

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DAYSE FERNANDA DE SOUZA

USO DE SOLVENTES COM HIDROFILICIDADE COMUTÁVEL APLICADO À
MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA DE MEDICAMENTOS E DROGAS DE ABUSO
EM AMOSTRAS DE URINA, SANGUE TOTAL, FÍGADO E CONTEÚDO DIGESTIVO
PARA FINS FORENSES

CURITIBA

2025

DAYSE FERNANDA DE SOUZA

USO DE SOLVENTES COM HIDROFILICIDADE COMUTÁVEL APLICADO À
MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA DE MEDICAMENTOS E DROGAS DE ABUSO
EM AMOSTRAS DE URINA, SANGUE TOTAL, FÍGADO E CONTEÚDO DIGESTIVO
PARA FINS FORENSES

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção
do grau de Doutora em Química, no Curso de Pós-
graduação em Química, Setor de Exatas, da
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof.Dr. Bruno José Gonçalves da Silva

CURITIBA
2025

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Souza, Dayse Fernanda de

Uso de solventes com hidrofiliabilidade comutável aplicado à microextração em fase líquida de medicamentos e drogas de abuso em amostras de urina, sangue total, fígado e conteúdo digestivo para fins forenses / Dayse Fernanda de Souza. – Curitiba, 2025.

1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química.

Orientador: Bruno José Gonçalves da Silva

1. Solventes. 2. Drogas – Abuso. 3. Toxicologia forense. 4. Solvente de hidrofiliabilidade comutável. I. Universidade Federal do Paraná. II. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Silva, Bruno José Gonçalves da. IV. Título.

Bibliotecário: Elias Barbosa da Silva CRB-9/1894

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **DAYSE FERNANDA DE SOUZA**, intitulada: **USO DE SOLVENTES COM HIDROFILICIDADE COMUTÁVEL APLICADO À MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA DE MEDICAMENTOS E DROGAS DE ABUSO EM AMOSTRAS DE URINA, SANGUE TOTAL, FÍGADO E CONTEÚDO DIGESTIVO PARA FINS FORENSES**, sob orientação do Prof. Dr. BRUNO JOSÉ GONÇALVES DA SILVA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 25 de Julho de 2025.

Assinatura Eletrônica

28/07/2025 09:21:16.0

BRUNO JOSÉ GONÇALVES DA SILVA
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

31/07/2025 17:12:12.0

TIAGO FRANCO DE OLIVEIRA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DE PORTO ALEGRE)

Assinatura Eletrônica

30/07/2025 08:08:59.0

FREDERICO LUIS FELIPE SOARES
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

30/07/2025 09:51:33.0

CLARICE DIAS BRITTO DO AMARAL
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

01/09/2025 12:02:00.0

EDUARDO GERALDO DE CAMPOS
Avaliador Externo (SAM HOUSTON STATE UNIVERSITY)

AGRADECIMENTOS

Inicio agradecendo ao meu orientador, Prof. Bruno, que com tanta gentileza e generosidade me acolheu durante todo o meu processo de doutoramento. Aceitou me orientar mesmo eu sendo graduada em outra área, estar distante da vida acadêmica há tantos anos e de estar apenas iniciando meu caminho na área da toxicologia forense. Durante meus momentos de crise e de querer jogar tudo para o alto, além de orientador, atuou como um terapeuta, sempre me mostrando que estava tudo certo e que não havia motivos para pânico. Que bom! Sem todo esse auxílio eu não teria chegado até aqui. Prof, se todos têm um propósito na vida, acredito que está cumprindo o seu!

Agradeço imensamente ao suporte da minha família que há tantos anos aceita “conviver com a minha ausência”, e me apoia em todas as minhas decisões, incondicionalmente. Mãe, Pai, Dani, Drê, Ari amo vocês imensamente! Saber que tenho o apoio de vocês e que sempre posso voltar para os braços da família me dá forças a perseguir meus objetivos e construir minha trajetória. Obrigada por tudo, sempre!

À Carolina Schmeiske, que participou de tantos momentos importantes de minha vida, desde a graduação, sendo minha equipe de trabalhos na indústria, até a minha aprovação no concurso para perita. Carol, admiro a pessoa e profissional que você é, sou muito grata por você embarcar nas minhas ideias (vamos fazer uma pós? Vamos transformar o laboratório no melhor do mundo? Hahahah) e por você ter percorrido parte desse caminho no CroMe comigo. Agradeço sua paciência, por sempre me escutar falando sobre minha tese, discutir assuntos comigo e colaborar para o engrandecimento do meu trabalho.

Aos meus colegas da toxicologia, Ale, Cami, Davi, Du, Jefté, Marco, Sil, Rach, Vivi, que tornam os meus dias mais leves e alegres. Obrigada por fazerem da toxicologia um lugar tão gostoso de se trabalhar, de desabafar, de filosofar. Muito obrigada por todo o apoio que me deram nesses anos de doutorado, e por sempre me incentivarem a seguir em frente. Vocês são mil!!! Incluo também os colegas de outros setores, Isa, Luis, Raquel, Marina, Juliane que sempre tiveram ouvidos e bons conselhos para me dar.

Aos demais colegas do setor de toxicologia que sempre me auxiliaram nesse período, me ajudando até nas ideias mais doidas. Aqui incluo nosso técnico,

residentes, estagiários, além de colegas de outros departamentos e as auxiliares de limpeza. Foi tanta gente me apoiando que fico com medo de tentar nomear todos e acabar deixando alguém para trás. Mas vocês sabem o quanto me ajudaram e o quanto sou grata a vocês!

Aos colegas do meu grupo de doutorado, o CroMe, com os quais não tive muita convivência, mas que sempre me fizeram me sentir incluída nos momentos que participei de reuniões do grupo. Agradeço a cada conselho, conversa e troca sobre nossos trabalhos, aprendi muito nas reuniões do grupo. Aqui vai um agradecimento especial para a Andressa, que além de me ensinar a usar ferramentas importantes para o meu trabalho, foi ombro amigo.

Aos professores que participaram da minha banca de qualificação, Noemi, Gilberto e Frederico, que muito contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho. Agradeço ainda ao Frederico por tanto ter me ajudado com a quimiometria durante todo o meu percurso, sempre sendo solícito e disposto a me ajudar a entender um pouco mais sobre o assunto. Muito obrigada, Prof. Fred!

Agradeço também aos colegas de profissão, peritos e toxicologistas de outros estados que tive o prazer de conhecer participando de cursos e congressos durante esses anos. Recebi muito auxílio e ideias valiosas ao comentar despretensiosamente sobre o meu projeto de doutorado. Gratidão!

E claro, agradeço às minhas amigas, que são pessoas importantes de meu convívio, e que tiveram a paciência de aceitar meu distanciamento por precisar me dedicar a esse trabalho e mesmo assim sempre terem um ombro amigo para me escutar e acolher nos momentos em que precisava conversar. Carol, Mari, Fer, Tati, Suzi, Damila, minha prima Carol, obrigada pelas conversas, risadas, puxões de orelha e por compartilharem a vida comigo.

Por fim, um agradecimento especial à Polícia Científica do Paraná e à Academia de Ciências forenses, pela possibilidade de realizar esse trabalho.

Caminhante, não existe caminho
O caminho se faz ao caminhar

Antonio Machado

RESUMO

O preparo de amostras pode ser considerada uma das etapas mais críticas para a realização de análises toxicológicas, especialmente quando se trata de pesquisa de analitos em matrizes complexas como sangue total, fígado e conteúdo gástrico. Métodos tradicionais, embora robustos, frequentemente demandam o uso de solventes orgânicos tóxicos, prejudiciais tanto ao analista quanto ao meio ambiente. Uma alternativa crescente em preparo de amostras é o uso de solventes considerados menos tóxicos, como os solventes de hidrofilicidade comutável (SHS), que possuem a propriedade de alterar suas características de hidrofília e hidrofobicidade de acordo com o pH do meio. Este trabalho teve como objetivo desenvolver um método de microextração líquido-líquido utilizando SHS (SHS-LLME) para a extração de substâncias de interesse forense (drogas de abuso, antidepressivos e opioides) das matrizes biológicas sangue total, urina, fígado e conteúdo gástrico. abuse, antidepressants, and opioids) from whole blood, urine, liver, and gastric content. Para tanto, um planejamento factorial fracionário 2^{IV-4} foi realizado para avaliar condições significativas para serem otimizadas através de um planejamento factorial 2^3 factorial design, com triplicata do ponto central e planejamento estrela. Dois SHS foram testados, a *N-N*-dimetilciclohexilamina (DMCHA) e a trietilamina (TEA), sendo que a TEA apresentou melhores resultados. Dessa forma, o método desenvolvido, após otimização, utilizou 500 µL de amostra, 250 µL de TEA acidificada com ácido clorídrico (TEA:HCl) e 250 µL de base (NaOH) e os extratos obtidos foram analisados utilizando cromatógrafo a líquido com detector de arranjo de diodos (LC-DAD). Foi realizada a avaliação dos parâmetros de desempenho LOQ, LOD, linearidade, efeito memória, efeito matriz e seletividade, conforme Guia de Validação de Métodos em Toxicologia Forense (ANSI/ANSB 036, 2019), para as amostras de sangue e urina. Linearidade foi atingida para todos os analitos testados em sangue (codeína, 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA), metilbenzodioxolilbutanamina (MBDB), cocaína, cocaetileno, flurazepam, desipramina, nortriptilina, flunitrazepam e diazepam), com coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,99, e para 6 dos 7 analitos testados em urina, sendo eles codeína, MBDB, cocaína, cocaetileno, desipramina e nortriptilina. O método foi também obtido sucesso para a extração dos analitos de amostras de fígado e conteúdo gástrico. Por fim, o método foi aplicado em amostras provenientes de material previamente periciado pelo Laboratório de Toxicologia Forense da Polícia Científica do Paraná, sendo 24 amostras de sangue total, 7 de urina, 5 de conteúdo gástrico e 4 de fígado, demonstrando sua aplicabilidade na rotina forense.

Palavras chave: Solvente de Hidrofilicidade Comutável. SHS. SHS-LLME.

ABSTRACT

Sample preparation is considered one of the most critical steps in toxicological analyses, especially when involves the detection of analytes in complex biological matrices such as whole blood, liver, and gastric contents. Traditional methods, although robust, often require the use of toxic organic solvents, which poses risks to both the analyst and the environment. An emerging alternative in sample preparation is the use of less hazardous solvents, such as switchable hydrophilicity solvents (SHS), which have the ability of changing their hydrophilicity and hydrophobicity characteristics according to the pH of the medium. This study aimed to develop a liquid–liquid microextraction (LLME) method using a switchable hydrophilicity solvent (SHS-LLME) for the extraction of substances with forensic interest (drugs of abuse, antidepressants, and opioids) from whole blood, urine, liver, and gastric content. A fractional factorial design 2_{IV}^{8-4} was performed to evaluate significant conditions that were optimized using a 2^3 factorial design, with triplicate of the central point and a star design. Two SHSs were evaluated: N,N-dimethylcyclohexylamine (DMCHA) and triethylamine (TEA), with TEA demonstrating superior analytical performance. The optimized method employed 500 μ L of the sample, 250 μ L of TEA acidified with hydrochloric acid (TEA:HCl), and 250 μ L of NaOH. The resulting extracts were analyzed using liquid chromatography with diode array detection (LC-DAD). The performance parameters LOQ, LOD, linearity, carryover, matrix effect and selectivity, were evaluated according to the ANSI/ANSB 036 Validation Guide (2019), for the blood and urine samples. Linearity was achieved for all the analytes tested in whole blood, (codeine, 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA), methylbenzodioxolylbutanamine (MBDB), cocaine, cocaethylene, flurazepam, desipramine, nortriptyline, flunitrazepam, and diazepam), with determination coefficient (R^2) greater than 0.99. In urine, linearity was observed for six out of seven tested analytes: codeine, MBDB, cocaine, cocaethylene, desipramine, and nortriptyline. The method was also successfully applied to the analytes extraction in liver and gastric content samples. Finally, the method was applied to samples from material previously examined by the Forensic Toxicology Laboratory of the Paraná Scientific Police, being 24 whole blood samples, 7 urines, 5 gastric contents and 4 livers, demonstrating its capacity to be used in forensics routine.

Keywords: Switchable Hydrophilicity Solvent. SHS. SHS-LLME.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – RELAÇÃO DE MATRIZES BIOLÓGICAS RECEBIDAS PELO LABORATÓRIO DE TOXICOLOGIA FORENSE DA POLÍCIA CIENTÍFICA DO PARANÁ NOS ANOS DE 2023 e 2024	23
FIGURA 2 – EXEMPLO DE MÉTODO PARA ANÁLISE TOXICOLÓGICA SISTEMÁTICA	24
FIGURA 3 – MECANISMO BÁSICO DA PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS	26
FIGURA 4 – UA-DLLME	31
FIGURA 5 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DAS TÉCNICAS DE MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA	34
FIGURA 6 – SOLVENTES COM HIDROFILICIDADE COMUTÁVEL	36
FIGURA 7 – AMINAS QUE NÃO APRESENTAM A CAPACIDADE DE ALTERAR SUAS CARACTERÍSTICAS DE HIDROFILICIDADE	38
FIGURA 8 – FÓRMULA ESTRUTURAL DAS AMINAS APRESENTADAS NA TABELA 3	40
FIGURA 9 – FLUXOGRAMA DA MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO	50
FIGURA 10 – SHS-LLME-LC-DAD EM AMOSTRAS DE URINA	54
FIGURA 11 – SHS-LLME-LC-DAD EM AMOSTRAS DE SANGUE, FÍGADO E CONTEÚDO GÁSTRICO	54
FIGURA 12 – EXTRAÇÃO CONFORME MÉTODO UTILIZADO NO LFT-PCP	58
FIGURA 13 – DETECÇÃO DE ESPECTROS DE COCAÍNA E LSD EM PICO CROMATOGRÁFICO APRESENTANDO COELUIÇÃO	59
FIGURA 14 – CROMATOGRAMA OBTIDO APÓS CORRIDA REALIZADA UTILIZANDO CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS ESTABELECIDAS NO GRADIENTE 1:	60
FIGURA 15 – CROMATOGRAMA OBTIDO APÓS CORRIDA UTILIZANDO GRADIENTE 2:	60
FIGURA 16 – CROMATOGRAMA OBTIDO APÓS CORRIDA UTILIZANDO GRADIENTE 3:	61
FIGURA 17 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA OS ENSAIOS 8 e 16	66
FIGURA 18 – ESTRUTURA QUÍMICA DAS MOLÉCULAS DOS ANALITOS ESTUDADOS, pKa E LogP	67
FIGURA 19 – EFEITOS CALCULADOS <i>versus</i> PROBABILIDADE CUMULATIVA ..	73

FIGURA 20 – CROMATOGRAMA OBTIDO PARA O ENSAIOS 16	76
FIGURA 21 – GRÁFICO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DOS FATORES VOLUME DE TEA:HCl E VOLUME DE AMOSTRA (a) E VOLUME DE NaOH E VOLUME DE AMOSTRA (b) E VOLUME DE TEA:HCl E NaOH (c)	81
FIGURA 22 – MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA COM SOLVENTE DE HIDROFILICIDADE COMUTÁVEL	82
FIGURA 23 – COMPARAÇÃO DAS ÁREAS DOS PICOS OBTIDOS PARA MICROEXTRAÇÃO DE URINA PURA E URINA DILUÍDA (n=3).....	85
FIGURA 24 – CROMATOGRAMA OBTIDO APÓS PREPARO DE AMOSTRA DILUÍDA E SEM DILUIÇÃO	86
FIGURA 25 – AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL DILUÍDAS COM ÁGUA ULTRAPURA (1:5 E 1:10) APÓS REALIZAÇÃO DA MICROEXTRAÇÃO - SEM SEPARAÇÃO DAS FASES	87
FIGURA 26 – EXTRAÇÃO DE AMOSTRA DE SANGUE TOTAL APÓS PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS COM ACETONITRILA – SEM SEPARAÇÃO DE FASES.	87
FIGURA 27 – DIFERENTES RESULTADOS QUALITATIVOS PARA PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS COM SULFATO DE ZINCO EM AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL PROVENIENTES DE DIFERENTES ORIGENS.	88
FIGURA 28 – DIFERENTES FORMAS DE PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS EM AMOSTRA DE SANGUE TOTAL	89
FIGURA 29 – SOBRENADANTES APÓS PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS COM DIFERENTES TEMPOS DE CENTRIFUGAÇÃO	91
FIGURA 30 – MÉDIA DAS ÁREAS DOS PICOS DE COCAÍNA E COCAETILENO APÓS CENTRIFUGAÇÃO NOS TEMPO DE 5, 10, 15 E 20 MINUTOS	91
FIGURA 31 – PRÉ-PREPARO DE AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL	92
FIGURA 32 – DIFERENTES RESULTADOS APÓS PRÉ PREPARO DE AMOSTRAS DE FÍGADO.....	93
FIGURA 33 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS APÓS SHS-LLME-LC-DAD APÓS DIFERENTES FORMAS DE PRÉ PREPARO DO FÍGADO.....	94
FIGURA 34 – ASPECTO VISUAL DAS AMOSTRAS DE FÍGADO APÓS DIFERENTES TEMPOS DE CENTRIFUGAÇÃO.....	95

FIGURA 35 – MÉDIA DAS ÁREAS DOS PICOS DE NORTRIPTILINA, FLUNITRAZEPAM E DIAZEPAM APÓS CENTRIFUGAÇÃO NOS TEMPO DE 5, 10, 15 E 20 MINUTOS	96
FIGURA 36 – CROMATOGRAMA DE FÍGADO FORTIFICADO APÓS SHS-LLME-LC-DAD.....	97
FIGURA 37 – COMPARAÇÃO DE EXTRAÇÃO OBTIDA POR MÉTODO DESENVOLVIDO POR PRAGST, (2004) E SHS-LLME-LC-DAD.....	98
FIGURA 38 – COMPARAÇÃO DE EXTRAÇÃO COM E SEM ETAPA PRÉVIA DE PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS	99
FIGURA 39 – CURVAS ANALÍTICAS DE CODEÍNA, MDA, MBDB, COCAÍNA, COCAETILENO, FLURAZEPAM, DESIPRAMINA, NORTRIPTILINA, FLUNITRAZEPAM E DIAZEPAM EM SANGUE TOTAL (n=5)	101
FIGURA 40 – CURVAS ANALÍTICAS DE CODEÍNA, MDA, MBDB, COCAÍNA, COCAETILENO, DESIPRAMINA, NORTRIPTILINA, EM URINA (n=5).....	103
FIGURA 41 – EFEITO MEMÓRIA (SANGUE E URINA).....	111
FIGURA 42 – EXEMPLO DE CROMATOGRAMA DE URINA BRANCO	112
FIGURA 43 – COMPARAÇÃO DAS CURVAS ANALÍTICAS CONSTRUÍDAS EM URINA E ÁGUA ULTRAPURA PARA OS ANALITOS DESIPRAMINA, NORTRIPTILINA, COCAÍNA E COCAETILENO (n=3)	112

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – CONCENTRAÇÃO TERAPÊUTICA E LETAL DE ALGUNS MEDICAMENTOS E DROGAS DE ABUSO DE INTERESSE FORENSE	21
TABELA 2 – ALGUNS ESTUDOS REALIZADOS NOS ULTIMOS CINCO ANOS PARA PESQUISA DE SUBSTÂNCIAS DE INTERESSE FORENSE	28
TABELA 3 – ARTIGOS PUBLICADOS REFERENTES AO DESENVOLVIMENTO DE TÉCNICA DE SHS-LLME.....	39
TABELA 4 – SOLVENTES ESTUDADOS NESSE TRABALHO E SUAS RESPECTIVAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS.....	41
TABELA 5 – GRADIENTE DE ELUIÇÃO TESTADOS (% EM VOLUME).....	49
TABELA 6 – MATRIZ DE ENSAIOS REALIZADOS PARA O PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO 2_{IV}^{8-4} , definido por $I=1248=1358=2368=1237$	51
TABELA 7 – MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3 , COM TRIPLICATA DO PONTO CENTRAL MAIS PLANEJAMENTO ESTRELA	52
TABELA 8 – NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DAS CURVAS ANALÍTICAS DE DESIPRAMINA, NORTRIPTILINA, COCAÍNA, MDA, CODEÍNA, COCAETILENO E MBDB EM URINA	55
TABELA 9 – NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DAS CURVAS ANALÍTICAS DE CODEÍNA, COCAÍNA, COCAETILENO, FLURAZEPAM, NORTRIPTILINA, FLUNITRAZEPAM, MDA, MBDB, DESIPRAMINA, E DIAZEPAM EM SANGUE.....	56
TABELA 10 – PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS PARA OS ANALITOS NO GRADIENTE 3	62
TABELA 11 – CONDIÇÕES ÓTIMAS DE TRABALHO ESTABELECIDAS PELOS AUTORES DAS REFERÊNCIAS CITADAS NA TABELA 3 (ITEM 2.3.2):	64
TABELA 12 – PARÂMETROS AVALIADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO 2_{IV}^{8-4}	65
TABELA 13 – VALORES DE DESEJABILIDADE.....	70
TABELA 14 – EFEITOS PRINCIPAIS E EFEITOS DE SEGUNDA ORDEM CALCULADOS A PARTIR DO PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO 2_{IV}^{8-4}	71
TABELA 15 – OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE EXTRAÇÃO UTILIZANDO PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3 COM PLANEJAMENTO ESTRELA E TRIPLICATA DO PONTO CENTRAL	75

TABELA 16 – IDENTIFICAÇÃO DOS PICOS VISTOS NOS CROMATOGRAMAS DOS ENSAIOS OBTIDOS APÓS PLANEJAMENTO FATORIAL MAIS PLANEJAMENTO ESTRELA E TRIPLICATA DO PONTO CENTRAL (ENSAIOS 1 – 17).....	77
TABELA 17 – VALORES DE DESEJABILIDADE PARA O PLANEJAMENTO FATORIAL MAIS PLANEJAMENTO ESTRELA E TRIPLICATA DO PONTO CENTRAL	77
TABELA 18 – ANÁLISE DA VARIÂNCIA PARA AVALIAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE RESPOSTA.....	79
TABELA 19 – SELEÇÃO DOS EFEITOS SIGNIFICATIVOS	80
TABELA 20 – ANÁLISE DA VARIÂNCIA PARA AVALIAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE RESPOSTA CONSIDERANDO EFEITOS SIGNIFICATIVOS.....	80
TABELA 21 – VOLUME RECUPERADO DE EXTRATO ORGÂNICOS APÓS SHS-LLME REALIZADA DEPOIS DE DIFERENTES FORMAS DE PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	89
TABELA 22 – VOLUME RECUPERADO DE EXTRATO ORGÂNICOS APÓS SHS-LLME REALIZADA DEPOIS DE DIFERENTES FORMAS DE PRÉ TRATAMENTO DAS AMOSTRAS DE FÍGADO	93
TABELA 23 – LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO E DE DETECÇÃO PARA OS ANALITOS EM ESTUDO EM SANGUE.....	105
TABELA 24 – LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO E DE DETECÇÃO PARA OS ANALITOS EM ESTUDO EM URINA.....	106
TABELA 25 – FAIXA DE LINEARIDADE E F CALCULADO PARA AS CURVAS OBTIDAS (F TABELADO = 7,71).....	107
TABELA 26 – PRECISÃO E EXATIDÃO DAS CURVAS ANALÍTICAS EM URINA	107
TABELA 27 – LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO E DE DETECÇÃO PARA OS ANALITOS EM ESTUDO	108
TABELA 28 – EFEITO MATRIZ CALCULADO PARA OS ANALITOS DESIPRAMINA, NORTRIPTILINA, COCAÍNA E COCAETILENO EM AMOSTRAS DE URINA	113
TABELA 29 – TESTE DE SELETIVIDADE – RESOLUÇÃO. Em negrito os compostos de interesse deste trabalho.	114
TABELA 30 – pKa E LogP DAS MOLÉCULAS NÃO DETECTADAS NO TESTE DE SELETIVIDADE.....	116
TABELA 31 – APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO EM CASOS REAIS .	117

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN - Acetonitrila

AINE - Anti-inflamatórios Não Esteroidais

ATR - Amitriptilina

ATS - Análise Toxicológica Sistemática

BZE - Benzoilecgonina

CE - Conteúdo Estomacal

CER - Cérebro

CG - Conteúdo Gástrico

COC - Cocaína

COD - Codeína

COR - Coração

CQA - Controle de Qualidade Alto

CQB - Controle de Qualidade Baixo

CQM - Controle de Qualidade Médio

CV - Coeficiente de Variação

D - Desejabilidade global

DAD - Detector de Arranjo De Diodos

DART-HRMS - *Direct Analysis In Real-Time tandem High-Resolution Mass Spectrometry* – Análise Direta em Tempo Real em Espectrometria de Massas de Alta Resolução

DBMA- *N-N*-dimetilbenzilamina

di - Desejabilidade individual

DLLME - *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction* – Microextração Líquido-Líquido Dispersiva

DMCHA- *N-N*-dimetilciclohexilamina

DPA - Dipropilamina

DPR - Desvio Padrão Relativo

DPX – *Disposable Pipette Extraction* – Extração em Pipeta Descartável

DZP - Diazepam

EM - Efeito Matriz

ETIL - Cocaetileno

FAAS – *Flame Atomic Absorption Spectrometry* - Espectrômetro de Absorção Atômica em Chama

FE - Fase Estacionária

FIG - Fígado

FM - Fase Móvel

GC – *Gas Chromatography* – Cromatografia a Gás

GC-FID – *Gas Chromatography with Flame Ionization Detector* - Cromatógrafo a Gás com Detector de Ionização de Chama

GC-MS – *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* - Cromatógrafo a Gás acoplado a Espectrômetro de Massas

GFAAS – *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry* - Espectrômetro de Absorção Atômica em Forno de Grafite

HF-LPME - *Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction* - Microextração em Fase Líquida com Fibra Oca

LC – *Liquid Chromatography* – Cromatografia Líquida

LC-DAD – *Liquid Chromatography-Diode Array Detector* - Cromatógrafo a Líquido com Detector de Arranjo de Diodos

LC-MS – *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* - Cromatógrafo a Líquido acoplado a Espectrômetro de Massas

LC-UV - *Liquid Chromatography-Ultraviolet Detection* - Cromatógrafo a Líquido com Detector no Ultravioleta

LLE - *Liquid-liquid extraction* – Extração Líquido-Líquido

LOD - *Limit of Detection* - Limite de Detecção

LOL - *Limit of Linearity* - Limite de Resposta Linear

LOQ - *Limit of Quantification* - Limite de Quantificação

LPME - *Liquid Phase Microextraction* – Microextração em Fase Líquida

LSD - *Lysergic Acid Diethylamide* - Dietilamida do Ácido Lisérgico

LTF-PCP - Laboratório de Toxicologia Forense da Polícia Científica do Estado do Paraná

MBDB - Metilbenzodioxolilbutanamina

MDA - 3,4-Metilenodioxianfetamina

MDMA - 3,4-Metilenodioximetanfetamina

MeOH - Metanol

NA - Não Aplicável

ND - Não Detectado

NR - Não Realizado

NSP- Novas Substâncias Psicoativas

NTR - Nortriptilina

pI - Ponto isoelétrico

PPT - Precipitação de proteínas

PUL - Pulmão

QuEChERS – Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe – Rápido, Fácil, Barato, Eficaz, Robusto e Seguro.

Rs - Resolução

SALLE - *Salt-Assisted Liquid-Liquid Extracton* – Extração Líquido-Líquido Assistida por Sal

sd - desvio padrão

SDME – *Single-Drop Microextraction* – Extração em Gota Única

SG – Sangue

SHS - Switchable Hidrofilicity Solvent - Solvente com Hidrofilicidade Comutável

SHS:HCl - Solvente de hidrofilicidade comutável acidificado

Sinan - Sistema de Informações de Agravos e Notificações

SLE - *Supported Liquid Extraction* – Extração Líquida Suportada

SPE-*Solid Phase Extraction* – Extração em Fase Sólida

SPME – *Solid Phase Microextraction* – Microextração em Fase Sólida

TEA – Trietilamina

UA-DLLME - *Ultrasound Assisted Dispersive Liquid-Liquid Microextraction* - Microextração Líquido-Líquido Dispersiva Assistida por Ultrassom

UA-LLE - *Ultrasound-assisted liquid-liquid extraction* – Extração Líquido-Líquido Assistida por Ultrassom

UR - Urina

UV - Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 TOXICOLOGIA FORENSE	20
2.2 MATRIZES BIOLÓGICAS E EFEITO MATRIZ.....	24
2.3 ANÁLISE TOXICOLÓGICA SISTEMÁTICA (ATS).....	28
2.4 MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA.....	33
2.4.1 Microextração com solvente de hidrofiliabilidade comutável.....	35
2.4.2 Critérios para a seleção do SHS	37
3 OBJETIVOS	43
3.1 OBJETIVO GERAL	43
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
4 MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1 REAGENTES E PADRÕES ANALÍTICOS	44
4.2 EQUIPAMENTOS	45
4.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE PADRÕES ANALÍTICOS (SOLUÇÃO ESTOQUE) E SOLUÇÕES DE TRABALHO (AMOSTRAS FORTIFICADAS).....	46
4.3.1 Para avaliação das condições cromatográficas:	46
4.3.2 Para avaliação das variáveis do processo de microextração:	47
4.3.3 Para a otimização das etapas de microextração.....	47
4.3.4 Para aplicação do método desenvolvido em matrizes biológicas:.....	47
4.4 PREPARO DA SOLUÇÃO EXTRATORA (SHS:HCl)	48
4.5 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	49
4.6 AVALIAÇÃO DAS VARIÁVEIS DO PROCESSO DE MICROEXTRAÇÃO.....	50
4.7 OTIMIZAÇÃO DAS ETAPAS DE MICROEXTRAÇÃO	51
4.8 CÁLCULO DA DESEJABILIDADE DA RESPOSTA ANALÍTICA	53

4.9 APLICAÇÃO DO MÉTODO DE MICROEXTRAÇÃO DESENVOLVIDO EM AMOSTRAS DAS MATRIZES BIOLÓGICAS AVALIADAS	53
4.10 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS ANALÍTICOS DE DESEMPENHO	54
4.10.1 LOQ, LOD e Linearidade	55
4.10.2 Precisão e Inexatidão	56
4.10.3 Efeito Memória	57
4.10.4 Efeito Matriz	57
4.11 COMPARAÇÃO ENTRE A SHS-LLME E EXTRAÇÃO REALIZADA NO LTF-PCP	58
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	59
5.2 DESENVOLVIMENTO DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO VIA SHS-LLME	63
5.2.1 Avaliação das variáveis do processo de microextração	63
5.3 OTIMIZAÇÃO DA MICROEXTRAÇÃO	74
5.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO DE MICROEXTRAÇÃO DESENVOLVIDO EM URINA	84
5.5 APLICAÇÃO DO MÉTODO DE MICROEXTRAÇÃO DESENVOLVIDO EM AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL	86
5.6 APLICAÇÃO DO MÉTODO DE MICROEXTRAÇÃO DESENVOLVIDO EM AMOSTRAS DE FÍGADO	92
5.7 APLICAÇÃO DO MÉTODO DE MICROEXTRAÇÃO DESENVOLVIDO EM AMOSTRAS DE CONTEÚDO GÁSTRICO	99
5.8 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS ANALÍTICOS DE DESEMPENHO EM SANGUE E URINA	100
5.8.1 LOQ, LOD e Linearidade	100
5.8.2 Precisão e Inexatidão	107
5.8.3 Efeito Memória	110
5.8.4 Efeito Matriz (EM)	111
5.8.5 Seletividade	114

5.9 APLICAÇÃO DO MÉTODO DE MICROEXTRAÇÃO DESENVOLVIDO EM AMOSTRAS DE CASOS REAIS	117
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO	121
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123
ANEXO 1	131
ANEXO 2-A	133
ANEXO 2-B	135

1 INTRODUÇÃO

A toxicologia forense apresenta um papel essencial para auxiliar a elucidação da causa da morte em contexto criminal, uma vez que seu papel é a identificação de substâncias químicas (como drogas, medicamentos, pesticidas etc.) que poderiam estar envolvidas na morte ou prejuízo à saúde de indivíduos. Para isso, é necessário o uso de técnicas analíticas que possibilitem a extração e detecção dessas substâncias a partir de amostras biológicas, uma vez que a única prova de intoxicação se dá pela identificação do agente tóxico em órgão do indivíduo exposto (Dorta *et al.*, 2018).

Um dos maiores desafios da toxicologia forense é a busca dessas substâncias químicas desconhecidas em amostras muito complexas, como sangue, urina, fígado e conteúdo gástrico, que apresentam uma diversidade de componentes em sua composição. Dessa forma, o preparo de amostras é etapa crucial para a realização da análise toxicológica, sendo ideal uma técnica que permita que os analitos sejam concentrados e que haja a remoção dos interferentes, que podem vir a prejudicar a sensibilidade, reprodutibilidade e robustez da metodologia. Para tanto, diversos estudos nesse campo são realizados, inclusive utilizando técnicas miniaturizadas de extração, como a microextração líquido-líquido (LLME).

A LLME é uma técnica que envolve dois líquidos imiscíveis, sendo que o objetivo é que os analitos migrem da amostra (matriz aquosa) para o solvente orgânico. Historicamente, os solventes orgânicos utilizados podem ser considerados como tóxicos e poluentes, sendo prejudiciais tanto para o analista quanto para o meio ambiente. Por isso, novas alternativas de solventes vêm sendo avaliadas, como os solventes de hidrofiliabilidade comutável (SHS), os quais tem a propriedade de alterar suas características de hidrofiliabilidade de acordo com o pH do meio. SHS básicos (como aminas, por exemplo) são líquidos hidrofóbicos em condições normais, mas têm a capacidade de alterar sua característica para hidrofílico, quando em pH ácido, e retornar para o estado hidrofóbico com o ajuste do pH para básico. Já os SHS ácidos são hidrofóbicos em pH ácido e hidrofílicos em pH básico. Devido a simplicidade, baixo custo e baixo consumo de solvente, estudos com SHS se mostram como uma alternativa interessante para serem utilizados na LLME, sendo que seu uso para extração de substâncias químicas de amostras biológicas vem sendo explorada pela comunidade científica, principalmente utilizando amostras de plasma e urina.

Nesse contexto, esse trabalho propõe o desenvolvimento de um método de SHS-LLME para a extração de substâncias de interesse forense, como drogas de abuso (como cocaína e anfetaminas), antidepressivos, opioides e benzodiazepínicos, de amostras biológicas geralmente disponíveis para a realização de análises toxicológicas, sendo elas: sangue total, urina, fígado e conteúdo gástrico. Com isso, objetiva-se a detecção de uma variedade de analitos que usualmente podem estar envolvidos em caso de intoxicação exógena utilizando para isso solventes menos agressivos, como a trietilamina, além de explorar a aplicação do uso de SHS em amostras biológicas ainda pouco exploradas, como sangue total, fígado e conteúdo gástrico. Para tanto, foram utilizadas ferramentas estatísticas da quimiometria, como o planejamento fatorial fracionário e planejamento fatorial com ponto central mais planejamento estrela, para que as condições ótimas do método desenvolvido fossem alcançadas com a realização de um menor número de experimentos que, além dos benefícios experimentais, permite a realização do trabalho com menor exposição à solventes e gerando menos resíduos para o meio ambiente.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 TOXICOLOGIA FORENSE

A toxicologia é a ciência que estuda os efeitos nocivos decorrentes de interações de substâncias químicas com o organismo, sob condições específicas de exposição (Oga; Camargo; Batistuzzo, 2021). A toxicologia forense é definida como a aplicação da toxicologia para os propósitos da lei, sendo que sua aplicação mais comum é a identificação de substâncias que poderiam estar envolvidas em morte (ou prejuízos à saúde de indivíduos) ou ser a causa de danos à propriedade e ao meio ambiente. Dessa forma, os achados toxicológicos são utilizados em processos criminais como forma de auxiliar o sistema judiciário (Dorta *et al.*, 2018).

O princípio básico da toxicologia forense, estabelecido por Joseph Jacob Plenck, diz que a única prova de intoxicação se dá pela identificação do agente tóxico em órgão do indivíduo exposto (Dorta *et al.*, 2018). Para tanto, a toxicologia forense está intimamente ligada à química analítica, uma vez que utiliza suas técnicas para a determinação qualitativa e/ou quantitativa de agentes tóxicos nas amostras. Os analitos, nestes casos, são os agentes tóxicos presentes no organismo, ou seus produtos de biotransformação, enquanto as amostras utilizadas consistem em matrizes biológicas, como fluidos corporais (Poklis, 2001).

A condição ideal de um laboratório forense seria a possibilidade de pesquisa de todas as substâncias potencialmente tóxicas nas amostras de interesse, entretanto isso seria impraticável em uma rotina real de trabalho. Dessa forma, é importante que se guie as análises de acordo com informações fornecidas pelo remetente da amostra, mas essas nem sempre estão disponíveis. Uma forma de se definir as substâncias de maior importância para serem consideradas durante a realização da triagem toxicológica é a avaliação de dados epidemiológicos da região da ocorrência da intoxicação (Pragst; Herzler; Erxleben, 2004).

Dados epidemiológicos disponibilizados pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) mostram que, das 216.647 notificações de intoxicação exógena recebidas até o ano de 2023 no Brasil, 56,7% foram causadas por medicamentos e 11,6% por drogas de abuso. Os 31,7% de notificações restantes são divididas entre agente tóxico ignorado (8,3%), alimentos e bebidas (4,5%), agrotóxicos agrícolas (2,4%), raticidas (2,5%) dentre outros.

Considerando-se os dados disponibilizados pelo Sinan apenas para o estado do Paraná, até 2023, 57,3% dos casos de intoxicação foram causados por medicamentos e 16,6% por drogas de abuso. Estes dados demonstram a importância de técnicas apropriadas para extração, pré-concentração, detecção e identificação de substâncias pertencentes às classes de medicamentos e drogas de abuso para a Toxicologia Forense.

Antidepressivos e benzodiazepínicos são importantes classes de medicamentos de interesse forense, principalmente devido à alta em suas prescrições após a pandemia de COVID-19. Como consequência, essas substâncias são frequentemente encontradas em casos de interesse forense, como intoxicações fatais, mortes acidentais, suicídios e acidentes de trânsito, além de serem utilizadas como drogas facilitadoras de crimes e violência sexual (Barone *et al.*, 2023). Opióides também apresentam grande relevância, uma vez que são analgésicos com grande potencial de induzir à dependência, e são utilizados também como drogas de abuso (Dorta *et al.*, 2018). A concentração terapêutica e letal de alguns medicamentos e drogas de abuso de interesse forense são demonstradas na TABELA 1.

TABELA 1 – CONCENTRAÇÃO TERAPÊUTICA E LETAL DE ALGUNS MEDICAMENTOS E DROGAS DE ABUSO DE INTERESSE FORENSE

Classe	Substância	Concentração terapêutica (medicamentos)/ “usual” (em usuários de drogas) (ng mL ⁻¹ de sangue)	Concentração letal (ng mL ⁻¹ de sangue)
Antidepressivos	Desipramina	10-500	3000
	Imipramina	50-350	1500-2000
	Nortriptilina	70-170	1000-3000
Benzodiazepínicos	Diazepam	100-2000	3000-5000*
	Flunitrazepam	5-150	300
	Flurazepam	75-165	500-2800
	Lorazepam	30-250	300-500*
	Nitrazepam	30-100	5000
Opióides	Codeína	30-250	450-2000
Drogas de abuso	Cocaína	50-300	900-21000
	MDA	-	1800-26000
	MDMA	100-350	400-800
	LSD	0,5-5	2-5

* Concentração tóxica

FONTE: Adaptado de Schulz *et al.* (2020)

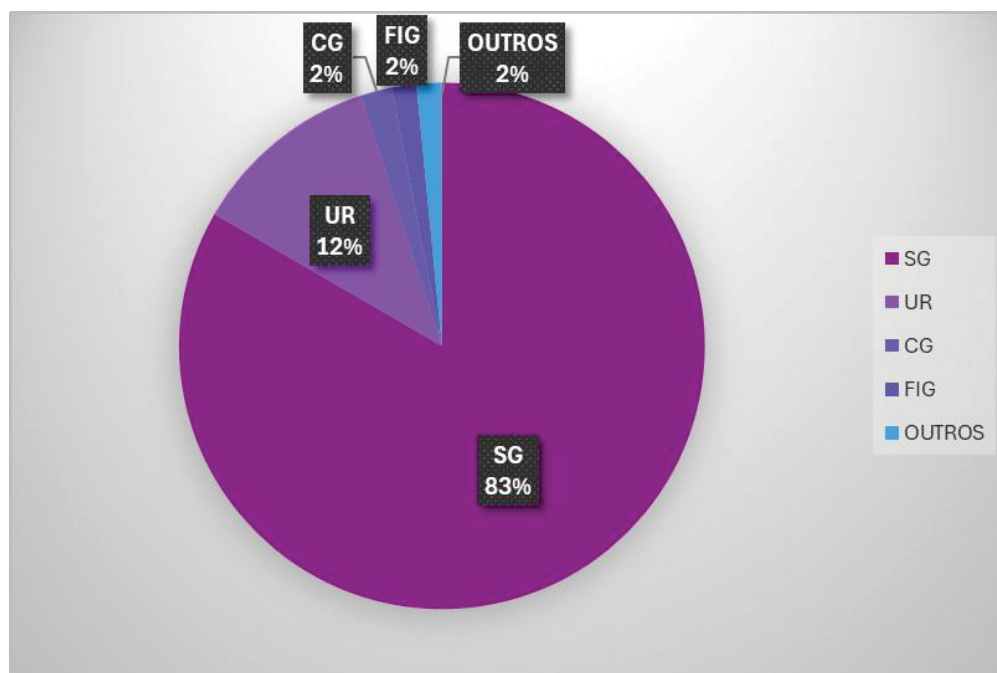
LEGENDA: MDA: 3,4-Metilenodioxianfetamina; MDMA: 3,4-Metilenodioximetanfetamina; LSD: Dietilamida do ácido lisérgico

As matrizes biológicas mais utilizadas nas análises toxicológicas são amostras de sangue. Para indivíduos vivos geralmente utiliza-se soro ou plasma, já em cadáveres a amostra mais utilizada é o sangue total, já que a separação das células e do soro plasmático normalmente não é possível (Skopp, 2010). O sangue total apresenta uma grande variedade de compostos endógenos (como ácidos graxos e colesterol) que, embora também presentes no soro e no plasma, nestes últimos estão em quantidades muito menores (Jickells; Negrusz, 2008).

Outras matrizes comumente utilizadas são a urina, conteúdo gástrico, fígado e humor vítreo, sendo que cada uma tem suas características específicas que devem ser consideradas no momento da seleção da matriz, objetivos da análise e da interpretação dos resultados. Como exemplo, o fígado é o mais importante para a toxicologia *post mortem*, entretanto seu alto teor de gordura, caracterizado como interferente nas análises, dificulta o preparo da amostra (Jickells; Negrusz, 2008).

