

# ANÁLISE TOXICOLÓGICA SISTEMÁTICA PARA DETECÇÃO DE AGENTES TÓXICOS EM URINA ATRAVÉS DA CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM)

## SYSTEMATIC TOXICOLOGICAL ANALYSIS FOR THE DETECTION OF TOXIC AGENTS IN URINE USING GAS CHROMATOGRAPHY COUPLED TO MASS SPECTROMETRY (CG-EM)

Bruna Espíndola da Silva\*  
Camila Marchioni\*\*

### RESUMO

A toxicologia estuda os efeitos tóxicos das substâncias químicas sobre organismos vivos. Dentro da toxicologia tem-se a toxicologia analítica de urgência, cujo desafio é realizar o exame toxicológico eficiente e rápido. Como há um número crescente de compostos químicos é um grande desafio desenvolver métodos que detectam esses compostos na mesma rapidez com que são disponíveis. Pensando nisso, esse trabalho teve como objetivos desenvolver e validar uma metodologia de análise toxicológica sistemática para detecção de agentes tóxicos em amostra biológica urina recebida pelo Centro de Informação e Assistência Toxicológica de Santa Catarina (CIATox/SC) através de CG-EM e aplicar o método em amostras reais. A metodologia proposta mostrou-se precisa e seletiva. Conseguiu-se realizar uma derivatização “*on column*” de forma que foi dispensável o tempo de ativação do derivatizando, além de mostrar que esse método teve um menor coeficiente de variação. Ao utilizar os padrões cocaína, paracetamol, ácido salicílico, aldicarbe e malation obteve-se melhores recuperações quando utilizado 1mL de amostra de urina, tampão com pH 4 e com pH 12 na extração. Ao testar a aplicabilidade do método, em 5 casos, notou-se que em todos os casos obteve-se um maior número de compostos detectados quando comparado a triagem por imunoensaio.

**Palavras-chave:** toxicologia, análise toxicológica sistemática, CG-EM.

### ABSTRACT

Toxicology studies the toxic effects of chemical substances on living organisms. Within toxicology there is emergency analytical toxicology, the challenge of which is to carry out efficient and rapid toxicological testing. As there is a growing number of chemical compounds, it is a major challenge to develop methods that detect these compounds as quickly as they become available. With this in mind, this study aimed to develop and validate a systematic toxicological analysis methodology for detecting toxic agents in biological urine samples received by the Santa Catarina Toxicological Information and Assistance Center (CIATox/SC) using GC-MS and to apply the method to real samples. The proposed methodology proved to be accurate and selective. It was possible to carry out an "on column" derivatization in such a way that the activation time of the derivatizer was dispensable, as well as showing that this method had a lower coefficient of variation. When using the standards cocaine, paracetamol, salicylic acid, aldicarb and malathion, better recoveries were obtained when using 1mL of urine sample, pH 4 buffer and pH 12 buffer in the extraction. When testing the applicability of the method in 5 cases, it was noted that in all cases a greater number of compounds were detected when compared to immunoassay screening.

**Keywords:** toxicology, systematic toxicological analysis, CG-EM.

---

\* Farmacêutica Residente - Residência Multiprofissional em Saúde. Ênfase Urgência e Emergência Universidade Federal de Santa Catarina. E-mail: brunaespi@gmail.com

\*\* Professora Adjunta – Departamento de Patologia. Universidade Federal de Santa Catarina. Doutora em Ciências. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (USP/RP). E-mail: camila.marchioni@ufsc.br

## 1 INTRODUÇÃO

Segundo Klaassen *et al.* (2012), a toxicologia é o estudo dos efeitos tóxicos das substâncias químicas sobre organismos vivos. É uma ciência multidisciplinar, subdividida em campos de trabalho, dentre eles temos a toxicologia analítica, clínica, forense e experimental. Dentro da toxicologia clínica, tem-se a toxicologia de urgência, que tem o desafio de realizar um exame toxicológico eficiente e rápido. Esses exames auxiliam no diagnóstico e prognóstico das intoxicações, que são a manifestação dos efeitos tóxicos no organismo. Em casos de diagnósticos diferenciais, por exemplo, quando há suspeita de intoxicação, porém não se tem uma história bem definida e o quadro clínico não é específico, torna-se imprescindível a análise laboratorial. Assim, a análise toxicológica analítica de urgência pode direcionar uma conduta terapêutica mais assertiva (KLAASSEN *et al.*, 2012; LOOMIS, TED, *et al.* 2001; BATISTUZZO; CAMARGO; OGA, 2008; MOREAU; SIQUEIRA, 2016).

No Hospital Universitário Polydoro Ernani São Thiago (HU/UFSC-EBSERH) funciona o Centro de Informação e Assistência Toxicológica de Santa Catarina (CIATox/SC), o qual presta atendimento de referência em toxicologia clínica para o estado de Santa Catarina. No ano de 2022, o CIATox/SC realizou 20.559 atendimentos, sendo que 35,15% dos casos foram relacionados a intoxicações envolvendo medicamentos, enquanto agrotóxicos e drogas de abuso, foram 2,18% e 1,97%, respectivamente (CIATox, 2023).

Com o intuito de auxiliar no diagnóstico, o CIATox/SC conta com o auxílio do Laboratório de Pesquisas Toxicológicas (LPTox), localizado na Unidade de Laboratório de Análises Clínicas do HU/UFSC-EBSERH, que no ano de 2022, realizou 2.353 exames solicitados via CIATox/SC. Atualmente, estão disponíveis as seguintes análises: triagem de drogas de abuso, identificação de paraquate e diquate, determinações das atividades das enzimas colinesterases, determinação sérica das concentrações de paracetamol, vancomicina, lítio, carbamazepina, ácido valproico, fenitoína, metahemoglobina, salicilatos, digoxina e fenobarbital (CIATox, 2023; LPTox, 2023).

