

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Uso da microextração por sorbente empacotado (MEPS) para preparo de amostras em análises toxicológicas envolvendo fármacos benzodiazepínicos

Lorraine Rezende Togni

Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências

Orientadora: Profa. Dra. Marina Franco Maggi Tavares

São Paulo

2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Uso da microextração por sorbente empacotado (MEPS) para preparo de amostras em análises toxicológicas envolvendo fármacos benzodiazepínicos

Lorraine Rezende Togni

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018

Original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração:

Toxicologia e Análises Toxicológicas

Orientadora: Profa. Dra. Marina Franco Maggi Tavares

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

T645u	Togni, Loraine Rezende Uso da microextração por sorbente empacotado (MEPS) para preparo de amostras em análises toxicológicas envolvendo fármacos benzodiazepínicos / Loraine Rezende Togni. - São Paulo, 2018. 131 p.
	Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Orientador: Tavares, Marina Franco Maggi
	1. Toxicologia. 2. Toxicologia forense. 3. Toxicologia analítica. I. T. II. Tavares, Marina Franco Maggi, orientador.

LORAINE REZENDE TOGNI

Uso da microextração por sorbente empacotado (MEPS) para preparo de amostras em análises toxicológicas envolvendo fármacos benzodiazepínicos

Comissão julgadora da dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia e Análises Toxicológicas

Aprovado em:

Profa. Dra. Marina Franco Maggi Tavares

orientadora/presidente

Prof. Dr. Álvaro José dos Santos Neto

Profa. Dra. Karina Helena Morais Cardozo

Prof. Dr. Maurício Yonamine

Aos meus pais, Liz e José Luiz Togni.

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Marina F. M. Tavares pela orientação, confiança, disposição e oportunidades profissionais.

Ao professor Dr. José Luiz da Costa pela coorientação, dedicação e confiança desde o início da minha carreira profissional.

Aos meus pais e ao meu irmão Thomas Togni pela paciência, apoio incondicional, colaboração e incentivo. Esse trabalho não seria possível sem a ajuda de vocês.

Ao Matheus Viana pelo companheirismo, e também aos seus pais, pelo apoio, compreensão e incentivo.

Aos colegas do Laboratório de Cromatografia e Eletroforese Capilar (LACE) do Instituto de Química da Universidade de São Paulo: Ana Rosa, Andrea, Aline, Carolina, Cíntia, Daniel, Fábio, Gisele, Lucas, Pedro, Maicon e Karina.

Ao professor Dr. João Pedro Simon Farah pelas discussões e sugestões.

Aos colegas da Polícia Técnico-Científica do Estado de São Paulo, especialmente à Dra. Gisela Bernete Sztulman e ao MSc. Elvis Medeiros de Aquino.

Aos colegas do Laboratório Clínico do Hospital Israelita Albert Einstein, principalmente à equipe do setor de Química Especial.

Aos inúmeros amigos que acompanharam a trajetória desse trabalho, sempre me incentivando a continuar e fazer o meu melhor.

Aos professores que participaram da banca de qualificação.

Aos professores que participaram da banca de defesa.

Às indústrias farmacêuticas locais que forneceram padrões analíticos para o desenvolvimento do trabalho.

Ao Núcleo de Toxicologia Forense do Instituto Médico Legal de São Paulo pelo fornecimento das amostras.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio financeiro (projeto FAPESP nº 2013/06934-5).

“New truths become evident when new tools become available.”

Rosalyn Sussman Yalow (1921 – 2011)

(física, co-laureada pelo Prêmio Nobel em Fisiologia ou Medicina em 1977 pelo desenvolvimento da técnica de radioimunoensaio)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xi
RESUMO	xiii
<i>ABSTRACT</i>	xiv
1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 INTOXICAÇÕES MEDICAMENTOSAS HUMANAS NO BRASIL	15
1.2 BENZODIAZEPÍNICOS	16
1.2.1 Intoxicações por fármacos da classe dos benzodiazepínicos.....	20
1.2.2 Benzodiazepínicos e a toxicologia forense	23
1.2.3 Dados de intoxicações dos registros de óbito do IML-SP	27
1.3 PREPARO DE MATRIZES BIOLÓGICAS PARA ANÁLISES TOXICOLÓGICAS.....	30
1.3.1 Métodos de preparo de amostras biológicas para a análise de benzodiazepínicos	35
1.3.2 Preparo de amostras pela técnica de microextração por sorbente empacotado.....	39
1.4 TOXICOLOGIA FORENSE POST MORTEM	52
1.4.1 Coleta de amostras biológicas post mortem.....	52
1.4.2 Análise toxicológica de sangue total post mortem.....	54
2 OBJETIVOS	57
3 ASPECTOS ÉTICOS.....	58
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	59
4.1 MATERIAIS	59
4.1.1 Padrões e reagentes	59
4.1.2 Amostras.....	59
4.1.3 Insumos para o preparo de amostras	60
4.1.4 Análises cromatográficas	60
4.1.5 Softwares	60
4.2 MÉTODOS	61
4.2.1 Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas	61
4.2.2 Microextração por sorbente empacotado.....	62
4.2.3 Validação analítica do método	65
4.2.3.1 Seletividade e especificidade	65

4.2.3.2	<i>Linearidade</i>	65
4.2.3.3	<i>Precisão e exatidão</i>	66
4.2.3.4	<i>Limite de detecção e limite de quantificação</i>	66
4.2.3.5	<i>Recuperação</i>	67
4.2.3.6	<i>Efeito matriz</i>	67
4.2.3.7	<i>Efeito residual</i>	68
4.2.3.8	<i>Integridade de diluição e estabilidade</i>	68
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
5.1	MÉTODO CROMATOGRÁFICO	70
5.2	PARÂMETROS OTIMIZADOS DE MEPS	81
5.3	VALIDAÇÃO	88
5.4	REUSO DO SORBENTE	94
5.5	TEMPO DE EXTRAÇÃO POR MEPS	95
5.6	QUANTIFICAÇÃO DE AMOSTRAS REAIS	95
6	CONCLUSÕES	100
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
	APÊNDICE	122
	ANEXOS	126

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do clordiazepóxido	17
Figura 2 – Principais produtos de biotransformação do diazepam.....	19
Figura 3 – Principais produtos de biotransformação do clonazepam	19
Figura 4 – Estratégias convencionais e modernas de preparo de amostras biológicas	33
Figura 5 – (A) Representação esquemática de MEPS e suas partes e (B) etapas de MEPS	41
Figura 6 – Microseringa e exemplo de BIN utilizados para MEPS	42
Figura 7 – Opções de MEPS manual, semi-automatizada e <i>on-line</i>	45
Figura 8 – Mapa de resolução para o par-crítico clonazepam e bromazepam.....	73
Figura 9 – Cromatograma teórico para o método proposto.....	75
Figura 10 – Cromatograma experimental do método proposto	76
Figura 11 – Fragmentação MS-MS do diazepam.....	77
Figura 12 – Fragmentação MS-MS do nordiazepam.....	78
Figura 13 – Fragmentação MS-MS do flunitrazepam.....	79
Figura 14 – Fragmentação MS-MS do alprazolam.....	79
Figura 15 – Cromatogramas das substâncias estudadas com as respectivas transições monitoradas	80
Figura 16 – Cromatograma de uma amostra positiva para diazepam e nordiazepam	96
Figura 17 – Cromatograma de uma amostra positiva para clonazepam e bromazepam	96
Figura 18 – Cromatograma de uma amostra negativa	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Informações cinéticas e farmacológicas de alguns benzodiazepínicos ...	17
Tabela 2 – Valores máximos indicados para caracterizar direção sob efeito de benzodiazepínicos (análise de sangue total)	25
Tabela 3 – Exemplos de métodos de preparo de amostras de sangue total para análise de benzodiazepínicos	38
Tabela 4 – Algumas fases extratoras disponíveis para aplicações em MEPS	43
Tabela 5 – Estudos publicados de MEPS com interesse toxicológico	48
Tabela 6 – Tecidos que podem ser enviados para análise no Núcleo de Toxicologia Forense (IML-SP) e instruções para coleta adequada	53
Tabela 7 – Parâmetros utilizados para a análise por LC-MS/MS	62
Tabela 8 – Gradiente de calibração 1 (tG = 30 min)	71
Tabela 9 – Gradiente de calibração 2 (tG = 60 min)	71
Tabela 10 – Tempos de retenção experimentais utilizados como dados de entrada no Drylab®	72
Tabela 11 - Método otimizado (tG = 10 min)	73
Tabela 12 – Parâmetros internos do Drylab®	74
Tabela 13 – Tempos de retenção teóricos e experimentais obtidos na condição cromatográfica otimizada	75
Tabela 14 – Propriedades físico-químicas dos analitos	82
Tabela 15 – Planejamento fatorial da otimização dos parâmetros de MEPS	83
Tabela 16 – Avaliação da distribuição da variância para as curvas de calibração	89
Tabela 17 – Limites de detecção (LOD), quantificação (LOQ) e curvas de calibração	90
Tabela 18 – Integridade de diluição	91
Tabela 19 – Recuperação, exatidão e precisão do método	92
Tabela 20 – Efeito matriz	93
Tabela 21 – Resultados obtidos para as dez amostras analisadas	97
Tabela 22 – Resultados das amostras quantificadas	98
Tabela 23 – Intervalo de referência de intoxicações fatais causadas por benzodiazepínicos sozinhos ou em associação com outras substâncias	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABRACIT – Associação Brasileira de Centros de Informação e Assistência Toxicológica

BIN – do inglês, *barrel insert and needle*

CCI – Centro de Controle de Intoxicações

CE - *Collision energy* (energia de colisão)

CIAT – Centro de Informação e Assistência Toxicológica

CID-10 – Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados com a Saúde

CIT – Centro de Informação Toxicológicas

CPE – extração em ponto nuvem

CS – Extração por comutação de colunas

CV – Coeficiente de variação

DBS – macha de sangue seco em papel

DLLME – microextração líquido-líquido dispersiva

DPX – Microextração em ponteiros descartáveis

EM – Efeito matriz

ESI - *Electrospray ionization* (ionização por eletrospray)

GABA – ácido gama-aminobutírico

IML – Instituto Médico Legal

k - fator de retenção

LC-MS/MS – cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas *in tandem*

LLE – extração líquido-líquido

LOD – limite de detecção

LOQ – limite de quantificação

LPME – microextração em fase líquida

MAE – extração assistida por micro-ondas

MEPS – Microextração por sorbente empacotado

MEPS-LC-MS/MS – Microextração por sorbente empacotado seguida de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas *in tandem* (sequencial)

MMQP – Método dos mínimos quadrados ponderados

NTF – Núcleo de Toxicologia Forense

PPT – precipitação de proteínas

QuEChERS – do inglês, *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*

Rs – Resolução cromatográfica

SBSE – extração sortiva em barra de agitação

SCX – do inglês, *strong cation Exchange*

SDME – microextração em gota suspensa

SIM – Sistema de Informação de Mortalidade

SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SINITOX – Sistema Nacional de Informações Toxicológicas

SNC – Sistema Nervoso Central

SPE – Extração em fase sólida

SPME – Microextração em fase sólida

SRM – *Selected reaction monitoring* (monitoramento de reação selecionada)

SSP – Secretaria de Segurança Pública

SWGTOX – *Scientific Working Group for Forensic Toxicology*

TFC – Cromatografia em fluxo turbulento

tG – Tempo de gradiente

TIAFT – *The International Association of Forensic Toxicologists*

Toxic - *Toxicology Investigators Consortium*

TR – Tempo de retenção

RESUMO

TOGNI, L.R. **Uso da microextração por sorbente empacotado (MEPS) para preparo de amostras em análises toxicológicas envolvendo fármacos benzodiazepínicos.** 2018. 131f. Dissertação de mestrado. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A microextração por sorbente empacotado (MEPS) é uma técnica de preparo de amostras ainda pouco utilizada no âmbito da toxicologia, em que os mesmos princípios da extração em fase sólida convencional são adaptados para uma escala miniaturizada. As principais vantagens da técnica estão associadas ao pequeno volume de amostra e de solventes utilizados, à possibilidade de realizar múltiplas extrações com um mesmo cartucho e à facilidade de automação. Os benzodiazepínicos possuem grande relevância na toxicologia dada sua ampla utilização e seus efeitos que podem, por exemplo, comprometer a capacidade de dirigir, além do uso abusivo, e como drogas facilitadoras de crimes. Neste trabalho, um método de MEPS foi desenvolvido e otimizado para a determinação de sete benzodiazepínicos e seus produtos de biotransformação (diazepam, clonazepam, flunitrazepam, alprazolam, bromazepam, 7-aminoflunitrazepam e nordiazepam) utilizando 100 µL de amostra de sangue total *post mortem*. Após a extração, os eluatos foram analisados por cromatografia líquida em fase reversa acoplada a espectrometria de massas. O método foi validado de acordo com as recomendações do *Scientific Working Group for Forensic Toxicology*, apresentando linearidade adequada de 5 a 500 ng.mL⁻¹. Os valores de exatidão (90,4 a 109,5%), precisão intra-dia (2,5 a 10,7 %CV) e inter-dia (1,1 a 8,0 %CV) também foram satisfatórios. MEPS foi realizada mais de 60 vezes com a mesma fase extratora sem evidências de contaminação cruzada. Dez amostras reais fornecidas pelo Instituto Médico Legal de São Paulo foram analisadas. Foram quantificados diazepam, nordiazepam, clonazepam e bromazepam. Os resultados encontrados em cada uma das amostras foram comparados com dados da literatura.

Palavras-chave: MEPS; *post mortem*; cromatografia líquida; espectrometria de massas; MEPS-LC-MS/MS.

ABSTRACT

TOGNI, L.R. **Microextraction by packed sorbent (MEPS) for sample preparation in toxicological analyses involving benzodiazepines.** 2018. 131p. Master's dissertation. Department of Clinical Chemistry and Toxicology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of de São Paulo, São Paulo, 2018.

Microextraction by packed sorbent (MEPS) is a sample preparation technique still little used in toxicology, where the same principles of conventional solid phase extraction are adapted to a miniaturized scale. The main advantages of the technique are associated with the small volume of sample and solvents required, the possibility of performing multiple extractions with the same cartridge and ease process automation. Benzodiazepine drugs are relevant in toxicology because of their widespread use, and effects (which may, for example, compromise the ability to drive vehicles), abuse and records as crime-facilitating drugs. In this work, a MEPS method was developed and optimized for a determination of seven benzodiazepines and their metabolites (diazepam, nordiazepam, clonazepam, flunitrazepam, 7-aminoflunitrazepam, alprazolam, and bromazepam) using 100 μL of *post mortem* whole blood. After extraction, the eluates were analyzed by reversed-phase liquid chromatography coupled to mass spectrometry. The method was validated according to the recommendations of the Scientific Working Group for Forensic Toxicology, presenting adequate linearity from 5 to 500 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$. The values of accuracy (90.4 to 109.5%), intra-day precision (2.5 to 10.7 %CV) and inter-day (1.1 to 8.0 %CV) also presented satisfactory results. MEPS was performed more than 60 times with the same extractive phase without compromising the results with the evidence of carryover. Ten real samples of post mortem blood provided by the Sao Paulo's Institute of Legal Medicine were submitted to analysis by MEPS-LC-MS/MS. In these samples, the following analytes were quantified: diazepam, nordiazepam, clonazepam and bromazepam. The results found in each of the samples were compared with data from the literature.

Keywords: MEPS; *post mortem*; liquid chromatography; mass spectrometry; MEPS-LC-MS/MS.

1 INTRODUÇÃO

1.1 INTOXICAÇÕES MEDICAMENTOSAS HUMANAS NO BRASIL

Os sistemas de informação em saúde são os principais instrumentos de monitoramento e coleta de dados relacionados a problemas de saúde de uma população (NETO, 2017). São exemplos de sistemas de informação em saúde de abrangência nacional relacionados ao âmbito da toxicologia o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), o Sistema de Informação de Mortalidade (SIM) e o Sistema Nacional de Informações Toxicológicas (SINITOX).

O SINITOX registra, desde a década de 80, informações provenientes dos Centros de Informação (CIT) e de Centros de Informação e Assistência Toxicológica (CIAT) de todos os estados brasileiros. Em 1994 os medicamentos passaram a ser o principal agente tóxico reportado e essa tendência se manteve até 2013 (MAGALHÃES, 2017). A classificação do SINITOX agrupa as intoxicações medicamentosas em um só grupo, impossibilitando aprofundamento da pesquisa com relação à classe terapêutica desses medicamentos relacionados a quadros de intoxicação.

Um dos estudos mais abrangentes sobre intoxicações medicamentosas no Brasil utilizou SIM e reuniu dados dos anos de 1996 a 2005. De acordo com o SIM - no período estudado - 0,04% dos óbitos registrados ocorreram por intoxicação medicamentosa. A principal circunstância de óbito causado por medicamentos foi a autointoxicação intencional, representando mais de 50% dos casos. Esse banco de dados, especificamente, classifica os óbitos de acordo com o Código Internacional de Doenças (CID-10), indicando que entre os óbitos cujo xenobiótico foi identificado, a intoxicação por “anticonvulsivantes, sedativos, antiparkinsonianos e psicotrópicos” foi a mais prevalente. Todavia, assim como no SINITOX, não é possível estabelecer a principal classe farmacológica envolvida em óbitos no Brasil (MOTA et al., 2012).

Estudos realizados especificamente para o estado de São Paulo utilizando dados do SINAN e SIM indicam uma tendência crescente para as internações e óbitos por intoxicação medicamentosa, com destaque para a mortalidade por intoxicação medicamentosa intencional. Entre 1996 e 2012 a principal causa de óbitos por

intoxicação medicamentosa para o gênero feminino foram casos intencionais devido ao uso de substâncias também do código X61 da CID-10, ou seja: anticonvulsivantes, sedativos, hipnóticos, antiparkinsonianos e psicotrópicos. Sendo assim, talvez seja possível inferir que as estatísticas regionais e nacionais seguem a mesma tendência (OLIVEIRA, 2017).

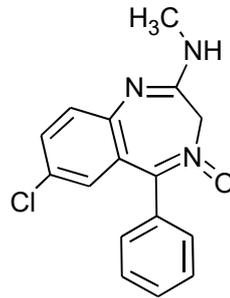
1.2 BENZODIAZEPÍNICOS

Os fármacos da classe dos benzodiazepínicos são agonistas seletivos dos receptores GABAérgicos do sistema nervoso central (SNC), especificamente dos receptores do tipo GABA_A, cujo canal é regulado por ligante. Os benzodiazepínicos atuam em um sítio acessório (chamado de “receptor benzodiazepínico”), facilitando a ligação do GABA (ácido γ -aminobutírico) endógeno aos receptores e potencializando os efeitos desse neurotransmissor inibitório do SNC. Os receptores benzodiazepínicos também são sítio de ação de outras substâncias como anestésicos e barbitúricos. Além dessas, são exemplos de outras substâncias que atuam nos receptores GABA_A o etanol, alguns antidepressivos e analgésicos opióides (DRUMMER, O. H., 2002; RANG et al., 2007).

De maneira geral esses fármacos são utilizados clinicamente como agentes ansiolíticos e hipnóticos, apesar disso, alguns também apresentam atividade anticonvulsivante (RANG et al., 2007).

A estrutura química básica dos benzodiazepínicos consiste num anel de sete elementos fundido com um anel aromático, com quatro substituintes principais, que podem ser alterados sem que ocorra perda da atividade da molécula. Os diferentes substituintes garantem que cada um dos benzodiazepínicos apresentem diferentes seletividades pelo sítio de ação, além de diferenças acentuadas na farmacocinética. O protótipo da classe é o clordiazepóxido, sintetizado em 1961, apresentado na Figura 1 (DRUMMER, O. H., 2002; RANG et al., 2007).

Figura 1 – Estrutura química do clordiazepóxido



Esses fármacos costumam ser bem absorvidos quando administrados por via oral, possuem elevada ligação a proteínas plasmáticas e baixos volumes de distribuição (devido à alta lipossolubilidade), porém esses parâmetros farmacocinéticos podem variar de acordo com a molécula em questão. As concentrações sanguíneas máximas desses fármacos são geralmente observadas duas horas após a administração do medicamento, podendo se estender a seis horas (POISINDEX®, 2014).

Dados cinéticos e farmacológicos de alguns benzodiazepínicos estão apresentados na Tabela 1 (SCHULZ et al., 2012).

Tabela 1 – Informações cinéticas e farmacológicas de alguns benzodiazepínicos

Fármaco	Analito no sangue	$t_{1/2}$ (h)	Concentração terapêutica (ng.mL ⁻¹)	Concentração tóxica mínima (ng.mL ⁻¹)
Alprazolam	Alprazolam	6 – 20	5 – 80	100 – 400
Bromazepam	Bromazepam	8 – 22	50 – 200	250 – 400
Clonazepam	Clonazepam	20 – 60	20 – 80	100
Diazepam	Diazepam	24 – 48	100 – 2500	3000 – 5000
	Nordiazepam	50 – 99	200 – 800	1500 – 2000
Flunitrazepam	Flunitrazepam	10 – 30	5 – 20	50
	7-aminoflunitrazepam		20	200

Fonte: retirado de SCHULZ et al. (2012)

Os benzodiazepínicos são divididos em três grupos, de acordo com seus tempos de ação: os de ação curta, usados para o tratamento de insônia e outros distúrbios do sono, tem tempo de ação inferior a 12h; e os de ação intermediária (12 a 24h) e longa (tempo de ação superior a 24h), que são usados no tratamento de diversas formas de ansiedade. Os diferentes tempos de ação desses fármacos estão relacionados a presença ou não de produtos de biotransformação com atividade farmacológica. As substâncias de ação curta são biotransformadas por conjugação com ácido glicurônico, enquanto as de ação mais longa sofrem extensa biotransformação de fase I, formando produtos intermediários ativos, cujos tempos de meia-vida ($t_{1/2}$) são prolongados (MANDRIOLI; MERCOLINI; RAGGI, 2008). A Figura 2 exemplifica a biotransformação do diazepam, um benzodiazepínico de ação longa.

No caso do diazepam ocorre a formação de três produtos farmacologicamente ativos por reações de biotransformação de fase I: o temazepam (por reação de hidroxilação); o nordiazepam (reação de desmetilação) e o oxazepam. O temazepam pode ser excretado por conjugação direta com ácido glicurônico ou passar por essa reação de biotransformação de fase II após desmetilação a oxazepam. Já o nordiazepam passa por hidrolisação, sendo convertido a oxazepam para posterior conjugação com ácido glicurônico e excreção na urina. Para análises de diazepam em sangue devem ser pesquisados, no mínimo, o fármaco inalterado e nordiazepam (seu principal produto de biotransformação) (DRUMMER, O. H., 2002).

Quando a substância pesquisada no sangue for clonazepam ou flunitrazepam, a literatura indica que sejam pesquisados também seus produtos 7-amino e 7-acetamido (Figura 3). Os produtos 7-amino são especialmente importantes para análises *post mortem*, tendo em vista que os benzodiazepínicos com grupamento 7-nitro são instáveis no sangue, sendo reduzidos naturalmente antes mesmo da coleta (DRUMMER, O. H., 2002).

Figura 2 – Principais produtos de biotransformação do diazepam

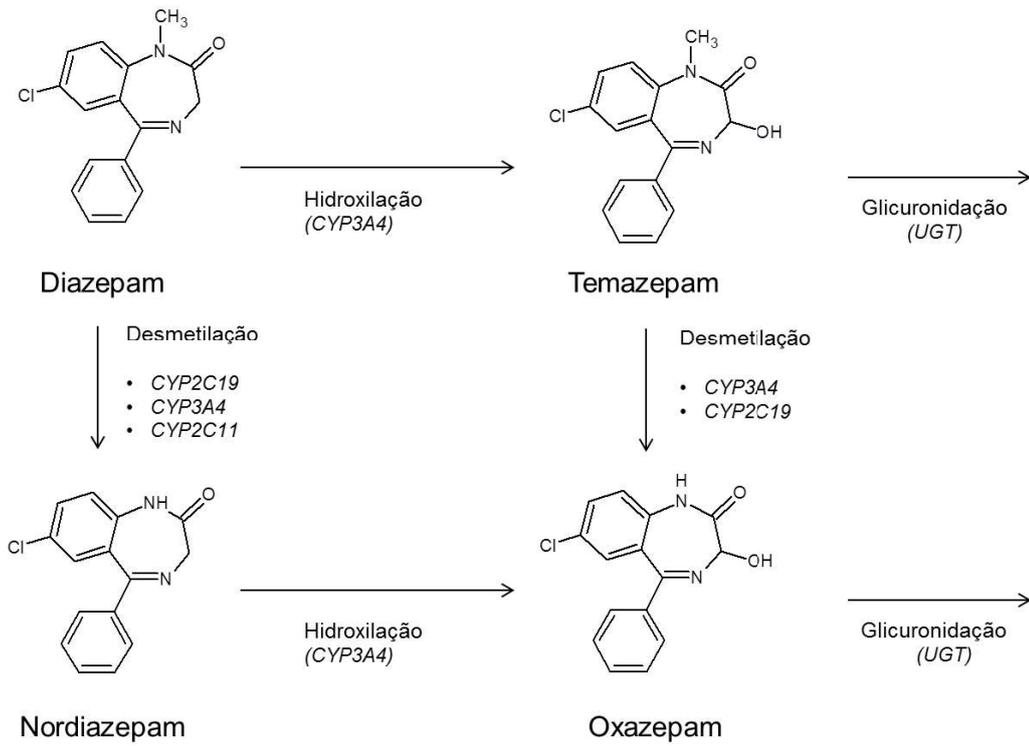
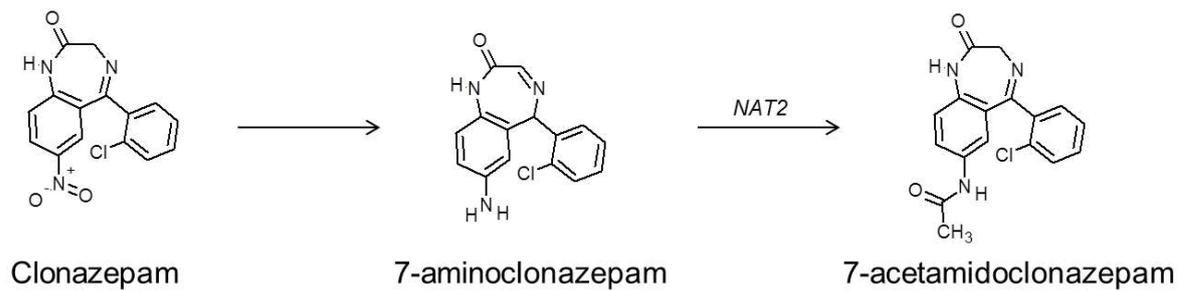
Fonte: adaptado de Thomson Reuters IntegritySM

Figura 3 – Principais produtos de biotransformação do clonazepam

Fonte: adaptado de Thomson Reuters IntegritySM

1.2.1 Intoxicações por fármacos da classe dos benzodiazepínicos

Os fármacos da classe dos benzodiazepínicos foram amplamente utilizados no passado como ansiolíticos, sendo inicialmente consideradas substâncias seguras e de baixa toxicidade. Atualmente, os benzodiazepínicos têm sido substituídos por fármacos antidepressivos para o tratamento de estados de ansiedade, restringindo sua aplicação a transtornos específicos, ou quadros psiquiátricos agudos (RANG et al., 2007).

Outro uso farmacológico de destaque dos benzodiazepínicos se dá pela ação hipnótica destas substâncias, induzindo o sono e promovendo sedação. Todavia, preconiza-se que tratamentos para insônia com esse tipo de medicamento não sejam prolongados por mais de algumas semanas, devido ao desenvolvimento de tolerância e dependência (RANG et al., 2007).

Apesar dos benzodiazepínicos serem fármacos de venda controlada pela Portaria SVS/MS nº 344 de 1998 (lista B1 - psicotrópicos prescritos em notificação de receita "B"), do uso terapêutico dessas substâncias ser restrito a condições clínicas específicas, da descoberta do potencial de abuso da classe e de riscos relacionados ao uso irracional de medicamentos, estima-se que 50 milhões de pessoas façam uso diário de benzodiazepínicos. Um estudo realizado pela consultoria IMS Health indica ainda que, entre 2009 e 2014, a venda de benzodiazepínicos aumentou 42% no Brasil (NERI, 2014).

Azevedo et al. (2016) observou que alprazolam, bromazepam, clonazepam, diazepam e lorazepam foram os benzodiazepínicos mais prescritos entre 2010 e 2012 em nosso país. Também foi relatado aumento de prescrições de benzodiazepínicos de meia-vida curta e uma diminuição das prescrições de diazepam (fármaco de meia-vida longa).

Outro levantamento estatístico determinou uma prevalência anual de 8,79% para o uso de medicamentos psicotrópicos de uma população de São Paulo. Os psicotrópicos mais utilizados foram os antidepressivos (4,72%) e os benzodiazepínicos (4,20%) (QUINTANA et al., 2015).

O relatório mais recente da *International Narcotics Control Board* (2016) indica um crescimento de 49% na produção de benzodiazepínicos entre os anos de 2014 e 2015 em todo o mundo. O relatório ainda destaca que o consumo total dessa classe de fármacos aumentou 19% entre esses dois anos e que os fármacos mais usados são os de ação ansiolítica (alprazolam, diazepam e lorazepam). Especificamente no caso do Brasil, uma substância que merece destaque é o clonazepam, que é o medicamento psicotrópico mais consumido no país, seguido pelos também benzodiazepínicos, bromazepam e alprazolam (**Boletim de Farmacoepidemiologia**, 2011). Além disso, o Brasil se destaca por ser um dos maiores produtores mundiais de clonazepam na última década (**Psychotropic Substances**, 2017).

De acordo com o relatório mais recente do *Toxicology Investigators Consortium* (ToxIC), em 2016 os analgésicos não-opioides foram os principais medicamentos relacionados a casos de intoxicação nos Estados Unidos, representando 12,8% dos casos. Seguidos, respectivamente, pelo grupo dos hipnóticos, sedativos e relaxantes musculares (11,8%); antidepressivos (11,1%) e opioides (9,8%). Entre os hipnóticos e sedativos, os benzodiazepínicos representam mais da metade (52,6%) dos casos reportados. Pela primeira vez, o benzodiazepínico mais reportado em casos de intoxicação nos Estados Unidos foi o alprazolam (20,6%). Anteriormente o clonazepam era o fármaco mais incidente, mas que agora está na segunda colocação da lista, com representação de 15,5% dos casos, seguido pelo lorazepam (7,4%) e diazepam (4,1%) (FARRUGIA et al., 2017).

