

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO
DE XENOBIÓTICOS EM IMATUROS DE INSETOS NECRÓFAGOS
POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA
DE MASSAS (LC-MS/MS)**

JÉSSICA DE AGUIAR FRANÇA
Dissertação de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. Fernando Fabríz Sodré
Co-orientador: Profa. Dra. Eloisa Dutra Caldas

Brasília - DF
2013

JÉSSICA DE AGUIAR FRANÇA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO
DE XENOBIÓTICOS EM IMATUROS DE INSETOS NECRÓFAGOS
POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA
DE MASSAS (LC-MS/MS)**

Dissertação apresentada como
requisito parcial para a obtenção do
Título de Mestre em Química Analítica
pelo Programa de Pós Graduação em
Química da Universidade de Brasília

Orientador: Prof. Dr. Fernando Fabríz Sodré
Co-orientador: Profa. Dra. Eloisa Dutra Caldas

Brasília-DF
2013



Universidade de Brasília – Instituto de Química

COMUNICADO

Comunicamos a aprovação da Defesa de Dissertação de Mestrado do (a) aluno (a) **Jéssica de Aguiar França**, matrícula nº **11/0165012**, intitulada **“Desenvolvimento de método para determinação de xenobióticos em imaturos de insetos necrófagos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS)”**, apresentada no Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB) em 13 de dezembro de 2013.

Profº Dr. Fernando Fabriz Sodré
Presidente de Banca (IQ/UnB)

Profº Dr. Jez Willian Batista Braga
Membro Titular (IQ/UnB)

Profº Dr. Adriano Otávio Maldaner
Membro Titular (INC/PF)

Profº Dr. Maurício Homem de Mello
Membro Suplente (UnB)

Em 13 de dezembro de 2013.

*“Comece fazendo o que é necessário,
depois o que é possível,
e de repente você estará fazendo o impossível.”
- São Francisco de Assis*

Agradecimentos

À minha família por tudo.

Aos professores Fernando e Eloísa pela orientação neste trabalho. Agradeço pela oportunidade, orientação e confiança.

Aos membros da Banca, pela participação e pelas contribuições ao trabalho.

Ao CNPq pela concessão de bolsa de estudos para a realização deste projeto.

À UnB e ao PPGQ.

Ao João Santos pela coleta das amostras. Ao IML, Dr Nivaldo e Dr Malthus.

Ao INCQS, à Roche e ao INC da Polícia Federal pela doação dos padrões analíticos.

À professora Rita Carvalho pela autorização do uso da Estação Experimental da Biologia para a criação dos imaturos de insetos necrófagos.

A todos os amados professores que me ajudam a trilhar meu caminho até esse mestrado, obrigada por todos os ensinamentos e pela inspiração pela carreira acadêmica.

Ao Prof. Mauricio por todo o aprendizado ao longo da iniciação científica e por ter me trazido para este laboratório onde fiz tantas amizades.

A todos os colegas do LabTox por todo apoio e aprendizado ao longo dos últimos anos e pela paciência de receberem essa criança na pós-graduação. Em especial à Érica e a Patrícia por todos os ensinamentos e por tudo que aprendemos juntas.

À Marianna pela companhia nos piores momentos e por compartilhar comigo a pergunta ainda não respondida, após todas as coletas de amostra: “porque larvas, meu Deus?”

Aos colegas da pós-graduação do IQ por dividirem comigo esta jornada.

À Silvinha pela belíssima ilustração e por tudo ao longo dos últimos dez anos. Obrigada por, mesmo que à distância, se fazer sempre presente.

À Ellen por me guiar quando dei meus primeiros passos no mundo da pesquisa científica, e por ser minha mãezona desde então.

Ao Leander, que sem querer querendo acabou sendo o responsável por eu fazer a prova do mestrado.

A todos os meus amigos por entenderem as diversas vezes que me ausentei ao longo deste mestrado e por estarem lá quando eu precisei.

Resumo

A entomotoxicologia forense advém da união da toxicologia e das ciências forenses com a entomologia, área da biologia que estuda os insetos. Em casos avançados de putrefação do cadáver, amostras de tecidos humanos para análise toxicológica não estão disponíveis, e a utilização de larvas de insetos para acessar a exposição a substâncias tóxicas pode auxiliar na elucidação da *causa mortis*. Os objetivos deste trabalho foram desenvolver e validar um método analítico para determinação de onze substâncias em larvas de insetos necrófagos e analisar amostras entomológicas coletadas pelo Instituto Médico Legal do Distrito Federal. O método desenvolvido envolveu extração sólido-líquido com purificação à baixa temperatura (ESL-PBT) e análise por LC-MS/MS. Após otimização por testes univariados e um planejamento fatorial, o método foi validado seguindo protocolos internacionalmente aceitos. Foi observado efeito significativo da matriz na resposta de todos os analitos, havendo a necessidade do uso de curva de calibração em matriz fortificada pré-extração e regressão por mínimos quadrados ponderados. Os limites de quantificação (LOQ) variaram entre 1,0 e 40 ng g⁻¹ e o coeficiente de variação nos ensaios de repetitividade, entre 2,83 e 16,9%. O método validado foi utilizado para análise de 27 amostras de larvas coletadas de cadáveres do IML-DF entre 2009 e 2012. Em 37% das amostras foi determinada pelo menos uma substância: cocaína (3 amostras), seu metabólito benzoilecgonina (4 amostras), diazepam (3 amostras), carbamazepina (1 amostra) e amitriptilina (1 amostra). Os resultados encontrados neste estudo representam as primeiras amostras entomotoxicológicas analisadas no Brasil. O método desenvolvido para este trabalho pode suprir a demanda da Polícia Civil do Distrito Federal de uma ferramenta complementar para elucidar casos de morte relacionados a intoxicações em situações onde as matrizes toxicológicas usuais não se encontram disponíveis.

Palavras chave: entomotoxicologia forense; larvas; ESL-PBT; LC-MS/MS; validação de método.

Abstract

Entomotoxicology emerges as the union of toxicology, forensic sciences and entomology, the area of biological sciences that studies the insects. When the body is in advanced putrefaction state, human tissues for toxicological analysis may not be available, and the use of insect larvae to access exposure to toxic substances may aid in the elucidation of the *causa mortis*. The aims of this study were to develop and validate an analytical method for the determination of eleven substances in necrophagous insect larvae, and to analyze entomological samples collected by the Medico-Legal Institute of the Federal District (IML-DF). The method involves a solid-liquid extraction with low temperature purification (SLE-LTP) and analysis by LC-MS/MS. Upon optimization by univariate analysis and a factorial design, the method was validated following internationally accepted protocols. Significant matrix effect was observed for all analytes, indicating the need to use calibration curves in pre-extraction spiked matrix and regression using weighted least squares. The limits of quantification (LOQ) ranged from 1,0 to 40 ng g⁻¹, with coefficient of variation determined in the repeatability assays between 2.83 and 16.9%. The validated method was used to analyze 27 larvae samples collected from corpses by the IML-DF between 2009 and 2012. At least one substance was determined in 37% of the samples analyzed: cocaine (3 samples), its metabolite benzoylecgonine (4 samples), diazepam (3 samples), carbamazepine (1 sample) and amitriptyline (1 sample). The results obtained in this study represent the first entomotoxicological samples analyzed in Brazil. The method developed can be implemented in the Civil Police of the Federal District as a complementary tool to elucidate intoxication-related deaths where usual toxicological matrices are not available.