O LPTox conta com a triagem de medicamento e drogas de abuso através de uma metodologia de imunoensaio competitivo de uma etapa. Porém, o laboratório também tem disponível um equipamento de cromatografia gasosa acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM), mas sem metodologia validada para triagem de substâncias químicas. O CG-EM apresenta como princípio a separação de compostos, utilizado uma fase estacionária sólida ou líquida, e com uma fase móvel (gás). A técnica requer pequenos volumes de amostra para detectar analitos na ordem de grandezas de  $10^{-12}$ g (COLLINS, 2006; VAN WIJK; *et al.*, 2019).

Com o crescente número de compostos químicos, as análises toxicológicas possuem um grande desafio em conseguir desenvolver métodos que detectam esses compostos na mesma rapidez com que são disponíveis. Tendo em mente situações que não se consegue um histórico de uso de substâncias, o caso se torna ainda mais desafiador. Pensando nisso, tem-se a Análise Toxicológica Sistemática (ATS), que se baseia na exclusão de substâncias e detecção das que realmente estão presentes na amostra. Para a sua realização, é necessário a padronização de metodologias (LINDEN; *et al.*, 2007).

Nos casos de intoxicações onde os analitos são incertos ou desconhecidos, a mais frequente prática é a utilização de banco de dados analíticos de bibliotecas com as informações dos espectros de massa das substâncias. Como há limitações aos laboratórios em construir suas próprias bases de dados, torna-se importante a contribuição de dados interlaboratoriais (STIMPFL; *et al.*, 2003).

O EM tem como objetivo identificar os compostos, podendo operar no modo varredura completa, chamada de *scan*. Neste modo, o EM detecta os íons contidos da amostra e compara

com a biblioteca disponível. Assim, com uma única análise é possível detectar vários compostos (VAN WIJK; *et al*, 2019).

Para a análise em cromatografia, as amostras biológicas precisam previamente de um preparo, pois são consideradas complexas e apresentam os analitos em baixa concentração. Com esse preparo prévio consegue-se aumentar a detectabilidade dos analitos, porque há um menor número de interferentes na amostra (MOREAU; SIQUEIRA, 2016).

Uma das técnicas mais usuais de preparo de amostra é a extração líquido-líquido, que se baseia em separar os compostos através das diferentes solubilidades entre a fase aquosa e a orgânica. O analito de interesse deve ser preferencialmente solúvel na fase orgânica e o solvente deve ser hidrofóbico assim tem-se a extração do analito por partição. A maior parte dos agentes tóxicos são ácidos ou bases fracas. Assim, o pH da amostra exerce uma importante influência, modulando a ionização dos analitos, tendo em vista que um composto não ionizado é lipossolúvel, gerando maior afinidade pela fase orgânica. Já os compostos ionizados seriam hidrossolúveis, assim permanecendo a fase aquosa (MOREAU; SIQUEIRA, 2016).

Desse modo, esse trabalho teve como objetivos desenvolver e validar uma metodologia de análise toxicológica sistemática para detecção de agentes tóxicos em amostra biológica urina encaminhadas pelo CIATox/SC através de CG-EM e aplicar o método em amostras reais.

## **2 DESENVOLVIMENTO**

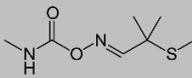
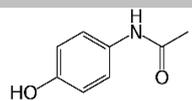
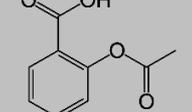
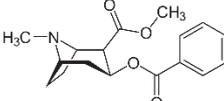
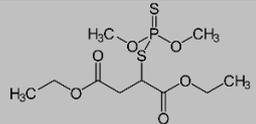
### **2.1 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **2.1.1 Padrões e Reagentes**

Os padrões utilizados para o desenvolvimento do método foram: Aldicarbe, Ácido Salicílico, Paracetamol e Malation; todos da empresa Sigma-aldrich<sup>®</sup>. Além do padrão de cocaína, cedido pela Polícia Científica do Estado de Santa Catarina (PCI/SC). Inicialmente utilizou-se 500 ng/mL de cada substância (Tabela 1).

Os reagentes necessários para o preparo dos tampões foram: bicarbonato de sódio (Biograde<sup>®</sup>), carbonato de sódio (Dinâmica<sup>®</sup>), acetato de sódio (Biograde<sup>®</sup>) e ácido acético grau HPLC (Biograde<sup>®</sup>). Para o preparo de amostra foi utilizado acetato de etila grau HPLC da empresa Êxodo Científica<sup>®</sup>. Também foi necessário o uso do derivatizante N-tert-Butyldimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamide (MTBSTFA) da empresa Sigma-aldrich<sup>®</sup>.

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas das substâncias analisadas

Substâncias	Log P	pKa	Temperatura de ebulição em °C	Molécula	Íons Monitorados
Aldicarbe	1,1	11,7	Decompõe-se antes do ponto de ebulição		99; 100
Paracetamol	0,5	9,46	>500		108; 109
Ácido salicílico	2,3	2,78	211		92
Cocaína	2,3	8,7	187		82; 182
Malation	2,4	6,8	157		93; 94; 95

Fonte: elaborado pelas autoras com informações extraídas da base de dados *Pubchem* (PubChem, 2023)

### 2.1.2 Amostras

Para o desenvolvimento do método foram utilizadas amostras de voluntários isentos de analitos de interesses. Para testar a aplicabilidade do método, utilizou-se 5 amostras de pacientes em que já tinham sido processadas e armazenadas por no mínimo 6 meses, sendo candidatas para descarte. O trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPSH-UFSC, 72952323.9.0000.0121).