No contexto deste trabalho, e como exemplo, a matriz biológica mais recebida pelo Laboratório de Toxicologia Forense da Polícia Científica do Estado do Paraná (LTF-PCP) tem sido o sangue total, conforme demonstrado FIGURA 1, com base nos dados disponíveis no laboratório, referente a análises realizadas entre os anos 2023 e 2024. Das 19.269 amostras de matrizes biológicas recebidas nesse período, 83% correspondem a amostras de sangue, 12% amostras de urina, 2% amostras de fígado, 1,5% amostras de conteúdo gástrico.

FIGURA 1 – RELAÇÃO DE MATRIZES BIOLÓGICAS RECEBIDAS PELO LABORATÓRIO DE TOXICOLOGIA FORENSE DA POLÍCIA CIENTÍFICA DO PARANÁ NOS ANOS DE 2023 e 2024



FONTE: A autora (2025)

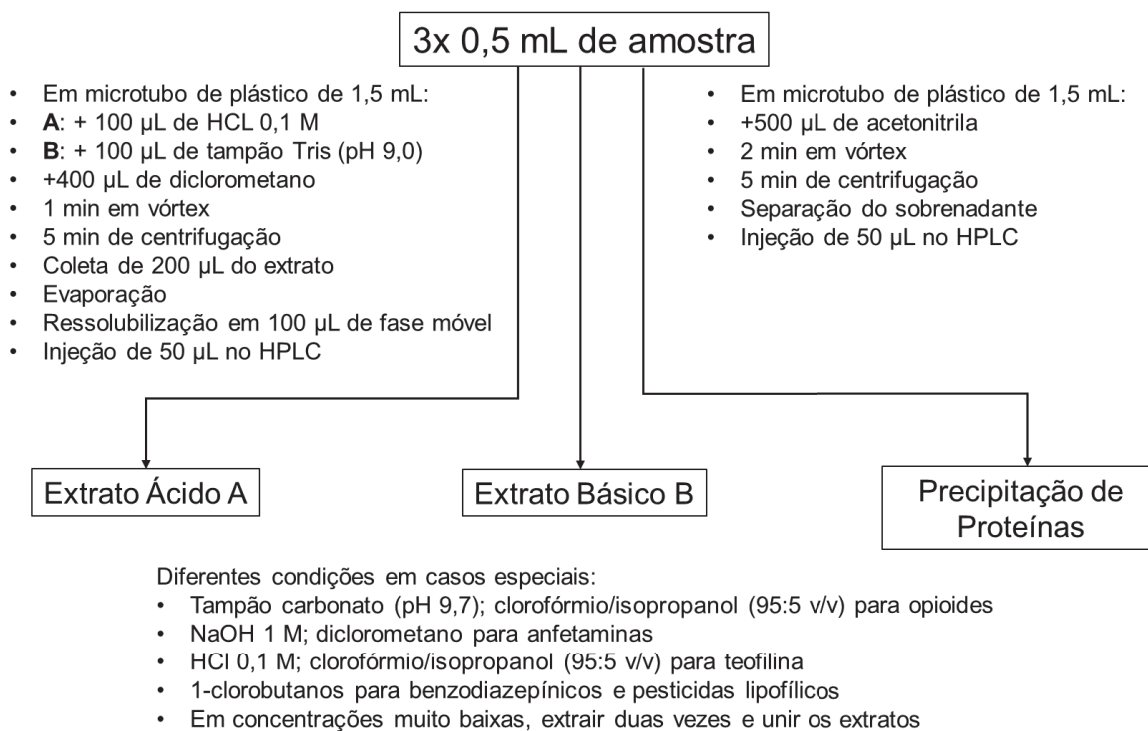
LEGENDA: SG: Sangue; UR: Urina; CG: Conteúdo Gástrico; Outros (Rim; Pulmão; Cérebro; Coração).

A complexidade dos fluidos biológicos e a presença dos analitos que podem estar presentes em concentrações de traços exigem o uso de um método de limpeza (*“clean up”*) e pré-concentração de amostra eficiente antes de sua análise instrumental, a fim de minimizar o efeito matriz, aumentar a seletividade e sensibilidade do método e prevenir danos ao equipamento. Além disso, a remoção dos principais interferentes da amostra resulta em um bom controle da composição do extrato final, o que melhora a reprodutibilidade e a robustez das análises. Adicionalmente, é altamente desejável ter um único procedimento de extração que seja aplicável a uma grande variedade de amostras com o mínimo de modificações (se houver) devido a diferenças que possam existir entre matrizes, como força iônica, teor de gordura, etc. (Hassan; Alshana, 2019).

Para isso, utiliza-se a Análise Toxicológica Sistemática (ATS), que pode ser definida como um método de varredura (*screening*) que busca por substâncias potencialmente nocivas, cuja presença é incerta e a identidade é desconhecida (De Zeeuw, 1997). Como não existe um método analítico universal, que seja capaz de detectar todas as substâncias tóxicas existentes, métodos de triagem geral, mais flexíveis, são necessários, por serem aplicáveis a uma ampla variedade de

substâncias (Jickells; Negrusz, 2008). Um método simples e rápido para a realização de ATS, conforme Pragst; Herzler; Erxleben (2004), está demonstrado na FIGURA 2:

FIGURA 2 – EXEMPLO DE MÉTODO PARA ANÁLISE TOXICOLÓGICA SISTEMÁTICA



FONTE: Adaptado de Pragst; Herzler; Erxleben, (2004)

Conforme dito anteriormente, não existe um método analítico universal, que seja capaz de detectar todas as substâncias tóxicas existentes, sendo possível observar no exemplo apresentado na FIGURA 2, que diferentes tipos de extratos são necessários para aumentar a possibilidade de detecção do agente tóxico, uma vez que, nesse ponto, suas características físico-químicas não são conhecidas.

2.2 MATRIZES BIOLÓGICAS E EFEITO MATRIZ

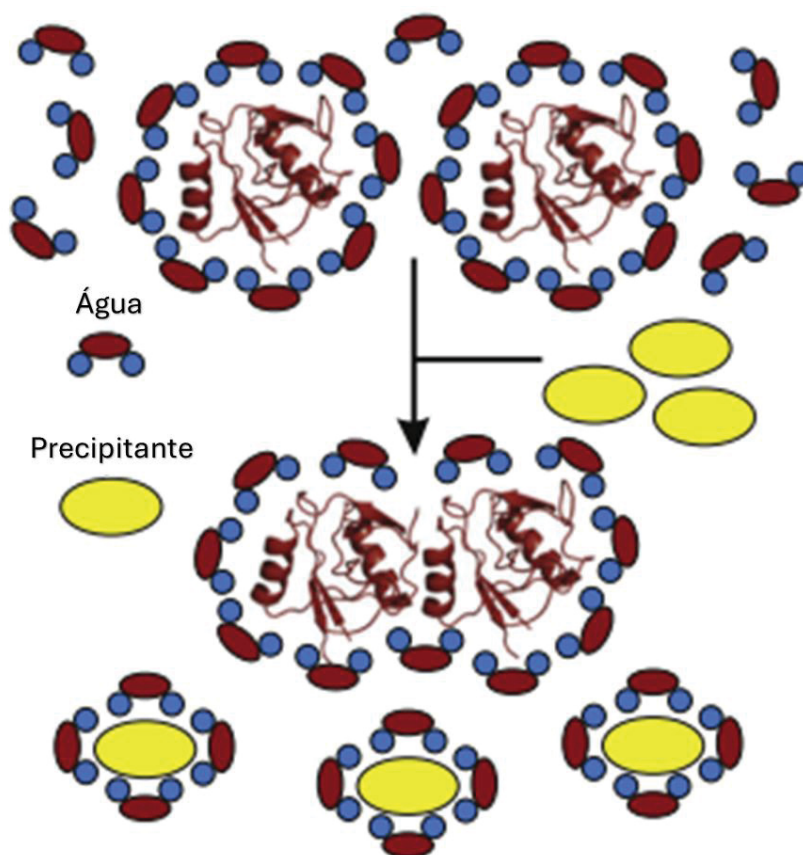
O sangue total é provavelmente a matriz biológica mais utilizada na análise de drogas para fins forenses, uma vez que o sangue total possui correlação direta entre as concentrações do analito e os efeitos observados no indivíduo. Apesar de ser uma matriz complexa, é relativamente homogênea, e permite a detecção de substâncias na sua forma inalterada (Silveira *et al.*, 2019). Entretanto, o sangue total apresenta uma grande variedade de compostos endógenos, sendo que sua composição é: majoritariamente água, seguido de corpúsculos (glóbulos brancos,

vermelhos e plaquetas), proteínas, fibrinogênio, gordura, ácidos graxos e NaCl (Perovani *et al.*, 2023).

Uma ferramenta útil ao se trabalhar com sangue total é a precipitação de proteínas, que promove um *clean-up* e rompimento da interação entre o analito e as proteínas, sendo utilizada como forma de preparo de amostra ou como precursora de outras metodologias de preparo de amostras. A solubilidade de proteínas resulta de interações polares com o solvente aquoso, interações iônicas com sais e forças eletrostáticas repulsivas entre moléculas com carga semelhante. No ponto isoelétrico (pI), não há carga líquida em uma proteína e, consequentemente, a proteína tem solubilidade mínima em solvente aquoso. Acima do pI, uma proteína tem carga líquida negativa, enquanto abaixo do pI, tem carga líquida positiva (Polson *et al.*, 2003).

Dessa forma, precipitantes de solventes orgânicos diminuem a constante dielétrica da solução de proteínas plasmáticas, o que aumenta as interações eletrostáticas entre proteínas. O solvente orgânico também desloca as moléculas de água ordenadas ao redor das regiões hidrofóbicas na superfície da proteína. As interações hidrofóbicas entre proteínas são minimizadas como resultado do solvente orgânico circundante, enquanto as interações eletrostáticas tornam-se predominantes e levam à agregação de proteínas. Reagentes ácidos formam sais insolúveis com os grupos amino carregados positivamente das moléculas de proteína em pHs abaixo de seu pI. As proteínas são precipitadas de soluções com altas concentrações de sal à medida que os íons de sal se hidratam e as moléculas de água disponíveis diminuem, afastando a água das regiões hidrofóbicas da superfície da proteína, o que, por sua vez, resulta na agregação de moléculas de proteína por meio de interações hidrofóbicas proteína-proteína. A ligação de íons metálicos carregados positivamente reduz a solubilidade da proteína, alterando pI. Os íons metálicos competem com os prótons da solução pelos sítios de ligação de coordenação nos aminoácidos expostos. Os íons metálicos de ligação mais fortes deslocam os prótons dos sítios de ligação, resultando na redução do pH da solução. A combinação da alteração do pI da proteína e da redução do pH geralmente resulta na precipitação de proteínas (Polson *et al.*, 2003). A FIGURA 3 demonstra o mecanismo básico da precipitação de proteínas.

FIGURA 3 – MECANISMO BÁSICO DA PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS



FONTE: Adaptado de Novák; Havlíček (2016)

Já a urina é composta principalmente por água (95%), seguido por ureia (2%), creatinina (0,1%), ácido úrico (0,03%), e outros íons e moléculas. As proteínas são encontradas em quantidades muito menores em comparação com seus valores no sangue (Sarigul; Korkmaz; Kurultak, 2019). A eficiência da extração dos analitos pode variar por vários motivos. Por exemplo, variações no pH da urina afetam tanto a eliminação de muitos fármacos quanto a eficiência da extração quando os efeitos no equilíbrio ácido/base do fármaco são significativos. Variações na força iônica também podem ter um efeito significativo na extração de fármacos (Lord; Pawliszyn, 2000). A urina é uma matriz muito útil para análises toxicológicas, uma vez que é formada predominantemente por água e apresenta poucas substâncias endógenas. No entanto, existem três desvantagens com a urina em exames *post mortem*: (1) a urina está disponível em apenas cerca de 50% dos óbitos, pois é bastante comum sua eliminação durante o processo de morte; (2) muitas drogas são metabolizadas tão extensivamente que a droga original não é detectada na urina ou está presente apenas em uma concentração relativamente baixa; (3) difícil interpretação das

concentrações urinárias, uma vez que a urina não é um fluido circulante, mas sim um resíduo coletado na bexiga. Dessa forma, as concentrações de fármacos e seus produtos de biotransformação na urina dependem do tempo de formação da urina em relação à coleta e à ingestão do analito (Jickells; Negrusz, 2008).

O fígado é um dos maiores órgãos do corpo humano, sendo que o tecido hepático é composto majoritariamente por hepatócitos, que correspondem a 80% do peso total do fígado (Solhi *et al.*, 2021). A principal função dos hepatócitos constitui a síntese e metabolização de proteínas, bem como a metabolização de lipídeos, carboidratos, desintoxicação e ativação de células imunes para manter a homeostase do fígado (Gong *et al.*, 2023). Do ponto de vista da toxicologia forense, o fígado é o órgão mais importante quando o sangue não está disponível, devido à grande quantidade de tecido disponível, a facilidade de coleta e a relativa facilidade de maceração da amostra em comparação com outros tecidos (Jickells; Negrusz, 2008). Adicionalmente, muitas drogas e fármacos (principalmente de caráter básico) tendem a se concentrar no fígado, apresentando uma concentração de 10 a 100 vezes superior à do sangue (Jones; Singer, 2008). Entretanto, devido à sua natureza, muitos lipídeos podem contribuir para a ocorrência do efeito matriz, além de poderem prejudicar os equipamentos utilizados (Cox *et al.*, 2020). Dessa forma, um preparo de amostra é essencial para se trabalhar com essa matriz.

O estômago é o órgão responsável por realizar a digestão mecânica e química de seu conteúdo, realizando a quebra de grandes moléculas orgânicas em suas partes componentes, ou seja, carboidratos em monossacarídeos, proteínas em aminoácidos e triglicerídeos em ácidos graxos e glicerol, formando o conteúdo gástrico, o qual é especialmente importante para a toxicologia forense em casos de intoxicação exógena por via oral, uma vez que essa matriz geralmente apresenta altas concentrações do agente toxicante nesses casos (Politi *et al.*, 2004) ainda não metabolizados (Peres; Nascimento; Pelição, 2019). A desvantagem de trabalhar com conteúdo gástrico é a variação de sua composição, que vai de um fluido aquoso ralo a um semissólido, dependendo da quantidade e do tipo de alimento presente. Adicionalmente, o conteúdo gástrico raramente é homogêneo e, portanto, é recomendado que o conteúdo seja homogeneizado antes de seu uso (Jickells; Negrusz, 2008). Portanto, um preparo de amostra adequado possibilita a diminuição da presença de compostos interferentes que pode vir a prejudicar a análise cromatográfica.

2.3 ANÁLISE TOXICOLÓGICA SISTEMÁTICA (ATS)

A ATS ocorre em três etapas: i) preparo da amostra, com isolamento e concentração das substâncias de interesse; ii) separação e detecção dos compostos; iii) identificação (De Zeeuw, 1997).

O preparo de amostra geralmente é realizado com o uso de solventes orgânicos, realizando-se a extração líquido-líquido (LLE – *liquid liquid extraction*) ou pelo uso de materiais adsorventes, realizando-se a extração em fase sólida (SPE-*solid phase extraction*) (Oga; Camargo; Batistuzzo, 2021). Já para a separação, detecção e identificação dos compostos, os procedimentos analíticos utilizados nas análises toxicológicas geralmente combinam métodos cromatográficos com métodos espectroscópicos. Os métodos cromatográficos mais empregados são a cromatografia líquida (LC – *liquid chromatography*) e cromatografia gasosa (GC – *gas chromatography*). Com relação aos métodos espectroscópicos e espectrométricos, destacam-se os detectores por absorção molecular no ultravioleta, visível e infravermelho, bem como a espectrometria de massas (MS – *mass spectrometry*) (Dorta *et al.*, 2018).

Devido à grande importância associada ao preparo da amostra, muitos estudos de aspecto forense vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de desenvolver técnicas de extração mais eficientes. Sumariza-se, na TABELA 2, alguns estudos realizados nos últimos cinco anos (de 2020 a 2024), para pesquisa de substâncias de interesse forense, de acordo com a matriz estudada, técnica de extração e de detecção:

TABELA 2 – ALGUNS ESTUDOS REALIZADOS NOS ULTIMOS CINCO ANOS PARA PESQUISA DE SUBSTÂNCIAS DE INTERESSE FORENSE (Continua)

Matriz	Analitos	Técnica de extração	Técnica Analítica	Referência
Sangue total	60 drogas e produtos de biotransformação	SPE	LC-MS/MS	(Al-Asmari, 2020)
Sangue total e urina	40 benzodiazepínicos e 3 Z-drugs	SPE	LC-MS/MS	(Sofalvi <i>et al.</i> , 2020)
Sangue total	15 Psicotrópicos	mini-QuEChERS	UHPLC-MS/MS	(Da Silva <i>et al.</i> , 2021)
Sangue total	Benzodiazepínicos e Z-drugs	LLE	LC-MS/MS	(Banaszkiewicz <i>et al.</i> , 2020)

TABELA 2 – ALGUNS ESTUDOS REALIZADOS NOS ULTIMOS CINCO ANOS PARA PESQUISA DE SUBSTÂNCIAS DE INTERESSE FORENSE (Conclusão)

Matriz	Analitos	Técnica de extração	Técnica Analítica	Referência
Fluido oral	Drogas de abuso	SPE e SALLE	LC-MS/MS	(Gorziza, 2020)
Urina	Δ^9 -THC-COOH	LLE	GC-MS	(Oliveira, 2022)
Urina	Metadona	UA-LLE	GC-MS	(Shekari, 2020)
Fígado	Fentanil e produtos de biotransformação	QuEChERS	LC-MS/MS	(Cox <i>et al.</i> , 2020)
Urina	Diazinon	DLLME	LC-DAD	(Mohammadzaheri <i>et al.</i> , 2020)
Sangue total	Anfetaminas	PPT	LC-MS/MS	(Cunha <i>et al.</i> , 2021)
Sangue total	13 antidepressivos	SLE	UHPLC-MS/MS	(Ma <i>et al.</i> , 2021)
Sangue total	Anfetaminas	HF-LLME	GC-MS	(Bombana <i>et al.</i> , 2020)
Plasma	Clozapina	DLLME	GC-MS	(Cabarcos-Fernández <i>et al.</i> , 2022)
Fluido oral	33 drogas psicoativas	SPE	UHPLC-MS/MS	(Mercier <i>et al.</i> , 2022)
Sangue	39 analitos (drogas e medicamentos)	DPX	UHPLC-MS	(Mata; Davis, 2022)
Urina e plasma	12 hipnóticos sedativos	SPE	LC-MS/MS	(An <i>et al.</i> , 2023)
Sangue total	9 análogos de opioides	LLME	UHPLC-MS/MS	(Schüller <i>et al.</i> , 2023)
Sangue total (post mortem)	15 pesticidas	PPT	UHPLC-MS/MS	(Matos, <i>et al.</i> , 2024)
Sangue total	10 benzodiazepínicos	UA-DLLME	DART-HRMS	(Antonio <i>et al.</i> , 2024)
Cordão umbilical	Cocaína	DLLME	GC-MS	(De Paula Meirelles <i>et.al</i> , 2024)

FONTE: A autora (2024)

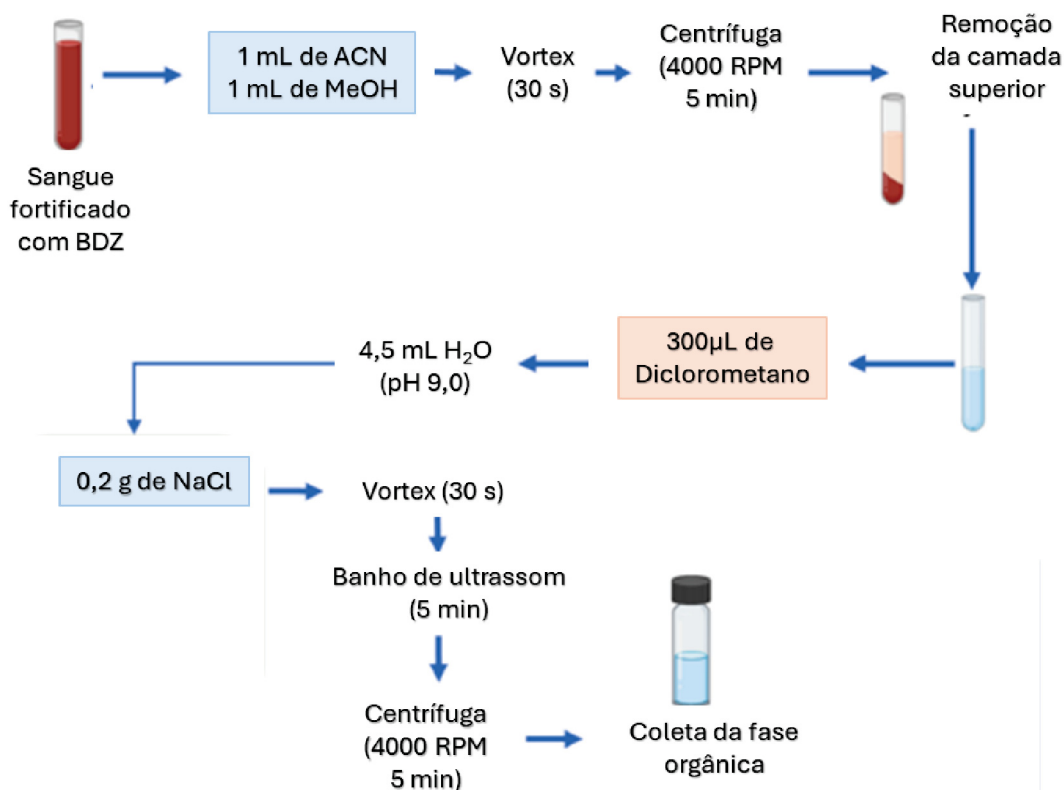
LEGENDA: SPE: solid-phase extraction; QuEChERS – Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe; SPME-solid-phase microextraction; LLE: liquid-liquid extraction; DPX: disposable pipette extraction; SALLE-salt-assisted liquid-liquid extracton; UALLE-ultrasound-assisted liquid-liquid extraction; DLLME-dispersive liquid-liquid microextraction; HF-LLME-hollow-fiber liquid-liquid microextraction; UA-DLLME-ultrasound assisted dispersive liquid-liquid microextraction; LLME: Liquid liquid microextraction; PPT: precipitação de proteínas; SLE: Supported Liquid Extraction

Nos exemplos apresentados na TABELA 2, o preparo de amostras foi realizado tanto utilizando técnicas de extração em fase líquida, quanto em fase sólida, sendo que ambas as técnicas apresentam vantagens e desvantagens. Um dos principais objetivos do desenvolvimento de novas técnicas de preparo de amostras é, além de provar sua sensibilidade e reprodutibilidade, utilizar metodologias menos agressivas ao meio ambiente, sendo através da miniaturização das técnicas (utilizando menos amostra e/ou menos solvente), do desenvolvimento de extração sem solventes, o uso de solventes menos tóxicos, dentre outros (Silveira *et al.*, 2019).

A maioria dos estudos foi realizada em sangue total, tendo em vista a importância dessa matriz no contexto forense. Al-Asmari (2020) e Solfavi *et al.* (2020) propuseram métodos baseados em SPE para a detecção de uma ampla janela de analitos (60 drogas/ produtos de biotransformação e 40 benzodiazepínicos/3 drogas Z, respectivamente), sendo a possibilidade de realizar a detecção de diferentes analitos em uma mesma análise uma grande vantagem, já que reduz a necessidade de realizar diferentes preparos de amostra. An *et al.* (2023) e Mercier *et al.* (2022) também desenvolveram métodos para a pesquisa de vários analitos utilizando SPE, em urina/plasma e fluido oral, respectivamente. Os estudos tiveram como objeto a detecção de 33 drogas psicoativas em fluido oral e 12 benzodiazepínicos em amostras de plasma e urina, sendo que a escolha das matrizes os torna adequados para toxicologia clínica e monitoramento do uso de drogas e medicamentos.

Já Antonio *et al.* (2024) estudaram a extração de 10 benzodiazepínicos de amostras de sangue total, utilizando uma variação da técnica de LLME, a UA-DLLME (*ultrasound-assisted dispersive liquid liquid microextraction* – microextração líquido-líquido dispersiva assistida por ultrassom). Para tanto, 1 mL de ACN foi utilizada como agente precipitante e 1 mL de MeOH como agente dispersante, 300 µL de diclorometano foi utilizado como solvente extrator e 0,2 g de NaCl foi utilizado para a obtenção do efeito *salting-out*, conforme demonstrado na FIGURA 4.

FIGURA 4 – UA-DLLME



Fonte: Adaptado de Antonio *et al.* (2024)

Após a obtenção do extrato, a análise foi realizada por DART-HRMS (*direct analysis in real-time tandem high-resolution mass spectrometry* – análise direta em tempo real em espectrometria de massas de alta resolução), que permite a detecção de analitos de forma muito rápida. Dessa forma, Antonio *et al.* foram capazes de desenvolver um método de preparo de amostra, associado a um método rápido para detecção dos analitos, sendo necessário apenas 1 min para a aquisição de dados no espectrômetro de massas.

Mohammadzaheri *et al.* (2020) também desenvolveram um método de preparo de amostra utilizando a técnica de DLLME para a extração do pesticida diazinon, de amostras de urina. Dos exemplos citados, este trabalho foi o único a não utilizar a espectrometria de massas para a detecção dos compostos, e sim utilizou a cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos. Para o preparo da amostra, foi utilizado uma mistura de 800 µL de metanol (solvente dispersor) e 310 µL de tolueno (solvente extrator). O extrato orgânico foi coletado após a centrifugação e, após seco e ressolubilizados em fase móvel, 20 µL foram injetados em LC-DAD. Os autores concluíram que foi possível o desenvolvimento de um método rápido e simples

para a extração e detecção de diazinon em amostras de urina, com limite de detecção de 0,15 µg/mL.

Alguns estudos foram realizados utilizando matrizes alternativas, como fígado e cordão umbilical. Para a análise de fentanil e seus produtos de biotransformação em fígado, Cox *et al.* (2020) utilizaram QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe – rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro) com o objetivo de diminuir o efeito matriz da amostra de fígado. Já De Paula Meirelles *et al.* (2024) desenvolveram um método, utilizando DLLME, para a detecção de cocaína em cordão umbilical. Sabe-se que algumas mulheres realizam o uso da droga durante a gravidez e, geralmente, esse fato somente é identificado através de entrevista realizada com a mãe. Entretanto, esse dado nem sempre é confiável, uma vez que muitas mulheres podem não reportar o uso da droga por medo ou vergonha, sendo a análise do cordão umbilical de grande valia nesses casos. O método desenvolvido utilizou 500 ± 20 mg de cordão umbilical combinando com 2 mL de tampão de fosfato de sódio 0,1 mol/L, homogeneizados em ultraturrax. O tecido homogeneizado foi centrifugado e o sobrenadante (900 µL) foi transferido para um Eppendorf, no qual adicionou-se 2 mL de diclorometano:isopropanol:hidróxido de amônio (50:48:2), seguido de agitação e centrifugação. Coletou-se 1,2 mL de extrato, o qual foi transferido para vial e seco sob fluxo de nitrogênio. Os analitos foram derivatizados com 1,1,2,2,3-pentafluoropropano e anidrido pentafluoropropiônico (30 µL de cada) em um bloco de aquecimento a 70 °C por 30 minutos. Após a secagem sob fluxo de nitrogênio, o extrato foi ressolubilizados com 25 µL de acetato de etila e injetado no GC-MS. Foi possível a detecção de cocaína e seus produtos de biotransformação (benzoilecgonina, cocaetileno, ecgonina metil-éster e norcocaína) do cordão umbilical de mulheres que faziam o uso crônico de cocaína, mas não foi possível a detecção nos casos em que houve uso esporádico da droga.

O LTF-PCP atualmente utiliza a técnica de ATS desenvolvida por Pragst e colaboradores (2004), no qual a microextração em fase líquida (LLME – *liquid liquid microextraction*) é utilizada como método de preparo da amostra. Para separação, detecção e identificação dos compostos de interesse, é empregada a cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos (LC-DAD) através da comparação com tempos de retenção relativo e dos espectros de absorção obtidos em condições padronizadas com uma biblioteca de referência. O uso de LC-DAD apresenta algumas vantagens como a elevada flexibilidade da LC, que permite a determinação de

compostos de baixa volatilidade e reduzida estabilidade térmica. Adicionalmente, o DAD não detecta diversos compostos endógenos que não possuem absorção significativa em comprimento de onda acima de 195 nm, como ácidos graxos, colesterol, lipídeos e carboidratos, irrelevantes para as análises para fins toxicológicos e forenses (Dorta *et al.*, 2018).

Como foi possível observar na TABELA 2 a maioria dos estudos recentes utiliza para separação, detecção e identificação de compostos a técnica de cromatografia acopladas à espectrometria de massas, devido à grande sensibilidade e possibilidade de detecção de traços de compostos em amostras complexas. Entretanto, como a maioria dos laboratórios de Toxicologia Forense no Brasil não possuem estas tecnologias, fica clara a importância do desenvolvimento e validação de metodologias utilizando equipamentos mais tradicionais e com menor custo, como o LC-DAD pós etapa de preparo de amostras.

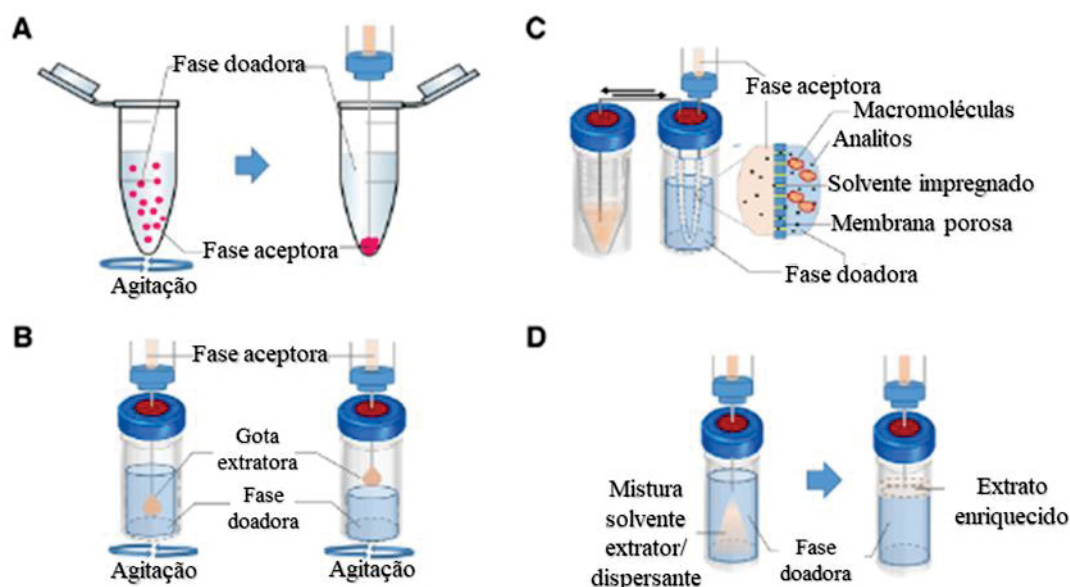
2.4 MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA

A extração em fase líquida (LLE – *liquid liquid extraction*) é um dos processos mais clássicos e mais amplamente utilizados no preparo de amostras até hoje. Essa técnica envolve a distribuição dos componentes da matriz entre dois líquidos imiscíveis, objetivando que os analitos sejam removidos da matriz aquosa para um solvente orgânico (Luiz; Maciel; Lanças, 2015). Apesar da grande aplicação, essa técnica exibe uma série de desvantagens como: a) possibilidade de formação de emulsão, acarretando um tempo prolongado para a separação de fases; b) quantidade relativamente altas de amostra e solventes orgânicos, gerando problemas de descarte; c) utilização de solventes orgânicos tóxicos; d) processo suscetível a erros e, relativamente, de difícil automação (Queiroz; Collins; Jardim, 2001).

Portanto, com intuito de suprimir as desvantagens supracitadas, técnicas miniaturizadas de preparo de amostras têm sido constantemente desenvolvidas, com o intuito de utilizar apenas alguns microlitros de amostra e de solvente como fase extratora. Diversas estratégias têm sido estudadas como alternativas para a miniaturização da técnica de LLE, merecendo destaque: (i) a LLME (*liquid-liquid microextraction*), (ii) a extração em gota única (*single-drop microextraction* – SDME), (iii) a microextração em fase líquida com fibra oca (*hollow fiber liquid phase microextraction* - HF-LPME) e a (iv) microextração líquido-líquido dispersiva

(*dispersive liquid-liquid microextraction* - DLLME), sendo possível ver um esquema representativo dessas técnicas na FIGURA 5.

FIGURA 5 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DAS TÉCNICAS DE MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA



LEGENDA – A: microextração líquido-líquido (LLME); B: microextração em gota única (SDME); C: microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME); D: microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)

FONTE: Adaptado de Burato *et al.* (2020)

Uma desvantagem dessas técnicas é o uso de solventes orgânicos, mesmo que em menores quantidades que na LLE, e a pobre seletividade no processo de extração. Historicamente, solventes orgânicos convencionais, como hexano, acetato de etila, clorofórmio, diclorometano, acetona, entre outros, são amplamente utilizados tanto nas técnicas de LLE quanto LLME. Entretanto, a maioria desses solventes são reconhecidos como tóxicos e poluentes (Burato *et al.*, 2020), e, dessa forma, uma das possibilidades de melhoria das técnicas de microextração para preparo de amostras é a aplicação de solventes alternativos, os quais seguem os princípios da química verde, (Bazel; Rečlo; Chubirka, 2020) resultando em alternativas mais seguras e eficientes (Wilson; Stewart, 2014). Neste campo, estudos com solventes de hidrofilicidade comutável vêm ganhando cada vez mais espaço e atenção.

2.4.1 Microextração com solvente de hidrofilicidade comutável

O uso de solventes com hidrofilicidade comutável (SHS - *Switchable Hydrophilicity Solvent*) foi introduzido em 2005 por Jessop e colaboradores como uma classe de solventes de extração para aplicações em grande escala (Hassan; Alshana, 2019; Jessop *et al.*, 2005).

Os SHSs são solventes ácidos ou básicos com propriedades de alterar suas características hidrofílicas/hidrofóbicas (e consequentemente sua solubilidade em amostras aquosas) de acordo com o pH do meio, devido a mudanças estruturais que ocorrem nas moléculas em soluções com diferentes valores de pH. Por exemplo, os SHS básicos, representados principalmente por aminas secundárias ou terciárias, apresentam, em condições normais, propriedades hidrofóbicas e em ambientes ácidos, propriedades hidrofílicas, uma vez que o equilíbrio se desloca para o lado de dominância de formas iônicas, que apresentam boa solubilidade em água. Com o aumento dos valores de pH, o equilíbrio se desloca para o lado de dominância da forma molecular, caracterizada por uma solubilidade limitada em meio aquoso, o que leva à formação de sistemas bifásicos (Bazel; Rečlo; Chubirka, 2020).

Uma das possibilidades para que essa classe de solventes alterne do estado hidrofóbico para o hidrofílico é a adição de CO₂, sendo que sua remoção faz com que o solvente retorne ao estado hidrofóbico, conforme demonstrado na FIGURA 6. A remoção do CO₂ é realizada pela adição de soluções alcalinas concentradas ou aspersão de gases como nitrogênio e argônio (Bazel; Rečlo; Chubirka, 2020). O gás carbônico é considerado o reagente ideal, devido a seu baixo custo, baixa toxicidade e facilidade de separação do meio de reação (Ezoddin; Abdi; Lamei, 2016; Lasarte-Aragonés *et al.*, 2015b; Vanderveen; Durelle; Jessop, 2014). A equação de equilíbrio da reação está demonstrada na sequência (eq. 1) (Vanderveen *et al.*, 2018).

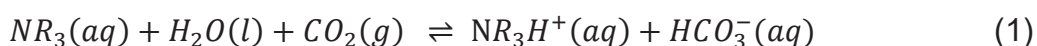
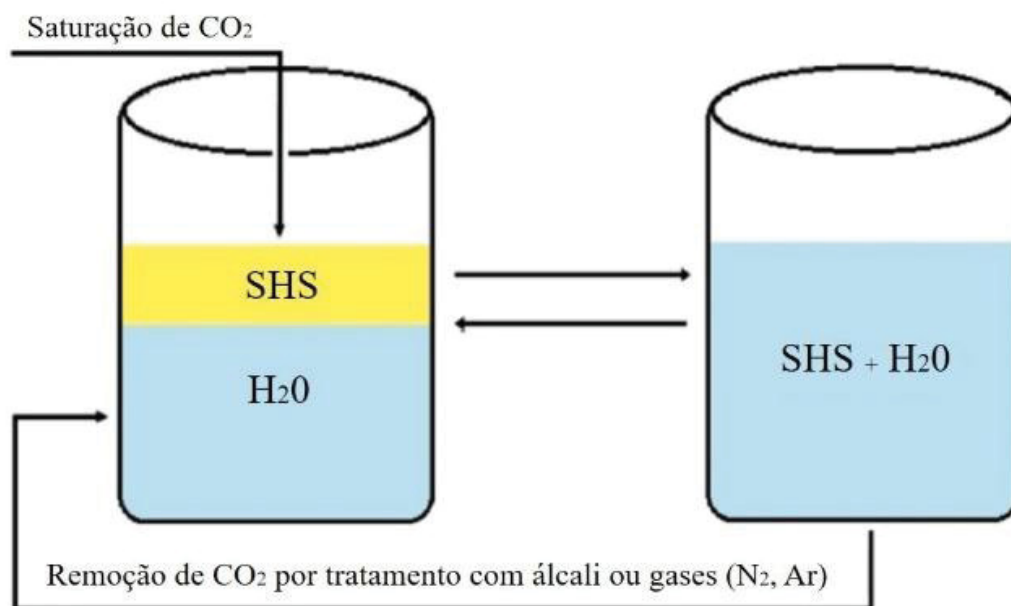


FIGURA 6 – SOLVENTES COM HIDROFILICIDADE COMUTÁVEL



FONTE: Adaptada de Bazel (2020).

As transições de formas de SHS de hidrofílica para hidrofóbica geralmente são realizadas usando gelo seco e álcali; no entanto, abordagens alternativas são conhecidas, como, por exemplo, o uso de sais de carbonato e ácido sulfúrico ou hidróxido de sódio e ácido perclórico (Wilson; Stewart, 2014). Como exemplo, Xu e colaboradores (2018) utilizaram ácido clorídrico como agente protonador do SHS e hidróxido de sódio para seu retorno ao estado hidrofóbico, para a determinação de onze drogas (meperidina, cocaína, diazepam, clozapina, cetamina, zolpidem, metaqualona, tramadol, codeína, papaverina e clordiazepóxido) em urina.

A relativa simplicidade de tais transformações permite o uso de SHS em química analítica para a separação/concentração de substâncias e sua determinação subsequente por combinação com técnicas instrumentais cromatográficas ou espectroscópicas (Bazel; Rečlo; Chubirka, 2020). Apesar de conhecido desde 2005 (Jessop et al., 2005), seu uso como solvente para técnicas de microextração foi relatado pela primeira vez apenas em 2015, por Lasarte-Aragonés *et al.* (2015b) Neste trabalho, os autores utilizaram *N,N*-dimetilciclohexilamina como SHS pra a extração de benz(a)traceno de amostras de água (de rio, da torneira e engarrafada).

A microextração líquido-líquido utilizando solvente de hidrofiliabilidade comutável, chamada de SHS-LLME (*switchable hydrophilicity solvent-based – liquid liquid microextraction*), vem recebendo cada vez mais atenção para preparo de

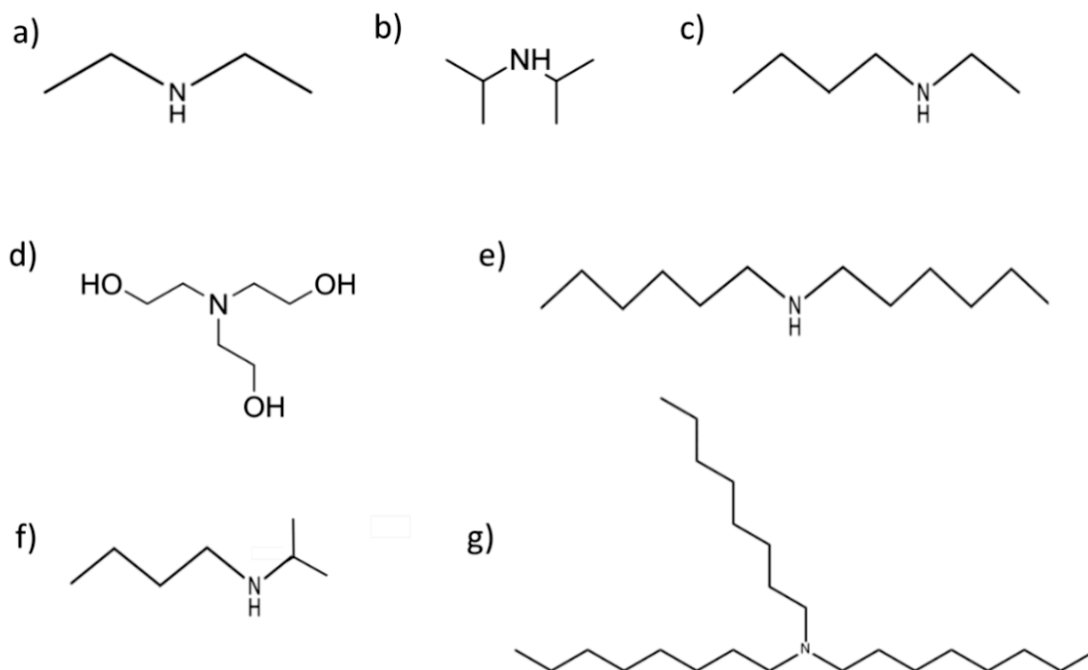
amostras por apresentar vantagens de alcançar um equilíbrio de partição mais rapidamente, extração eficiente, simplicidade, baixo custo e baixo consumo de solvente. Trata-se de um procedimento simples de duas etapas: (i) completa miscibilidade das fases aceptora e doadora, que fornece uma ampla superfície de contato para extração, e (ii) separação em duas fases apenas com adição ou remoção de um reagente particular (Ahmar *et al.*, 2018).

De acordo com a literatura, os SHSs podem ser categorizados como “solventes verdes” (Ahmar et al., 2018; Ezoddin; Abdi; Lamei, 2016) uma vez que, esses solventes são, na maioria dos casos, menos inflamáveis e menos voláteis que os solventes orgânicos tradicionais (Shiri; Shiri, 2021).

2.4.2 Critérios para a seleção do SHS

Os solventes mais comumente utilizados como SHS básicos são aminas, entretanto, nem todas as aminas podem ser utilizadas para esse fim. Algumas aminas, como dietilamina, diisopropilamina, butiletilamina e trietanolamina são capazes de formar sistemas homogêneos em meio aquoso, no entanto não são capazes de retornar a um sistema de duas fases. Já outras aminas, como diexilamina, butilisopropilamina e trioctilamina apresentam solubilidade limitada, mesmo em ambientes ácidos (Bazel; Rečlo; Chubirka, 2020). As aminas citadas nesse parágrafo estão demonstradas na FIGURA 7, onde é possível observar a presença de grandes cadeias apolares nas três últimas (FIGURA 7e, 7f e 7g), o que possivelmente limita sua solubilidade em ambientes ácidos, e características mais polares nas demais aminas (FIGURA 7a, 7b, 7c e 7d), o que dificulta seu retorno à forma hidrofóbica.