Keywords: Forensic Entomotoxicology; larvae; SLE-LTP; LC-MS/MS; method validation.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Sucessão entomológica e ciclo de vida	3
2.2 Efeito de xenobióticos sobre o desenvolvimento das larvas	6
2.3 Metabolismo dos insetos	7
2.4 Métodos de análise em entomotoxicologia	9
2.5 Validação de métodos analíticos	13
2.6 Entomotoxicologia em casos reais	14
2.7 Analitos	19
2.7.1 Aldicarbe, aldicarbe sulfona e aldicarbe sulfóxido	21
2.7.2 Bromazepam, Clonazepam, Diazepam e Flunitrazepam	22
2.7.3 Cocaína e benzoilecgonina	25
2.7.4 Amitriptilina e carbamazepina	26
3. METODOLOGIA	30
3.1 Amostras biológicas	30
3.1.1 Desenvolvimento e validação do método	30
3.1.2 Amostras reais	30
3.2 Materiais e reagentes	31
3.3 Preparo das soluções	31
3.4 Instrumentação analítica	32
3.5 Desenvolvimento do método de extração	35
3.5.1 Otimização do método de extração	37
3.6 Validação	38
3.7 Amostras reais	41
3.7.1 Controle de qualidade interno	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1 Otimização de parâmetros instrumentais	43
4.2 Separação cromatográfica	44
4.3 LOD e LOQ do equipamento	46
4.4 Extração sólido-líquido com purificação a baixa temperatura (ESL-PBT) 46	
4.4.1 Otimização do método de extração sólido-líquido com purificação a baixa temperatura	48
4.5 Validação	56
4.5.1 Seletividade	56
4.5.2 Efeito matriz, recuperação e eficiência do processo	56
4.5.3 Linearidade	63
4.5.4 Precisão e Exatidão	67
4.5.5 Limites de quantificação e detecção	69
4.6 Análise de amostras reais	70
4.6.1 Controle de qualidade interno	74
5. CONCLUSÕES	75
REFERÊNCIAS	77
Apêndice I	87

Lista de Abreviaturas e Acrônimos

- ACN – acetonitrila
- AcOEt – acetato de etila
- ANOVA – análise de variância
- CE – energia de colisão
- CV – coeficiente de variação
- CXP – potencial de saída da célula de colisão
- DF – Distrito Federal
- DL₅₀ – dose letal 50%
- DP – *declustering potential*
- EPR – erro percentual relativo
- ESL-PBT - Extração sólido-líquido com purificação a baixa temperatura
- GABA – ácido gama-aminobutírico
- GC-ECD – cromatografia gasosa acoplada a detector de captura de elétrons
- GC-MS – cromatografia gasosa acoplada a detector de espectroscopia de massas
- GC-NPD – cromatografia gasosa acoplada a detector de nitrogênio/fósforo
- HPLC-CL – cromatografia líquida acoplada a detector de quimioluminescência
- HPLC-DAD – cromatografia líquida acoplada a detector de arranjo de diodos
- HPLC-UV – cromatografia líquida acoplada a detector UV
- IML-DF – Instituto de Medicina Legal da Polícia Civil do Distrito Federal
- INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
- IPM – intervalo *post-mortem*
- K_{ow} – coeficiente de partição octanol-água
- LC-MS – cromatografia líquida acoplada a detector de espectroscopia de massas
- LC-MS/MS – cromatografia líquida acoplada a detector de espectroscopia de massas *in tandem*
- LLE – extração líquido-líquido
- LOD – limite de detecção
- LOQ – limite de quantificação
- MAPA – Ministério da Agricultura
- MeOH – metanol
- MRM – monitoramento de reações múltiplas
- RIA – radioimunoensaio
- SLE – extração sólido-líquido
- SNC – sistema nervoso central
- SPE – extração em fase sólida
- TLC – cromatografia em camada delgada

Lista de tabelas

Tabela 1. Métodos de extração e detecção em entomotoxicologia	11
Tabela 2. Substâncias e concentrações encontradas, matriz e métodos utilizados em entomotoxicologia em casos reais.	18
Tabela 3. Informações de toxicidade aguda e/ou dose terapêutica das substâncias avaliadas neste estudo.....	28
Tabela 4. Planejamento fatorial 2 ² com ponto central para otimização da ESL-PBT.	38
Tabela 5. Concentrações da curva para avaliação da linearidade.	40
Tabela 6. Parâmetros MRM para cada analito.	43
Tabela 7. Parâmetros da fonte de íons após otimização.	44
Tabela 8. LOD e LOQ no equipamento LC-MS/MS 4000 Q-Trap (AB SCIEX) para os compostos analisados.	47
Tabela 9. Efeito do volume de solvente adicionado na recuperação.	48
Tabela 10. Resultado do planejamento fatorial 2 ² com ponto central para otimização da ESL-PBT, avaliando composição do solvente (X) e acidificação da fase extratora (Y).	50
Tabela 11. Efeito matriz encontrado após ESL-PBT e análise por LC-MS/MS com ionização por eletronebulização nos 5 níveis testados.	59
Tabela 12. Recuperação após ESL-PBT nos 5 níveis testados.	61
Tabela 13. Eficiência do processo após ESL-PBT e análise por LC-MS/MS nos 5 níveis testados.	62
Tabela 14. Teste de Cochran para homocedasticidade dos resíduos resultantes da regressão por mínimos quadrados ordinários para 5 níveis de concentração em sextuplicata.	63
Tabela 15. Regressão por mínimos quadrados ponderados.	65
Tabela 16. Razão iônica e tempo de retenção resultantes dos ensaios de linearidade e exatidão e precisão obtidos nos ensaios de repetitividade e precisão intermediária com matriz branca fortificada pré-extração.	68
Tabela 17. Valores de limite de quantificação (LOQ) do método ESL-PBT e análise por LC-MS/MS.	69
Tabela 18. Concentrações encontradas nas amostras entomológicas positivas para ao menos um analito investigado.	71

Lista de Figuras

Figura 1. Ciclo de vida de dípteras.	5
Figura 2. Casos de intoxicação por agente em 2010.	20
Figura 3. Desenlace dos casos de intoxicação em 2010.	20
Figura 4. Estrutura molecular do aldicarbe e seus dois metabólitos, aldicarbe sulfóxido e aldicarbe sulfona.	22
Figura 5. Estrutura molecular geral de benzodiazepínicos e de algumas substâncias dessa classe.....	23
Figura 6. Estrutura molecular da cocaína e benzoilecgonina.	25
Figura 7. Estrutura molecular da amitriptilina e nortriptilina.	27
Figura 8. Estrutura molecular da carbamazepina.	28
Figura 9. Esquema de preparo de soluções	32
Figura 10. Funcionamento de um espectrômetro de massas triplo quadrupolo no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM).	33
Figura 11. Fluxograma de extração sólido líquido com purificação a baixas temperaturas.	36
Figura 12. Representação gráfica do efeito matriz, recuperação e eficiência do processo.....	39
Figura 13. Gradiente de fase móvel utilizado na corrida cromatográfica.	45
Figura 14. Cromatograma MRM a 20 ng mL ⁻¹ indicando as transições de quantificação (mais intensa) e de confirmação (menos intensa) para cada analito. .	46
Figura 15. Efeito do tempo de congelamento sobre a recuperação dos analitos (concentrações de 0,5 a 5 ng mL ⁻¹ dependendo do analito).	51
Figura 16. Fluxograma do método ESL-PBT otimizado para amostras fortificadas.	53
Figura 17. Influência do coeficiente de partição octanol-água (K _{OW}) dos analitos em sua recuperação.....	55
Figura 18. Influência da solubilidade em água dos analitos em sua recuperação....	55
Figura 19. Cromatogramas MRM da matriz branca e da matriz branca fortificada...	57
Figura 20. Média do efeito matriz encontrado após ESL-PBT e análise por LC-MS/MS com ionização por eletronebulização, avaliado em 5 níveis de concentração (0,2 – 400 ng mL ⁻¹).	58
Figura 21. Correlação do coeficiente de partição octanol-água e o efeito matriz.	60
Figura 22. Correlação da massa molecular de cada analito e o efeito matriz.	60