### 2.1.3 CG-EM

Para detecção cromatográfica foi utilizado um equipamento de cromatografia gasosa GC-QP2010 Ultra (Shimadzu<sup>®</sup>), acoplado a um espectrômetro de massas QP-2010 Ultra, com amostrador automático AOC-5000 Plus. A coluna cromatográfica utilizada foi a coluna capilar 5% difenil/95% dimetilpolisiloxano, modelo RTx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) e com gás de arraste o Hélio 4mL/min. A eluição foi realizada com uma rampa de temperatura, começando em 60°C, aumentando 10°C a cada 2 minutos, chegando em uma temperatura final de 310°C por 5 minutos. A análise no espectrômetro de massas foi realizada com ionização por impacto de elétrons (70eV) no modo *splitless*. Foi injetado 1 µL de amostra na coluna. O espectro de massas operou no modo varredura completa (*scan*), para posterior comparação com a biblioteca MPW2011, NIST11, NIST11s, TOX DATABASE e posterior análise com o Sistema de Análise Toxicológica Sistemática (SATS). Antes de definir a melhor condição cromatográfica, foram avaliadas diferentes rampas de temperatura de forma a definir a que apresentasse melhor resolução cromatográfica.

#### **2.1.4 Preparo da amostra**

Foi utilizado 2 mL de urina, 1 mL para extração ácida e outro 1 mL para extração básica. Então, 1 mL de urina foi adicionada em um tubo de ensaio de vidro, adicionado 1 mL de tampão acético pH 4,0 (para extração ácida) ou tampão fosfato pH 12,0 (para extração básica) e 2 mL de acetato de etila. A mistura foi submetida a agitação em vórtex por 30 segundos e centrifugação por 5 minutos à 2.500rpm. Os sobrenadantes (1900 µL) foram transferidos separadamente para tubos de ensaio e secos no concentrador de amostras por 50°C por 15 minutos. Ao final, os extratos foram ressuspensos com 50 µL de acetato de etila e acrescido 10µL do derivatizante MTBSTFA, transferidos para *inserts* com capacidade de 200 µL e *vial* com capacidade de 2 mL. Nessa etapa, para definir a melhor condição, avaliou-se a quantidade de solvente, o volume de amostra, pH da amostra e a possibilidade de juntar os dois sobrenadantes das extrações ácida e básica.

#### **2.1.5 Derivatização**

Para etapa de derivatização acrescentou-se 10 µL do derivatizante MTBSTFA junto com a alíquota final já ressuspensa, posteriormente agitado em vórtex e transferido para o *insert* do *vial*.

### **2.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO**

Os critérios para validação do método analítico, foram baseados no Manual da *United Nations Office on Drugs and Crime* (UNODC). Os parâmetros analisados para o método qualitativo foram: seletividade, limite de detecção, precisão e estabilidade (UNODC, 2009).

#### **2.2.1 Seletividade**

Para avaliação da seletividade foi avaliada amostras brancas e comparadas com a análise apenas dos padrões. Avaliando se ocorreria algum pico no cromatograma que pudesse interferir nos picos de interesse dos padrões.

#### **2.2.2 Limite de detecção**

Para determinar o limite de detecção partiu-se de uma concentração de cada analito de 500 ng/mL em uma amostra branco e realizado a extração como demonstrado anteriormente, a partir dessa concentração dependendo da substância foi necessário aumento ou diminuição da concentração, fazendo diluições seriadas para amostras que já eram detectadas em 500 ng/mL ou fazendo soluções mais concentradas seriadas para aquelas que não eram detectadas nessa concentração inicial.

#### **2.2.3 Precisão**

Foram utilizadas 10 amostras de voluntários sem analitos de interesse como branco, e adicionadas os analitos de interesse com concentração 2 vezes maior que o limite de detecção. Não sendo permitida mais do que 2 amostras falso-negativas.

## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

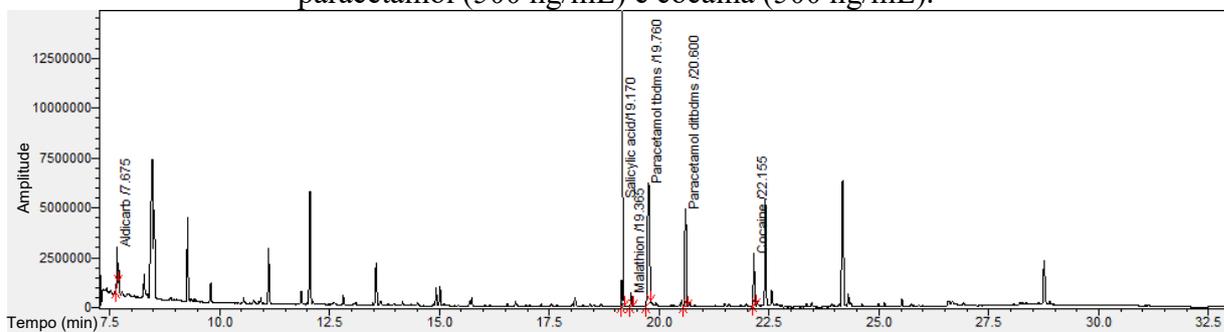
### 2.3.2 Desenvolvimento do método cromatográfico

Em um primeiro momento, para o desenvolvimento do método cromatográfico, usou-se como base a metodologia apresentada por Lizot et al. (2012), que traz uma rampa de temperatura iniciando em 140°C mantida por 2 min, para que em seguida fosse aumentado 10°C/min até chegar à 320°C e por fim manter essa temperatura por 5 minutos. As adaptações da metodologia da literatura avaliadas foram: alteração da coluna cromatográfica, fluxo do gás de arraste do hélio de 4 mL/min, e ao invés de 260°C do injetor, optou-se por utilizar 250°C.