FIGURA 7 – AMINAS QUE NÃO APRESENTAM A CAPACIDADE DE ALTERAR SUAS CARACTERÍSTICAS DE HIDROFILICIDADE



LEGENDA – a) dietilamina; b) diisopropilamina; c) butiletilamina; d) trietanolamina; e) diexilamina; f) butilisopropilamina; g) trioctilamina
 FONTE: Pubchem (2024)

Dessa forma, critérios como solubilidade e reversibilidade do solvente devem ser avaliados no momento de sua seleção. Aminas com log Kow entre 1,2 e 2,5 e pKa acima de 9,5 são mais prováveis de apresentarem um comportamento de alteração de hidrofilicidade (Carasek *et al.*, 2021).

Diversos autores, ao longo dos anos, vêm testando diferentes solventes quanto à sua aplicabilidade como SHS (Jessop *et al.*, 2010, 2011; Vanderveen; Durelle; Jessop, 2014). O primeiro artigo publicado sobre esse tema, por Jessop *et al.*, no ano de 2010, demonstra a avaliação de algumas amidinas e guanidinas, onde concluiu-se que a tributilpentamidina apresenta comportamento comutável em presença/ausência de CO₂. Entretanto, a amidina foi considerada um solvente impraticável, devido ao alto custo de fabricação (Vanderveen; Durelle; Jessop, 2014). A partir disso, outros artigos vêm sendo publicado em busca de solventes comercialmente disponíveis ou facilmente preparados (Bazel; Rečlo; Chubirka, 2020).

Na TABELA 3 são apresentados alguns dos artigos publicados na literatura, nos quais os autores empregaram aminas secundárias ou terciárias como SHS para desenvolvimento da técnica de microextração líquido-líquido. Nesta tabela também são demonstrados os analitos, tipos de amostra e instrumentação analítica utilizada

na pesquisa. As fórmulas estruturais das aminas citadas na tabela estão demonstradas na FIGURA 8:

TABELA 3 – ARTIGOS PUBLICADOS REFERENTES AO DESENVOLVIMENTO DE TÉCNICA DE SHS-LLME (Continua)

SHS	Analitos	Tipo de amostra	Instrumentação analítica	Referência
DPA	Tramadol e metadona	Urina	GC-FID	(Ahmar <i>et al.</i> , 2018)
DMCHA	Benz(a)traceno	Água de torneira, de garrafa e de rio	Fluorescência	(Lasarte-Aragonés <i>et al.</i> , 2015b)
DMCHA	Chumbo	Água	GFAAS	(Ezoddin; Abdi; Lamei, 2016)
DMCHA	AINEs	Urina, plasma e leite	LC-DAD	(Hassan; Alshana, 2019)
DMCHA	11 drogas	Urina	GC-MS	(Xu <i>et al.</i> , 2018)
DMCHA	Cobre	Água, comida e cabelo	FAAS	(Yilmaz; Soylak, 2015)
DMCHA	NSPs, MDA, MDMA	Sangue total	LC-MS	(Scheid <i>et al.</i> 2022)
DMCHA	Antidepressivos	Urina	GC-MS	(Oenning <i>et al.</i> , 2020)
DBMA	Oxacarbazepina	Plasma e Urina	GC-MS	(Erarpat <i>et al.</i> , 2020)
DPA	Nitrazepam	Urina	análise eletroquímica	(Shahraki; Ahmar; Nejati-Yazdinejad, 2018)
DPA	Metanfetamina	Urina	GC-MS	(Shahvandi; Banitaba; Ahmar, 2018)
DPA	Desipramina, Citalopram, Clozapina	Soro, leite e água	GC-FID	(Behpour <i>et al.</i> , 2020)
TEA	Paraquat	Urina, plasma, água e suco	LC-UV	(Lamei <i>et al.</i> , 2018)
TEA	Chumbo e Cádmio	Água, chá e cabelo	GFAAS	(Zhang <i>et al.</i> , 2018)
TEA	Metais pesados	Água de torneira, de garrafa, chá preto e urina	FAAS	(Habibiyan <i>et al.</i> , 2017)
DMCHA	Triazinas	Água de torneira, de garrafa e de rio	GC-MS	(Lasarte-Aragonés <i>et al.</i> , 2015a)
DMCHA	Bisfenóis	Leite, suco de laranja e energético	LC-UV	(Wang <i>et al.</i> , 2018)
DPA	Canabinóides sintéticos	Plasma	LC-MS/MS	(Fabris <i>et al.</i> , 2023)
DBMA	Pesticidas	Frutas e vegetais	GC-MS	(Zhang <i>et al.</i> , 2023)
TEA	Diazinon	Água de rio	GC-FID	(Kakaei <i>et al.</i> , 2023)

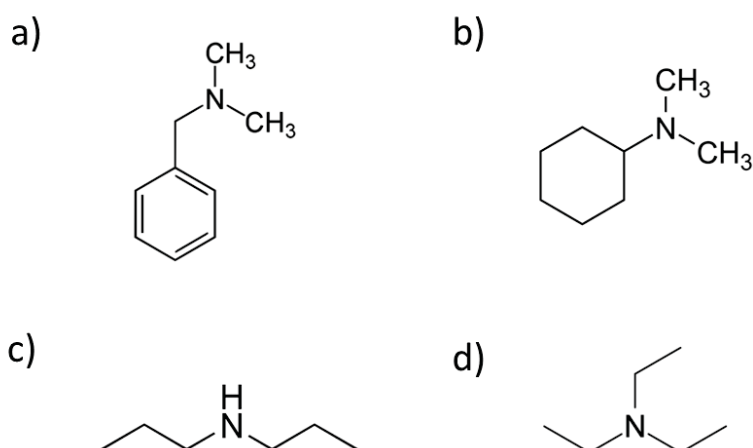
TABELA 3 – ARTIGOS PUBLICADOS REFERENTES AO DESENVOLVIMENTO DE TÉCNICA DE SHS-LLME (Conclusão)

SHS	Analitos	Tipo de amostra	Instrumentação analítica	Referência
DPA	AINE	Água	LC-UV	(Di, Zhao, Guo, 2020)

FONTE: A autora (2023)

Legenda: AINE: Anti-inflamatórios não esteroidais; DBMA: *N,N*-dimetilbenzilamina; DMCHA: *N,N*-dimetilciclohexilamina; DPA - dipropilamina; FAAS - Espectrômetro de absorção atômica com chama; GC-FID – Cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama; GC-MS – cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas; GFAAS – espectrômetro de absorção atômica em forno de grafite; LC-DAD – cromatógrafo a líquido com detector por arranjo de diodos; LC-MS – cromatógrafo a gás com espectrômetro de massas; LC-UV - cromatógrafo a líquido com detector no ultravioleta; NSP: Novas substâncias Psicoativas; TEA – trietilamina.

FIGURA 8 – FÓRMULA ESTRUTURAL DAS AMINAS APRESENTADAS NA TABELA 3



LEGENDA – a) DBMA: *N,N*-dimetilbenzilamina; b) DMCHA: *N,N*-dimetilciclohexilamina; c) DPA - dipropilamina; d) TEA – trietilamina

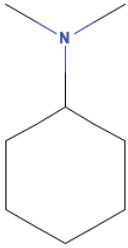
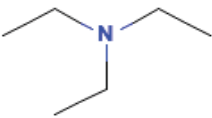
FONTE: Pubchem (2025)

Estabilidade, volatilidade, toxicidade e bioacumulação também são muito importantes no processo de escolha do SHS adequado, sendo que a estabilidade é especialmente importante para a reutilização do solvente. Adicionalmente, os solventes devem apresentar baixa toxicidade e volatilidade (Xu *et al.*, 2018).

Dessa forma, os solventes selecionados para serem estudados neste trabalho foram as aminas terciárias *N,N*-dimetilciclohexilamina (DMCHA) e trietilamina (TEA) devido à sua disponibilidade e ao fato de ambas já terem apresentado sucesso quando utilizadas em microextrações de matrizes biológicas, como urina, plasma, leite e sangue total conforme demonstrado na TABELA 3. As propriedades físico-químicas

deste solvente estão apresentadas na TABELA 4 e estão de acordo com as propriedades das aminas que apresentam comportamento comutável (log Kow entre 1,2 e 2,5 e pKa acima de 9,5) (Carasek *et al.*, 2021).

TABELA 4 – SOLVENTES ESTUDADOS NESSE TRABALHO E SUAS RESPECTIVAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS.

Solvente	Estrutura química	Massa molecular (g mol ⁻¹)	Ponto de ebulição (°C)	pKa	logP
N-N-dimetilciclohexilamina		127,23	162	10,7	2,01
Trietilamina		101,2	89	10,9	1,45

FONTE: Pubchem (2024).

Embora a Polícia Científica do Paraná utilize um método de Análise Toxicológica Sistemática para triagem de drogas de abuso e medicamentos em matrizes biológicas, o qual foi desenvolvido por Pragst; Herzler; Erxleben (2004), é importante que haja investimento continuado em pesquisas e desenvolvimentos de métodos que possam vir a otimizar a realização das análises toxicológicas e melhorar a confiabilidade dos resultados, além de gerar menos resíduos tóxicos, tendo em vista que o LTF-PCP recebe cerca de sete mil requisições de exames toxicológicos por ano (sendo que cada exame pode ser desdobrado em mais de um tipo de preparo de amostra). Dessa forma, a avaliação de um novo método de extração, no caso SHS-LLME, mostra-se promissor para o laboratório, uma vez que esse método se encontra alinhado às novas tendências de técnicas miniaturizadas, com uso de solventes mais seguros e ambientalmente sustentáveis e também apresenta poucas etapas de preparo, acarretando uma boa frequência analítica.

Adicionalmente, conforme visto na TABELA 3, estudos de SHS-LLME publicados até o momento utilizaram mais comumente matrizes como água, leite,

urina e plasma. Apenas um estudo (Scheid *et al.* 2022) avaliou a aplicabilidade de SHS (DMCHA) em matriz de sangue total, o que demonstra que ainda há uma grande lacuna na literatura quanto à aplicabilidade desse tipo de extração em matrizes como sangue total e outras matrizes de interesse forense (como fígado e conteúdo gástrico), além da avaliação de sua aplicabilidade para a extração de uma ampla gama de analitos.

Dessa forma, apesar da existência de métodos consolidados para a realização de triagem toxicológica em matrizes biológicas, como o utilizado atualmente pelo LTF-PCP, novas estratégias analíticas devem ser estudadas, proporcionando métodos eficientes, sustentáveis e confiáveis para serem utilizados em rotina forense. Portanto, a avaliação da técnica de microextração líquido-líquido com solvente de hidrofilicidade comutável (SHS-LLME) se justifica tanto pelo seu potencial de otimização operacional, quanto pela escassez de estudos envolvendo sua aplicação em matrizes complexas como sangue total, fígado e conteúdo gástrico — muito relevantes no contexto forense. Adicionalmente, o desenvolvimento de metodologias compatíveis com equipamentos mais tradicionais e menos custosos, como o LC-DAD, é importante para o cenário da toxicologia forense no Brasil.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento de método analítico baseado em microextração em fase líquida com solvente de hidrofilicidade comutável (SHS-LLME) e cromatografia líquida com detector por arranjo de diodos (LC-DAD) para determinação de medicamentos e drogas de abuso em sangue total, urina, conteúdo gástrico e fígado, com fins de toxicologia forense.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimização das condições cromatográficas na separação dos compostos selecionados (drogas de abuso e medicamentos), via LC-DAD;
- Otimização do processo de extração em fluidos biológicos via SHS-LLME: seleção de solventes, volumes de amostra e solvente, tempo, agitação, entre outros parâmetros;
- Avaliação da eficiência da técnica padronizada para estudos preliminares de varredura (“*screening*”) em amostras de urina, sangue total, conteúdo gástrico e fígado;
- Avaliação dos parâmetros de desempenho dos métodos SHS-LLME - LC-DAD padronizados para diferentes matrizes (urina e sangue total), provenientes do Instituto Médico-Legal do Paraná;
- Comparação da eficiência de extração da metodologia de extração por SHS-LLME desenvolvida com a metodologia via LLME atualmente utilizada no Laboratório de Toxicologia Forense do Estado do Paraná.
- Aplicação do método desenvolvido em amostras de casos periciados no LTF-PCP.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 REAGENTES E PADRÕES ANALÍTICOS

Padrões de alta pureza ($\geq 99,0\%$) de medicamentos, drogas de abuso e produtos de biotransformação da marca Cerilant® (Texas, Estados Unidos) e MRC-INMETRO (Rio de Janeiro, Brasil), no caso do Diazepam e Flunitrazepam, estavam disponíveis na Polícia Científica do Paraná. Os padrões analíticos utilizados foram:

Medicamentos: Desipramina, Imipramina, Nortriptilina, Diazepam, Flunitrazepam, Flurazepam, Lorazepam, Nitrazepam, Codeína

Drogas de Abuso: Cocaína, MDA, MBDB (Metilbenzodioxolilbutanamina), LSD

produtos de biotransformação: Benzoilecgonina, Cocaetileno

Para o preparo das soluções padrão e da fase móvel foram utilizadas Acetonitrila, grau HPLC, da Merck® (São Paulo, Brasil) e Metanol, grau HPLC, da Dinamica® (São Paulo, Brasil).

Para o preparo das soluções tampão fosfato, foram utilizados os reagentes ácido fosfórico e di-hidrogenofosfato de potássio da Sigma-Aldrich® (São Paulo, Brasil), e mono-hidrogenofosfato de potássio da Merck® (São Paulo, Brasil).

Para o preparo da solução de ácido clorídrico (HCl) em concentração de 6 mol L⁻¹ foi utilizado HCl 37% grau PA da Biotec® (Paraná, Brasil). A solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 10 mol L⁻¹ foi preparada a partir de NaOH grau PA da Synth® (São Paulo, Brasil).

Os solventes de hidrofilicidade comutável utilizados neste trabalho foram a *N*-*N*-dimetilclohexilamina (DMCHA), e a trietilamina (TEA) (ambas da Sigma-Aldrich® - São Paulo, Brasil).

A água ultrapura (resistividade 18,2 MΩ cm a 25°C) utilizada nos ensaios foi obtida em sistema de purificação de água MiliQ® IQ 7003 Água Pura & Ultrapura -IQ (Millipore® - São Paulo, Brasil).

4.2 EQUIPAMENTOS

Para as pesagens utilizou-se uma balança analítica digital Mettler Toledo® (São Paulo, Brasil) XS205DU com precisão de 0,01 mg. O ajuste do pH da solução tampão foi efetuado com o auxílio de um pHmetro Orion 3-star (Thermo Scientific®).

As análises cromatográficas foram realizadas em sistema de LC-DAD constituído de um cromatógrafo à líquido acoplado a detector de arranjo de diodos, ambos da marca Agilent Technologies® (Califórnia, Estados Unidos), modelo 1260 Infinity II. Os dados obtidos foram obtidos no software OpenLab EZChrom A.04.10 e o tratamento de dados foi realizado no software Chromeleon 7.3.0 e OriginPro versão 8.5. Todos os cromatogramas apresentados neste trabalho foram adquiridos no comprimento de onda de 232 nm.

A separação foi realizada em coluna de octilsilano (Varian® RP-18, 150 mm x 4,6 mm, 5 µm) com controle de temperatura em 30 °C, pré-coluna de fase estacionária similar e eluição por gradiente de concentração na vazão de 1,0 mL min⁻¹. A aquisição dos espectros pelo detector de arranjo de diodos foi realizada na faixa de comprimento de onda de 195 a 380 nm.

Para composição da fase móvel foram utilizados acetonitrila grau HPLC e tampão fosfato pH 2,3 na concentração 25 mmol L⁻¹. Os componentes foram misturados em gradiente, conforme estabelecido no item 4.5. Os componentes da fase móvel foram filtrados por de membrana de celulose regenerada (0,45 µm, 47 mm Sartorius® - Göttingen, Alemanha).

Equipamentos de centrífuga Hettich® (Tuttlingen, Alemanha) MIKRO 22 e agitador orbital vórtex IKA® (Staufen, Alemanha) MS 3 basic foram utilizados para a realização do procedimento de microextração.

Para a obtenção de homogenatos de fígado e conteúdo gástrico foi utilizado dispersor ultraturrax IKA® (Staufen, Alemanha) T25.

Para pipetagem das amostras, foi utilizada micropipetas ACURA 815, volume fixo de 500 µL, da marca Socorex (Ecublens, Suíça). Para pipetagem de padrões e demais volumes necessários, foram utilizadas pipetas do modelo monocal Pippetman Concept® da marca Gilson (Wisconsin, Estados Unidos) nos volumes de 5-100 µL, 20-300 µL e 100-1200 µL.

Demais vidrarias (como béqueres, provetas, balões volumétricos etc.) utilizadas estavam disponíveis no Laboratório de Toxicologia Forense da Polícia Científica do Paraná.

4.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE PADRÕES ANALÍTICOS (SOLUÇÃO ESTOQUE) E SOLUÇÕES DE TRABALHO (AMOSTRAS FORTIFICADAS)

Os padrões certificados dos analitos apresentavam concentração de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ em metanol (para todos os analitos, com exceção da cocaína e cocaetileno, que estavam diluídos em acetonitrila). A partir desses padrões, foram preparadas soluções estoque em forma de MIX, na concentração de $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, da seguinte forma:

- a) MIX 1 – $100 \text{ } \mu\text{L}$ de cada padrão dos analitos codeína, desipramina, diazepam, flunitrazepam, flurazepam, desipramina, lorazepam, nitrazepam, nortriptilina em $100 \text{ } \mu\text{L}$ de metanol;
- b) MIX 2 – $100 \text{ } \mu\text{L}$ de cada padrão dos analitos benzoilecgonina, MDA, MBDB e LSD em $600 \text{ } \mu\text{L}$ de metanol;
- c) MIX 3 – $100 \text{ } \mu\text{L}$ dos padrões analíticos de cocaína e cocaetileno em $800 \text{ } \mu\text{L}$ de acetonitrila;

Estas soluções estoques foram utilizadas para preparar as soluções de trabalho nas concentrações necessárias no dia de seu uso. Todas as soluções estoque foram preparadas em vials âmbar e armazenadas à temperatura de $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

A partir das soluções estoque dos padrões analíticos, foi possível realizar o preparo das soluções de trabalho, as quais foram feitas no momento do uso, da seguinte forma:

4.3.1 Para avaliação das condições cromatográficas:

A partir das soluções estoque MIX 1; MIX 2 e MIX 3 preparou-se uma solução de trabalho de $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, adicionando $100 \text{ } \mu\text{L}$ de cada MIX em $700 \text{ } \mu\text{L}$ de metanol. $100 \text{ } \mu\text{L}$ dessa solução de trabalho foi diluída em $900 \text{ } \mu\text{L}$ de fase móvel, resultando em um mix de padrões em concentração de $1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, o qual foi utilizado para a avaliação das condições cromatográficas.

4.3.2 Para avaliação das variáveis do processo de microextração:

1000 μL de cada MIX de solução estoque foi transferido para um balão volumétrico de 10 mL, o qual foi completado com água ultrapura, resultando em uma solução de trabalho de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

4.3.3 Para a otimização das etapas de microextração

100 μL de cada MIX de solução estoque foi transferido para um balão volumétrico de 10 mL, o qual foi completado com água ultrapura, resultando em uma solução de trabalho de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

4.3.4 Para aplicação do método desenvolvido em matrizes biológicas:

As matrizes biológicas utilizadas neste trabalho (sangue, urina, conteúdo gástrico e fígado) são alíquotas de amostras que foram previamente periciadas pelo LTF-PCP e que seriam destinadas ao descarte, sendo que para o preparo das amostras fortificadas, foram selecionadas matrizes isentas dos analitos alvo deste projeto e para a aplicação do método em casos reais, utilizou-se amostras nas quais foram detectadas a presença de uma ou mais substâncias de interesse para esse trabalho.

O uso das matrizes biológicas, após sua destinação ao descarte, foi autorizado pelo Diretor Geral da Polícia Científica do Paraná.

As amostras foram mantidas a uma temperatura de -20°C e descongeladas no momento de seu uso, sendo fortificadas com padrões analíticos nas concentrações desejadas para a realização dos ensaios.

Para o preparo das amostras fortificadas de sangue e urina, primeiramente, aguardou-se as amostras descongelarem e atingirem a temperatura ambiente (20°C). As amostras fortificadas foram preparadas em balões volumétricos de 5 e 10 mL e pipeta volumétrica, utilizando soluções estoque de MIX de padrões previamente preparadas para perfazer as concentrações de trabalho necessárias, que estão demonstradas nos itens 4.10.1 (Linearidade, LOQ e LOD) e 4.10.2 (Exatidão e Precisão). As amostras fortificadas foram imediatamente utilizadas para análise após seu preparo.

Para o preparo das amostras de fígado seguiu-se o seguinte protocolo: primeiramente, pesou-se 5 g de fígado, o qual foi cortado em pedaços menores e homogeneizado no dispersor ultraturrax. Como o fígado utilizado como teste era sabidamente positivo para amitriptilina/nortriptilina, preparou-se solução estoque dos seguintes padrões: codeína, flurazepam, nitrazepam, desipramina, flunitrazepam diazepam (MIX 1.1) e MDA, MBDB, cocaína, cocaetileno, (MIX 2.1) na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo que $50 \mu\text{L}$ de cada mix de padrão foi adicionado em tubo falcon, e o peso foi completado para 5g do homogenato de fígado. O falcon foi agitado em vórtex por 1 min, resultando em uma amostra fortificada de $1 \mu\text{g g}^{-1}$ de fígado. Essa amostra foi diluída com 5 mL de água ultrapura (proporção 1:1) a fim de facilitar sua manipulação e análise.

O preparo dos fígados utilizados em amostra real foi realizado da mesma forma que o enriquecido, com exceção da adição do mix dos padrões na amostra.

Por fim, para a avaliação da aplicação da técnica em conteúdo gástrico (CG), foi utilizado um modelo simulado de conteúdo gástrico preparado a partir de alimento infantil processado (papinha de lentilha, carne e legumes), marca Papapá® (Paraná, Brasil) adquirido em supermercado local e acidificado com solução de HCl a 1% (p/v), conforme protocolo descrito por Peres, Nascimento e Pelição (2019). Um volume de $200 \mu\text{L}$ de cada um dos mix de padrões foi adicionado em tubo falcon, no qual foi adicionado o CG simulado até completar 10 g da mistura. O falcon foi agitado em vórtex por 1 min, resultando em uma amostra fortificada com concentração de $2 \mu\text{g g}^{-1}$ de conteúdo gástrico.

Tanto o CG simulado, quanto o proveniente de casos reais, foram usados sem preparo da amostra, exceto pela diluição nas proporções de 1:2 e 1:10.

4.4 PREPARO DA SOLUÇÃO EXTRATORA (SHS:HCl)

Para a realização do procedimento de extração, utilizou-se o solvente extrator acidificado com ácido clorídrico (HCl), em uma proporção de 1:1, conforme já utilizado por Oenning (2020). Dessa forma, os solventes selecionados (DMCHA e TEA) apresentavam-se inicialmente em sua forma ionizada e, portanto, hidrofílica – ou seja, miscível com a amostra. Para o preparo da solução, acrescentou-se em um béquer 200 mL do SHS, onde lentamente foi adicionado 200 mL de ácido clorídrico 6 mol L^{-1} .

Essa mistura foi mantida sob agitação por 15 minutos, até a obtenção de uma mistura homogênea. A solução foi guardada num frasco de cor âmbar para posterior uso.

4.5 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Três gradientes de eluição foram testados, utilizando ACN e tampão fosfato pH 2,3 em sua composição. O planejamento das proporções foi realizado a partir das condições cromatográficas estabelecidas por Pragst; Herzler; Erxleben (2004) e utilizadas no LTF-PCP. O primeiro gradiente (Gradiente 1) iniciou com 33% de ACN até chegar a 40%, o segundo gradiente testado (Gradiente 2) iniciou com 30% de ACN, até chegar a 40%, e por fim, o Gradiente 3 iniciou em 30% e foi até 45% de ACN. Os gradientes de eluição estão apresentados na TABELA 5.

TABELA 5 – GRADIENTE DE ELUIÇÃO TESTADOS (% EM VOLUME)

GRADIENTE	Duração da corrida	TEMPO (min)	ACN (%)	TAMPÃO pH 2,3 (%)
Gradiente 1	15 min	0,00	33	67
		1,80	35	65
		3,60	40	60
Gradiente 2	18 min	0,00	30	70
		2,00	30	70
		8,00	40	60
		12,00	40	60
		15,00	30	70
		18,00	30	70
Gradiente 3	20 min	0,00	30	70
		10,00	45	55
		16,00	45	55
		20,00	30	70

FONTE: A autora (2023)

A resolução entre os picos adjacentes dos pares de analitos foi calculada através da seguinte equação (eq. 2) (Collins, 2017):

$$R_S = \frac{2 (t_{R2} - t_{R1})}{(w_{b2} + w_{b1})} \quad (2)$$

onde:

R_S : resolução, t_R : tempo de retenção, w_b : largura do pico na base. 1 e 2 referem-se a picos adjacentes.

4.6 AVALIAÇÃO DAS VARIÁVEIS DO PROCESSO DE MICROEXTRAÇÃO

Os primeiros ensaios realizados para testar a aplicabilidade dos solventes selecionados e sua capacidade de extração dos compostos de interesse foram feitos utilizando a ferramenta de planejamento fatorial fracionário 2_{IV}^{8-4} . Nessa etapa foram avaliadas, de forma multivariada, 8 variáveis, a saber: tipo de solvente, volume de amostra, volume de SHS:HCl, agitação em vórtex, volume de NaOH, agitação em vórtex após adição de NaOH, tempo de repouso e tempo de centrifugação. Para a realização dessa etapa, utilizou-se a solução de trabalho preparada conforme item 4.3.2, e as áreas dos picos obtidos para cada analito em cada ensaio foi monitorada como resposta do planejamento fatorial.

As extrações foram realizadas conforme demonstrado no fluxograma apresentado na FIGURA 9 e sendo que as condições de cada ensaio estão apresentadas na TABELA 6.

FIGURA 9 – FLUXOGRAMA DA MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

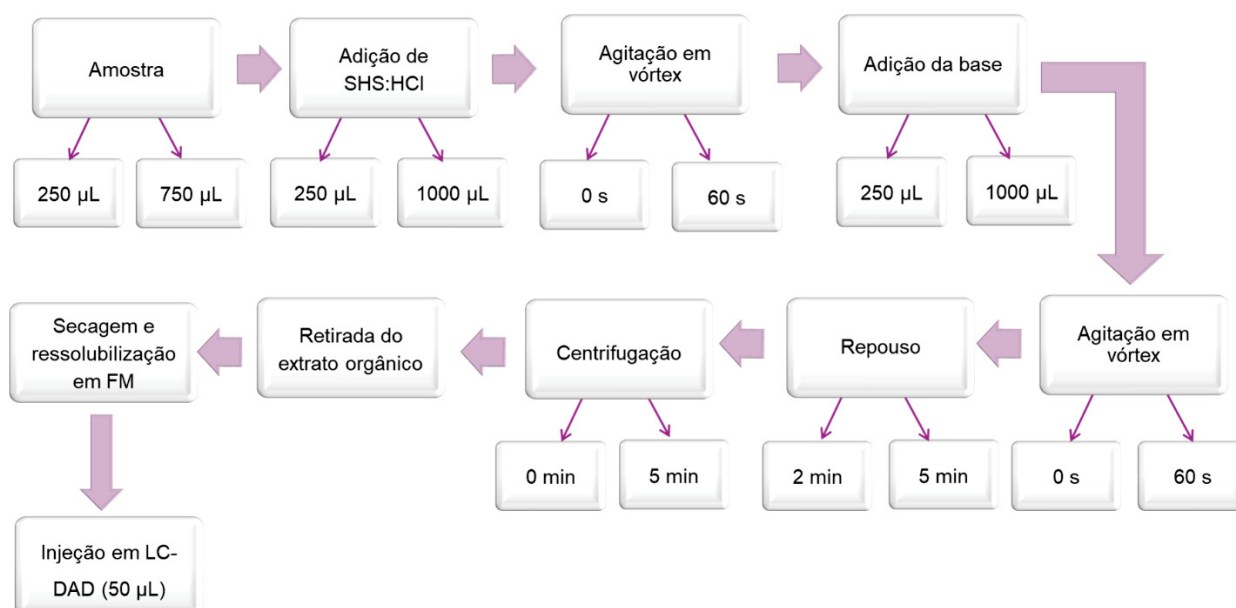


TABELA 6 – MATRIZ DE ENSAIOS REALIZADOS PARA O PLANEJAMENTO FATORIAL
FRACIONÁRIO 2_{IV}^{8-4} , definido por $I=1248=1358=2368=1237$

Ensaio	Solvente	Volume amostra (μL)	Volume SHS:HCl (μL)	Agitação vórtex (s)	Volume NaOH (μL)	Agitação vórtex (s)	Repouso (min)	Centrifuga (min)
Função geradora	1	2	3	4 128	5 138	6 238	7 123	8
1	TEA (-1)	250 (-1)	250 (-1)	60 (+1)	1000 (+1)	60 (+1)	2 (-1)	5 (+1)
2	DMCHA (+1)	250 (-1)	250 (-1)	0 (-1)	250 (-1)	60 (+1)	5 (+1)	5 (+1)
3	TEA (-1)	750 (+1)	250 (-1)	0 (-1)	1000 (+1)	0 (-1)	5 (+1)	5 (+1)
4	DMCHA (+1)	750 (+1)	250 (-1)	60 (+1)	250 (-1)	0 (-1)	2 (-1)	5 (+1)
5	TEA (-1)	250 (-1)	1000 (+1)	60 (+1)	250 (-1)	0 (-1)	5 (+1)	5 (+1)
6	DMCHA (+1)	250 (-1)	1000 (+1)	0 (-1)	1000 (+1)	0 (-1)	2 (-1)	5 (+1)
7	TEA (-1)	750 (+1)	1000 (+1)	0 (-1)	250 (-1)	60 (+1)	2 (-1)	5 (+1)
8	DMCHA (+1)	750 (+1)	1000 (+1)	60 (+1)	1000 (+1)	60 (+1)	5 (+1)	5 (+1)
9	DMCHA (+1)	750 (+1)	1000 (+1)	0 (-1)	250 (-1)	0 (-1)	5 (+1)	0 (-1)
10	TEA (-1)	750 (+1)	1000 (+1)	60 (+1)	1000 (+1)	0 (-1)	2 (-1)	0 (-1)
11	DMCHA (+1)	250 (-1)	1000 (+1)	60 (+1)	250 (-1)	60 (+1)	2 (-1)	0 (-1)
12	TEA (-1)	250 (-1)	1000 (+1)	0 (-1)	1000 (+1)	60 (+1)	5 (+1)	0 (-1)
13	DMCHA (+1)	750 (+1)	250 (-1)	0 (-1)	1000 (+1)	60 (+1)	2 (-1)	0 (-1)
14	TEA (-1)	750 (+1)	250 (-1)	60 (+1)	250 (-1)	60 (+1)	5 (+1)	0 (-1)
15	DMCHA (+1)	250 (-1)	250 (-1)	60 (+1)	1000 (+1)	0 (-1)	5 (+1)	0 (-1)
16	TEA (-1)	250 (-1)	250 (-1)	0 (-1)	250 (-1)	0 (-1)	2 (-1)	0 (-1)

Após realizado o processo de extração, os extratos orgânicos foram coletados em vials e secos em capela. Os extratos secos foram ressolubilizados em 100 μL de fase móvel (FM), e um volume de 50 μL foi injetado no LC-DAD.

Os cromatogramas obtidos pelo software OpenLab EZChrom foram tratados no software Origin®, sendo que as áreas dos picos foram convertidas em função de sua desejabilidade (item 4.8), para a realização dos cálculos e interpretação dos resultados, utilizando para isso o software Excel®.

Os resultados foram plotados, utilizando o software Excel®, em gráfico de efeitos calculados *versus* probabilidade cumulativa para seleção dos parâmetros a serem otimizados conforme item 4.7.

4.7 OTIMIZAÇÃO DAS ETAPAS DE MICROEXTRAÇÃO

Com o objetivo de encontrar resposta máxima para a extração dos analitos, as variáveis volume de amostra, volume de SHS:HCl e volume de NaOH foram otimizadas utilizando-se um planejamento fatorial 2^3 com planejamento estrela e triplicata do ponto central. Para isso, utilizou-se a solução de trabalho preparada

conforme item 4.3.3, contendo 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dos analitos em estudo. Os ensaios realizados para a otimização das variáveis foram feitos conforme TABELA 7:

TABELA 7 – MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3 , COM TRIPLICATA DO PONTO CENTRAL MAIS PLANEJAMENTO ESTRELA

Ensaio	Volume de amostra (μL)	Volume de TEA:HCl (μL)	Volume de NaOH (μL)
1	400	150	150
2	600	150	150
3	400	350	150
4	600	350	150
5	400	150	350
6	600	150	350
7	400	350	350
8	600	350	350
9	330	250	250
10	670	250	250
11	500	80	250
12	500	420	250
13	500	250	80
14	500	250	420
15	500	250	250
16	500	250	250
17	500	250	250

Após realizado o processo de extração, os extratos orgânicos foram coletados em vials e secos em capela. Os extratos secos foram ressolubilizados em 100 μL de fase móvel (FM), e um volume de 50 μL foi injetado no LC-DAD.

As áreas dos picos obtidas após tratamento no software Origin®, foram convertidas em função de sua desejabilidade (item 4.8) no software Excel®, para a realização dos cálculos e interpretação dos resultados. A desejabilidade global obtida foi plotada em gráfico de superfície de resposta, utilizando o software Origin®, para definição das condições ótimas para a execução do método analítico desenvolvido.

4.8 CÁLCULO DA DESEJABILIDADE DA RESPOSTA ANALÍTICA

A desejabilidade individual (d_i) de cada analito, para a seleção das variáveis a serem otimizadas, foi calculada através da seguinte equação (eq. 3):

$$d_i = \frac{\text{área do pico} - L}{U - L} \quad (3)$$

Sendo que L é o valor inferior da escala, e foi definido como 0, já que alguns ensaios apresentaram como resposta uma área do pico igual a zero. Já o valor superior da escala (U) foi definido como a maior área obtida para aquele pico.

Já a desejabilidade individual (d_i) para a avaliação da otimização das variáveis selecionadas, foi calculada através da seguinte equação (eq. 4):

$$d_i = \left(\frac{\text{área do pico} - L}{U - L} \right)^s \quad (4)$$

Onde s é o parâmetro utilizado para demonstrar a importância daquela desejabilidade para o cálculo global, sendo utilizado um expoente de 1,25 para todos os analitos, conferindo um maior peso a recuperações mais altas.

A partir do cálculo da desejabilidade individual de cada pico, é possível calcular a desejabilidade global de cada ensaio (D), que é a média geométrica das desejabilidades individuais de cada resposta para cada analito. A desejabilidade global é o valor utilizado para o cálculo dos efeitos e interpretação dos resultados.

4.9 APLICAÇÃO DO MÉTODO DE MICROEXTRAÇÃO DESENVOLVIDO EM AMOSTRAS DAS MATRIZES BIOLÓGICAS AVALIADAS

Após as condições de microextração otimizadas e a avaliação da necessidade de realização de pré-preparo das matrizes, definiu-se as condições para a realização de SHS-LLME-LC-DAD na urina, como demonstrado na FIGURA 10, e no sangue, fígado e conteúdo gástrico na FIGURA 11.

FIGURA 10 – SHS-LLME-LC-DAD EM AMOSTRAS DE URINA

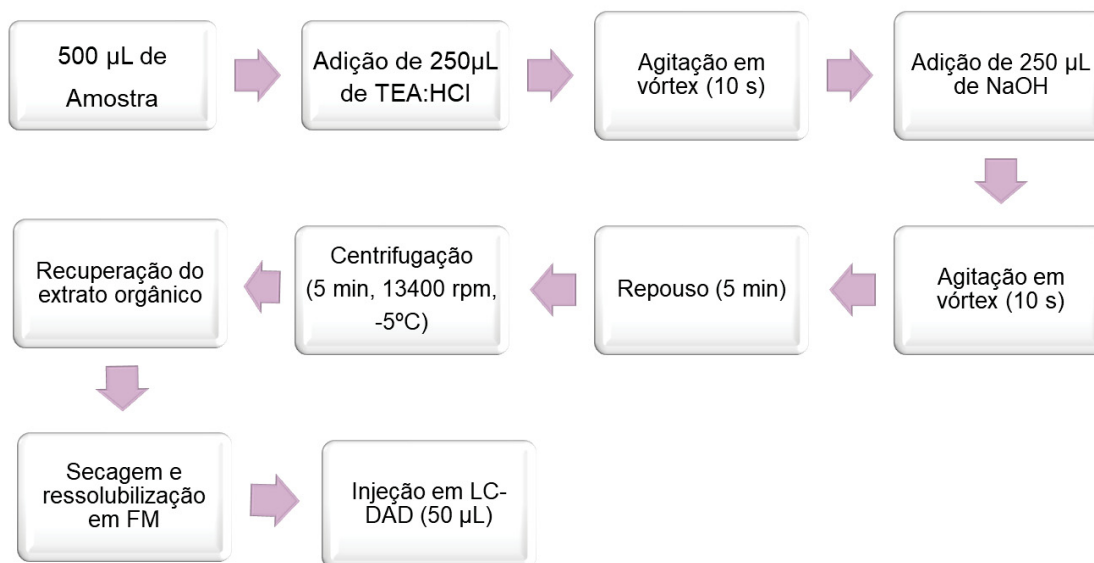
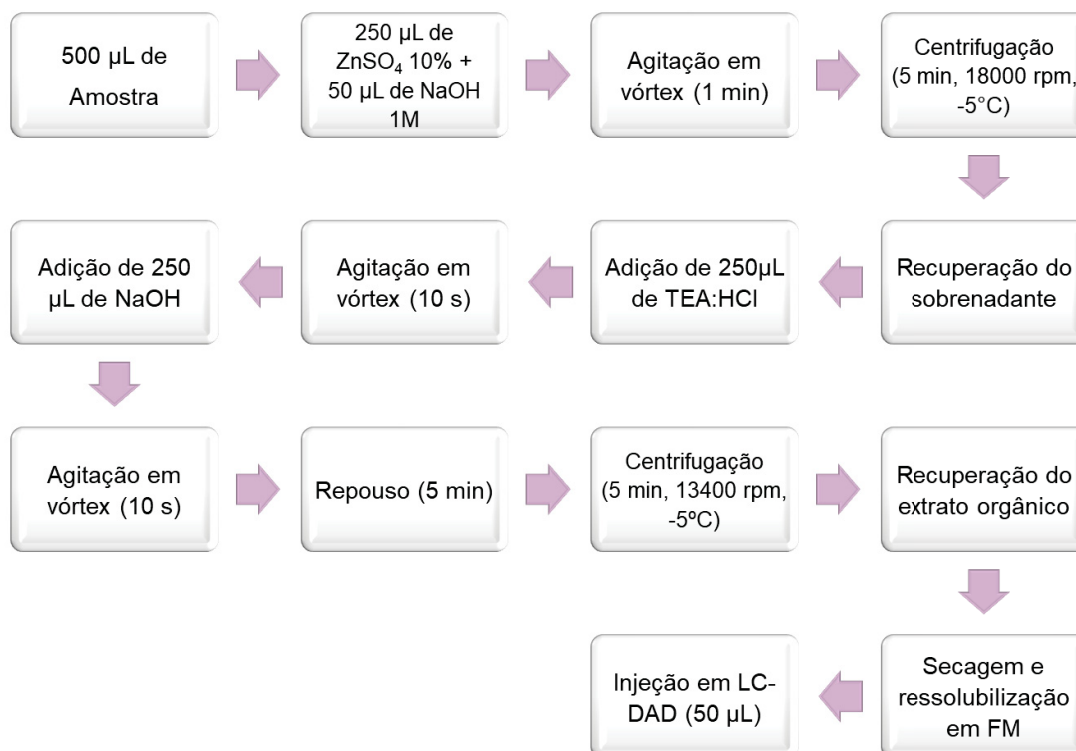


FIGURA 11 – SHS-LLME-LC-DAD EM AMOSTRAS DE SANGUE, FÍGADO E CONTEÚDO GÁSTRICO



4.10 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS ANALÍTICOS DE DESEMPENHO

Os parâmetros analíticos de desempenho linearidade, LOQ, LOD, precisão, exatidão, efeito memória (*carryover*), efeito matriz e seletividade foram avaliados, para

amostras de sangue e urina, empregando as condições de extração demonstradas nas figuras FIGURA 10 e FIGURA 11, sendo seguidas as diretrizes do guia de validação de métodos em Toxicologia Forense da *American Academy of Sciences* (ANSI/ASB Std 036, 2019).

4.10.1 LOQ, LOD e Linearidade

Conforme o guia seguido (ANSI/ASB 036, 2019), a linearidade do método deve ser avaliada para cada matriz biológica para a qual se deseja realizar a quantificação dos analitos. O objetivo desse trabalho é que seja possível a quantificação dos analitos em sangue e urina, enquanto apenas a detecção dos mesmos é visada para as demais matrizes (fígado e conteúdo gástrico). Para a avaliação da linearidade foram construídas cinco curvas analíticas com amostras de urina e sangue enriquecidas com as substâncias de interesse em seis níveis de concentração, conforme demonstrado na TABELA 8 para a urina e TABELA 9 para o sangue, sendo os pontos da curva preparados conforme item 4.3.4. As curvas foram avaliadas de acordo com o coeficiente de determinação (R^2) e ANOVA.