Além de causarem dependência, os benzodiazepínicos têm sido consumidos junto com outras drogas de abuso, principalmente estimulantes do sistema nervoso central, como heroína, cocaína e *ecstasy*, a fim de modular os efeitos dessas outras drogas. A literatura também cita o consumo de álcool e outros medicamentos com o intuito recreacional de potencializar os efeitos sedativos (KURTZ et al., 2011). Em outros casos, a associação de opioides a benzodiazepínicos é feita para potencializar a intoxicação, aumentando o efeito recreacional dos opioides (JONES, J. D.; MOGALI; COMER, 2012). Publicações recentes destacam o uso abusivo de benzodiazepínicos principalmente por adolescentes e jovens, com ênfase para o flunitrazepam (**Drugs of abuse: a DEA resource guide**, 2017).

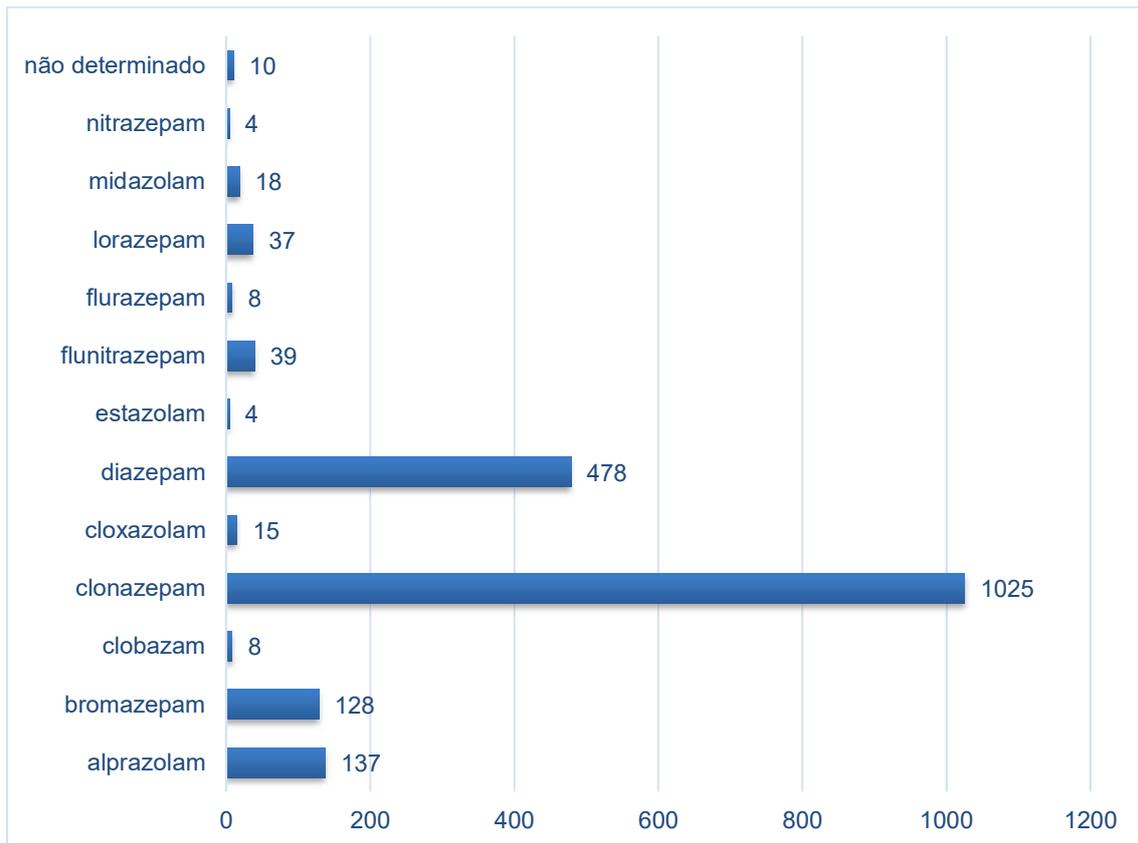
O uso de benzodiazepínicos como drogas de abuso não se restringe às formulações farmacêuticas disponíveis no mercado. Substâncias derivadas dessa classe farmacológica, chamadas de *designer benzodiazepines*, têm sido apreendidas nos últimos anos. Alguns dos *designer benzodiazepines* são produtos de biotransformação ativos de fármacos tradicionais, que são vendidos na forma de pó, comprimidos, cápsulas ou *blotters*. Os maiores exemplos são o fonazepam (desmetilflunitrazepam) e o nifoxipam (3-hidróxi-desmetilflunitrazepam). Outros são moléculas que a indústria desenvolveu, mas não chegou a lançar comercialmente, como é o caso do pirazolam, diclazepam e flubromazepam (MOOSMANN; KING; AUWÄRTER, 2015). Já existem casos publicados na literatura de intoxicações relacionadas e essas novas substâncias (KATSELOU et al., 2017).

A Associação Brasileira de Centros de Informação e Assistência Toxicológica (ABRACIT) disponibiliza em seu *website* uma série de levantamentos estatísticos de casos de intoxicação por todo o Brasil. Os dados mais atualizados encontrados foram os do Centro de Informações Toxicológicas do Rio Grande do Sul (CIT-RS), Centro de Informações Toxicológicas do Amazonas e Centro de Controle de Intoxicações (CCI) da Universidade Estadual de Campinas, em São Paulo. Nos três estados, e em todos os períodos pesquisados (2007 a 2013), a classe dos medicamentos benzodiazepínicos foi indicada como um importante agente tóxico, relacionado principalmente à intoxicação de adultos, porém presente em todas as faixas etárias. De acordo com o relatório do CIT-RS (2014), em 2013 o clonazepam foi o medicamento responsável pelo maior número de registros de casos, seguido pelo diazepam, alprazolam e bromazepam, respectivamente.

Uma análise retrospectiva descritiva de dados de uma unidade de pronto-atendimento em Minas Gerais destaca que os benzodiazepínicos foram a principal causa de intoxicação observada no estudo. Os principais fármacos observados foram os mesmos que no CIT-RS (Gráfico 1), mas esse novo estudo também avaliou as associações responsáveis pelas intoxicações registradas. As principais classes farmacológicas associadas aos benzodiazepínicos foram antidepressivos, antipsicóticos e o álcool. Esse levantamento também relata que a administração de flumazenil (antídoto usado em casos de intoxicação confirmada por benzodiazepínicos) foi o terceiro procedimento de desintoxicação mais realizado na

unidade naquele período (AMARAL ALMEIDA; COUTO; DRUMOND CHEQUER, 2016).

Gráfico 1 – Fármacos da classe dos benzodiazepínicos relacionados a intoxicações registradas no CIT-RS durante o ano de 2013



Fonte: CIT-RS

1.2.2 Benzodiazepínicos e a toxicologia forense

A classe dos benzodiazepínicos se destaca em diversos países entre as drogas mais frequentemente encontradas em análises toxicológicas de emergência e em toxicologia forense (BELOW; LIGNITZ, 2003; CAMPELO; CALDAS, 2010; BUCKLEY et al., 2015; KIM et al., 2015; ZUBIAUR et al., 2015; MOWRY et al., 2016; STEUER; EISENBEISS; KRAEMER, 2016; HAMNETT et al., 2017). O amplo uso desses medicamentos e a associação destes com outras drogas fazem com que a

quantificação dessas substâncias seja uma rotina importante nos laboratórios de toxicologia.

Benzodiazepínicos também são citados como substâncias facilitadoras de crimes, destacando-se em casos de *drug facilitated sexual assaults*. Tendo em vista esse tipo de crime, em alguns países, as formulações farmacêuticas de benzodiazepínicos recebem corantes para que, quando diluídos, alterem as características originais das bebidas e impeçam que uma pessoa desavisada seja vítima desse tipo de golpe (HALL; MOORE, 2008; CRIME, 2011; **Drugs of abuse: a DEA resource guide**, 2017; ANDERSON; FLYNN; PILGRIM, 2017).

Associados ou não a outras drogas, os benzodiazepínicos são relacionados a acidentes de trânsito devido à redução da vigilância e disfunções cognitivas, inclusive redução do controle olho-mão e aumento de tempo de reação do motorista (DRUMMER, O. H., 2002; CHARLSON et al., 2009; ELVIK, 2013; PAPOUTSIS et al., 2016). No Brasil um levantamento realizado com amostras de vítimas de acidentes de trânsito, necropsiadas na cidade de Porto Alegre, classifica os benzodiazepínicos entre as substâncias mais prevalentes nos exames toxicológicos, sendo superados apenas pelo álcool, canabinóides (maconha) e cocaína (PECHANSKY; DUARTE; BONI, 2010). Alguns dos valores de corte (*cut-off*) máximos indicados para métodos de análise de sangue total, para caracterizar o uso de benzodiazepínicos por motoristas envolvidos em acidentes de trânsito, estão apresentados na Tabela 2.

Um estudo realizado na Suécia relaciona a quantidade de doses de medicamentos psicoativos comercializados naquele país com dados médico-legais, ressaltando incidência de intoxicações fatais por clonazepam, flunitrazepam, midazolam, entre outros (JONSSON et al., 2014).

Um estudo feito com laudos cadavéricos do Instituto Médico Legal do Distrito Federal (IML-DF) descreve que os medicamentos estão entre os principais agentes etiológicos identificados nos exames toxicológicos realizados naquela instituição entre 2009 e 2013 (MAGALHÃES, 2017).

Tabela 2 – Valores máximos indicados para caracterizar direção sob efeito de benzodiazepínicos (análise de sangue total)

Substância	Valor de <i>cut-off</i> (ng.mL⁻¹)
Diazepam	20
Nordiazepam	20
Oxazepam	50
Tepazepam	50
Alprazolam	10
Clonazepam	10
Lorazepam	10
Midazolam	20

Fonte: adaptado de WALSH et al. (2008)

Dados consolidados do SINAN, SIM e IML-DF para o período de 2009 a 2013, relacionados a óbitos somente do Distrito Federal, demonstram que os seguintes classes terapêuticas foram identificadas em intoxicações fatais envolvendo medicamentos: antibióticos, benzodiazepínicos, antidepressivos, antiepiléticos, analgésicos, antiinflamatórios e antiipertensivos (MAGALHÃES, 2017).

Um levantamento realizado para o município de São Paulo (SP), com dados do SINAN e SIM do ano de 2014, descreve que intoxicações exógenas fatais ocorreram em praticamente todas as faixas etárias, exceto crianças de 5 a 9 anos. A maior parte (69,1%) desses óbitos foi atestada por médicos do IML-SP, seguido pelo Serviço de Verificação de Óbitos (13,8%). O agente tóxico mais frequente foi o álcool (25,2%). O grupo dos anticonvulsivantes, sedativos, hipnóticos, antiparkinsonianos e psicotrópicos corresponde a 9,6% dos óbitos desse estudo (NETO, 2017).

Apesar dessas informações, não existem estudos que relacionem, em nível nacional, intoxicações por uma classe específica de medicamentos e mortalidade.

No contexto global, diversos outros países também têm trabalhos publicados relacionando mortalidade a intoxicações exógenas. Um estudo canadense indica que, entre 1996 e 2013, os usuários de heroína, cocaína, álcool e anfetaminas que associaram essas substâncias a benzodiazepínicos tiveram maior mortalidade

(WALTON et al., 2016). Na Alemanha, dados da Universidade de Greifswald demonstram que, durante 50 anos, de 10 a 15% dos exames necroscópicos realizados no Instituto de Medicina Legal da cidade foram relacionados a quadros de intoxicação. Neste estudo, as intoxicações medicamentosas representam a terceira principal *causa mortis* (19%). Durante todos esses anos os benzodiazepínicos tiveram grande participação entre as intoxicações fatais na região, com um aumento significativo na década de 90 (BELOW; LIGNITZ, 2003). Na Escócia, um estudo retrospectivo relacionou os dados toxicológicos de motoristas envolvidos em acidentes fatais entre 2012 e 2015. Dos casos analisados, 36% representam motoristas que usaram algum tipo de droga de abuso ou medicamento, e 13% os que usaram alguma droga ou medicamento associados ao álcool. Entre os fármacos, os benzodiazepínicos se destacam com a classe terapêutica mais comum (12%), principalmente o diazepam (JONES, A. W.; HOLMGREN; AHLNER, 2016). Na Coreia, intoxicações intencionais por sedativos e hipnóticos são a principal maneira de suicídio, com destaque para as chamadas “z-drugs” e o alprazolam (KIM et al., 2015). Na Macedônia, um estudo nacional diz que 66% das intoxicações agudas causadas por psicotrópicos estão relacionadas a benzodiazepínicos e, ainda, que intoxicações fatais tem ocorrido devido a associação de diazepam e metadona (PETRUSHEVSKA et al., 2015).

Na Austrália, um levantamento realizado com dados de 1987 a 2012 mostra que os benzodiazepínicos representam 15,9% das autointoxicações registradas, colocando esses medicamentos na primeira colocação da classificação, juntamente com o álcool (também 15,9%). Porém, assim como no Brasil, os dados de mortalidade da Austrália são registrados de acordo com a CID-10, agrupando os sedativos e hipnóticos em um grupo junto com outros medicamentos, portanto esse país também não tem dados de mortalidade específicos por classe terapêutica (BUCKLEY et al., 2015).

1.2.3 Dados de intoxicações dos registros de óbito do IML-SP

Desde o mês de maio de 2016 a Secretaria de Segurança Pública (SSP) do Estado de São Paulo disponibiliza no portal “SSP – TRANSPARÊNCIA” dados sobre criminalidade, estatísticas e registros referentes a óbitos registrados pelo Instituto Médico Legal (IML). A publicação desses dados tem como objetivo a divulgação de índices e informações sobre produtividade policial e auxiliar a realização de estatísticas e pesquisas científicas.

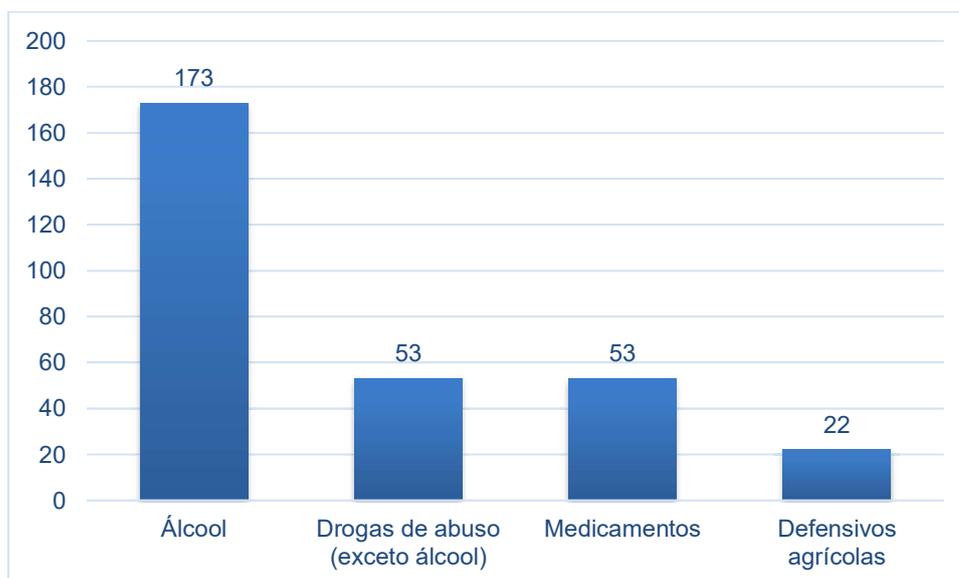
Está prevista a divulgação na *internet* de dados referentes a óbitos registrados desde 2013, ano em que foi implementado o serviço digital de Gestão de Laudos pela SSP. Por enquanto, os registros referentes ao intervalo entre 2013 e 2016 estão incompletos no portal. Para estes dados constam somente a data de entrada no IML, dados do boletim de ocorrência, nome da vítima, idade da vítima, delegacia de registro, número do laudo expedido, ano do laudo, e número da declaração de óbito. Não foram divulgadas as conclusões dos laudos emitidos nesse período. Para os laudos expedidos a partir de 2017, além de todas as informações já fornecidas pelo portal, foram adicionadas as conclusões dos laudos.

Atualmente ainda não estão disponíveis estatísticas oficiais dos registros de intoxicações do IML-SP.

Com o objetivo de verificar se os registros do IML-SP seguem as mesmas tendências estatísticas dos centros de controle, informação e assistência toxicológica, além dos dados de outros institutos de medicina legal (por exemplo o IML-DF), foi realizado um levantamento nas conclusões dos laudos expedidos entre janeiro e novembro de 2017 e divulgados na *internet* (n=17749). Os termos pesquisados estão apresentados no APÊNDICE A e contemplam fármacos psicotrópicos de diferentes classes farmacológicas, drogas de abuso e defensivos agrícolas. Considerou-se que, a cada vez que um termo foi citado na conclusão do laudo, essa substância foi pesquisada em uma amostra. O resultado do laudo pode ter sido positivo ou negativo para devida substância, mas, uma vez que a hipótese foi considerada, um exame dessa substância precisou ser realizado.

Foram localizadas 301 citações às substâncias exógenas pesquisadas. A principal substância identificada foi o álcool (etanol), seguida pelos medicamentos e drogas de abuso (exceto álcool), e por último, os defensivos agrícolas. Pode-se observar no Gráfico 2 que os medicamentos e drogas de abuso aparecem com igual contribuição na segunda posição da classificação, ambos com 53 citações.

Gráfico 2 – Distribuição das substâncias pesquisadas no registro de óbitos do IML-SP

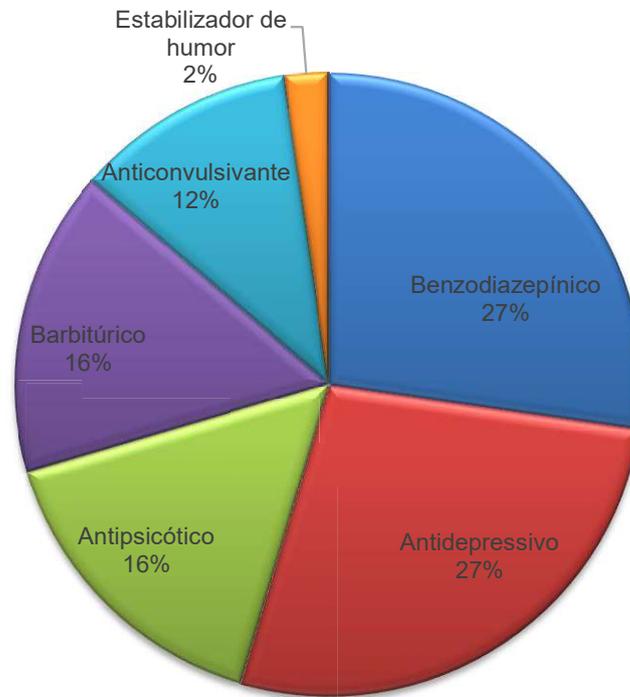


Fonte: IML-SP (2018)

Entre os medicamentos citados, os antidepressivos e os benzodiazepínicos foram os mais recorrentes, ambos com 27% dos laudos (Gráfico 3). Também foram citados fármacos barbitúricos, antipsicóticos, anticonvulsivantes e estabilizadores do humor.

Com relação aos medicamentos, o mais encontrado foi o diazepam (benzodiazepínico), seguido pela carbamazepina (anticonvulsivante) e fenobarbital (barbitúrico), ambos com o mesmo número de citações em laudos. Outros benzodiazepínicos citados nos laudos foram o alprazolam e o midazolam. O Gráfico 4 apresenta todos os fármacos de uso terapêutico citados com seus respectivos números de citações nos laudos.

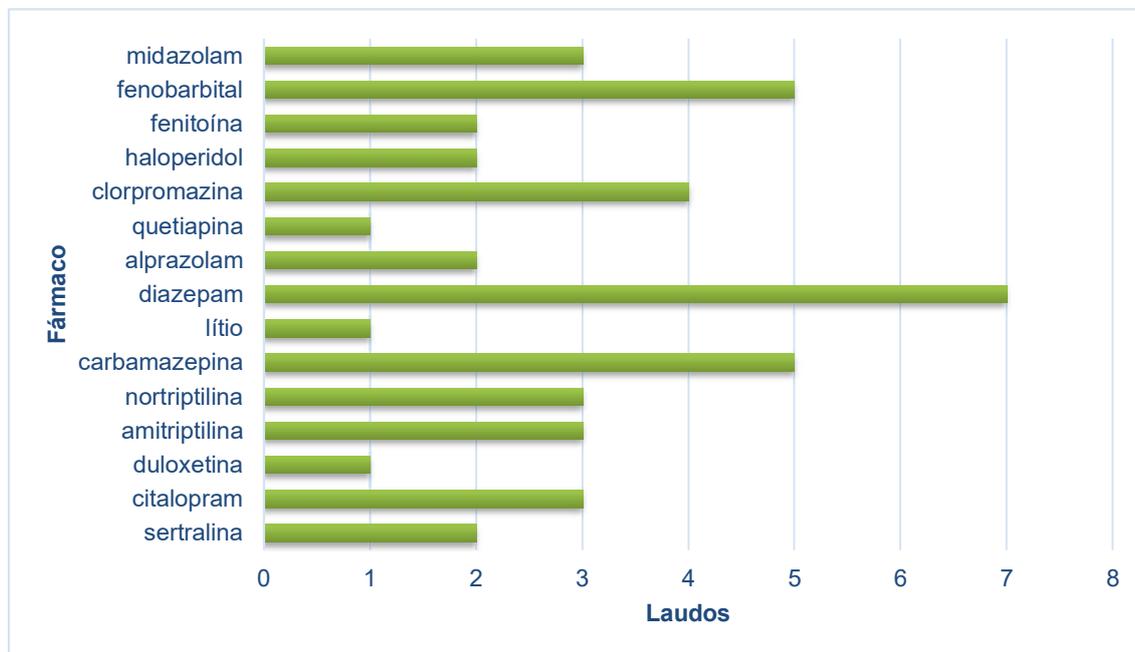
Gráfico 3 – Classes farmacológicas identificadas entre os medicamentos identificados nos óbitos registrados pelo IML-SP



Fonte: IML-SP (2018)

Deve-se considerar que, somente a conclusão do laudo expedido está disponível para consulta e que, muitas vezes, as substâncias pesquisadas ou a *causa mortis* não são citadas nessa parte do laudo. Não existe um padrão de redação para esse campo do laudo. Portanto, provavelmente os dados apresentados estão subnotificados. Porém, como não existem estatísticas oficiais publicadas, talvez essa seja uma das maneiras de se ter um panorama dos registros de óbitos examinados pelo IML-SP. Apesar do número de laudos ser relativamente pequeno, a validação desses pode ser feita pela comparação com estatísticas publicadas por outras instituições, nas quais foi observado um padrão semelhante (MONTEIRO et al., 2010; VIEIRA, 2016; MAGALHÃES, 2017).

Gráfico 4 – Fármacos de uso terapêutico citados nos laudos com o respectivo número de citações



Fonte: IML-SP (2018)

1.3 PREPARO DE MATRIZES BIOLÓGICAS PARA ANÁLISES TOXICOLÓGICAS

O preparo de amostra é considerado um ponto crítico nas análises toxicológicas, estima-se que até 80% do tempo total de análise seja comprometido somente com procedimentos de preparo de amostras (BUSZEWSKI; SZULTKA, 2012; NOVAKOVA, 2013; MONTESANO; SERGI, 2016). Muitas das análises de rotina dos laboratórios não podem ser realizadas em matrizes biológicas brutas devido à incompatibilidade dos componentes da matriz com a metodologia analítica utilizada ou interferência destes no resultado a ser obtido (VALENTE et al., 2000; ALTUN, 2005). A complexidade das etapas de preparo da amostra depende da matriz em questão, do analito e das técnicas de separação e detecção a serem utilizadas para a identificação da substância de interesse. O preparo de amostra tem como principais objetivos a remoção de interferentes da matriz, a adequação do analito para a técnica de identificação a ser utilizada (por exemplo, derivatização) e a pré-concentração dos analitos para um aumento de sensibilidade do método (ASHRI; ABDEL-REHIM, 2011).

As abordagens para preparo de amostras biológicas podem ser didaticamente divididas em duas categorias: estratégias convencionais e estratégias modernas. As estratégias convencionais são as técnicas mais utilizadas para preparo de amostras e contemplam as seguintes técnicas: precipitação de proteínas (PPT, do inglês *protein precipitation*), extração líquido-líquido (LLE, do inglês *liquid-liquid extraction*) e extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid-phase extraction*) (ASHRI; ABDEL-REHIM, 2011; NOVAKOVA, 2013).

A precipitação das proteínas presentes em matrizes biológicas ocorre por desnaturação após adição de solventes, soluções salinas, ácidos ou íons metálicos à amostra. Esse método de preparo de amostra é geralmente utilizado quando o analito se encontra em concentrações relativamente altas na matriz, pois ocorre diluição da amostra e pode ocorrer co-precipitação das substâncias de interesse. A eficiência do processo está relacionada a proporção entre amostra e solução de precipitação escolhida (ASHRI; ABDEL-REHIM, 2011). Muitas vezes a PPT é o método de escolha devido a sua facilidade, rapidez e capacidade de automação. A forma mais comum de automação da PPT é o uso de microplacas de 96 posições, que podem ter conteúdo funcional (agente precipitante imobilizado na própria placa) ou apenas membranas filtrantes.

A técnica de extração LLE se baseia na partição entre a amostra (aquosa) e um solvente orgânico imiscível. A eficiência da extração depende do coeficiente de partição do analito de interesse, do volume de solvente extrator utilizado e o número de extrações realizadas. Apesar de ser uma técnica muito utilizada, a LLE apresenta certas desvantagens, como alto consumo de solventes, exposição do analista a estes solventes, várias etapas de preparo e, algumas vezes, formação de emulsão entre as fases, o que resulta em perda de parte do analito (QUEIROZ et al., 2005). As técnicas de PPT e LLE também podem ser associadas para matrizes com alto conteúdo proteico, nesses casos a LLE é feita com o sobrenadante da etapa de precipitação. A automação total de protocolos por LLE é difícil e pode exigir instrumentação de alto custo.

Em vista do alto consumo de solventes para a LLE, algumas das estratégias modernas de preparo de amostras biológicas seguem o mesmo princípio da técnica, porém com volumes reduzidos de amostra e reagentes. Por exemplo: microextração

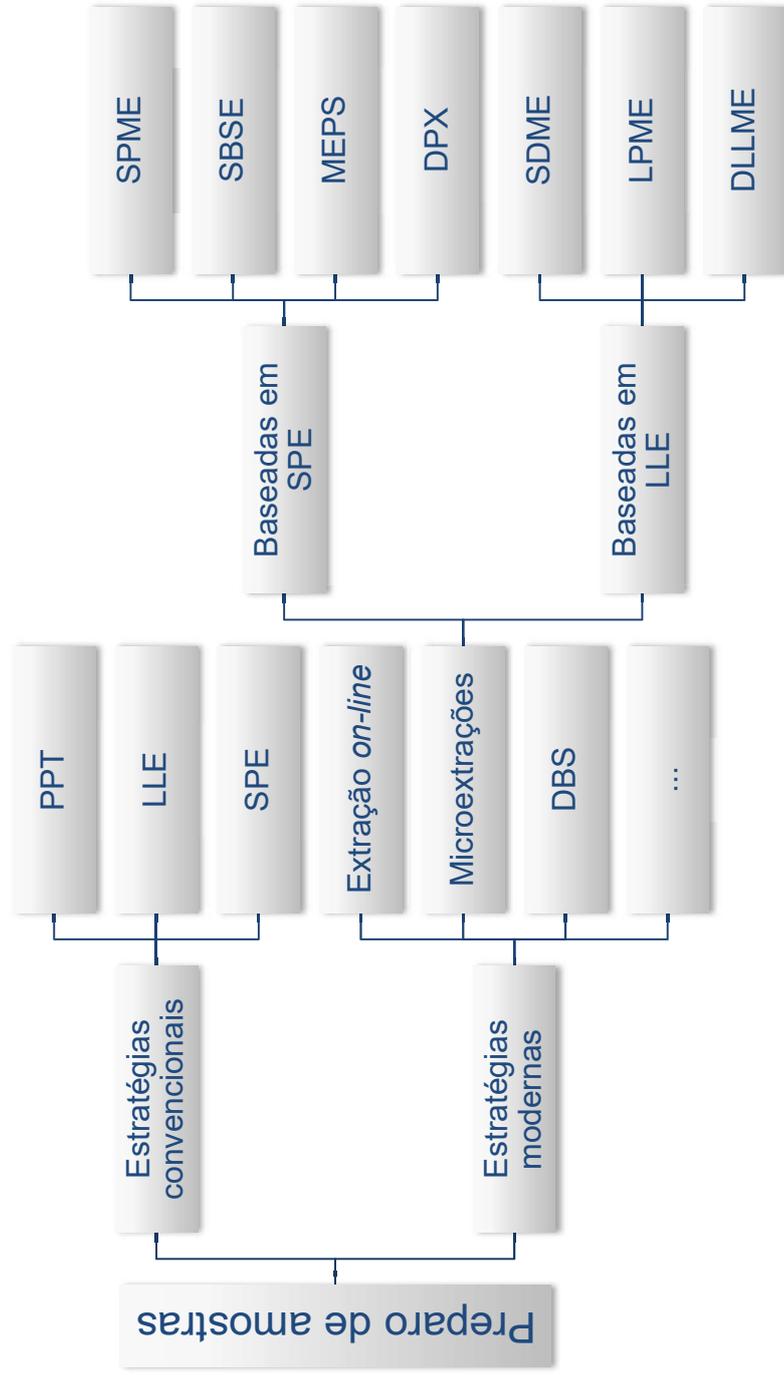
em gota suspensa (SDME) e microextração em fase líquida (LPME) e microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) (NOVAKOVA, 2013; FILIPPOU; BITAS; SAMANIDOU, 2017).

