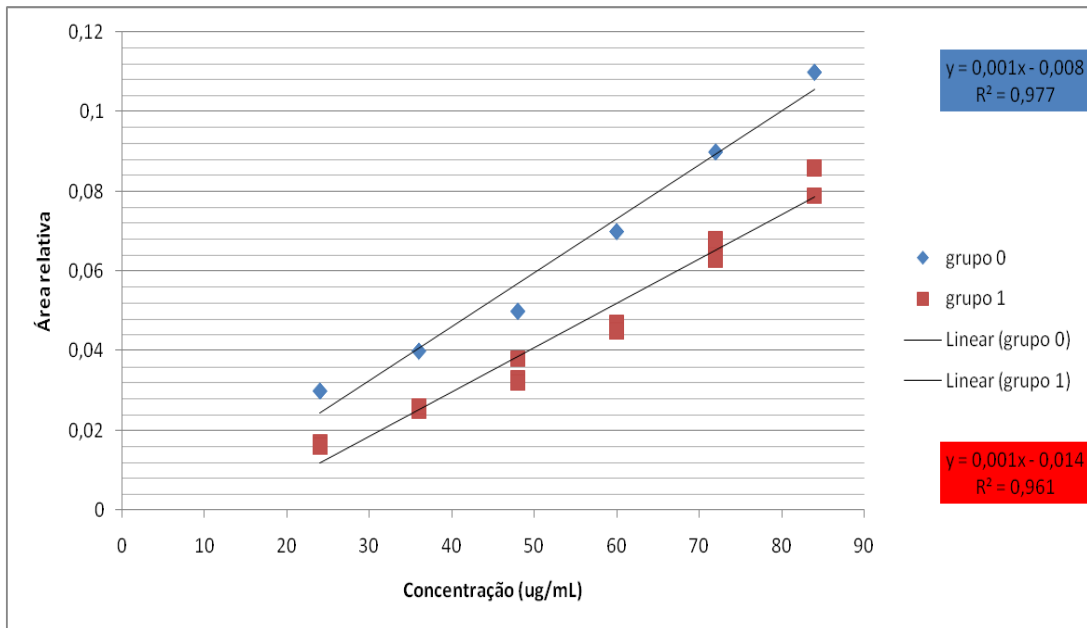
As equações das retas utilizadas para determinação dos resultados para os três analitos foram todas adquiridas da curva matrizada. A figura 14 estabelece a reta de regressão do fenobarbital, sendo o coeficiente de determinação do modelo de 0,954, indicando que cerca de 96 % da variabilidade da área relativa está sendo explicada pelo fator grupo e pela concentração.

Figura 14. Curva de calibração com reta de regressão do fenobarbital



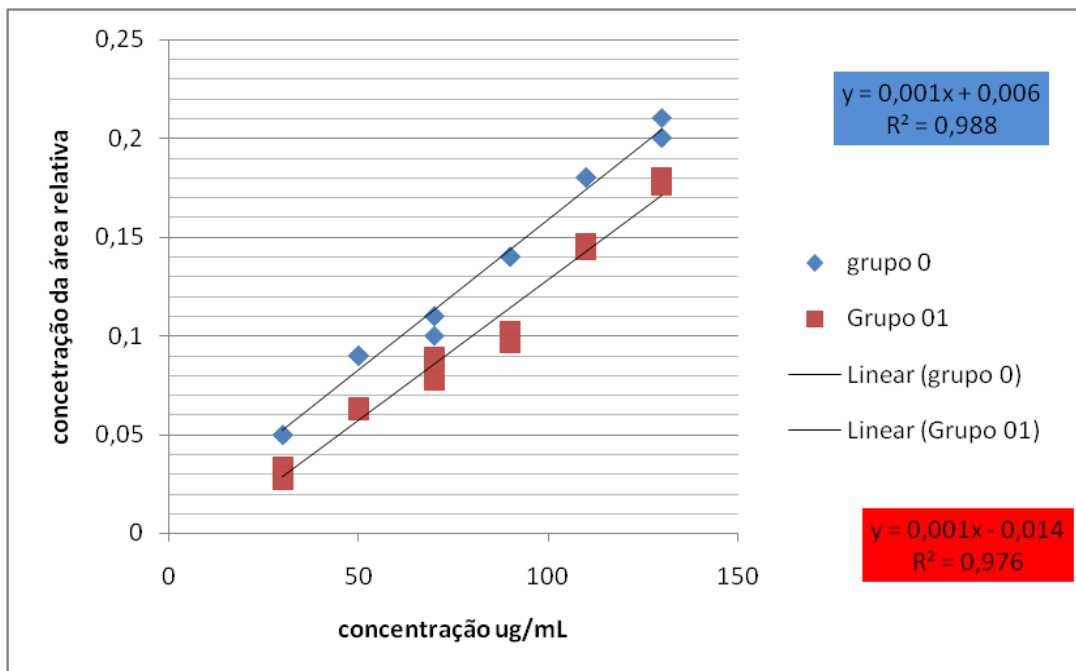
A carbamazepina teve um coeficiente de determinação de 0,961 indicando que cerca de 97% da variabilidade da área relativa esta sendo explicada pelas duas covariáveis escolhidas. O coeficiente de determinação pode ser observado na figura 15.

Figura 15. Curva de calibração com reta de regressão da carbamazepina



A reta de regressão da fenitoína pode ser observada na figura 16, onde o coeficiente de determinação do modelo foi de 0,976, indicando que cerca de 98% da variabilidade da área relativa esta sendo explicada pelo fator grupo e pela concentração.

Figura 16 Curva de calibração com reta de regressão da fenitoína



5.3.3. Análise estatística do efeito de matriz

As tabelas a seguir (Tabela 4.0; tabela 5.0 e tabela 6.0) apresentam os resultados obtidos na realização dos testes T e F, utilizados na análise de efeito matriz para o fenobarbital, carbamazepina e fenitoína

Tabela 4.0 As duas tabelas apresentam os testes T e F realizado para análise das áreas do FNB. (A): Teste T.(B): Teste F

(A) Teste T

<i>Teste T</i>	<i>solventes</i>	<i>Matrizada</i>
Média	0,130555556	0,101666667
Variância	0,004523203	0,003826471
Observações	18	18
Hipótese da diferença de média	0	
Gl	34	
Stat t	1,341319851	
P(T<=t) uni-caudal	0,094354102	
t crítico uni-caudal	1,690924198	
P(T<=t) bi-caudal	0,188708204	
t crítico bi-caudal	2,032244498	

Observa-se que o valor-p foi superior a 0,05, portanto não se rejeita a hipótese nula.

(B): Teste F

<i>Teste F</i>	<i>solventes</i>	<i>matrizada</i>
Média	0,130555556	0,101666667
Variância	0,004523203	0,003826471
Observações	18	18
Gl	17	17
F	1,182082159	
P(F<=f) uni-caudal	0,367069443	
F crítico uni-caudal	2,271892889	

No teste F o p-valor foi de 0,367 levando a não rejeição da hipótese de normalidade para os erros do modelo.

Tabela 5.0 As duas tabelas apresentam os testes T e F realizado para análise das áreas do CBZ. (A): Teste T.(B): Teste F

A: Teste T

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias diferentes		
	<i>Solvetes</i>	<i>Matrizada</i>
Média	0,0485	0,045166667
Variância	0,000707206	0,000572029
Observações	18	18
Hipótese da diferença de média	0	
GI	34	
Stat t	0,395402837	
P(T<=t) uni-caudal	0,347507842	
t crítico uni-caudal	1,690924198	
P(T<=t) bi-caudal	0,695015684	
t crítico bi-caudal	2,032244498	

Observa-se que o valor-p foi superior a 0,05, portanto não se rejeita a hipótese nula.