TABELA 8 – NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DAS CURVAS ANALÍTICAS DE DESIPRAMINA, NORTRIPTILINA, COCAÍNA, MDA, CODEÍNA, COCAETILENO E MBDB EM URINA

Nível	Analitos (em ng mL ⁻¹)		
	Desipramina e Nortriptilina	Cocaína e MDA	Codeína, Cocaetileno e MBDB
1	50	200	300
2	150	300	600
3	300	400	1000
4	500	800	2000
5	800	1200	2500
6	1000	2000	3000

TABELA 9 – NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DAS CURVAS ANALÍTICAS DE CODEÍNA, COCAÍNA, COCAETILENO, FLURAZEPAM, NORTRIPTILINA, FLUNITRAZEPAM, MDA, MBDB, DESIPRAMINA, E DIAZEPAM EM SANGUE

Nível	Analitos (em ng mL ⁻¹)	
	Codeína, Cocaína, Cocaetileno, Flurazepam, Nortriptilina, Flunitrazepam	MDA, MBDB, Desipramina, Diazepam
1	200	300
2	300	400
3	400	600
4	800	1000
5	1300	2000
6	2000	3000

O limite de quantificação foi determinado como sendo o primeiro ponto da curva que apresentou critérios de exatidão e precisão dentro do especificado (CV% de até 20% para precisão e exatidão na faixa de 80% a 120% da concentração nominal). Já o limite de detecção (LOD) foi determinado utilizando a curva analítica através da seguinte equação (eq. 5) (ANSI/ASB 036, 2019):

$$LOD = \frac{(3,3 \text{ sdy})}{\bar{X}_a} \quad (5)$$

Onde: sdy = desvio padrão do intercepto

$\bar{X}_a$ = média do coeficiente angular

4.10.2 Precisão e Inexatidão

Precisão intra- e inter-corridas foram calculadas em triplicata, em 3 concentrações diferentes dos analitos (concentração baixa, média e alta) em 5 corridas diferentes para o sangue e 3 corridas para a urina. A precisão intra-corrída foi calculada para cada uma das corridas de cada concentração, usando os resultados das triplicatas, conforme equação abaixo (eq. 6). O resultado mais alto foi utilizado para avaliação do parâmetro (ANSI/ASB, 2019).

$$\text{Intra – corrida (CV\%)} = \frac{\text{sd das triplicatas de uma única corrida}}{\text{Média das triplicatas da corrida}} \times 100 \quad (6)$$

Onde: sd = desvio padrão

A precisão inter-corridas foi calculada para cada uma das concentrações, utilizando os resultados de todas as replicatas das corridas, conforme equação apresentada na sequência (eq.7) (ANSI/ASB, 2019).

$$\text{Inter – corrida (CV\%)} = \frac{\text{sd de todas as replicatas de cada concentração}}{\text{Média de todas as replicatas de cada concentração}} \times 100 \quad (7)$$

Para o cálculo da inexatidão, (*bias* ou viés), utilizou-se o resultado de todas as replicatas de cada concentração na seguinte equação (eq.8):

$$\text{Inexatidão (CV\%)} = \frac{\text{Média das concentrações encontradas} - \text{Concentração nominal}}{\text{Concentração nominal}} \times 100 \quad (8)$$

Para cada parâmetro, valores abaixo de CV% 20 foram considerados como dentro das especificações (ANSI/ASB, 2019).

4.10.3 Efeito Memória

Para a avaliação da presença de efeito memória (*carryover*) no método, uma amostra branco foi injetada após a injeção do ponto mais alto da curva, sendo que esse ensaio foi realizado em triplicata.

4.10.4 Efeito Matriz

Para avaliação do efeito matriz, foram utilizadas amostras de sangue e urina, isentas de analitos, provenientes de 10 fontes diferentes, as quais foram extraídas e analisadas com o objetivo de detectar a ausência ou presença dos interferentes mais comuns das matrizes trabalhadas.

Como alguns interferentes foram detectados na urina em regiões importantes do cromatograma, avaliou-se o efeito matriz (EM) por comparação da resposta analítica encontrada para as curvas de calibração da urina com curvas realizadas nas mesmas condições utilizando água ultrapura fortificada com os analitos. Para tanto, utilizou-se a seguinte equação (eq. 9) (Santos *et al.*, 2013):

$$EM (\%) = \frac{x_1 - x_2}{x_2} \times 100 \quad (9)$$

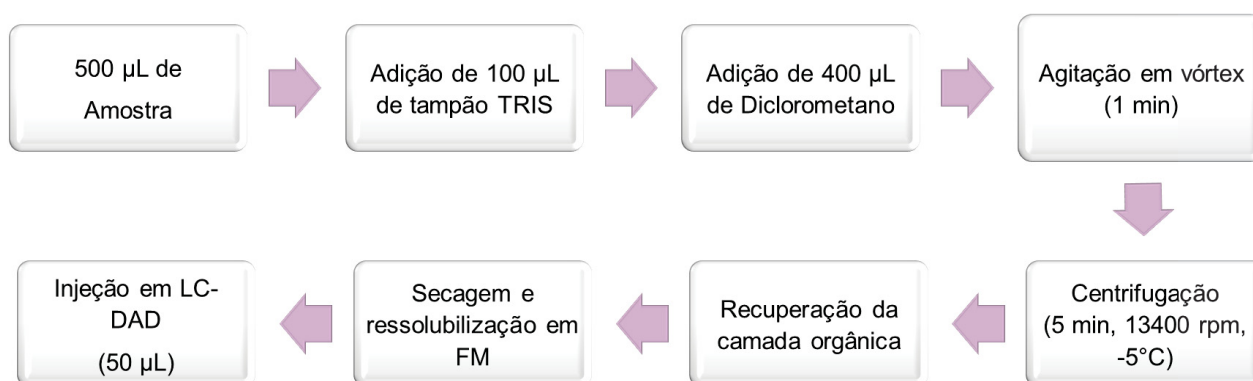
Onde: x_1 = inclinação da curva analítica construída na matriz

x_2 = inclinação da curva analítica construída em água ultrapura

4.11 COMPARAÇÃO ENTRE A SHS-LLME E EXTRAÇÃO REALIZADA NO LTF-PCP

Para a comparação dos cromatogramas obtidos após a extração pelo método desenvolvido e o desenvolvido por Pragst; Herzler; Erxleben (2004), realizou-se o preparo de uma amostra de fígado, sabidamente contendo nortriptilina, por cada um dos métodos. A extração do pelo método desenvolvido foi realizada conforme fluxograma apresentado na FIGURA 11 (item 4.9) e a extração conforme método utilizado no LFT-PCP está demonstrado no fluxograma apresentado na FIGURA 12, na sequência.

FIGURA 12 – EXTRAÇÃO CONFORME MÉTODO UTILIZADO NO LFT-PCP



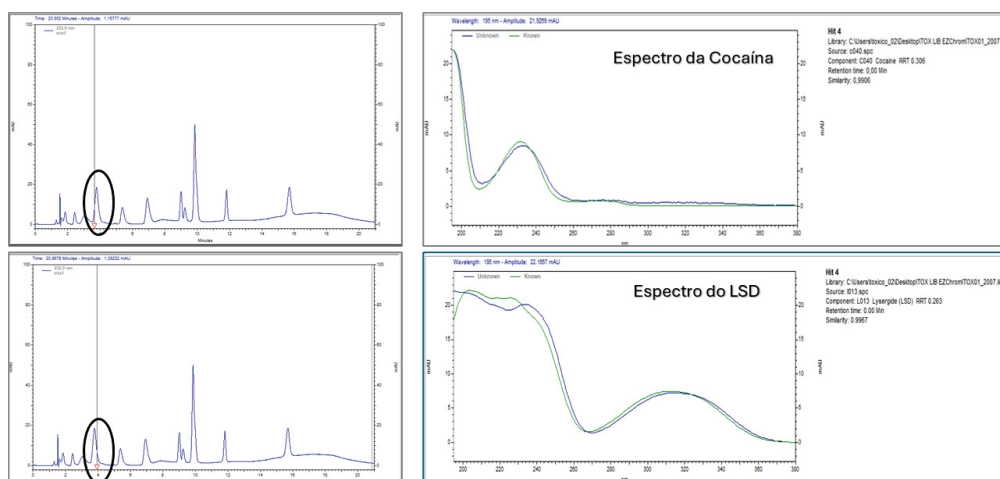
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

O método cromatográfico utilizado pelo LTF-PCP para a realização de ATS é o método desenvolvido por Pragst *et al.* (2004) que consiste em fase móvel (FM) composta de 33% de acetonitrila (ACN) e 67% de tampão fosfato pH 2,3 (Tampão 2,3) e fase estacionária (FE) coluna LiChrospher® RP-8, 250 mm x 4,6 mm, 5µm e modo de eluição isocrático, de 1 mL min⁻¹. Para a realização deste trabalho, as condições cromatográficas utilizadas pelo LTF-PCP foram levadas em consideração, entretanto, a FE estacionária utilizada foi uma coluna Varian® RP-18, 150 mm x 4,6 mm, 5 µm. Devido à mudança da FE, e partindo da FM já utilizada para a realização da ATS, as condições cromatográficas foram avaliadas com o objetivo de encontrar as melhores condições analíticas para a execução do projeto. Para isso, foram avaliados o uso de tampão pH 2,3 e ACN em diferentes gradientes de eluição (conforme item 4.5).

As condições cromatográficas foram avaliadas de acordo com a resolução dos picos dos cromatogramas obtidos nos diferentes gradientes de eluição, após a injeção do mix de padrões preparado conforme item 4.3.1. Os cromatogramas foram avaliados considerando-se o espectro de absorção no UV de cada um dos picos, em busca de se avaliar a presença de coeluições de diferentes analitos em um mesmo pico cromatográfico, conforme exemplificado na FIGURA 13, na qual é possível ver a coeluição de cocaína (no início do pico) e LSD (no final do pico).

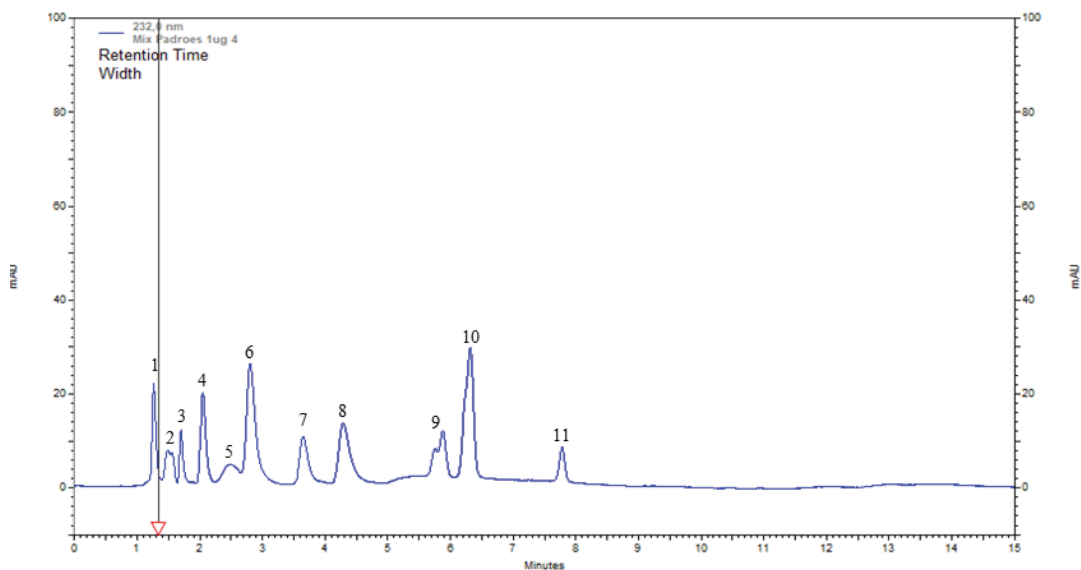
FIGURA 13 – DETECÇÃO DE ESPECTROS DE COCAÍNA E LSD EM PICO CROMATOGRÁFICO APRESENTANDO COELUIÇÃO



FONTE: A autora (2023)

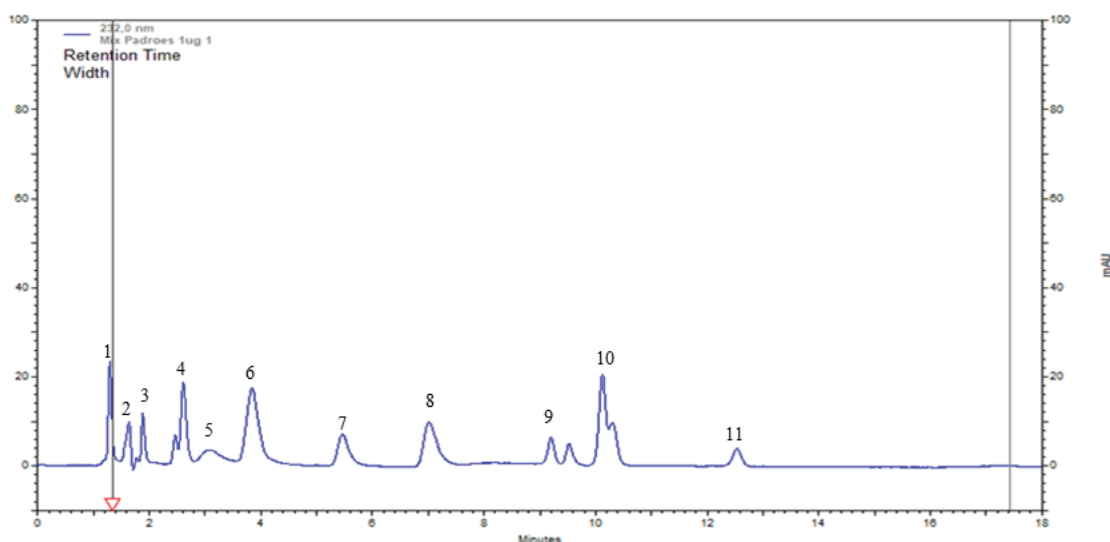
Na sequência, estão demonstrados os cromatogramas obtidos após as corridas feitas nos gradientes de eluição demonstrados no item 4.5, sendo a FIGURA 14, referente ao Gradiente 1, FIGURA 15, Gradiente 2 e FIGURA 16, Gradiente 3. Na legenda das figuras estão demonstradas as substâncias detectadas em cada pico.

FIGURA 14 – CROMATOGRAMA OBTIDO APÓS CORRIDA REALIZADA UTILIZANDO CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS ESTABELECIDAS NO GRADIENTE 1:



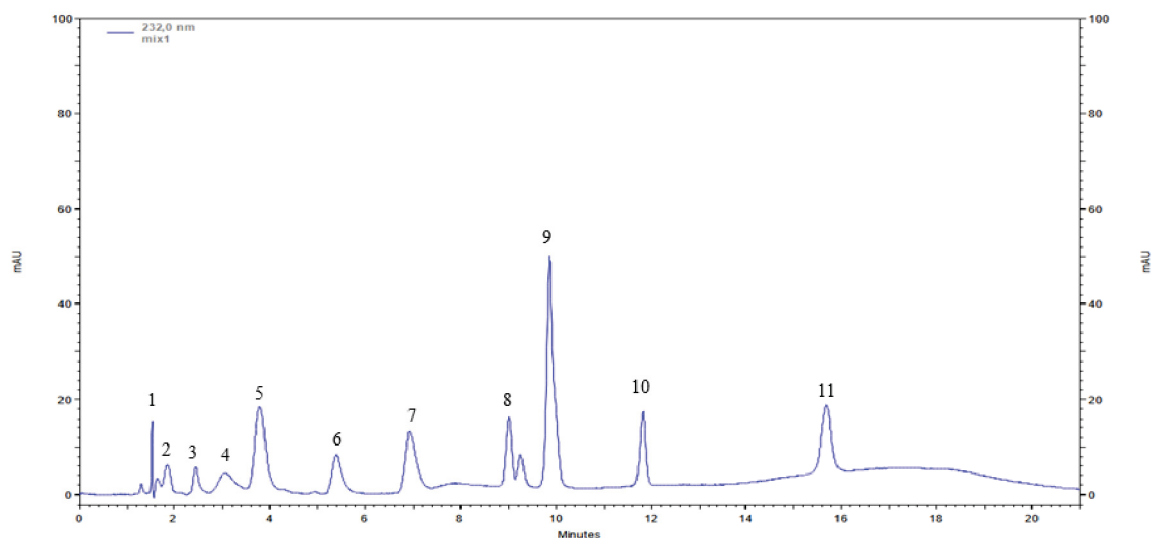
LEGENDA: 1: não identificou; 2: Codeína; 3: MDA; 4: MBDB; 5: Benzoilecgonina; 6: Cocaína + LSD; 7: Cocaetileno; 8: Flurazepam; 9: Desipramina + Nitrazepam; 10: Lorazepam + Nortriptilina; 11: Flunitrazepam

FIGURA 15 – CROMATOGRAMA OBTIDO APÓS CORRIDA UTILIZANDO GRADIENTE 2:



LEGENDA: 1: não identificou; 2: Codeína; 3: MDA; 4: MBDB; 5: Benzoilecgonina; 6: Cocaína + LSD; 7: Cocaetileno; 8: Flurazepam; 9: Nitrazepam + Desipramina; 10: Lorazepam + Nortriptilina; 11: Flunitrazepam

FIGURA 16 – CROMATOGRAMA OBTIDO APÓS CORRIDA UTILIZANDO GRADIENTE 3:



LEGENDA: 1: Codeína; 2: MDA; 3: MBDB; 4: Benzoilecgonina; 5: Cocaína + LSD; 6: Cocaetileno; 7: Flurazepam; 8: Nitrazepam. + Desipramina; 9: Lorazepam + Nortriptilina; 10: Flunitrazepam; 11: Diazepam

Ao se analisar as FIGURAS 14, 15 e 16, é possível observar que nem todos os analitos presentes no mix de padrões foram detectados em todas as condições cromatográficas, uma vez que pode ter ocorrido a completa coeluição dos analitos e decorrente impossibilidade de diferenciá-los no detector.

O gradiente 1 iniciou com 33% de ACN, enquanto os gradientes 2 e 3, com 30% do solvente orgânico. A diminuição da proporção da ACN no demonstrou uma maior separação dos picos que saem nos primeiros minutos do cromatograma, sendo essa característica considerada como mais vantajosa para esse estudo, uma vez que haveria uma menor probabilidade da coeluição dos analitos em casos de amostras que estes estivessem presentes em concentrações mais elevadas.

Prosseguindo a avaliação do cromatograma, notou-se que os picos de 6 a 11 apresentaram-se mais bem resolvidos, com maior intensidade e menor base, na FIGURA 16, referente ao Gradiente 3. Neste gradiente, a proporção de ACN chegou a 45%, enquanto no Gradiente 2 (FIGURA 15) a ACN chegou ao máximo de 40% da proporção da fase. Como essa diferença não foi possível de resolver as coeluições que estavam acontecendo em ambos os casos e o Gradiente 3 apresentou picos mais resolvidos, além da detecção de diazepam que não apareceu nos outros cromatogramas, esse foi o gradiente selecionado, com uma corrida cromatográfica de 20 minutos para a execução deste trabalho.

Após a definição do melhor gradiente de eluição para ser utilizado neste trabalho, cada um dos padrões (em uma concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi injetado

individualmente, sendo possível observar os parâmetros de tempo de retenção (t_R) e largura da base do pico (w_b). A partir destes dados foi possível calcular a resolução (R_s) de cada pico, conforme a equação 2 apresentada no item 4.5. Os resultados estão expressos na TABELA 10, sendo que o resultado da resolução se refere ao analito da mesma linha da tabela e o analito da linha anterior. Por exemplo, o valor demonstrado na coluna R_s para o analito denominado **2**, representa a resolução do pico **2** em relação ao pico **1**, e assim sucessivamente.

TABELA 10 – PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS PARA OS ANALITOS NO GRADIENTE 3

Identificação do pico	Analito	Tempo de retenção (min)	Largura da base (w_b)	Resolução R_s
1	Codeína	1,52	0,31	-
2	MDA	1,85	0,29	3,78
3	MBDB	2,44	0,46	4,21
4	Benzoilecgonina	3,05	1,21	0,87
5(início)	Cocaína	3,64	0,83	0,57
5(fim)	LSD	3,71	0,62	0,12
6	Cocaetileno	5,44	1,03	2,55
7	Flurazepam	6,16	0,66	1,01
8 (início)	Nitrazepam	8,22	0,64	4,88
8 (fim)	Desipramina	8,33	0,71	0,24
9 (início)	Lorazepam	8,98	0,66	1,37
9 (fim)	Nortriptilina	9,11	0,34	0,54
10	Flunitrazepam	11,11	0,78	6,33
11	Diazepam	15,06	0,89	5,68

O parâmetro de resolução (R_s) expressa a separação entre dois compostos. Quando $R_s = 1$, os dois picos são razoavelmente separados, podendo ser em algumas situações identificados, mas não integrados para fins quantitativos, uma vez que existe coeluição parcial dos mesmos. Para fins quantitativos, é necessário um valor de R_s de, pelo menos, 1,25, enquanto valores superiores a 1,5 indicam separação completa (Collins, 2017). Pela TABELA 10, é possível notar que não foi observada resolução suficiente (ou seja, a resolução foi inferior a 1) entre os analitos benzoilecgonina e MBDB ($R_s=0,87$), cocaína e benzoilecgonina

($R_s=0,57$), LSD e cocaína ($R_s=0,12$), desipramina e nitrazepam ($R_s=0,24$) e nortriptilina e lorazepam ($R_s=0,54$).

Apesar da ocorrência da coeluição ($R_s<1$) de picos, foi possível detectar a presença dos diferentes analitos que eluíram em cada pico, devido aos diferentes espectros de absorção no UV para cada analito. Dessa forma, tal fato não foi considerado como um fator limitante para a utilização do método cromatográfico na determinação dos analitos passíveis de serem extraídos com os SHS selecionados neste trabalho (DMCHA e TEA).

5.2 DESENVOLVIMENTO DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO VIA SHS-LLME

5.2.1 Avaliação das variáveis do processo de microextração

Como o objetivo desse trabalho era o de desenvolver um método de microextração líquida-líquida aplicável a diferentes tipos de matrizes biológicas (sangue, urina, conteúdo gástrico e fígado), a avaliação das variáveis envolvidas no processo de microextração foi primeiramente realizada utilizando água ultrapura fortificada como amostra, a uma concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, a qual foi preparada conforme item 4.3.2. Dessa forma foi possível estabelecer o potencial dos solventes testados em extrair os analitos avaliados, sem a interferência de compostos presentes nas diferentes matrizes.

A seleção das variáveis avaliadas nesta etapa foi realizada a partir da análise de artigos apresentados na TABELA 3 (item 2.3.2) com foco em observar as diferentes metodologias propostas para a execução da técnica de SHS-LLME estabelecidas nos trabalhos, bem como as condições ótimas de trabalho encontradas, sendo que um resumo desta análise está demonstrado na TABELA 11 apresentada na sequência. Com base nesta tabela, foi possível observar a presença de oito fatores principais que variaram entre os métodos propostos e que podem influenciar diretamente na eficiência da microextração, sendo eles: tipo de solvente utilizado, volume de solvente, volume de amostra, agitação do sistema amostra + solvente, volume de base adicionada para o retorno do SHS para a forma hidrofóbica, agitação após adição da base, tempo de repouso do sistema e necessidade de centrifugação para separar as fases ao final da extração.

TABELA 11 – CONDIÇÕES ÓTIMAS DE TRABALHO ESTABELECIDAS PELOS AUTORES DAS REFERÊNCIAS CITADAS NA TABELA 3 (ITEM 2.3.2):

Referência	SHS	Volume de SHS acidificado	Volume de amostra	Agitação vórtex	Volume de base	Agitação vórtex	Tempo de repouso	Tempo de centrifuga
(Ahmar <i>et al.</i> , 2018)	DPA	800 µL	15 mL	15 s	2 mL	15 s	2 min	0 min
(Lasarte-Aragonés <i>et al.</i> , 2015b)	DMCHA	750 µL	10 mL	15 s	1 mL	15 s	5 min	0 min
(Ezoddin; Abdi; Lamei, 2016)	DMCHA	750 µL	10 mL	0 s	1 mL	0 s	0 min	3 min
(Hassan; Alshana, 2019)	DMCHA	500 µL	3 mL + 9,5 mL de água	0 s	500 µL	30 s	1 min	0 min
(Xu <i>et al.</i> , 2018)	TEA	400 µL	2 mL	0 s	400 µL	0 s	3 min	Sim (mas não cita o tempo)
(Yilmaz; Soyak, 2015)	DMCHA	1 mL	10 mL	0 s	2 mL	0 s	0 min	4 min
(Scheid <i>et al.</i> 2022)	DMCHA	650 µL	500 µL	0 s	500 µL	5 s	1 min	5 min
(Oenning <i>et al.</i> , 2020)	DMCHA	200 µL	500 µL	0 s	600 µL	0 s	3 min	0 min
(Erarpat <i>et al.</i> , 2020)	DBA	750 µL	8 mL	0 s	1 mL	15 s	0	2 min
(Shahraki; Ahmar; Nejati-Yazdinejad, 2018)	DPA	200 µL	4 mL	10 s	2 mL	10 s	2 min	0 min
(Shahvandi; Banitaba; Ahmar, 2018)	DPA	200 µL	4 mL	10 s	100 µL	0 s	2 min	0 min
(Behpour <i>et al.</i> , 2020)	DPA	200 µL	500 µL	10 s	2 mL	0 s	0 min	2 min
(Lamei <i>et al.</i> , 2018)	TEA	500 µL	10 mL	Sonicado por 1 min	2 mL	Ainda sob sonicação	0 min	3 min
(Zhang <i>et al.</i> , 2018)	TEA	2 mL	10 mL	0 min	1 mL	30 s	0 min	3 min
(Habibiyan <i>et al.</i> , 2017)	TEA	900 µL	10 mL	0 min	2 mL	Sonicado por 2 min	0 min	4 min
(Lasarte-Aragonés <i>et al.</i> , 2015a)	DMCHA	250 µL	10 mL	Agitação manual	1 mL	Agitação manual	5 min	0 min
(Wang <i>et al.</i> , 2018)	DMCHA	782 µL	5 mL	2 min	375 µL	0	3 min	0 min

FONTE: A autora (2023)

Dessa forma, foi utilizado um planejamento fatorial fracionário 2_{IV}^{8-4} para uma obtenção de uma visão ampla do método em desenvolvimento e, portanto, a realização da triagem das variáveis mais relevantes que posteriormente serão otimizadas.

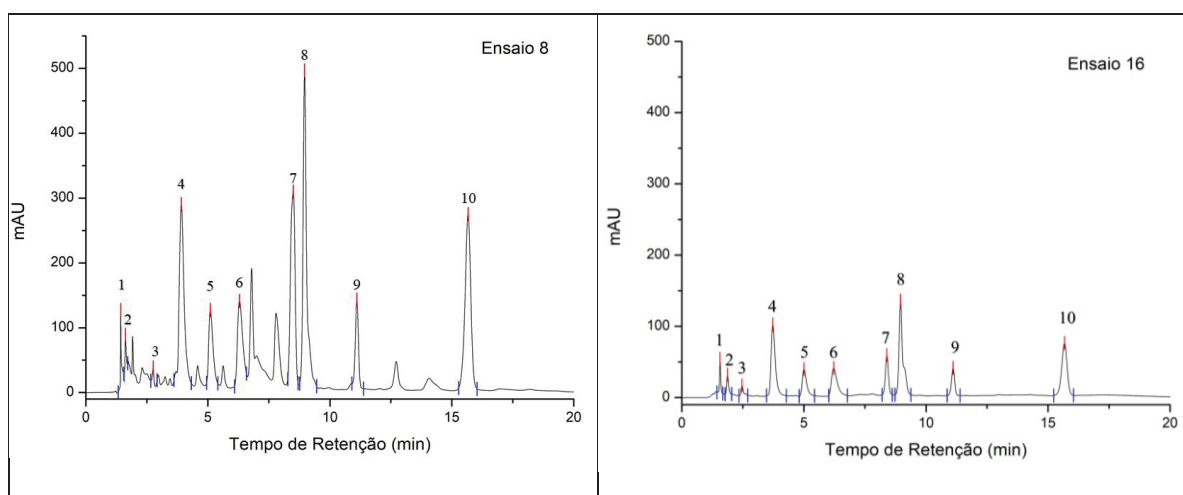
Para tanto, foram definidos 8 fatores e um nível mínimo (-1) e um nível máximo (+1) para cada um dos fatores estudados, conforme demonstrado na TABELA 12. O tipo de solvente usado foi avaliado de forma qualitativa, sendo que a TEA foi estabelecida como nível -1 e o DMCHA como +1. Os demais valores atribuídos para os diferentes parâmetros foram estabelecidos de acordo com valores vistos na literatura. Os ensaios foram realizados conforme TABELA 6, apresentada no item 4.6.

TABELA 12 – PARÂMETROS AVALIADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO 2_{IV}^{8-4}

Fator	Parâmetro Avaliado	Nível	
		-1	+1
1	Solvente	TEA	DMCHA
2	Volume de Amostra	250 µL	750 µL
3	Volume de SHS:HCl	250 µL	1000 µL
4	Agitação no vórtex	0	60 s
5	Volume de NaOH	250 µL	1000 µL
6	Agitação no vórtex	0	60 s
7	Tempo de repouso	2 min	5 min
8	Tempo de centrifugação	0	5 min

Após a realização da microextração, o extrato orgânico de cada ensaio foi coletado e deixado em capela para a evaporação do solvente extrator e, após seco, foi ressolubilizado com 100 µL de fase móvel e as corridas cromatográficas foram realizadas, utilizando 50 µL como volume de injeção. Os cromatogramas obtidos para o Ensaio 8, no qual todos os fatores foram avaliados no Nível +1, e para o Ensaio 16, com todos os fatores no Nível -1, estão demonstrados na FIGURA 17, já os cromatogramas obtidos para os demais ensaios podem ser vistos na figura apresentada no ANEXO 2-A

FIGURA 17 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA OS ENSAIOS 8 e 16

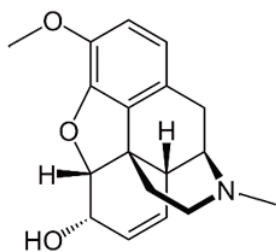


LEGENDA: 1: Codeína; 2: MDA; 3: MBDB; 4:Cocaína + LSD; 5: Cocaetileno; 6: Flurazepam; 7: Nitrazepam. + Desipramina; 8: Lorazepam + Nortriptilina; 9: Flunitrazepam; 10: Diazepam

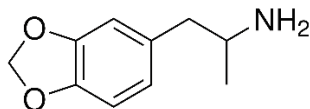
Os Ensaios 8 e 16 mostram os dois extremos das condições analíticas testadas, sendo que o Ensaio 8 foi realizado com todos os fatores no nível (+1) e o Ensaio 16, todos os fatores estavam no nível (-1). Nota-se que o Ensaio 8 apresentou picos bem mais intensos, mas também apresentou um número maior de picos, que podem ser entendidos como picos interferentes, provenientes da extração de substâncias do microtubo de plástico ou de reagentes utilizados no ensaio. Já o Ensaio 16 apresentou um cromatograma bem mais limpo, entretanto, com picos de menor intensidade. Dessa forma, é possível notar a importância da avaliação de todos os fatores de forma conjunta, levando-se em consideração como a variação em um fator pode influenciar na resposta de outro, com o objetivo de encontrar as melhores condições de extração.

Comparando-se os cromatogramas apresentados na FIGURA 17, nota-se a presença de 10 picos cromatográficos e não 11 como foi visto na etapa de avaliação das condições cromatográficas. Isso ocorreu devido ao fato de nenhuma condição testada ter sido capaz de extrair o analito benzoilecgonina, principal produto de biotransformação da cocaína. Conhecendo as características físico-químicas das moléculas, como pKa e LogP, demonstrados na FIGURA 18, é possível avaliar o sucesso ou insucesso da extração com o solvente trietilamina, conforme será explicado na sequência.

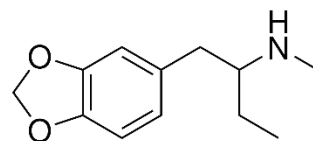
FIGURA 18 – ESTRUTURA QUÍMICA DAS MOLÉCULAS DOS ANALITOS ESTUDADOS, pKa
E LogP (Continua)



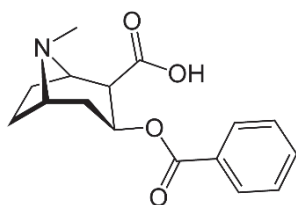
Codeína
pKa: 8,20
LogP: 1,39



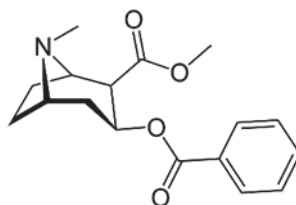
MDA
pKa: 9,67
LogP: 1,64



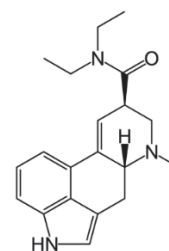
MBDB
pKa: 9,90
LogP: 2,15



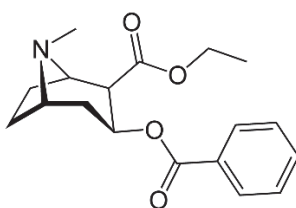
Benzoilecgonina
pKa: 9,54
LogP: 1,7



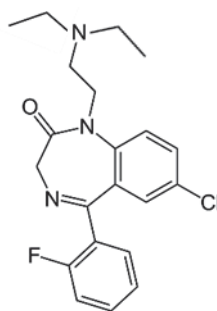
Cocaína
pKa: 8,61
LogP: 2,3



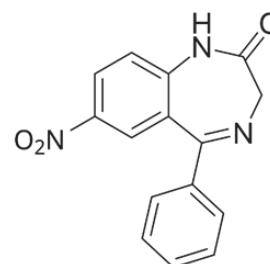
LSD
pKa: 7,8
LogP: 2,95



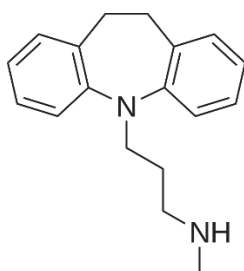
Cocaetileno
pKa: 8,77
LogP: 2,53



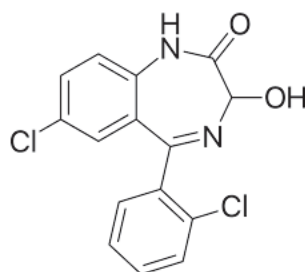
Flurazepam
pKa: 8,70
LogP: 2,53



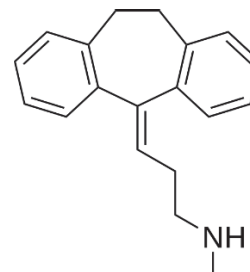
Nitrazepam
pKa: 2,65
LogP: 2,25



Desipramina
pKa: 10,4
LogP: 4,9

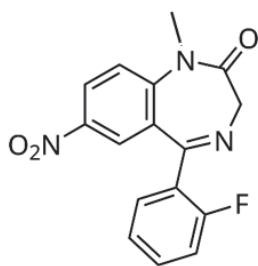


Lorazepam
pKa: 10,6
LogP: 2,39

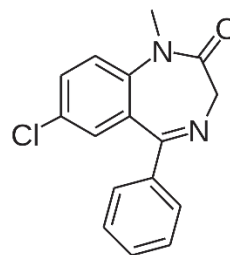


Nortriptilina
pKa: 9,70
LogP: 4,50

FIGURA 18 – ESTRUTURA QUÍMICA DAS MOLÉCULAS DOS ANALITOS ESTUDADOS, pKa E LogP
(Conclusão)



Flunitrazepam
pKa: 1,72
LogP: 2,06



Diazepam
pKa: 3,40
LogP: 2,82

FONTE: DrugBank, 2025

A maioria dos analitos (MBDB, cocaína, LSD, cocaetileno, flurazepam, desipramina, lorazepam e nortriptilina) apresenta pKa básico ($pK_a > 7,0$). Essa condição favorece a extração dos analitos, uma vez que durante a extração ocorre a basificação do meio, para promover o retorno da TEA para sua forma hidrofóbica (FIGURA 6), logo, os analitos estarão predominantemente em sua forma molecular. Adicionalmente, esses analitos apresentam o coeficiente de partição octanol:água (LogP) superior a 2,0, indicando que as moléculas são mais solúveis no solvente orgânico do que em meio aquoso (matriz biológica). Os benzodiazepínicos nitrazepam, flunitrazepam e diazepam apresentam um pKa ácido (2,65, 1,72 e 3,40, respectivamente), e estarão predominantemente em sua forma ionizada durante a extração dos analitos, entretanto, seus altos valores de LogP (2,25, 2,06 e 2,82) podem ter favorecido a solubilização das moléculas no solvente orgânico.

Os analitos codeína, MDA e benzoilecgonina apresentam valores próximos de pKa (respectivamente, 8,20, 9,67 e 9,54) e de LogP (1,39, 1,64 e 1,70), entretanto, apenas a benzoilecgonina não foi extraída com sucesso pela TEA. Este fato pode ser devido a presença de um grupamento ácido carboxílico na molécula de benzoilecgonina, o que torna a molécula mais polar e de mais difícil extração por solventes orgânicos apolares. Já é reconhecido na literatura que a extração da benzoilecgonina juntamente com a cocaína e outros produtos de biotransformação representa um grande desafio para métodos de microextração líquida-líquida, devido a seu caráter anfótero (Lizot *et al.*, 2019).

Não foram obtidos cromatogramas para os Ensaios 6 e 10 devido à grande dificuldade de recuperação da fração orgânica após a extração. Nestes ensaios,

foram utilizados os maiores volumes de SHS:HCl e de NaOH, sem agitação posterior. Provavelmente, devido ao grande volume de solvente e da base presentes no sistema (2 mL) e à pequena superfície de contato entre os dois (devido à falta de agitação), não houve uma completa desprotonação do SHS utilizado, ou seja, o mesmo não retornou para sua forma hidrofóbica, impossibilitando sua separação da fase aquosa e consequente coleta. Dessa forma, foi atribuído o valor zero para todos os picos desses dois ensaios, para que esses fatores fossem levados em consideração na triagem das variáveis a serem otimizadas.

Para a realização dos cálculos estatísticos, a área de cada pico foi convertida para a função de desejabilidade, a qual foi proposta por Derringer e Suich em 1980 e é amplamente utilizada para a otimização de processos envolvendo várias respostas a serem simultaneamente otimizadas. Para tanto, as respostas obtidas nos ensaios são transformadas em valores adimensionais, que variam de 0 a 1, e então agregadas em um valor de Desejabilidade global (D), que corresponde à média geométrica das desejabilidades individuais (d_i) encontradas em cada ensaio (Ferreira *et al.*, 2007).

A desejabilidade não apenas combina várias respostas, mas também permite que diferentes pesos sejam dados para as respostas de cada analito, conforme necessário. O primeiro passo para o cálculo da desejabilidade, é definir o propósito da otimização, se minimizar ou maximizar os resultados encontrados (Bezerra *et al.*, 2019). Quando se tem a intenção de maximizar a resposta de um ou mais analitos, a função demonstrada na equação 9 (eq. 9) deve ser utilizada:

$$d_i = \begin{cases} 0 & \text{se } y_i < L_i \\ \left(\frac{y_i - L_i}{U_i - L_i}\right)^s & \text{se } L_i \leq y_i \leq U_i \\ 1 & \text{se } y_i > U_i \end{cases} \quad (9)$$

Onde: y_i = resposta encontrada; U_i = valor máximo da resposta; L_i = valor mínimo da resposta e s = parâmetro que demonstra qual a importância da resposta (y_i) estar próxima do máximo, funcionando como uma espécie de peso para cada resposta de cada ensaio (Bezerra *et al.*, 2019)

Para a realização da triagem das variáveis, optou-se por trabalhar com as áreas obtidas para cada pico como valor máximo e mínimo e sem acrescentar

nenhum peso nos cálculos (ou seja, $s=1$), já que o objetivo dessa etapa é o de observar como cada variável influencia na resposta obtida. Portanto, as desejabilidades individuais foram calculadas conforme equação 4 (item 4.8) e a desejabilidade global (média geométrica das di) foi calculada para cada ensaio. Os resultados obtidos estão apresentados na TABELA 13.

TABELA 13 – VALORES DE DESEJABILIDADE

Ensaio	Pico 1	Pico 2	Pico 3	Pico 4	Pico 5	Pico 6	Pico 7	Pico 8	Pico 9	Pico 10	D
1	0,783	0,501	0,371	0,413	0,425	0,463	0,139	0,242	0,353	0,323	0,368
2	0,212	0,053	0,120	0,109	0,085	0,075	0,041	0,073	0,047	0,080	0,080
3	0,565	0,486	0,628	0,730	0,785	0,845	0,251	0,543	0,629	0,594	0,579
4	0,531	0,326	0,489	0,337	0,324	0,324	0,147	0,330	0,198	0,317	0,313
5	0,000	0,000	0,331	0,242	0,287	0,313	0,126	0,295	0,236	0,223	0,248
6	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
7	0,984	0,577	1,000	0,591	0,711	0,661	0,289	0,747	0,581	0,553	0,637
8	1,000	1,000	0,103	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,797
9	0,000	0,161	0,457	0,211	0,232	0,266	0,124	0,277	0,199	0,207	0,223
10	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
11	0,000	0,247	0,000	0,208	0,157	0,905	0,698	0,207	0,354	0,238	0,312
12	0,205	0,098	0,062	0,062	0,060	0,063	0,024	0,047	0,057	0,051	0,063
13	0,630	0,302	0,533	0,390	0,346	0,385	0,164	0,311	0,305	0,367	0,353
14	0,470	0,430	0,692	0,502	0,532	0,560	0,172	0,348	0,273	0,445	0,415
15	0,288	0,290	0,389	0,254	0,250	0,248	0,155	0,232	0,281	0,232	0,256
16	0,471	0,359	0,307	0,327	0,341	0,366	0,132	0,298	0,283	0,261	0,301

Nota: foram apresentadas apenas 3 casas decimais nesta tabela para facilitar sua visualização.

A partir da desejabilidade global obtida para cada ensaio, os efeitos dos fatores foram calculados. Para os cálculos utilizando o planejamento fatorial fracionário $2^{IV^{8-4}}$, foram utilizadas as seguintes funções geradoras: I4=128, I5=138, I6=238 e I7=123.

O planejamento fatorial fracionário permite a obtenção de uma visão ampla do método sendo desenvolvido, uma vez que se trata de uma estratégia analítica útil para triagem das variáveis mais relevantes de um determinado sistema

analítico. A partir da seleção dessas variáveis, é possível realizar suas otimizações para a determinação das melhores condições para a execução do método (Vicentini *et al.*, 2011), sendo que isso é possível porque parte das interações consideradas de maior ordem (isto é, interação entre três ou mais variáveis) apresentam uma grande probabilidade de serem consideradas não significativas para os resultados (Barros Neto; Scarminio; Bruns, 2010).

Efeitos com baixas significâncias são misturados com os efeitos de interações significativas, gerando um valor de contraste para essas variáveis ou interações misturadas o que é chamado de “confundimento”. Essa mistura dos efeitos de interações não significativos com interações significativas permite a realização apenas de uma fração dos experimentos sem perdas significativas para o resultado (da Silva *et al.*, 2023).

Adicionalmente, pode haver o confundimento gerado pela interação entre os fatores de segunda ordem, sendo que as funções geradoras dos efeitos de segunda ordem estão demonstradas na TABELA 14.