Para o preparo de matrizes biológicas complexas, destaca-se a extração em fase sólida, cujos mecanismos de retenção seguem os mesmos princípios da cromatografia líquida em coluna. Para que o analito fique retido ele deve ter maior afinidade pela fase sólida em relação a sua afinidade pela fase líquida (no caso, a matriz biológica), e a retenção do analito ocorre devido a sua polaridade e/ou interações iônicas. O preparo de amostras por SPE geralmente é realizado com cartuchos que contém 50 a 200 mg de fase sólida e dispositivos multivias (*manifolds*). As vantagens da SPE em relação a LLE são a maior remoção de interferentes da matriz e concentração dos analitos. O fator de concentração do analito é obtido pela razão entre o volume inicial de amostra aplicado no cartucho e o volume final de eluato (JARDIM, 2010; ASHRI; ABDEL-REHIM, 2011). Após a eluição, etapas de secagem e ressuspensão, assim como, etapas de diluição também devem ser consideradas no cálculo do fator de diluição final do procedimento.

Assim como outras técnicas de preparo de amostra, a SPE também pode ser automatizada e conta com grande variedade de fases extratoras. As inovações relacionadas a essas técnicas de preparo de amostra estão relacionadas, principalmente, com a automação e miniaturização do processo. Uma das formas de automatizar e miniaturizar esse processo de extração é o uso de placas extratoras (geralmente de 96 posições) no lugar dos tradicionais cartuchos de SPE. Entre as estratégias ainda mais modernas e miniaturizadas relacionadas a SPE, destacam-se a microextração em fase sólida (SPME), extração sortiva em barra de agitação (SBSE), a microextração em ponteiras descartáveis (DPX) e a microextração por sorbente empacotado (MEPS) (NOVAKOVA, 2013; OCANA-GONZALEZ et al., 2016), objeto do presente estudo.

Na Figura 4 estão esquematizadas as estratégias convencionais e algumas das principais estratégias modernas de preparo de amostras biológicas. Pode-se notar que as estratégias modernas são classificadas de acordo com suas semelhanças com técnicas convencionais, dividindo-se em: estratégias modernas baseadas em SPE e estratégias modernas baseadas em LLE.

Figura 4 – Estratégias convencionais e modernas de preparo de amostras biológicas¹



Fonte: adaptado de NOVAKOVA (2013)

¹ PPT – precipitação de proteínas; LLE – extração líquido-líquido; SPE – extração em fase sólida; DBS – extração em fase sólida; DBS – mancha de sangue seco em papel; SPME – microextração em fase sólida; SBSE – extração sortiva em barra de agitação; MEPS – microextração por sorbente empacotado; DPX – microextração em ponteiros descartáveis; SDME – microextração em gota suspensa; LPME – microextração em fase líquida; DLLME – microextração líquido-líquido dispersiva.

As técnicas miniaturizadas se destacam pelo uso de menores volumes de amostras biológicas e menor consumo de solventes orgânicos durante o processo, sendo consideradas técnicas mais sustentáveis que as já tradicionalmente usadas (MONTESANO; SERGI, 2016; FILIPPOU; BITAS; SAMANIDOU, 2017). Além da redução de consumo e descarte de solventes orgânicos, as microextrações permitem o reuso de suas fibras (de SPME, por exemplo) e sorbentes, por isso as microextrações podem ser consideradas como abordagem relacionada aos conceitos de sustentabilidade e “química analítica verde”.

Estudos ainda mais recentes destacam também a possibilidade de uso das técnicas de microextração para análises *in vivo*, sem a necessidade de coleta do material biológico (GÓMEZ-RÍOS et al., 2016; GÓMEZ-RÍOS et al., 2017). Chamada de Bio-SPME, a extração do tipo SPME compatível com tecidos biológicos só foi utilizada até hoje em estudos com animais. O grupo responsável por esse estudo desenvolveu um dispositivo não letal que permite a realização da extração por Bio-SPME de substâncias presentes em tecidos vivos. E espera-se que, no futuro, esse tipo de dispositivo permita a realização de exames em humanos vivos, principalmente em tecidos que não são passíveis de coleta ou biópsia, como o cérebro, por exemplo.

De acordo com a classificação proposta na Figura 4, uma outra abordagem moderna de preparo de amostras é a extração *on-line* (NOVAKOVA, 2013). Neste caso, deve-se considerar a automação de técnicas não miniaturizadas. Um exemplo de técnica desse tipo é a cromatografia em fluxo turbulento (TFC, do inglês *turbulent flow chromatography*) que, apesar de ser uma técnica antiga, é considerada nova no contexto de preparo de amostras biológicas (FUMES et al., 2017).

Uma outra técnica moderna que tem aparecido em diversas publicações é a mancha de sangue seco em papel (DBS, do inglês *dried blood spots*). Essa técnica tem como principal vantagem a possibilidade de coleta não invasiva do sangue capilar diretamente nos cartões de DBS. Posteriormente, a mancha de sangue seca é recortada do cartão e o procedimento de extração é realizado

com esse fragmento de papel. Outra vantagem associada ao DBS é a maior estabilidade de muitos analitos nessas condições (NOVAKOVA, 2013).

1.3.1 Métodos de preparo de amostras biológicas para a análise de benzodiazepínicos

Os benzodiazepínicos podem ser analisados em diversas matrizes biológicas. As matrizes convencionais (sangue total, plasma, soro e urina) ainda são as mais utilizadas para a quantificação dessas substâncias. Entre as matrizes alternativas, destacam-se o fluido oral, humor vítreo, cabelo, unhas e – mais recentemente – ar exalado e depósitos de suor em impressões digitais (PERSONA et al., 2015).

De acordo com a literatura, a extração líquido-líquido (LLE) e extração em fase sólida (SPE) são os métodos mais usados para o preparo de amostras biológicas para a análise de benzodiazepínicos (UDDIN; VICTORIA F; PAPADOYANNIS, 2014). O Gráfico 5 representa a participação das diferentes técnicas de preparo de amostras para a análise de benzodiazepínicos. Neste contexto, a LLE corresponde 44% e a SPE 33% dos métodos.

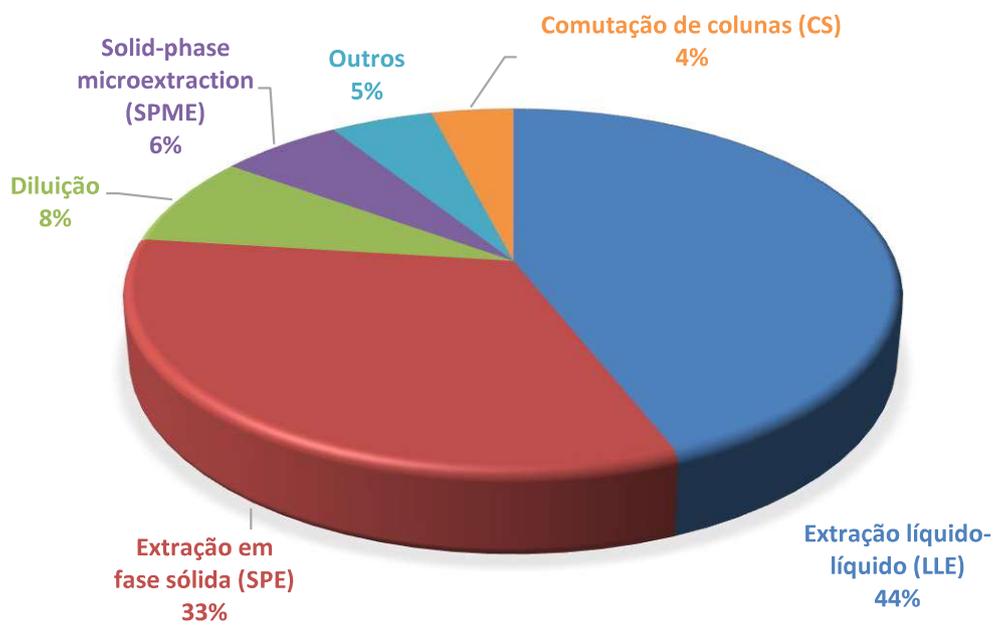
Entre os métodos de SPE, o cartucho de fase reversa C18 é o mais utilizado, no entanto, alguns autores desenvolveram protocolos utilizando cartuchos C2, C8 e também com cartuchos de fase mista (DRUMMER, OLAF H., 1998; PERSONA et al., 2015).

A literatura também cita outros métodos: alguns mais simples, como a simples diluição da matriz com um tampão ou a precipitação de proteínas; outros mais elaborados incluem a microextração em fase sólida (SPME), extração assistida por micro-ondas (MAE), extração no ponto nuvem (CPE) e extração *on-line* por comutação de colunas (CS) (UDDIN; VICTORIA F; PAPADOYANNIS, 2014; PERSONA et al., 2015).

Alguns trabalhos também citam o uso da técnica QuEChERS (do inglês, *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*) e mancha de sangue seco em

papel (DBS) para o preparo desse tipo de amostra (WESTLAND; DORMAN, 2013; ANZILLOTTI; ODOARDI; STRANO-ROSSI, 2014; LEE et al., 2015).

Gráfico 5 – Participação de diferentes técnicas de preparo de amostras em publicações de análises de benzodiazepínicos



Fonte: adaptado de UDDIN; VICTORIA F; PAPADOYANNIS (2014)

Para o preparo de amostras de sangue total, a maior parte dos métodos descritos na literatura necessita de duas etapas. A primeira etapa consiste na diluição da amostra (com água ou solução-tampão), ou também na precipitação de proteínas com solventes orgânicos. Só então, na etapa seguinte, são realizadas as técnicas de extração propriamente ditas. Alguns métodos também contêm reações de derivatização nessa segunda etapa de preparo (PERSONA et al., 2015). A Tabela 3 traz alguns dos métodos de preparo de amostras para análise de benzodiazepínicos em sangue total. Pode-se observar que os valores de recuperação são variados, principalmente para SPE (47 a 110%) (PERSONA et al., 2015). Mesmo quando se trabalha com uma classe única de substâncias, uma baixa recuperação pode ocorrer quando o método abrange um grupo de analitos com características físico-químicas diversas. Nos métodos para quantificação de fármacos em matrizes biológicas valores variados de recuperação costumam surgir quando o método visa quantificação, tanto do fármaco inalterado, quanto de seus produtos de biotransformação.

Tabela 3 – Exemplos de métodos de preparo de amostras de sangue total para análise de benzodiazepínicos

Preparo de amostra	Volume de sangue (mL)	Pré-tratamento da amostra	Extração	Técnica analítica	Recuperação (%)
SPE	0,1 a 1,0	Diluição com água ou solução-tampão	<ul style="list-style-type: none"> • Fenil • Fase mista • MgSO₄ 	HPLC-DAD	47 a 110
				GC-MS*	
				GC-NPD*	
LLE	0,5 a 1,0	Diluição com solução-tampão ou precipitação com acetonitrila	<ul style="list-style-type: none"> • Cloreto de n-butila • Clorofórmio 	UHPLC-MS/MS	74 - 107
				HPLC-DAD-MS	
				LC-MS	

*Necessidade de derivatização com N-terc-butildimetilsilil-N-metiltrifluoroacetamida (MTBSTFA)

Fonte: adaptado de PERSONA et al. (2015)

A escolha da técnica de extração a ser utilizada não depende somente do analito a ser estudado. O preparo de amostras tem relação direta com a instrumentação analítica que vai ser usada. No caso específico da cromatografia líquida com espectrometria de massas *in tandem* (LC-MS/MS), deve-se ter muita atenção a elementos da amostra que possam causar interferências na análise. Esse fenômeno é chamado de “efeito matriz”. O efeito matriz pode ser causado por substâncias endógenas, presentes no fluido biológico, ou reagentes adicionados durante a análise (BYLDA et al., 2014).

O preparo de amostras adequado é uma das ferramentas que garante que o efeito causado pelas substâncias endógenas a amostra não interfira na análise instrumental. Outra estratégia é a separação cromatográfica dos analito de interesse dos interferentes de matriz (NOVAKOVA, 2013).

Os principais interferentes de matriz para análises por LC-MS/MS são os fosfolipídeos. Amostras hemolisadas também costumam apresentar efeito matriz pronunciado (BYLDA et al., 2014). Sendo esses os principais interferentes de matriz e, tendo em vista que as amostras de sangue total são repletas de interferentes com essas características, a seleção de uma estratégia de *clean-up* adequada para essas amostras, antes da injeção no LC-MS/MS, é fundamental.

1.3.2 Preparo de amostras pela técnica de microextração por sorbente empacotado

A técnica de microextração com sorbente empacotado (MEPS, do inglês *microextraction by packed sorbent*) foi desenvolvida em 2004, por Abdel-Rehim e colaboradores, nos laboratórios da AstraZeneca, na Suécia, e consiste em uma versão miniaturizada da extração em fase sólida tradicional (ABDEL-REHIM, 2011; PEREIRA et al., 2013).

Em MEPS uma pequena quantidade de fase sólida, que neste caso é denominada como “sorbente”, se encontra acondicionada em uma microseringa. O sorbente pode estar em duas posições distintas, dependendo

do dispositivo a ser utilizado, conforme demonstrado na Figura 5A. Na primeira configuração o sorbente fica dentro do corpo da microsseringa. Já na segunda configuração o sorbente ocupa uma posição correspondente à agulha da microsseringa. Neste último caso o cartucho de sorbente é chamado de BIN (do inglês *barrel insert and needle*), também conforme a Figura 5A. Nos BINs a 1 a 4 mg de fase extratora é empacotada entre duas fritas idênticas, permitindo o fluxo bidirecional no cartucho. Uma desvantagem dos BINs é que não é possível substituir essas fritas, o que pode acarretar na perda de todo o conjunto por entupimento. A Figura 6 traz uma foto de um BIN comercialmente disponível e a seringa de MEPS utilizada para a extração com o BIN.

Figura 5 – (A) Representação esquemática de MEPS e suas partes e (B) etapas de MEPS

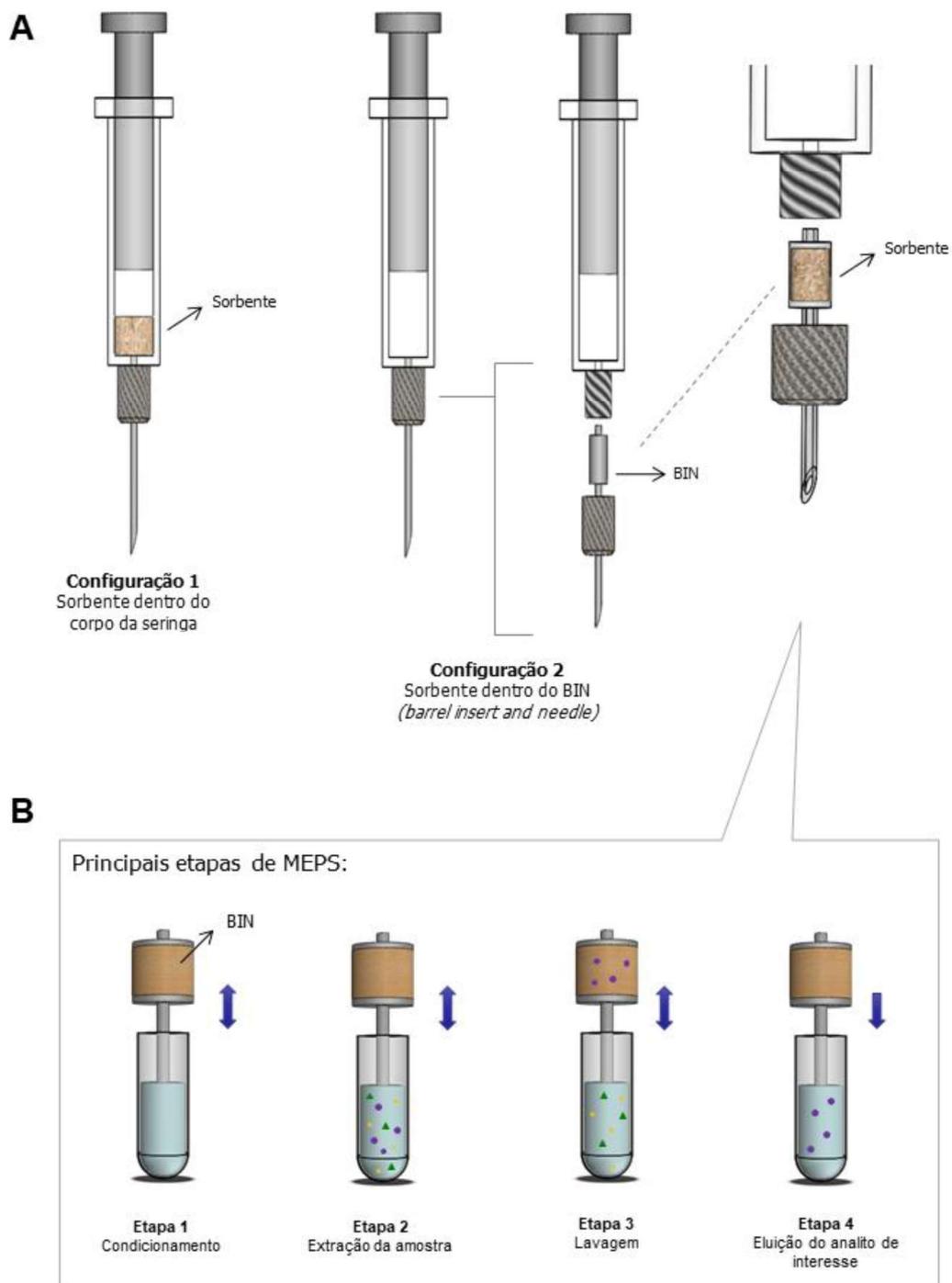


Figura 6 – Microseringa e exemplo de BIN utilizados para MEPS



Fonte: Adaptado de ABDEL-REHIM (2011)

Os sorbentes utilizados para MEPS podem ser os mesmos que os utilizados para SPE, não existindo limitação da técnica a esse respeito. Atualmente, existem BINs comercialmente disponíveis com propriedades químicas variadas para uso como fases normal, reversa e mista, permitindo que a maior parte dos métodos desenvolvidos por SPE possam ser reproduzidos também por MEPS. Alguns leitos disponíveis para aplicação em MEPS estão na Tabela 4.

O preparo de amostras por extração em fase normal é usado quando é necessário retirar da amostra analitos de característica polar. Para isso, podem ser usados leitos de sílica pura, alumina, florisil ou sílica ligada a grupamentos como ciano, amino ou diol. A diferença entre essas fases é o mecanismo e, por isso, extrações com fases ciano-, amino- ou diol- (que tem mecanismo de partição) são indicadas para analitos de polaridade intermediária a alta. Já as fases de sílica, alumina e florisil (que atuam pelo mecanismo de adsorção) devem ser aplicadas a analitos de menor polaridade. O principal tipo de interação nesse modo de extração é a ligação de hidrogênio. A eluição do analito de interesse do leito costuma ser feita com álcoois. Também podem ser usadas soluções-tampão de elevada força iônica (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2011).

Tabela 4 – Algumas fases extratoras disponíveis para aplicações em MEPS

Fase extratora	Mecanismo	Características			
		Leito	Análito	Matriz	Eluente
Sílica (fase normal)	Adsorção	Moderadamente polar	Polar	Apolar	Álcoois Acetato de etila Clorofórmio
		Apolar	Apolar	Polar	Álcoois Acetonitrila Diclorometano
C2, C8 e C18 (fase reversa)	Partição	Apolar	Apolar	Polar	Álcoois Acetonitrila Diclorometano
		Apolar com trocador iônico	Apolar	Polar	Álcoois Acetonitrila Ajuste de pH

SCX: *strong cation exchange*

A fase reversa é, sem dúvidas, a mais utilizada atualmente. O material do leito pode ser feito a partir de sílica (mais comum) ou polímeros, nos quais grupamentos apolares estão ligados. São exemplos de grupamentos comuns em fase reversa o etil- (C2), octil- (C8) e octadecil- (C18), que são escolhidos de acordo com a seletividade desejada. O mecanismo de interação envolvido nessa extração é a partição do analito entre os solventes utilizados e o leito apolar. O principal tipo de interação nesse modo de extração são as forças de van der Waals. E a eluição do analito de interesse do leito geralmente é feita com solventes orgânicos como metanol ou acetonitrila (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2011).

Outro modo de extração disponível para MEPS é a fase mista, que consiste em uma mistura de dois tipos de leitos ligados a sílica diferentes: o de fase reversa (no caso, C8) e um leito de troca iônica, cujo grupamento sulfonil-garante mais um sítio de interação com o analito. O grupamento sulfonil- atua pelo mecanismo de troca catiônica, mais especificamente troca catiônica forte (SCX, do inglês *strong cation exchange*). Ou seja, devem ser utilizados para extração de analitos carregados positivamente. A combinação desses dois mecanismos diferentes garante uma seletividade ainda maior para esse modo de extração, pois de acordo com o pH de trabalho, analitos ácidos e neutros podem ser retidos por interações hidrofóbicas. Da mesma maneira, o pH de trabalho também pode permitir que analitos básicos sejam retidos pelos grupamentos de troca iônica (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2011).

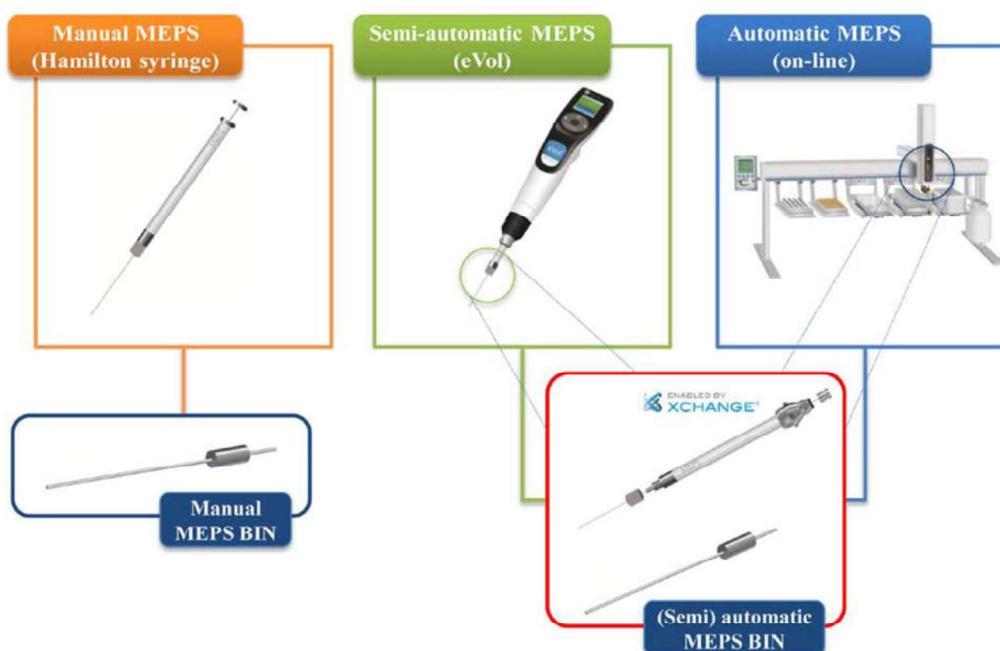
As etapas que compõem o preparo de amostras MEPS são basicamente as mesmas de uma SPE convencional: tratamento da amostra (diluição, precipitação de proteínas, centrifugação, entre outros); condicionamento do cartucho; extração da amostra e eluição dos compostos de interesse, conforme ilustrado na Figura 5B. Adicionalmente, MEPS necessita de uma etapa de limpeza para reutilização da fase extratora.

Além da versão comercial dos BINS, alguns laboratórios manufaturam suas próprias fases extratoras para MEPS. Nesses casos, geralmente, o sorbente fica empacotado dentro do corpo da microseringa, conforme já apresentado na Figura 5A. Um trabalho desenvolvido na Universidade de São

Paulo contou com um dispositivo para MEPS projetado e confeccionado na Oficina de Mecânica do Instituto de Química de São Carlos. O protótipo se compromete a ir além da versão comercial, permitindo a escolha do sorbente de acordo com a análise a ser desenvolvida. Este dispositivo de extração comporta 3,8 mg de sorbente (AMPARO, 2013).

O preparo de amostras por MEPS pode ser manual (*off-line*), semi-automatizado ou totalmente *on-line*, conforme apresentado na Figura 7. Quando é feita *off-line*, a extração é feita em uma microsseringa. Na versão semi-automatizada, a microsseringa é acoplada a uma pipeta automática eVol® (SGE Analytics, Melbourne, Austrália), que é uma micropipeta capaz de armazenar ciclos específicos para preparo de amostras. Já a extração *on-line* é feita pela substituição da seringa do amostrador automático do cromatógrafo (líquido ou gasoso) pela microsseringa de MEPS com o BIN, permitindo que toda a programação do método de extração e injeção da amostra seja feita pelo *software* do equipamento (PEREIRA et al., 2013).

Figura 7 – Opções de MEPS manual, semi-automatizada e *on-line*



Fonte: retirado de PEREIRA et al. (2013)

As principais vantagens da técnica estão associadas ao pequeno volume de amostra e solventes necessários para extração. Outro diferencial é que múltiplas extrações são realizadas com um mesmo BIN (40 a 100 amostras com um único cartucho) (MOEIN; SAID; ABDEL-REHIM, 2015).

A literatura não apresenta uma ampla relação de artigos de MEPS como técnica de escolha para preparo de amostras no âmbito da toxicologia, conforme compilado na Tabela 5. Além disso, entre as matrizes usadas em análises toxicológicas com MEPS, destacam-se urina, soro, e fluido oral, mas não matrizes complexas como o sangue total. Em toxicologia, MEPS é utilizada para o preparo de amostras para análises por cromatografia líquida e gasosa, com detecção por diversas técnicas tanto de maior, quanto de menor sensibilidade. O volume de amostra necessário varia de 50 a 1000 µL.

A técnica já foi descrita para a análise de benzodiazepínicos em bebidas alcoólicas, com possível aplicação em casos de crimes facilitados por drogas (MAGRINI et al., 2016), mas não para a análise dessa classe de fármacos em amostras biológicas. Todavia, a técnica já é aplicada em controle terapêutico de outros fármacos (SAID et al., 2012; CATAI et al., 2013; SZULTKA et al., 2013; VLČKOVÁ et al., 2016; FERRONE et al., 2017; VENTURA et al., 2017), desenvolvimento de novos fármacos (EL BEQQALI; AHMADI; ABDEL-REHIM, 2017), análises clínicas (SARACINO, MARIA A. et al., 2014) e para análises de água e outras bebidas (MENDES; GONÇALVES; CÂMARA, 2012; QUINTO et al., 2012; SILVA, C. L.; GONÇALVES; CAMARA, 2012; GONÇALVES et al., 2013; FUMES; LANÇAS, 2017). Potencialmente essa técnica de microextração também pode ser usada em estudos de metabolômica (SILVA, C. et al., 2014).

Além do uso de MEPS como técnica de preparo para separações cromatográficas, ela também pode ser usada para análises por eletroforese capilar (CATAI et al., 2013), ou até mesmo como técnica de preparo para infusão direta no espectrômetro de massas (CASAS FERREIRA; MORENO CORDERO; PÉREZ PAVÓN, 2017).

A técnica de microextração por sorbente empacotado (MEPS) já foi utilizada, e tem se mostrado extremamente útil, para o preparo de amostras das

mais diversas matrizes biológicas para análises por cromatografia líquida ou gasosa acopladas a detectores de maior ou menor sensibilidade.

Muitas vezes um único laboratório forense atende a uma ampla região (como é o caso do IML-SP, que atende a todo o estado de São Paulo), o que gera uma enorme demanda de amostras a serem processadas. Como MEPS é uma técnica de fácil automação, espera-se que o método proposto atenda à demanda por análises rápidas e passíveis de automação que esses laboratórios necessitam.

Tabela 5 – Estudos publicados de MEPS com interesse toxicológico (continua)

Analito	Matriz	BIN	Técnica analítica	Recuperação (%)	LOD (ng.mL ⁻¹)	LOQ (ng.mL ⁻¹)	Volume de amostra (µL)	Nº de vezes que cada BIN foi usado
Metadona ²	Urina	C8	GC-MS	50	0,4	2,3	50	-
Oxcarbapentina e seus produtos de biotransformação ³	Plasma e fluido oral	C18	HPLC-DAD	>86.5	0,050 a 0,125	0,015 a 0,037	50	-
Clozapina e seus produtos de biotransformação ⁴	DBS	C8	HPLC-CD	90 a 96.1	0,08	0,25	150 µL do extrato do DBS	-
Buprenorfina e norbuprenorfina, metadona e naloxona ⁵	Plasma	C8	HPLC-CD	>85	0,04 a 0,9	0,13 a 3,0	100	-

² EL-BEQALI, A.; ABDEL-REHIM, M. Quantitative analysis of methadone in human urine samples by microextraction in packed syringe-gas chromatography-mass spectrometry (MEPS-GC-MS). *Journal of Separation Science*, v. 30, n. 15, p. 2501-2505, 2007.

³ SARACINO, M. A.; TALLARICO, K.; RAGGI, M. A. Liquid chromatographic analysis of oxcarbapentina and its metabolites in plasma and saliva after a novel microextraction by packed sorbent procedure. *Analytica Chimica Acta*, v. 661, n. 2, p. 222-228, 2010.

⁴ SARACINO, M. A.; LAZZARA, G.; PRUGNOLI, B.; RAGGI, M. A. Rapid assays of clozapine and its metabolites in dried blood spots by liquid chromatography and microextraction by packed sorbent procedure. *Journal of Chromatography A*, v. 1218, n. 16, p. 2153-2159, 2011.

⁵ SOMAINI, L.; SARACINO, M. A.; MARCHESSELLI, C.; ZANCHINI, S.; GERRA, G.; RAGGI, M. A. Combined liquid chromatography–coulometric detection and microextraction by packed sorbent for the plasma analysis of long acting opioids in heroin addicted patients. *Analytica Chimica Acta*, v. 702, n. 2, p. 280-287, 2011.

Tabela 5 – Estudos publicados de MEPS com interesse toxicológico (continuação)

Analito	Matriz	BIN	Técnica analítica	Recuperação (%)	LOD (ng.mL ⁻¹)	LOQ (ng.mL ⁻¹)	Volume de amostra (µL)	Nº de vezes que cada BIN foi usado
Estimulantes piperazínicos ⁶	Urina	C8	HPLC-DAD	52	50	100	100	-
		a		a				
Anticonvulsivantes ⁷	Plasma e urina	C18	LC-UV	100.5	100	0,132	1000	-
				88.56	0,040			
				a	a			
Salvinorin A ⁸	Urina	C18	GC-MS	99.38	0,593	15	200	80
				71	5			
Ziprasidona ⁹	Plasma	C2	HPLC-DAD	a	0,3	1	100	-
				80	0,3			

⁶ MORENO, I. E. D.; DA FONSECA, B. M.; BARROSO, M.; COSTA, S.; QUEIROZ, J. A.; GALLARDO, E. Determination of piperazine-type stimulants in human urine by means of microextraction in packed sorbent and high performance liquid chromatography-diode array detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 61, n. 0, p. 93-99, 2012.