Figura 23. Resíduos da regressão por mínimos quadrados ordinários para o aldicarbe sulfona.	63
Figura 24. Variância dos resíduos da regressão por mínimos quadrados ordinários em função da concentração para o aldicarbe sulfona.	64
Figura 25. Resíduos normalizados da regressão por mínimos quadrados ponderados (utilizando ponderação $1/x^2$) para o aldicarbe sulfona.	66
Figura 26. Causa da morte para as 22 amostras identificadas analisadas.	70
Figura 27. Exatidão para as 12 amostras de controle de qualidade extraídas junto às amostras reais.	74

1. INTRODUÇÃO

A investigação do possível envolvimento de substâncias tóxicas em casos de óbito geralmente é feita com amostras coletadas diretamente do cadáver, em especial, urina, sangue, conteúdo gástrico ou órgãos e tecidos. Entretanto, muitos casos de óbito são descobertos apenas quando o cadáver já se encontra em um estado de putrefação avançado, o que torna a presença de material para uma análise toxicológica adequada escassa ou até mesmo inexistente. Neste contexto, toda ferramenta que possibilite o levantamento de mais informações sobre as circunstâncias do óbito é importante para elucidar suas causas e auxiliar na perícia.

O uso dos insetos necrófagos para a determinação do intervalo decorrido desde a morte é uma prática antiga e bem conhecida. Porém, na década de 1980, começou-se a utilizar espécimes entomológicos também como alternativa para a análise toxicológica, uma vez que os xenobióticos encontrados nos insetos têm origem no cadáver do qual foram coletados. Esta nova ferramenta para as ciências forenses, a entomotoxicologia, é uma área recente e ainda pouco valorizada. Alguns pesquisadores questionam a utilidade dos dados toxicológicos obtidos com o uso dos insetos, entretanto, outra frente justifica que quaisquer ferramentas que ampliem o arsenal analítico disponível para a perícia devem ser levadas em consideração. Em alguns casos, os insetos são a única matriz disponível no cadáver, tornando possível a execução de uma análise toxicológica, que auxilia na investigação das circunstâncias que envolveram o óbito.

Algumas vantagens técnicas do uso de espécimes entomológicos em detrimento do uso de tecidos em putrefação incluem a facilidade de coleta dos insetos, a disponibilidade destas matrizes por um período de tempo maior em relação aos tecidos humanos e a menor quantidade de substâncias interferentes, resultando em menos interferências durante a análise. Grande parte dos casos de análise toxicológica de amostras entomológicas relatados na literatura faz uso de métodos adaptados dos utilizados em tecidos humanos, geralmente em circunstâncias não de desenvolvimento analítico, mas de necessidade imediata de análise da amostra de um caso específico. Poucos métodos validados para análise de diferentes substâncias em matrizes entomológicas foram publicados, e não há, até hoje, um método multiclases que permita uma análise toxicológica sistemática como as realizadas com os tecidos humanos.

Não há relato de análise toxicológica de amostras entomológicas no contexto forense no Brasil. Este estudo buscou suprir uma demanda da Polícia Civil do Distrito Federal por ferramentas a serem usadas na investigação de óbitos onde o cadáver se encontra em avançado estado de putrefação, e matrizes utilizadas normalmente, como tecidos e fluidos biológicos, não estão disponíveis.

O objetivo foi desenvolver um método analítico para determinação de aldicarbe, seus metabólitos, cocaína e metabólito, benzodiazepínicos, amitriptilina e carbamazepina em imaturos de insetos necrófagos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas *in tandem* (LC-MS/MS).

Os objetivos específicos incluem

- Estabelecer os parâmetros instrumentais para determinação dos analitos por LC-MS/MS;
- Desenvolver um método eficiente de extração e *clean-up* dos analitos da matriz;
- Validar o método desenvolvido;
- Analisar amostras de larvas coletadas de cadáveres em putrefação por técnicos no IML-DF.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A escolha das amostras levadas à análise na investigação de casos forenses depende dos tecidos disponíveis e estado de putrefação do cadáver. Além de tecidos, podem ser analisadas amostras sangue, urina, bile, humor vítreo, osso, medula óssea, derrame pleural, cabelos ou unhas. As amostras *post-mortem* em geral apresentam alterações devido à demora na coleta ou tempo de armazenamento excessivo antes da análise, levando à liquefação dos tecidos, e à presença de substâncias endógenas que podem interferir na análise.^{1,2}

A entomotoxicologia é um ramo relativamente recente da entomologia forense, e surge da união da entomologia, ramo da biologia que estuda os insetos, com a toxicologia e as ciências forenses.³ As duas grandes áreas de interesse dessa ciência são (1) a avaliação do efeito biológico de xenobióticos (compostos químicos estranhos ao organismo) sobre o desenvolvimento dos artrópodes e (2) a aplicação de análises toxicológicas para identificação de substâncias em insetos necrófagos.⁴ Embora o termo só tenha sido cunhado em 1994,⁵ os primeiros trabalhos na área foram publicados na segunda metade da década de 1970, quando Sohal e Lamb^{6,7} demonstraram o acúmulo de cobre, zinco, cálcio e ferro na mosca *Musca domestica* sem efeitos toxicológicos deletérios ao inseto. Esses estudos relataram a presença na mosca de possíveis mecanismos fisiológicos de eliminação destes metais em concentrações relativamente altas quando comparadas às concentrações tóxicas para mamíferos.

A maior limitação da entomotoxicologia atualmente é a interpretação dos resultados.⁴ Não existe uma correlação clara entre a concentração do xenobiótico nos insetos e aquela encontrada no cadáver, o que limita uma conclusão do seu envolvimento direto no óbito do indivíduo.⁸ É importante ressaltar, porém, que todas as matrizes disponíveis para análise devem ser levadas em consideração durante a investigação, mesmo que se agregue apenas informação qualitativa.²

2.1 Sucessão entomológica e ciclo de vida

Dependendo das condições ambientais e da acessibilidade ao corpo, insetos necrófagos podem começar a colonização do cadáver logo após a morte, especialmente em climas tropicais.^{9,10} Os invertebrados encontrados em um cadáver

podem ser classificados em quatro categorias ecológicas, sendo as duas primeiras as de maior interesse para a entomologia forense.^{11,12}

- (1) Espécies necrófagas – se alimentam diretamente do cadáver;
- (2) Predadores e parasitas das espécies necrófagas;
- (3) Espécies onívoras – se alimentam tanto do cadáver como das espécies que o colonizam;
- (4) Espécies acidentais – usam o cadáver como extensão do ambiente;