B: Teste F

Teste-F: duas amostras para variâncias		
	<i>Solvetes</i>	<i>matrizada</i>
Média	0,0485	0,045166667
Variância	0,000707206	0,000572029
Observações	18	18
GI	17	17
F	1,23631035	
P(F<=f) uni-caudal	0,333400438	
F crítico uni-caudal	2,271892889	

No teste F o p-valor foi de 0,333 levando a não rejeição da hipótese de normalidade para os erros do modelo.

Tabela 6.0 As duas tabelas apresentam os testes T e F realizado para análise das áreas do FNT. A: Teste T. B: Teste F

(A): Apresentação do Teste T

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias diferentes		
	<i>solventes</i>	<i>matrizada</i>
Média	0,128333333	0,100555556
Variância	0,002920588	0,002699673
Observações	18	18
Hipótese da diferença de média	0	
Gl	34	
Stat t	1,572010682	
P(T<=t) uni-caudal	0,06260444	
t crítico uni-caudal	1,690924198	
P(T<=t) bi-caudal	0,125208879	
t crítico bi-caudal	2,032244498	

Observa-se que o valor-p foi superior a 0,05, portanto não se rejeita a hipótese nula

(B): Teste F

Teste-F: duas amostras para variâncias		
	<i>solventes</i>	<i>matrizada</i>
Média	0,128333333	0,100555556
Variância	0,002920588	0,002699673
Observações	18	18
Gl	17	17
F	1,081830287	
P(F<=f) uni-caudal	0,436533496	
F crítico uni-caudal	2,271892889	

O teste F, apresentou um p-valor de 0,436 levando a não rejeição da hipótese de normalidade para os erros do modelo.

5.3.4 Exatidão

As tabelas a seguir apresentam a média dos valores das concentrações encontradas na amostra fortificada de cada nível, juntamente com as concentrações teóricas que seriam extraídas do disco da mancha de sangue seco com os valores obtidos da recuperação média de cada analito (Tabela 7.0; tabela 8.0 e tabela 9.0).

Tabela 7.0 Valores obtidos no teste de exatidão do FNB

Analito	Concentração	Recuperação
FNB	70 µg/mL	61,5 %
	110 µg/mL	81,4%
	150 µg/mL	81,9%

Tabela 8.0 Valores obtidos no teste de exatidão da CBZ

Analito	Concentração	Recuperação
CBZ	30 µg/mL	79,3 %
	50 µg/mL	80,7%
	80 µg/mL	79, 1%

Tabela 9.0 Valores obtidos no teste de exatidão da FNT

Analito	Concentração	Recuperação
FNT	40 µg/mL	76,1 %
	80 µg/mL	79,4 %
	120 µg/mL	84,7 %

5.3.5. Precisão

As tabelas a seguir apresentam a concentração teórica de cada analito, juntamente com os coeficientes de variação intra-ensaio e inter-ensaio obtidos no estudo da precisão de cada analito (Tabela 10.0; tabela 11.0 e tabela 12.0).

Tabela 10.0 Valores obtidos dos coeficientes de variação dos teste intra e inter ensaio para o fenobarbital (n=6).

Concentração	Coeficiente de variação intra-ensaio	Coeficiente de variação inter-ensaio
70 µg/mL	11,2 %	11,1 %
110 µg/mL	7,3 %	7,5 %
150 µg/mL	6,1 %	5,0 %

Tabela 11.0 Valores obtidos dos coeficientes de variação dos teste intra e inter ensaio para o carbamazepina (n=6).

Concentração	Coeficiente de variação intra-ensaio	Coeficiente de variação inter-ensaio
30 µg/mL	13,16 %	14,7%
50 µg/mL	10,4 %	10,2 %
80 µg/mL	8,3 %	7,6 %

Tabela 12.0 Valores obtidos dos coeficientes de variação dos teste intra e inter ensaio para o carbamazepina (n=6).

Concentração	Coeficiente de variação intra-ensaio	Coeficiente de variação inter-ensaio
40 µg/mL	12,9%	14,5%
80 µg/mL	7,6 %	8,5 %
120 µg/mL	7,8 %	6,7%

5.3.6.Limites de quantificação e de detecção

A tabela 13.0 apresenta os resultados obtidos para os LDs e LQs do fenobarbital, carbamazepina e fenitoína.

Tabela 13.0 Limites de detecção e quantificação obtidos para o FNB, CBZ e FNT

Analitos	Limite de detecção	Limite de Quantificação
FNB	2,98µg/mL	9,80µg/mL
CBZ	1,77µg/mL	5,90µg/mL
FNT	5,46µg/mL	18,2µg/ml

5.4. Aplicações do método

Os resultados obtidos com as amostras post-mortem, utilizadas para avaliar a aplicabilidade deste método estão descritos na tabela 14.0 e a figura 17 apresenta as manchas de sangue seco obtidas com preparação das amostras de sangue *post-mortem* para aplicação deste teste.

Figura 17 Mancha de sangue seco obtidas para a determinação das amostras *post-mortem*



Fonte: Autoria própria

Nesta figura pode-se observar diferença significativa entre as duas primeiras manchas de sangue seco, em relação à terceira.

Tabela 14.0 Determinação das amostras de sangue post-mortem para FNB, CBZ e FNT.

Amostra	FNB ($\mu\text{g/mL}$)	CBZ ($\mu\text{g/mL}$)	FNT ($\mu\text{g/mL}$)
Amostra 01	Abaixo do LD	Abaixo do LD	Abaixo do LD
Amostra 02	Abaixo do LD	Abaixo do LQ	Abaixo do LD
Amostra 03	71,6	Abaixo do LD	Abaixo do LD
Amostra 04	Abaixo do LD	Abaixo do LD	Abaixo do LD
Amostra 05	Abaixo do LD	27,11	Abaixo do LD
Amostra 06	Abaixo do LD	Abaixo do LD	Abaixo do LD
Amostra 07	52,8	Abaixo do LD	Abaixo do LD
Amostra 08	Abaixo do LD	Abaixo do LD	Abaixo do LD
Amostra 09	61,86	Abaixo do LD	Abaixo do LD
Amostra 10	Abaixo do LD	Abaixo do LD	Abaixo do LD

6. DISCUSSÃO

Embora já tenham sido realizadas determinações do FNB, CBZ e FNT tanto na CLAE quanto no CG-EM, como já relatado neste estudo. A sistemática analítica neste método seguiu outro caminho, pois diferente das metodologias citadas, que trabalharam com a técnica de MSS para monitoramento terapêutico, este trabalho realizou a determinação destes três medicamentos em amostras *post-mortem* para análises de intoxicações por uma destes medicamentos.

Foi relatado ao longo deste estudo que amostras de sangue *post-mortem* sofrem uma especial dificuldade em se trabalhar frente às amostras clínicas comuns. As afirmações encontradas na literatura puderam ser comprovadas também por este estudo. Jones (2008) reforça essa idéia em seu livro de toxicológica analítica forense, quando descreve que o sangue *post-mortem* apresenta uma heterogeneidade, que dificulta as análises. As amostras de sangue utilizadas neste estudo (adquiridas através do Labtox IML-BH) apresentavam aspecto bastante heterogêneo, com número elevado de coágulos e com aspecto bastante diferente de sangue venoso ou arterial de um indivíduo vivo, com uma viscosidade intensa.