TABELA 14 – EFEITOS PRINCIPAIS E EFEITOS DE SEGUNDA ORDEM CALCULADOS A PARTIR DO PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO 2_{IV}^{8-4}

Nome do efeito de primeira ordem	Fator principal correspondente/ interação entre os fatores	Nome do efeito de segunda ordem	Interações entre fatores
I_1	1	I_{12}	12 + 37 + 48 + 56
I_2	2	I_{13}	13 + 27 + 46 + 58
I_3	3	I_{14}	14 + 28 + 36 + 57
I_4	4	I_{15}	15 + 26 + 38 + 47
I_5	5	I_{16}	16 + 25 + 34 + 78
I_6	6	I_{17}	17 + 23 + 45 + 68
I_7	7	I_{18}	18 + 24 + 35 + 67
I_8	8	-	-

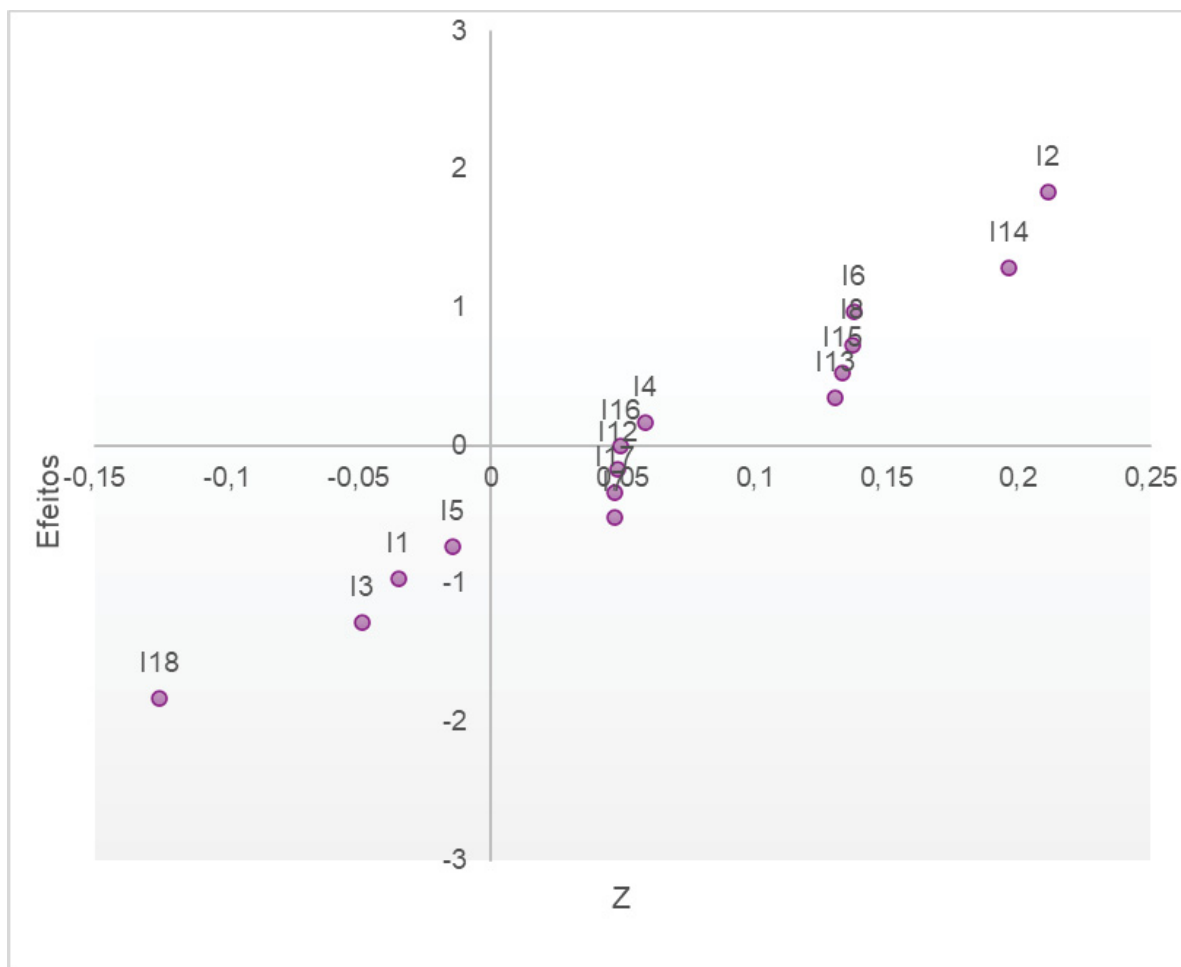
FONTE: Barros Neto; Scarmio; Bruns (2010)

Conforme é possível ver na TABELA 14, o efeito de primeira ordem I_1 corresponde à primeira coluna da matriz do planejamento fatorial (solvente) e seus cálculos serão realizados utilizando os sinais definidos para essa coluna na matriz (os sinais podem ser vistos na TABELA 6 do item 4.6) Já para o cálculo dos efeitos de segunda ordem, há que se considerar o produto de duas colunas. Por exemplo,

o efeito de segunda ordem I_{12} pode ser entendido como a interação entre os fatores 1 e 2 (solvente e quantidade de amostra), e/ou 3 e 7 (quantidade de SHS:HCl e tempo de repouso), e/ou 4 e 8 (agitação no vórtex e tempo de centrifuga) e/ou 5 e 6 (volume de NaOH e agitação no vórtex). Portanto, o efeito I_{12} será calculado considerando o produto dos sinais de qualquer uma das combinações de colunas apresentadas para esse efeito (uma vez que o resultado será o mesmo).

Devido à ocorrência da confusão dos efeitos de segunda ordem, já que várias interações apresentam o mesmo produto, eles não são levados em consideração para a avaliação dos fatores significativos. Adicionalmente, como as colunas da matriz do planejamento fatorial fracionário são todas ortogonais, essa simetria permite que os efeitos principais de cada fator sejam considerados e que os efeitos das interações entre os fatores sejam desprezados (Barros Neto; Scarminio; Bruns, 2010).

Com base no exposto, os efeitos dos confundimentos foram calculados e os valores encontrados foram associados a uma probabilidade acumulada de sua ocorrência. Para tanto, os efeitos foram organizados de forma crescente, associados a uma região de probabilidade cumulativa (%) e plotados num gráfico normal em função do valor Z, que é o valor correspondente da distribuição normal padronizada (FIGURA 19).

FIGURA 19 – EFEITOS CALCULADOS *versus* PROBABILIDADE CUMULATIVA

Para a avaliação do gráfico, considera-se que quanto mais distante dos valores 0 (Efeito) e 0 (Z), mais significância estatística o fator apresenta na realização do ensaio, ou seja, se esses fatores sofrerem alterações poderão acarretar grandes mudanças nos resultados obtidos nos ensaios. Dessa forma, cada fator foi avaliado da seguinte forma:

- Fator 1 (Solvente utilizado): Apesar desse fator (I1) estar próximo à origem no gráfico apresentado, observou-se que uma melhor resposta foi encontrada no nível -1. Ou seja, ambos os solventes foram capazes de extrair todos os analitos (com a exceção da benzoilecgonina) mas a TEA apresentou resultados um pouco melhores. Dessa forma, a TEA foi selecionada como solvente extrator para a realização deste estudo, sem a necessidade de otimização desse fator, por tratar-se de uma variável qualitativa.
- Fator 2, 3 e 5 (Volume de amostra, de SHS:HCl e NaOH): O volume da amostra foi o fator mais distante da origem do gráfico, sendo considerado o fator de maior relevância estatística e, portanto, selecionado para a otimização. Os

fatores referentes ao volume de solvente (I3) e volume da base (I5) apresentaram uma menor relevância estatística que o volume da amostra, entretanto, também foram considerados como fatores importantes e selecionados para a etapa de otimização.

- Fatores 4 e 6 (Agitação no vórtex): tanto após a adição de solvente acidificado quanto após a adição da base, os fatores apresentaram sinal positivo, ou seja, resultados melhores com agitação. Entretanto, é possível ver no gráfico que esses efeitos formam duas linhas verticais com outros efeitos, o que demonstra que há a ocorrência de confundimento entre eles, ou seja, não há significância estatística para o tempo de agitação empregado no vórtex. Dessa forma, o tempo de agitação em ambas as etapas foi fixado em 10 s, tempo experimentalmente visto como suficiente para misturar os componentes. A importância da agitação foi especialmente vista na execução dos ensaios 6 e 10, como comentado anteriormente, para os quais não houve a recuperação da fase orgânica devido à ausência da agitação.

- Fator 7 e 8 (Tempo de repouso e tempo de centrifugação): O tempo de repouso do sistema é o momento em que efetivamente acontece a extração dos analitos, com a migração das moléculas para a fase orgânica. Durante o repouso já é possível constatar a separação das fases orgânica e aquosa, entretanto, experimentalmente foi mais fácil a coleta da porção orgânica após a centrifugação. Adicionalmente, ambos os fatores apresentaram resultado positivo, ou seja, melhores respostas no nível +1. Dessa forma, os tempos definidos para repouso e centrifugação testados no nível +1 foram fixados para a realização da microextração e esses fatores não foram selecionados para otimização.

Com base na avaliação realizada, os fatores 2 (volume da amostra), 3 (volume do solvente) e 5 (volume da base) foram otimizadas conforme item 5.3.

5.3 OTIMIZAÇÃO DA MICROEXTRAÇÃO

A otimização das variáveis foi realizada utilizando-se um planejamento fatorial completo 2^3 , mais planejamento estrela, e triplicata do ponto central, com a avaliação dos resultados através de um gráfico de superfície de resposta. A adição do planejamento estrela ao planejamento fatorial, que consiste na inclusão de 6 novos pontos que se distanciam do ponto central de forma simétrica, possibilitou a

avaliação dos fatores em condições extremas, permitindo estudar um espaço amostral mais amplo, mas ainda mantendo um baixo número de experimentos (Souza; Azerêdo; Silva, 2018). Os níveis a serem otimizados estão demonstrados na TABELA 15 e foram definidos de acordo com os resultados obtidos no planejamento fatorial fracionário.

TABELA 15 – OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE EXTRAÇÃO UTILIZANDO PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3 COM PLANEJAMENTO ESTRELA E TRIPPLICATA DO PONTO CENTRAL

Parâmetro Avaliado	Nível				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Volume de Amostra (μL)	330	400	500	600	670
Volume de SHS:HCl (μL)	80	150	250	350	420
Volume de NaOH (μL)	80	150	250	350	420

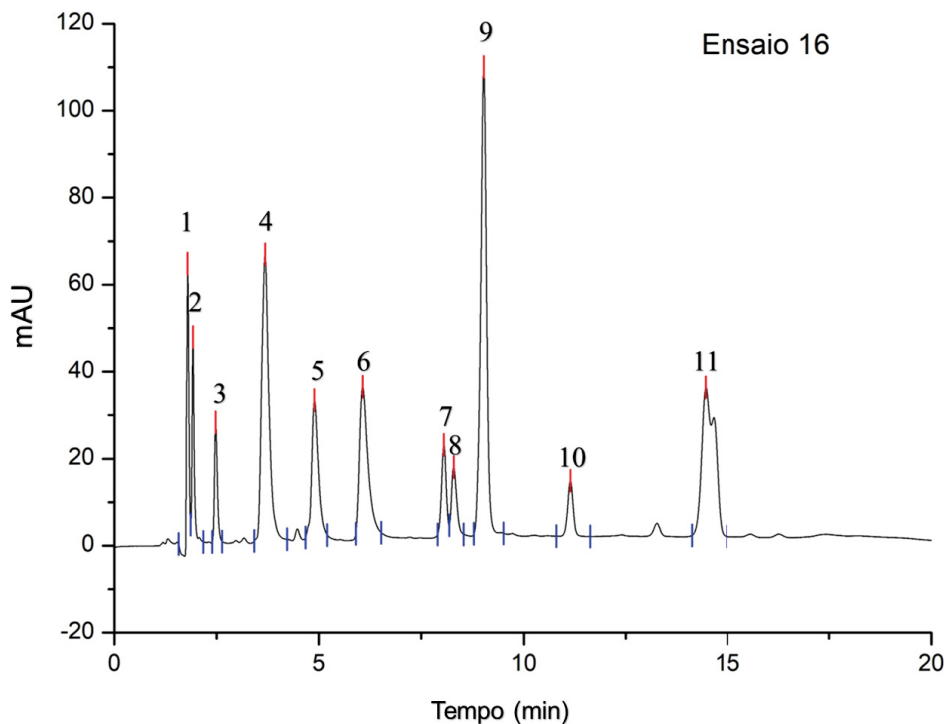
Como o volume de solvente acidificado e de base apresentaram melhores resultados no nível (-1), selecionou-se o volume utilizado nesse nível, 250 μL , como nível 0, variando-se esse volume em 100 μL para menos e para mais para a realização do planejamento fatorial. Adicionando os pontos do planejamento estrela, e o intervalo estudado para essas variáveis variou de 80 a 420 μL .

Já o volume de amostra apresentou melhor resultado no nível (+1), ou seja, quando utilizado um volume de amostra de 750 μL . Entretanto, considerando aplicabilidade do método na rotina de um laboratório de toxicologia forense, nem sempre este volume de amostra está disponível, uma vez que em muitas situações estão disponíveis apenas 1 ou 2 mL de sangue para a realização da perícia e guarda de material para contraperícia (LTF-PCP, 2022). Apesar de que esse fator já deveria ter sido levado em consideração durante a etapa do planejamento fatorial fracionário, optou-se por definir o ponto central em 500 μL de amostra (volume atualmente utilizado pelo LTF-PCP (Pragst; Herzler; Erxleben, 2004)). Os níveis -1 e +1 também tiveram uma variação de 100 μL e o intervalo testado foi de 330 a 670 μL .

Os ensaios foram realizados conforme matriz demonstrada na TABELA 7 do item 4.7 e os extratos obtidos foram tratados conforme item anterior, ou seja, secos, ressolubilizados com FM e injetados (50 μL) no LC-DAD. Como exemplo, na FIGURA 20 a seguir, apresenta-se o cromatograma obtido para o Ensaio 16,

realizado nas condições centrais do experimento. Os demais cromatogramas estão apresentados no anexo 2-B deste documento.

FIGURA 20 – CROMATOGRAMA OBTIDO PARA O ENSAIO 16



Legenda: 1: Codeína; 2: MDA; 3: MBDB; 4: Cocaína + LSD; 5: Cocaetileno; 6: Flurazepam; 7: Nitrazepam; 8: Desipramina; 9: Lorazepam + Nortriptilina; 10: Flunitrazepam; 11: Diazepam

Avaliando-se o cromatograma, é possível observar que nesta etapa do estudo, foram obtidos 11 picos cromatográficos, em vez dos 10 picos encontrados no planejamento fatorial fracionário. Essa ocorrência se deu devido aos analitos desipramina e nitrazepam, que estavam coeluído nos cromatogramas obtidos para o planejamento fatorial fracionário, não coeluíram nos cromatogramas obtidos nessa etapa do estudo. Isso pode ter acontecido devido à pequenas variações ocorridas durante a realização do processo cromatográfico, como o preparo do tampão utilizado no equipamento, condições do equipamento cromatográfico que podem variar devido a seu uso constante, temperatura da sala, entre outros. A identificação dos picos obtidos nos cromatogramas dos Ensaios 1 a 17, e seus tempos de retenção, podem ser vistos na TABELA 16

TABELA 16 – IDENTIFICAÇÃO DOS PICOS VISTOS NOS CROMATOGRAMAS DOS ENSAIOS OBTIDOS APÓS PLANEJAMENTO FATORIAL MAIS PLANEJAMENTO ESTRELA E TRIPLICATA DO PONTO CENTRAL (ENSAIOS 1 – 17)

Nome do Pico	Analitos	Tempo de Retenção (min)
1	Codeína	1,78
2	MDA	1,96
3	MBDB	2,53
4	Cocaína+LSD	3,73
5	Cocaetileno	4,99
6	Flurazepam	6,11
7	Nitrazepam	8,05
8	Desipramina	8,35
9	Lorazepam+Nortriptilina	9,03
10	Flunitrazepam	11,14
11	Diazepam	14,42

CAs áreas dos picos obtidos nos cromatogramas foram convertidas em função da desejabilidade individual, sendo que para todos os analitos foi dado um peso de 1,25, para que o valor encontrado tivesse um peso maior. A desejabilidade individual nesse caso foi calculado utilizando a equação 5, apresentada no item 4.8, e a desejabilidade global foi calculada para cada um dos ensaios. Os resultados estão demonstrados na TABELA 17.

TABELA 17 – VALORES DE DESEJABILIDADE PARA O PLANEJAMENTO FATORIAL MAIS PLANEJAMENTO ESTRELA E TRIPLICATA DO PONTO CENTRAL (Continua)

Ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	D
1	1E-08	1,000	0,542	1,000	1E-08	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,666	0,032
2	0,334	0,019	0,384	0,271	0,504	0,108	0,228	0,156	0,212	0,074	0,535	0,189
3	0,463	0,017	0,457	0,304	0,563	0,093	0,156	0,179	0,243	1E-08	0,377	0,045
4	0,383	0,020	0,385	0,169	0,398	0,060	0,126	0,079	0,106	0,086	0,170	0,130
5	0,463	0,036	0,628	0,195	0,429	0,057	0,092	0,052	0,103	0,076	0,230	0,140
6	0,321	0,007	0,112	0,139	0,219	0,038	0,092	0,088	0,107	0,062	0,195	0,089
7	0,259	0,030	1,000	0,328	0,507	0,147	0,238	0,158	0,224	0,094	0,291	0,215

TABELA 17 – VALORES DE DESEJABILIDADE PARA O PLANEJAMENTO FATORIAL MAIS PLANEJAMENTO ESTRELA E TRIPLICATA DO PONTO CENTRAL (Conclusão)

Ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	D
8	0,528	0,017	0,402	0,322	0,448	0,131	0,239	0,124	0,239	0,212	0,548	0,219
9	1,000	0,038	0,870	0,550	1,000	0,142	0,260	0,315	0,366	0,155	0,504	0,335
10	0,445	0,014	0,272	0,176	0,292	0,044	0,098	0,105	0,141	0,073	0,218	0,122
11	1E-08	1E-08	1E-08	1E-08	1E-08	1E-08	1E-08	1E-08	1E-08	1E-08	1E-08	1E-08
12	0,497	0,032	0,805	0,557	0,962	0,227	0,458	0,300	0,451	0,137	1,000	0,360
13	0,535	0,028	0,652	0,389	0,749	0,131	0,222	0,138	0,249	0,189	0,482	0,252
14	0,393	0,015	0,447	0,262	0,522	0,066	0,099	0,150	0,193	0,130	0,180	0,158
15	0,934	0,997	0,468	0,946	0,925	0,625	0,448	1,000	0,976	0,875	0,591	0,767
16	1,000	1,000	0,498	1,000	1,000	0,694	0,485	0,958	1,000	0,949	0,690	0,815
17	0,251	0,473	1,000	0,639	0,535	1,000	1,000	0,632	0,952	0,857	1,000	0,704

Nota: foram apresentadas apenas 3 casas decimais nesta tabela para facilitar sua visualização.

LEGENDA: 1: Codeína; 2: MDA; 3: MBDB; 4 Cocaína + LSD; 5: Cocaetileno; 6: Flurazepam; 7: Nitrazepam; 8: Desipramina; 9: Nortriptilina+Lorazepam; 10: Flunitrazepam; 11: Diazepam

Não foi possível analisar o extrato orgânico para a realização da análise cromatográfica do Ensaio 11. Isso provavelmente ocorreu devido à pequena quantidade de TEA:HCl utilizada, que foi de apenas 80 μL (dos quais, 40 μL de TEA e 40 μL de HCl), para a extração de um volume de amostra de 500 μL e posterior adição de 250 μL de NaOH. Como o volume do sistema era muito maior do que o volume do extrato orgânico (que seria de no máximo 40 μL) nessa situação, foi inviável a sua recuperação. Ainda assim, foi considerada uma desejabilidade de 0,00000001 para os picos desse ensaio para que o mesmo fosse considerado para os cálculos estatísticos.

Os resultados obtidos foram plotados em um gráfico de superfície de resposta, sendo essa uma técnica matemática e estatística frequentemente utilizada na otimização de processos com diversas variáveis, uma vez que permite a identificação de correlação entre os fatores observados e também a determinação da condição ótima de trabalho para cada analito (Mokhtari *et al.*, 2024). Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA) para a avaliação da validade da superfície de resposta, sendo que os resultados obtidos para essa avaliação estão na TABELA 18:

TABELA 18 – ANÁLISE DA VARIÂNCIA PARA AVALIAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Fonte de variação	gl	SQ	MQ	F	F de significação	F tabelado
Regressão	10	0,95	0,10	6,54	0,016	4,06
Resíduo	6	0,09	0,01			
Erro puro	2	0,01	0,01			
Falta de ajuste	4	0,07	0,02	6,52		19,25
Total	16	1,04				

% de variação explicada: 77,59%

% máxima de variação explicada: 91,60%

LEGENDA: gl: graus de liberdade; SQ: soma quadrática, MQ: média quadrática

A superfície de resposta foi considerada estatisticamente significativa, apresentando um p de 0,02 (<p0,05). Adicionalmente, apresenta o F calculado maior do que o F tabelado e o F calculado para a falta de ajuste menor que o F tabelado. O modelo apresentou um R² ajustado de 0,7759 que é considerado adequado para um modelo envolvendo vários fatores, além do monitoramento de várias respostas (uma vez que 13 analitos foram avaliados ao mesmo tempo).

Por fim, a superfície de resposta é calculada através da seguinte equação (eq.11):

$$y = \beta_0 + \sum_i \beta_i x_i + \sum_i \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \sum_j \beta_{ij} x_i x_j \quad (11)$$

Onde β_0 é a constante do modelo, β_i , β_{ii} e β_{ij} são os parâmetros de regressão para o efeito linear, quadrático e de interação respectivamente. Estes parâmetros geralmente são estimados usando a regressão dos mínimos quadrados (Bezerra *et al.*, 2019). Para a superfície de resposta aqui estudada, apenas os efeitos quadráticos foram vistos como significativos, conforme é possível ver na tabela de efeitos demonstrada na TABELA 19:

TABELA 19 – SELEÇÃO DOS EFEITOS SIGNIFICATIVOS

	<i>Coeficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>
Interseção	0,7618	0,0697	10,9318	0,0000	0,5912	0,9323
1	-0,0120	0,0327	-0,3671	0,7262	-0,0919	0,0679
2	0,0560	0,0327	1,7136	0,1374	-0,0239	0,1359
3	0,0080	0,0327	0,2456	0,8142	-0,0719	0,0879
1²	-0,1915	0,0346	-5,5408	0,0015	-0,2761	-0,1069
2²	-0,2076	0,0346	-6,0074	0,0010	-0,2922	-0,1231
3²	-0,1992	0,0346	-5,7650	0,0012	-0,2838	-0,1147
12	-0,0019	0,0427	-0,0454	0,9653	-0,1064	0,1025
13	-0,0361	0,0427	-0,8456	0,4302	-0,1405	0,0683
23	0,0311	0,0427	0,7293	0,4933	-0,0733	0,1355
123	0,0158	0,0427	0,3710	0,7234	-0,0886	0,1202

LEGENDA: gl: graus de liberdade; SQ: soma quadrática, MQ: média quadrática

Portanto, a equação do modelo ajustado pode ser descrita da seguinte forma (eq.12):

$$y = 0,7618 - 0,1915x_1^2 - 0,2076x_2^2 - 0,1992x_3^2 \quad (12)$$

Uma nova ANOVA foi realizada considerando apenas os efeitos significativos, com o objetivo de avaliar a validade da superfície de resposta obtida. Os resultados estão apresentados na TABELA 20:

TABELA 20 – ANÁLISE DA VARIÂNCIA PARA AVALIAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE RESPOSTA CONSIDERANDO EFEITOS SIGNIFICATIVOS

Fonte de variação	gl	SQ	MQ	F	F de significação	F tabelado
Regressão	3	0,89	0,30	25,1	1,11E-05	3,41
Resíduo	13	0,15	0,01			
Erro puro	2	0,01	0,00			
Falta de ajuste	11	0,15	0,01	4,29		19,40
Total	16	1,04				

% de variação explicada: 81,87%

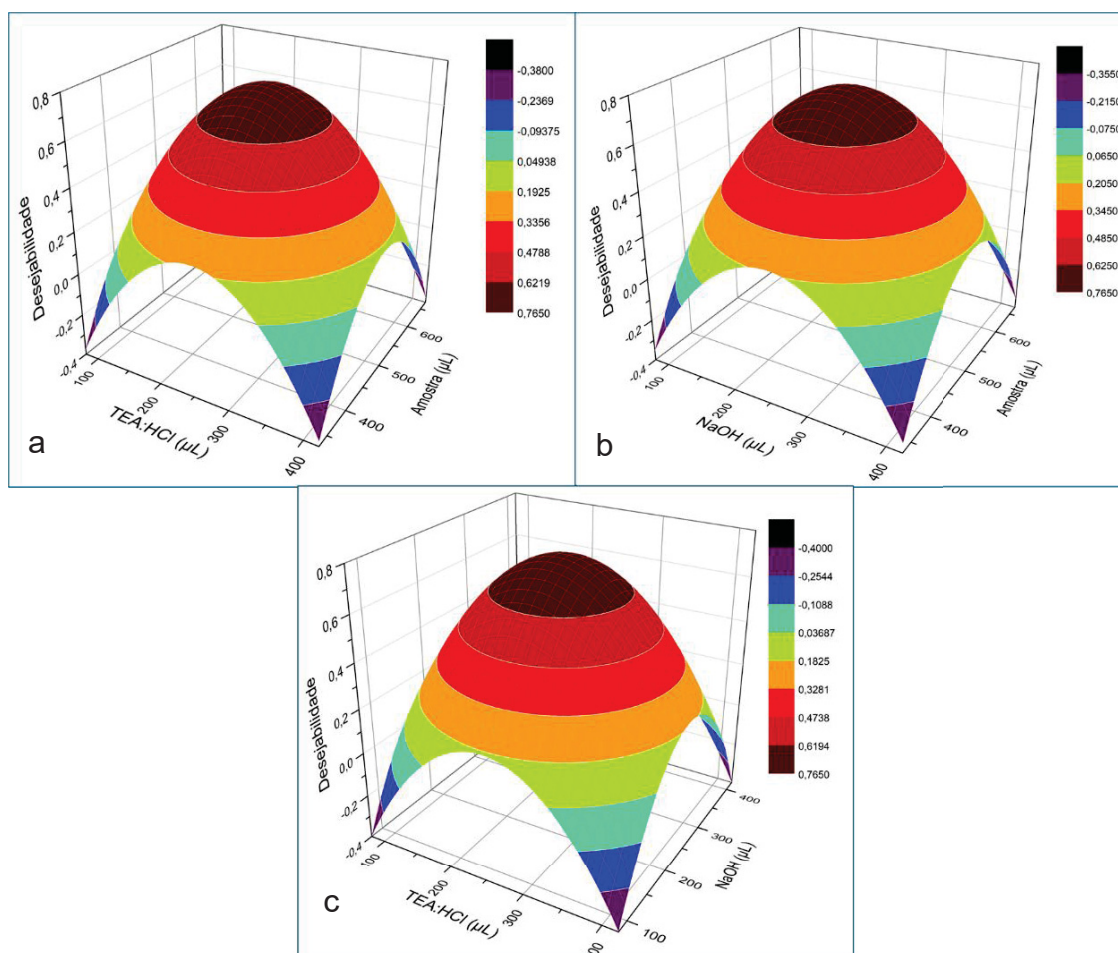
% máxima de variação explicada: 85,27%

LEGENDA: gl: graus de liberdade; SQ: soma quadrática, MQ: média quadrática

Observando os resultados, superfície de resposta foi considerada estatisticamente significativa, apresentando um p de $1,11E-05$ ($<p0,05$). Adicionalmente, apresenta o F calculado (25,1) maior do que o F tabelado (3,41) e o F calculado para a falta de ajuste (4,29) menor que o F tabelado (19,40). O modelo apresentou um R^2 ajustado de 0,8187 que, conforme dito anteriormente, é considerado adequado para um modelo envolvendo vários fatores, além do monitoramento de várias respostas.

O fato de todos os coeficientes da equação da superfície de resposta (eq. 12) apresentarem um sinal negativo, indica que a variação desses fatores para qualquer lado (aumento ou diminuição) diminuirá a resposta (y) do modelo (Barros Neto; Scarminio; Bruns, 2010), logo condições extremas não são favorecidas e sim condições médias. Essa conclusão pode ser mais bem observada nos gráficos de superfície de resposta plotados, que estão demonstrados na FIGURA 21.

FIGURA 21 – GRÁFICO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DOS FATORES VOLUME DE TEA:HCl E VOLUME DE AMOSTRA (a) E VOLUME DE NaOH E VOLUME DE AMOSTRA (b) E VOLUME DE TEA:HCl E NaOH (c)

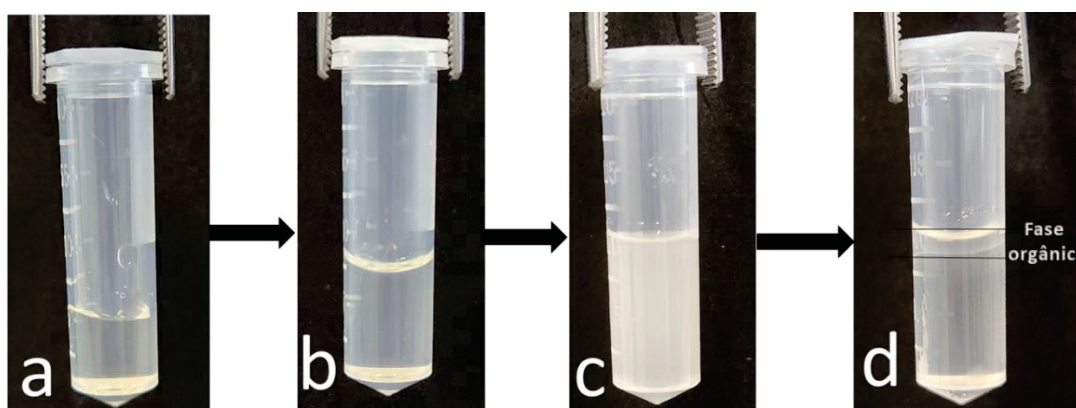


De acordo com os gráficos de superfície de resposta obtidos, foi possível observar que as respostas máximas foram vistas utilizando-se 500 μL de volume de amostra, 250 μL de solvente acidificado e 250 μL de base uma vez que a intersecção dessas condições (volume de amostra e volume de solvente acidificado na FIGURA 21 (a) e volume de amostra e volume de NaOH na FIGURA 21 (b) e volume de solvente acidificado e volume de NaOH (c)) apresenta-se na região de coloração vermelho mais intensa do gráficos, representando que nessas condições foram encontradas as melhores respostas para o experimento.

Possivelmente, as condições médias apresentaram melhores resultados por favorecerem a superfície de contato entre os elementos do sistema. Um volume de 250 μL de TEA:HCl mostra-se ideal para que, quando adicionado em 500 μL de amostra, seja possível o contato com toda a amostra (já que estará miscível) sem uma possível saturação do meio que poderia dificultar a posterior separação das fases. Já um volume menor, poderia permanecer muito diluído no meio, também acarretando uma difícil separação das fases. Já o volume de 250 μL de NaOH mostrou-se ideal para a desprotonação da TEA:HCl, sendo que um volume menor poderia não entrar em contato com todo o solvente acidificado, prejudicando a desprotonação, e um volume maior poderia dificultar a recuperação da TEA e também favorecer a degradação de compostos presentes na amostra.

Por fim, o método de SHS-LLME otimizado está demonstrado na FIGURA 22:

FIGURA 22 – MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA COM SOLVENTE DE HIDROFILICIDADE COMUTÁVEL



LEGENDA: a) 500 μ L de amostra; b) adição de 250 μ L TEA:HCl e 10 s de agitação em vórtex; c) adição de 250 μ L de NaOH; d) após repouso de 5 min e centrifugação por 5 min é possível notar a separação das fases.

É possível observar na FIGURA 22 (b) a formação de uma mistura homogênea após a adição do solvente acidificado na amostra, o que proporciona uma ampla superfície de contato entre analitos presentes na amostra e solvente. Na FIGURA 22 (c) é possível ver a formação de uma mistura turva, em decorrência da adição da base e desprotonação da trietilamina, causando seu retorno à sua forma hidrofóbica. Dessa forma há a formação de milhares de gotículas de solvente orgânico no meio aquoso e, portanto, ampla superfície de contato entre os analitos presentes na amostra e o solvente orgânico, o que proporciona uma rápida transferência de massa da amostra para o solvente. Já na FIGURA 22 (d) nota-se a separação das fases orgânica e aquosa, após o repouso e a centrifugação da mistura, o que permite a recuperação do extrato orgânico que será analisado em LC-DAD.

Como o solvente selecionado para esse trabalho, a trietilamina, foi capaz de extrair todos os analitos pesquisados, com exceção da benzoilecgonina. Uma vez que alguns analitos apresentaram coeluições nas condições cromatográficas aqui utilizadas (cocaína e LSD; desipramina e nitrazepam; lorazepam e nortriptilina), optou-se pela seleção de apenas um dos analitos de cada pico apresentando coeluição, para o prosseguimento dos experimentos realizados.

Para a coeluição de cocaína e LSD, optou-se por prosseguir o estudo com a cocaína, devido sua maior casuística. Com relação às demais coeluições, optou-se por seguir o trabalho com a desipramina e a nortriptilina, antidepressivos tricíclicos, uma vez que outros benzodiazepínicos (flurazepam, flunitrazepam e diazepam) estão incluídos no escopo deste trabalho. Dessa forma, optou-se por uma avaliação mais ampla de classes de moléculas estudadas, que é o objetivo da realização de uma análise de triagem. Os analitos benzodiazepínicos flurazepam, flunitrazepam e diazepam não foram avaliados na urina, uma vez que são excretados nesta matriz na sua forma conjugada (com ácido glucurônico) e não na sua forma inalterada conforme os padrões disponíveis.

Por fim, foi avaliada a realização de injeção direta do extrato orgânico obtido pela SHS-LLME. Para isso, realizou-se o procedimento de extração (em triplicata) de amostras de urina contendo mix dos padrões a uma concentração

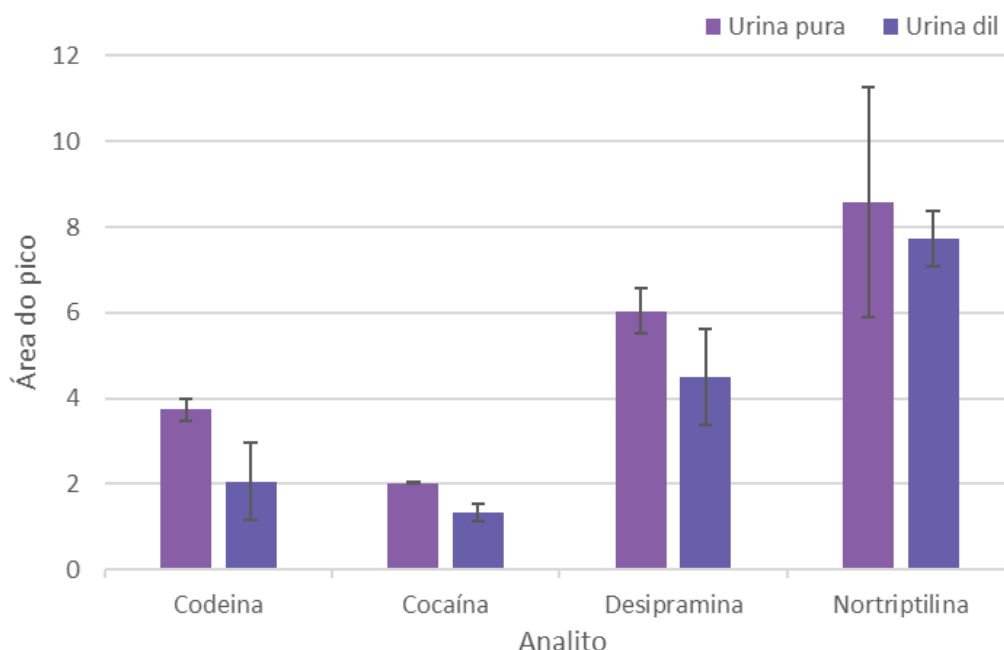
de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e o extrato obtido foi diretamente injetado no LC-DAD. Entretanto, como a TEA possui absorção acima de 240 nm, o pico do solvente se sobrepôs aos picos dos analitos presentes na amostra. Hassan e Alshana (2019) testaram a injeção direta em LC-DAD dos solventes TEA e DMCHA com sucesso em seu trabalho, mas para isso, adicionaram ácido trifluoroacético na composição da fase móvel (com pH de 1,3). A presença do ácido no meio foi capaz de protonar as aminas utilizadas como solvente, tornando-as perfeitamente solúveis na FM e com menor afinidade pela coluna utilizada como fase estacionária, diminuindo assim seus tempos de retenção, e eluição do solvente muito próximo ao tempo morto da corrida. Dessa forma, o pico do solvente não se sobrepôs ao pico de nenhum composto de interesse.

Como não havia o interesse de realizar alterações na fase móvel já definida para esse trabalho, decidiu-se por secar o extrato orgânico e ressolubilizá-lo em fase móvel, para então injetá-lo no equipamento de LC-DAD.

5.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO DE MICROEXTRAÇÃO DESENVOLVIDO EM URINA

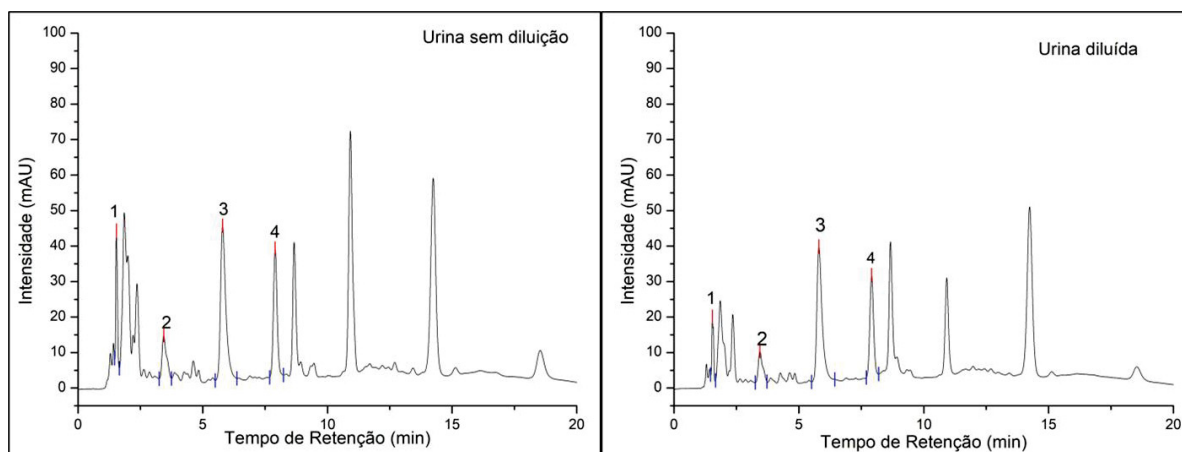
Para iniciar a aplicação do método em amostras de urina, primeiro avaliou-se a necessidade de um pré-preparo da matriz, de forma a se encontrar menos interferentes durante a análise. Para isso, realizou-se a comparação (em triplicata) de amostras de urina fortificadas com padrões de codeína, cocaína, desipramina e nortriptilina, em concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, com amostras de urina preparadas da mesma forma, mas diluídas com água ultrapura na proporção de 1:1. Os resultados obtidos estão demonstrados no gráfico apresentado na FIGURA 23.

FIGURA 23 – COMPARAÇÃO DAS ÁREAS DOS PICOS OBTIDOS PARA MICROEXTRAÇÃO DE URINA PURA E URINA DILUÍDA (n=3)



As áreas encontradas para cada analito nas duas situações (urina pura e urina diluída) foram comparadas aplicando o teste estatístico ANOVA fator único, sendo visto que os analitos codeína e cocaína apresentaram diferença estatística entre as situações ($F_{\text{CODEÍNA}} = 9,42$; $F_{\text{COCAÍNA}} = 33,04$; $F_{\text{tab}} = 7,07$), ou seja, observou-se uma resposta analítica maior para os analitos na urina sem diluição. Já os analitos desipramina e nortriptilina não apresentaram diferença estatística ($F_{\text{DESIPRAMINA}} = 4,58$; $F_{\text{NORTRIPTILINA}} = 0,01$; $F_{\text{tab}} = 7,07$) para os ensaios realizados das diferentes maneiras. Adicionalmente, os cromatogramas foram comparados com o objetivo de avaliar se os cromatogramas obtidos a partir da urina diluída apresentariam menos interferentes de matriz (FIGURA 24). Como essa diferença da presença de interferentes não foi percebida, decidiu-se por utilizar a urina pura, sem nenhum tipo de pré-preparo, assim como é feito na metodologia desenvolvida por Pragst, e colaboradores (2004) não sendo vista a necessidade da adição de mais uma etapa para a realização do procedimento de microextração.

FIGURA 24 – CROMATOGRAMA OBTIDO APÓS PREPARO DE AMOSTRA DILUÍDA E SEM DILUIÇÃO



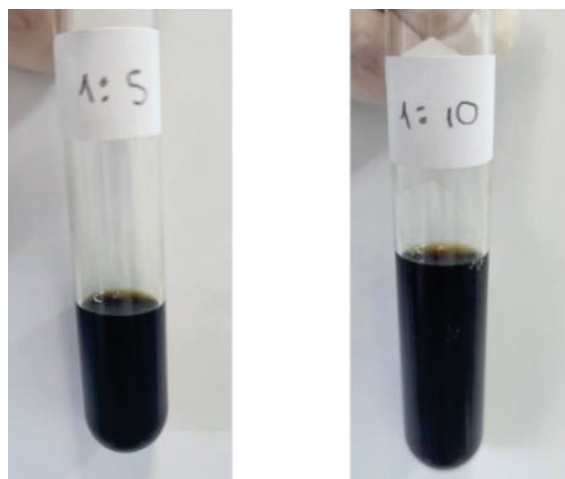
LEGENDA: 1 – CODEÍNA; 2 – COCAÍNA; 3 – DESIPRAMINA; 4 – NORTRIPTILINA
(concentração dos analitos igual a $1 \mu\text{g mL}^{-1}$)

Após essa avaliação, as amostras de urina foram preparadas conforme item 4.9 para avaliação dos parâmetros analíticos de desempenho da SHS-LLME em urina, sendo os resultados apresentados no item 5.6.

5.5 APLICAÇÃO DO MÉTODO DE MICROEXTRAÇÃO DESENVOLVIDO EM AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL

Assim como realizado com a urina, inicialmente avaliou-se a aplicação do método desenvolvido em amostras de sangue total, sem a realização de pré-tratamento da amostra, entretanto, nesse caso, não foi possível recuperar o extrato orgânico, uma vez que não houve separação das fases após a centrifugação do sistema analítico. Então verificou-se se, através da diluição do sangue total com água ultrapura, haveria a separação das fases. Foi realizado o teste diluindo-se o sangue em proporção de 1:5 e 1:10, mas também sem sucesso para essas condições, como é possível ver na FIGURA 25.

FIGURA 25 – AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL DILUÍDAS COM ÁGUA ULTRAPURA (1:5 E 1:10) APÓS REALIZAÇÃO DA MICROEXTRAÇÃO - SEM SEPARAÇÃO DAS FASES



Testou-se então a aplicação do método após a realização da precipitação de proteínas da amostra. Primeiramente, testou-se precipitar as proteínas pela adição de solvente orgânico (ACN) numa proporção de 2:1 (Solvente:Amostra, v/v). O sobrenadante foi recuperado e utilizado para a realização da microextração, entretanto, neste caso também não houve a separação das fases, uma vez que a ACN e a TEA são completamente miscíveis (FIGURA 26).