Os primeiros insetos a colonizarem um cadáver são usualmente dípteras (moscas) das famílias Calliphoridae, Muscidae e Sarcophagidae. Embora seja reconhecido um padrão de colonização por diferentes espécies, este é um sistema biológico complexo e não há consenso na divisão das diferentes fases de sucessão.¹¹ Estas espécies incluem dípteras das famílias Fanniidae, Piophilidae e Phoridae, e de coleópteras (besouros) das famílias Silphidae, Histeridae, Cleridae, Dermestidae e Tenebrionidae.¹³

As dípteras podem percorrer até 20 quilômetros por dia em busca de uma fonte de alimento adequada, e localizam o cadáver pelo odor dos gases liberados no processo de autólise e putrefação.^{3,9,11,14} Moscas adultas atraídas até o cadáver podem fazer a deposição de ovos imediatamente ou se alimentar dos fluidos do cadáver antes desse processo, que se inicia nas aberturas naturais ou lesões expostas no cadáver.^{10,12} Grandes aglomerações de milhares de ovos chegam a cobrir as cavidades do cadáver durante épocas mais quentes do ano.¹⁰ Após aproximadamente 24 horas, os ovos eclodem, dando origem a pequenas larvas imaturas que se alimentam dos tecidos no interior do cadáver, onde se protegem de predadores e da dessecação.³

Estas larvas são organismos pequenos e alongados que possuem um par de ganchos em uma das extremidades, utilizados para locomoção e alimentação, e um par de espiráculos para a respiração na outra extremidade.¹⁰ Enquanto se alimentam e amadurecem, as larvas passam por três estágios (ínstars), trocando de cutícula para permitir o crescimento.⁹ Quando as larvas de terceiro ínstar cessam a alimentação, elas entram no estado de pré-pupa, marcado por uma diminuição do comprimento e migração para longe da fonte de alimento.¹⁵ As pré-pupas procuram um abrigo adequado para empuparem, processo no qual diminuem seu comprimento, se alargam, enrijecem e escurecem, se tornando pupas envolvidas

pelo pupário (casulo), uma camada protetora externa composta pela cutícula enrijecida da larva de terceiro ínstar.^{3,9} Após o processo de metamorfose, a mosca adulta emerge, deixando o casulo. Este processo, ilustrado na Figura 1, é representativo para moscas das famílias Calliphoridae e Muscidae. Uma diferença marcante para moscas da família Sarcophagidae é que a fêmea adulta deposita larvas do primeiro ínstar no cadáver, e não ovos, gerando uma prole consideravelmente menor.¹⁰

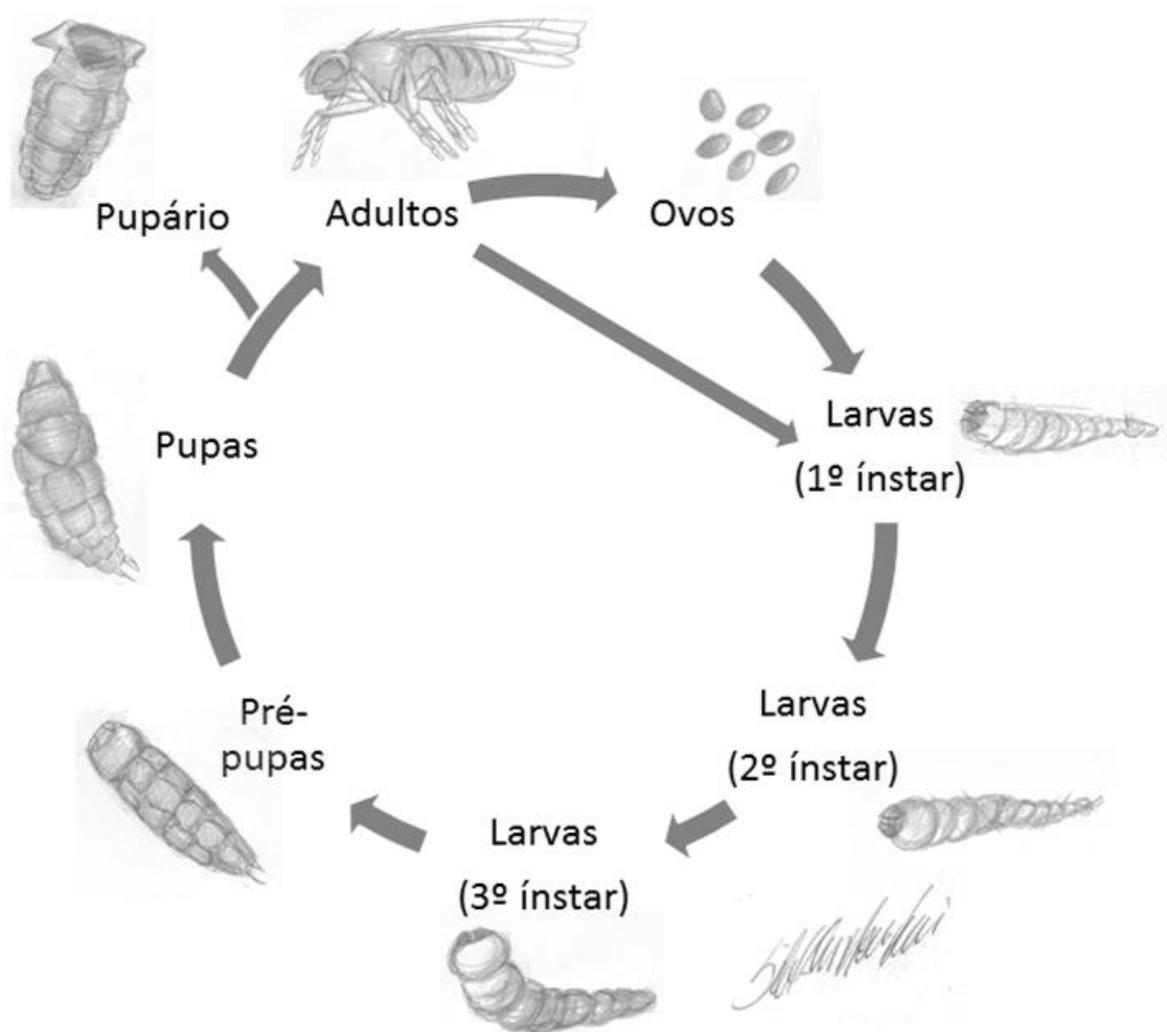


Figura 1. Ciclo de vida de dípteras.

O estudo da taxa de desenvolvimento dos insetos e do padrão de sucessão das espécies colonizadoras permite auxiliar o estabelecimento do chamado intervalo *post-mortem* (IPM), normalmente expresso como o período mínimo de tempo necessário para os insetos coletados chegarem ao estado de

desenvolvimento no qual se encontravam quando descobertos.³ Para tanto, é necessária a coleta e identificação das espécies encontradas no cadáver, a avaliação da temperatura da cena do crime e a modelagem da taxa de desenvolvimento dos imaturos de insetos encontrados no corpo.⁹ Embora os entomologistas ajustem os cálculos da estimativa do IPM com base na região geográfica, estação do ano e temperaturas locais, outros fatores normalmente não são considerados, como a presença de xenobióticos que podem afetar a taxa de crescimento das larvas quando presentes no alimento durante o desenvolvimento destes insetos.³

Além de auxiliar na estimativa do IPM, os insetos podem servir de matriz para análise toxicológica uma vez que permanecem no cadáver durante as etapas de putrefação tardia, quando o cadáver já se encontra seco e sem tecidos adequados para análises.