Para escolher as melhores condições analíticas, em um primeiro momento houve a necessidade de injeção dos padrões de cada analito separados, seguidos de injeção de todos os compostos associados em uma mesma corrida, com intuito de avaliar o tempo de retenção e a separação de cada pico. O fenobarbital foi o primeiro pico eluído, seguido do PI, carbamazepina e fenitoína. Os únicos que apresentaram co-eluição inicialmente foram a CBZ e o FNT, onde mesmo depois de diversas modificações nas temperaturas do forno para separá-los, ainda apresentaram uma proximidade grande, mas nada que atrapalhasse a identificação e quantificação de ambos com a faixa de trabalho proposta. Nos trabalhos de determinação da CBZ e FNT simultaneamente descrito por Kong e colaboradores (2014) e Lima e colaboradores (2014), estes dois analitos também demonstraram uma proximidade, mesmo sendo estes dois trabalhos em técnicas cromatográficas diferentes. Portanto, consideramos essa aproximação dos picos como normal. Diferente deste trabalho, no estudo realizado por Kong e colaboradores (2014) o FNT elui primeiro do que a

CBZ seguida do PI utilizado, que foi a 5-metildifenil hidantoína. O tempo de duração da corrida cromatográfica deste estudo foi de 15 minutos, mostrando-se ser mais rápida do que a descrita por Kong e colaboradores (2014).

Com a utilização da espectrometria de massa, pudemos aumentar a especificidade da técnica, pois conseguimos a identificação de cada analito através da relação carga-massa dos íons correspondentes de cada composto. Após a identificação de cada analito e dos seus respectivos íons, aumentamos ainda mais a especificidade do método com a utilização do modo SIM, o qual nos permite selecionar apenas os íons de interesse. Neste caso, foi selecionado para identificação, apenas os íons dos três compostos de interesse juntamente com os íons do PI. Dessa maneira, foi realizada uma seleção no cromatograma, onde aparecerão apenas picos dos íons selecionados.

Kong e colaboradores em 2014 e Lima e colaboradores também em 2014 desenvolveram um método para determinação de alguns fármacos antiepilépticas por CG-EM e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) respectivamente. As duas técnicas tinham propostas de extrações diferentes, contudo trabalhavam com medicamentos similares.

Para escolher a técnica de extração do sangue, que melhor se adequaria neste estudo, foram avaliados três critérios: (I) tempo, (II) custo e (III) desempenho cromatográfico dos analitos nos dois procedimentos. As duas técnicas tinham como maior diferença a derivatização.

Derivatização é a transformação de um composto químico em outro com a finalidade de melhorar o perfil cromatográfico: aumentar a estabilidade térmica e a volatilidade do analito; melhorar a precisão e sensibilidade do método: diminuir a polaridade dos compostos; e evitar a perda do analito por adsorção à coluna ou por decomposição térmica. Pela derivatização, a estrutura química do analito é modificada através da substituição dos hidrogênios livres ativos por outros que impeçam as ligações do tipo hidrogênio e, conseqüentemente, o padrão de fragmentação do novo composto também é alterado (CASARETT, 2013; LANÇAS, 1993).

A técnica escolhida para extração do sangue foi sem a etapa de derivatização. Os motivos para esta escolha foram: o procedimento escolhido permitiu trabalhar com

apenas dois tipos de solventes, ambos com um pequeno volume, trazendo benefício para o analista. O tempo de duração da técnica escolhida foi menor do que a técnica com derivatização, o que permite realizar um maior número de exames em um menor intervalo de tempo. O custo da técnica escolhida foi bem menor, já que não utiliza o reagente derivatizante BSTFA, cujo valor é muito alto e assim torna a técnica com derivatização com custo mais elevado. Os cromatogramas obtidos dos analitos com a extração das duas técnicas apresentaram picos de boa separação e resolução. Porém a técnica com derivatização mesmo demonstrando picos mais intensos para os analitos apresentou também uma maior quantidade de picos, que não eram dos compostos de interesse. OLIVEIRA (2013) em seu estudo de determinação da carbamazepina, fenitoína, fenobarbital e lamotrigina em plasma por CLAE, utilizou o extrator MTBE para alcançar uma melhor sensibilidade dos seus analitos. Talvez, se trabalhado com a otimização da técnica realizada por Kong e colaboradores (2014), poderia haver um aumento de sensibilidade, em especial com FNB, que devido a sua polaridade, quando derivatizado consegue-se uma maior estabilidade do analito (ALMEIDA, 2012), assim poderíamos ter conseguido limites de detecção e quantificação menores para todos os compostos. Contudo, como o objetivo deste estudo foi otimizar um método que possa quantificar FAES em indivíduos intoxicados *post-mortem*, que por motivo da ingestão dos medicamentos tenha-se atribuído ou contribuído para causa morte. A faixa de trabalho padronizada por estes motivos respeitou as doses tóxicas e letais respectivas de cada analito estudado. Sendo assim, a faixa de trabalho estabelecida foi alta e não houve necessidade de que o método apresentasse uma grande sensibilidade. Portanto a técnica escolhida para este trabalho foi a otimização do procedimento descrito por Lima e colaboradores (2014), que atendeu aos requisitos exigidos para escolha da faixa de trabalho.

As diferenças no método descrito por Lima e colaboradores (2014) e a otimização da extração neste trabalho, se iniciou com a quantidade de discos de sangue seco utilizado. No método descrito por Lima e colaboradores (2014) foi utilizado apenas um disco por extração de sangue do papel. Neste estudo houve a necessidade de trabalhar com dois discos, pois quando analisamos apenas um disco de sangue fortificado, não obtivemos boa resposta cromatográfica. Sendo assim, viu-se a necessidade em se trabalhar com dois discos, com o intuito de aumentar o volume

sanguíneo e melhorar a sensibilidade do método. Diferente do método de Lima e colaboradores (2014), neste procedimento optou-se por trabalhar com extração do solvente em duplicata, ou seja, fez-se o processo de adição, agitação e separação do solvente duas vezes. O volume utilizado para retomar o extrato já seco, foi maior do que o utilizado por Lima e colaboradores (2014) e o volume de injeção foi de 1µL enquanto o de LIMA foi de 25 µL.

Para análise das figuras de méritos, foram avaliados os parâmetros descritos pela ANVISA de seletividade; Linearidade e faixa de trabalho; efeito matriz; Exatidão; Precisão e Limites de detecção e quantificação.

No estudo da seletividade avaliou-se o tempo de retenção dos analitos e a relação da linha de base. Na avaliação nos Tempos de Retenção ficou evidenciada uma variação menor do que 5% se comparado os cromatogramas da amostra fortificada com os TRs dos analitos injetados diretamente em solventes, sem adição da matriz. Os TRs das amostras de sangue fortificadas mostraram uma variação menor do que 2% entre diferentes concentrações. Truta (2012) relata em seus estudos, quando na investigação de alguns antidepressivos por CG-EM/EM, que houve uma pequena variabilidade dos seus tempos de retenção de + ou - 0,1 minutos, se comparado seus controles positivos com suas amostras fortificadas. Portanto, considerou-se essa pequena variação insignificante, inerente a qualquer técnica utilizada, onde acontecerá uma pequena variabilidade dos tempos de retenção de cada analito eluído na coluna.

Na relação da linha de base não foi observado no cromatograma da amostra branca nenhum pico nos tempos de retenção dos analitos deste estudo que pudesse interferir na análise dos picos e a linha de base dos dois cromatogramas se mantiveram bem equiparadas.

Dessa maneira, todos os resultados obtidos confirmaram a inexistência de interferência proveniente da matriz que pudesse interferir na capacidade de identificação e seleção do método.