Como um dos analitos de interesse, o aldicarbe, apresenta sua degradação antes mesmo do ponto de ebulição. Então, testou-se iniciar a rampa em 50°C, 60°C e 70°C. Mantendo essas temperaturas por 2 min, aumentando 10°C/min até chegar 310°C, mantendo essa temperatura final por 5 minutos. Ao final a tempo total de corrida foi de 32 minutos. A temperatura final foi 10°C menor que o método de Lizot *et al.* (2012), pois é a temperatura máxima suportada pela coluna disponível no laboratório. Para ressuspender os padrões previamente secos, foi utilizado o solvente acetato de etila. O qual apresentou um tempo de retenção até 7,2 minutos, assim sendo determinado o tempo de *cut-off* do solvente nesse mesmo tempo.

Com isso, se obteve a detecção do aldicabe em 7.675min em uma concentração 2µg/mL quando iniciamos a corrida em 60°C. Além das outras 4 substâncias de interesse, ácido salicílico (19,170min), malation (19,365min), paracetamol terc-butildimetilsililo (tbdms) (19,760min), paracetamol ácido 2-cetoadípico (ditbdms) (20,600min) e cocaína (22,155min) (Figura 1).

Figura 1 – Aldicarbe (2 µg/mL), ácido salicílico (500 ng/mL), malation (500 ng/mL), paracetamol (500 ng/mL) e cocaína (500 ng/mL).

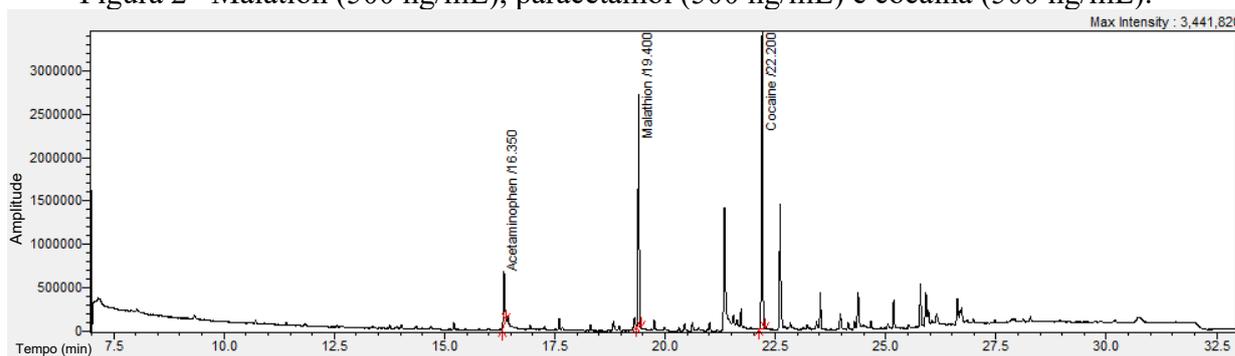


Fonte: elaborado pela autora.

### 2.3.3 Derivatização

Inicialmente, ao injetar os padrões em uma concentração de 500 ng/mL, houve a detecção de apenas três substâncias (cocaína, malation e paracetamol) das cinco substâncias alvo (Figura 2).

Figura 2 –Malation (500 ng/mL), paracetamol (500 ng/mL) e cocaína (500 ng/mL).



Fonte: elaborado pela autora.

Condições cromatográficas: 60°C/2min, 10°C/min até chegar 310°C/5min.

Como o ácido salicílico é um anti-inflamatório não esteroideal, ele apresenta hidrogênios ionizáveis em sua estrutura, gerando uma alta polaridade e pouca volatilidade, assim tornando possível a detecção desses compostos através de CG-EM apenas com auxílio de derivatização (WIELENS, 2012).

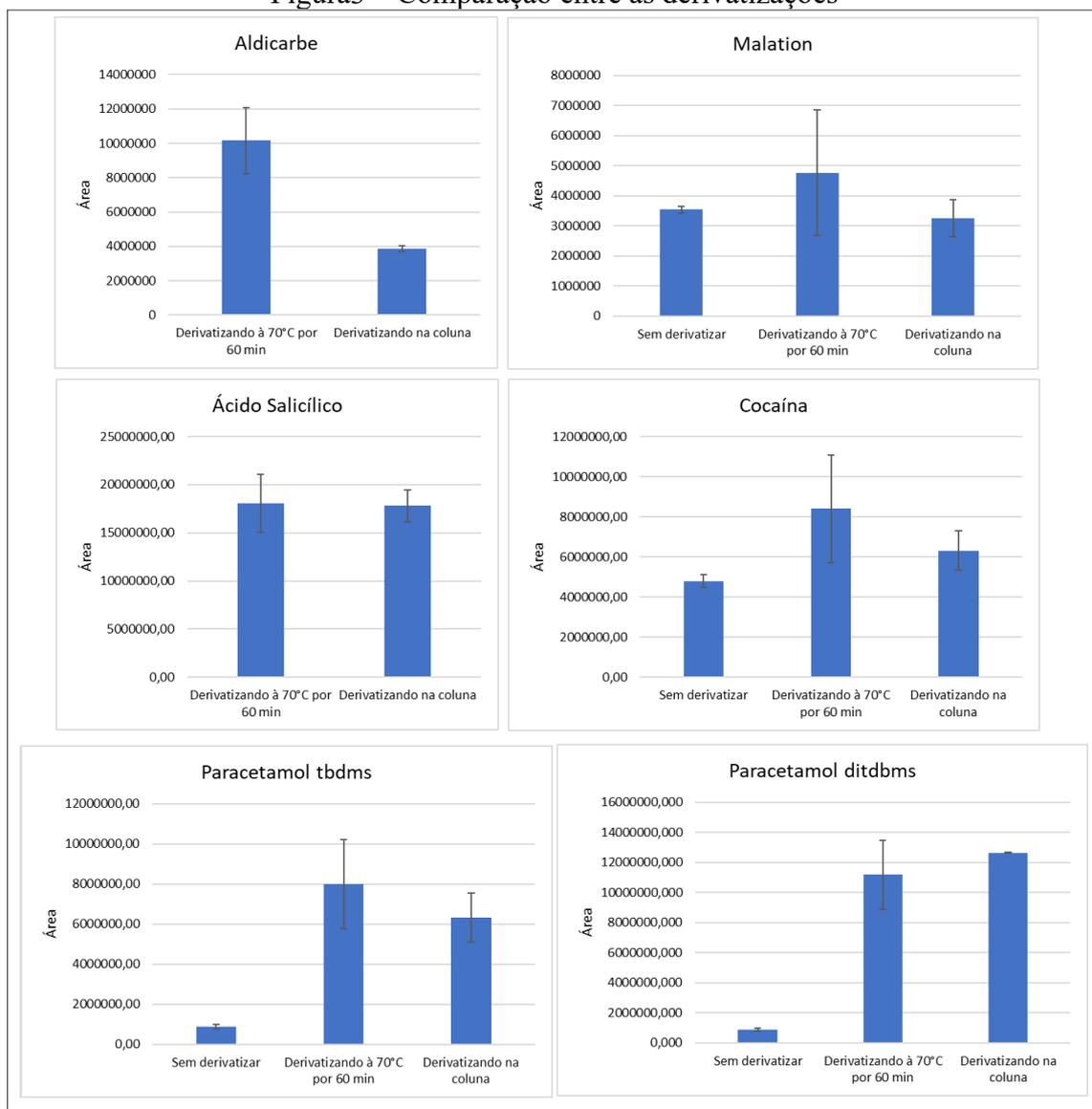
Já em relação ao aldicarbe, por causa do seu grupamento amida e sua capacidade de realizar ligações de hidrogênios, e devido sua instabilidade térmica principalmente pelo seu grupamento amida, também tornou-se necessário sua derivatização.