2.2 Efeito de xenobióticos sobre o desenvolvimento das larvas

Desde o início da década de 1990, diversos grupos têm estudado o efeito da presença de xenobióticos no desenvolvimento de diferentes espécies de insetos com interesse forense. Estudos mostram que substâncias como a metanfetamina e anfetamina¹⁶ e a fenciclidina¹⁷ aceleram o desenvolvimento de *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera: Sargophagidae), enquanto a presença de cádmio¹⁸ e amitriptilina e seu metabólito nortriptilina¹⁹ retardam o crescimento de *Lucilia sericata* e *P. ruficornis*, respectivamente. Algumas substâncias, entretanto, parecem não afetar significativamente o desenvolvimento larval, como o paracetamol em *Calliphora vicina*²⁰ e a hidrocortisona e o metoexital sódico, que retardaram o desenvolvimento larval mas aceleraram o desenvolvimento da pupa, não apresentando efeito significativo no tempo total do desenvolvimento de *Sarcophaga tibialis*.²¹

Oliveira *et al.*²² estudaram o efeito do Buscopan® (butilbrometo de escopolamina) sobre o desenvolvimento de *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae), criando os insetos em carne contaminada com o medicamento em concentrações de 0,25 a 2 vezes a dose letal para ratos. A presença do medicamento aumentou a mortalidade em todas as doses, principalmente no estágio larval. As larvas criadas na concentração equivalente à dose letal para ratos levaram

54 horas a mais para começar a empupar quando comparadas ao controle (96 horas), sugerindo que a presença do medicamento possa causar erro na estimativa do IPM quando grandes quantidades do medicamento forem ingeridas antes do óbito. O diazepam acelerou a taxa de desenvolvimento de larvas de *Chrysomia albiceps* e *C. putoria*, comprometendo a estimativa do IPM com erro de 18 a 54 horas.²³ A presença do diazepam, entretanto, não afetou a taxa de mortalidade de larvas e pupas, nem a taxa de adultos não emergentes.

Goff *et al.*¹⁵ reportaram que a presença de heroína resultou na aceleração do desenvolvimento larval de *Boettcheris caperegrina*, e retardou o desenvolvimento de larvas de *Lucilia sericata* de maneira dose-dependente²⁴. George *et al.*²⁵ não encontraram nenhum efeito da heroína no desenvolvimento de *Calliphora stygia*. Em outro estudo,² a presença de codeína em altas concentrações na dieta acelerou o desenvolvimento de larvas de *L. sericata*. Estes estudos demonstram a impossibilidade de se extrapolar dados de um estudo entomotoxicológico realizado em uma espécie para o ajuste do IPM calculado com base em outra espécie, e que uma mesma espécie pode reagir de maneira oposta a duas substâncias similares.

Liu *et al.* avaliaram o efeito do pesticida malation sobre o desenvolvimento de *C. megacephala* criadas em músculo e fígado de coelhos tratados com doses de 0,5 a 1,5 vezes a dose letal.²⁶ Larvas expostas apresentaram comprimento máximo menor, que é atingido mais tardiamente quando comparadas ao controle, e as pupas se mostraram menores e mais leves, o que poderia acarretar em um erro na estimativa do IPM de até 36 horas.²⁶ Um outro estudo do mesmo grupo demonstrou maior comprimento de larvas de diversas espécies de insetos que colonizaram carcaça de coelho infectado com malation.²⁷ Adicionalmente, o número de espécies encontradas foi menor, e houve um atraso no aparecimento de coleópteros comparado ao grupo controle, em um efeito dose-dependente.²⁷ Esses resultados estão de acordo com as observações de Gunatilake e Goff²⁸ e de Rashid *et al.*²⁹

2.3 Metabolismo dos insetos

Quando a taxa de absorção de uma substância pela larva é maior que sua taxa de eliminação, como ocorre durante o fim do desenvolvimento larval, a substância é acumulada nos tecidos dos insetos, possibilitando sua detecção por

meio de métodos analíticos. Nem todos os analitos são encontrados em larvas expostas, já que elas são capazes de eliminar substâncias de maneira eficiente por mecanismos existentes ou após a indução de novas vias metabólicas na presença de xenobióticos.³⁰

O acúmulo de substâncias nas larvas depende da espécie do inseto e da estrutura química do xenobiótico, o que dificulta extrapolar a quantidade da substância presente na larva para a concentração no corpo nos casos de óbito.³¹ Essa falta de correlação se deve em parte ao movimento não completamente compreendido das larvas durante o seu desenvolvimento, que faz com que as larvas se exponham a diferentes concentrações da mesma substância ao longo do desenvolvimento ao se alimentarem de diferentes regiões do cadáver.³

Substâncias lipofílicas, como a metadona, são acumuladas no tecido adiposo das larvas ou biotransformadas antes de voltarem a hemolinfa (análoga ao sangue de vertebrados) e serem excretadas por uma estrutura denominada túbulos de Malpighi.³³ Substâncias hidrossolúveis, como o paracetamol,³⁴ são normalmente transportadas para a hemolinfa e excretadas nos túbulos de Malpighi diretamente.³⁵ A eficiência destes sistemas de eliminação nas larvas pode variar de uma substância para a outra, resultando então em acúmulo de algumas substâncias e eliminação de outras. As substâncias normalmente detectadas nas larvas são lipossolúveis e com estrutura química complexa.³²

Larvas de Calliphoridae mostram uma forte tolerância a algumas substâncias, podendo se alimentar de tecidos contendo concentrações letais para humanos. Esta tolerância pode ser devido à regulação de enzimas responsáveis pela degradação destas substâncias, ou por indução do próprio metabolismo larval, que ainda é pouco compreendido.³⁶ O efeito biológico distinto apresentado pela mesma substância quando ingerida por diferentes espécies de moscas pode ser explicado em parte por possíveis diferenças no metabolismo.³⁷ Fatores ambientais como temperatura, umidade e índice de radiação UV afetam a motilidade intestinal das larvas, a absorção e a excreção das substâncias, podendo influenciar nas concentrações encontradas nas larvas.⁴

A morfina é excretada da hemolinfa de *Calliphora vomitoria* por meio de células epidérmicas e depositada em canais na matriz cuticular, podendo resultar na sua incorporação ao pupário durante o estágio de pupa.³⁵ Pien *et al.*³⁸ detectaram

oxazepam em larvas de Calliphoridae criadas na presença exclusiva de nordiazepam, indicando que as larvas tem capacidade de metabolizar o nordiazepam, e bioacumular seu metabólito.

O pH da secreção de algumas espécies de larvas, como *L. sericata* e *C. vicina*, é básico (pH de 8 a 9),³⁹ alcalinizando o ambiente de desenvolvimento larval, o que pode levar à hidrólise de substâncias como o metilfenidato. Bushby *et al.*³⁶ detectaram metilfenidato em larvas de Calliphoridae, indicando que os insetos podem servir de reservatório para substâncias que sofreriam hidrólise no tecido em putrefação (básico) e portanto, não seriam encontradas nas análises toxicológicas com matrizes usuais.