⁷ RANI, S.; MALIK, A. K.; SINGH, B. Novel micro-extraction by packed sorbent procedure for the liquid chromatographic analysis of antiepileptic drugs in human plasma and urine. **Journal of Separation Science**, v. 35, n. 3, p. 359-366, 2012.

⁸ MORENO, I.; DA FONSECA, B.; OPOLZER, D.; MARTINHO, A.; BARROSO, M.; CRUZ, A.; QUEIROZ, J. A.; GALLARDO, E. Analysis of Salvinorin A in urine using microextraction in packed syringe and GC-MS/MS. **Bioanalysis**, v. 5, n. 6, p. 661-668, 2013.

⁹ MERCOLINI, L.; PROTTI, M.; FULGENZI, G.; MANDRIOLI, R.; GHEDINI, N.; CONCA, A.; RAGGI, M. A. A fast and feasible microextraction by packed sorbent (MEPS) procedure for HPLC analysis of the atypical antipsychotic ziprasidone in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 88, n. 0, p. 467-471, 2014.

Tabela 5 – Estudos publicados de MEPS com interesse toxicológico (continuação)

Analito	Matriz	BIN	Técnica analítica	Recuperação (%)	LOD (ng.mL ⁻¹)	LOQ (ng.mL ⁻¹)	Volume de amostra (µL)	Nº de vezes que cada BIN foi usado
Antidepressivos tricíclicos ¹⁰	Fluido oral	C8 + SCX	UHPLC-MS	20.3 a 48.4	0,01 a 0,04	0.03 a 0,14	150	15
Cocaína, anfetaminas, opioides e alucinógenos ¹¹	Fluido oral	C18	LC-MS/MS	18 a 102	0,2 a 10	0,5 a 30	100	100
Antiinflamatórios não-esteroidais ¹²	Dialisatos	C18	UHPLC-PDA	94 a 100	8 a 10	0,025 a 0,033	50	-

¹⁰ WOŹNIAKIEWICZ, M.; WIETECHA-POSLUSZNY, R.; MOOS, A.; WIECZOREK, M.; KNIHNICKI, P.; KOŚCIELNIAK, P. Development of microextraction by packed sorbent for toxicological analysis of tricyclic antidepressant drugs in human oral fluid. **Journal of Chromatography A**, v. 1337, n. 0, p. 9-16, 2014.

¹¹ C, M.; SIMEONI MC FAU - CURINI, R.; CURINI R FAU - SERGI, M.; SERGI M FAU - LO STERZO, C.; LO STERZO C FAU - COMPAGNONE, D.; D, C. Determination of illicit drugs and metabolites in oral fluid by microextraction on packed sorbent coupled with LC-MS/MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 13, p. 3647-3658, 2015.

¹² D'ARCHIVO, A. A.; MAGGI, M. A.; RUGGIERI, F.; CARLUCCI, M.; FERRONE, V.; CARLUCCI, G. Optimisation by response surface methodology of microextraction by packed sorbent of non steroidal anti-inflammatory drugs and ultra-high performance liquid chromatography analysis of dialyzed samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 125, n., p. 114-121, 2016.

Tabela 5 – Estudos publicados de MEPS com interesse toxicológico (conclusão)

Análito	Matriz	BIN	Técnica analítica	Recuperação (%)	LOD (ng.mL ⁻¹)	LOQ (ng.mL ⁻¹)	Volume de amostra (µL)	Nº de vezes que cada BIN foi usado
Catinonas e outras drogas de abuso ¹³	Plasma	C8	UHPLC-DAD	80	5	0,01	300	-
		+ SCX		a	a	a		
THC e seus produtos de biotransformação ¹⁴	Plasma	C8	GC-MS/MS	53	0,1	0,1	250	200
		+ SCX		a				
Cocaina e seus produtos de biotransformação ¹⁵	Urina	C8	GC-MS	14.5	25	25	200	200
		+ SCX		a				

¹³ FERNÁNDEZ, P.; GONZÁLEZ, M.; REGENJO, M.; ARES, A. M.; FERNÁNDEZ, A. M.; LORENZO, R. A.; CARRO, A. M. Analysis of drugs of abuse in human plasma using microextraction by packed sorbents and ultra-high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1485, n., p. 8-19, 2017.

¹⁴ ROSADO, T.; FERNANDES, L.; BARROSO, M.; GALLARDO, E. Sensitive determination of THC and main metabolites in human plasma by means of microextraction in packed sorbent and gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 1043, n., p. 63-73, 2017.

¹⁵ ROSADO, T.; GONÇALVES, A.; MARGALHO, C.; BARROSO, M.; GALLARDO, E. Rapid analysis of cocaine and metabolites in urine using microextraction in packed sorbent and GC/MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 409, n. 8, p. 2051-2063, 2017.

1.4 TOXICOLOGIA FORENSE *POST MORTEM*

1.4.1 Coleta de amostras biológicas post mortem

O Instituto Médico Legal (IML) é o órgão governamental subordinado à Superintendência da Polícia Técnico-Científica do Estado de São Paulo que fornece as bases técnicas em Medicina Legal para o julgamento de causas criminais. A mais conhecida das funções do IML é a necropsia, ou seja, exame do indivíduo após a morte. Porém, o IML também realiza o atendimento de indivíduos vivos envolvidos em acidentes de trânsito, agressões, acidentes de trabalho, entre outros (**Instituto Médico Legal**, 2018)

De acordo com a nossa legislação, nem todo cadáver deve ser submetido a necropsia forense. São encaminhados ao IML somente os indivíduos mortos em circunstâncias violentas, suspeitas, ou por qualquer causa externa. Nos casos de óbito por falta de assistência médica, ou por causas naturais desconhecidas, os corpos são encaminhados para o Serviço de Verificação de Óbitos municipal (SÃO PAULO, 1959).

O IML-SP conta com núcleos responsáveis por análises e pesquisas complementares aos seus exames como, por exemplo, o Núcleo de Toxicologia Forense. De acordo com o Decreto 48009, de 11 de agosto de 2003, artigo 34º, as atribuições do Núcleo de Toxicologia Forense (NTF) são: realizar exames em sangue, urina, secreções e vísceras de seres humanos, a fim de detectar substâncias que causem envenenamento e/ou dependência.

O exame toxicológico é a análise complementar mais frequentemente solicitada. A coleta de material para exames toxicológicos *post mortem* para análise pelo NTF é feita pelo médico legista ou auxiliar de necropsia, responsáveis pelo exame tanatológico, e deve contemplar os seguintes requisitos, descritos na Portaria do Diretor Técnico do Departamento de 04 de dezembro de 2012 (Tabela 6). A coleta de amostras para exames toxicológicos *post mortem* também é abordada em guias de referência internacional, como, por exemplo, o guia do *The International Association of Forensic Toxicologists* (TIAFT), que descreve recomendações para a coleta de amostras para análises

toxicológicas. No caso específico da coleta de sangue total post mortem, o TIAFT indica a coleta de 30 mL de matriz proveniente da cavidade cardíaca para análises qualitativas, e também 10 mL de sangue periférico (preferencialmente da veia femoral), para análises quantitativas. Ambas as coletas devem ser feitas com conservante fluoreto de sódio ou oxalato de potássio, salvo ocasiões em que a suspeita de intoxicação envolva uma dessas substâncias (TIAFT, 2009).

Tabela 6 – Tecidos que podem ser enviados para análise no Núcleo de Toxicologia Forense (IML-SP) e instruções para coleta adequada

Substância suspeita de intoxicação	Matriz biológica coletada	Volume mínimo para análise
Etanol	Sangue*	4 mL
Medicamentos, drogas de abuso ou praguicidas	Sangue Urina	40 mL 40 mL
Monóxido de carbono	Sangue	20 mL
Arsênico	Estômago + conteúdo gástrico	Todo o conteúdo
Cianeto	Sangue	20 mL
Solventes voláteis	Sangue** Pulmão Cérebro	8 mL 50 g 50 g
Outros (<i>causa mortis</i> indeterminada)	Sangue Urina Estômago + conteúdo gástrico Fígado Rim	40 mL 40 mL Todo o conteúdo 100 g 100 g

* sangue da veia femoral ou da cavidade cardíaca em tubo contendo conservante fluoreto de sódio e anticoagulante EDTA

** sangue contendo conservante fluoreto de sódio e anticoagulante EDTA

Fonte: retirado de IML-SP (2012)

Dadas as características das matrizes biológicas coletadas e, considerando que os xenobióticos presentes nessas matrizes são passíveis de degradação ao longo do tempo, o NTF não retém contraprova. Ou seja, o

material biológico é descartado após a expedição do laudo pelo perito responsável pela análise.

Além das matrizes biológicas preconizadas pelo IML-SP e TIAFT, outros tecidos também são descritos na literatura para análises toxicológicas *post mortem*. São matrizes convencionais provenientes de sítio anatômico em que não estão disponíveis para coleta *in vivo* ou, simplesmente, matrizes alternativas. São elas: humor vítreo, coágulos (subdural, subaracnóide ou epidural), sangue da cavidade torácica ou abdominal, fluido pleural, baço, bile, rins, ossos, fluido sinovial, tecido adiposo, músculos esqueléticos, entre outros (DINIS-OLIVEIRA; VIEIRA; MAGALHÃES, 2016)

1.4.2 Análise toxicológica de sangue total post mortem

Os fenômenos cadavéricos, como a putrefação, estão relacionados a fatores intrínsecos e extrínsecos. A temperatura e a umidade do ambiente em que o cadáver está, são exemplos de fatores extrínsecos. Porém, a idade, *causa mortis* e composição corporal do cadáver também influenciam no processo destrutivo dos tecidos. Dependendo do estado de putrefação, algumas matrizes podem não estar mais disponíveis. Fluidos biológicos como o sangue e o humor vítreo são os primeiros a se degradar, podendo não estar mais disponíveis até 48 horas após o óbito, principalmente se o cadáver permanecer em um ambiente de temperatura elevada durante esse período (WYMAN, 2012). Cadáveres de grandes queimados e indivíduos que sofreram choque hipovolêmico (exanguinação) também podem não ter sangue disponível para coleta (SKOPP, 2004; DINIS-OLIVEIRA; VIEIRA; MAGALHÃES, 2016). A mumificação, outro fenômeno cadavérico, também dificulta a coleta de material biológico para os exames toxicológicos (BYARD; TSOKOS, 2013).

O sangue total periférico é, geralmente, a amostra de escolha para análises toxicológicas quantitativas *post mortem*. A coleta costuma ser realizada por punção da veia femoral (preferencialmente), ou subclávia (SKOPP, 2004; SKOPP; MEYER, 2004).

O sangue da cavidade cardíaca costuma estar presente em maior volume que o periférico, portanto análises toxicológicas qualitativas (de triagem) são preferencialmente realizadas nessas amostras. De maneira geral, a concentração dos fármacos tende a ser mais alta no sangue cardíaco em relação ao sangue periférico, portanto a coleta de sangue cardíaco também se faz útil para a investigação de intoxicações por fármacos de extensa biotransformação (SKOPP, 2004).

A coleta de sangue da cavidade abdominal pode ser considerada uma opção para casos de morte traumática, em que não existe a possibilidade de coleta de material isento de contaminações externas ao cadáver. Todavia, é importante ressaltar que o sangue da cavidade abdominal é altamente susceptível a contaminação pela urina, conteúdo gástrico e intestinal do próprio cadáver, sendo possível somente análise qualitativa dessas amostras (SKOPP, 2004; DINIS-OLIVEIRA; VIEIRA; MAGALHÃES, 2016).

As características do sangue total *post mortem* são muito diferentes das observadas em condições fisiológicas *ante mortem*. São observadas intensas alterações celulares e extracelulares que dependem, assim como os outros fenômenos cadavéricos, de fatores intrínsecos e extrínsecos. Amostras de sangue provenientes de exames necroscópicos são hemolisadas, extremamente viscosas e, muitas vezes, apresentam coágulos visíveis. O sangue *post mortem* também é menos hidratado, podendo chegar a ter somente cerca de 60% de sua constituição aquosa. O pH sanguíneo começa a sofrer alteração imediatamente após o óbito, chegando a valores próximos de 5,5. Porém, após a acidificação do meio, a clivagem de proteínas faz com que esse valor aumente gradativamente (SKOPP, 2004).

Valores de referência estabelecidos em plasma, ou soro de indivíduos vivos, não devem ser utilizados diretamente na interpretação de resultados de sangue total *post mortem*, pois algumas substâncias possuem distribuição desigual entre o plasma e fração eritrocitária do sangue. Bons exemplos disso são os próprios benzodiazepínicos: clonazepam, cuja razão plasma/sangue total é de 1,54; alprazolam (1,35); diazepam (1,80) e nordiazepam (1,70) (Monographs, 2011; JONES, G., 2011).

Devido a essas características específicas do sangue total *post mortem*, essa matriz se torna ainda mais complexa que as frações sanguíneas geralmente utilizadas em análises toxicológicas (soro e plasma), e até mesmo do próprio sangue total *ante mortem*. Por isso, técnicas de preparo de amostras como a diluição e precipitação de proteínas não costumam ser usadas, exceto em casos em que esses procedimentos sejam utilizados como uma primeira etapa de tratamento da amostra para que, em seguida, outra técnica de extração mais seletiva seja realizada. Amostras complexas como o sangue total, quando submetidas a um preparo inadequado ou insuficiente podem levar a um efeito matriz pronunciado, ocasionando, inclusive, resultados falso-negativos. Outra desvantagem da inserção de interferentes da matriz nos equipamentos analíticos é a maior necessidade de manutenções e calibrações dos sistemas (PETERS et al., 2017)

Portanto, como foi visto na revisão da literatura, a quantificação de fármacos benzodiazepínicos é uma rotina fundamental em laboratórios de análises toxicológicas forenses.

As amostras de sangue total *post mortem* são complexas e sua composição varia de acordo com os fenômenos transformativos cadavéricos, sendo necessária a escolha de uma técnica de preparo de amostras adequada para que os interferentes de matriz não prejudiquem a análise.

2 OBJETIVOS

Desenvolver e validar método de preparo de amostras por microextração por sorbente empacotado (MEPS) para análise de fármacos benzodiazepínicos em amostras reais de sangue total humano *post mortem* por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS).

3 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, conforme o parecer consubstanciado número 1.996.499 apresentado nos Anexos, juntamente com o despacho da Superintendência da Polícia Técnico-Científica do Estado de São Paulo autorizando, o fornecimento das amostras para o projeto de pesquisa.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Padrões e reagentes

Os padrões de clonazepam, diazepam, bromazepam, flunitrazepam e alprazolam (pureza $\geq 95\%$) foram gentilmente doados por indústrias farmacêuticas locais. Já os padrões de nordiazepam, 7-aminoflunitrazepam e clonazepam-d4 (pureza $\geq 98\%$) foram adquiridos da Cerilliant[®] Analytical Reference Standards (Round Rock, TX, EUA).

Todos os solventes orgânicos utilizados foram de grau cromatográfico ou superior (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). Todos os reagentes utilizados para o preparo das soluções-tampão são de grau de pureza elevado, adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). O sistema de purificação da água utilizada foi do tipo Milli-Q (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha).

4.1.2 Amostras

As dez amostras de sangue total *post mortem* fornecidas para o presente estudo eram parte da coleção de amostras de sangue de cadáver do Núcleo de Toxicologia Forense do Instituto Médico Legal de São Paulo (NTF-IML-SP), órgão da Superintendência da Polícia Técnico-Científica do Estado de São Paulo. Só foram utilizadas amostras cujos exames oficiais já tinham sido encerrados, e o respectivo laudo pericial emitido, situação na qual a amostra seria destinada ao descarte. Não se teve acesso a qualquer dado de identificação dos indivíduos, número de boletim de ocorrência, ou processo judicial. Dessa forma o estudo foi realizado com garantia de sigilo e anonimato dos casos analisados.

4.1.3 Insumos para o preparo de amostras

A extração das amostras foi realizada de maneira semi-automatizada, com auxílio de micropipeta automática eVol® e uma microsseringa de 50 µL (SGE Analytics, Melbourne, Austrália). As fases extratoras (BIN) foram adquiridas do mesmo fabricante.

4.1.4 Análises cromatográficas

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido *Proeminence* acoplado a espectrômetro de massas do tipo triploquadrupolo modelo 8040 (Shimadzu Corp., Kyoto, Japão). A separação cromatográfica ocorreu em fase reversa com uma coluna Atlantis® T3 (150 x 3,0 mm, 3 µm; Waters Corporation, Milford, EUA).

4.1.5 Softwares

O *software Drylab*® (LC Resources Inc., Lafayette, CA, EUA) versão 2000 foi utilizado para a otimização da separação cromatográfica.

O *software* Statistica 12 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA) foi utilizado para a análise estatística dos dados.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas

A separação cromatográfica foi realizada em fase reversa com uma coluna Atlantis® T3, termostaticada a 40°C. A fase móvel foi composta por (A) formiato de amônio 2 mmol.L⁻¹ e 0,1% de ácido fórmico em água, e (B) formiato de amônio 2 mmol.L⁻¹ e 0,1% de ácido fórmico em metanol. A vazão de fase móvel utilizada foi 0,350 mL.min⁻¹. Os *vials* foram mantidos a 4°C no amostrador automático e o volume de injeção foi 20 µL.

O método foi desenvolvido em sistema LC-MS/MS, composto por cromatógrafo líquido e espectrômetro de massas do tipo triploquadrupolo, com ionização por *electrospray* (ESI). Nitrogênio foi utilizado como gás de colisão, nebulização (3 L.min⁻¹), dessolvatação (15 L.min⁻¹) e de cone. A interface permaneceu a 350 °C, sendo a temperatura de dessolvatação de 250 °C. O *heat block* foi mantido a 400 °C. A tensão elétrica tanto do cone, como do *spray*, foi de 4 kV. As análises foram realizadas com ionização positiva, monitoramento em modo *selected reaction monitoring* (SRM) e aquisição de dados em *dwell* durante 40 msec. As transições monitoradas, tempos de retenção (RT) e energias de colisão (CE) estão apresentadas na Tabela 7.

O critério de identificação dos analitos considerou o tempo de retenção das substâncias de interesse, admitindo uma variação de ± 2% em relação ao tempo de retenção observado na curva analítica. A razão entre os íons também foi considerada, admitindo-se uma variação de ± 20% na razão entre o íon quantificador e qualificador em relação ao observado também na curva analítica (GTFCh, 2018).

Tabela 7 – Parâmetros utilizados para a análise por LC-MS/MS

Analito	TR (min)	SRM (m/z)	CE (eV)
7-Aminoflunitrazepam	7,65	284,10 → <u>135,10</u>	31
		284,10 → 227,20	25
Clonazepam-D ₄ (PI)	9,91	319,80 → <u>274,00</u>	25
		319,80 → 218,00	40
Clonazepam	9,94	316,10 → <u>270,00</u>	20
		316,10 → 213,90	36
Bromazepam	9,94	317,80 → <u>272,00</u>	25
		317,80 → 215,95	39
Flunitrazepam	10,04	314,10 → <u>268,00</u>	24
		314,10 → 239,00	36
Alprazolam	10,47	309,10 → <u>281,00</u>	25
		309,10 → 205,00	49
Nordiazepam	11,00	271,00 → <u>140,00</u>	28
		271,00 → 165,00	26
Diazepam	11,26	284,90 → <u>154,00</u>	28
		284,90 → 193,05	33

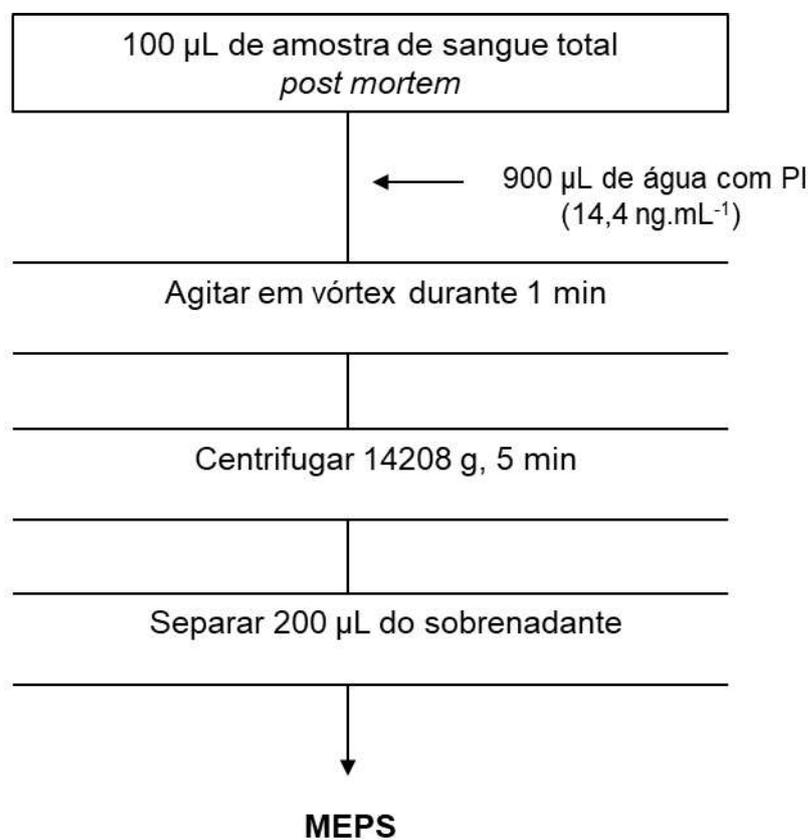
*íons sublinhados foram utilizados como quantificadores

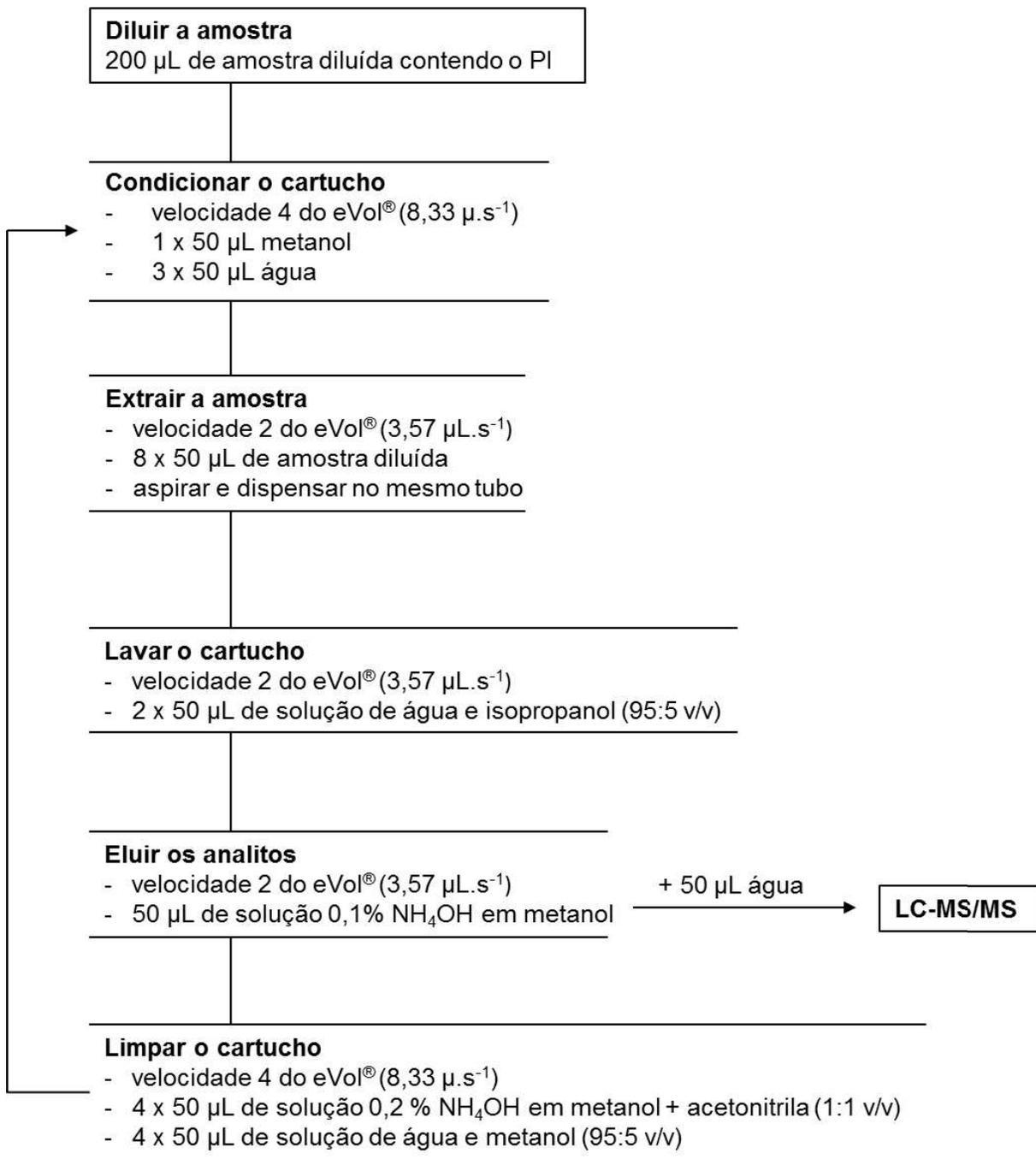
4.2.2 Microextração por sorbente empacotado

As amostras de sangue total *post mortem* foram diluídas dez vezes com água contendo clonazepam-d₄ (padrão interno), conforme apresentado no Fluxograma 1. Após centrifugação (14208 g, 5 min), as etapas de MEPS foram realizadas com 200 µL do sobrenadante.

O protocolo para extração dos benzodiazepínicos estudados por MEPS está descrito no Fluxograma 2.

Fluxograma 1 – Protocolo de diluição das amostras de sangue total *post mortem* para posterior extração por MEPS



Fluxograma 2 – Protocolo de extração de benzodiazepínicos de amostras de sangue total *post mortem* utilizando como sorbente a fase C18

4.2.3 Validação analítica do método

O método proposto foi validado de acordo com o *Scientific Working Group for Forensic Toxicology* (SWGTOX). Todos os experimentos foram conduzidos usando um *pool* de amostras de sangue total *post mortem* (isentas de benzodiazepínicos) fortificado com os analitos em estudo.

4.2.3.1 Seletividade e especificidade

As interferências da matriz foram avaliadas processando dez amostras diferentes de sangue total *post mortem* sem a adição de padrão interno. O critério de aceitação do ensaio foi a ausência de identificação cruzada.

O critério de identificação dos analitos admitiu uma variação de $\pm 2\%$ no tempo de retenção de cada substância e uma variação de $\pm 20\%$ na razão entre os íons obtidos (GTFCh, 2018).

4.2.3.2 Linearidade

O ensaio de linearidade foi realizado analisando amostras fortificadas individualmente com os analitos nas seguintes concentrações: 5, 10, 25, 50, 100, 250 e 500 ng.mL⁻¹. Cada um dos sete pontos foi processado em simplicata, durante cinco dias diferentes. As cinco replicatas de corridas diferentes foram consideradas para cada nível de calibração.

O modelo de calibração de cada um dos analitos foi avaliado quanto a distribuição das variâncias em cada nível de calibração (teste de Fisher) para verificar a ocorrência heterocedasticidade. Considera-se que ocorre heterocedasticidade para todos os analito cujo valor de $F_{\text{calculado}}$ apresente valor superior ao F_{tabelado} . Nestes casos, as curvas analíticas devem construídas pelo método dos mínimos quadrados ponderados (MMQP) utilizando como critério de

escolha a menor soma do erro relativo de medida (ALMEIDA; CASTELBRANCO; FALCAO, 2002).

4.2.3.3 *Precisão e exatidão*

A avaliação da exatidão, precisão intra-dia e inter-dia foi feita simultaneamente a partir da quantificação de amostras controle de qualidade em concentrações baixa (15 ng.mL⁻¹), média (150 ng.mL⁻¹) e alta (400 ng.mL⁻¹) em triplicata durante cinco dias. O SWGTOX preconiza que tanto o coeficiente de variação (%CV) quanto o erro padrão relativo não ultrapassem 20%.

4.2.3.4 *Limite de detecção e limite de quantificação*

Um dos métodos sugeridos pelo SWGTOX para determinação do limite de detecção (LOD) para modelos lineares é a estimativa a partir das curvas. Essa abordagem utiliza o desvio padrão do intercepto (s_y) e a média da inclinação das curvas analíticas (Avg_m) de cada benzodiazepínico (Equação 1). A SWGTOX estabelece que s_y e Avg_m devem ser determinados a partir de, pelo menos, três curvas analíticas. No presente trabalho, esses parâmetros foram calculados com dados das cinco curvas.

Equação 1 – Cálculo do limite de detecção

$$LOD = \frac{3.3 s_y}{Avg_m}$$

O limite de quantificação (LOQ) foi estabelecido como o nível mais baixo da curva analítica de cada uma das substâncias estudadas. Para validar o uso dessa concentração como LOQ foram processadas três amostras fortificadas

com os analitos na concentração de interesse em três dias diferentes, totalizando nove amostras.

4.2.3.5 *Recuperação*

A avaliação da recuperação dos analitos pelo procedimento de MEPS foi feita pela comparação da média das áreas das amostras controle de qualidade nas concentrações baixa e alta, com amostras de sangue total branco (isenta de benzodiazepínicos) extraídas e adicionadas de padrões nas concentrações correspondentes (n=6).

4.2.3.6 *Efeito matriz*

A abordagem quantitativa foi escolhida para a avaliação do efeito matriz. Para isso foi feita a comparação das áreas dos padrões analíticos em duas situações:

- Soluções aquosas nas concentrações baixa (15 ng.mL^{-1}) e alta (400 ng.mL^{-1})
- Amostras branco processadas por MEPS às quais os padrões foram posteriormente adicionados de maneira a se obter as mesmas concentrações baixa (15 ng.mL^{-1}) e alta (400 ng.mL^{-1})

O critério de aceitação desse ensaio é efeito matriz $<25\%$ com coeficiente de variação $<15\%$.