Foi utilizado no presente estudo o derivatizante chamado MTBSTFA, o qual realiza reação de sililação em hidrogênios em grupos álcoois, tióis, amins, amida, ácidos, cetonas e aldeídos. Assim, substituindo o hidrogênio por um grupo trimetilsilil, gerando compostos mais voláteis e mais estáveis termicamente (FARAJZADEH; NOURI; KHORRAM, 2014)

Para realização da derivatização, Wielens (2012) avaliou o tempo e concentração necessária para ativação do derivatizante MTBSTFA. Mostrando que o melhor resultado foi submetendo a alíquota final com 10  $\mu$ L de MTBSTFA à 70°C por 60 minutos. Ao reproduzir essa metodologia, conseguiu-se a detecção de todos os cinco analitos de interesse. Porém com o paracetamol houve a transformação do pico que aparecia em 16,302 min (Figura 2) em dois picos derivatizados com terminologias tbdms e ditbdms, em 19,170 min e 20,600min respectivamente (Figura 1).

A utilização de mais 60 minutos de preparo de amostra apenas para derivatização se mostrou inviável para rotina laboratorial. Desta forma, avaliou-se a possibilidade da realização da derivatização “*on column*”, que consiste em injetar o derivatizante na coluna concomitante a amostra, em um intervalo de três segundos. Porém, ocorreu a impossibilidade desse tipo de injeção devido a limitação analítica. Então, optou-se por realizar o acréscimo do derivatizante logo após a ressuspensão no *insert* do *vial*. Após isso ocorreu a injeção do equipamento (Figura 3) (FELIPE; OLIVEIRA; MG, 2011).

Figura3 – Comparação entre as derivatizações



Fonte: elaborado pela autora

Observa-se na Figura 3, que as áreas obtidas dos compostos de interesse foram maiores quando a derivatização ocorreu à 70°C por 60 min. No entanto, quando comparamos suas barras de erros, baseadas no desvio padrão, observamos sobreposição entre as áreas, com exceção do aldicarbe. Também nota-se que comparando as substâncias detectadas sem derivatizar, com a derivatização na coluna, a área da derivatização na coluna mostrou-se superior. Além disso, foi observado que quando realizava-se a derivatização na coluna havia uma menor variação das áreas quando comparada a derivatização submetendo à 70°C por 60 min.

### 2.3.4 Preparo da amostra

#### 2.3.4.1 Volume de solvente

Inicialmente, foi utilizado como solvente extrator o acetato de etila, em uma proporção 1:1 de amostra. Porém, na separação entre a fase aquosa e a fase orgânica teve a ocorrência de

uma emulsão. De forma que era impossibilitado a pipetagem de um volume adequado da fase orgânica.

É evidenciado por Passagli (2018), que ao aumentar a proporção entre a fase aquosa e a orgânica, evita-se o aparecimento de emulsão. Assim, ao realizar a proporção 1:2 de fase aquosa para orgânica (1 mL de urina para 2 mL de acetato de etila) não ocorreu mais o aparecimento da emulsão.

#### 2.3.4.2 Volume de amostra

O estudo de Wozniak et al. (2018), realizou a detecção de anfetaminas no sangue e na urina. Para isso utilizou cerca de 200µL de amostra para 2 mL de acetato de etila. Na tentativa de diminuir a quantidade de amostra necessária, tentou-se reproduzir a metodologia utilizada pelo estudo. Porém, ao realizar a extração com 200 µL de amostra no pH ácido ocorreu uma diminuição significativa da recuperação (Quadro 1). Quando submetida ao mesmo pH 4 com 1 mL de urina, obteve-se recuperações de 32% para o Aldicarbe, 454% para o Malation e 70% para cocaína, não sendo detectado o ácido salicílico.