Com relação às áreas relativas obtidas para construção da curva de calibração, pode-se perceber que a CBZ possuiu uma mediana e uma menor variabilidade do que o FNB e a FNT. Isso é explicado pelo fato da CBZ ter uma faixa de trabalho com

concentrações menores do que os outros analitos, além de ter uma faixa linear menor, sendo o FNT e FNB com valores de faixa lineares muito próximos.

Os resultados estatísticos obtidos para o estudo da linearidade indicaram que os três compostos se ajustaram a uma função de calibração linear, uma vez que foi possível observar comportamento da área relativa com 5% de variância. Além de apresentar um intervalo de confiança acima de 95% com coeficiente de correlação (r^2) superiores a 0,95.

Uma correlação de +1 ou - 1 é raramente observado. O mais comum é que o coeficiente fique situado no intervalo entre estes dois valores. Um coeficiente de correlação "0" significa que não existe um relacionamento linear entre as duas variáveis (SANCHEZ, 2002). O método se mostrou linear entre as concentrações dos analitos e os índices das áreas de cada pico na faixa de 24- 84 ug/mL para CBZ, 30- 130 ug/mL para FNT e 60-160 ug/mL para o FNB.

No estudo do efeito matriz foi realizado testes com os grupos das áreas relativas das amostras fortificadas (curva de calibração) com as áreas obtidas dos analitos somente diluídos em solvente (utilizada mesma concentração teórica obtida para a curva de calibração). Nesta análise, foi utilizado o teste T, que é aplicado sempre que se pretende comparar as médias de uma variável quantitativa em dois grupos diferentes de sujeitos e se desconhecem as respectivas variâncias, sendo o nível de significância de 0,05 (SILVA *et al.*, 2014). Como o teste T, demonstrou um valor-p superior ao nível de significância para os três analitos, a hipótese nula é aceita e assim pode-se concluir que não existe diferença significativa para os dois grupos. Aliado ao teste T, o teste F também demonstrou que não houve uma variância grande, se comprado os dois grupos. Em um estudo realizado por Ellefsen e colaboradores (2015) na determinação de cocaína e seus metabólitos utilizando a MSS, com o intuito de minimizar os efeitos de matriz, empregaram a adição da técnica de SPE, contudo mesmo com adição deste procedimento, ainda obtiveram interferência da matriz.

Dessa forma, podemos concluir que houve uma pequena variação entre as médias dos dois grupos, porém não foi tão significativa, sendo essa variação inerente a

matriz utilizada. Em consequência disso, o efeito de matriz não prejudicou a eficiência da metodologia proposta.

Thompson e colaboradores (2002) descrevem que estudos de recuperação somente permitem avaliar a tendência devida a efeitos dos analito adicionado. Os mesmos efeitos não são necessariamente aplicáveis na mesma extensão às amostras naturais. Enquanto boas recuperações não são garantias de exatidão, pobres recuperações são certamente indicativas de falta de exatidão.

No estudo da exatidão, foram obtidos resultados com uma média de 76,2 % para o FNB, 74,5% para a CBZ e 80,0% para a FNT, sendo o intervalo para os três analitos de 61,5 a 84,7 %. No estudo realizado por Alfazil & Anderson (2008), onde foi analisado a estabilidade de cocaína e alguns benzodiazepínicos em amostras de mancha de sangue seco, adquiridos através do Scottish National Blood transfusion, conseguiu-se obter um intervalo de recuperação de 81 a 106% para todos os analitos. Já Oliveira (2013) para determinar FNB, CBZ e FNT em amostras de plasma obteve uma variação na recuperação com intervalo de 88,1 -112,1%. OLIVEIRA ainda cita em seu trabalho, que de acordo com referências na literatura, seus resultados obtidos com a recuperação são condizentes, já que estes valores variam geralmente de 63-113 %. Como já mencionado, se levado em consideração a complexidade das amostras trabalhadas neste estudo, e o pequeno volume de amostra trabalhado, esta pequena diferença entre os dois tipos de amostras, não foi tão significativa. Portanto consideramos a recuperação obtida neste trabalho como boa, sendo apenas a CQB do FNB com um valor abaixo do esperado, mas que ainda assim pode ser aceitável.

Como mostrado no item 5.3.4, este método mostrou uma boa precisão, com intervalos nos coeficientes de variação (CV) nos testes intra-ensaio para o FNB de 6,1-11,2 %; CBZ de 8,3 – 13,1% e FNT de 7,6 a 12,9%. Já os intervalos dos CV dos testes inter-ensaio foram de 5,0 -11,1% para o FNB; 7,6- 14,7% para a CBZ e 6,7 – 14,5 para a FNT. Todos os resultados apresentaram valores abaixo de 15%.

Em um trabalho realizado por YUAN SU (2013), o qual consistia na análise quantitativa de drogas de abuso por pulverização de papel cartão em espectrometria de massas, o autor obteve nos testes de precisão um desvio padrão relativo de até

12% em suas análises. Neste mesmo estudo o autor trabalhou com um tratamento simples para o papel, utilizando ácido nítrico (HNO₃) ou hipoclorito de sódio (NaClO), para melhorar o desempenho quantitativo do método, eliminando o efeito de matriz, que configurava no método, em grande parte devido a moléculas pequenas contidas no papel

Já Lima e colaboradores (2014), obteve bons resultados de precisão, com valores de CV para o teste intra-ensaio entre 5,3- 8,4 % e inter-ensaio entre 3,3 – 5,2 %. Duas grandes diferenças estão acopladas nos métodos realizados por Lima e colaboradores e por este estudo. A principal diferença consiste na amostra de sangue *post-mortem*, como relatado algumas vezes, que faz uma diferença grande nos resultados analíticos. Outra diferença pode ser atribuída à técnica cromatográfica, já que Lima utilizou a CLAE. Já Yuan além de trabalhar com amostras clínicas, utilizou também uma solução para minimizar os interferentes inerentes a técnica. Portanto para se ter um embasamento maior nas comparações, seria necessário, comparar os resultados desta metodologia com um método que também determinasse os anticonvulsivantes em amostras de sangue *post-mortem* utilizando mancha de sangue seco, contudo não foi encontrado nenhum artigo que pudesse ser realizado esta analogia de resultados.

Os limites de detecção e quantificação dos três analitos abrangeram a área citada na literatura como intervalo de monitoramento terapêutico, sendo os LDs de 2,98; 1,77 e 5,46µg/mL e os LQs de 9,80; 5,90 e 18,20µg/ml para FNB, CBZ e FNT respectivamente. Somente a FNT apresentou um LQ próximo ao limite máximo do intervalo do monitoramento terapêutico. Talvez isso possa ser explicado, pela forte ligação protéica que a fenitoína sofre como já citado por Moreau & Siqueira (2008) neste estudo e que com o grande número de coágulos que as amostras possuíam, pode ter sido um fator que possa ter elevado essa interferência, diminuindo assim sua sensibilidade. Talvez para minimizar essa interferência e conseguir resultados com maior sensibilidade fosse necessário utilizar uma técnica de desproteinização.

Contudo, como relatado para este estudo o importante é a identificação e determinação dos medicamentos em indivíduos com históricos de intoxicações.. Portanto métodos que obtiveram um LD e um LQ muito menor, como no estudo de Lima e colaboradores (2014) onde o LQ da CBZ foi de 0,63 ug/mL e do FNB e FNT

de 1,56 ug/mL, tinham outra proposta de trabalho, em consequência disso, tinham uma faixa de trabalho menor. Especialmente no caso de Lima e colaboradores (2014), o objetivo do estudo era a quantificação de FAES com o uso de MSS em amostras utilizadas para monitoramento terapêutico. Ou seja, o objetivo era a prevenção de intoxicações, no nosso estudo o indivíduo ou periciado já deve ter sofrido a intoxicação que possa ter levado ou contribuído para causa morte.