4.2.3.7 Efeito residual

O efeito residual (*carryover*) é o aparecimento de sinal de algum dos analitos causado por contaminação proveniente de amostras analisadas anteriormente. Esse efeito foi avaliado com a extração de uma amostra branco logo após a extração do calibrador mais alto em cada uma das curvas analíticas executadas. O SWGTOX sugere que o sinal dos analitos no estudo de *carryover* não exceda 10% do sinal do calibrador mais baixo.

4.2.3.8 Integridade de diluição e estabilidade

Estudos de integridade de diluição e estabilidade de amostra são considerados parâmetros adicionais da validação.

O ensaio de integridade de diluição foi realizado, pois tendo em vista a aplicação do método a resultados tóxicos é possível que surjam amostras com concentrações acima do limite superior de quantificação validado. Para isso, foram adicionados padrões analíticos a uma matriz de sangue total *post mortem* isenta de benzodiazepínicos de maneira a se obter uma amostra simulada de concentração 1000 ng.mL^{-1} de cada um dos benzodiazepínicos estudados. Essa amostra foi diluída com sangue total branco nas proporções 1:5 e 1:10 em triplicata. Esse ensaio foi repetido em cinco dias diferentes de análise.

O ensaio de estabilidade das amostras processadas se fez necessário para garantir os resultados de corridas cromatográficas *overnight*. A estabilidade foi avaliada em 6 amostras de controle de qualidade de nível baixo (15 ng.mL^{-1}) e em 6 amostras de controle de qualidade de nível alto (400 ng.mL^{-1}), que foram quantificadas em dois momentos diferentes: imediatamente após a extração e 24h após o preparo (armazenamento no amostrador do cromatógrafo, a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$). O critério de aceitação do ensaio foi um coeficiente de variação de $\pm 20\%$ na área absoluta de cada um dos analitos. Nesse ensaio foram utilizadas áreas

absolutas para avaliar também a estabilidade pós-processamento do padrão interno.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 MÉTODO CROMATOGRÁFICO

A otimização das variáveis do método analítico exige um desenho experimental cuidadoso, que estabeleça os experimentos a serem realizados de forma sistemática. A interpretação dos dados provenientes da variação de condições do método pode ser complexa, principalmente para análises simultâneas de múltiplas substâncias. Por essa razão o uso de simulação computacional tem se tornado cada vez mais comum em cromatografia (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2011).

Um dos *softwares* disponíveis para otimização de métodos cromatográficos é o *Drylab*[®] (LC Resources Inc., Lafayette, CA, EUA).

Para garantir o pleno funcionamento do sistema cromatográfico, previamente foram realizados testes de desempenho e a determinação de volume morto do sistema.

Um dos recursos do software *Drylab*[®] é a otimização do tempo de gradiente (*tG*) de um método. Para isso, são necessárias duas corridas experimentais de calibração, as quais fornecem os dados para a simulação computacional. Essas corridas devem ser realizadas utilizando uma mesma composição de fase móvel, coluna cromatográfica, temperatura de forno de coluna e vazão fixas. O gradiente, por sua vez, deve linear e amplo. Neste modelo de otimização a única variável é o *tG*.

As condições cromatográficas da otimização foram: coluna Atlantis[®] T3 (termostatizada a 40°C), fase móvel foi composta por (A) formiato de amônio 2 mmol.L⁻¹ e 0,1% de ácido fórmico em água, e (B) formiato de amônio 2 mmol.L⁻¹ e 0,1% de ácido fórmico em metanol. A vazão de fase móvel utilizada foi 0,350 mL.min⁻¹. Os gradientes (20 – 100 %B) estudados estão descritos nas Tabelas 8 e 9. Foram avaliados dois gradientes amplos, com 30 e 60 min de corrida.

Tabela 8 – Gradiente de calibração 1 ($t_G = 30$ min)

Tempo (min)	% B
0,00	20,00
30,00	100,00
30,01	20,00
40,00	Final

Tabela 9 – Gradiente de calibração 2 ($t_G = 60$ min)

Tempo (min)	% B
0,00	20,00
60,00	100,00
60,01	20,00
70,00	Final

O *software* solicita informações do cromatógrafo (volume morto do sistema e vazão de fase móvel), informações da coluna cromatográfica utilizada (comprimento, diâmetro e tamanho de partícula) e informações sobre a constituição da fase móvel (pH e solvente orgânico utilizado, por exemplo). Com esses dados, diversos modelos de simulação baseados em dados empíricos e teóricos são gerados. A Equação 2 é uma das que melhor ilustra a simulação que o *software* realiza em casos de otimização de tempo de gradiente para cromatografia em fase reversa. Nessa equação existe uma relação quantitativa entre o fator de retenção (k) e a %B na fase móvel ($\Phi = 0,01\%B$), onde B é o solvente orgânico.

Equação 2 – Fator de retenção (k) de um dado analito em função da %B

$$\log k = \log k_w - S\phi$$

Os dados com informações sobre o cromatógrafo e os tempos de gradiente são utilizados pelo *software* para calcular os valores de S e k_w . Em seguida, utilizando a Equação 2 são calculados valores de k para qualquer %B (ou tempo de gradiente) (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2011). Ou seja, a partir desses dados experimentais o *software* é capaz de simular diferentes gradientes de modo que a melhor resolução cromatográfica possível, dadas as condições de análise estabelecidas, seja obtida.

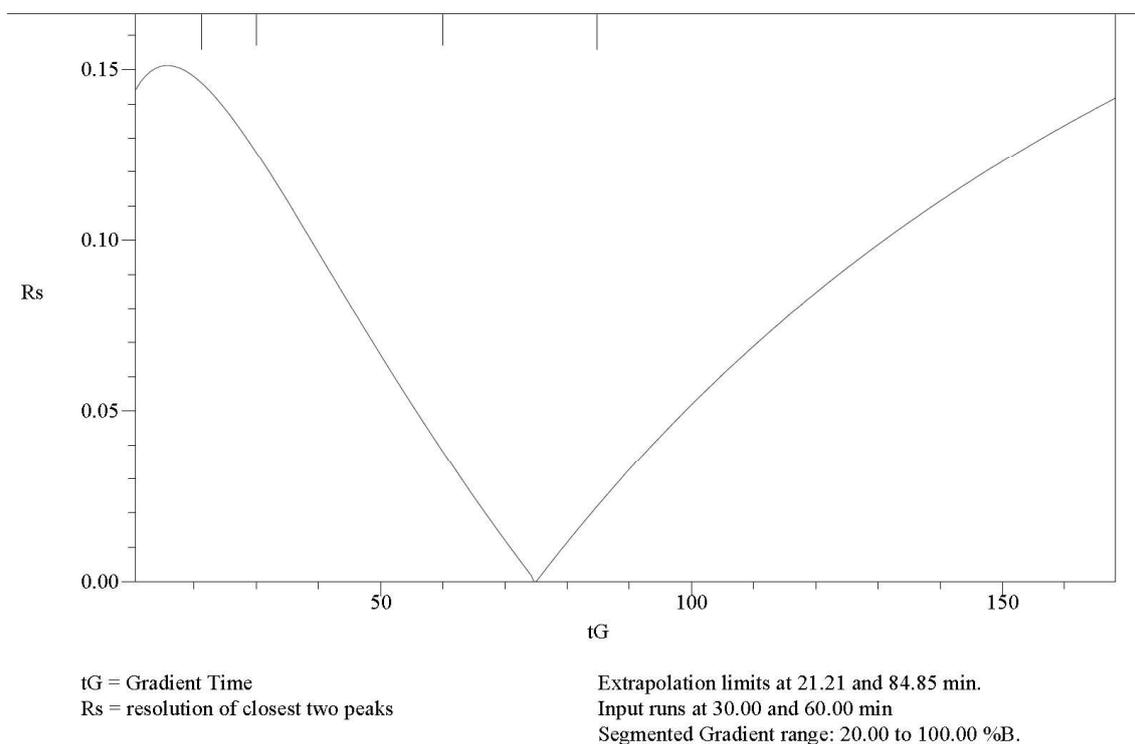
A Tabela 10 apresenta os tempos de retenção obtidos para cada um dos analitos nas duas condições de análise propostas para a realização da otimização computacional do método cromatográfico. Esses tempos foram utilizados como dados de entrada no *Drylab*[®].

Tabela 10 – Tempos de retenção experimentais utilizados como dados de entrada no *Drylab*[®]

Analito	$t_G = 30$ min	$t_G = 60$ min
7-aminoflunitrazepam	11,66	15,24
clonazepam	18,71	28,95
bromazepam	18,73	28,95
flunitrazepam	19,00	29,50
alprazolam	20,14	31,76
nordiazepam	21,69	34,45
diazepam	22,53	36,26

Considerando o par-crítico formado pelo clonazepam e bromazepam, o *software* gerou um mapa de resolução (Figura 8), onde é possível observar máxima resolução entre esse par de analitos em aproximadamente 20 minutos de corrida cromatográfica.

Figura 8 – Mapa de resolução para o par-crítico clonazepam e bromazepam



Considerando o mapa de resolução do par-crítico apresentado acima e a necessidade de métodos de análise rápidos para suprir a demanda dos laboratórios de toxicologia forense, o tempo de gradiente foi limitado no *software* a 10 minutos. O gradiente cromatográfico linear escolhido para a execução das etapas seguintes do trabalho está apresentado na Tabela 11. O gradiente do método foi de 20 a 100 %B em 10 minutos, permanecendo nesta condição por 2,5 minutos.

Tabela 11 – Método otimizado ($tG = 10$ min)

Tempo (min)	% B (metanol)
0,00	20,00
10,00	100,00
12,50	20,00
17,50	Final

A Tabela 12 apresenta os parâmetros que o Drylab® utilizou para a otimização.

Tabela 12 – Parâmetros internos no Drylab®

Analito	S	log k_w	log k
7-aminoflunitrazepam	3,32	1,81	1,15
clonazepam	3,82	2,74	1,98
bromazepam	3,79	2,73	1,97
flunitrazepam	3,81	2,76	2,00
alprazolam	3,83	2,89	2,13
nordiazepam	3,58	2,90	2,19
diazepam	3,68	3,05	2,31

S: fator força peso

k: fator de retenção

k_w : fator de retenção para fase móvel composta por água pura

Os resultados da verificação experimental do método desenvolvido por simulação computacional estão na Tabela 13. Todos os analitos eluem entre 7 e 11 min de corrida e os fatores de retenção encontrados são adequados para um método de eluição em gradiente ($0,5 \leq k \leq 20$), principalmente se levarmos em conta que foi estabelecido um tempo máximo de corrida. Quanto à resolução cromatográfica (R_s), considera-se que todos os analitos que tenham valores de $R_s \geq 1,5$ estão separados em linha de base. Portanto, pode-se observar que alguns analitos coeluem por volta de 9,6 min de corrida. A resolução do par-crítico formado pelo clonazepam e bromazepam foi ligeiramente prejudicada ($R_s < 0,15$). Pode-se observar também que, o flunitrazepam passou a coeluir com o bromazepam e o clonazepam.

Também é possível observar que o erro associado às medidas de tempo de retenção (TR) foi de aproximadamente 0,3 min para todos os analitos, o que está de acordo com dados da literatura para métodos desenvolvidos por simulação computacional (DOLAN et al., 1999; HABER et al., 2000).

Tabela 13 – Tempos de retenção teóricos e experimentais obtidos na condição cromatográfica otimizada

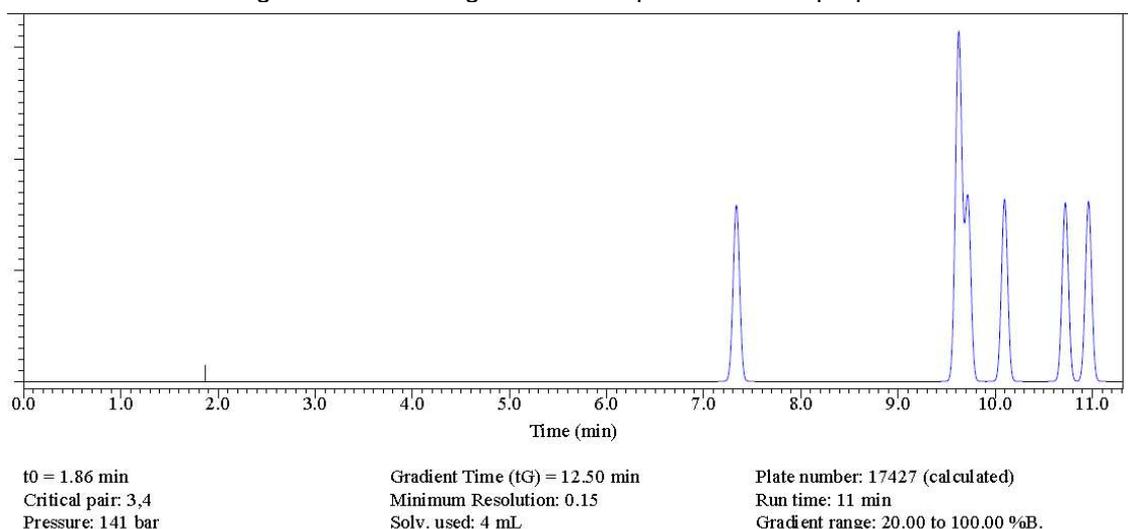
Analito	TR teórico (min)	k	Rs teórica	TR experimental (min)	Erro (min)
7-aminoflunitrazepam	7,34	1,7	18	7,65	0,31
clonazepam	9,62	1,5	0,15	9,92	0,30
bromazepam	9,63	1,5	0,69	9,92	0,29
flunitrazepam	9,72	1,5	3,0	10,02	0,30
alprazolam	10,1	1,5	5,0	10,45	0,35
nordiazepam	10,72	1,6	1,9	10,99	0,27
diazepam	10,96	1,6	-	11,24	0,28

k: fator de retenção

Rs: resolução cromatográfica

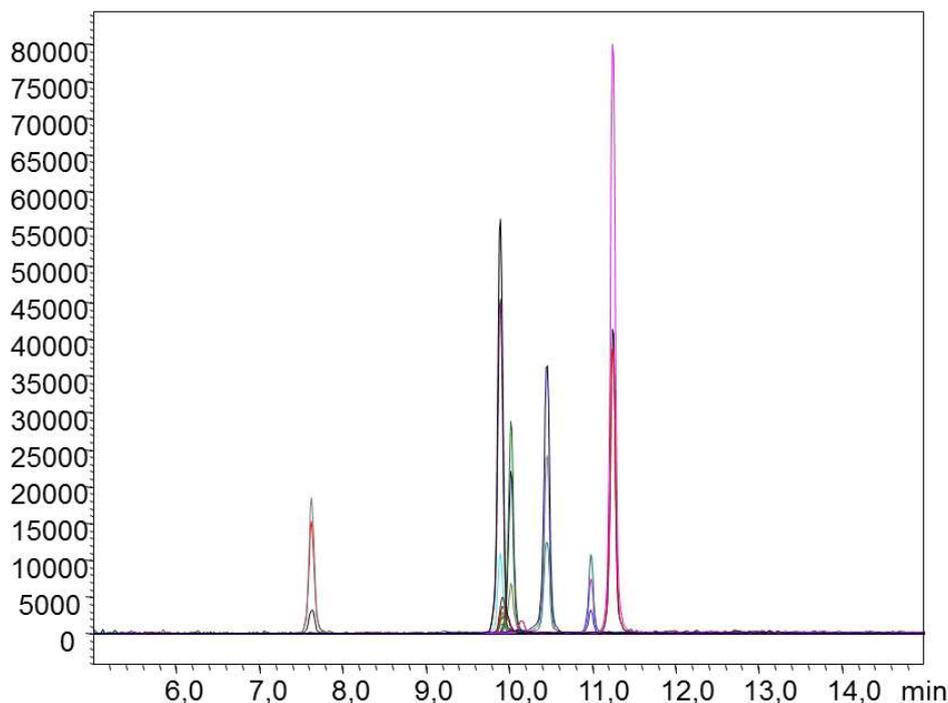
A Figura 9 apresenta o cromatograma teórico gerado pelo software para o método com o tempo de gradiente otimizado. Pode-se observar as coeluições entre 9 e 10 min.

Figura 9 – Cromatograma teórico para o método proposto



O cromatograma experimental está apresentado na Figura 10. Também é possível notar as mesmas coeluições, porém, tendo em vista que o método de detecção proposto é a espectrometria de massas *in tandem*, não foi necessária resolução cromatográfica completa dessas substâncias.

Figura 10 – Cromatograma experimental do método proposto



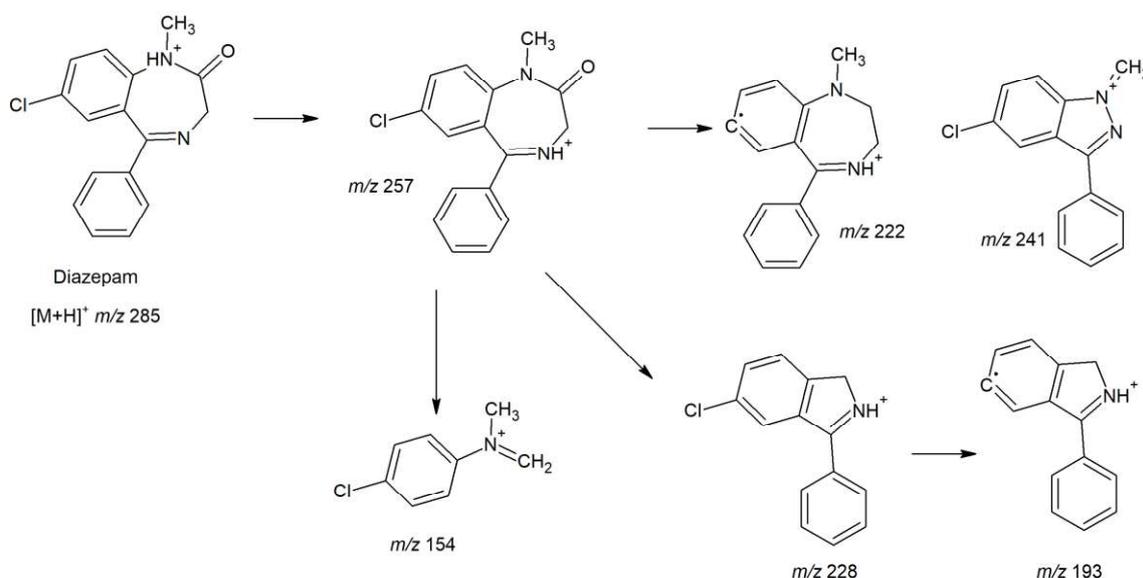
De acordo com Maurer (2006), tendo em vista uma maior seletividade do método, deve-se monitorar pelo menos duas transições SRM de cada uma das substâncias de interesse. Os critérios de identificação do analito são: o tempo de retenção, a presença e a abundância dos íons monitorados, e a razão da abundância desses íons (MAURER, 2006).

A fragmentação MS-MS dos benzodiazepínicos não segue um padrão para todas as moléculas da classe. Para demonstrar alguns dos mecanismos de que precisam ser considerados para a análises desses fármacos, seguem os exemplos de fragmentação do diazepam, nordiazepam, flunitrazepam e alprazolam.

A fragmentação do diazepam ($[M+H]^+$, m/z 285) ocorre pela perda de 28 Da (CO), transformando o anel diazepínico em um íon de m/z 257. Em

seguida, pode ocorrer tanto a perda de 35 Da (Cl^\bullet), formando um íon de m/z 222, quanto a perda de 29 Da ($\text{H}_2\text{C}=\text{NH}$), formando um íon de m/z 228. Caso seja formado m/z 228, este então perde 35 Da (Cl^\bullet), formando o íon de m/z 193 (Figura 11). Um fragmento de m/z 154 também pode ser observado em alguns casos (NIESSSEN, W. M., 2011).

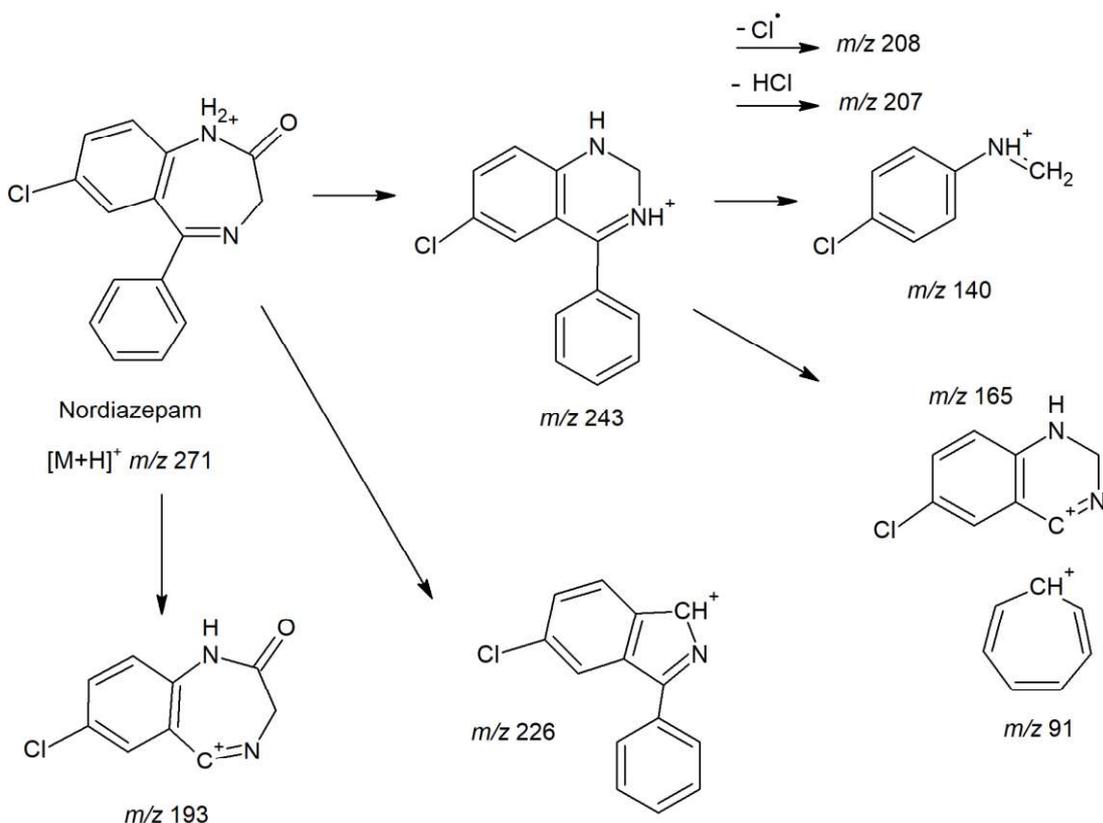
Figura 11 – Fragmentação MS-MS do Diazepam



Fonte: adaptado de NIESSSEN, W. M. A.; CORREA C. (2017)

No caso do nordiazepam ($[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 271), inicialmente também pode ocorrer a perda de 28 Da (CO), formando o íon de m/z 243. Outro mecanismo possível é a perda de formamida (HCONH_2) promovendo a formação do íon m/z 226. E ainda pode ocorrer uma perda de benzeno (C_6H_6), levando à formação do íon m/z 193. A partir do íon m/z 243, são propostas fragmentações secundárias que levam a formação de m/z 208, 207, 165 e 140. A Figura 12 representa a formação dos íons produto a partir da fragmentação do nordiazepam protonado.

Figura 12 – Fragmentação MS-MS do nordiazepam



Fonte: adaptado de NIESSSEN, W. M. A.; CORREA C (2017)

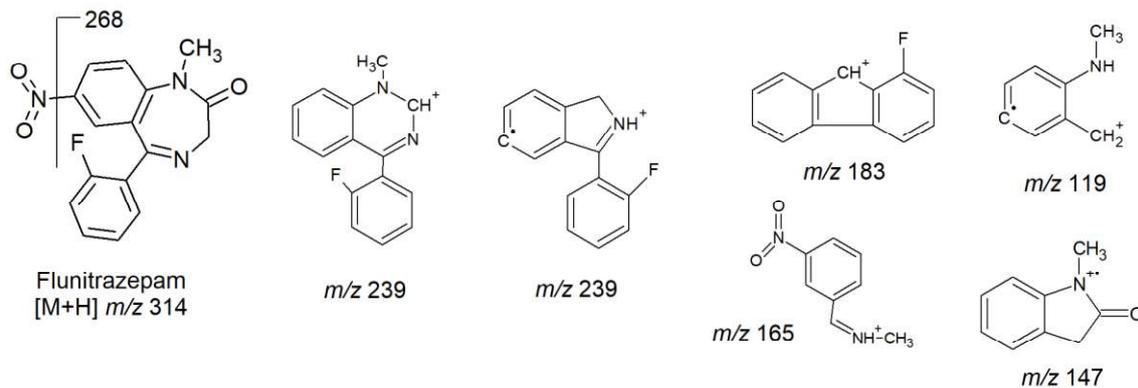
A fragmentação do flunitrazepam ($[M+H]^+$, m/z 314) ocorre pela perda de 46 Da (NO_2^\bullet), seguida pela perda de 29 Da (HCO^\bullet) conforme a Figura 11. Íons adicionais podem se formar em espectrômetros do tipo triploquadrupolo, no caso do flunitrazepam, são eles: m/z 211, 119, 147, 165 e 183 (NIESSSEN, W. M., 2011).

No caso do alprazolam ($[M+H]^+$, m/z 309), o mecanismo de fragmentação ainda não está completamente esclarecido e descrito na literatura (NIESSSEN, W. M., 2011). Uma das propostas está na Figura 12.

Para o clonazepam, bromazepam e 7-aminoflunitrazepam também foram monitorados fragmentos relevantes citados na literatura (KINTZ et al., 2005; ANZILLOTTI; ODOARDI; STRANO-ROSSI, 2014).

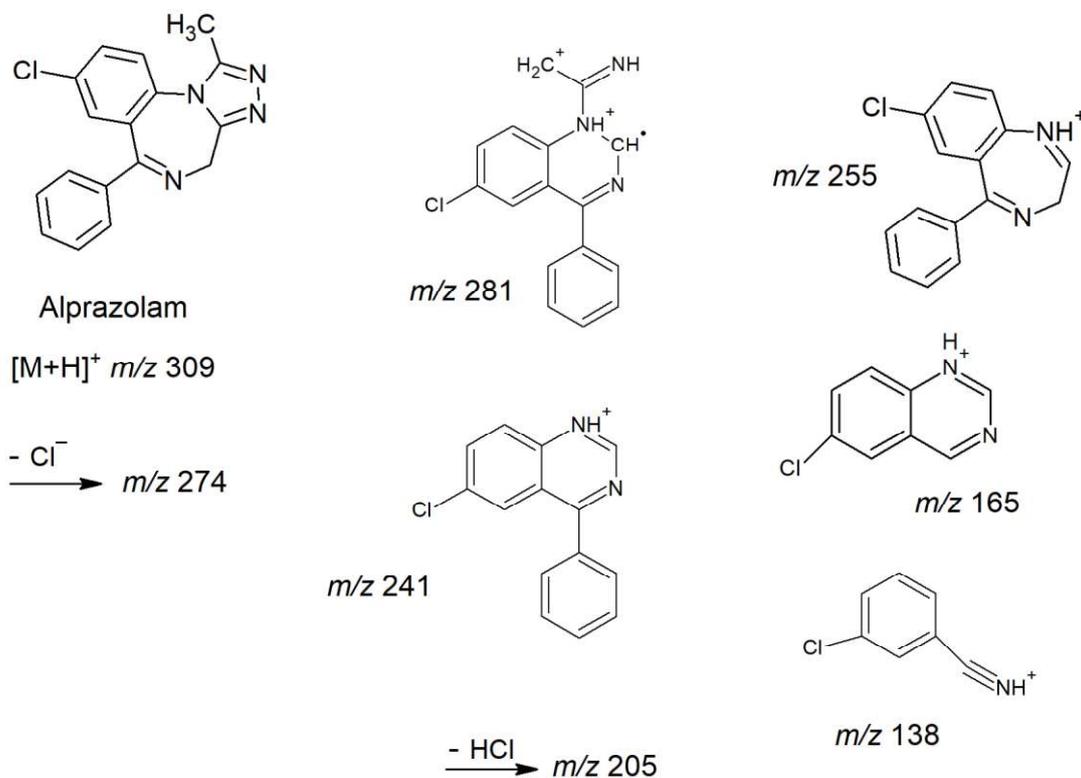
Na Figura 15 estão ilustrados todos os benzodiazepínicos estudados com suas respectivas transições monitoradas.