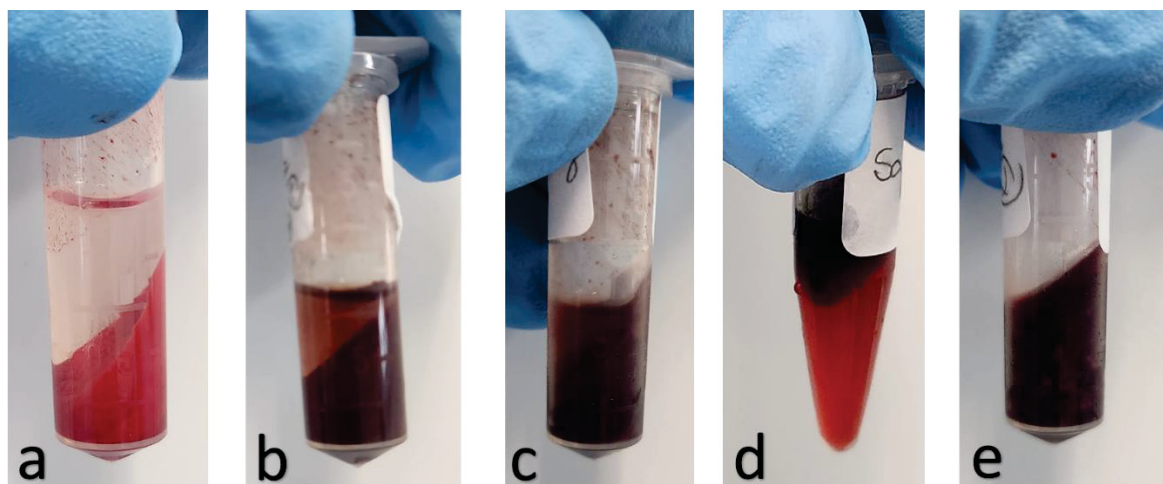
FIGURA 26 – EXTRAÇÃO DE AMOSTRA DE SANGUE TOTAL APÓS PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS COM ACETONITRILA – SEM SEPARAÇÃO DE FASES.



Por fim, testou-se a aplicação da precipitação de proteínas pela adição de íon metálico, sendo adicionados 250 μ L de sulfato de zinco 10% e 50 μ L de NaOH em 500 μ L de amostras de sangue total provenientes de diferentes origens. O conjunto foi agitado em vórtex (1 min) e centrifugado, por 5 min, a

13500 rpm. Os resultados obtidos após a centrifugação das amostras estão demonstrados na FIGURA 27.

FIGURA 27 – DIFERENTES RESULTADOS QUALITATIVOS PARA PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS COM SULFATO DE ZINCO EM AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL PROVENIENTES DE DIFERENTES ORIGENS.



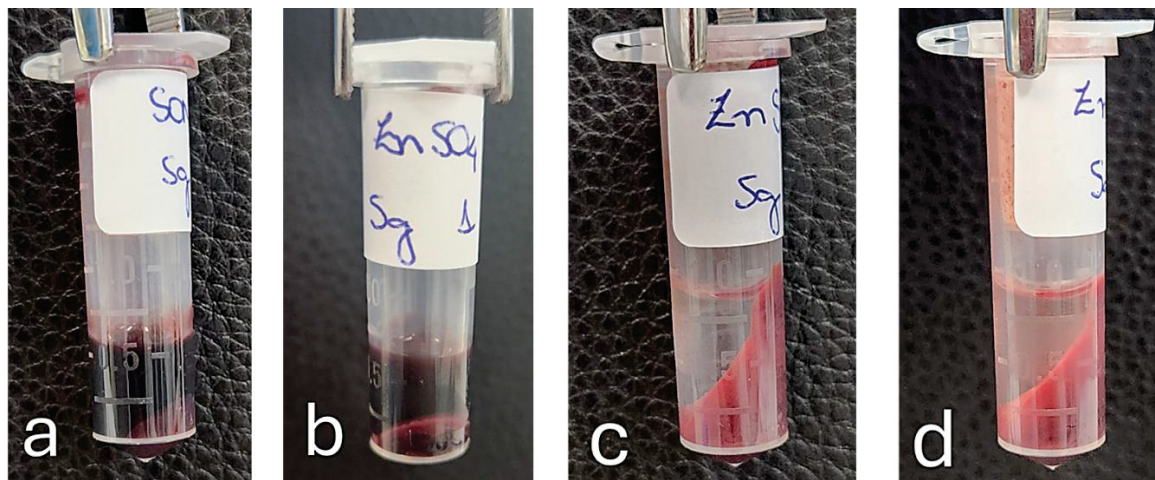
LEGENDA: a) um sobrenadante límpido e em grande quantidade; b) sobrenadante turvo e em menor quantidade que (a); c) sobrenadante turvo e em menor quantidade que (b); d) houve uma inversão das fases (a parte que esperava-se ser o sobrenadante apresenta-se no fundo do microtubo); e) não houve a separação do sobrenadante e precipitado.

Foi observada uma grande variabilidade de respostas qualitativas nessa etapa, sendo que muitas vezes houve a recuperação de um sobrenadante límpido, outras vezes de um sobrenadante turvo e ainda situações em que não foi possível a recuperação de um sobrenadante, conforme visto na FIGURA 27. De acordo com Zenati *et al.* (2023), a variabilidade biológica encontrada entre as amostras de sangue pode mascarar a reprodutibilidade da técnica analítica de precipitação de proteínas.

Novos testes foram realizados com o objetivo de viabilizar a aplicação da técnica em amostras de sangue total, como a precipitação de proteínas por sonicação e posterior centrifugação da amostra. Adicionalmente, novas abordagens de precipitação de proteínas com o uso de ZnSO_4 foram avaliadas, sendo elas: o uso de 10 mg do sal puro, o uso de ZnSO_4 a 25% e novamente o uso da solução de ZnSO_4 a 10%, entretanto, todos os novos testes foram realizados com a centrifugação da amostra à 18000 rpm, por 20 minutos e em temperatura de -5°C . Os testes iniciais realizados com ZnSO_4 a 10%, apresentados na FIGURA 27, foram centrifugados à 13500 rpm, por 5 minutos à

-5°C. Os resultados obtidos após a precipitação de proteínas estão demonstrados na FIGURA 28:

FIGURA 28 – DIFERENTES FORMAS DE PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS EM AMOSTRA DE SANGUE TOTAL.



LEGENDA: a) Sonicação; b) ZnSO_4 puro; c) ZnSO_4 a 10%; d) ZnSO_4 a 25%

Por avaliação visual após a precipitação de proteínas, observa-se que em todos os ensaios realizados houve a formação de um sedimentado e a presença de um sobrenadante. Em termos práticos, a realização do experimento utilizando o sulfato de zinco em forma de solução foi de execução mais simples do que o uso do ZnSO_4 em forma de pó ou realizando a sonicação da amostra. Este fator foi considerado de grande relevância, pois quanto mais simples e de fácil execução o procedimento analítico, mais provável é a sua reprodutibilidade. Os sobrenadantes foram coletados e submetidos ao processo de SHS-LLME. Os testes foram realizados em duplicata e a facilidade da recuperação do extrato orgânico ao final da SHS-LLME, bem como sua quantidade, foi avaliada. Os resultados estão sumarizados na TABELA 21:

TABELA 21 – VOLUME RECUPERADO DE EXTRATO ORGÂNICOS APÓS SHS-LLME REALIZADA DEPOIS DE DIFERENTES FORMAS DE PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS

Precipitação de proteínas	Volume recuperado Replicata 1	Volume recuperado Replicata 2
a) Sonicação	30 μL	Não houve separação de fases
b) ZnSO_4 (10 mg de pó)	40 μL	40 μL
c) ZnSO_4 (10%)	85 μL	100 μL
d) ZnSO_4 (25%)	90 μL	90 μL

É possível ver que um maior volume de fase orgânica foi possível de ser coletado com o uso da solução de sulfato de zinco, (TABELA 21 (c) e(d)), que também apresentou maior facilidade para a coleta do mesmo.

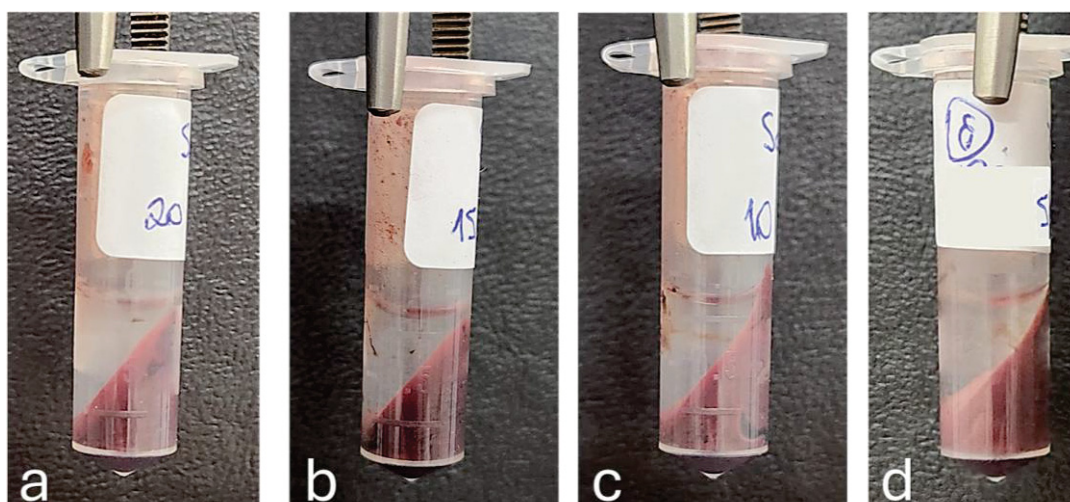
A diferença da performance dos experimentos realizados com precipitação de proteínas utilizando solução de sulfato de zinco apresentados na FIGURA 27 e FIGURAS 28 (b), (c) e (d) pode estar relacionada com o aumento da velocidade da centrífuga de 13400 para 18000 rpm, o que promoveu a precipitação das proteínas de forma mais eficiente. Levando esse fato em consideração, avaliou-se a possibilidade de utilizar as amostras de sangue apenas centrifugando-as antes da realização da SHS-LLME, sem a adição de um agente precipitador das proteínas, entretanto, apenas 30 µL de extrato orgânico estava disponível para coleta após a realização da microextração (em duplicata).

Dessa forma, considerou-se que o pré-preparo das amostras de sangue total mais adequado a realização deste trabalho foi a adição de 250 µL de sulfato de zinco 10% e 50 µL de NaOH em 500 µL de amostra de sangue total e posterior centrifugação à 18000 rpm. Como não houve muita diferença entre o trabalho com o sulfato de zinco 10% e o sulfato de zinco 25%, optou-se por utilizar o de menor concentração.

Conforme dito, todos os ensaios realizados nessa etapa foram feitos centrifugando as amostras a 18000 rpm, à -5°C, por 20 minutos. Foi então avaliada a possibilidade da diminuição deste tempo de centrifuga. Para isso, realizou-se a comparação dos resultados obtidos após 20, 15, 10 e 5 minutos de centrifuga, utilizando-se para isso sangue fortificado com cocaína e cocaetileno a uma concentração de 1,0 µg mL⁻¹ (em triplicata). O aspecto visual dos sobrenadantes obtidos após os diferentes tempos de centrifuga podem ser vistos na FIGURA 29.

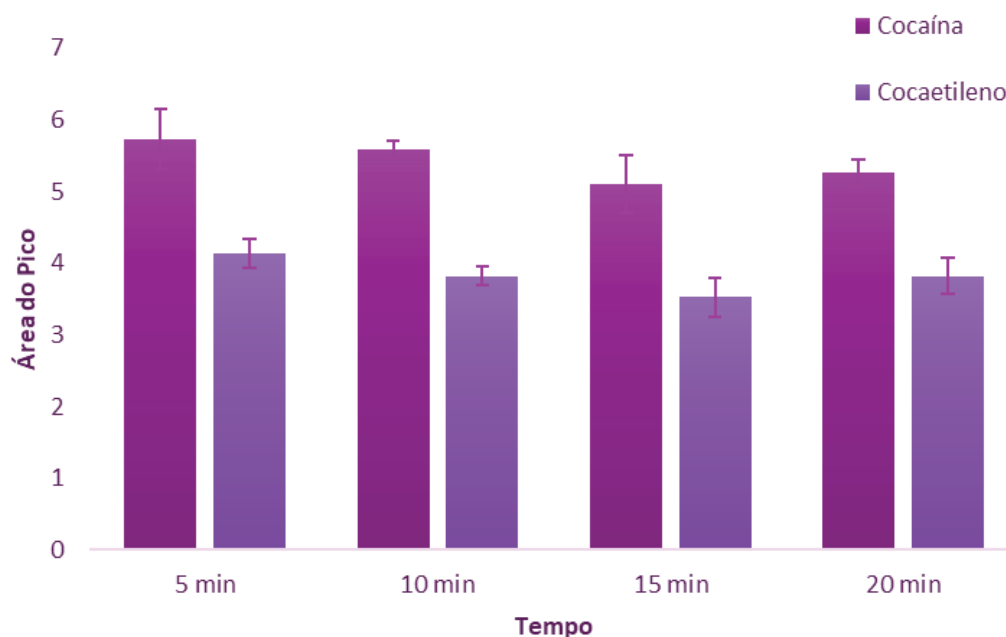
O sobrenadante de cada tubo *ependorf* foi coletado e submetido ao processo de SHS-LLME. Os extratos obtidos foram secos, ressolubilizados em FM e analisados em LC-DAD, sendo que as médias das áreas dos picos de cocaína e cocaetileno, para cada um dos tempos testados, estão demonstradas no gráfico apresentado na FIGURA 30.

FIGURA 29 – SOBRENADANTES APÓS PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS COM DIFERENTES TEMPOS DE CENTRIFUGAÇÃO



LEGENDA: a) 20 minutos; b) 15 minutos; c) 10 minutos; d) 5 minutos

FIGURA 30 – MÉDIA DAS ÁREAS DOS PICOS DE COCAÍNA E COCAETILENO APÓS CENTRIFUGAÇÃO NOS TEMPO DE 5, 10, 15 E 20 MINUTOS



A áreas encontradas para os picos foram comparadas utilizando ANOVA fator único, sendo possível perceber que não houve diferença estatística para os valores encontrados para os picos de cocaína (F calculado (2,49) < F crítico (4,07); $p=0,13$) e para os picos de cocaetileno (F calculado (3,81) < F crítico (4,07); $p=0,06$), uma vez que o F calculado foi menor que o F tabelado e o valor- p foi maior que 0,05 para ambos os analitos. Como não houve ganhos na

extração dos analitos com um maior tempo de centrifuga, determinou-se o tempo de 5 minutos para a realização da precipitação de proteínas. Dessa forma, o pré-preparo das amostras de sangue total ficou definido conforme fluxograma apresentado na FIGURA 31:

FIGURA 31 – PRÉ-PREPARO DE AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL

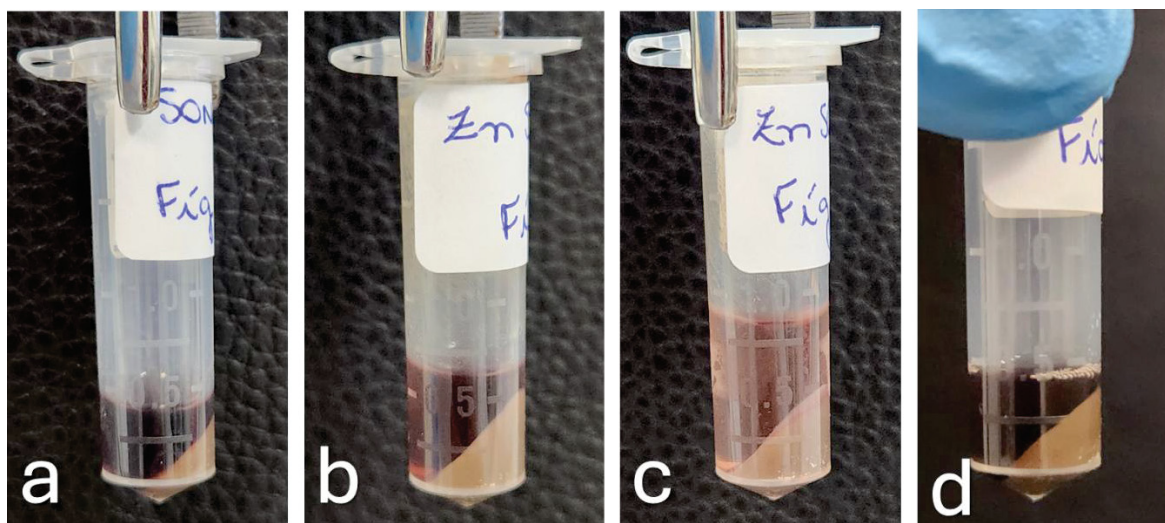


Na etapa seguinte, realizou-se então a avaliação dos parâmetros de desempenho do método de SHS-LLME em amostras de sangue e os resultados estão apresentados no item 5.8.

5.6 APLICAÇÃO DO MÉTODO DE MICROEXTRAÇÃO DESENVOLVIDO EM AMOSTRAS DE FÍGADO

Assim como no sangue e urina, avaliou-se a necessidade de pré-preparo do fígado antes da realização da técnica de microextração. Dessa forma, decidiu-se por avaliar o comportamento do fígado após realizar os seguintes tratamentos: centrifugação do mesmo (20 min à 18.000 rpm e -5°C); desproteínização por sonicação (ciclos de 10 seg de sonicação e 10 seg de repouso, até completar 1 minuto), seguido de centrifugação; desproteínização da amostra por adição de íons metálicos utilizando ZnSO₄ na forma pura (10 mg), solução a 10%, mais adição de 50 µL de NaOH 1M, vórtex por 1 minuto e posterior centrifugação (20 min à 18.000 rpm e -5°C). Os resultados obtidos após a realização de cada um desses testes estão demonstrados na FIGURA 32.

FIGURA 32 – DIFERENTES RESULTADOS APÓS PRÉ PREPARO DE AMOSTRAS DE FÍGADO

LEGENDA: a) Sonicação; b) ZnSO_4 puro; c) ZnSO_4 a 10%; d) Centrifugação da amostra

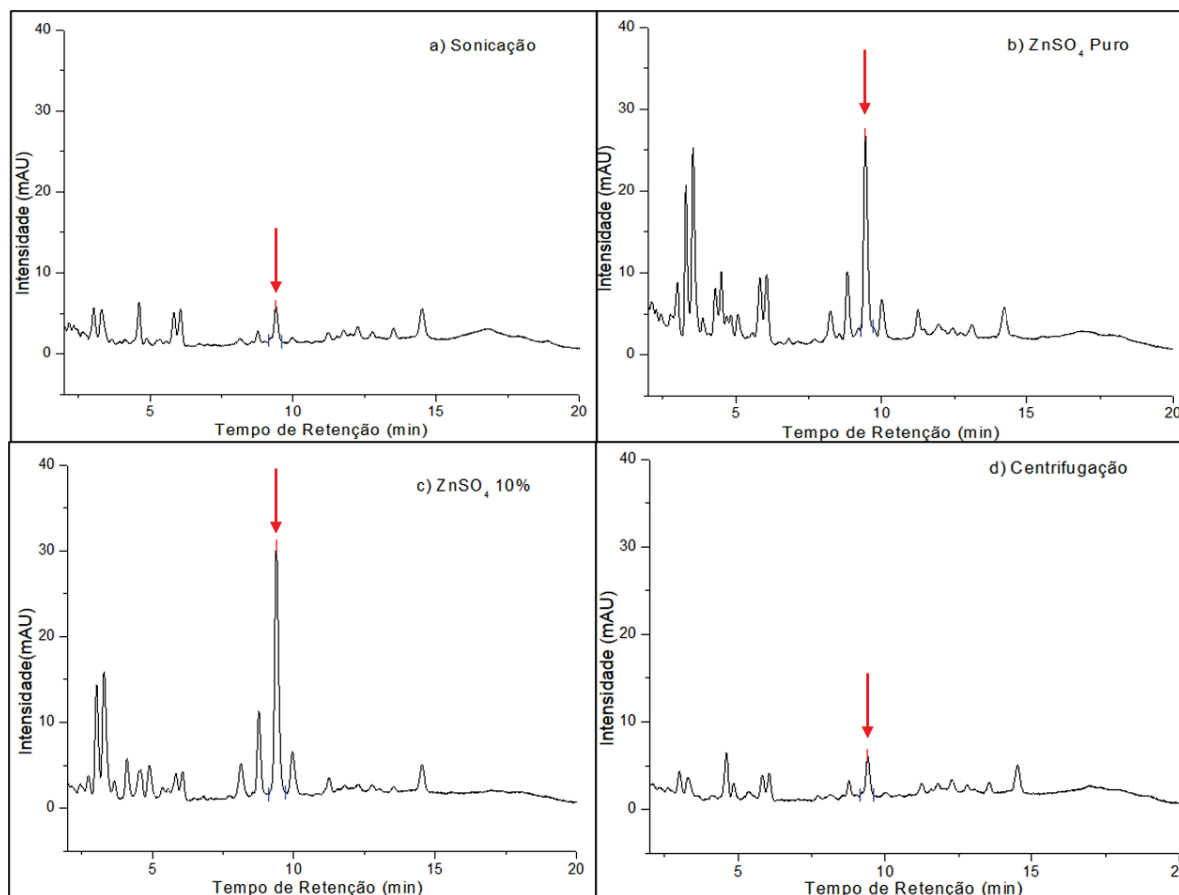
É possível ver na FIGURA 32 que todos os testes resultaram na presença de um sobrenadante límpido e um sedimento na parte inferior do tubo. Os sobrenadantes foram coletados e submetidos ao processo de SHS-LLME desenvolvido, sendo que nessa etapa avaliou-se a facilidade de execução da técnica e a facilidade de recuperação do extrato orgânico ao fim do processo. As análises foram realizadas em duplicata e a quantidade de extrato recuperado em cada teste está demonstrado na TABELA 22.

TABELA 22 – VOLUME RECUPERADO DE EXTRATO ORGÂNICOS APÓS SHS-LLME REALIZADA DEPOIS DE DIFERENTES FORMAS DE PRÉ TRATAMENTO DAS AMOSTRAS DE FÍGADO

Precipitação de proteínas	Volume recuperado Replicata 1	Volume recuperado Replicata 2
Sonicação	80 μL	80 μL
ZnSO_4 (10 mg de pó)	90 μL	85 μL
ZnSO_4 (10%)	80 μL	80 μL
Centrifugação	80 μL	80 μL

Diferente do que foi visto ao se trabalhar com amostras de sangue, as amostras de fígado foram de mais fácil manuseio e coleta do extrato orgânico. Dessa forma, os cromatogramas obtidos após secagem, ressolubilização em FM e injeção no LC-DAD foram avaliados e comparados entre si. Nesta etapa, utilizou-se uma amostra de fígado que conhecidamente apresentava a presença de nortriptilina. Os cromatogramas obtidos estão apresentados na FIGURA 33.

FIGURA 33 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS APÓS SHS-LLME-LC-DAD APÓS DIFERENTES FORMAS DE PRÉ PREPARO DO FÍGADO



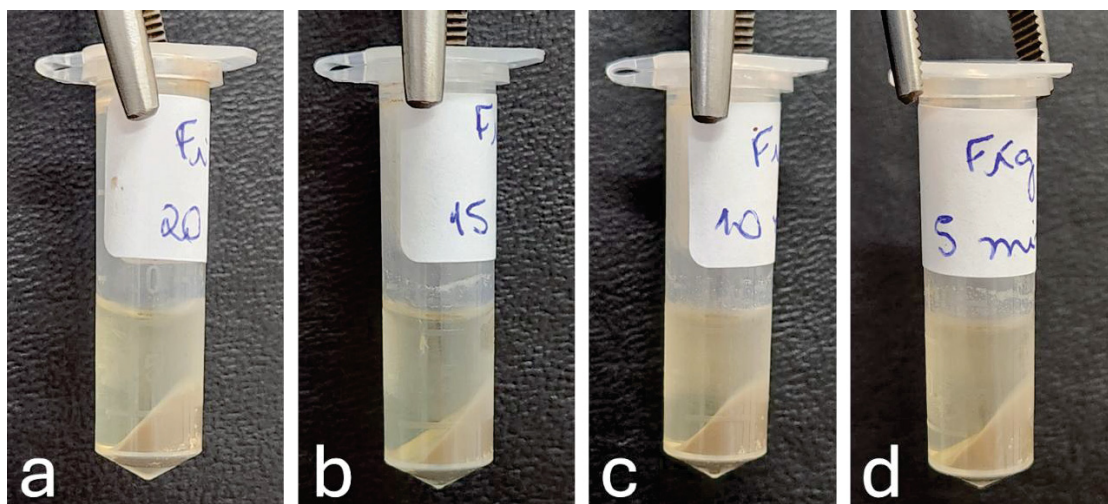
*Os picos sinalizados nos cromatogramas referem-se ao analito nortriptilina.

LEGENDA: Cromatogramas obtidos por SHS-LLME-LC-DAD obtidos após diferentes tipos de pré-preparo da amostra: a) Sonicação; b) ZnSO_4 puro; c) ZnSO_4 a 10%; d) Centrifugação da amostra.

É possível ver nos cromatogramas apresentados (FIGURA 33) que os picos de nortriptilina apresentaram maior intensidade de resposta após o pré-preparo das amostras com sulfato de zinco (FIGURAS 33 (b) e (c)). Realizou-se a ANOVA fator único, com 95% de confiança e o resultado obtido demonstrou que houve diferença estatística entre as áreas dos picos após diferentes tipos de pré-preparo de amostra (F calculado (529,7) > F tabelado (6,59); $p=1,18\text{E-}05$). Após essa constatação, resultados obtidos após o uso de ZnSO_4 puro e solução a 10% também foram comparados entre si, sendo visto que houve diferença estatística também entre essas diferentes formas de preparo (F calculado (54,0) > F tabelado (18,5), $p=0,01$). Dessa forma, ficou estabelecido o pré-preparo das amostras de fígado com o uso de 250 μL de solução de ZnSO_4 10%, adição de 50 μL de NaOH 1M, 1 min em vórtex seguido de centrifugação.

Como todos os testes de pré-preparo de fígado foram realizados com centrifugação, a 18.000 rpm, à -5°C, por 20 minutos, a possibilidade de diminuir este tempo de centrifugação foi avaliada. Dessa forma, os tempos de centrifugação de 20, 15, 10 e 5 minutos foram testados e o aspecto visual das amostras está demonstrado na FIGURA 34.

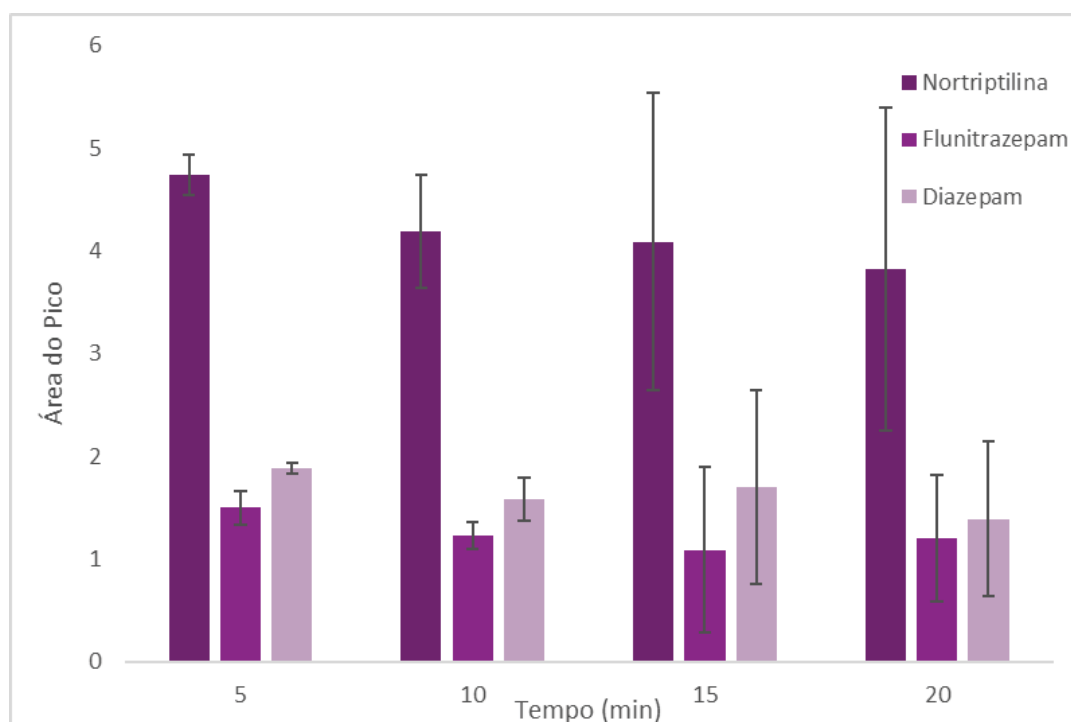
FIGURA 34 – ASPECTO VISUAL DAS AMOSTRAS DE FÍGADO APÓS DIFERENTES TEMPOS DE CENTRIFUGAÇÃO



LEGENDA: a) 20 minutos; b) 15 minutos; c) 10 minutos; d) 5 minutos

Foi possível coletar cerca de 450 μL de sobrenadante de todas as amostras, os quais seguiram para SHS-LLME-LC-DAD. Para a realização desta etapa, utilizou-se o fígado sabidamente contendo nortriptilina, o qual foi fortificado com flunitrazepam e diazepam, a uma concentração de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. As análises foram realizadas em triplicata e as áreas obtidas dos picos dos analitos estão apresentadas na FIGURA 35.

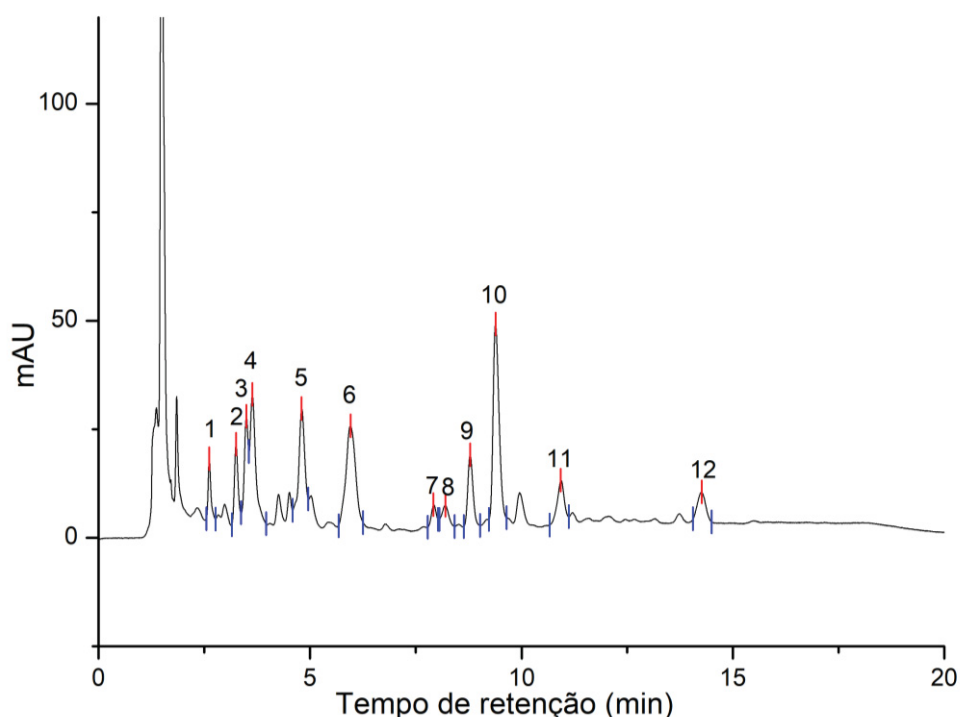
FIGURA 35 – MÉDIA DAS ÁREAS DOS PICOS DE NORTRIPTILINA, FLUNITRAZEPAM E DIAZEPAM APÓS CENTRIFUGAÇÃO NOS TEMPO DE 5, 10, 15 E 20 MINUTOS



A áreas encontradas para os picos foram comparadas utilizando ANOVA fator único, sendo possível perceber que não houve diferença estatística entre os valores encontrados para os picos de nortriptilina (F calculado (0,36) < F tabelado (4,07); $p=0,78$), de flunitrazepam (F calculado (0,34) < F tabelado (4,07); $p = 0,80$) e entre os picos de diazepam (F calculado (0,33) < F tabelado (4,07); $p=0,80$). Adicionalmente, observando-se as barras de erros no gráfico apresentado na FIGURA 35, é possível ver que os tempos de 15 e 20 minutos apresentaram maior variação de resultados do que os tempos menores. Dessa forma, determinou-se o tempo de 5 minutos para a centrifugação das amostras de fígado, assim como foi estabelecido para o sangue.

Após as condições de extração e de pré-preparo das amostras de fígado, foi realizada a análise de fígado fortificado com padrões, preparado conforme descrito no item 4.3.4, com o objetivo de observar a aplicabilidade do método desenvolvido nessa matriz biológica. Para essa etapa, não foi realizada uma avaliação quantitativa dos resultados encontrados, e sim uma avaliação qualitativa, relacionada à detecção dos analitos presentes na amostra. O cromatograma obtido para o fígado fortificado está demonstrado na FIGURA 36.

FIGURA 36 – CROMATOGRAMA DE FÍGADO FORTIFICADO APÓS SHS-LLME-LC-DAD

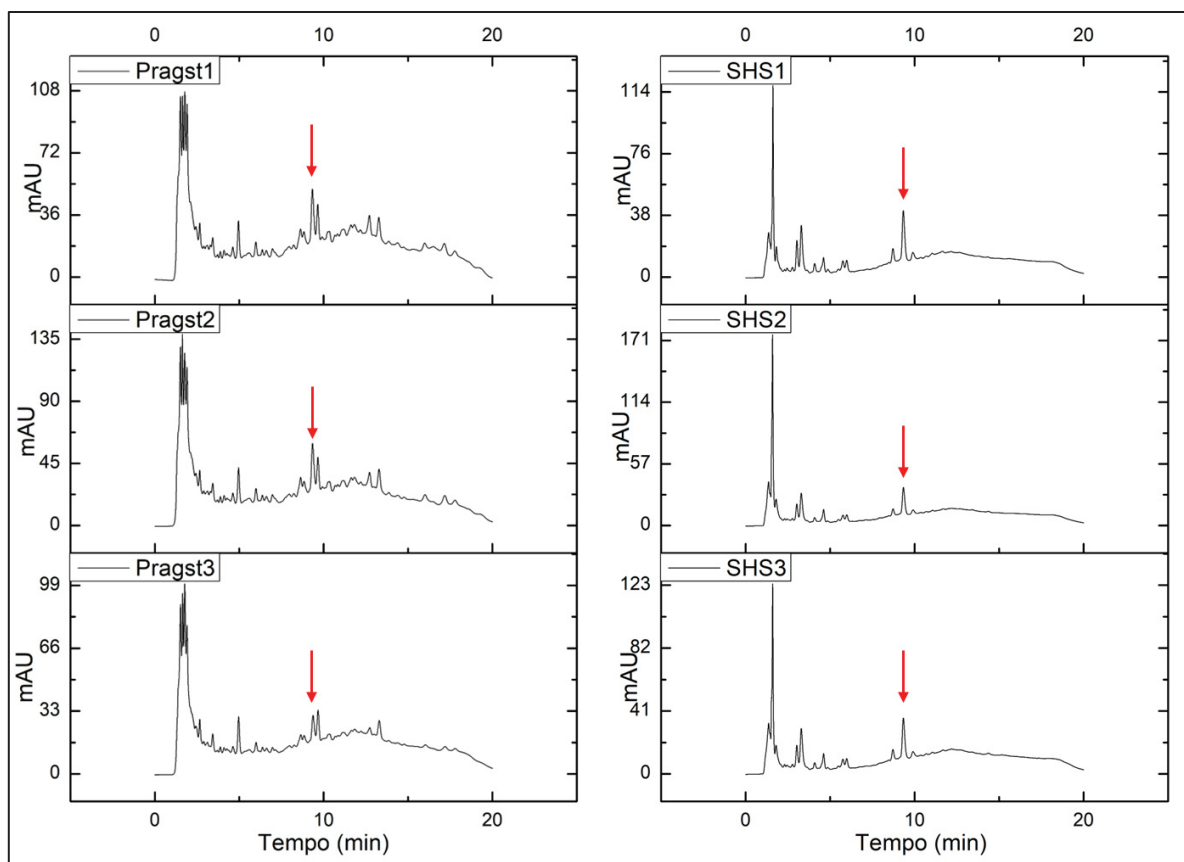


LEGENDA: 1: MBDB, 2 E 3: produtos de biotransformação da amitriptilina, 4: Cocaína, 5: Cocaetileno, 6: Flurazepam, 7: Nitrazepam, 8: Desipramina, 9: Amitriptilina, 10: Nortriptilina, 11: Flunitrazepam, 12: Diazepam.

Avaliando-se o cromatograma apresentado, nota-se que todos os analitos foram detectados, com exceção da codeína e do MDA. Isso possivelmente ocorreu pela presença de interferentes da matriz que encobriram os picos destes analitos. Adicionalmente, além da nortriptilina, a amitriptilina também foi detectada, sugerindo, nesse caso, que a nortriptilina detectada é produto de biotransformação da amitriptilina. Também foi possível detectar a presença de mais dois produtos de biotransformação da amitriptilina, já que os picos 2 e 3 apresentaram similaridade superior a 0,99 com o espectro da amitriptilina. Portanto, considerou-se que a SHS-LLME-LC-DAD pode ser utilizada com sucesso em amostras de fígado.

Por fim, uma amostra de fígado, sabidamente contendo o analito nortriptilina, foi preparada conforme a extração desenvolvida e a extração utilizada no LTF-PCP (apresentada no item 4.11). Os extratos de ambas as extrações (realizadas em triplicata) foram secos, ressolubilizados em FM e 50 μ L foram injetados em LC-DAD utilizando as condições cromatográficas estabelecidas neste trabalho. Os cromatogramas obtidos estão apresentados na FIGURA 37.

FIGURA 37 – COMPARAÇÃO DE EXTRAÇÃO OBTIDA POR MÉTODO DESENVOLVIDO POR PRAGST, (2004) E SHS-LLME-LC-DAD



LEGENDA: Pico sinalizado nos cromatogramas corresponde ao analito nortriptilina

Comparando-se os cromatogramas obtidos, é possível observar que a linha de base obtida para os cromatogramas utilizando SHS-LLME apresenta-se menos ruidosa, o que sugere uma menor extração de interferentes da matriz biológica, possivelmente devido à etapa de precipitação de proteínas anterior ao processo de extração propriamente dito. Comparando-se as áreas obtidas para os picos de nortriptilina, utilizando-se ANOVA fator duplo, observou-se que não houve diferença significativa entre os grupos ($F_{\text{CALCULADO}} = 0,01 < F_{\text{TABELADO}} = 7,71$; valor-p = 0,92), entretanto a SHS-LLME demonstrou menor DPR ($\text{DPR}_{\text{PRAGST}} = 47,3\%$; $\text{DPR}_{\text{SHS}} = 12,9$), que pode ser justificado pela linha de base menos ruidosa, que oferece maior reprodutibilidade ao método.

Um ponto interessante a ser comentado é que a extração utilizada pelo LTF-PCP utiliza 400 μL do solvente diclorometano, que são recuperados como extrato orgânico ao final da extração, e apenas 90 μL de extrato orgânico é recuperado ao final da SHS-LLME e ainda assim os resultados encontrados para

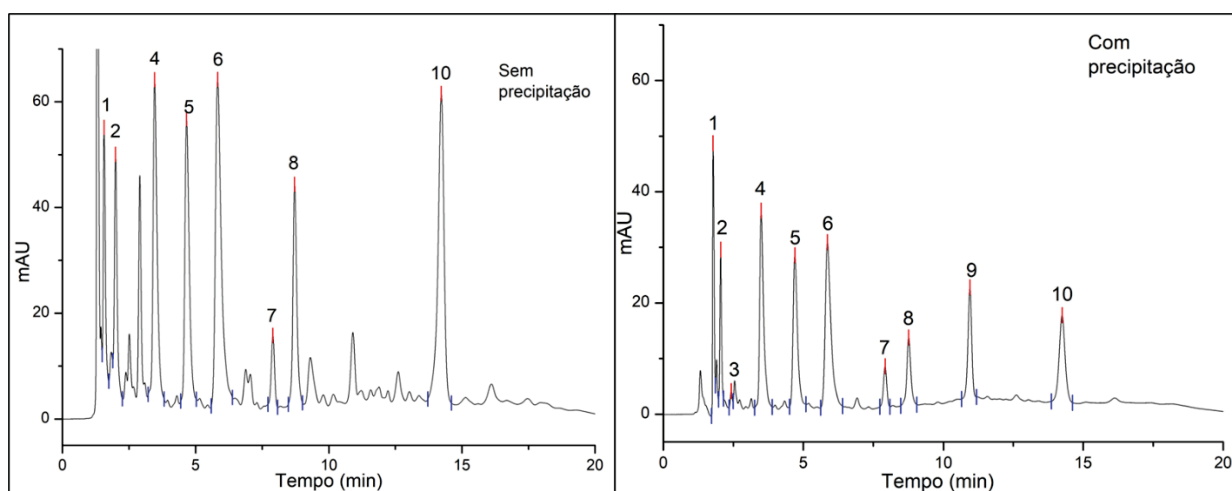
ambas as extrações foram considerados iguais, já que não houve diferença significativa entre os resultados. Este fato corrobora com o entendimento de que a transformação de um solvente hidrofílico, totalmente miscível com a amostra, em hidrofóbico, formando milhares de gotículas no interior da amostra, favorecendo uma rápida transferência de massa para o solvente orgânico e a obtenção do equilíbrio de extração em um tempo curto (Xu *et al.*, 2018)

5.7 APLICAÇÃO DO MÉTODO DE MICROEXTRAÇÃO DESENVOLVIDO EM AMOSTRAS DE CONTEÚDO GÁSTRICO

Como já foi comentado, o conteúdo gástrico é uma matriz biológica de muita importância para a toxicologia forense, principalmente em casos de intoxicação exógena por via oral, onde os toxicantes podem ser encontrados em altas concentrações. Entretanto, assim como as demais matrizes biológicas, o conteúdo gástrico é uma matriz rica em elementos gordurosos, proteínas (Peres, Nascimento, Pelção, 2019). Dessa forma, para a aplicação do método desenvolvido em amostras de CG, inicialmente foi avaliado se a etapa de precipitação de proteínas antes da realização da SHS-LLME favoreceria melhores resultados.

Dessa forma, a SHS-LLME foi realizada com e sem precipitação de proteínas para fins de comparação. Para isso, utilizou-se o CG simulado e fortificado com padrões conforme, item 4.3.4 e os cromatogramas obtidos estão apresentados na FIGURA 38.