Quadro 1 – Extração utilizando volume de 200µL de amostra de urina

Substância		Aldicarbe	Paracetamol	Malation	Cocaína	Ácido Salicílico
Padrão	<i>TR</i>	7,67	20.545	19.315	22.148	19.163
	<i>Área</i>	7516017	6307834	2939701	5942963	11148093
Extração com pH 4	<i>TR</i>	7.649	-	19.404	22.148	19.157
	<i>Área</i>	819738	-	447765	235811	3822171
	<i>REC %</i>	<b>11</b>	-	<b>15</b>	<b>4</b>	<b>34</b>
Extração com pH 12	<i>TR</i>	7.675	20.587	19.357	22.139	-
	<i>Área</i>	2798775	6766507	4534824	5292382	-
	<i>REC %</i>	<b>37</b>	<b>107</b>	<b>154</b>	<b>89</b>	-

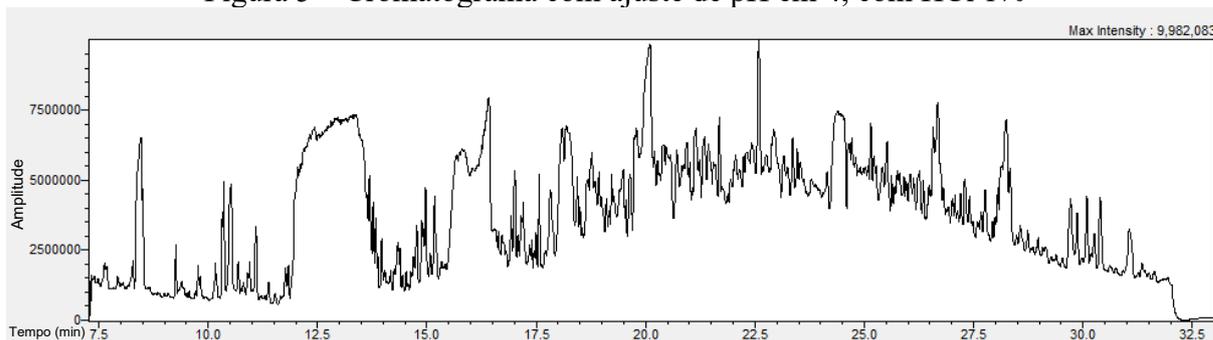
Fonte: elaborado pela autora

Legenda: REC\*: recuperação; TR: tempo de retenção

#### 2.3.4.3 pH da amostra

Em uma extração líquido-líquido o ajuste do pH do meio influencia diretamente na solubilidade dos analitos, pois podem mudar a proporção da forma ionizada e não ionizada. Então, inicialmente ajustou-se a alíquota da amostra de urina com NaOH 1 mM até atingir o pH 10 e em outra alíquota foi ajustado com HCl 1%, até chegar no pH 4. Porém, ao analisar essas amostras, após a extração, o cromatograma apresentou aumento do ruído, de forma que ficou impossibilitado a leitura dos picos (Figura 5).

Figura 5 – Cromatograma com ajuste de pH em 4, com HCl 1%



Fonte: elaborado pela autora

Desse modo, uma alternativa para conseguir ajustar o pH, foi a utilização de soluções tampões. Para o pH 12, foi utilizado o tampão fosfato e para o pH 4 o tampão acético (Quadro 2). Também foram testados o pH 10, o qual demonstrou uma menor recuperação em relação ao pH 12 (Quadro 2). Já ao ajustar o pH de 4 para 3, obtivemos um cromatograma com ruído, também impossibilitando a análise.

Quadro 2 – Extração com tampão pH 4 e pH 12

Substância		Aldicarbe	Paracetamol	Malation	Cocaína	Ácido Salicílico
Padrão	TR	7.586	19.751	19.357	22.095	19.171
	Área	15753464	5999304	672814	4390793	16817375
Extração com pH 4	TR	7.653	19.762	19.361	-	19.165
	Área	5102515	17195407	3055562	-	11902399
	REC %	32	286	454	-	70
Extração com pH 12	TR	7.680	19.726	-	22.150	-
	Área	12767866	2846883	-	3166871	-
	REC %	81	47	-	72	-
Extração com pH 10	TR	7,65	-	19.340	22.110	-
	Área	632150	-	537334	1341594	-
	REC %	4	-	79	30	-

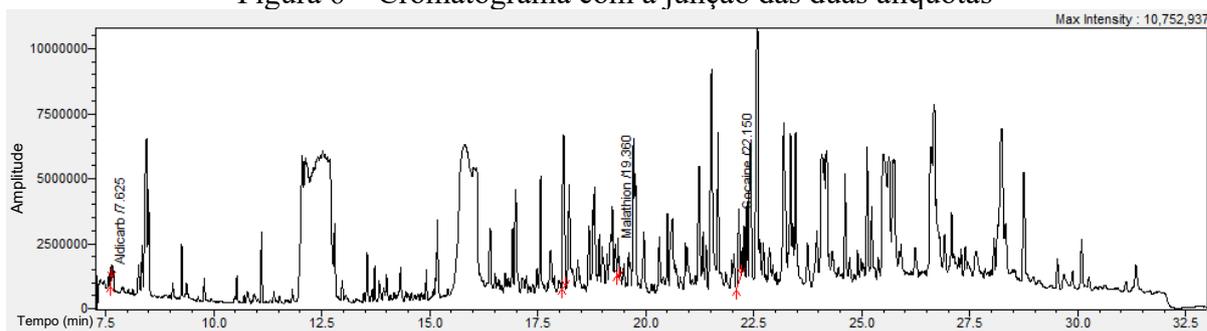
Fonte: elaborado pela autora

Legenda: REC: recuperação; TR: tempo de retenção.