Devido à imprevisibilidade do acúmulo de substâncias ao longo do desenvolvimento das moscas e seus efeitos na taxa de desenvolvimento desses insetos, os dados entomológicos de estimativa do IPM em casos forenses devem ser ajustados em função da acumulação e do metabolismo das diferentes substâncias envolvidas no caso.²⁹ Por outro lado, a ausência de uma substância na larva não necessariamente indica que o indivíduo não foi exposto a ela, uma vez que a mesma pode ter sido excretada, impossibilitando sua detecção.³¹

2.4 Métodos de análise em entomotoxicologia

O preparo de amostras entomológicas e sua extração seguem procedimentos similares aos utilizados para tecidos humanos, com a vantagem das amostras serem de fácil coleta, não estarem associadas à formação de emulsão e apresentarem menor quantidade de substâncias endógenas que podem interferir na análise.^{14,40} Normalmente, os métodos em larvas são adaptações daqueles existentes para material biológico humano, apresentando em geral, maior sensibilidade quando comparado ao uso de tecidos putrefatos.⁴

Antes da extração dos analitos, as amostras passam por uma etapa de preparo, que se inicia com a lavagem com água morna ou a temperatura ambiente, visando eliminar a contaminação superficial por restos oriundos do cadáver.^{2,32,33,41-}

⁴³ Após a etapa de lavagem, as larvas são secas em papel e mortas por congelamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ^{26,30,38,43,44} ou água fervente,^{27,45} embora haja relatos de morte antes da etapa de lavagem.⁴⁶ Em seguida, as larvas podem ser homogeneizadas

puras,^{45,47} com água destilada,^{30,34,42,48} solução de cloreto de sódio 9%,² solução tampão borato pH 9,²³ tampão fosfato²⁹ ou sulfato de sódio anidro,^{26,27} em proporções que vão de 1:1^{26,27,42} até 1:10.²⁹ Normalmente é utilizado homogeneizador de tecidos, porém o uso de gral e pistilo após congelamento com nitrogênio líquido também é reportado.⁴⁷

A Tabela 1 mostra os principais parâmetros dos métodos analíticos reportados na literatura. Um número limitado de substâncias foi investigado em entomotoxicologia, principalmente substâncias psicoativas. Grande parte dos trabalhos avalia a presença de xenobióticos apenas em larvas, com relatos de investigações em pupas, pré-pupas, pupários, adultos, exúvias (restos de exoesqueleto) e fezes de artrópodes. Os métodos de extração normalmente utilizados incluem extração líquido-líquido (LLE, *liquid-liquid extraction*), extração sólido líquido (SLE, *solid-liquid extraction*) e extração em fase sólida (SPE, *solid phase extraction*). Normalmente, esses métodos possuem várias etapas, sendo demorados e dispendiosos. A análise é feita usualmente por radioimunoensaio, cromatografia gasosa acoplada a detector de nitrogênio/fósforo (GC-NPD, *gas chromatography – nitrogen-phosphorus detector*), detector de captura de elétrons (GC-ECD, *electron capture detector*) ou espectroscopia de massas (GC-MS, *mass spectrometry*) ou cromatografia líquida acoplada a detector UV (HPLC-UV), detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD, *diode array detector*), detector de quimioluminescência (HPLC-CL, *chemiluminescence*), espectroscopia de massas (LC-MS) ou espectroscopia de massa *in tandem* (LC-MS/MS). As concentrações encontradas variam da faixa de nanograma a miligrama por grama de larva ou nanograma a micrograma por mililitro do homogenato larval.

Tabela 1. Métodos de extração e detecção em entomotoxicologia.

Substância	Matriz (Quantidade)	Extração	Deteção	LOD	Ref.
Fenobarbital	Larva (10 g)	LLE	GC-MS e TLC	NI	49
Malation	Larva (0,28 g)	NI	GC-NPD	NI	28
Morfina	Larva (2 g)	---	RIA	NI	42
Bromazepam e levomepromazina	Larva (NI)	LLE	HPLC-UV	NI	41
Triazolam, oxazepam, fenobarbital, alimemazina e clomipramina	Larva (NI)	LLE	HPLC-UV	NI	14
Morfina e fenobarbital	Larva (NI)	LLE	GC-NPD ou HPLC-UV	NI	50
Cocaína	Fezes de besouro (3-4 g)	SPE	GC-MS	3 µg g ⁻¹	51
Cocaína e benzoilecgonina	Larva (0,5 g)	LLE	GC-NPD ou GC-MS	NI	52
Nortriptilina	Larva (2 g)	LLE	GC-MS	NI	53
Amitriptilina, nortriptilina, propoxifeno e paracetamol	Larva (NI)	SLE ou SPE	HPLC-UV ou GC-NPD	NI	32
Morfina e codeína	Larva (NI)	LLE	GC-MS	NI	54
Amitriptilina	Pupário, exúvia e fezes (80-200 mg)	SPE ou LLE	GC-MS	NI	10
Nortriptilina	Pupário	LLE ou SPE			
Amitriptilina, Temazepam, trazodona e trimipramina	Larva e pupa (5 g)	LLE	GC-MS ou HPLC-UV	10 ng g ⁻¹	30
Amitriptilina	Larva e pupa (2,5-5 g)	LLE ou SPE	HPLC-UV ou GC-MS	1 ng g ⁻¹	48
Nortriptilina	Larva (5 g)	LLE	HPLC-UV		
Ácido acetilsalicílico, paracetamol, amobarbital, fenobarbital, salicilato, aminohipurato, anfetamina, tiopental, barbital, bralobarbital	Larva (1-5 g)	LLE ou SPE	HPLC-UV	0,02-1 mg L ^{-1a}	34
Morfina	Larva (10)	---	RIA	1 ng mL ^{-1 b}	13,37,55
Morfina	Larva, pupa, pupários e adulto (NI)	---	RIA	NI	46
Secobarbital	Larva (2 g)	SPE	GC-NPD	NI	56

Tabela 1. Continuação

Substância	Matriz (Quantidade)	Extração	Deteção	LOD	Ref.
Diazepam	Larva, pupários e adulto (1 g)	LLE	GC-MS	NI	23
Alprazolam, clonazepam, diazepam, flunitrazepam, lorazepam, nordiazepam, oxazepam, prazepam, temazepam e triazolam	Larva ou pupa (1)	LLE	LC-MS/MS	1,88 a 19,03 ng g ⁻¹	43
Paration	Larva, pupa, pupário e Adulto (NI)	LLE	HPLC-DAD	NI	57
Morfina, benzoilecgonina, fenobarbital, tioridazina, clomipramina, amitriptilina, nortriptilina e levomepromazina	Larva (0,2 g)	SPE ou LLE	GC-MS	NI	58
Morfina	Larva (0,5 g)	SLE	LC-CL	NI	44
Propoxur	Larva, pupa e adulto (até 0,2 g)	LLE	HPLC-DAD	NI	59
Anfetamina	Larva (NI)	SPE	GC-MS	NI	40
Codeína, norcodeína e morfina	Larva, pupa e adulto (0,5 g)	LLE	LC-MS	1 a 3 ng g ⁻¹	2
Malation	Larva, pupa e adulto (0,5 g)	SPE	GC-ECD	NI	29
Malation	Larva (10 g)	SLE, LLE e SPE	GC-MS	0,1 µg mL ⁻¹	26
Malation	Larva (5 g)	SLE, LLE e SPE	GC-MS	NI	27
Metadona e EDDP	Larva (1)	LLE	LC-MS/MS	NI	33
Metadona	Pupa (1)	LLE	UPLC-MS/MS	2 ng g ⁻¹	60
Tramadol	Larva (NI)	LLE	HPLC-UV	NI	45
Malation	Larva, pré-pupa, pupa e adulto (1 g)	LLE	GC-MS	NI	61
Metilfenidato	Larva (0,5 mL)	LLE	LC-MS/MS	24 ng mL ⁻¹	36