FIGURA 38 – COMPARAÇÃO DE EXTRAÇÃO COM E SEM ETAPA PRÉVIA DE PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS



LEGENDA: 1: Codeína; 2: MDA; 3: MBDB; 4:Cocaína; 5: Cocaetileno; 6: Flurazepam; 7: Nitrazepam; 8: Nortriptilina; 9: Flunitrazepam; 10: Diazepam. Picos 3 e 9 não foram detectados no cromatograma “Sem precipitação”.

Com base nos cromatogramas obtidos, foi possível notar que a extração realizada sem a etapa de precipitação de proteínas apresentou picos mais intensos, entretanto apresentou um maior número de picos e uma linha de base mais ruidosa, possivelmente devido a ocorrência de mais compostos interferentes presentes na amostra. Adicionalmente, os analitos MBDB e flunitrazepam não foram detectados nessa extração, o que sugere que esses analitos podem estar encobertos por interferentes da matriz biológica. Dessa forma, decidiu-se por realizar o preparo de amostras de CG com a etapa prévia de precipitação de proteínas.

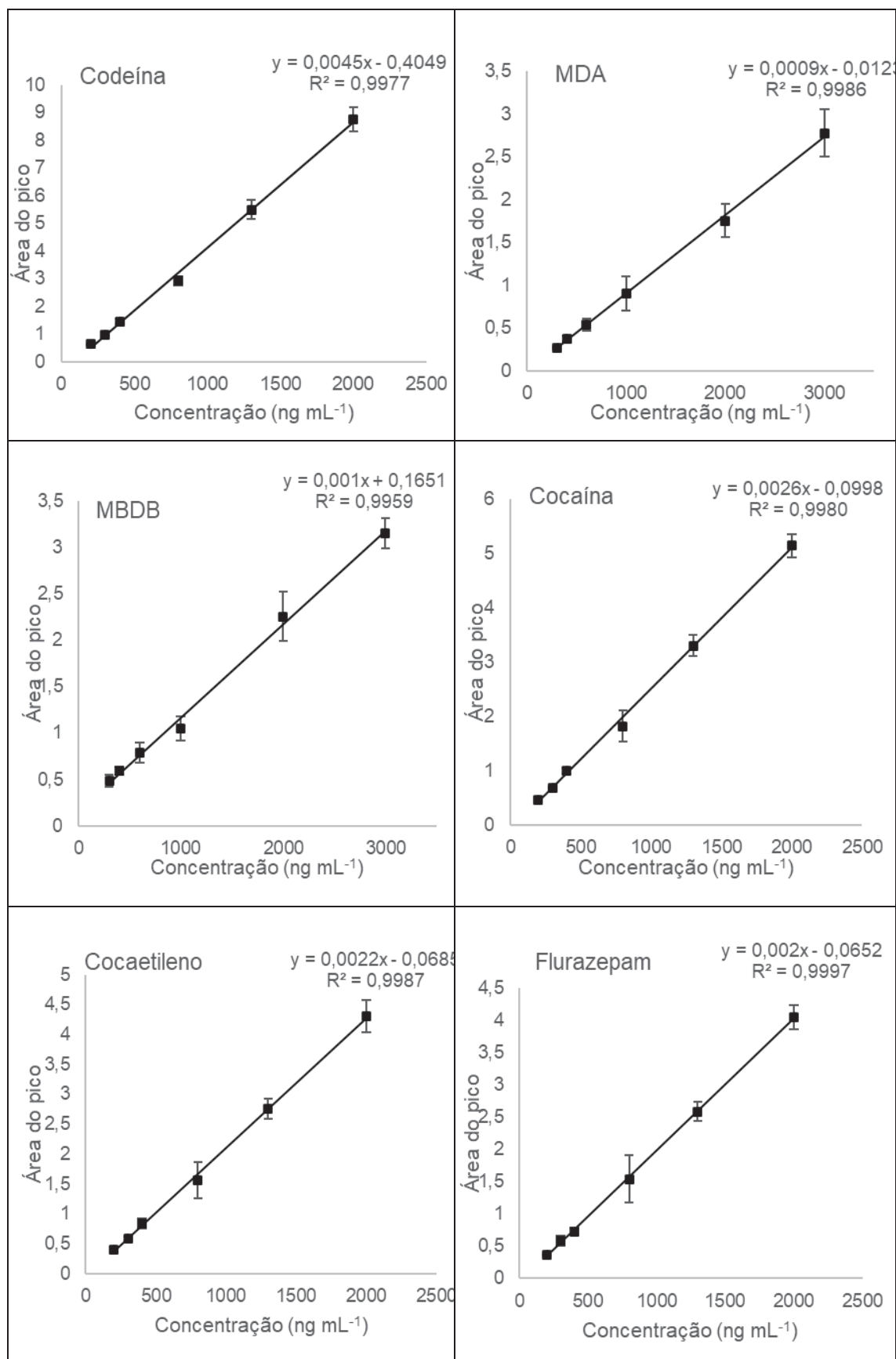
Por fim, foi possível ver que todos os analitos presentes no CG simulado fortificado foram extraídos com sucesso, concluindo-se que a SHS-LLME-LC-DAD também pode ser utilizada em matriz biológica de CG com sucesso.

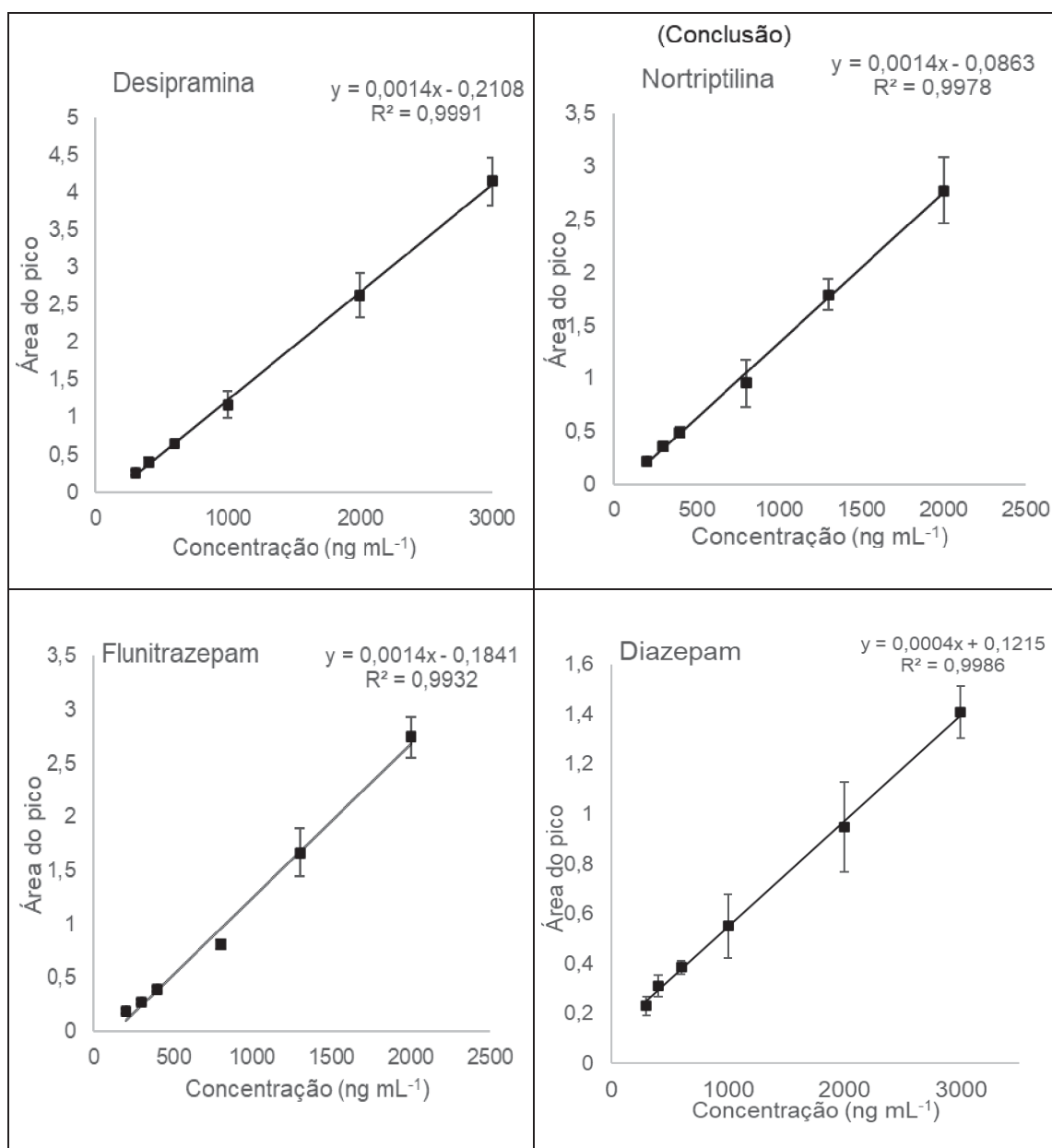
5.8 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS ANALÍTICOS DE DESEMPENHO EM SANGUE E URINA

5.8.1 LOQ, LOD e Linearidade

Conforme exposto no Item 4.10.1, foram feitas 5 curvas analíticas, em 6 níveis de concentração, para as matrizes de sangue e urina. Para a construção das curvas de sangue, foram utilizadas amostras de sangue branco enriquecidas com os padrões analíticos: codeína, MDA, MBDB, cocaína, cocaetileno, flurazepam, desipramina, nortriptilina, flunitrazepam e diazepam. As curvas obtidas para cada um dos analitos podem ser vistas na FIGURA 39:

FIGURA 39 – CURVAS ANALÍTICAS DE CODEÍNA, MDA, MBDB, COCAÍNA, COCAETILENO, FLURAZEPAM, DESIPRAMINA, NORTRIPTILINA, FLUNITRAZEPAM E DIAZEPAM EM SANGUE TOTAL (n=5) (Continua)





Todas as curvas analíticas apresentaram um coeficiente de determinação superior 0,99, como pode ser visto na FIGURA 39, o que indica que o método apresenta uma linearidade adequada para os analitos estudados, podendo ser utilizado para fins de sua detecção e quantificação.

As curvas construídas para avaliação da linearidade em urina foram feitas a partir de urina livre dos analitos e enriquecida com os padrões analíticos: Codeína, MDA, MBDB, Cocaína, Cocaetileno, Desipramina e Nortriptilina (conforme item 4.10.1). As curvas obtidas estão demonstradas na FIGURA 40.

FIGURA 40 – CURVAS ANALÍTICAS DE CODEÍNA, MDA, MBDB, COCAÍNA, COCAETILENO, DESIPRAMINA, NORTRIPTILINA, EM URINA (n=5) (Continua)

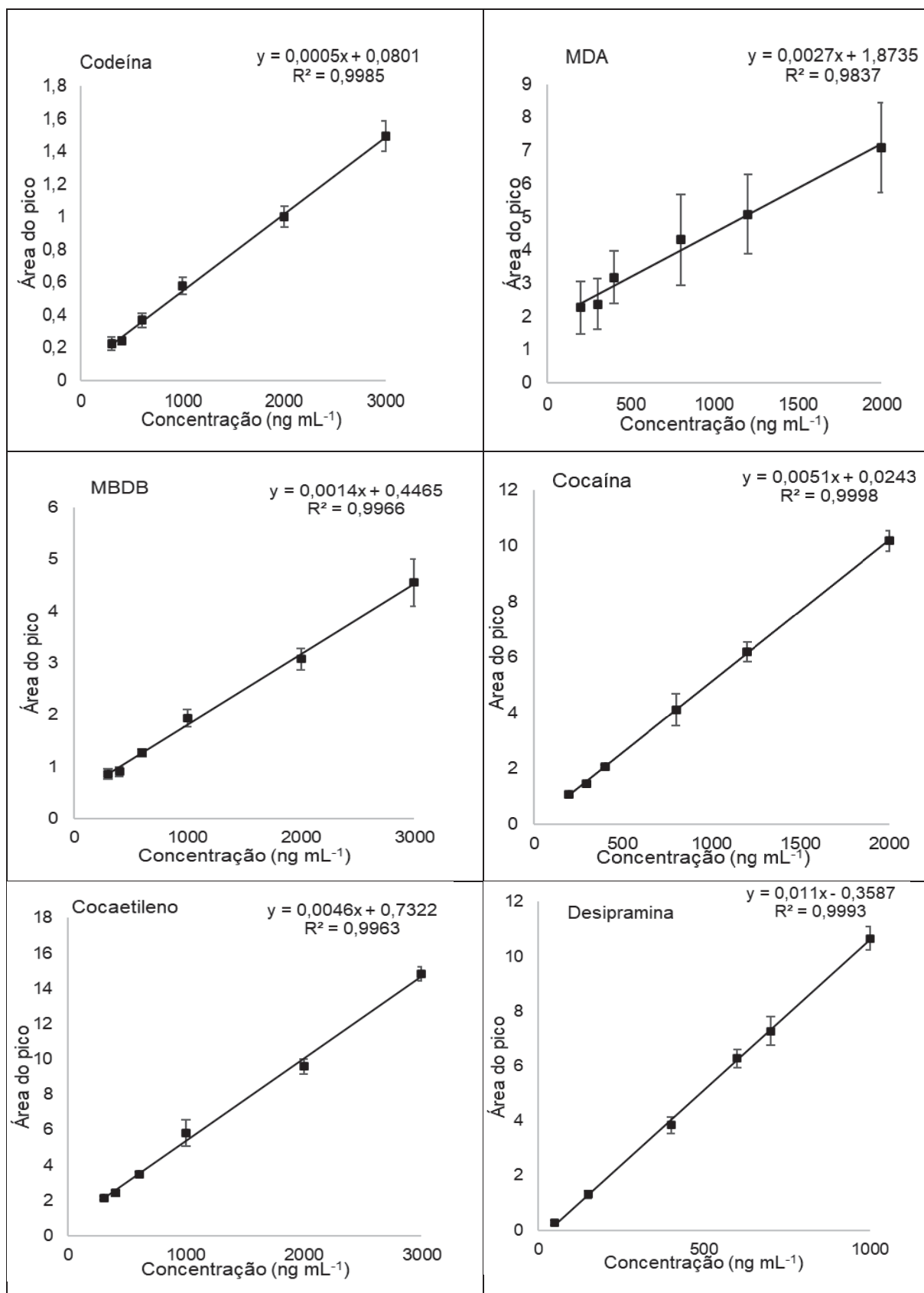
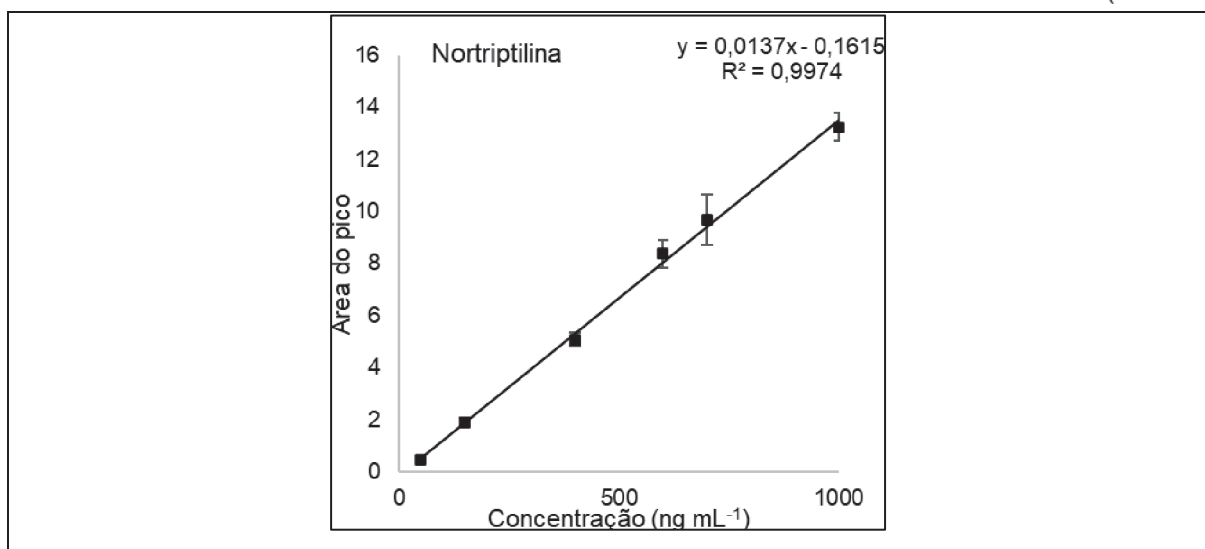


FIGURA 40 – CURVAS ANALÍTICAS DE CODEÍNA, MDA, MBDB, COCAÍNA, COCAETILENO, DESIPRAMINA, NORTRIPTILINA, EM URINA (n=5)

(Conclusão)



Foi possível observar que todos os analitos apresentaram respostas lineares ($R^2 > 0,99$), com exceção do MDA ($R^2 = 0,98$). Isso pode ter acontecido porque o MDA sai em tempo inicial no cromatograma, em região de eluição de compostos endógenos da urina, o que pode ter causado distorção dos picos desse analito, o que pode ser evidenciado pela maior imprecisão das replicatas, de acordo com as barras de erro na curva analítica do MDA (FIGURA 40). As barras de erro referem-se ao desvio padrão entre as replicatas de cada nível, sendo que os coeficientes de variação (que é o desvio padrão dividido pela média e multiplicado por cem) de cada nível ficou no intervalo 19 a 34%. Adicionalmente, a equação da reta apresentou um alto valor de intercepto da reta (+1,87), o que pode indicar a presença de interferentes na amostra.

Assim como visto com as amostras de sangue, a curva de codeína na urina apresentou um baixo coeficiente angular ($a = 0,000469395$) mas um alto coeficiente de determinação ($R^2 = 0,9985$) o que indica uma linearidade adequada da curva deste analito.

Com base nas curvas analíticas obtidas para os analitos, foi possível calcular o LOD e também o LOQ do método. Conforme diretriz de validação de métodos para toxicologia forense (ANSI/ASB, 2019), três curvas foram utilizadas para o cálculo de LOD e nove replicatas dos pontos da curva foram avaliados quanto à precisão e exatidão, como demonstrado no item 4.10.1. Os resultados obtidos para os analitos estudados em sangue estão demonstrados na TABELA 23.

TABELA 23 – LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO E DE DETECÇÃO PARA OS ANALITOS EM ESTUDO EM SANGUE

Analito	LOD (ng mL ⁻¹)	LOQ		
		Concentração (ng mL ⁻¹)	CV% (n=9)	Exatidão (%) (n=9)
Codeína	24,3	200	9,4	111,2
MDA	55,6	300	12,9	92,0
MBDB	18,9	300	19,8	98,9
Cocaína	27,8	200	9,9	114,8
Cocaetileno	51,9	200	12,1	110,2
Flurazepam	71,4	200	12,2	108,1
Desipramina	110,9	300	14,4	114,4
Nortriptilina	115,8	200	16,7	107,6
Flunitrazepam	54,2	300	8,1	108,4
Diazepam	205,9	300	16,0	85,2

A maior parte dos analitos apresentou valores de LOD abaixo de 100 ng mL⁻¹, com exceção da desipramina, nortriptilina e diazepam. Nestes casos, concentrações muito baixas dos analitos poderiam não ser detectadas, mas concentrações mais elevadas, comumente presentes nos casos de intoxicação exógena, poderiam ser detectadas. Para casos em que é necessária a detecção de concentrações mais baixas, a nível de traços, é mais indicado o uso de equipamento com maior detectabilidade, como o LC-MS/MS.

O limite de quantificação foi calculado como o primeiro ponto da curva a apresentar CV menor que 20% e exatidão entre 80 e 120%. Para todos os analitos, o primeiro ponto definido para a curva analítica atendeu essas especificações, com exceção do flunitrazepam, que apresentou 130% de exatidão. Nesse caso, o primeiro ponto da curva a atender as especificações foi o de concentração 300 ng mL⁻¹, sendo a linearidade considerada para esse analito de 300 a 2000 ng mL⁻¹.

Os resultados de LOD e LOQ para os analitos estudados em urina, com exceção do MDA que não apresentou linearidade, estão demonstrados na TABELA 24.

TABELA 24 – LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO E DE DETECÇÃO PARA OS ANALITOS EM ESTUDO EM URINA

Analito	LOD (ng mL ⁻¹)	LOQ		
		Concentração (ng mL ⁻¹)	CV (%) (n=9)	Exatidão (%) (n=9)
Codeína	37,6	300	18,4	90,8
MBDB	37,3	300	13,6	110,7
Cocaína	25,9	200	9,4	91,6
Cocaetileno	52,2	300	11,1	87,1
Desipramina	30,0	150	19,0	89,0
Nortriptilina	27,8	150	16,9	93,4

Assim como para o sangue, o limite de quantificação foi calculado como o primeiro ponto da curva a apresentar CV menor que 20% e exatidão entre 80 e 120%. A maioria dos analitos apresentou o primeiro ponto da curva de calibração como o limite de quantificação, com exceção da desipramina, que apresentou um CV% de 42% para o ponto de 50 µg mL⁻¹, e a nortriptilina (CV% = 21,6%, para 50 µg mL⁻¹). Para esses casos, os requisitos de limite de quantificação foram atendidos pelo segundo ponto da curva (150 ng mL⁻¹) e, dessa forma, a faixa de linearidade para esses analitos passou a ser considerada de 150 a 1000 ng mL⁻¹. Os limites de detecção e quantificação encontrados para os analitos estão próximos às concentrações consideradas normais ou terapêuticas para essas substâncias (TABELA 1) e, portanto, podem ser considerados como adequados para os objetivos da toxicologia forense, que procura identificar efeitos nocivos decorrentes de interações de substâncias químicas com o organismo, e esses efeitos são esperados que ocorram em concentrações mais elevadas do que as consideradas terapêuticas ou normais.

A partir da faixa de linearidade estabelecida, foi realizada a análise da variância (ANOVA) para todas as curvas (com exceção do MDA para a urina), com nível de confiança de 95%. As linearidades encontradas foram consideradas como significativas, uma vez que o F calculado foi superior ao F tabelado e o valor-p foi menor do que 0,05, conforme apresentado na TABELA 25.

TABELA 25 – FAIXA DE LINEARIDADE E F CALCULADO PARA AS CURVAS OBTIDAS (F TABELADO = 7,71)

Analito	Sangue			Urina		
	Faixa de linearidade (ng mL ⁻¹)	F calculado	Valor-p	Faixa de linearidade (ng mL ⁻¹)	F calculado	Valor-p
Codeína	200 – 2000	1714,2	2,03E-06	300 – 3000	2614,9	8,75E-07
MDA	300 – 3000	2852,6	7,36E-07	-	-	-
MBDB	300 – 3000	973,02	6,29E-06	300 – 3000	1174,0	4,33E-06
Cocaína	200 – 2000	1962,0	1,55E-06	200 – 2000	17708,0	1,91E-08
Cocaetileno	200 – 2000	2137,6	2,23E-05	300 – 3000	1081,7	5,10E-06
Flurazepam	200 – 2000	12229,4	4,01E-08	-	-	-
Desipramina	300 – 3000	4642,8	2,78E-07	150 – 1000	3871,3	1,63E-07
Nortriptilina	200 – 2000	1818,8	1,81E-06	150 – 1000	772,3	2,46E-06
Flunitrazepam	300 – 2000	519,7	1,74E-05	-	-	-
Diazepam	300 – 3000	2826,8	7,49E-07	-	-	-

5.8.2 Precisão e Inexatidão

Conforme recomendação do Guia de Validação de Métodos em Toxicologia Forense (ANSI/ANSB, 2019), os ensaios de precisão e inexatidão (*bias*) devem ser realizados em todos os métodos quantitativos e em todas as matrizes em que se pretende realizar a quantificação. Dessa forma, nesse trabalho, a precisão e inexatidão foram avaliadas para as matrizes de sangue e urina, utilizando amostras branco fortificadas com os analitos conforme item 4.3.4. Os resultados obtidos para os analitos apresentados na TABELA 26 (urina) e na TABELA 27 (sangue).

TABELA 26 – PRECISÃO E EXATIDÃO DAS CURVAS ANALÍTICAS EM URINA (Continua)

Analito	Concentração (ng mL ⁻¹)	Precisão		Inexatidão (%) (n=9)
		Intra ensaio CV% (n=3)	Inter ensaio CV% (n=3; dias=3)	
Codeína	800	19,5	14,9	-0,9
	1500	18,5	19,7	-3,6
	2500	7,2	3,2	15,7

TABELA 26 – PRECISÃO E EXATIDÃO DAS CURVAS ANALÍTICAS EM URINA (Conclusão)

Analito	Concentração (ng mL ⁻¹)	Precisão		Inexatidão (%) (n=9)
		Intra ensaio CV% (n=3)	Inter ensaio CV% (n=3; dias=3)	
MBDB	800	12,3	4,8	9,0
	1500	14,5	15,1	6,3
	2500	17,2	8,5	-12,7
Cocaína	600	10,3	5,9	-6,4
	1000	14,9	16,5	1,5
	1500	16,7	7,2	-1,3
Cocaetileno	800	14,8	6,7	-0,2
	1500	15,4	17,8	9,8
	2500	16,1	7,2	0,4
Desipramina	300	15,4	9,1	-2,6
	500	18,6	18,7	0,15
	800	15,3	7,1	-7,8
Nortriptilina	300	16,2	10,2	1,9
	500	19,0	16,8	8,6
	800	16,3	7,2	-4,4

TABELA 27 – LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO E DE DETECÇÃO PARA OS ANALITOS EM ESTUDO (Continua)

Analito	Concentração (ng mL ⁻¹)	Precisão		Inexatidão (%) (n=15)
		Intra ensaio CV% (n=5)	Inter ensaio CV% (n=5; dias=3)	
Codeína	600	10,5	11,1	-0,5
	1000	10,9	12,2	-2,1
	1600	8,3	12,0	-11,2
MDA	900	15,7	14,7	7,6
	1500	18,5	11,8	-13,6
	2500	19,6	14,9	-8,7

TABELA 27 – LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO E DE DETECÇÃO PARA OS ANALITOS EM ESTUDO

Analito	Concentração (ng mL ⁻¹)	Precisão		Inexatidão (%) (n=15)
		Intra ensaio	Inter ensaio	
		CV% (n=5)	CV% (n=5; dias=3)	
MBDB	900	12,2	12,9	4,9
	1500	14,2	10,28	-9,2
	2500	13,4	16,0	-9,3
Cocaína	600	5,8	8,7	3,9
	1000	11,6	13,3	9,5
	1600	13,9	9,24	-12,3
Cocaetileno	600	14,3	13,2	0,15
	1000	12,6	14,7	15,0
	1600	16,1	11,6	-10,4
Flurazepam	600	10,2	7,8	9,9
	1000	15,0	13,8	19,9
	1600	17,8	14,7	-8,3
Desipramina	900	12,8	9,84	-1,73
	1500	6,9	11,6	-14,0
	2500	17,8	13,6	-3,0
Nortriptilina	600	9,2	9,1	4,11
	1000	17,5	16,4	3,6
	1600	14,3	15,4	11,1
Flunitrazepam	600	6,4	6,7	-6,2
	1000	17,8	11,6	-1,1
	1600	12,3	8,9	-16,9
Diazepam	900	19,0	18,1	1,53
	1500	15,3	11,2	-10,7
	2500	16,8	16,6	-6,1

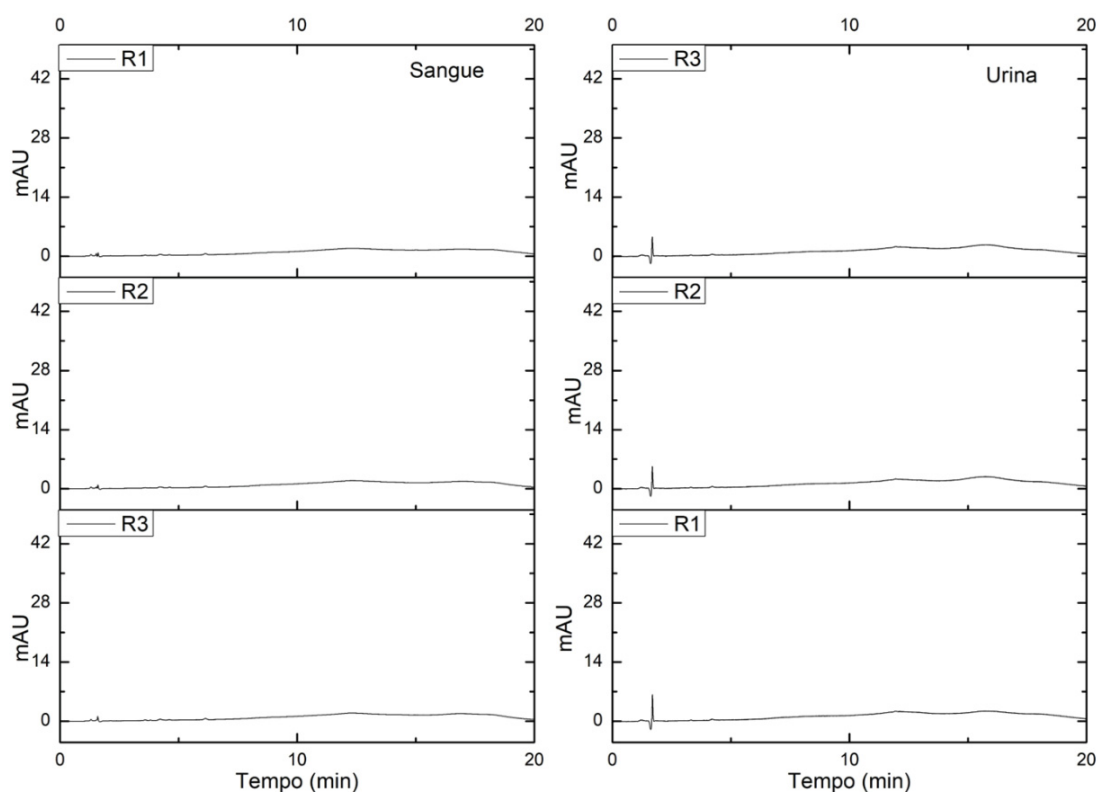
Apesar de tanto as análises realizadas no sangue, quanto na urina, terem apresentado alguns resultados altos para os testes de precisão intra ensaio (por

exemplo, $CQB_{CODEÍNA} = 19,5\%$; $CQM_{NORTRIPTILINA} = 19,0\%$ na urina e no sangue $CQA_{MDA} = 19,6\%$; $CQB_{DIAZEPAM} = 19,0\%$), inter ensaio (como $CQM_{CODEÍNA} = 19,7\%$ na urina $CQB_{DIAZEPAM} = 18,1\%$ no sangue) e inexatidão ($CQA_{CODEÍNA} = 15,7\%$ na urina e $CQM_{FLURAZEPAM} = 19,9\%$ no sangue) todos os valores encontrados estão abaixo do limite de coeficiente de variação de até 20,0%, conforme estipulado pelo guia utilizado para a realização da avaliação dos parâmetros de desempenho utilizado nesse trabalho (ANS/ANSB, 2019). Isso demonstra que o método de SHS-LLME-LC-DAD apresenta uma confiabilidade analítica para ser utilizado como método de triagem ou quantificação dos analitos nas matrizes de estudo. Esses valores poderiam ser menores com o uso de um padrão interno, que tem como um de seus objetivos, corrigir possíveis erros analíticos que ocorram durante o preparo da amostra ou análise instrumental.

5.8.3 Efeito Memória

Para a avaliação do Efeito Memória, ou *carryover*, foi realizada a injeção de três amostras de branco, após a injeção do último ponto da curva analítica de urina e a injeção de três amostras de sangue branco após o último ponto da curva analítica de sangue (FIGURA 41). Em nenhum dos cromatogramas obtidos nesse caso foi detectada a presença de picos nos tempos de retenção dos analitos, concluindo-se assim que o método é livre de *carryover* nas concentrações avaliadas no item 5.8.1 Linearidade.

FIGURA 41 – EFEITO MEMÓRIA (SANGUE E URINA)



LEGENDA: R1 – Replicata 1; R2 – Replicata 2; R3 – Replicata 3;

5.8.4 Efeito Matriz (EM)

Para a avaliação do EM, 10 amostras de sangue e urina, isentas de analitos, provenientes de diferentes indivíduos, foram extraídas e analisadas no LC-DAD, com o objetivo de identificar a presença de picos interferentes que pudessem prejudicar a detecção dos analitos em estudo. Nenhum sinal foi detectado nos tempos de retenção dos analitos no sangue e, portanto, foi considerado que não há efeito matriz para essa matriz. Em contrapartida, houve a presença de picos de compostos endógenos e/ou exógenos nas amostras de urina isenta de analitos avaliadas, conforme exemplo apresentado na FIGURA 42. O EM foi então calculado comparando-se a linearidade das curvas em urina com curvas em água ultrapura, conforme item 4.10.4, para os analitos cocaína, cocaetileno, desipramina e nortriptilina, conforme FIGURA 43. Adicionalmente, os resultados obtidos para o EM, calculado conforme eq. 9, podem ser vistos na TABELA 28.

FIGURA 42 – EXEMPLO DE CROMATOGRAMA DE URINA BRANCO

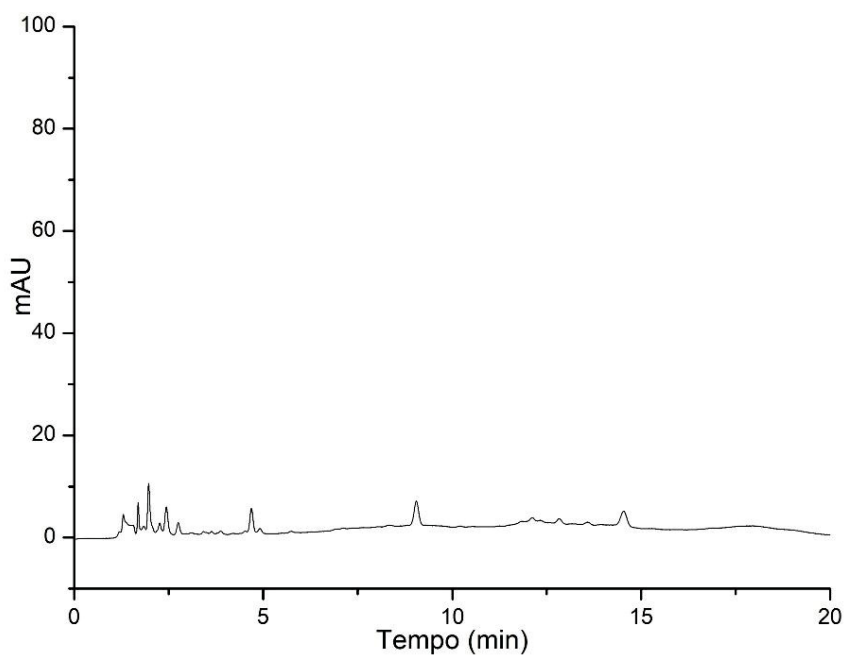


FIGURA 43 – COMPARAÇÃO DAS CURVAS ANALÍTICAS CONSTRUÍDAS EM URINA E ÁGUA ULTRAPURA PARA OS ANALITOS DESIPRAMINA, NORTRIPTILINA, COCAÍNA E COCAETILENO (n=3) (Continua)

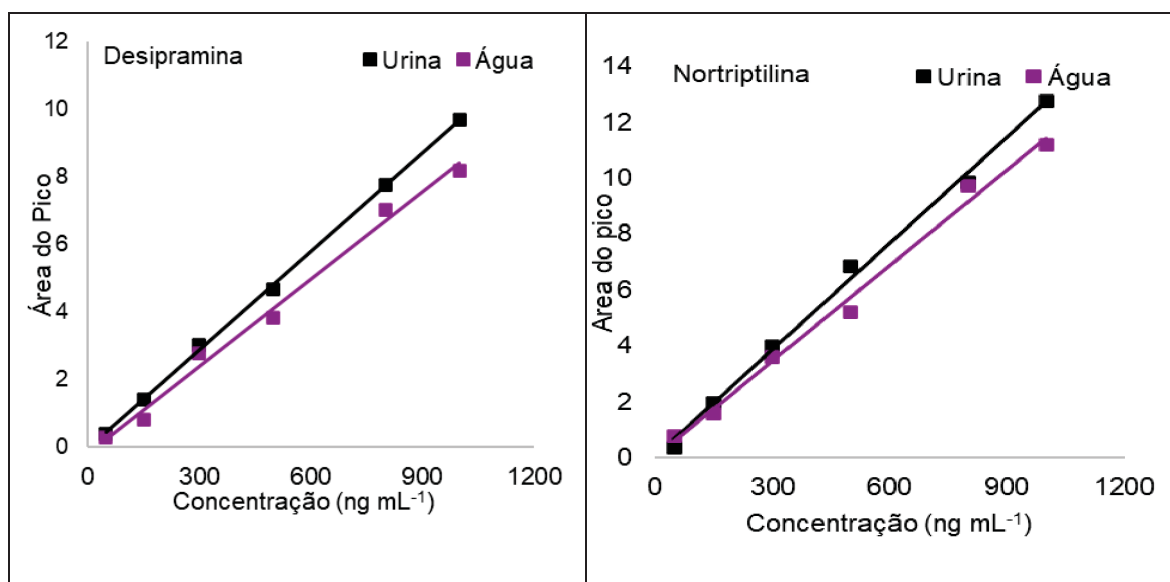


FIGURA 43 – COMPARAÇÃO DAS CURVAS ANALÍTICAS CONSTRUÍDAS EM URINA E ÁGUA ULTRAPURA PARA OS ANALITOS DESIPRAMINA, NORTRIPTILINA, COCAÍNA E COCAETILENO (n=3)

(Conclusão)

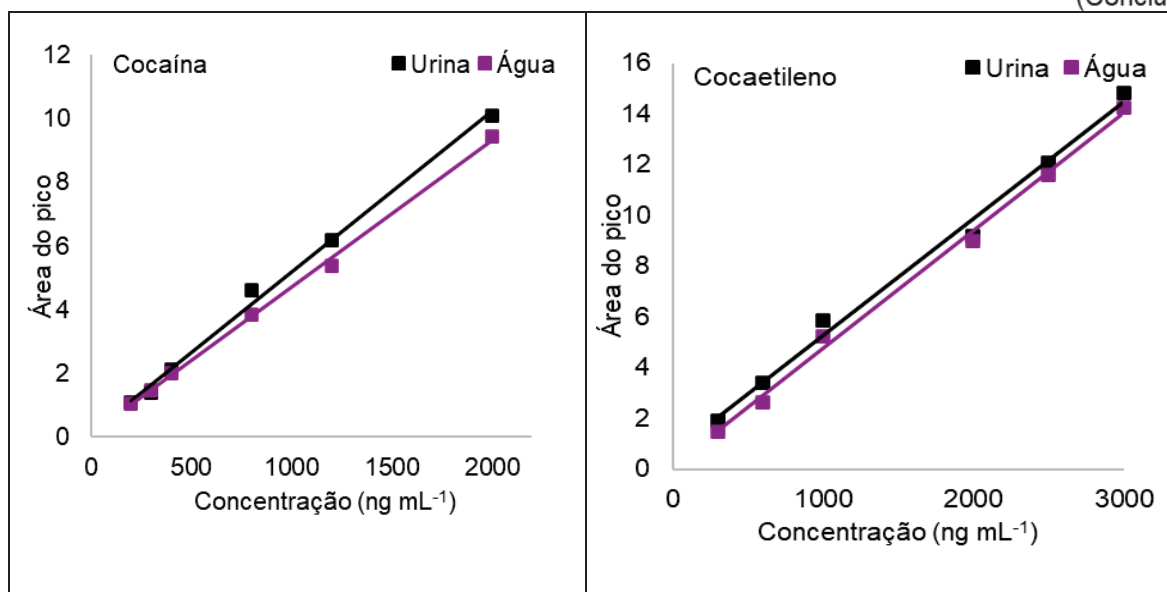


TABELA 28 – EFEITO MATRIZ CALCULADO PARA OS ANALITOS DESIPRAMINA, NORTRIPTILINA, COCAÍNA E COCAETILENO EM AMOSTRAS DE URINA

Analito	Coefficiente angular - urina	Coefficiente angular - água	Efeito Matriz (%)
Desipramina	0,0097	0,0086	12,8
Nortriptilina	0,0127	0,0114	11,4
Cocaína	0,0050	0,0046	9,64
Cocaetileno	0,0047	0,0047	0

Valores de EM iguais a zero, como é o caso do cocaetileno, nenhum efeito matriz é observado. Já para valores superiores a um, entende-se que pode haver um aumento do sinal do analito devido à coeluição deste com algum interferente da matriz, que é o caso da desipramina, desipramina e cocaetileno

EM superiores a 10% foram considerados como sendo significativos estatisticamente, ou seja, que a amostra apresenta um efeito matriz importante (Santos *et al.*, 2013). Dessa forma, para minimizar o efeito matriz, recomenda-se que as soluções padrão para análises de quantificação (como curva analítica e controles baixo, médio e alto) sejam feitos em urina (Pinho *et al.*, 2009)

5.8.5 Seletividade

A avaliação da seletividade foi realizada utilizando amostras de sangue fortificadas com medicamentos comumente utilizadas pela população brasileira, como: metformina, carbamazepina, nimesulida, paracetamol, ácido acetilsalicílico, omeprazol, bromoprida, losartana, hidroclorotiazida, dipirona, captopril, prednisolona e cafeína. A análise foi realizada em triplicata, pelo enriquecimento de sangue branco a uma concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada analito e posterior realização de SHS-LLME-LC-DAD.

O objetivo da avaliação do parâmetro de seletividade é determinar se outros analitos podem interferir na detecção e identificação das substâncias para as quais o método está sendo desenvolvido. Os TR dos analitos detectados estão apresentados na TABELA 29, bem como os TR dos analitos que fazem parte do escopo desse trabalho e a resolução entre os picos, calculada conforme equação 2 apresentada no item 3.5. Para o cálculo da resolução foi considerado os valores de dois picos adjacentes, sendo o pico avaliado e o pico imediatamente anterior, exceto para os picos de bromoprida e losartana, que tiveram sua resolução calculada em relação ao analito escopo desse trabalho mais próximo. Sendo assim, a bromoprida teve sua resolução calculada referente ao pico de MBDB e a losartana em relação à desipramina. Isso foi feito pois a intenção desse parâmetro é avaliar a interferência de outros analitos em relação aos analitos estudados durante o desenvolvimento do método.