No entanto, é importante ser ressaltado que houve uma grande diferença entre os limites de quantificação deste estudo em comparado com os de Lima e colaboradores (2014), já que a otimização da extração realizada neste trabalho, partiu do procedimento descrito por Lima e colaboradores (2014). Assim podemos inferir que o tipo de amostra (sangue *post-mortem*) influenciou bastante o resultado de detecção dos analitos. Não foi possível fazer uma comparação entre os limites de detecção de Lima e colaboradores (2014) e este estudo, já que os LDs dos analitos não foram descritos no estudo realizado por Lima e colaboradores (2014). Outra situação que foi divergente do trabalho de Lima e colaboradores (2014), é que o seu LQ foi alcançado através do valor inferior da sua curva analítica. Diferente deste autor, neste estudo foi seguido às orientações descritas pela Eurachem (2014), INMETRO (2011) e Ribani (2003) onde o LQ teórico foi obtido através da equação descrita no item 4.2.4.6.

Sendo assim, os LDS e LQS encontrados para todos os analitos, foram considerados adequados para este método, pois ficaram abaixo do limite inferior da faixa de trabalho e dentro do intervalo de monitoramento terapêutico utilizado para cada anticonvulsivante.

Para avaliação do método desenvolvido, foram testadas 10 amostras de sangue, onde constava nos registros do Labtox, detecção para a FNB, CBZ e/ou FNT. Estas amostras foram submetidas aos procedimentos desenvolvidos neste estudo e que estão descrito no item 4.2.5. Com os resultados obtidos foi possível perceber que das 04 amostras já com detecção do FNB na metodologia qualitativa do Labtox (IML/BH), 03 também foram detectadas, sendo 01 amostra abaixo da linearidade da curva utilizada, porém acima do LQ determinado, já outras duas amostras apresentaram resultados dentro da faixa linear, portanto estes dois resultados obtidos podem ser considerados dentro da linearidade. Nos resultados obtidos para

a CBZ, das três amostras com detecção no Labtox., duas apresentaram detecção neste estudo, uma dentro da área do limite de detecção, porém abaixo do limite de quantificação, portanto não foi possível determiná-la e a outra amostra de número 05 apresentou detecção e área dentro da faixa linear com uma concentração de 27,11 µg/mL para CBZ. Entretanto, das 03 amostras positivas para FNT, nesta metodologia não foi possível detectar nenhuma substância. Isso, provavelmente pode ter sido motivado pela baixa concentração da FNT nas três amostras utilizadas ou pela baixa sensibilidade da FNT, que apresenta limite de detecção um pouco elevado. Para confirmação desses resultados, seria necessária a comparação com uma técnica similar quantitativa das amostras. Todavia, não foi possível realizar esta comparação, já que o Labtox (BH) não quantifica estes medicamentos.

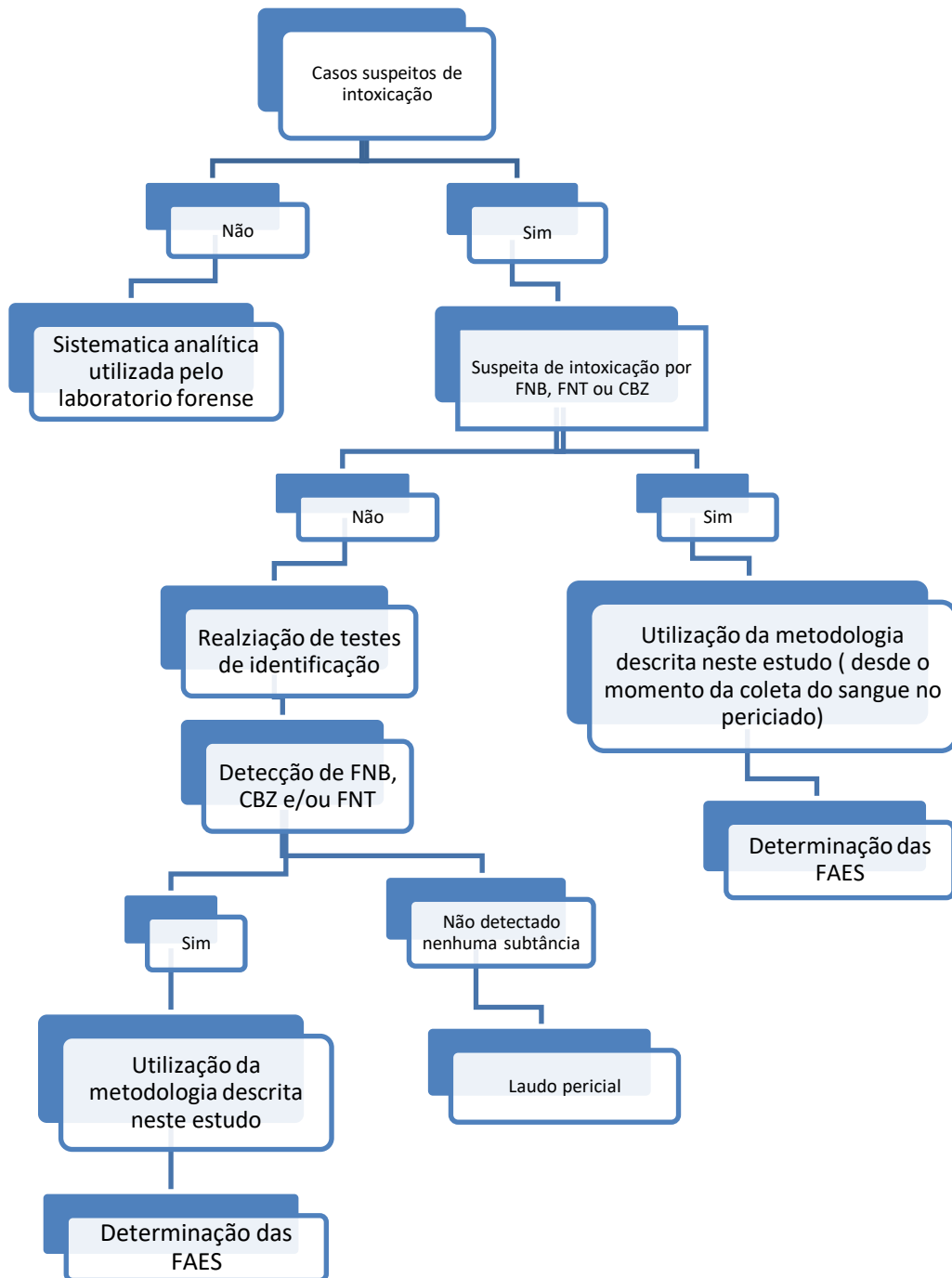
Os resultados obtidos foram satisfatórios, já que a metodologia apresentou bons resultados de detecção para o FNB e CBZ. O resultado de não detecção de algumas amostras pode ser explicado pelo fato dos analitos possuírem baixa concentração no sangue determinado. Como o Labtox, trabalha com um método de extração diferente, no qual utiliza um volume de sangue muito maior (20 mL), essa quantidade maior de sangue pode tornar o método com uma sensibilidade maior do que o deste estudo. Dessa maneira, amostras com concentrações baixas podem ser detectadas no método do laboratório e não serem detectadas neste método.