NI: não informado; LLE: extração líquido-líquido; SLE: Extração sólido-líquido; SPE: Extração em fase sólida; ^apor volume de homogenato larval; ^bReferente ao volume do extrato levado para análise por RIA

Grande parte dos estudos publicados tem enfoque biológico, demonstrando pouca preocupação com os parâmetros analíticos. Poucos reportaram o limite de detecção (LOD), e só alguns validaram o método utilizado.^{2,26,33,36,43,60,61}

2.5 Validação de métodos analíticos

A validação de métodos analíticos é importante para estabelecer o desempenho do método desenvolvido e demonstrar que os resultados obtidos são confiáveis e reprodutíveis. No contexto forense, o uso de métodos não validados pode acarretar em contestamentos na corte ou erros nos julgamentos. Em geral, para a validação de métodos bioanalíticos quantitativos é necessário avaliar os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade (modelo de calibração), estabilidade, exatidão, precisão (repetitividade e precisão intermediária) e limite de quantificação (LOQ).⁶²

A seletividade é a habilidade de um método analítico de identificar e medir inequivocamente um analito na presença de outros componentes, como metabólitos, impurezas ou componentes da matriz. A faixa de linearidade mede o intervalo de concentração do analito que gera uma resposta linear, possibilitando a quantificação do analito através da adequação de uma equação de reta aos dados experimentais. Nessa etapa, é importante avaliar a homocedasticidade ou heterocedasticidade dos resíduos associados a regressão e optar por uma regressão por mínimos quadrados ordinária ou ponderada de maneira a melhor adequar o modelo aos dados. A estabilidade química dos analitos em uma dada matriz sob diferentes condições e intervalos de tempo deve ser analisada durante os testes de estabilidade. A exatidão é avaliada pela diferença entre o valor experimental e o valor esperado na amostra fortificada, normalmente expressada como o desvio percentual em relação ao valor esperado. A precisão mede o grau de concordância de várias medições de amostras na mesma concentração em termos do desvio padrão relativo, e pode ser avaliada em três níveis: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade.⁶²

Outros parâmetros relevantes incluem o limite de detecção (LOD), a recuperação e a robustez. O LOD representa a menor concentração do analito que

pode ser encontrada pelo método, sem necessariamente ser possível sua quantificação. A recuperação avalia a porcentagem da substância adicionada na amostra que é extraída e passível de ser quantificada. A robustez mede a susceptibilidade do método a pequenas mudanças que possam ocorrer durante a análise de rotina, sendo também avaliada durante as etapas de desenvolvimento e otimização do método. O estudo do efeito matriz avalia a supressão ou aumento do sinal analítico devido a presença de componentes da matriz.⁶²

Estudos com validação de métodos em entomotoxicologia surgiram apenas na última década. Wood *et al.*⁴³ desenvolveram e validaram um método para determinação de 10 benzodiazepínicos em larvas e pupários de *C. vicina* por LC-MS/MS, avaliando a recuperação, efeito matriz, linearidade, LOD, LOQ, repetitividade e precisão intermediária. Outros estudos que incluíram a validação completa foram o conduzido por Karbouche *et al.*² para determinação de codeína por LC-MS, Liu *et al.*²⁶ e Mahat *et al.*⁶¹ para determinação de malation por GC-MS, Gosselin *et al.*^{33,60} para metadona por LC-MS/MS e Bushby *et al.*³⁶ para metilfenidato por LC-MS/MS.

2.6 Entomotoxicologia em casos reais

Nuorteva⁶³ utilizou dados de bioacumulação do mercúrio em moscas para identificar que, em função da baixa concentração de mercúrio encontrada, o cadáver era oriundo de uma área relativamente livre de poluição, constituindo a primeira aplicação da entomotoxicologia em um caso real.

Beyer *et al.* relataram o primeiro caso de identificação de um medicamento (fenobarbital) utilizando larvas de *Cochliomyia macellaria*, em um caso com forte indício de intoxicação.⁴⁹ A análise permitiu a identificação da presença de fenobarbital em uma concentração de 100 µg g⁻¹ (na larva) por GC (detector não informado) e posterior confirmação por cromatografia em camada delgada (TLC, *thin layer chromatography*) e GC-MS.

Gunatilake e Goff relataram a investigação de um caso de intoxicação por meio da determinação do pesticida malation em larvas de *C. megacephala* e *C. rufifacies* por cromatografia gasosa acoplada a detector de nitrogênio e fósforo (GC-

NPD).²⁸ Além das larvas, malation foi encontrado também na gordura (17 mg kg⁻¹) e detectado no conteúdo gástrico, porém nada foi encontrado em sangue e urina. Os autores estimaram um IPM, porém ressaltaram que esta estimativa foi limitada pela falta de informação na época sobre o impacto do malation sobre o desenvolvimento e o padrão de sucessão dos insetos no cadáver.

Kintz *et al.*¹⁴ analisaram amostras de tecidos e de larvas de um cadáver encontrado aproximadamente dois meses após o óbito. Foram detectados benzodiazepínicos (triazolam e oxazepam), barbitúrico (fenobarbital) e antidepressivos tricíclicos (alimemazina e clomipramina) por HPLC-UV em todas as amostras analisadas, com exceção do triazolam, que não foi detectado nas amostras de baço e rim. Em outro caso, foi coletado material cerebral e de clavícula, e larvas de *Piophilina casei* (Piophilidae) de um cadáver encontrado 6 meses após o óbito.⁴¹ Análise por HPLC-UV mostrou a presença de bromazepam e levomepromazina, sendo que essa apresentou concentração maior na larva quando comparada a encontrada na clavícula. Nenhum dos estudos foi capaz de determinar uma correlação quantitativa entre a quantidade de medicamento encontrada na larva com a encontrada nos outros tecidos analisados.

Em um terceiro estudo publicado pelo grupo de Kintz,⁵⁰ amostras de tecidos e larvas de Calliphoridae coletadas de um cadáver oito dias após o óbito foram analisadas por imunoensaio, indicando a presença de morfina, confirmada por HPLC-UV, e de fenobarbital, confirmada por GC-NPD, em todas as amostras analisadas. As concentrações nas larvas foram inferiores as encontradas nos outros tecidos, com exceção do cérebro. Em outro estudo, foram coletadas larvas de Calliphoridae, sangue e bile de um cadáver de um usuário de heroína morto havia dez dias.⁵⁴ Análise por GC-MS confirmou a presença de morfina e codeína, em concentrações maiores na bile e no sangue quando comparadas a concentração nas larvas.

Manhoff *et al.* analisaram cocaína por GC-MS em amostras de 77 casos forenses (fluidos cadavéricos, músculos e outras matrizes), encontrando 22 casos positivos.⁵¹ Em um caso, a análise foi possível apenas em fezes de besouro associadas a tecido mumificado, enquanto em outro, a presença nas larvas serviu apenas de confirmação após a análise de tecidos humanos. Em outro estudo,

cocaína foi identificada em larvas de *Calliphora vicina* (Calliphoridae) coletadas mortas em um cadáver mumificado encontrado 5 meses após o óbito.⁵² A análise, feita primeiramente por radioimunoensaio, foi confirmada por GC-MS e a cocaína quantificada por GC-NPD. A cocaína não foi detectada nas mesmas amostras analisadas 14 meses depois, porém a análise por GC-MS revelou a presença de seu metabólito, benzoilecgonina.