#### 2.3.4.4 Junção das alíquotas

Como foi necessário a realização de uma alíquota ácida e outra básica, para cada amostra teria que realizar duas análises cromatográficas. Uma possibilidade foi a junção dos fase orgânicas sobrenatantes (etapa após a centrifugação), depois secar e ressuspender normalmente. Mas não foi possível a detecção de todas as substâncias de interesse, apenas malation, aldicarbe e cocaína, substâncias que comumente aparecem em caráter básico (Figura 6).

Figura 6 – Cromatograma com a junção das duas alíquotas



Fonte: elaborado pela autora

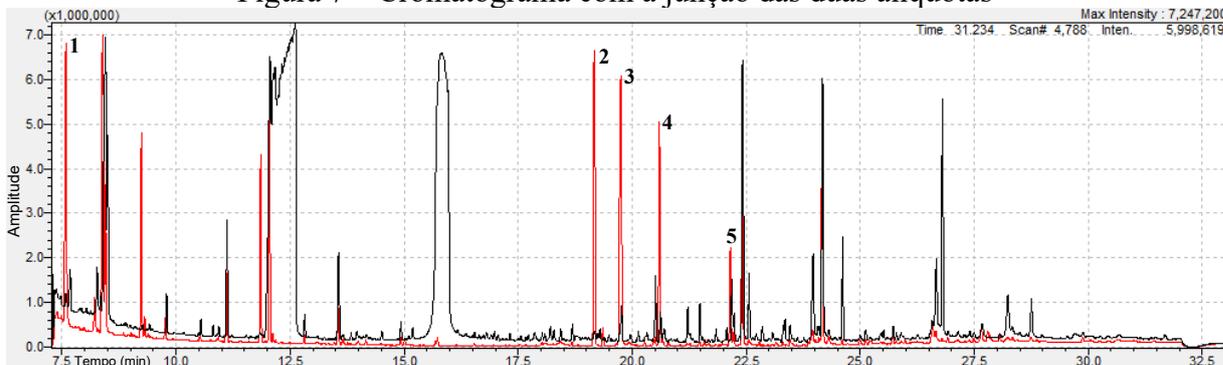
### 2.3.1 Limite de detecção

Para determinação do limite de detecção, foi realizada uma série de diluições seriadas para aquelas substâncias que eram detectadas em 500 ng/mL. Já para aquelas que não eram detectadas nessa concentração, foi necessário fazer análises seriadas mais concentradas. Chegando em uma concentração de 40 µg/mL para o aldicarbe, 1,5 µg/mL para o paracetamol, 2 µg/mL para o ácido salicílico, 1 µg/mL para o malation e 1 µg/mL para a cocaína.

### 2.3.2 Seletividade

Ao analisar os padrões dos analitos monitorados com amostras branco isentas dos analitos, observa-se que principalmente no pico da cocaína pode ter interferência com o branco. Porém, com o auxílio do espectrômetro de massas, conseguimos distinguir através da detecção dos íons específicos da cocaína (Figura 7).

Figura 7 – Cromatograma com a junção das duas alíquotas



Fonte: elaborado pela autora

Legenda: cromatograma em vermelho refere-se a injeção apenas de padrões ressuspensos em acetato de etila; cromatograma em preto refere-se a amostra branco.

1: aldicarbe; 2: ácido salicílico; 3: malation; 4: paracetamol; 5: cocaína.

### 2.3.3 Precisão

Ao analisar as amostras enriquecida com o dobro da concentração determinada no limite de detecção, nenhuma das amostras demonstrou resultado falso-negativo.

### 2.3.5 Aplicabilidade do método

Para testar a aplicabilidade do método, foram analisadas 5 amostras de pacientes com suspeita de intoxicação. Essas amostras passaram previamente pela teste de triagem de drogas de abuso por imunoensaio (TDA). Os resultados estão demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2 – Resultado da aplicabilidade do método desenvolvido em amostras reais de pacientes com suspeita de intoxicação

Casos	Histórico	Resultado do TDA*	Íons detectados sugestivos de:
1	Suspeita de intoxicação por agente indeterminado	Não detectado	Lidocaína Propofol
2	Suspeita de intoxicação por gás propano	Metanfetamina THC Cocaína Benzodiazepínicos	Isorsobida Norcetamina Cetamina Lidocaína Ibuprofeno Cocaína** Benzoilecgonina Metilecgonina Canabinol Midazolam
3	Suspeita de intoxicação por MDMA, ATC, Clonazepam, Metilfenidato, Quetiapina	MDMA ATC Anfetamina	Efavirenz Quetiapina MDA Cafeína MDMA
4	Suspeita de intoxicação por agente indeterminado	THC Barbitúricos	Lidocaína Dipirona Fenitoína Quetiapina
5	Suspeita de intoxicação por organofosforado não determinado	Benzodiazepínicos	Cetamina Lidocaína Norcetamina Flurazepam Clonazepam Propofol Fenoterol

Fonte: elaborado pela autora

\*\*Cocaína: os íons detectados foram confirmados através de uso de padrão analítico

Legenda: antidepressivo tricíclico (ATC), 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA), 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), Tetrahydrocannabinol (THC).

Substâncias testadas no TDA\*: anfetamina, barbitúricos, benzodiazepínicos, cocaína, THC, MDMA, opiáceos, antidepressivos tricíclicos, metadona, morfina, fenilciclidina e metanfetamina.

Um grande desafio para a análise toxicologia de emergência é conseguir um método abrangente que consiga detectar o maior número de substâncias possíveis, pois nem sempre é possível obter o histórico do paciente para conduzir clinicamente o caso (MOREAU;

SIQUEIRA, 2016). Um exemplo prático, é o caso 1 (Tabela 2), em que se tem uma suspeita de intoxicação, porém no TDA o resultado foi não detectado para as substâncias testadas. Já no método do presente estudo, foi possível detectar duas substâncias, propofol e lidocaína. Esses medicamentos não pertencem a nenhum grupo de substâncias pesquisadas no TDA disponível pelo laboratório.