Estudo como o de Villanelli (1990), demonstrou que a FNT se mantida em amostras com conservantes usuais de monitoramento terapêutico, tem perca média de 17,9% se mantida em temperatura ambiente e se elevada a temperatura, a perca deste analito sobe para 25,9%. Já em outros estudos descritos por Chetty (1994) e Dasgupta (1995), onde foram realizados testes de estabilidade de alguns anticonvulsivantes (fenobarbital, carbamazepina e ácido valproico), concluiu-se que a fenitoína dentre todas as substâncias estudadas, apresentava maior redução se mantida em temperatura ambiente por 24 horas. Sendo assim, existe uma grande possibilidade de degradação da fenitoína nas amostras utilizadas para aplicação deste método, já que as amostras utilizadas estavam em processo de descarte.

Dessa forma, sugere-se que para realização desta metodologia em amostras de periciados que não tenham suspeita de intoxicação por umas das FAES estudadas ou que a colheita tenha sido em materiais de coleta usuais de sangue (frascos sem

anticoagulantes), seja realizado antes um teste de triagem para identificação de pequenas concentrações destes medicamentos, e se confirmada a presença de um destes analitos seja realizada a análise por esta metodologia, a fim de verificar a sua concentração. Para casos que o médico legista já tenha a suspeita relevante de intoxicação por um desses três analitos, sugere-se a colheita direta em papel cartão, para a quantificação direta destes medicamentos na metodologia proposta neste estudo. Abaixo é apresentado um fluxograma, com sugestão de aplicação do método desenvolvido neste estudo para utilização em laboratórios de toxicologia forense (Figura 18)

.Figura 18.0 Fluxograma de sugestão para aplicação da metodologia desenvolvida neste estudo



A grande vantagem do uso das MSS é a facilidade no transporte e no armazenamento destes materiais. Este estudo mostrou que em análises realizadas em após três dias, não se observou grande variação dos resultados de precisão.

Alfazil e Anderson (2008) descreveram que a MSS apresentou uma maior estabilidade de algumas drogas, no estudo de comparação entre a MSS e o sangue líquido realizado pelo próprio. Lima e colaboradores (2014) concluíram em seus estudos que as FAES utilizadas neste estudo mantiveram estáveis por até 12 dias em temperatura ambiente e por refrigeração. Villanelli (2014) descreveu em seus estudos que utilizando a técnica de MSS conseguiu manter a estabilidade da FNT em diferentes temperaturas de armazenamento por até um mês. Portanto pressupões-se que o uso da MSS para as FAES, poderia auxiliar na melhoria do transporte e do armazenamento na área da toxicológica forense. Claro que se faz necessário uma avaliação mais aprofundada sobre essa questão do armazenamento prolongado, pois a armazenagem das amostras na área forense se estende por longos períodos. Assim é fundamental estudos de avaliação propriamente em sangue de indivíduos *post-mortem* e dos próprios analitos em questão, para avaliar a estabilidade das MSS em períodos prolongados. Mas em um primeiro momento é possível verificar uma boa estabilidade destes fármacos nas manchas de sangue seco.

Para o Labtox (IML/BH), essa ferramenta metodológica seria de grande utilidade, pois em casos que tenha sido verificada intoxicações graves por um destes medicamentos, com o uso de MSS, além de quantificar as amostras, este material possuiria uma maior facilidade no transporte, já que o laboratório recebe material de toda Minas Gerais e também melhorias nas condições de armazenamento do sangue.

O pequeno volume utilizado na técnica de MSS atinge diretamente a sensibilidade do método. Nos estudos realizados por Kong e colaboradores (2014); Lima e colaboradores (2014) e Alfazil & Anderson (2008), todos obtiveram boa sensibilidade analítica. Neste estudo não foi possível obter uma sensibilidade analítica muito baixa, provavelmente pela grande heterogeneidade das amostras de sangue *post-mortem*. No item 5.4 através da figura obtida com as amostra de sangue *post-mortem*, pela técnica de MSS, é ainda possível verificar, diferenças significativas nas colorações dos sangues utilizados. Talvez, o uso de amostras já coletadas e em estado de descarte, possa ter interferido na eficiência da sensibilidade.

7. CONCLUSÕES

- Foi estabelecido as condições cromatográficas ideais com o volume sanguíneo e extração da mancha de sangue seco adequados para serem utilizadas no método.
- Técnica de extração de fácil execução e também com utilização de pouco volume de solvente, o que é muito benéfico para o analista que está realizando o procedimento.
- Com os resultados obtidos na realização das figuras de mérito, pode-se concluir que o método se mostrou eficaz dentro do que foi proposto para os três analitos.
- No estudo de aplicação das amostras, o método se mostrou eficaz dentro das possibilidades trabalhadas.
- Método adequado para determinação simultânea do FNB, CBZ e FNT
- O uso da MSS para determinação dos FAES nas análises forenses, pode ser de grande valia, pois pode conseguir melhorias na manutenção da estabilidade destes fármacos, assim como referenciado nas literaturas e demonstrado por este estudo no teste de precisão inter-dias.
- Contudo é necessário um estudo de estabilidade das MSS com as FAES por um período superior a 2 anos, com o intuito de verificar a estabilidade dos analitos em longos períodos de armazenamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFAZIL, A.; ANDERSON, R. **Stability of Benzodiazepines and Cocaine in Blood Spots Stored on Filter Paper**. Journal of Analytical Toxicology, Vol.32, No.7, pp. 511-515, 2008.

ALMEIDA, R., **Redistribuição *postmortem* de Barbitúricos em Tecidos Biológicos Humanos**. 2012. Tese (Doutorado em Toxicologia e Análises Toxicológicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Resolução RDC nº 84**, de 19 de março de 2002. São Paulo: 2002

ANVISA, – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Resolução RE:899**, 29 de maio de 2003. São Paulo: 2003

ARDEY, R. **Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction**, John Wiley & Sons, Inc., New York, 2003.

AVCIL, M.; ALI, D.; KENAM, T.; MUCAHIT, K.; AYHAM, A.; AKOZ, A.; CANAKCI, S.; OZLUER, Y., **Phenytoin Intoxication With no Symptoms Correlated With Serum Drug Level: a case Study**. Pan African Medical Journal, 2015.

BARROS, B.; PIMENTEL, F.; ARAÚJO, F., **Recomendações para Calibração Analítica- Parte I. Fundamentos e Calibração com um componente (Calibração Univariada)** Química Nova, 25, 856, 2002.

BEHNEISH, B.; BAZIM, E.; TAGHADD, **Carbamazepine Poisong and effect of Multiple-dose activated Charcoal**. ACTA Medical Iramica, 2009, 47: 9-14.

BONILHA, L.; COLLARES, F.; AMARAL, P.; DANTAS, S.; OLIVEIRA, M.: **Antiepileptic drugs a Study of 1028 Cases Registered by the São Paulo, Intoxication Control Center**, Seizure, v. 14, n.3, pp 170- 174, 2005.

BOTLER, J.; CAMACHO, L. A. B.; CRUZ, M., **Phenylketonuria, congenital hypothyroidism and haemoglobinopathies: public health issues for a Brazilian newborn screening program**. Cadernos de Saúde Pública, v. 28(9), p.1623-1631, 2012.

BRAHMIN; N.; KOURAICHI, N.; ABDERRAZEK, H.: **Clinical Experience With Carbamazepine Oversdose Relation Ship Between Serum Concentration and Neurological Severity**. J. CLIN Psychopharmacol, 2008, 2: 241-43.

BRUCE, B.; MINKKINEN, P.; RIEKKOLA, M., L.: **Practical method validation: validation sufficient for an analysis method**. Mikrochim. Acta, v. 128, p. 93-106, 1998.