Figura 13 – Fragmentação MS-MS do flunitrazepam



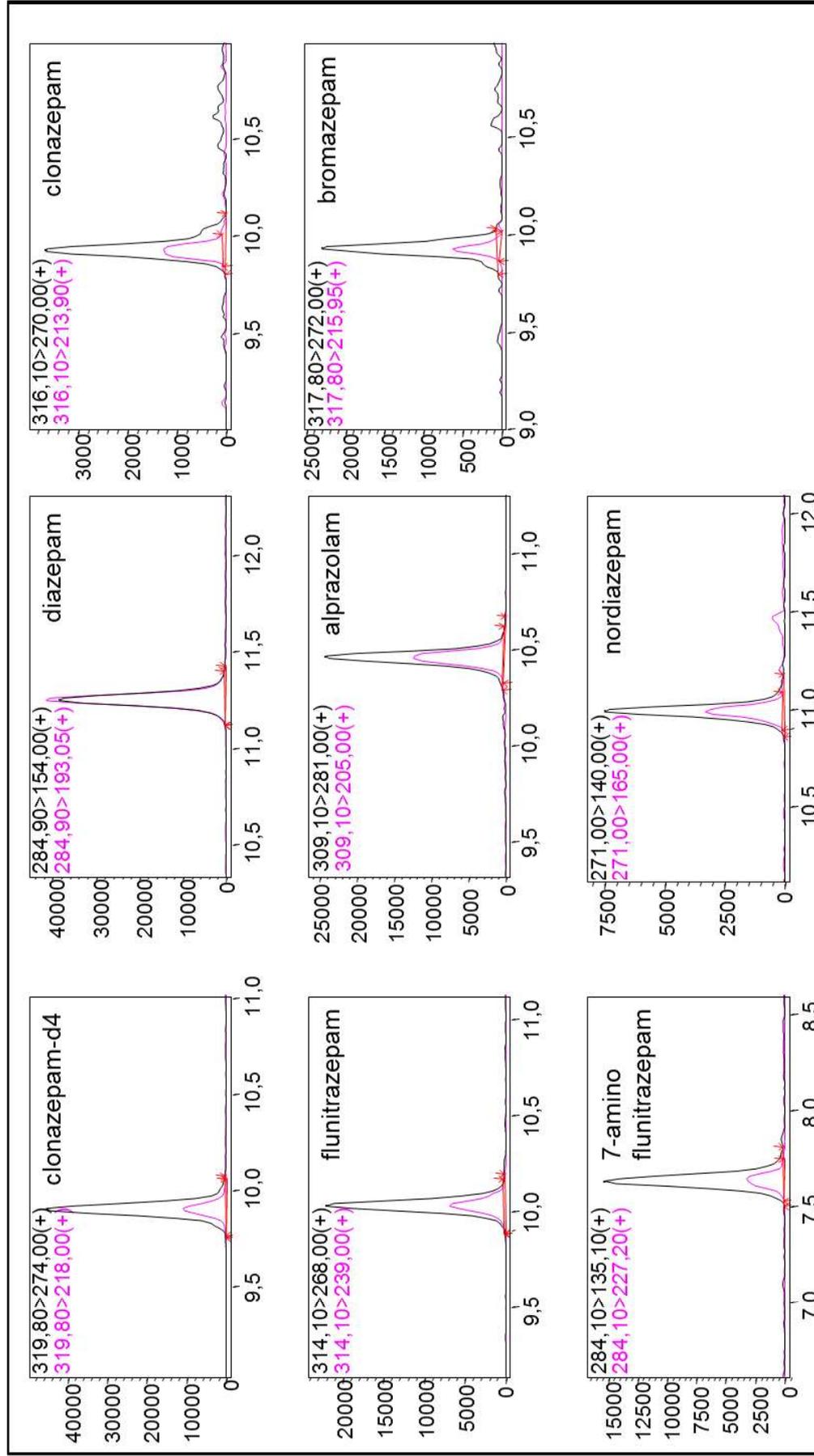
Fonte: adaptado de NIESEN, W. M. (2011)

Figura 14 – Fragmentação MS-MS do alprazolam



Fonte: retirado de NIESEN, W. M. A.; CORREA C (2017)

Figura 15 – Cromatogramas das substâncias estudadas com as respectivas transições monitoradas



5.2 PARÂMETROS OTIMIZADOS DE MEPS

O início do desenvolvimento analítico se deu pela análise de soluções aquosas contendo os analitos de interesse. Após esta etapa de familiarização com a técnica passou a ser usada amostra branco de sangue total humano *post mortem*.

A fase extratora escolhida foi a C18. Antes do primeiro uso dos BINs, os cartuchos foram lavados com 100 µL de metanol e, em seguida, com água. O condicionamento foi feito a cada reutilização do BIN com 50 µL de metanol e 150 µL de água.

Com o objetivo de reduzir a viscosidade das amostras, evitando assim o entupimento do BIN de extração, as amostras foram diluídas dez vezes com água contendo clonazepam-D₄ (padrão interno), conforme apresentado no Fluxograma 1.

Após centrifugação (14208 g, 5 min), as etapas de otimização de MEPS foram realizadas com 200 µL do sobrenadante. Não foi necessário ajuste de pH devido às características físico-químicas dos analitos (Tabela 14). Todos os analitos se encontram em sua forma molecular no pH de trabalho.

Tabela 14 – Propriedades físico-químicas dos analitos

Analito	Log P	pKa (1)	pKa (2)
Clonazepam ^a	2,41	1,50	10,50
Flunitrazepam ^b	2,06	1,70	-
Alprazolam ^b	2,12	5,08	18,30
Bromazepam ^b	2,05	2,68	12,24
Diazepam ^b	2,82	3,40	-
7-aminoflunitrazepam ^c	1,30	3,32	-
Nordiazepam ^c	3,21	2,85	12,30

Fonte: ^a <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>, ^b www.drugbank.ca, ^c <http://www.hmdb.ca>.

Acesso em 14 de maio de 2018.

Para verificar a adequação das condições de extração propostas pela literatura (ABDEL-REHIM, 2011) de MEPS para o caso específico dos benzodiazepínicos foi feita otimização por planejamento fatorial com quatro variáveis em dois níveis (2^4). Os parâmetros avaliados estão na Tabela 15 a seguir. Foram realizadas 16 análises, todas com amostra de sangue total branco *post mortem* adicionado dos benzodiazepínicos de interesse (na concentração de 100 ng.mL⁻¹) e padrão interno (14,4 ng.mL⁻¹).

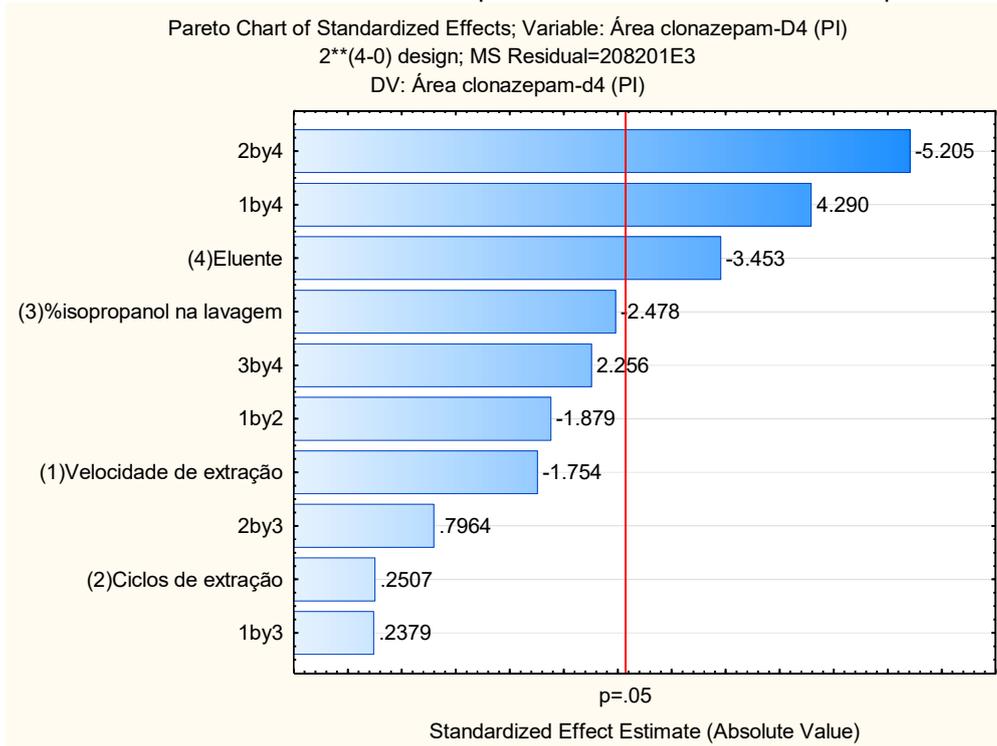
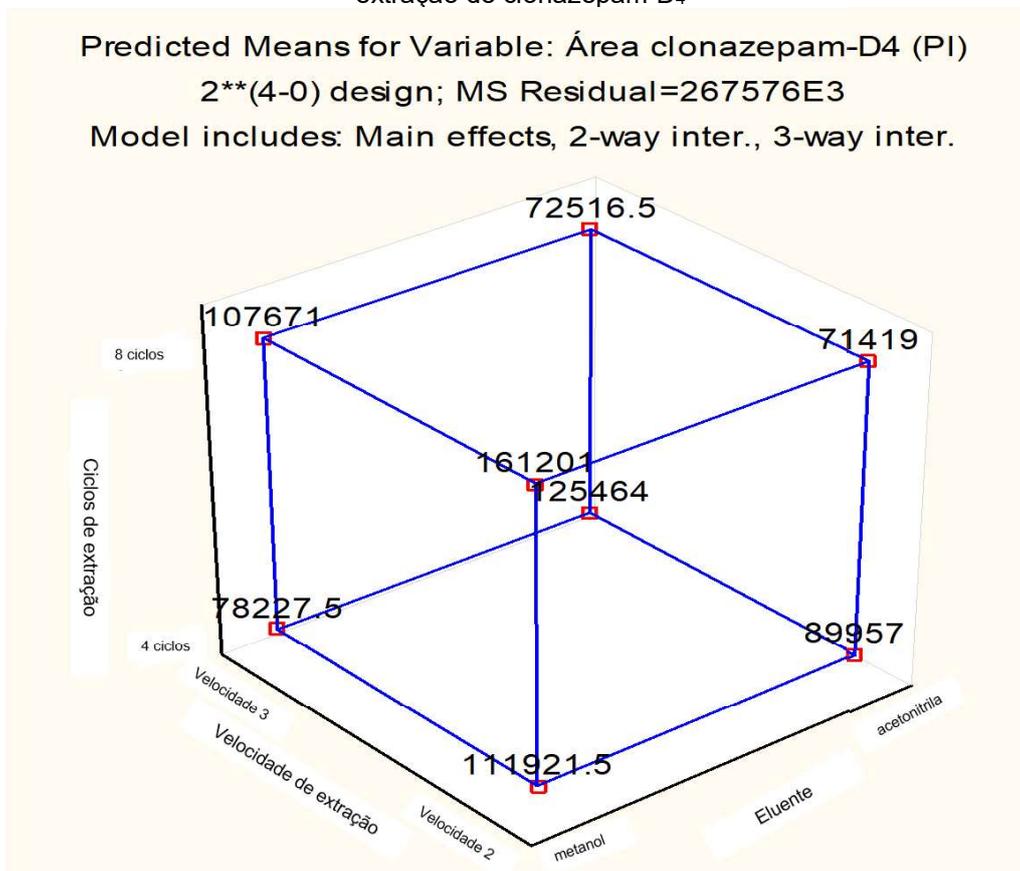
Tabela 15 – Planejamento fatorial da otimização dos parâmetros de MEPS

Parâmetro	Baixo (-1)	Alto (+1)
Velocidade de extração	3,57 $\mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$	8,33 $\mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$
Ciclos de extração	4	8
% isopropanol na lavagem do cartucho	5	15
Eluente	0,1% NH_4OH em metanol	0,1% NH_4OH em acetonitrila

O desenho experimental e o tratamento dos dados de área obtidos foram feitos com auxílio do software *Statistica* 12 (Tulsa, OK, EUA). Dados de área absoluta foram utilizados para os cálculos referentes ao padrão interno. Já para os outros analitos, foram utilizados dados de área relativa. A análise dos dados foi feita por ANOVA ($p=0,05$). Gráficos de Pareto foram usados para facilitar a visualização os efeitos estatisticamente significativos para cada um dos analitos.

Os resultados da otimização da extração foram significativos apenas para o padrão interno (Gráfico 6) e 7-aminoflunitrazepam (Gráfico 8).

Para o clonazepam-D₄ a interação entre os efeitos de ciclos de extração e eluente foi a que mais influenciou a extração dessa substância do BIN. A interação entre a velocidade de extração e a composição do eluente também foi significativa, assim como a composição do eluente isolada. A extração desse analito (considerando a área absoluta como fator de resposta) foi favorecida por um maior número de ciclos de extração (8 ciclos), com menor velocidade de aspiração e ejeção da amostra (3,57 $\mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$), utilizando metanol na composição do eluente (Gráfico 7).

Gráfico 6 – Gráfico de Pareto obtido pela análise das áreas de clonazepam-D₄Gráfico 7 - Representação do efeito de interação entre os três fatores significativos para a extração de clonazepam-D₄

Já para o 7-aminoflunitrazepam os fatores que influenciaram a extração foram o eluente e a quantidade de isopropanol para lavagem do BIN (Gráfico 8).

Como é possível observar na Gráfico 9, utilizando metanol como eluente, as áreas de 7-aminoflunitrazepam são maiores caso a proporção de isopropanol na solução de lavagem seja de 5%. Em contrapartida, utilizando acetonitrila como eluente, a extração desse analito é favorecida com 15% de isopropanol na solução de lavagem.

Sendo assim, considerando que o clonazepam-D₄ apresentou melhores resultados utilizando metanol como eluente. E que, no caso do 7-aminoflunitrazepam as respostas foram muito próximas com ambos os solventes, desde que respeitadas as devidas proporções de isopropanol na lavagem. Estabeleceu-se a lavagem do cartucho antes da eluição dos analitos com 100 µL de uma mistura de água e isopropanol (95:5 v/v) para posterior eluição com metanol alcalinizado (0,1% de hidróxido de amônio).

Gráfico 8 – Gráfico de Pareto obtido pela análise das áreas relativas de 7-aminoflunitrazepam

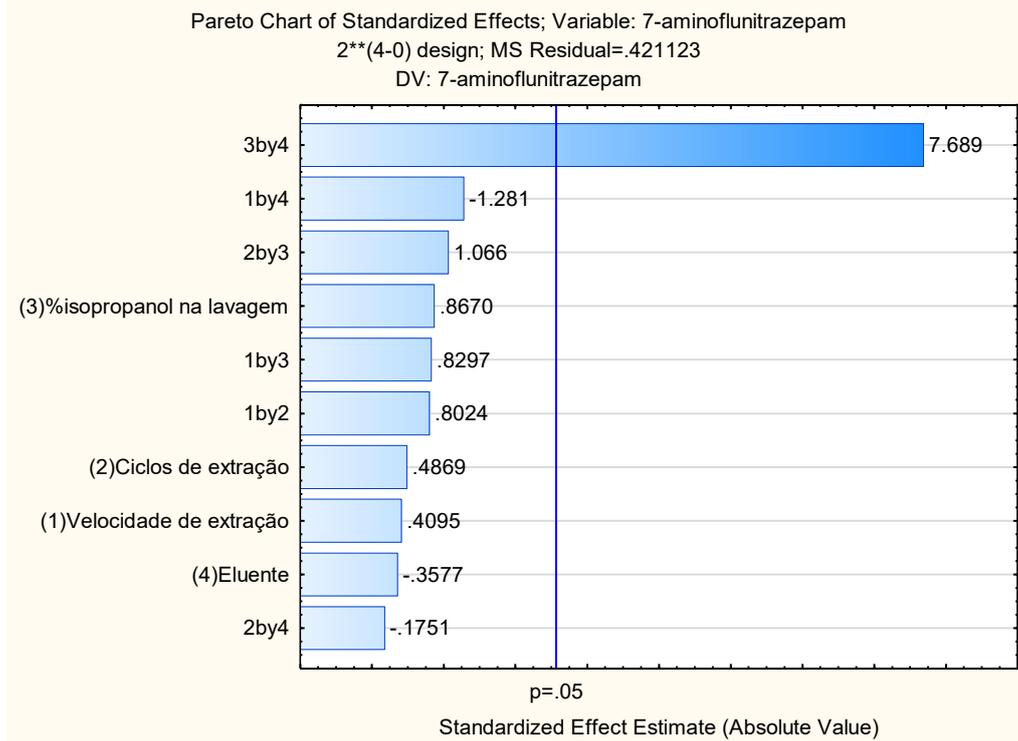
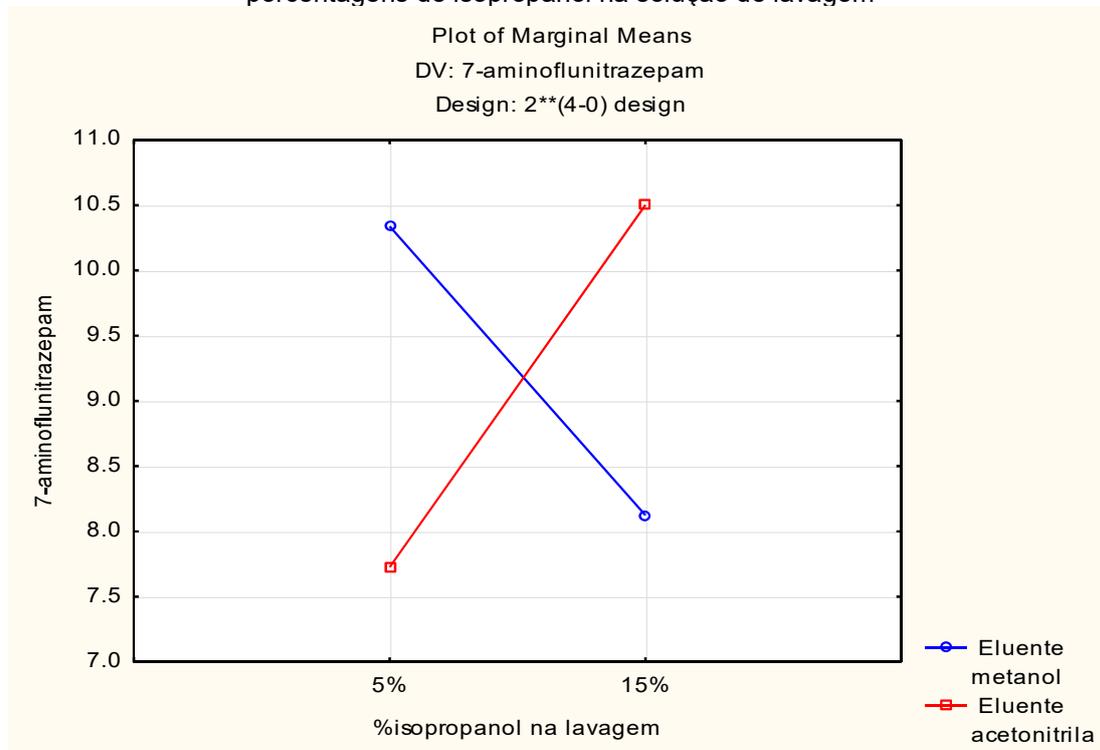


Gráfico 9 – Médias marginais das áreas relativas de 7-aminoflunitrazepam com diferentes porcentagens de isopropanol na solução de lavagem



A partir dos resultados do experimento ficou determinada a eluição com 50 μL de metanol alcalinizado com 0,1% de hidróxido de amônio, porém, foi adicionado ao eluato mais 50 μL de água para melhorar o formato dos picos cromatográficos.

Por fim, a limpeza do cartucho foi feita com 200 μL de 0,2% hidróxido de amônio em metanol e acetonitrila (1:1 v/v) e 200 μL de solução água e metanol (95:5 v/v).

Os fluxogramas do protocolo otimizado para o preparo de amostras de sangue total *post mortem* para a análise de fármacos benzodiazepínicos por MEPS estão apresentados na seção “Materiais e Métodos”.

O Fluxograma 1 descreve a etapa de diluição da amostra para redução da viscosidade da matriz. O Fluxograma 2 descreve o protocolo de extração, que é composto pelas etapas de condicionamento do cartucho, inserção da amostra, eliminação dos interferentes da matriz, eluição dos analitos de interesse e limpeza do sistema para o preparo de uma nova amostra.

5.3 VALIDAÇÃO

A partir dos parâmetros otimizados de extração foi realizada a validação analítica do método proposto.

A seletividade foi avaliada pela análise de amostras de sangue branco. Nenhuma amostra apresentou substâncias com identificação cruzada com os analitos de interesse. Tendo em vista ampliar a seletividade do método, foram monitoradas duas transições SRM de cada uma das substâncias de interesse (MAURER, 2006). Os critérios de identificação dos analito foram: o tempo de retenção, a presença e a abundância dos íons monitorados e a razão da abundância desses íons.

O modelo de calibração de cada um dos analitos foi avaliado quanto a distribuição das variâncias em cada nível de calibração (teste de Fisher) para verificar a ocorrência heterocedasticidade (Tabela 16). Considera-se que ocorre heterocedasticidade para todos os analito cujo valor de $F_{\text{calculado}}$ apresente valor superior ao F_{tabelado} . Sendo assim, todos os analito estudados apresentaram comportamento heteroscedástico, ou seja, distribuição desigual da variância ao longo da curva analítica. Por isso as curvas analíticas foram construídas pelo método dos mínimos quadrados ponderados (MMQP) utilizando os seguintes fatores de ponderação: diazepam ($1/x^2$), clonazepam ($1/x^2$), flunitrazepam ($1/x$), alprazolam ($1/x$), bromazepam ($1/x^2$), 7-aminoflunitrazepam ($1/x^2$), nordiazepam ($1/x$) (ALMEIDA; CASTEL-BRANCO; FALCAO, 2002). As médias de inclinação, intercepto e coeficiente de determinação (r^2) das curvas estão apresentadas na Tabela 17.

Tabela 16 – Avaliação da distribuição da variância para as curvas de calibração

Analito	F_{calculado}	p-valor	Fator de ponderação escolhido
Diazepam	3961	$6,80 \times 10^{-6}$	$1/x^2$
Clonazepam	1822	$1,00 \times 10^{-6}$	$1/x^2$
Flunitrazepam	13899	$7,19 \times 10^{-5}$	$1/x$
Alprazolam	10609	$9,42 \times 10^{-5}$	$1/x$
Bromazepam	7944	$1,26 \times 10^{-4}$	$1/x^2$
7-Aminoflunitrazepam	6074	$1,65 \times 10^{-4}$	$1/x^2$
Nordiazepam	39657	$2,52 \times 10^{-5}$	$1/x$

F: teste de Fisher ($F_{\text{tabelado}} = 6,388$); $\alpha = 0,05$

Os LOD e LOQ obtidos tornam a metodologia adequada para a quantificação de amostras desde as concentrações terapêuticas até níveis tóxicos desses fármacos (Tabela 17). Apesar das concentrações terapêuticas e tóxicas de diazepam e nordiazepam poderem ultrapassar o limite superior de quantificação do método (Tabela 1), verificou-se no ensaio de integridade de diluição que essas amostras podem ser diluídas até 10 vezes sem comprometer a precisão e a exatidão dos resultados.

Tabela 17 – Limites de detecção (LOD), quantificação (LOQ) e curvas de calibração

Analito	LOD (ng.mL ⁻¹)	LOQ (ng.mL ⁻¹)	Linearidade (ng.mL ⁻¹)	Inclinação	Intercepto	r ²
Diazepam	1	5	5 – 500	0,068 ± 0,030	0,0462 ± 0,0265	0,9896
Clonazepam	5	5	5 – 500	0,0088 ± 0,0025	-0,0095 ± 0,0145	0,996
Flunitrazepam	2	5	5 – 500	0,035 ± 0,021	0,0251 ± 0,0218	0,998
Alprazolam	2	5	5 – 500	0,034 ± 0,022	0,0666 ± 0,0234	0,997
Bromazepam	3	10	10 – 500	0,0045 ± 0,0011	-0,0050 ± 0,0039	0,994
7-Aminoflunitrazepam	1	5	5 – 500	0,040 ± 0,013	0,0273 ± 0,0129	0,994
Nordiazepam	5	5	5 – 500	0,0122 ± 0,0044	0,0159 ± 0,0179	0,994

A avaliação da integridade de diluição foi feita a partir de uma amostra fortificada com todos os analitos na concentração de 800 ng.mL⁻¹, que foi diluída 5 e 10 vezes com sangue total branco. Foram analisadas seis replicatas para cada nível de diluição. Como pode ser observado na Tabela 18, o único analito que não apresentou resultados satisfatórios (exatidão inferior a 80%) foi o 7-aminoflunitrazepam, porém isso não compromete a determinação de resultados tóxicos já que a concentração tóxica mínima dessa substância (200 ng.mL⁻¹) está dentro da faixa linear do método.

Tabela 18 – Integridade de diluição

Analito	1:5		1:10	
	Exatidão (%)	%CV	Exatidão (%)	%CV
Alprazolam	86,4	3,2	105,0	8,0
Bromazepam	83,8	11,7	89,2	10,9
Clonazepam	94,2	2,3	101,9	9,3
Diazepam	84,8	3,3	106,8	3,9
Nordiazepam	115,5	3,0	90,8	3,8
Flunitrazepam	83,5	2,6	87,5	2,6
7-Aminoflunitrazepam	75,8	2,9	78,1	5,8

Os resultados de exatidão, precisão intra-dia e inter-dia se mantiveram dentro da especificação do SWGTOX, com variação inferior a 20% para todos os analitos estudados (Tabela 19). Na mesma tabela também são apresentados os valores de recuperação, cujos valores estão entre 51,4 e 107,5%.

Tabela 19 – Recuperação, exatidão e precisão do método

Análito	Recuperação (%)			Exatidão (%)			Precisão (%CV)					
							Intra-dia			Inter-dia		
	CQB	CQA		CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA
Diazepam	107,5	90,3		108,7	98,3	98,3	9,8	10,3	9,6	3,4	6,8	4,0
Clonazepam	51,4	51,6		103,5	90,4	98,8	4,6	5,2	3,6	5,1	1,9	1,5
Flunitrazepam	74,7	74,9		103,8	98,9	104,9	7,7	7,5	8,3	1,8	4,8	8,7
Alprazolam	81,8	73,3		108,4	100,6	100,0	5,6	7,7	10,7	5,5	4,5	3,4
Bromazepam	55,4	57,9		109,5	93,7	102,6	9,3	2,5	3,5	7,8	2,5	1,1
7-aminoflunitrazepam	72,0	55,2		106,6	101,5	101,3	7,0	6,4	9,7	6,6	5,3	8,0
Nordiazepam	73,8	74,8		98,1	99,1	102,2	10	9,3	8,1	3,5	4,3	5,6

CQB (controle de qualidade baixo – 15 ng.mL⁻¹), CQM (controle de qualidade médio – 150 ng.mL⁻¹), CQA (controle de qualidade alto – 400 ng.mL⁻¹).

Não foi observado efeito residual (*carryover*) até o limite superior de quantificação das curvas de analíticas (500 ng.mL⁻¹). Esse efeito foi avaliado pela extração de uma amostra branco imediatamente após a extração do calibrador de concentração mais alta em cada uma das curvas analíticas executadas.

As amostras processadas se mantiveram estáveis por 24h a 4°C no amostrador automático do LC-MS/MS, permitindo assim que o método proposto seja utilizado em laboratórios que realizam rotina de análises toxicológicas.

Não foi observada interferência de elementos da matriz nas análises. Os resultados do efeito matriz para o nível mais baixo ficaram entre -18 e 13%. Já para o nível mais alto, os resultados ficaram entre -17 e 14% (Tabela 20). Os coeficientes de variação também permaneceram dentro dos limites aceitáveis.

Tabela 20 – Efeito matriz

Analito	EM_{baixo} (%)	CV_{baixo} (%)	EM_{alto} (%)	CV_{alto} (%)
7-aminoflunitrazepam	-12	9,2	-14	10
Alprazolam	-17	13	-13	10
Bromazepam	-7,9	5,8	-10	7,7
Clonazepam	12	8,4	14	9,3
Clonazepam-d4 (IS)	10	6,9	14	9,3
Diazepam	4,7	3,2	8,8	5,9
Flunitrazepam	-11	8,3	-13,	9,9
Nordiazepam	-11	8,2	-16	13

EM: efeito matriz (avaliado em dois níveis de concentração)

CV: coeficiente de variação entre as replicatas analisadas

5.4 REUSO DO SORBENTE

O reuso de cartuchos de SPE é um assunto bastante discutido na área analítica. Apesar dos trabalhos internacionais muitas vezes não considerarem o custo atrelado ao desenvolvimento de métodos que utilizam esse tipo de insumo, no contexto brasileiro, os cartuchos costumam ser produtos importados, o que faz com que o custo seja relativamente alto.

Em MEPS o reuso dos BINs é inerente a técnica. A literatura prevê que um BIN possa ser reutilizado de 40 a 100 vezes. Porém, muitas vezes a limpeza do sistema somente com metanol ou acetonitrila não é suficiente. Em casos em que o BIN entope, a limpeza com solventes orgânicos não é viável, pois o solvente não consegue ser aspirado pela seringa de MEPS. Essa dificuldade de aspiração ocorre, provavelmente devido ao bloqueio do fluxo na frita de entrada do BIN.

Utilizando um protocolo de limpeza já descrito para a limpeza de cartuchos de SPE (CHEN et al., 1993), que utiliza uma solução de ácido clorídrico 1% em água ultrapura foi possível recuperar os BINS e reutilizá-los conforme previsto na literatura. Esse procedimento só foi realizado em casos de entupimento visível do BIN, impedindo o fluxo de amostra pelo sorbente. Após a limpeza com ácido, o sorbente foi condicionado conforme descrito anteriormente no Fluxograma 2.

Em média, cada um dos BINs utilizados para a realização do presente trabalho foi reutilizado 61 vezes sem comprometimento da qualidade de extração.

Considerando que o preço de um *manifold*, somado ao preço de uma bomba de vácuo, (utilizados para SPE) e do eVol[®] (utilizado para MEPS) é o mesmo e que um cartucho de SPE custe R\$ 10,17 e um BIN custe R\$ 10,39 (por análise), pode-se considerar que MEPS seja a técnica de menor custo entre as duas, pois MEPS é uma técnica miniaturizada. Ou seja, para um preparo de amostra por MEPS são gastos menores volumes de reagentes e solventes.

5.5 TEMPO DE EXTRAÇÃO POR MEPS

O tempo teórico total calculado para a realização do o protocolo de MEPS para cada amostra foi de 7,5 min. Na prática, partindo da amostra bruta e seguindo o procedimento proposto nos Fluxogramas 1 e 2, o tempo total de preparo de amostra de sangue total *post mortem* por MEPS é de de 8 min.

5.6 QUANTIFICAÇÃO DE AMOSTRAS REAIS

Foram submetidas à análise por MEPS-LC-MS/MS dez amostras reais de sangue total *post mortem* sabidamente positivas para benzodiazepínicos. Quatro amostras apresentaram resultado positivo para diazepam (5 a 71 ng.mL⁻¹), sendo que, todas elas também apresentaram o produto de biotransformação nordiazepam conforme pode ser visto na Figura 16. Em duas amostras somente o nordiazepam foi identificado e quantificado (7 a 162 ng.mL⁻¹). Duas amostras em que diazepam e nordiazepam foram quantificado apresentaram também alprazolam, porém em concentração inferior ao limite de quantificação do método.

Uma amostra apresentou resultado positivo para dois dos benzodiazepínicos pesquisados: clonazepam (141 ng.mL⁻¹) e bromazepam (164 ng.mL⁻¹) conforme apresentado na Figura 17.

Em uma amostra foi possível detectar flunitrazepam em concentração inferior ao limite de quantificação do método. E as duas amostras restantes apresentaram resultado negativo para as substâncias pesquisadas por este trabalho (Figura 18).