Nos casos aplicados a metodologia, pode-se observar que em todos eles foram possíveis detectar mais substâncias do que as detectadas pelo TDA. No entanto, também se obteve substâncias das quais não foram possíveis realizar a confirmação através da ATS. Como no caso 3 (ATC) e no caso 4 (THC e barbitúricos). Uma possibilidade é a ocorrência de reação cruzada com outra substância ou até mesmo o limite de detecção do TDA ser menor que a metodologia proposta. Também foi possível notar que muitas substâncias que foram detectadas pelo TDA, foram confirmadas.

### **2.2.3 Considerações finais**

Com o crescente número de compostos disponíveis no mercado, a análise toxicológica de emergência necessita cada vez mais de metodologias que possam auxiliar na elucidação de casos de intoxicação em que o agente é desconhecido. O presente estudo demonstra a validação de um método utilizando a análise toxicológica sistemática através de CG-EM. No desenvolvimento do método, conseguiu-se uma corrida cromatográfica que fosse possível a detecção dos cinco analitos de interesse inicialmente propostos. Além de reduzir o tempo de preparo de amostra com a derivatização “*on column*”. Ademais, com o ajuste de pH proposto na etapa de preparo de amostra será possível a análise de xenobióticos de diferentes características físico-químicas. Desta forma, o método desenvolvido e validado pôde ser aplicado em amostras reais, demonstrando a adequada utilidade da técnica uma vez que em todos os casos analisados obteve-se um maior número de analitos detectados quando comparado ao teste rápido utilizado atualmente.

## REFERÊNCIAS

- Batistuzzo, J. A. d. O., Oga, S., Camargo, M. M. d. A. (2008). **Fundamentos de toxicologia**. Brasil: Atheneu.
- CIATox/SC, CENTRO DE INFORMAÇÃO E ASSISTÊNCIA TOXICOLÓGICA DE SANTA CATARINA. **Relatório anual 2022**. Florianópolis/SC: UFSC; SES/SC, 2022. Disponível em: < <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/249263>>. Acesso em: 10 de nov. 2023.
- Collins, Carol H. **Fundamentos de cromatografia**. Editora Unicamp, 2006.
- FARAJZADEH, M. A.; NOURI, N.; KHORRAM, P. Derivatization and microextraction methods for determination of organic compounds by gas chromatography. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 55, p. 14–23, mar. 2014.
- FELIPE, A.; OLIVEIRA, F.; MG, A. Análise de fluoxetine e norfluoxetine em plasma por microextração em fase líquida e CG-MS com derivatização no injector. **Universidade Federal de Alfenas**. Alfenas (MG), 2011. 75 p.
- KLAASSEN, Curtis D. *et al.* **Fundamentos em toxicologia de Casarett e Doull**. 2. ed. Porto Alegre: Amgh Editora Ltda., 2012. 460 p.
- LOOMIS, TED A., et al. **Fundamentos de toxicologia**. Acribia, 2001.
- LPTox: **Prestação de serviços**. 2023. Disponível em: <https://lptox.paginas.ufsc.br/prestacao-de-servicos/>. Acesso em: 13 jun. 2023.
- LINDEN, Rafael; SARTORI, Sander; KELLERMANN, Estefânio; SOUTO, André Arigony. Identificação de substâncias em análise toxicológica sistemática utilizando um sistema informatizado para cálculo de parâmetros cromatográficos e busca em bases de dados. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 468-475, abr. 2007. FapUNIFESP (SciELO). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422007000200040>>. Acesso em: 25 mai. 2023.
- LIZOT, L. F. et al. Determinação rápida de fármacos básicos em plasma por cromatografia a gás com detector de nitrogênio e fósforo. **Química Nova**, v. 35, n. 6, p. 1222–1227, 2012.
- MOREAU, Regina Lúcia de Moraes e SIQUEIRA, Maria Elisa Pereira Bastos de. **Toxicologia Analítica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- PAPOUTSIS, I. et al. Development and Validation of a Simple GC-MS Method for the Simultaneous Determination of 11 Anticholinesterase Pesticides in Blood-Clinical and Forensic Toxicology Applications. **Journal of Forensic Sciences**, v. 57, n. 3, p. 806–812, maio 2012.
- PASSAGLI, Marcos. **Toxicologia Forense – Teoria e Prática**, 5ª Edição. Millenium, 2018.
- PubChem**. Disponível em: < <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 10 de out. de 2023.

UNODC. United Nations Office on Drugs and Crime, **Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment Used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens**, United Nations, New York, 2009. Disponível em <[https://www.unodc.org/documents/scientific/validation\\_E.pdf](https://www.unodc.org/documents/scientific/validation_E.pdf)> Acesso em: 23 jun. 2023

VAN WIJK, Xander M. R.; GOODNOUGH, Robert; COLBY, Jennifer M.. Mass spectrometry in emergency toxicology: current state and future applications. **Critical Reviews In Clinical Laboratory Sciences**, [S.L.], v. 56, n. 4, p. 225-238, abr. 2019. Informa UK Limited. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/10408363.2019.1585415>> Acesso em: 25 mai. 2023.

STIMPFL, T. et al. Systematic toxicological analysis: Computer-assisted identification of poisons in biological materials. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**. Anais...Elsevier, 5 jun. 2003.

WIELENS BECKER, R.. Determinação de anti-inflamatórios em efluente urbano na região de Porto Alegre-RS por SPE, derivatização e CG-MS. **Universidade Federal do Rio Grande so Sul. Instituto de química. Programa de Pós-graduação em química**. 75p. 2012.

WOŹNIAK, M. K. et al. Application of gas chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of amphetamine-type stimulants in blood and urine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 148, p. 58–64, jan. 2018.