CARAN, N. **Avaliação Sistemática do Uso de Dried Blood Spot para Determinação de Elementos Químicos em Sangue capilar Visando Estudos de Biomonitoramento no Brasil**. Dissertação apresentada a faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2016.

CASARETT and DOULL's Toxicology: **The Basic Science of Poisons**, 8^o Edition, McGraw Hill Professional, 2013.

CHETTY, M.: **The Stability of Anticonvulsant drugs in Whole Blood , The drug Monitoring**, 16 (5); 491- 4, 1994

CHUI, H.; ZUCCHINI, R.; LICHTIG, J.; **Qualidade de Medições em Química Analítica. Estudo de caso. Determinação de Cádmiio Por Espectrofotometria de Absorção Atômica com Chama**. Química Nova, 24, 3, 2001.

DASGUPTA, A.,.; BLACKWELL, W.; BARD, D.: **Stability of Therapeutic Drug Measurement in Specimens Collected in VACUTAINER Plastic Blood-Collection Tubes** : Department of pathology and Clinical Toxicology laboratory, University of New Mexico Health Sciences center, Albuquerque, New Mexico, U.S.A, 1995

DELUCIA, R., FILHO, R. M. O.; PLANETA C. S. **Farmacologia integrada**. 3^o Edição, RJ: Editora Revinter, 2007, p. 247-50.

DRUMMER, O.H. **Post-mortem Toxicology**. Forensic Science International, v. 165, n.2/3, p.199-203, 2008.

ELLEFSEN, K.; COSTA, J.; CONCHEIRO, M.; ANIZAN, S.; BARNES, A.; PIRARD, S.; HUESTIS, M, Cocaine and Metabolite Concentration in DBS and Venous Blood After Controlled Intravenous Cocaine Administration, Bioanalysis, vol. 7, No. 16, 2015.

ERMER, J. **Validation in Pharmaceutical Analysis. Part I:** An integrated approach. Elsevier Science, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, (24): 755-767, 2001.

EURACHEM. **The Fitness for Purpose of Analytical Methods.** a Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, Second Edition, 2014.

FLANAGAN, R.; TAYLOR, A.; WATSON, I.D.; WHELPTON, R. **Fundamentals of analytical toxicology.** John Wile & Sons, Inc., New York, 2007, 505 p.

FRANÇA, Genival Veloso de. **Medicina Legal.** 10^o edição. São Paulo: Guanabara Koogan, 2015.

GANDOLFI, E.; ANDRADE, M. **Eventos Toxicológicos Relacionados a Medicamentos no Estado de São Paulo.** Rev. Saúde Pública, v. 40, 1056-64, 2006.

GUIMARÃES, S.; MOURA, D.; SILVA, P. **Terapêutica Medicamentos e suas Bases Farmacológicas.** Manual de Farmacologia e Farmacoterapia. 5^a edição: Editora: Porto, pp. 175-189. Capítulo 16: antiepiléticos, 2006.

GUNAYDIN, Y.; AKILLI, N. ZERRIN, D.; KOYLU, R.; CEKMEN, B.; CANDER, B., **Antiepileptic drug poisoning: Tree-year experience.** Toxicology Reports 2, 56-62, 2015.

HOLMGREN, P.; DRUID, H.; HOLMGREN, J. **Stability of Drugs in Stored Post Mortem Femoral Blood and Vitreous Humor.** Journal of Forensic Sciences, Vol. 49, No. 4, pp. 820-825, 2004.

HOYLAND, K.; HOY, M.; AUSTIN, R.; WILDMAN, M., **Successful Use of Haemodialysis to Treat Phenobarbital Overdose.** Cross Mark, Case Rep. doi: 10.1136, 2013.

INMETRO - INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA. **Norma DOQ-CGCRE-008 (Revisão 01):** Normalização e Qualidade Industrial. Inmetro. Rio de Janeiro, Março de 2011.

INGELS, S.; LAMBERT, W.; STOVE, C., **Dried blood spot analysis spreads to more applications.** Clinical e forensic toxicology news, March, 2012.

JANTOS, R. **Comparison of the Determination of Drugs With Influence on Driving Performance in Serum. Whole Blood and Dried Blood Spot**, ToxichenKrimtech, 80(1):49, 2013.

JONES, G.R. **Postmortem toxicology**. In: JICKELLS, S.; NEGRUSZ, A., ed. Clarke's analytical forensic toxicology. London: Pharmaceutical Press, cap. 7, p191-217, 2008.

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

KITSON, F.; LARSEN, B.; McEWEN, C., **Gas Chromatography and Mass Spectrometry – A Practical Guide**, Academic: London, 1996.

KONG, S.; LIM, S.; LEE, W; KUMAR, P; WANG, H; WONG, P., **Clinical Validation and of Dried Blood Spot Sampling of Carbamazepina, Valproic Acid and Phenytoin in Patients with Epilepsy**. Singapore, Plos One, September 25, 2014.

LANÇAS, F. M., **Cromatografia em Fase Gasosa**. São Carlos: Acta, p. 254, 1993.

LEMOS, Y.; **Análise das Principais Causas de Intoxicações Exógenas em Periciados do Estado de Minas Gerais em Exames realizados no IML-BH no ano de 2014**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação da Faculdade de Ciências Médicas de Minas Gerais, 2017.

LAUBSCHER, F.: **Fatal Diphenylhydantoin Poisoning**. JAMA, 198: 1974-195, 1996.

LIMA, G.; HANH, R.; RAMA, C.; HIDALGO, P.; SILVA, C.; ANTUNES, M.; LINDEN, R., **Determinação Simultânea de Carbamazepina, Fenitoína e Fenobarbital em Sangue Seco Em Papel Por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**. Novo Hamburgo-RS, Química Nova, Vil. 37, No. 6, 1067- 1071, 2014.

LINDEN, R.; SARTORI S.; KELLERMANN, E.; SOUTO, A., **Identificação de Substâncias em Análise Toxicológica Sistemática utilizando um sistema informatizado para Cálculo de Parâmetros Cromatográficos e Busca em Bases de dados**. Química Nova vol.30, no. 2, São Paulo, Abril, 2007.

LITOVITZ, L.; KLEIN-SCHWARTZ, W.; RODGERS, C.; COBAUGH, J.; YOUNISS, J.; OMSLAER, C. **Annual report of the American association of poison control centers toxic exposure surveillance system.** Am. J. Emer. Med., 2002; 20(5): 391-452

LUDERS, H.; ACHARYA, J.; BAUMGARTMER, C.; BENBADES, S.; BLEASE, A.; BURGESS, R.; **Semiological Seizure Classification.** Epilepsia 1998; 39 (9): 1006-1013.

MAGALHÃES, E., **Desenvolvimento de Métodos para Quantificação de Drogas em Matrizes de Interesse Forense.** 2012. Tese (Doutorado em Ciências – Química) – Instituto de Ciências Exatas - departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

MAGALHAES, P.K.R.; TURCATO, M.F.; ÂNGULO, I.L.; MACIEL, L.M.Z. **Neonatal screening programa theuniversity hospital ofthe Ribeirão Pretoschoolof medicine.** Universidade de São Paulo, Brasil. Caderno de Saúde Pública, v.25(2), p. 445-454,2009

MARCOS, M. **Determinação de medicamentos Antiepilépticos e Anticonvulsivantes por UPLC- MS/MS.** 2011. Dissertação (Mestrado em Química Forense) - Faculdade de Ciência e Tecnologia da Universidade de Coimbra Departamento de Química, Coimbra, 2011.