Figura 16 – Cromatograma de uma amostra positiva para diazepam e nordiazepam

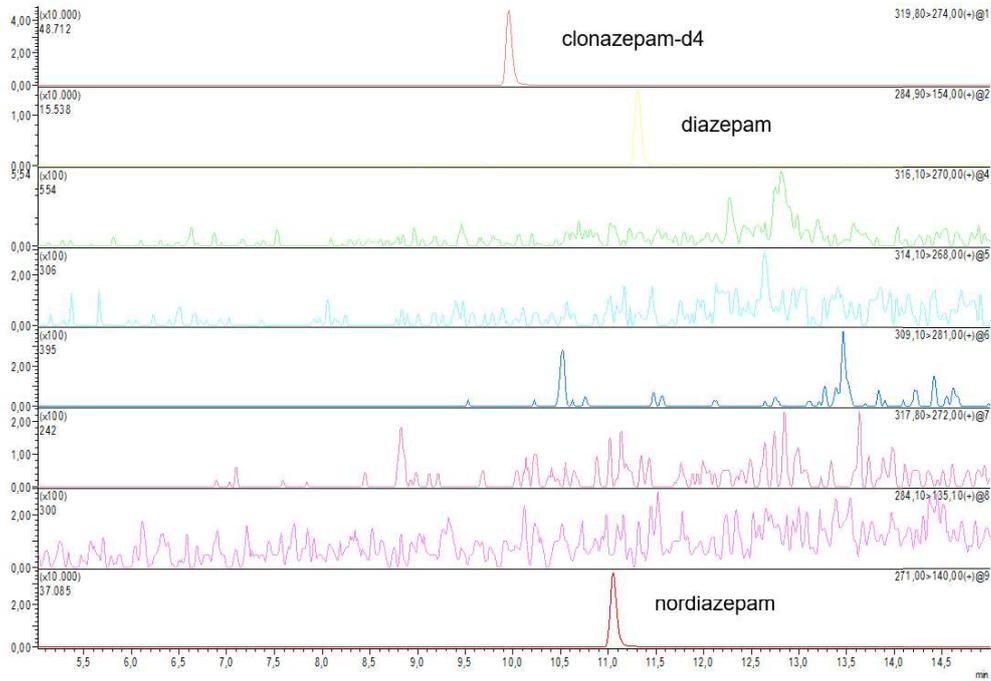


Figura 17 – Cromatograma de uma amostra positiva para clonazepam e bromazepam

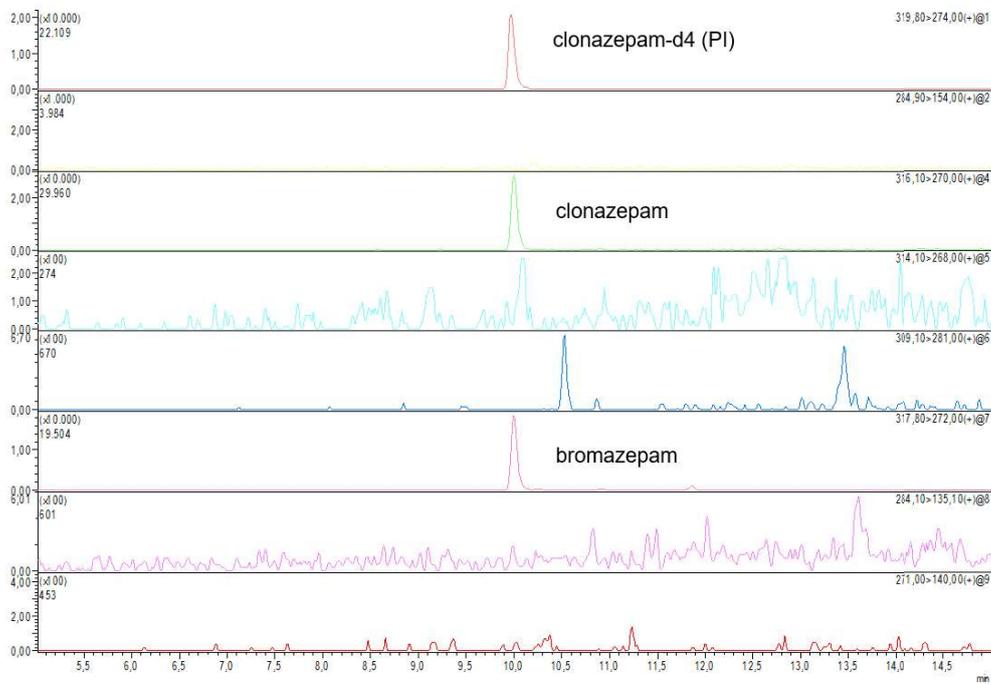
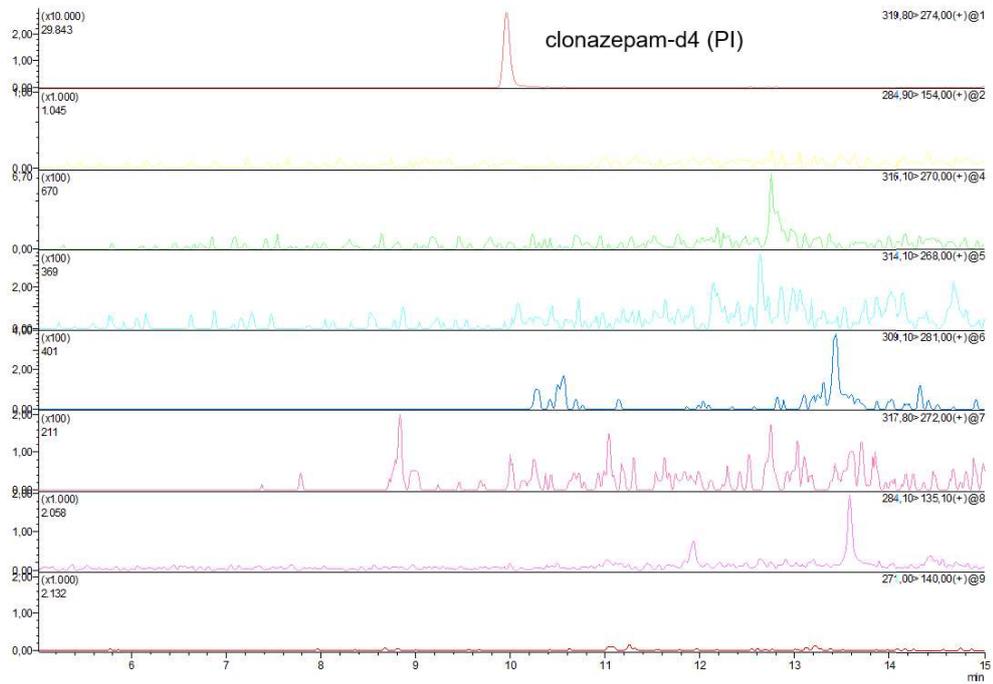


Figura 18 – Cromatograma de uma amostra negativa



A Tabela 21 traz um resumo dos resultados obtidos. Os resultados de todas as amostras que foram quantificadas estão apresentados na Tabela 22.

Tabela 21 – Resultados obtidos para as dez amostras analisadas

Analito	Amostra									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Diazepam	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
Nordiazepam	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Clonazepam	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Bromazepam	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Flunitrazepam	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7-Aminoflunitrazepam	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alprazolam	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+

Tabela 22 – Resultados das amostras quantificadas

Analito	Amostra						
	3	5	6	7	8	9	10
Diazepam (ng.mL ⁻¹)	< LOQ	57	71	< LOQ	< LOQ	23	5
Nordiazepam (ng.mL ⁻¹)	< LOQ	20	7	51	7	162	12
Clonazepam (ng.mL ⁻¹)	141	< LOQ					
Bromazepam (ng.mL ⁻¹)	164	< LOQ					

< LOQ: resultado inferior ao limite de quantificação do método

Vale ressaltar que, de acordo com o levantamento realizado com dados dos registros de óbitos do IML-SP durante o ano de 2017 outros benzodiazepínicos, além dos pesquisados pelo presente trabalho, surgiram como fármacos envolvidos em intoxicações. Sendo assim, pode-se inferir que os dois resultados negativos encontrados correspondem a amostras que contém outros benzodiazepínicos como, por exemplo, o midazolam.

Para auxiliar interpretação dos resultados obtidos em exames de sangue total, Jönsson e colaboradores (2014) estabeleceram valores de referência a partir de casos reais de intoxicações envolvendo fármacos sedativos e hipnóticos. A Tabela 23 indica os valores encontrados em casos em que os benzodiazepínicos foram relacionados a *causa mortis*, sozinhos ou em associação com outras substâncias. As análises dos óbitos relacionados ao consumo de benzodiazepínicos confirmam que esses fármacos são relativamente seguros e causam intoxicações, principalmente, quando associados a outras substâncias (SKOV et al., 2016).

O levantamento bibliográfico dos intervalos de referência de concentração de benzodiazepínicos em sangue total de casos reais de intoxicações comprova que esses são fármacos de alto índice terapêutico. Pode-se observar que a literatura relata intoxicações cujas concentrações sanguíneas de benzodiazepínicos chegam a ordem de microgramas por mililitro. Quanto a isso o método proposto também está adequado, pois a integridade de diluição está validada até a proporção 1:10. Sendo assim, o limite superior de relato de resultado é de 5000 ng.mL⁻¹. O único analito estudado o qual a literatura cita concentrações superiores a 5000 ng.mL⁻¹ é o diazepam, neste caso o resultado seria registrado como superior ao limite de quantificação do método.

Tabela 23 – Intervalo de referência de intoxicações fatais causadas por benzodiazepínicos sozinhos ou em associação com outras substâncias

Analito no sangue	Intervalo de concentração (µg.g⁻¹)	Intervalo de concentração (ng.mL⁻¹)**	Referência
Alprazolam	0,10 – 0,60	106 – 636	JÖNSSON et al. (2014)
Bromazepam	0,041 – 2,15	44 – 2279	SKOV (2016)
Clonazepam*	0,14 – 0,75	148 – 795	JÖNSSON et al. (2014)
Diazepam	1,20 – 6,00	1272 – 6360	JÖNSSON et al. (2014)
Nordiazepam	0,086 – 1,73	91 – 1884	
Flunitrazepam*	0,07 – 0,74	74 - 784	JÖNSSON et al. (2014)

*Soma da concentração do fármaco e seus produtos de biotransformação

**Valores convertidos considerando a densidade do sangue total como 1,06 g.mL⁻¹

6 CONCLUSÕES

Os protocolos desenvolvidos pelo presente estudo contaram com o auxílio de ferramentas estatísticas de desenho experimental e simulação computacional, o que é uma tendência nos laboratórios de química analítica, análises clínicas e análises toxicológicas. Essas estratégias tornam o desenvolvimento analítico direcionado às substâncias de interesse e reduzem o tempo de envolvimento do analista com as atividades de bancada, promovendo também um melhor aproveitamento dos equipamentos do laboratório.

O tempo total de preparo de amostra de sangue total *post mortem* por MEPS pelo método proposto de menos de 10 min. Apesar da proposta de extração por MEPS do trabalho ter sido uma abordagem semi-automatizada, a automação total desse mesmo procedimento pode ser implementada substituindo a agulha do injetor de cromatógrafo (líquido ou gasoso) pelo BIN de extração e programação dos ciclos de extração no *software* do equipamento.

Os limites do método proposto estão de acordo com as recomendações internacionais para métodos de análise para caracterizar direção sob efeito de benzodiazepínicos. Essa poderia ser mais uma aplicação do método proposto, ainda dentro da toxicologia forense, desde que a matriz de escolha para a análise seja sangue total.

Foram submetidas a análise por MEPS-LC-MS/MS dez amostras reais de sangue total *post mortem*. Algumas amostras apresentaram resultado positivo para diazepam e seu produto de biotransformação nordiazepam. Em outras amostras somente o nordiazepam foi identificado e quantificado. Tanto o diazepam, quanto o nordiazepam foram encontrados em concentrações que podem ser consideradas terapêuticas.

Uma das amostras reais analisadas apresentou resultados tóxicos para duas substâncias: clonazepam e bromazepam.

Apesar da matriz escolhida ser extremamente coagulada e viscosa, a diluição adequada das amostras permitiu a reutilização dos BINs tanto quanto em trabalhos com matrizes biológicas menos complexas (soro e urina).

Preconiza-se que as análises toxicológicas *post mortem* quantitativas sejam realizadas preferencialmente em sangue coletado da veia femoral. Porém, nem sempre é possível a coleta dos volumes necessários de fluido biológico (40 mL) de sítio anatômico adequado. A coleta pode ser prejudicada, por exemplo, em casos de morte causada por agente físico (fogo) e choque hipovolêmico. O estado de decomposição do cadáver também pode ser um impeditivo a coleta de sangue. Considerando que MEPS é uma técnica miniaturizada e que o método proposto necessita somente de 100 µL de sangue para a análise, espera-se que a técnica possa auxiliar futuramente em casos de coleta difícil de material biológico durante o exame necroscópico.

Julgando pelo disposto, o método de preparo de amostras por microextração por sorbente empacotado seguido de cromatografia líquida e espectrometria de massas *in tandem* (MEPS-LC-MS/MS) proposto é adequado para a análise de cinco fármacos benzodiazepínicos (alprazolam, bromazepam, clonazepam, diazepam, flunitrazepam) e seus produtos de biotransformação (7-aminoflunitrazepam e nordiazepam) em amostras sangue total *post mortem*.

Não é de conhecimento dos autores desse trabalho outras aplicações de MEPS em análises de fluidos biológicos *post mortem*, tampouco de benzodiazepínicos em sangue total *post mortem*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹⁶

ABDEL-REHIM, M. Microextraction by packed sorbent (MEPS): A tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 701, n. 2, p. 119-128, 2011.

ABDEL-REHIM, M. Microextraction by packed sorbent (MEPS): A tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 701, n. 2, p. 119-128, 2011.

ABDEL-REHIM, M. Recent advances in microextraction by packed sorbent for bioanalysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2569-2580, 2010.

ABRACIT (Associação Brasileira de Centros de Informação e Assistência Toxicológica). **Estatísticas dos Centros**. Disponível em: <<http://abracit.org.br/wp/estatisticas-dos-centos/>>. Acesso em: 25 jan. 2018.

ADAM, M. et al. Microextraction by packed sorbent (MEPS) as a suitable selective method for L-ascorbic acid determination in beverages. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1613-1618, 2012.

ALMEIDA, A. M.; CASTEL-BRANCO, M. M.; FALCAO, A. C. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. **J Chromatogr B**, v. 774, n. 2, p. 215-222, 2002.

ALMEIDA, A. M.; CASTEL-BRANCO, M. M.; FALCAO, A. C. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. **J Chromatogr B**, v. 774, n. 2, p. 215-222, 2002.

¹⁶ As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR 6023/2002 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

ALTUN, Z. **New Techniques for Sample Preparation in Analytical Chemistry**. 2005. Licentiate Thesis. Department of Chemistry, Karlstad University, Sweden.

AMARAL ALMEIDA, T. C.; COUTO, C. C.; DRUMOND CHEQUER, F. M. Perfil das intoxicações agudas ocorridas em uma cidade do centro-oeste de Minas Gerais. **Electronic Journal of Pharmacy**, vol. XIII, n. 3, p. 151-164, 2016.

AMPARO, M. R. **Desenvolvimento e validação de métodos SPE-LC-MS e MEPS-LC-MS para quantificação de fluoroquinolonas em matrizes aquosas**. 2013. Dissertação de mestrado. Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

ANDERSON, L. J.; FLYNN, A.; PILGRIM, J. L. A global epidemiological perspective on the toxicology of drug-facilitated sexual assault: A systematic review. **J Forensic Leg Med**, v. 47, p. 46-54, 2017.

ANZILLOTTI, L.; ODOARDI, S.; STRANO-ROSSI, S. Cleaning up blood samples using a modified “QuEChERS” procedure for the determination of drugs of abuse and benzodiazepines by UPLC–MSMS. **Forensic Science International**, v. 243, n. 0, p. 99-106.

ASHRI, N. Y.; ABDEL-REHIM, M. Sample treatment based on extraction techniques in biological matrices. **Bioanalysis**, v. 3, n. 17, p. 2003-18, 2011.

AZEVEDO, Â. J. P. D.; ARAÚJO, A. A. D.; FERREIRA, M. Â. F. Consumo de ansiolíticos benzodiazepínicos: uma correlação entre dados do SNGPC e indicadores sociodemográficos nas capitais brasileiras. **Cien Saude Colet**, v. 21, n., p. 83-90, 2016.

BELOW, E.; LIGNITZ, E. Cases of fatal poisoning in post-mortem examinations at the Institute of Forensic Medicine in Greifswald--analysis of five decades of post-mortems. **Forensic Sci Int**, v. 133, n. 1-2, p. 125-131, 2003.

BENZODIAZEPINES. In Micromedex®: POISINDEX® System [banco de dados da internet]. Greenwood Village, CO: Thomson Micromedex®. Disponível em: <<http://www.micromedexsolutions.com/>>. Acesso em 29 mai. 2016.

BUCKLEY, N. A.; WHYTE, I. M.; DAWSON, A. H.; ISBISTER, G. K. A prospective cohort study of trends in self-poisoning, Newcastle, Australia, 1987-2012: plus ça change, plus c'est la même chose. **Med J Aust**, v. 202, n. 8, p. 438-442, 2015.

BUSZEWSKI, B.; SZULTKA, M. Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction: A Review. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 42, n. 3, p. 198-213, 2012.

BYARD, R. W.; TSOKOS, M. The challenges presented by decomposition. **Forensic Science, Medicine, and Pathology**, v. 9, n. 2, p. 135-137, 2013.

BYLDA, C.; THIELE, R.; KOBOLD, U.; VOLMER, D. A. Recent advances in sample preparation techniques to overcome difficulties encountered during quantitative analysis of small molecules from biofluids using LC-MS/MS. **Analyst**, v. 139, n. 10, p. 2265-2276, 2014.

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

CASAS FERREIRA, A. M.; MORENO CORDERO, B.; PÉREZ PAVÓN, J. L. Use of microextraction by packed sorbent directly coupled to an electron ionization single quadrupole mass spectrometer as an alternative for non-separative determinations. **J Chromatograph B**, v. 1043, n., p. 74-80, 2017.

CATAI, A. P. F.; PICHELI, F. P.; CARRILHO, E.; QUEIROZ, M. E. C. Assessing stir bar sorptive extraction and microextraction by packed sorbent for determination of selective serotonin reuptake inhibitor antidepressants in plasma sample by non-aqueous capillary electrophoresis. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n., p. 1635-1641, 2013.

CENTRO DE CONTROLE DE INTOXICAÇÕES DE CAMPINAS (CCI-CAMPINAS). **Relatório anual dos atendimentos do centro de controle de intoxicações de Campinas**. Disponível em: <https://www.fcm.unicamp.br/fcm/sites/default/files/ATENDIMENTO_ANUAL_2009_1.pdf>. Acesso em: 01 set. 2016.

CENTRO DE INFORMAÇÕES TOXICOLÓGICAS DO AMAZONAS (CIT-AMAZONAS). **Atendimentos do Centro de Informações Toxicológicas do Amazonas em 2007**. Disponível em: <<http://www.cit.ufam.edu.br/publicacoes.htm>>. Acesso em 01 set. 2016.

CENTRO DE INFORMAÇÕES TOXICOLÓGICAS DO RIO GRANDE DO SUL (CIT-RS). **Relatório de atendimentos 2014**. Disponível em: <http://www.cit.rs.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=137&Itemid=61>. Acesso em: 01 set. 2016.

CHARLSON, F. et al. A systematic review of research examining benzodiazepine-related mortality. **Pharmacoepidemiology and drug safety**, v. 18, n. 2, p. 93-103, 2009.

CHAVES, A. R. et al. Microextraction in packed sorbent for analysis of antidepressants in human plasma by liquid chromatography and spectrophotometric detection. **J Chromatograph B**, v. 878, n. 23, p. 2123-2129, 2010.

CHEN, X. H.; FRANKE, J. P.; WIJSBEEK, J.; DE ZEEUW, R. A. Reusability of Bond Elut Certify columns for the extraction of drugs from plasma. **J Chromatogr**, v. 619, n. 1, p. 137-142, 1993.

CLONAZEPAM. In: Thomson Reuters IntegritySM [banco de dados da internet]. New York, NY. Disponível em: <https://integrity.thomson-pharma.com/integrity/xmlxsl/>. Acesso em 28 ago. 2016.

D'ARCHIVIO, A. A.; MAGGI, M. A.; RUGGIERI, F.; CARLUCCI, M.; FERRONE, V.; CARLUCCI, G. Optimization by response surface methodology of microextraction by packed sorbent of non steroidal anti-inflammatory drugs and ultra-high performance liquid chromatography analysis of dialyzed samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 125, n., p. 114-121, 2016.

DIAZEPAM. In: Thomson Reuters IntegritySM [banco de dados da internet]. New York, NY. Disponível em: <https://integrity.thomson-pharma.com/integrity/xmlxsl/>. Acesso em 28 ago. 2016.

DINIS-OLIVEIRA, R. J.; VIEIRA, D. N.; MAGALHÃES, T. Guidelines for collection of biological samples for clinical and forensic toxicological analysis. **Forensic Sciences Research**, v. 1, n. 1, p. 42-51, 2016.

DOLAN, J. W. et al. Reversed-phase liquid chromatographic separation of complex samples by optimizing temperature and gradient time: III. Improving the accuracy of computer simulation. **J Chromatogr A**, v. 857, n. 1-2, p. 41-68, 1999.

Drugs of abuse: a DEA resource guide. United States Drug Enforcement Administration (DEA). Washington, 2017, p.94. Disponível em: <<https://www.dea.gov/pr/publications.shtml>>. Acesso em 15 mai. 2018.

DRUMMER, O. H. Benzodiazepines - Effects on Human Performance and Behavior. **Forensic Sci Rev**, v. 14, n. 1-2, p. 1-14, 2002.

DRUMMER, O. H. Methods for the measurement of benzodiazepines in biological samples. **J Chromatogr B**, v. 713, n. 1, p. 201-225, 1998.

DRUMMER, O. H. Review: Pharmacokinetics of illicit drugs in oral fluid. **Forensic Sci Int**, v. 150, n. 2–3, p. 133-142, 2005.

Drylab® Chromatography Reference Guide. Walnut Creek, CA, USA: LC Resources Inc. 2000.

EL BEQQALI, A.; AHMADI, M.; ABDEL-REHIM, M. Determination of AZD6118 in dog plasma samples utilizing microextraction by packed sorbent and liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. **J Chromatogr B**, v. 1043, n., p. 20-24, 2017.

EL-BEQQALI, A.; ABDEL-REHIM, M. Quantitative analysis of methadone in human urine samples by microextraction in packed syringe-gas chromatography-mass spectrometry (MEPS-GC-MS). **J Sep Sci**, v. 30, n. 15, p. 2501-5, 2007.

EL-BEQQALI, A.; ABDEL-REHIM, M. Quantitative analysis of methadone in human urine samples by microextraction in packed syringe-gas chromatography-mass spectrometry (MEPS-GC-MS). **J Sep Sci**, v. 30, n. 15, p. 2501-2505, 2007.

ELVIK, R. Risk of road accident associated with the use of drugs: A systematic review and meta-analysis of evidence from epidemiological studies. **Accident Analysis & Prevention**, v. 60, p. 254-267, 2013.

FARRUGIA, L. A.; RHYEE, S. H.; CALELLO, D. P.; et al. The Toxicology Investigators Consortium (ToxIC) Case Registry-the 2016 Experience. **J Med Toxicol**, v. 13, n. 3, p. 203-226, 2017.

FERNÁNDEZ, P.; GONZÁLEZ, M.; REGENJO, M.; ARES, A. M.; FERNÁNDEZ, A. M.; LORENZO, R. A.; CARRO, A. M. Analysis of drugs of abuse in human plasma using microextraction by packed sorbents and ultra-high-performance liquid chromatography. **J Chromatogr A**, v. 1485, n., p. 8-19, 2017.

FERRONE, V.; CARLUCCI, M.; COTELLESE, R.; RAIMONDI, P.; CICHELLA, A.; MARCO, L. D.; CARLUCCI, G. Development and validation of a fast micro-extraction by packed sorbent UHPLC-PDA method for the simultaneous determination of linezolid and ciprofloxacin in human plasma from patients with hospital-acquired pneumonia. **Talanta**, v. 164, n., p. 64-68, 2017.

FILIPPOU, O.; BITAS, D.; SAMANIDOU, V. Green approaches in sample preparation of bioanalytical samples prior to chromatographic analysis. **J Chromatogr B**, v. 1043, n., p. 44-62, 2017.

FUMES, B. H.; ANDRADE, M. A.; FRANCO, M. S.; LANCAS, F. M. On-line approaches for the determination of residues and contaminants in complex samples. **J Sep Sci**, v. 40, n. 1, p. 183-202, 2017.

FUMES, B. H.; LANÇAS, F. M. Use of graphene supported on aminopropyl silica for microextraction of parabens from water samples. **J Chromatogr A**, v. 1487, n., p. 64-71, 2017.

GÓMEZ-RÍOS, G. A.; LIU, C.; TASCÓN, M.; REYES-GARCÉS, N.; ARNOLD, D. W.; COVEY, T. R.; PAWLISZYN, J. Open Port Probe Sampling Interface for the Direct Coupling of Biocompatible Solid-Phase Microextraction to Atmospheric Pressure Ionization Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 7, p. 3805-3809, 2017.

GÓMEZ-RÍOS, G. A.; REYES-GARCÉS, N.; BOJKO, B.; PAWLISZYN, J. Biocompatible Solid-Phase Microextraction Nanoelectrospray Ionization: An Unexploited Tool in Bioanalysis. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 2, p. 1259-1265, 2016.

GONÇALVES, J. L.; ALVES, V. L.; RODRIGUES, F. P.; FIGUEIRA, J. A.; CÂMARA, J. S. A semi-automatic microextraction in packed sorbent, using a digitally controlled syringe, combined with ultra-high pressure liquid chromatography as a new and ultra-fast approach for the determination of prenylflavonoids in beers. **Journal of Chromatography A**, v. 1304, n. 0, p. 42-51, 2013.

GTFCh (Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie). Guideline for quality control in forensic-toxicological analyses. **Toxikem + Krimtech**, v. 65, n. 1, p. 2-8; 1998. Atualizações disponíveis em: <<https://www.gtfch.org/cms/images/stories/files/Guidelines-for-quality-control-in-forensic-toxicological-analyses-GTFCh-20090601-20180125.pdf>>. Acesso em 15 mai. 2018.

HABER, P. et al. Computer simulation for the simultaneous optimization of any two variables and any chromatographic procedure. **J Chromatogr Sci**, v. 38, n. 9, p. 386-92, 2000.

HALL, J. A.; MOORE, C. B. T. Drug facilitated sexual assault – A review. **Journal of Forensic and Legal Medicine**, v. 15, n. 5, p. 291-297, 2008.

HAMNETT, H. J.; ILETT, M.; IZZATI, F.; SMITH, S. S.; WATSON, K. H. Toxicological findings in driver and motorcyclist fatalities in Scotland 2012-2015. **Forensic Sci Int**, v. 274, n., p. 22-26, 2017.

Instituto Médico-Legal do Estado de São Paulo (IML-SP). **Portaria do Diretor Técnico de Departamento, de 04 de julho de 2012**. Dispõe sobre normas e procedimentos para envio de materiais biológicos para análise ao Núcleo de Toxicologia Forense. Diário Oficial do Estado de São Paulo, São Paulo, 07 jul. 2012.

JAGERDEO, E.; ABDEL-REHIM, M. Screening of Cocaine and Its Metabolites in Human Urine Samples by Direct Analysis in Real-Time Source Coupled to Time-of-Flight Mass Spectrometry After Online Preconcentration Utilizing Microextraction by Packed Sorbent. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 20, n. 5, p. 891-899, 2009.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. **Scientia Chromatographica** Vol.2, N°1, 13-25, 2010, v. Vol.2, n. N° 1, p. 13-25, 2010.

JONES, A. W.; HOLMGREN, A.; AHLNER, J. Post-mortem concentrations of drugs determined in femoral blood in single-drug fatalities compared with multi-drug poisoning deaths. **Forensic Sci Int**, v. 267, n., p. 96-103, 2016.

JONES, G. Postmortem toxicology. In: Moffat, A. C., Osselton, M. D., et al (Ed.). **Clarke's analysis of drugs and poisons**. London: Pharmaceutical Press, 2011. v.1, p.2609.

JONES, J. D.; MOGALI, S.; COMER, S. D. Polydrug abuse: A review of opioid and benzodiazepine combination use. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 125, n. 1–2, p. 8-18, 2012.

JÖNSSON, A. K. et al. Sedative and hypnotic drugs — Fatal and non-fatal reference blood concentrations. **Forensic Sci Int**, v. 236, n. 0, p. 138-145, 2014.

KATSELOU, M.; PAPOUTSIS, I.; NIKOLAOU, P.; SPILIOPOULOU, C.; ATHANASELIS, S. Metabolites replace the parent drug in the drug arena. The cases of fonazepam and nifoxipam. **Forensic Toxicology**, v. 35, n. 1, p. 1-10, 2017.

KIM, J.; KIM, M.; KIM, Y. R.; CHOI, K. H.; LEE, K. U. High Prevalence of Psychotropics Overdose among Suicide Attempters in Korea. **Clin Psychopharmacol Neurosci**, v. 13, n. 3, p. 302-307, 2015.

KINTZ, P.; VILLAIN, M.; CONCHEIRO, M.; CIRIMELE, V. Screening and confirmatory method for benzodiazepines and hypnotics in oral fluid by LC-MS/MS. **Forensic Sci Int**, v. 150, n. 2–3, p. 213-220, 2005.

KURTZ, S. P.; SURRATT, H. L.; LEVI-MINZI, M. A.; MOOSS, A. Benzodiazepine dependence among multidrug users in the club scene. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 119, n. 1–2, p. 99-105, 2011.

LEE, H.; PARK, Y.; JO, J.; IN, S.; PARK, Y.; KIM, E.; PYO, J.; CHOE, S. Analysis of benzodiazepines and their metabolites using DBS cards and LC–MS/MS. **Forensic Sci Int**, v. 255, n., p. 137 - 145, 2015.

MAGALHÃES, A. F. A. **Avaliação das intoxicações exógenas no Distrito Federal no período de 2009 a 2013**. Brasília, 2017. 168 p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências da Saúde - Universidade de Brasília.