TABELA 29 – TESTE DE SELETIVIDADE – RESOLUÇÃO. Em negrito os compostos de interesse deste trabalho. (Continua)

Analito	t_r (min)	Largura da base do pico (wb), min	Resolução (Rs)
Metformina	ND	-	-
Dipirona	1,53	0,25	-
Codeína	1,58	0,25	0,19
Paracetamol	ND	-	-
MDA	2,00	0,32	1,45
Hidroclorotiazida	ND	-	-
MBDB	2,38	0,49	0,96
Cafeína	2,44	0,35	0,14

TABELA 29 – TESTE DE SELETIVIDADE – RESOLUÇÃO. Em negrito os compostos de interesse deste trabalho. (Conclusão)

Analito	t_r (min)	Largura da base do pico (wb), min	Resolução (Rs)
Bromoprida	2,52	0,66	0,24
Cocaína	3,49	0,75	1,37
Captopril	ND	-	-
Omeprazol	ND	-	-
Cocaetileno	4,71	0,67	1,73
Prednisolona	5,22	0,52	0,87
AAS	ND	-	-
Flurazepam	5,88	0,87	0,95
Desipramina	8,08	0,64	2,92
Carbamazepina	8,24	0,51	0,28
Losartana	8,43	0,42	0,66
Nortriptilina	8,79	0,39	0,90
Flunitrazepam	10,97	0,75	3,85
Diazepam	14,22	0,75	4,36
Nimesulida	ND	-	-
Ibuprofeno	ND	-	-

Conforme discutido no item 5.1, picos com resolução superior a 1,0 estão razoavelmente separados, podendo ser identificados. Observa-se na TABELA 29 que vários analitos apresentaram valor de Rs inferior a 1,0, o que indica que o método não é seletivo para alguns analitos. É possível ver que a dipirona pode interferir na detecção da codeína, a presença de cafeína e bromoprida pode interferir na detecção de MBDB, assim como a prednisolona pode interferir tanto na detecção de cocaetileno, quanto na de flurazepam, enquanto a carbamazepina e a losartana podem interferir na detecção de desipramina, além da losartana também interferir na detecção de nortriptilina.

A presença de interferentes na análise não é desejado, entretanto, era esperado que houvesse a extração de mais analitos, uma vez que a intenção do método desenvolvido é o uso da trietilamina como solvente de triagem, ou seja, que extraia a maior quantidade de analitos possível. Dessa forma, para o uso da

metodologia desenvolvida em uma rotina de laboratório forense, seria recomendado o uso de uma corrida cromatográfica mais longa, que permitisse uma melhor separação dos analitos, ou o uso de outro equipamento para a detecção dos compostos, como o LC-MS/MS.

Quanto aos compostos que não foram detectados, isso pode ser explicado pelas características físico-químicas, como pKa e LogP, das moléculas, que estão demonstradas na TABELA 30 apresentada na sequência.

TABELA 30 – pKa E LogP DAS MOLÉCULAS NÃO DETECTADAS NO TESTE DE SELETIVIDADE

Analito	pKa	LogP
Metformina	12,4	-2,6
Paracetamol	9,38	0,46
Hidroclorotiazida	7,90	-0,07
Captopril	3,70	0,34
Omeprazol	4,77	2,23
AAS	2,97	2,26
Nimesulida	6,50	2,00
Ibuprofeno	5,30	3,97

Os analitos metformina, paracetamol, hidroclorotiazida e captopril apresentam um LogP inferior a 0,5, o que indica que são mais solúveis em ambiente aquoso e podem não ter sido extraídos pela TEA por essa razão. Já os analitos omeprazol, AAS e nimesulida, apesar de apresentarem um elevado valor de LogP, apresentam um pKa inferior a 7,0, o que pode ter acarretado um maior número de moléculas na forma ionizada, desfavorecendo a sua extração. O ibuprofeno, apesar de ter característica de pKa ácido, apresenta um LogP próximo a 4,0, o que favorece sua extração por solvente orgânico. Entretanto, não foi possível a detecção deste composto nem com a injeção do padrão analítico, o que pode ser explicado por uma alta afinidade da molécula pela coluna cromatográfica e pouca afinidade pela fase móvel. Não é possível afirmar que este analito não é extraído pela SHS-LLME-LC-DAD desenvolvida nesse trabalho, mas sabe-se que nas condições cromatográficas utilizadas, não foi possível a sua detecção.

Com base no exposto, nota-se que o método não é seletivo para as substâncias que fazem parte do escopo analítico deste trabalho, uma vez que

substâncias além do escopo foram detectadas. Esse fato é muito interessante, uma vez que demonstra que os SHS são bons candidatos para aplicação em triagem toxicológica, em substituição a solventes halogenados.

5.9 APLICAÇÃO DO MÉTODO DE MICROEXTRAÇÃO DESENVOLVIDO EM AMOSTRAS DE CASOS REAIS

O método desenvolvido foi aplicado em casos reais previamente periciados pelo LTF-PCP e sabidamente positivos para alguns dos analitos objetos de estudo deste trabalho. Para o exame pericial, foi utilizado o método desenvolvido por Pragst; Herzler; Erxleben (2004) e que está demonstrado na FIGURA 13, do item 4.11 deste trabalho.

Ao todo, 24 amostras de sangue, 7 amostras de urina, 4 amostras de fígado e 5 amostras de conteúdo gástrico foram analisadas utilizando o método SHS-LLME-LC-DAD desenvolvido nesse trabalho. Os resultados, apresentados na TABELA 31, estão divididos em casos, sendo que cada caso contém uma ou mais matrizes pertencentes à mesma origem (mesmo indivíduo).

TABELA 31 – APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO EM CASOS REAIS (Continua)

Caso	Matriz	Analitos detectados		Concentração (ng mL ⁻¹) (por SHS-LLME)
		LFT-PCP	SHS-LLME	
1	SG	COC, BZE	COC	C _{COC} = 894,8
2	SG	COC, BZE, ETIL	COC, ETIL	C _{COC} = 415,58 C _{ETIL} < LOQ
3	SG	COC, BZE	COC	C _{COC} < LOQ; C _{ETIL} < LOQ
4	SG	COC, BZE	COC	C _{COC} = 1093,1
5	SG	COC, BZE	COC	C _{COC} < LOQ
6	SG	Dipirona, Lidocaína, MDA	Dipirona, Lidocaína, MDA	C _{MDA} > LOL
7	SG	MDA	MDA	C _{MDA} > LOL
8	SG	COC, ETIL	COC, ETIL	C _{COC} = 1143,9; C _{ETIL} = 222,7
9	SG	COC, BZE	COC	C _{COC} > LOQ
10	SG	COC, BZE, ETIL	COC, ETIL	C _{COC} = 456,8; C _{ETIL} < LOQ
11	SG	COD, ATR, Clonazepam	COD, ATR, NTR	C _{COD} = 875,8; C _{NTR} = 399,22

TABELA 31 – APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO EM CASOS REAIS

Caso	Matriz	Analitos detectados		Concentração (ng mL ⁻¹) (por SHS-LLME)
		LFT-PCP	SHS-LLME	
12	SG	COC, BZE, ETIL	COC, ETIL	C _{COC} > LOL; C _{ETIL} = 734,2
13	SG	COC, BZE, ETIL	COC, ETIL	C _{COC} = 1126,7; C _{ETIL} < LOQ
14	SG	COC, ETIL	COC, ETIL	C _{COC} = 341,0; C _{ETIL} = 417,8
15	SG	COC, BZE, ETIL	COC, ETIL	C _{COC} = 252,1; C _{ETIL} < LOQ
16	SG	COC, ETIL	COC, ETIL	C _{COC} < LOQ ; C _{ETIL} < LOQ
17	SG	COC, BZE, ETIL	COC, ETIL	C _{COC} = 443,2; C _{ETIL} = 453,8
	UR	COC, BZE, ETIL	COC, ETIL	C _{COC} > LOL; C _{ETIL} > LOL
18	SG	DESI	DESI	C _{DESI} < LOQ
	CG	DESI	DESI	NA
19	SG	COC, BZE, ETIL	COC, ETIL	C _{COC} < LOQ; C _{ETIL} < LOQ
	UR	COC, BZE, ETIL	COC, ETIL	C _{COC} = 1176,8; C _{ETIL} > LOL
20	SG	ATR, NTR, Clorpromazina, Sertralina	ATR, NTR, Clorpromazina	C _{NTR} = 1768,6
	UR	ATR, NTR, Clorpromazina, Sertralina	ATR, NTR, Clorpromazina	C _{NTR} > LOL
	CG	ATR, NTR, Clorpromazina, Sertralina	ATR, NTR, Clorpromazina, Sertralina	NA
21	SG	Carbamazepina, Fenitoína, NTR	Carbamazepina, NTR	C _{NTR} < LOQ
	UR	Carbamazepina, Fenitoína, NTR	Carbamazepina, NTR	C _{NTR} > LOL
	CG	Carbamazepina, Fenitoína, NTR	Carbamazepina, NTR	NA
22	SG	COC	COC	C _{COC} = 308,3
	UR	COC	COC	C _{COC} = 1085,3
	FIG	ND	ND	NA
23	SG	ATR, NTR	ATR, NTR	C _{NTR} < LOQ
	FIG	ATR, NTR	ATR, NTR	NA
24	UR	NTR	ATR, NTR	C _{NTR} > LOL
	FIG	NR	ATR, NTR, DZP	NA
	CG	ATR, DZP	ATR, NTR, DZP	NA

TABELA 31 – APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO EM CASOS REAIS (Conclusão)

Caso	Matriz	Analitos detectados		Concentração (ng mL ⁻¹) (por SHS-LLME)
		LFT-PCP	SHS-LLME	
25	SG	COC, BZE	COC	Ccoc = 526,1
	UR	COC, BZE	COC	Ccoc > LOL
	FIG	COC, BZE	COC	NA
	CG	COC, BZE	COC	NA

LEGENDA: ATR: Amitriptilina; BZE: Benzoilecgonina; COD: Codeína; COC: Cocaína; DZP: Diazepam; ETIL: Cocaetileno; NTR: Nortriptilina; ND: Não detectado; NR: Não Realizado; NA: Não aplicável, LOQ: Limite de quantificação; LOL: Limite de resposta linear SG: Sangue, UR: Urina; FIG: Fígado; CG: Conteúdo Gástrico

Foi possível realizar a extração das amostras reais utilizando SHS-LLME-LC-DAD sendo que todos os analitos que foram escopo de análise desse trabalho foram detectados, com exceção da benzoilecgonina, como já foi discutido anteriormente. Os casos 4,8,9,12 e 13 apresentaram concentração de cocaína no sangue superior a 1000 ng mL⁻¹, concentração considerada letal (TABELA 1), sendo que para os casos 9 e 12 havia suspeita de intoxicação exógena (e para os dois casos a concentração de cocaína no sangue foi superior ao maior ponto da curva). O caso 25 trata-se de um encontro de cadáver em que a suspeita era a de intoxicação exógena por entorpecentes. Como o cadáver encontrado estava em avançado estado de decomposição, todas as principais matrizes biológicas (sangue, urina, fígado e CG) foram encaminhadas para a análise toxicológica, sendo possível detectar a presença de cocaína em todas as matrizes avaliadas (sendo a concentração superior a 500 ng mL⁻¹ de cocaína em sangue considerada alta – TABELA 1). Adicionalmente, todos os casos previamente testados como positivos para cocaetileno, foram confirmados pela SHS-LLME, sendo que o cocaetileno trata-se de um dos produtos de biotransformação mais tóxico que a cocaína.

Para o caso 20, havia a suspeita de suicídio pela ingestão de diversos medicamentos, sendo que para esse caso, a concentração encontrada de nortriptilina foi superior ao maior ponto da curva (2000 ng mL), sendo a concentração superior a 1000 ng mL⁻¹ considerada letal (TABELA 1).

Por fim, além dos analitos do escopo, também houve a detecção de outros analitos que estavam presentes nas amostras, como Carbamazepina e Dipirona

(que já haviam sido vistos no ensaio de seletividade), Lidocaína, Clorpromazina e Sertralina, o que reforça a possibilidade do uso da TEA como solvente para triagem de vários analitos de interesse toxicológico.

Com os resultados obtidos observou-se que o método desenvolvido apresentou resultados comparáveis com o método utilizado pelo LTF-PCP, sendo aplicado em casos reais com sucesso. Nota-se que a etapa da microextração foi realizada utilizando 250 μL de trietilamina acidificada (ou seja, 125 μL do solvente orgânico) enquanto o método utilizado na rotina utiliza 400 μL do solvente diclorometano, o que demonstra a eficiência do SHS em extrair analitos devido à sua ampla superfície de contato formada entre o solvente orgânico e a amostra aquosa. Adicionalmente, para realizar a extração com diclorometano, é necessário que a amostra seja agitada em vórtex por 1 min, o que pode gerar emulsões, principalmente em amostras de sangue, e consequentemente, a perda de analitos. Já com o uso do SHS, a etapa da extração ocorre em repouso, após o ajuste do meio para o pH básico e com o retorno do solvente para sua forma hidrofóbica, diminuindo o risco da perda de analitos devido à formação de emulsão. Portanto, acredita-se que os solventes SHS, aqui representado pela TEA, são uma ferramenta útil para a toxicologia forense e que podem ser considerados para serem utilizados em análises de triagem toxicológica.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO

A técnica de microextração em fase líquida com solvente de hidrofilicidade comutável, a trietilamina, desenvolvido apresentou aplicabilidade para a extração de várias substâncias de interesse forense, como a desipramina, nortriptilina, codeína, MDA, MBDB, cocaína e seu produto de biotransformação, cocaetileno, flurazepam, flunitrazepam em amostras de sangue, urina, fígado e conteúdo gástrico.

A avaliação de parâmetros de desempenho realizada em amostras de sangue e urina mostrou que a SHS-LLME-LC-DAD desenvolvida, pode ser utilizada tanto para a detecção quanto para a quantificação dos analitos em amostras de sangue e urina, estando de acordo com as diretrizes do guia de validação de métodos em Toxicologia Forense da *American Academy of Sciences* (ANSI/ASB 036, 2019) e podendo ser utilizado na rotina de um laboratório forense.

Os limites de quantificação superiores a 150 ng mL^{-1} foram considerados adequados para a aplicação em toxicologia forense, já que em casos de intoxicação exógena espera-se que as concentrações presentes no sangue ou urina sejam superiores a essa. Entretanto, o preparo de amostra desenvolvido mostra-se promissor para ser utilizado associado a outras técnicas analíticas para separação, detecção e identificação dos analitos. Conforme demonstrado na Tabela 3, diversos estudos utilizando SHS para preparo de amostra utilizaram técnicas mais sensíveis para a análise dos extratos, como o GC-MS e LC-MS. Como a cromatografia acoplada à espectrometria de massas aumenta a sensibilidade do equipamento, o uso dessas técnicas analíticas permitiria curvas com menores limites de detecção e quantificação que os obtidos com o uso do LC-DAD.

Foi possível observar a dificuldade de aplicar a SHS-LLME em amostras de sangue total, o que pode justificar a baixa quantidade de artigos publicados para essa matriz na literatura. Apesar do grande desafio, foi possível chegar a condições adequadas para a realização do método em amostras de sangue. Adicionalmente, na busca realizada, não foram encontrados artigos publicados em matrizes como fígado e conteúdo gástrico, sendo que este trabalho vem a contribuir para a ampliação do conhecimento acerca do uso de SHS para a realização de microextração em diferentes matrizes. Adicionalmente, o ensaio de seletividade e de aplicação em casos reais demonstraram que a TEA foi capaz de extrair analitos

em além do escopo avaliado nesse trabalho, podendo ser considerado seu uso como solvente para realização de triagem toxicológica.

A comparação dos resultados obtidos por preparo de amostra realizada pela SHS-LLME desenvolvida e o método utilizado pelo LTF-PCP, desenvolvido por Pragst; Herzler; Erxleben (2004), através da análise de casos reais e da comparação da extração em amostras de fígado, mostrou que a SHS-LLME pode ser uma alternativa para a triagem toxicológica, tendo apresentado resultados promissores para amostras de fígado, sendo que houve a extração de menos interferentes dessa matriz.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 141, 24 de jul. 2017. Disponível em: https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf. Acesso em: 03 mai. 2024.

ANSI/ASB STANDARD 036. **Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology**. American Academy of Forensic Sciences, http://www.asbstandardsboard.org/wp-content/uploads/2019/11/036_Std_e1.pdf, 2019.

AHMAR, H. *et al.* Switchable Hydrophilicity Solvent-Based Homogenous Liquid–Liquid Microextraction (SHS-HLLME) Combined with GC-FID for the Quantification of Methadone and Tramadol. **Chromatographia**, v. 81, n. 7, p. 1063–1070, 2018.

AL-ASMARI, A. Method for the identification and quantification of sixty drugs and their metabolites in postmortem whole blood using liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Forensic Science International**, v.309, p.1-19, 2020.

AN, J. *et al.* Quantification of sedative-hypnotics in human urine and plasma via polystyrene-based solid phase extraction-LC-MS/MS analysis; **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.236, p.1-11, 2023.

ANTONIO, A. S. *et al.* Investigating the capability of UA-DLLME and DART-HRMS in the analysis of benzodiazepines in whole human blood. **Forensic Chemistry**, v. 39, 2024.

BANASZKIEWICZ, L. *et al.* Rapid and simple multi-analyte LC-MS/MS method for the determination of benzodiazepines and Z-hypnotic drugs in blood samples: Development, validation and application based on three years of toxicological analyses. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.191, p.1-11, 2020.

BARONE, R. *et al.* Development and validation of a fast UPLC-MS/MS screening method for the detection of 68 psychoactive drugs and metabolites in whole blood and application to post-mortem cases. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 228, 2023.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria**. 4. ed. Porto Alegre: Bookmam, 2010.

BAZEL, Y.; REČLO, M.; CHUBIRKA, Y. Switchable hydrophilicity solvents in analytical chemistry. Five years of achievements. **Microchemical Journal**, v. 157, 2020.

BEHPOUR, M. *et al.* Combination of gel-electromembrane extraction with switchable hydrophilicity solvent-based homogeneous liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography for the extraction and determination of

antidepressants in human serum, breast milk and wastewater. **Journal of Chromatography A**, v. 1621, 2020.

BEZERRA, M. A. *et al.* Simultaneous optimization of multiple responses and its application in Analytical Chemistry – A review, **Talanta**, v.194, p. 941-959, 2019.

BOMBANA, H. S. *et al.* Hollow-fiber liquid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometric determination of amphetamines in whole blood. **Journal of Chromatography B**, v.1139, p.1-6, 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN)**. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/Intoxbr.def>. (Acesso em 06 jun 2024).

BURATO, J. S. S. *et al.* Recent advances and trends in miniaturized sample preparation techniques. **Journal of Separation Science**, v.43, n.1, p.202-225, 2020.

CABARCOS-FERNÁNDEZ, P. *et al.* Quantitative determination of clozapine in plasma using an environmentally friendly technique. **Microchemical Journal**, v.180, p.1-8, 2022.

CARASEK, E. *et al.* Sustainable green solvents for microextraction techniques: Recent developments and applications. **Journal of Chromatography A**, v. 1640, 2021.

COLLINS, C. H. Princípios Básicos de Cromatografia. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. (org.). **Fundamentos de Cromatografia**. 1. ed. Campinas: Editora Unicamp, 2017.

COX, J. *et al.* Quantitation of Fentanyl and Metabolites from liver tissue using a validated QuEChERS extraction and LC-MS-MS Analysis. **Journal of Analytical Toxicology**, v.44, p.957-967, 2020.

CUNHA, R. L. *et al.* Fast determination of amphetamine-type stimulants and synthetic cathinones in whole blood samples using protein precipitation and LC-MS/MS. **Microchemical Journal**, v.163, p.1-9, 2021.

DA SILVA, C. P. *et al.* Simple extraction of toxicologically relevant psychotropic compound and metabolites from whole blood using mini-QuEChERS followed by UPLC-MS/MS analysis. **Biomedical Chromatography**, v.5142, p.1-10, 2021.

DA SILVA, K. C. *et al.* Coffee with chemometric: an application of 2^{5-1} fractional factorial design. **Química Nova**, v. 46, n. 1, p. 98–107, 2023.

DE PAULA MEIRELLES, G., *et al.* Development of a dispersive liquid-liquid microextraction method for the evaluation of maternal-fetal exposure to cocaine employing human umbilical cord tissue. **Journal of Analytical Toxicology**, v.48, n.5, p.263-272, 2024.

DE ZEEUW, R. A. Drug screening in biological fluids: the need for a systematic approach **Journal of Chromatography B**, v.689, n.1, p.71-79, 1997.

DI, X.; ZHAO, X.; GUO, X. Dispersive micro-solid phase extraction combined with switchable hydrophilicity solvent-based homogeneous liquid-liquid microextraction for enrichment of non-steroidal anti-inflammatory drugs in environmental water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1634, 2020.

DORTA, D. J. *et al.* **Toxicologia Forense**. 1. ed. São Paulo: Blucher, 2018.

EDUCE DESIGN & INNOVATION INC. Drugbank Online. Disponível em < <https://go.drugbank.com/>> Acesso em 18 jan 2025.

ERARPAT, S. *et al.* Accurate and simple determination of oxcarbazepine in human plasma and urine samples using switchable-hydrophilicity solvent in GC–MS. **Biomedical Chromatography**, v. 34, n. 10, 2020.

EZODDIN, M.; ABDI, K.; LAMEI, N. Development of air assisted liquid phase microextraction based on switchable-hydrophilicity solvent for the determination of palladium in environmental samples. **Talanta**, v. 153, p. 247–252, 2016.

FABRIS, A. L. *et al.* A new application of the switchable hydrophilicity solvent-based homogenous liquid–liquid microextraction to analyze synthetic cannabinoids in plasma by LC-MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 234, 2023.

FERREIRA, S. L. C. *et al.* Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta**, v.597, n.10, p.179-186, 2007.

GONG J., *et al.* Hepatocytes: A key role in liver inflammation. **Frontiers in Immunology**, v.13, n.1083780, 2023.

GORZIZA, R. *et al.* Extraction of dried oral fluid spots for the identification of drugs of abuse using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Forensic Chemistry**, v.19, p.1-11, 2020.

HABIBIYAN, A. *et al.* Ultrasonic assisted switchable solvent based on liquid phase microextraction combined with micro sample injection flame atomic absorption spectrometry for determination of some heavy metals in water, urine and tea infusion samples. **Journal of Molecular Liquids**, v. 242, p. 492–496, 2017.

HASSAN, M.; ALSHANA, U. Switchable-hydrophilicity solvent liquid–liquid microextraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs from biological fluids prior to HPLC-DAD determination. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 174, p. 509–517, 2019.

JESSOP, P. G. *et al.* A solvent having switchable hydrophilicity. **Green Chemistry**, v. 12, n. 5, p. 809–881, 2010.

JESSOP, P. G. *et al.* Reversible nonpolar-to-polar solvent. **Nature**, v. 436, p. 1102, 2005.

JESSOP, P. G. *et al.* Tertiary amine solvents having switchable hydrophilicity. **Green Chemistry**, v. 13, n. 3, p. 619–623, 2011.

JICKELLS, S.; NEGRUSZ, A. **Clarke's Analytical Forensic Toxicology**. London: Pharmaceutical Press, 2008.

JONES, G. R.; SINGER, P. P. Drugs-of-Abuse in Liver. *In*: JENKINS, A. J. (Ed.) **Drug Testing in Alternate Biological Specimens**. Painesville: Human Press, 2008. p. 139-155.

KAKAEI, H. *et al.* Separation and quantification of diazinon in water samples using liquid-phase microextraction-based effervescent tablet-assisted switchable solvent method coupled to gas chromatography-flame ionization detection. **Biomedical Chromatography**, v.37, n.3, 2023.

LAMEI, N. *et al.* Ultrasound-Assisted Switchable Solvent in Determination of Quaternary Ammonium Herbicide Paraquat in Biological, Environmental Water, and Apple Juice Samples Using Chemical Reduction Process Coupled to GC–MS Detection. **Chromatographia**, v. 81, n. 6, p. 923–930, 2018.

LASARTE-ARAGONÉS, G. *et al.* Use of switchable hydrophilicity solvents for the homogeneous liquid-liquid microextraction of triazine herbicides from environmental water samples. **Journal of Separation Science**, v. 38, n. 6, p.990–995, 2015a.

LASARTE-ARAGONÉS, G. *et al.* Use of switchable solvents in the microextraction context. **Talanta**, v. 131, p. 645–649, 2015b.

LIZOT, L. L. F. *et al.* Simultaneous Determination of Cocaine and Metabolites in Human Plasma Using Solid Phase Micro-Extraction Fiber Tips C18 and UPLC–MS/MS. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 44, p.49-56, 2019.

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

LUIZ, A.; MACIEL, E.; LANÇAS, F. Uma abordagem conceitual das técnicas miniaturizadas de preparo de amostra e suas aplicações na análise de resíduos e contaminantes em matrizes alimentares. **Scientia Chromatographica**. V.7, p.157-182, 2015.

MA W, GAO X, GUO H, CHEN W. Determination of 13 antidepressants in blood by UPLC-MS/MS with supported liquid extraction pretreatment. **Journal of Chromatography B**, v.1171, n.1, 2021.

MATA, D. C., DAVIS, J. F. Simultaneous quantitative analysis of 39 common toxicological drugs for increased efficiency in an ante- and postmortem laboratory. **Forensic Science International**, v.334, p.1-8, 2022.

MATOS, F. *et al.* Development and validation of a multi-substance method for routine analysis of pesticides in post-mortem samples by Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.245, 2024.

MERCIER, B. *et al.* Online SPE UPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of 33 psychoactive drugs from swab-collected human oral fluid samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.414, p.4203-4215, 2022.

MOHAMMADZAHERI, R. *et al.* Experimental central composite design based dispersive liquid-liquid microextraction for HPLC-DAD determination of diazinon in human urine samples: method development and validation. **Archives of Industrial, Hygiene and Toxicology**, v.71, p.48-55, 2020.

MOKHTARI, *et al.* Synthesis of Fe₃O₄-SiO₂@ZnO nanocomposite: A RSM study towards sulfasalazine photodegradation. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 161, 2024.

NOVÁK, P.; HAVLÍČEK, V. Protein Extraction and Precipitation. *In*: CIBOROWSKI, P.; SILBERRING, J. (Ed.) **Proteomic Profiling and Analytical Chemistry**. 2nded. Elsevier, 2016. p.51-62.

OENNING, A. L. *et al.* A green and low-cost method employing switchable hydrophilicity solvent for the simultaneous determination of antidepressants in human urine by gas chromatography - mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 15, n. 1143, 2020.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2021.

OLIVEIRA, K. O. *et al.* Quantitative analysis of Δ^9 -THC-COOH in human urine by the liquid-liquid extraction technique and Gas Chromatography-Mass Spectrometry: Adaptation, Optimization and Validation. **Brazilian Journal of Analytical Chemistry**, v.9, p.229-239, 2022.

PERES, M. D., NASCIMENTO, S.; PELIÇÃO, F. S. A new clean-up approach for stomach content toxicological analysis. **Forensic Science International**, v. 302, 2019.

PEROVANI, I. S. *et al.* Determination of polyfluoroalkyl substances in biological matrices by chromatography techniques: A review focused on the sample preparation techniques - Review, **Journal of Chromatography Open**, v.3, 2023.

PINHO, G.P.; NEVES, A.A.; QUEIROZ, M.E.L.R; SILVERIO, F.O. Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa, **Química Nova**, v. 32, n.4, 2009.

POKLIS, A. Analytic/Forensic Toxicology. *In*: KLAASSEN, C. D. (org.). **Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons**. 6. ed. New York: McGraw-Hill, 2001. p. 1089–1108.

POLITI, L.; GROPPi, A.; POLETTINI, A.; MONTAGNA, M. A rapid screening procedure for drugs and poisons in gastric contents by direct injection-HPLC analysis. **Forensic Science International**, v.141, n. 2–3, p. 115-120, 2004.

POLSON, C. *et al.* Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography–tandem mass spectrometry, **Journal of Chromatography B**, v.785, n. 2, p. 263-275, 2003.

PRAGST, F.; HERZLER, M.; ERXLEBEN, B. T. Systematic toxicological analysis by high-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD). **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 42, n. 11, p. 1325–1340, 2004.

PUBCHEM. EXPLORE CHEMISTRY. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 11 jun 2024.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 68–76, 2001.

SANTOS, D. M. *et al.* Matrix effect on butyltin analysis of sediments and fish tissues by GC-PFPD, **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.24, n.6, p. 998 – 1005, 2013.

SARIGUL, N.; KORKMAZ, F.; KURULTAK, İ. A New Artificial Urine Protocol to Better Imitate Human Urine, **Scientific Reports**, v.9, n.1, 2019.

SCHEID, C. *et al.* Application of Homogeneous Liquid–Liquid Microextraction with Switchable Hydrophilicity Solvents to the determination of MDMA, MDA and NBOMes in postmortem blood samples, **Journal of Analytical Toxicology**, v.46, p.776-782, 2022.

SCHÜLLER, M. *et al.* High-throughput quantification of emerging "nitazene" benzimidazole opioid analogs by microextraction and UHPLC-MS-MS. **Journal of Analytical Toxicology**, v.47, n.9, p.787-796, 2023.

SCHULZ, M. *et al.* Revisited: Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 1100 drugs and other xenobiotics. **Critical Care**, v.24, n.195, 2020.

SHAHRAKI, S.; AHMAR, H.; NEJATI-YAZDINEJAD, M. Electrochemical determination of nitrazepam by switchable solvent based liquid-liquid microextraction combined with differential pulse voltammetry. **Microchemical Journal**, v. 142, p. 229–235, 2018.

SHAHVANDI, S. K.; BANITABA, M. H.; AHMAR, H. Development of a new pH assisted homogeneous liquid-liquid microextraction by a solvent with switchable hydrophilicity: Application for GC-MS determination of methamphetamine. **Talanta**, v. 184, p. 103–108, 2018.

SHEKARI, A. *et al.* Ultrasound-assisted liquid-liquid extraction for analyzing methadone in urine samples by gas-chromatography-mass spectrometry. **International Journal of Medical Toxicology and Forensic Medicine**, v.10, n.3, p.1-11, 2020.

SHIRI, M.; SHIRI, F. An exploratory study on application of various classification models to distinguish switchable-hydrophilicity solvents based on 3D-descriptors. **Separation Science and Technology**, v. 56, n. 5, p. 961–969, 2021.

SILVEIRA, G.O., *et al.* Green sample preparations for the bioanalysis of drugs of abuse in complex matrices. **Bioanalysis**, v.11, n.4, p.295-312, 2019.

SKOPP, G. Postmortem toxicology. **Forensic Science, Medicine and Pathology**, v.6, n.4, p.314-325, 2010.

SOFALVI, S. *et al.* Development and Validation of an LC–MS-MS Method for the Detection of 40 Benzodiazepines and Three Z-Drugs in Blood and Urine by Solid-Phase Extraction. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 44, n.7, p. 708-717, 2020

SOLHI, R. *et al.* Metabolic hallmarks of liver regeneration. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v.32, n.9, p.731-745, 2021.

SOUZA, L. D. P.; AZERÊDO, G. A.; SILVA, F. A. Comportamento do concreto sob altas temperaturas via planejamento experimental fatorial com configuração estrela. **Ambiente Construído**, v.18, n.1, p.327–344, 2018.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338–350, 2006.

VANDERVEEN, J. R.; DURELLE, J.; JESSOP, P. G. Design and evaluation of switchable-hydrophilicity solvents. **Green Chemistry**, v. 16, n. 3, p. 1187–1197, 2014.

VANDERVEEN, J. R.; *et al.* Diamines as switchable-hydrophilicity solvents with improved phase behaviour. **RSC Advances**, v. 8, n. 3, p. 27318–27325, 2018.

VICENTINI, F. C. *et al.* Planejamento fatorial e superfície de resposta: otimização de um método voltamétrico para a determinação de Ag(I) empregando um eletrodo de pasta de nanotubos de carbono. **Química Nova**, v.34, n.5, p. 825-830, 2011.

WANG, X. *et al.* Development of CO₂-Mediated Switchable Hydrophilicity Solvent-Based Microextraction Combined with HPLC-UV for the Determination of Bisphenols in Foods and Drinks. **Food Analytical Methods**, v. 11, n. 8, p. 2093–2104, 2018.

WILSON, A. D.; STEWART, F. F. Structure-function study of tertiary amines as switchable polarity solvents. **RSC Advances**, v. 4, n. 22, p. 11039–11049, 2014.

XU, F. *et al.* Development of a Liquid–Liquid Microextraction Method Based on a Switchable Hydrophilicity Solvent for the Simultaneous Determination of 11 Drugs in Urine by GC–MS. **Chromatographia**, v. 81, n. 12, p. 1695–1703, 2018.

YILMAZ, E.; SOYLAK, M. Switchable solvent-based liquid phase microextraction of copper(ii): optimization and application to environmental samples. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 30, n. 7, p. 1629–1635, 2015.

ZENATI, R. A. *et al.* Evaluation of Two Simultaneous Metabolomic and Proteomic Extraction Protocols Assessed by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, 2023.

ZHANG, S. *et al.* Switchable solvent based liquid phase microextraction of trace lead and cadmium from environmental and biological samples prior to graphite furnace atomic absorption spectrometry detection. **Microchemical Journal**, v. 139, p. 380–385, 2018.

ZHANG, Z. *et al.* Combination of switchable hydrophilic solvent liquid–liquid microextraction with QuEChERS for trace determination of triazole fungicide pesticides by GC–MS. **Analytical Sciences**, v.39, n.7, p.1151-1161, 2023.

ANEXO 1

1) Disciplinas cursadas

Disciplinas cursada	Créditos	Conceito
Química Analítica Avançada – A	4	B
Métodos Analíticos de Separação – A	4	A
Calibração Multivariada em Química Analítica – A	4	A
Tópicos Especiais em Química I – Determinação Estrutural de Compostos Orgânicos – Módulo II: Espectrometria de Massas	2	A
Desenvolvimento de Métodos por HPLC: Fundamentos, Estratégias e Validação*	4	B
Seminários D1- A	1	A
Tópicos Especiais em Química II – Validação de Métodos Analíticos	4	B
Metodologia Científica e Redação Acadêmica Científica – A	4	A
Seminários D2 – A	1	A
Prática de Docência em Química	1	A
Métodos Espectroquímicos de Análise	4	A
Prática de Docência em Química (II)	1	A
Tópicos Especiais em Química I – Práticas em Divulgação Científica	2	A
Tópicos especiais em química I - Tópicos em espectrometria de massas: fundamentos e aplicações	2	A

*Disciplina cursada como aluna externa

2) Participação em cursos e congressos

Congresso: XXII Congresso Brasileiro de Toxicologia – CBTox 2022. De 25 a 28 de maio de 2022. Local: Balneário Camboriú, SC.

Congresso: XXIII Congresso Brasileiro de Toxicologia – CBTox 2024. De 15 a 18 de maio de 2024. Local: Rio de Janeiro, RJ.

Congresso: 21º Encontro Nacional de Química Analítica e 9º Congresso ibero-Americano de Química Analítica – 21ºENQA | 9ºCIAQA. De 15 a 18 de setembro de 2024. Local: Belém, PA.

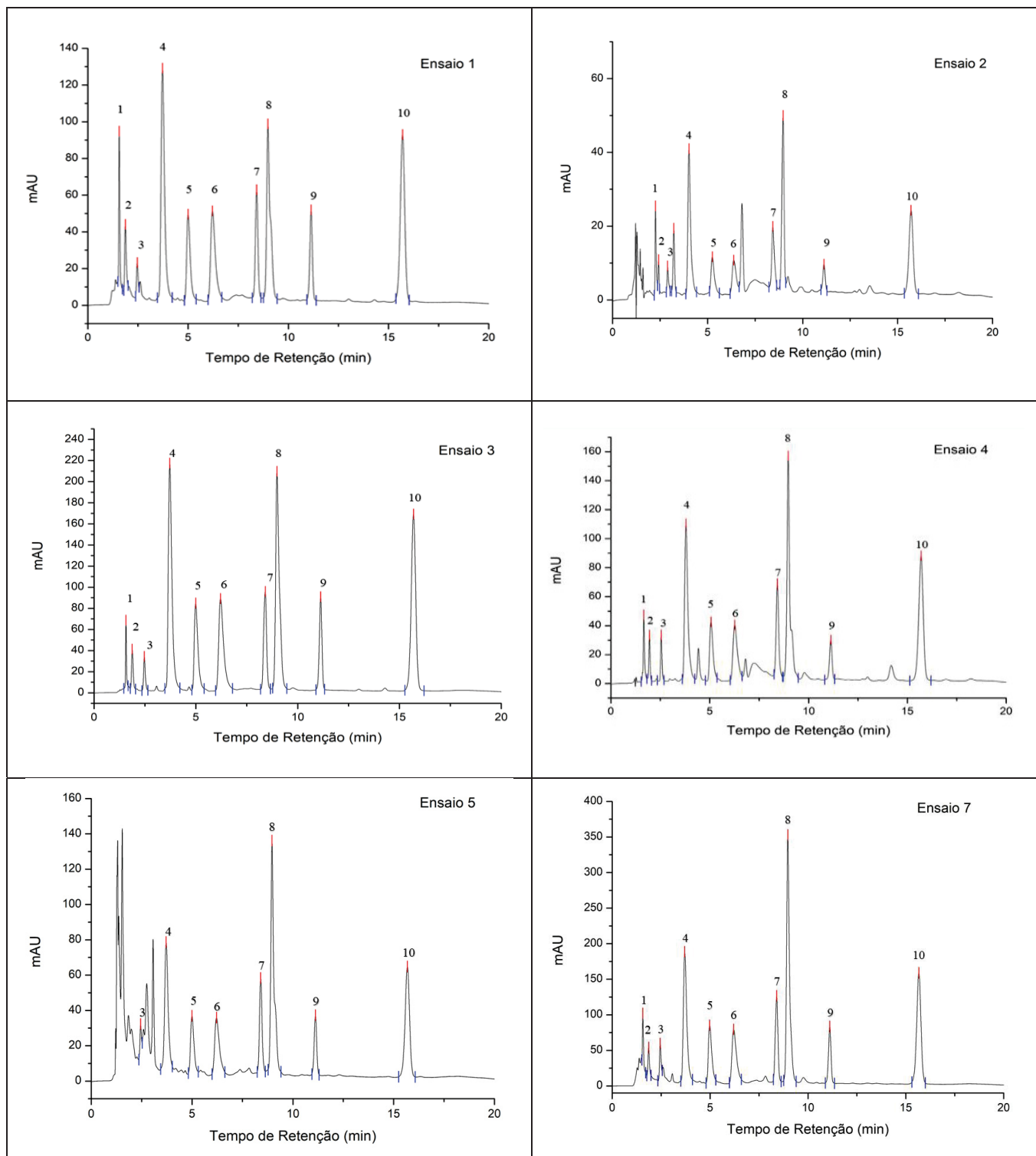
Congresso: 9º Encontro Nacional de Química Forense, 6º Encontro da Sociedade Brasileira de Ciências Forenses e 19º Congresso Regional Latino-Americano de Toxicologia Forense – ENQFor | SBCF | TIAFT. De 10 a 13 de novembro de 2024. Local: Ribeirão Preto, SP.

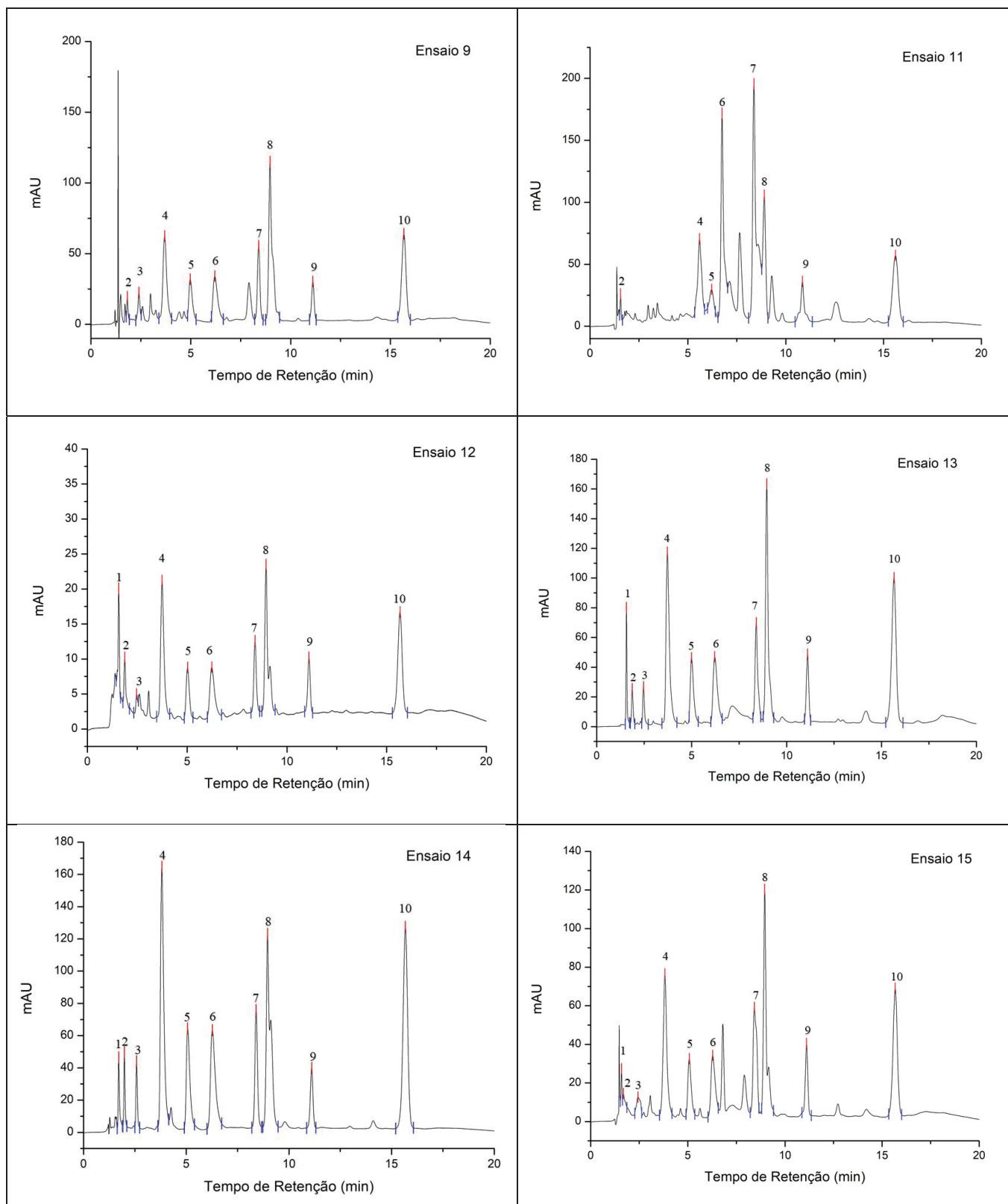
3) Produções

Artigo publicado: SCHMEISKE, CAROLINA; **DE SOUZA, DAYSE** ; DA SILVA, BRUNO . Technical Note: Optimization of the Hollow Fiber Microextraction conditions for the Determination of Pesticides in Whole Blood by GC-MS. Brazilian Journal of Analytical Chemistry, v. 11, p. 110-121, 2024.

ANEXO 2-A

Cromatogramas dos Ensaios realizados no Planejamento Fatorial Fracionário 2^{IV}₈₋₄





FONTE: A autora (2023)

ANEXO 2-B

Cromatogramas dos ensaios realizados para otimização dos parâmetros de extração utilizando planejamento fatorial 2^3 com planejamento estrela e triplicata do ponto central