MARTIN, B. **Antiepileptic drug therapy the story so far.** Seizure, 2010, Vol.19, PP. 650-655.

MEDEIROS-SOUZA, P.; SANTOS-NETO, L.; KUSANO, T., **Diagnosis and controlo f plypharmacy in the elderly.** Saúde Pública, 2007; 41(6): 1049-53.

MEHMET A., PAKSU, M.; GUZEL, A.; ALACAM, A.; ALACAM, F., **Severe Carbamazepine Intoxication in Children Analysis of 40- Case Series.** Medical Science Monitor, 22; 4729-4735; 2016.

MILLER CA. **Toxicity Phenytoin.** Emedicine website. Revisão de literatura 2010. Acesso em Fevereiro 2016. Disponível em: < www.emedicine.medscape.com>.

MOFFAT, A.; OSSELTON, M.; WIDDOP, B., **Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in Pharmaceuticals, body fluids and post-mortem material.** 3 Edition, London: Pharmaceutical Press. Volume I, Capítulo 28, pp. 442, 2004.

MOGHADAMNIA, A.; ABDOLHAHI, M., **An Epidemiological Study of poisoning in Northern Islamic Republic of Iran.** East Mediterr Health J., Jan. 8, PP. 88-94, 2002.

MOREAU, R.; SIQUEIRA, M., **Toxicologia Analítica.** 2ª edição, Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2008.

MOTA, D.; MELO, J.; FREITAS, D.; MACHADO, MARCIO: **Perfil da mortalidade por intoxicação com medicamentos no Brasil, 1996-2005:** retrato de uma década. Ciência e Saúde Coletiva, n. 17: 61-70, 2012.

OLIVEIRA, F.; EFFING, C.; MUNIM, I.; FREIRE, R.; CARNEIRO, W.; RODRIGUES, C.; CUNHA, L., **Determinação Simplificada de Carbamazepina, fenitoína, fenobarbital e lamotrigina em plasma e monitoração terapêutica por HPLC/PDA.** Revista Ciências Farmacêutica Básica Aplicada, 34(4):519-526, 2013.

PARKER, K.; CRIM, B.; HENRY, W.; ELLIOTT, D.; WRIGHT, J.; NORMAN, D.; HINE, C., **Blood and Urine Concentrations of Subjects receiving Brbiturates, Meprobamate, Glutethimide, or Diphenylhydantoin.** Clinical Toxicology, 3(1), pp. 131-145, 1970.

PARISH, R.; AILEXANDER, T.: **Stability of Phenytoin in Blood Collected in Vacuum Blood Collection tubes.** The Drug Monitoring, 12(1): 85-9, 1990.

PASSAGLI, M., **Toxicologia Forense: Teoria e Prática.** 2 edição, Campinas, SP: E. Millennium, 145- 170, 2009.

PELISSIER-ALICOT, L.; GAULIER, 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

PERUCA, E.; BERLOWITZ, D.; BIRNBAUM, A. **Pharmacological and clinical aspects of antiepileptic drug use in the elderly.** Epilepsy Res, 2006; 68(Supp 1); 49-63.

QURAIISHI, R.; JAIN, R.; AMBEKAR, A., **The Use of Dried Blood Spot Samples in Screening Drugs of Abuse.** Pharmacology e Pharmacy, 4, 152-159, 2013.

RANGEL, R. **Noções Gerais Sobre Outras Ciências Forenses.** Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 2004.

REPETTO, M.; REPETTO, G. **Toxicologia Fundamental**. 4^o Edicion, Sevilla, 2009.

RIBANI, M.; JARDIM, I.; BOTTOLI, C.; MELO, L., **Validação em Métodos Cromatográficos Eletroforéticos**. Química Nova, Vol. 27, No. 5, 771-780, 2004.

RIOS, D.; BASTOS, F.; CUNHA, L.; VALADARES, M. **Tentativa de Suicídio com o Uso de Medicamentos Registrados pelo CIT- GO nos Anos de 2003 e 2004**. Revista Eletrônica de Farmácia, Vol.2, PP. 6-14, 2005.

SÁNCHEZ, M. **Incertidumbre em Métodos Analíticos de Rutina**. Universitat Rovira i Virgili (Tarragona): Departament de Química Analítica i Química Orgànica, àrea de Química analítica (Tese de doutoramento em Química). Outubro, 2012.

SEZAK, M. **Prognostic Importance of P-glicoprotein Expression in Ewing Sarcoma**. Ege Journal of Medicine. 47 (1): 7-13, 2008.

Manual de Procedimento para Postos de Coleta do Teste do Pezinho. Serviço de referência em triagem neonatal do estado de Mato Grosso, 2013.

SILVA, G.; HAHN, R.; RAMA, C.; RHODEN, L.; HIDALGO, P.; SILVA, C.; ANTUNES, M.; LINDEN, R.; **Determinação Simultânea de Carbamazepina, Fenitoína e Fenobarbital em Sangue Seco em Papel por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**. Química Nova, Vol. 37, No.6, 1067-1071, 2014.

Sistema Nacional de Informações Tóxico – Farmacológicas. **Casos de Intoxicação por Medicamentos por Unidade Federada**, Segundo Circunstância Registrado em 2012.

THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. HARMONIZED. **Guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis**. Pure Appl. Chem., v. 74, p. 835-855, 2002.

THOMPSON, T.; AKS, S., **Case Files of the Toxikon Medical Toxicology Fellowship in Chicago: The Poisoned Anesthesiologist**. Journal Of Medical Toxicology, Case Files, Volume 3, Number 1, 2007.

THORTON, M.; LIMA, **Barbitúricos e benzodiazepínicos**. In: ZANINI, A., **Fundamentos de Toxicologia**, 2. Ed. São Paulo: Atheneu, 2003, p. 259-269.

TRUTA, L. **Desenvolvimento e Procedimentos de Validação de uma Metodologia Analítica pó GC/MS para a Determinação de Antidepressivos em Sangue Total**. Coimbra, 2012.

United States Pharmacopeia Convention. **Validation of Compendial Methods**. US Pharmacopeia 24 ed, Rockville, 1999.

United States Food and Drug Administration (US-FDA). **Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation**, 2001.

VALIENTE, M.; ECHEMENDIA, J.; DELGADO, C.; MARRERO, B. **Mortalidad por Intoxicaciones Agudas Producidas com Medicamentos**. Cuba 1995- 1996, Ver. Cubana Farm., V.34 n. 1, Ciudad de La Habana ene, Abril, 2000.

VASCONCELOS, R.; GOMES, M.; OLIVEIRA, MLW. **Efeitos adversos das drogas antiepilépticas**. J. Epilepsy Clin. Neurophysiol, 2002; 8(1): 13-23.

VÉKEY, K. **Mass Spectrometry and Mass-selective detection in Chromatography**. J. Of Chromatography A, Jul. 6;921(2): 227-36, 2001.

VIILLANELLI, F.; GIOCALIERE, E.; MALVAGIA, S.; ROSATI, A; OMBRONE, D.; BONA, M.; MARCA, G.: **Dried Blood Spot Assay For The Quantification of Phenytoin Using Liquid Chromatography- Mass Spectrometry**. Clinica Chimica Acta, 440, 31- 35, 2015

VITORINO, S. **Procedimento para Validação Intralaboratorial de Métodos de Ensaio: Delineamento e Aplicabilidade em Análises de Alimentos**. 2007. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

YUAN, S.; WANG, H.; LIU, J.; WEI, P.; COOKS, R.; OUYANG, Z., **Quantitative Paper Spray Mass Spectrometry Analysis of Drugs of Abuse**. Analyst, 16, 2013.