MAGIERA, S. Fast, simultaneous quantification of three novel cardiac drugs in human urine by MEPS–UHPLC–MS/MS for therapeutic drug monitoring. **J Chromatogr B**, v. 938, n. 0, p. 86-95, 2013.

MAGRINI, L. et al. Microextraction by packed sorbent (MEPS)-UHPLC-UV: A simple and efficient method for the determination of five benzodiazepines in an alcoholic beverage. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 125, p. 48-53, 2016.

MAGRINI, L.; CAPPIELLO, A.; FAMIGLINI, G.; PALMA, P. Microextraction by packed sorbent (MEPS)-UHPLC-UV: A simple and efficient method for the determination of five benzodiazepines in an alcoholic beverage. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 125, n., p. 48-53, 2016.

MANDRIOLI, R.; MERCOLINI, L.; RAGGI, M. A. Benzodiazepine metabolism: an analytical perspective. **Curr Drug Metab**, v. 9, n. 8, p. 827- 44, 2008.

MAURER, H. H. Hyphenated mass spectrometric techniques-indispensable tools in clinical and forensic toxicology and in doping control. **J Mass Spectrom**, v. 41, n. 11, p. 1399-413, 2006.

MENDES, B.; GONÇALVES, J.; CÂMARA, J. S. Effectiveness of high-throughput miniaturized sorbent- and solid phase microextraction techniques combined with gas chromatography–mass spectrometry analysis for a rapid screening of volatile and semi-volatile composition of wines — A comparative study. **Talanta**, v. 88, n. 0, p. 79-94, 2012

MENDES, B.; GONÇALVES, J.; CÂMARA, J. S. Effectiveness of high-throughput miniaturized sorbent- and solid phase microextraction techniques combined with gas chromatography–mass spectrometry analysis for a rapid screening of volatile and semi-volatile composition of wines—A comparative study. **Talanta**, v. 88, n. 0, p. 79-94, 2012.

MERCOLINI, L.; PROTTI, M.; FULGENZI, G.; MANDRIOLI, R.; GHEDINI, N.; CONCA, A.; RAGGI, M. A. A fast and feasible microextraction by packed sorbent (MEPS) procedure for HPLC analysis of the atypical antipsychotic ziprasidone in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 88, n. 0, p. 467-471, 2014.

MIYAGUCHI, H. et al. Rapid identification and quantification of methamphetamine and amphetamine in hair by gas chromatography/mass spectrometry coupled with micropulverized extraction, aqueous acetylation and microextraction by packed sorbent. **J Chromatogr A**, v. 1216, n. 18, p. 4063-4070, 2009.

MOEIN, M. M.; SAID, R.; ABDEL-REHIM, M. Microextraction by packed sorbent. **Bioanalysis**, v. 7, n. 17, p. 2155-2161, 2015.

Monographs. In: Moffat, A. C., Osselton, M. D., et al (Ed.). Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. London, 2011. v.2, p.2609.

MONTEIRO, C. N.; VIEIRA, R. D. C. P. A.; FERREIRA, A. S.; CHICOUREL, E. L.; RAPOSO, N. R. B. Perfil das intoxicações fatais registradas no instituto médico legal de Juiz de Fora—Minas Gerais. **Revista de APS**, v. 13, n. 3, p., 2010.

MONTESANO, C.; SERGI, M. Microextraction techniques in illicit drug testing: present and future. **Bioanalysis**, v. 8, n. 9, p. 863-866, 2016.

MONTESANO, C; et al. Determination of illicit drugs and metabolites in oral fluid by microextraction on packed sorbent coupled with LC-MS/MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 13, p. 3647-3658, 2015.

MOOSMANN, B.; KING, L. A.; AUWÄRTER, V. Designer benzodiazepines: A new challenge. **World Psychiatry**, v. 14, n. 2, p. 248-248, 2015.

MORENO, I. et al. Analysis of Salvinorin A in urine using microextraction in packed syringe and GC-MS/MS. **Bioanalysis**, v. 5, n. 6, p. 661-8, 2013.

MORENO, I. E. D. et al. Determination of piperazine-type stimulants in human urine by means of microextraction in packed sorbent and high performance liquid chromatography-diode array detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 61, n. 0, p. 93-99, 2012.

MOTA, D. M.; MELO, J. R. R.; FREITAS, D. R. C. D.; MACHADO, M. Perfil da mortalidade por intoxicação com medicamentos no Brasil, 1996-2005: retrato de uma década. **Cien Saude Colet**, v. 17, n., p. 61-70, 2012.

MOWRY, J. B.; SPYKER, D. A.; BROOKS, D. E.; ZIMMERMAN, A.; SCHAUBEN, J. L. 2015 Annual Report of the American Association of Poison Control Centers' National Poison Data System (NPDS): 33rd Annual Report. **Clinical Toxicology**, v. 54, n. 10, p. 924-1109, 2016.

NERI, M. A bomba-relógio do uso abusivo. **Revista do Farmacêutico**. São Paulo: Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo - CRF-SP: p.26 – 28. 2014.

NETO, P. T. D. C. **Óbitos por intoxicação exógena no município de São Paulo, Brasil**. São Paulo, 2017. 80 p. Dissertação de mestrado - Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo.

NIESSEN, W. M. A.; CORREA C, R. A. Fragmentation of Drugs and Pesticides. In: (Ed.). **Interpretation of MS-MS Mass Spectra of Drugs and Pesticides**: John Wiley & Sons, Inc., 2017, p.129-349.

NIESSEN, W. M. Fragmentation of toxicologically relevant drugs in positive-ion liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Mass Spectrom Rev**, v. 30, n. 4, p. 626-663, 2011.

NOVAKOVA, L. Challenges in the development of bioanalytical liquid chromatography-mass spectrometry method with emphasis on fast analysis. **J Chromatogr A**, v. 1292, p. 25-37, 2013.

OCANA-GONZALEZ, J. A.; FERNANDEZ-TORRES, R.; BELLO-LOPEZ, M. A.; RAMOS-PAYAN, M. New developments in microextraction techniques in bioanalysis. A review. **Anal Chim Acta**, v. 905, n., p. 8-23, 2016.

OLIVEIRA, J. D. F. M. D. **Internações hospitalares e mortalidade por intoxicação medicamentosa em São Paulo**. São Paulo, 2017. 137 p. Tese de Doutorado - Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo.

PAPOUTSIS, I.; NIKOLAOU, P.; SPILIOPOULOU, C.; ATHANASELIS, S. Different aspects of driving under the influence of benzodiazepines. **Med Sci Law**, v. 56, n. 2, p. 159-160, 2016.

PECHANSKY, F.; DUARTE, P. D. C. A. V.; BONI, R. B. D. **Uso de Bebidas Alcoólicas e Outras Drogas nas Rodovias Brasileiras e Outros Estudos**. Disponível em: <<http://www.cpad.org.br/site2/br/publicacoes/livros/411-pagdownbook1>>. Acesso em: 15 mai. 2018.

PEREIRA, J.; GONÇALVES, J.; ALVES, V.; CÂMARA, J. S. Microextraction using packed sorbent as an effective and high-throughput sample extraction technique: Recent applications and future trends. **Sample Preparation**, v. 1, n., p. 38, 2013.

PERSONA, K.; MADEJ, K.; KNIHNICKI, P.; PIEKOSZEWSKI, W. Analytical methodologies for the determination of benzodiazepines in biological samples. **J Pharm Biomed Anal**, v. 113, n., p. 239-264, 2015.

PETERS, F. T.; WISSENBACH, D. K.; BUSARDO, F. P.; MARCHEI, E.; PICHINI, S. Method development in Forensic Toxicology. **Curr Pharm Des**, v.23, n.36, p.5455-5467, 2017.

PETRUSHEVSKA, T.; JAKOVSKI, Z.; POPOSKA, V.; STEFANOVSKA, V. V. Drug-related deaths between 2002 and 2013 with accent to methadone and benzodiazepines. **J Forensic Leg Med**, v. 31, n., p. 12-18, 2015.

POISINDEX®. **Benzodiazepines**. Greenwood Village, Colo: Thomson MICROMEDEX®, 2014.

Portaria SVS/MS nº 344, de 12 de maio de 1998. Aprova o Regulamento Técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial. Diário Oficial da União, Brasília, 15 mai. 1998.

Psychotropic Substances. International Narcotics Control Board (INCB). New York, 2017, p.422. Disponível em: <<https://www.incb.org/incb/en/psychotropics/technical-report.html>>. Acesso em 15 mai. 2018.

QUEIROZ, M. E. C.; LANÇAS, F. M. Análise de fármacos em material biológico: acoplamento microextração em fase sólida "no tubo" e cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 28, n.5, p. 880-886, 2005.

QUINTANA, M. I.; ANDREOLI, S. B.; PELUFFO, M. P.; RIBEIRO, W. S.; FEIJO, M. M.; BRESSAN, R. A.; COUTINHO, E. S. F.; MARI, J. D. J. Psychotropic Drug Use in São Paulo, Brazil – An Epidemiological Survey. **PLoS One**, v. 10, n. 8, p. e0135059, 2015.

QUINTO, M.; AMODIO, P.; SPADACCINO, G.; CENTONZE, D. Development of a mathematical model for online microextraction by packed sorbent under equilibrium conditions and its application for polycyclic aromatic hydrocarbon determination in water by gas chromatography–mass spectrometry. **J Chromatogr A**, v. 1262, n. 0, p. 19-26, 2012.

RANG, H. P.; DALE, M.; RIITER, J.M.; FLOWER, R.J. **Rang & Dale Farmacologia**. 6.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. p. 829.

RANI, S.; MALIK, A. K.; SINGH, B. Novel micro-extraction by packed sorbent procedure for the liquid chromatographic analysis of antiepileptic drugs in human plasma and urine. **Journal of Separation Science**, v. 35, n. 3, p. 359-366, 2012.

ROSADO, T.; FERNANDES, L.; BARROSO, M.; GALLARDO, E. Sensitive determination of THC and main metabolites in human plasma by means of microextraction in packed sorbent and gas chromatography–tandem mass spectrometry. **J Chromatogr B**, v. 1043, n., p. 63-73, 2017.

ROSADO, T.; GONÇALVES, A.; MARGALHO, C.; BARROSO, M.; GALLARDO, E. Rapid analysis of cocaine and metabolites in urine using microextraction in packed sorbent and GC/MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 409, n. 8, p. 2051-2063, 2017.

SAID, R. **Application of new technology: MEPS and LC-MS/MS for determination of therapeutic drugs**. 2010. Thesis for doctoral degree (Ph.D.). Division of Clinical Pharmacology from Department of Medicine, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden.

SAID, R.; POHANKA, A.; ABDEL-REHIM, M.; BECK, O. Determination of four immunosuppressive drugs in whole blood using MEPS and LC-MS/MS allowing automated sample work-up and analysis. **J Chromatogr B**, v. 897, n., p. 42-49, 2012.

SÃO PAULO (Estado). **Decreto nº 35566, de 30 de setembro de 1959**. Aprova o Regulamento do Instituto Médico-Legal do Estado. Assembléia Legislativa do Estado de São Paulo, São Paulo, 30 set. 1959.

SÃO PAULO (Estado). **Decreto nº 48009, de 11 de agosto de 2003**. Dispõe sobre o detalhamento das atribuições das unidades que especifica do Instituto de Criminalística e do Instituto Médico- Legal, ambos da Superintendência da Polícia Técnico-Científica, da Secretaria da Segurança Pública, e dá providências correlatas. Assembléia Legislativa do Estado de São Paulo, São Paulo, 11 ago. 2003.

SARACINO, M. A.; IACONO, C.; SOMAINI, L.; GERRA, G.; GHEDINI, N.; RAGGI, M. A. Multi-matrix assay of cortisol, cortisone and corticosterone using a combined MEPS-HPLC procedure. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 88, n. 0, p. 643-648, 2014.

SARACINO, M. A.; LAZZARA, G.; PRUGNOLI, B.; RAGGI, M. A. Rapid assays of clozapine and its metabolites in dried blood spots by liquid chromatography and microextraction by packed sorbent procedure. **J Chromatogr A**, v. 1218, n. 16, p. 2153-2159, 2011.

SARACINO, M. A.; TALLARICO, K.; RAGGI, M. A. Liquid chromatographic analysis of oxcarbazepine and its metabolites in plasma and saliva after a novel microextraction by packed sorbent procedure. **Analytica Chimica Acta**, v. 661, n. 2, p. 222-228, 2010.

SCHULZ, M.; IWERSEN-BERGMANN, S.; ANDRESEN, H.; SCHMOLDT, A. Therapeutic and toxic blood concentrations of nearly 1,000 drugs and other xenobiotics. **Crit Care**, v. 16, n. 4, p. R136, 2012.

SILVA, C. L.; GONCALVES, J. L.; CAMARA, J. S. A sensitive microextraction by packed sorbent-based methodology combined with ultra-high pressure liquid chromatography as a powerful technique for analysis of biologically active flavonols in wines. **Analytica Chimica Acta**, v. 739, n., p. 89-98, 2012.

SILVA, C.; CAVACO, C.; PERESTRELO, R.; PEREIRA, J.; CAMARA, J. S. Microextraction by Packed Sorbent (MEPS) and Solid-Phase Microextraction (SPME) as Sample Preparation Procedures for the Metabolomic Profiling of Urine. **Metabolites**, v. 4, n. 1, p. 71-97, 2014.

Sistema Nacional de Gerenciamento de Produtos Controlados (SNGPC). **Boletim de Farmacoepidemiologia**. Brasília, 2011, p.9. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/sngpc/boletins/2011/boletim_sngpc_2edatualizada.pdf>. Acesso em 15 mai. 2018.

SKOPP, G. Preanalytic aspects in postmortem toxicology. **Forensic Sci Int.** v.142, n. 2, p.75-100, 2004.

SKOPP, G.; MEYER, L. V. Empfehlungen der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh) zur Asservierung von Obduktionsmaterial für forensischtoxikologische Untersuchungen. **Toxichem + Krimtech**, v. 71, n. 2, p. 101 - 107, 2004.

SKOV, L.; HOLM, K. M.; JOHANSEN, S. S.; LINNET, K. Postmortem Brain and Blood Reference Concentrations of Alprazolam, Bromazepam, Chlordiazepoxide, Diazepam, and their Metabolites and a Review of the Literature. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 40, n. 7, p. 529-536, 2016.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. Computer-assisted method development. In: Snyder, L. R., Kirkland, J. J., et al (Ed.). **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. United States of America: Wiley, 2011, p.911.

SOMAINI, L.; SARACINO, M. A.; MARCHESELLI, C.; ZANCHINI, S.; GERRA, G.; RAGGI, M. A. Combined liquid chromatography–coulometric detection and microextraction by packed sorbent for the plasma analysis of long acting opioids in heroin addicted patients. **Analytica Chimica Acta**, v. 702, n. 2, p. 280-287, 2011.

SSP-Transparência. Governo do Estado de São Paulo. Secretaria de Segurança Pública (SSP). Disponível em: <<http://www.ssp.sp.gov.br/transparenciassp/Consulta.aspx>>. Acesso em: 26 jan. 2018.

STEUER, A. E.; EISENBEISS, L.; KRAEMER, T. Blood alcohol analysis alone versus comprehensive toxicological analysis - Systematic investigation of missed co-ingested other drugs in suspected alcohol-impaired drivers. **Forensic Sci Int**, v. 267, n., p. 52-59, 2016.

Superintendência da Polícia Técnico-Científica do Estado de São Paulo (SPTC-SP). **Instituto Médico Legal**. Disponível em: <<http://www.policiacientifica.sp.gov.br/iml-instituto-medico-legal/>>. Acesso em: 12 jan. 2018.

SWGTOX (Scientific Working Group for Forensic Toxicology). Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 37, n. 7, p. 452-474, 2013.

SZULTKA, M.; KRZEMINSKI, R.; SZELIGA, J.; JACKOWSKI, M.; BUSZEWSKI, B. A new approach for antibiotic drugs determination in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry. **J Chromatogr A**, v. 1272, n. 0, p. 41-49, 2013.

Thomson Reuters Integrity SM. Clarivate Analytics, 2017.

TIAFT (The International Association of Forensic Toxicologists). Recommendations on Sample Collection. **Bulletin of the International Association of Forensic Toxicologists**, 2009. Volume XXXIX Number 1, p 7.

UDDIN, M. N.; VICTORIA F, S.; PAPADOYANNIS, I. N. An Overview on Total Analytical Methods for the Detection of 1,4-Benzodiazepines. **Pharmaceutica Analytica Acta**, v. 5, n. 6, p. 303, 2014.

UNODC (United Nations Office on Drugs and Crime). **Guidelines for the forensic analysis of drugs facilitating sexual assault and other criminal acts**. Vienna: United Nations, 2011. Disponível em: <https://www.unodc.org/documents/scientific/forensic_analys_of_drugs_facilitating_sexual_assault_and_other_criminal_acts.pdf>. Acesso em: 15 mai. 2018.

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

VENTURA, S.; RODRIGUES, M.; POUSINHO, S.; FALCÃO, A.; ALVES, G. Determination of lamotrigine in human plasma and saliva using microextraction by packed sorbent and high performance liquid chromatography–diode array detection: An innovative bioanalytical tool for therapeutic drug monitoring. **Microchemical Journal**, v. 130, n., p. 221-228, 2017.

VIEIRA, É. L. R. et al. **Verificação da ocorrência de óbitos por intoxicação exógena por análise de laudos necroscópicos – IML/PE**. 2016. Universidade Federal de Pernambuco. Disponível em: <https://www.derechoycambiosocial.com/revista046/VERIFICACAO_DA_OCORRENCIA_DE_OBITOS_POR_INTOXICACAO.pdf>. Acesso em 15 mai. 2018.

VLČKOVÁ, H.; SVOBODA, P.; NOVÁK, O.; SOLICH, P.; NOVÁKOVÁ, L. Development of MEPS-UHPLC–MS/MS multistatin methods for clinical analysis. **Bioanalysis**, v. 8, n. 4, p. 333-349, 2016.

WALSH, J. M.; VERSTRAETE, A. G.; HUESTIS, M. A.; MORLAND, J. Guidelines for research on drugged driving. **Addiction**, v. 103, n. 8, p. 1258-1268, 2008.

WALTON, G. R. T.; HAYASHI, K.; BACH, P.; DONG, H.; KERR, T.; AHAMAD, K.; MILLOY, M. J.; MONTANER, J.; WOOD, E. **The Impact of Benzodiazepine Use on Mortality Among Polysubstance Users in Vancouver**, Canada. *Public Health Rep*, v. 131, n. 3, p. 491-499, 2016.

WESTLAND, J. L.; DORMAN, F. L. QuEChERS extraction of benzodiazepines in biological matrices. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 3, n. 6, p. 509-517, 2013.

WOŹNIAKIEWICZ, M.; WIETECH-POSŁUSZNY, R.; MOOS, A.; WIECZOREK, M.; KNIHNICKI, P.; KOŚCIELNIAK, P. Development of microextraction by packed sorbent for toxicological analysis of tricyclic antidepressant drugs in human oral fluid. **J Chromatogr A**, v. 1337, n. 0, p. 9-16, 2014.

WYMAN, J. F. Principles and Procedures in Forensic Toxicology. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 32, n. 3, p. 493-507, 2012.

ZUBIAUR, O.; SALAZAR, J.; AZKUNAGA, B.; MINTEGI, S. Therapeutic psychotropic drugs: Most common cause of unintentional poisoning in children. **An Pediatr (Barc)**, v. 83, n. 4, p. 244-247, 2015.

APÊNDICE

APÊNDICE A

Nº	Classificação	Fármaco ou termo	Casos localizados?
1	Antidepressivo	escitalopram	
2	Antidepressivo	sertralina	sim
3	Antidepressivo	bupropiona	
4	Antidepressivo	paroxetina	
5	Antidepressivo	citalopram	sim
6	Antidepressivo	fluoxetina	
7	Antidepressivo	venlafaxina	
8	Antidepressivo	duloxetina	sim
9	Antidepressivo	fluvoxamina	
10	Antidepressivo	amitriptilina	sim
11	Antidepressivo	imipramina	
12	Antidepressivo	nortriptilina	sim
13	Antidepressivo	clomipramina	
14	Antidepressivo	trazodona	
15	Antidepressivo	tianeptina	
16	Antidepressivo	reboxetina	
17	Anorexígeno	sibutramina	
18	Anorexígeno	mazindol	
19	Anorexígeno	fenfluramina	
20	Anorexígeno	femproporex	
21	Anorexígeno	dietilpropiona	
22	Anorexígeno	anfeparamona	
23	Anticonvulsivante	gabapentina	
24	Anticonvulsivante	carbamazepina	sim
25	Estabilizador de humor	lítio	sim
26	Anticonvulsivante	valproato	
27	Anticonvulsivante	lamotrigina	
28	Anticonvulsivante	topiramato	
29	Benzodiazepínico	oxazepam	
30	Benzodiazepínico	clorazepato	
31	Benzodiazepínico	diazepam	sim
32	Benzodiazepínico	alprazolam	sim
33	Benzodiazepínico	bromazepam	
34	Benzodiazepínico	clonazepam	
35	Benzodiazepínico	clordiazepóxido	
36	Benzodiazepínico	lorazepam	

Nº	Classificação	Fármaco ou termo	Casos localizados?
37	Benzodiazepínico	clobazam	
38	Benzodiazepínico	cloxazolam	
39	Antipsicótico	aripirazol	
40	Antipsicótico	quetiapina	sim
41	Antipsicótico	ziprasidona	
42	Antipsicótico	risperidona	
43	Antipsicótico	clozapina	
44	Antipsicótico	pipotiazina	
45	Antipsicótico	penfluridol	
46	Antipsicótico	zuclopentixol	
47	Antipsicótico	flufenazina	
48	Antipsicótico	tioridazina	
49	Antipsicótico	trifluperazina	
50	Antipsicótico	clorpromazina	sim
51	Antipsicótico	amissulprida	
52	Antipsicótico	haloperidol	sim
53	Antipsicótico	buspirona	
54	Anticolinérgico	biperideno	
55	Anticolinérgico	acamprosato	
56	Barbitúrico	fenitoína	sim
57	Barbitúrico	fenobarbital	sim
58	Antietanol	dissulfiram	
59	Antietanol	naltrexona	
60	Benzodiazepínico	nitrazepam	
61	Hipnótico não-benzodiazepínico	zolpidem	
62	Benzodiazepínico	triazolam	
63	Benzodiazepínico	flunitrazepam	
64	Benzodiazepínico	midazolam	sim
65	Neurotônico	metilfenidato	
66	Neurotônico	atomoxetina	
67	Outros termos	psicotrópico	sim
68	Outros termos	sedativo	sim
69	Outros termos	hipnótico	
70	Outros termos	ansiolítico	sim
71	Droga de abuso	2-CB	
72	Droga de abuso	anfepramona	
73	Droga de abuso	cafeína	
74	Droga de abuso	clobenzorex	
75	Droga de abuso	cetamina	

Nº	Classificação	Fármaco ou termo	Casos localizados?
76	Droga de abuso	efedrina	
77	Droga de abuso	dimetoxianfetamina	
78	Droga de abuso	metaclorfenilpiperazina (mCPP)	
79	Droga de abuso	3,4-metilenodioximetanfetamina(MDMA)	sim
80	Droga de abuso	metanfetamina	
81	Droga de abuso	fenciclidina	
82	Droga de abuso	pirovalerona	
83	Droga de abuso	trifluorometilfenilpiperazina	
84	Droga de abuso	delta-9-tetraidrocanabinol	sim
85	Droga de abuso	cocaína	sim
86	Droga de abuso	lidocaína	
87	Droga de abuso	LSD	
88	Droga de abuso	NBOMe	
89	Droga de abuso	Álcool	sim
90	Defensivo agrícola	Aldicarbe	sim
91	Defensivo agrícola	Carbamato	sim
92	Defensivo agrícola	Carbofurano	sim
93	Defensivo agrícola	Organofosforados	
94	Defensivo agrícola	Paraquat	sim

ANEXOS



USP - FACULDADE DE
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DA UNIVERSIDADE DE SÃO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Uso da microextração por sorbente empacotado (MEPS) para preparo de amostras em análises toxicológicas envolvendo fármacos benzodiazepínicos.

Pesquisador: Marina Franco Maggi Tavares

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 65272217.8.0000.0067

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.996.499

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto a ser executado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP), em parceria com a Polícia Técnico-científica do Estado de São Paulo. Participam da equipe a Profa. Dra. Marina Franco Maggi Tavares, orientadora, a aluna de mestrado Loraine Rezende Togni e José Luiz da Costa da Secretaria de Segurança Pública - Superintendência da Polícia técnico-científica. Trata-se de um projeto destinado a avaliar um novo método de identificação de benzodiazepínicos em amostras de sangue. O método de microextração será comparado com métodos tradicionais para avaliar sua eficácia na detecção de benzodiazepínicos e sua vantagem consiste na possibilidade de utilização de um menor volume de amostra para se obter os resultados. As amostras a serem utilizadas no projeto serão fornecidas pela Polícia Técnico-científica, sem que os pesquisadores possam identificar os indivíduos de onde as amostras foram obtidas. Este material biológico seria descartado pela polícia que já terá efetuado análise nas amostras por métodos já consagrados.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Desenvolver um protocolo para extração de benzodiazepínicos (alprazolam, bromazepam, clonazepam, diazepam, nordiazepam, flunitrazepam e 7-

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112

Bairro: Butantã

CEP: 05.508-000

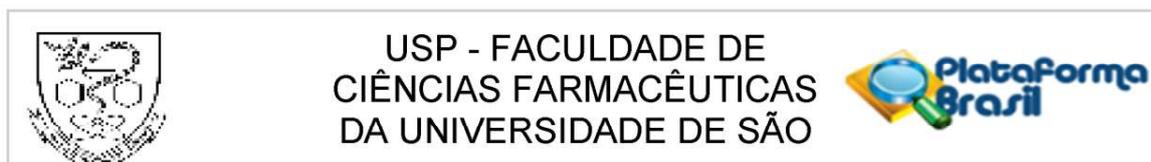
UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-3622

Fax: (11)3031-8986

E-mail: cepfcf@usp.br



Continuação do Parecer: 1.996.499

aminoflunitrazepam) de amostras de sangue total post mortem para análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LCMS/MS).

Objetivo Secundário:

Os protocolos desenvolvidos e aplicados em amostras reais poderão servir também como ferramenta para os laboratórios de análises toxicológicas clínicas e forenses.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são mínimos e os benefícios potenciais estão relacionados ao desenvolvimento de um método analítico mais eficaz.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

a pesquisa é clara, com objetivos bem definidos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A solicitação de dispensa do TCLE aprovada é pertinente.

Recomendações:

1. Apresentar autorização para a cessão do material biológico.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

1. Atender ao disposto nas considerações acima.

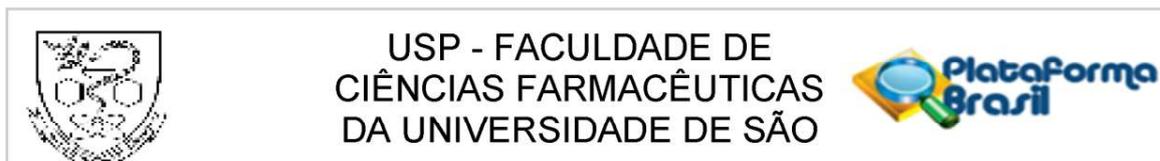
Considerações Finais a critério do CEP:

Este CEP entende que o projeto de pesquisa pode ser aprovado assim que as providências indicadas sejam atendidas na Plataforma Brasil.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_347515.pdf	28/02/2017 11:51:19		Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto_projeto_loraine_assinada.pdf	28/02/2017 11:46:18	Loraine Rezende Togni	Aceito
Outros	descricao_da_equipe.pdf	25/02/2017 18:43:22	Loraine Rezende Togni	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracao_Marina.pdf	25/02/2017 18:27:48	Loraine Rezende Togni	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	Projeto_CEP.pdf	25/02/2017 18:17:39	Loraine Rezende Togni	Aceito

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfcf@usp.br



Continuação do Parecer: 1.996.499

Investigador	Projeto_CEP.pdf	25/02/2017 18:17:39	Loraine Rezende Togni	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracao_JLC.pdf	25/02/2017 17:44:09	Loraine Rezende Togni	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracao_loraine.pdf	25/02/2017 17:43:24	Loraine Rezende Togni	Aceito
Outros	resposta_comissao_cientifica_SPTC.pdf	25/02/2017 17:42:29	Loraine Rezende Togni	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

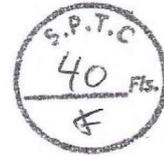
SAO PAULO, 03 de Abril de 2017

Assinado por:
Cristina Northfleet de Albuquerque
(Coordenador)



SECRETARIA DA SEGURANÇA PÚBLICA
SUPERINTENDÊNCIA DA POLÍCIA TÉCNICO-CIENTÍFICA
Gabinete da Superintendência

Rua Moncorvo Filho, 410 - 4º andar - Ala I - Capital - SP - CEP: 05507-060.
☎ (011) 3811-7000 R 7009 - FAX: (011) 3031-1311 - www.policiacientifica.sp.gov.br



Despacho nº 724/2015/ATS/SPTC-SSP

São Paulo, 22 de abril de 2015.

Assunto: Solicitação de avaliação de projeto de pesquisa

Referência: SPTC 3350/2014.

Interessado: Dr. José Luiz da Costa.

1. Após reunião da Comissão Científica da Superintendência da Polícia Técnico-Científica, restituo à Diretoria Técnica Departamental do Instituto Médico Legal, onde informamos que o Projeto de Pesquisa, obteve o parecer favorável a realização do Projeto Científico.

2. Informamos que o trabalho científico somente pode ser iniciado nesta instituição, após apresentação do documento de Aprovação da FAPESP, com a descrição das bolsas fornecidas pelo órgão de fomento da pesquisa e salientamos que o mesmo deverá ser iniciado somente após o recebimento dos insumos fornecidos pela FAPESP e pelo Instituto de Química da USP.

Atenciosamente,

IVAN DIEB MIZIARA

Superintendente da Polícia Técnico-Científica

ATS/efma

INSTITUTO MÉDICO LEGAL-SP . DTD-IML	
Nome:	<i>Alicia Mariudo</i>
RG:	<i>26.177.678-58</i>
Cargo:	<i>Atend. Neuro. Pol.</i>
Data:	<i>24, 04, 15. 14.48</i>
Ass.:	<i>IVD</i>