Miller *et al.*¹⁰ investigaram por GC-MS a presença de amitriptilina e seu metabólito nortriptilina em amostras de cérebro, conteúdo estomacal, pupário de moscas, exúvia e fezes de besouro coletadas de restos mumificados. A amitriptilina foi encontrada em todas as amostras analisadas, enquanto a nortriptilina foi encontrada apenas no pupário e nos tecidos humanos, em concentrações de 2 a 15 vezes menor que a de amitriptilina, padrão característico de overdose de amitriptilina. Estes resultados demonstram o uso de restos de insetos na investigação do óbito na ausência de outras matrizes. Em outro estudo, nortriptilina foi quantificada em músculo e larvas e qualitativamente detectada por GC-MS em amostras de cabelo, osso e pele associados a um corpo.⁵³ As análises foram feitas com 23 a 150 mg de amostra, garantindo que fosse possível identificar a substância mesmo frente a casos com baixa disponibilidade de amostras, como ocorre muitas vezes no âmbito forense.

Levine *et al.*⁵⁶ coletaram amostras do músculo da panturrilha, único tecido disponível para análise, e larvas de um corpo decomposto e esqueletonizado encontrado próximo a um frasco vazio de secobarbital, um sedativo. Análise por GC-NPD e confirmação por GC-MS revelou presença do medicamento apenas na larva, indicando um possível suicídio por overdose, quando não haveria tempo suficiente para sua distribuição até o músculo.

Amostras de duas espécies de larva das famílias Calliphoridae e Sarcophagidae, sangue, fígado e rim, coletadas em um cadáver aproximadamente três semanas após o óbito, foram analisadas por GC-MS.⁴⁰ Os resultados foram positivos para anfetamina nos tecidos e larvas, mas a quantificação não foi possível na amostra de larvas.

Tracqui *et al.*⁸ analisaram larvas coletadas de 29 corpos ao longo de 15 anos cujas mortes foram associadas a medicamentos. Foram detectadas 26

substâncias diferentes, com vários casos de detecção de mais de uma substância na mesma amostra. Todas as substâncias identificadas nas larvas também foram identificadas em tecidos dos cadáveres associados, geralmente em concentrações menores, porém sem correlação quantitativa.

Campobasso *et al.*,⁵⁸ utilizando GC-MS, encontraram fenobarbital em maior concentração em larvas na etapa pós-alimentação que em larvas que ainda se alimentavam do cadáver, sugerindo bioacumulação da substância. Em ambas as amostras, a concentração foi inferior à encontrada no fígado. Os autores criaram larvas de *L. sericata* em fígados de 17 outros casos, encontrando nas larvas todas as substâncias detectadas nas amostras humanas analisadas (sangue, urina, bile e fígado). Foram encontrados opiáceos, cocaína, fenobarbital, amitriptilina, nortriptilina, clomipramina, e antipsicóticos (tioridazina e levomepromazina), porém sem correlação entre as concentrações nas larvas e nos tecidos.

A Tabela 2 resume os casos reais reportados na literatura, indicando as substâncias encontradas, suas concentrações, a matriz e o método de análise utilizado em cada caso. Grande parte dos casos faz uso de larvas, embora haja relatos do uso de outros materiais, como exúvias e pupários. O caso relatado por Gosselin *et al.*³³ representa o único caso de amostra entomológica coletada de um cadáver analisada com método previamente validado.

Wilson *et al.*³² criaram *Calliphora vicina* em músculos obtidos de dois casos de suicídio, um por uso de amitriptilina e um pela combinação de paracetamol e propoxifeno. Propoxifeno, amitriptilina e nortriptilina foram detectados nas larvas, embora em concentrações inferiores a quantidade inicial presente no músculo. O paracetamol, mais polar, não foi detectado, provavelmente devido à sua maior excreção pela larva. Nenhuma das substâncias foi detectada nos pupários e adultos.

Larvas de *C. vicina* foram criadas em músculos oriundos de três casos de morte associada a medicamentos (amitriptilina, temazepam e combinação de trazodona e trimipramina).³⁰ Os medicamentos foram encontrados nas larvas, porém não em todas as pupas analisadas, indicando possível metabolismo ou utilização de método de extração inadequado para as pupas, matrizes altamente proteicas e quitinizadas.

Bourel *et al.*⁴⁶ criaram *L. sericata* em músculos oriundos de 9 cadáveres de usuários de heroína e foram capazes de quantificar morfina por radioimunoensaio em larvas de segundo e terceiro instar, pupários e adultos, mas não encontraram morfina nas pré-pupas analisadas. Em duas amostras de músculo não foi detectada a presença de morfina, porém as larvas e pupários analisados foram positivos nesses casos, demonstrando a utilidade dessa matriz em casos forenses.

Tabela 2. Substâncias e concentrações encontradas, matriz e métodos utilizados em entomotoxicologia em casos reais.

Substância	Concentração	Matriz	Método	Ref.
Fenobarbital	100 µg g ⁻¹	Larvas de Calliphoridae	GC-MS e TLC	49
Malation	2050 µg g ⁻¹	Larvas de Calliphoridae	GC-NPD	28
Bromazepam Levomepromazina	810 ng g ⁻¹ 45,3 ng g ⁻¹	Larvas de Piophilidae	HPLC-UV	41
Morfina Fenobarbital	182 ng g ⁻¹ 500 ng g ⁻¹	Larvas de Calliphoridae	GC-NPD HPLC-UV	50
Morfina Codeína	90 ng g ⁻¹ 12 ng g ⁻¹	Larvas de Calliphoridae	GC-MS	54
Cocaína	90 ng g ⁻¹	Tecido mumificado e fezes de besouro	GC-MS	51
Cocaína	Não informado	Larvas de Calliphoridae		
Cocaína Benzoilecgonina	490 ng g ⁻¹ 30 ng g ⁻¹	Larvas de Calliphoridae	GC-NPD GC-MS	52
Nordiazepam, oxazepam, lorazepam, bromazepam, alprazolam e triazolam.	21-810 ng g ⁻¹			
Fenobarbital e amobarbital	500-2250 ng g ⁻¹			
Amitriptilina, clomipramina e dotiepina	28-280 ng g ⁻¹			
Fluoxetina e venlafaxina	16-59 ng g ⁻¹			
Clorpromazina, alimemazina, ciamemazina e levomepromazina	16-551 ng g ⁻¹	Larvas de Calliphoridae	GC-MS ou LC-MS	8
Morfina, codeína, folcodina e propoxifeno	13-867 ng g ⁻¹			
THC-COOH e 11-hidróxi-THC	11-39 ng g ⁻¹			
Meprobamato, digoxina e nefopam	21-4439 ng g ⁻¹			

Tabela 2. Continuação

Substância	Concentração	Matriz	Método	Ref.
Nortriptilina	1200 ng g ⁻¹	Larvas (não especificadas)	GC-MS	53
Secobarbital	Não quantificado	Larvas (não especificadas)	GC-NPD e GC-MS	56
Triazolam, oxazepam, fenobarbital, alimemazina e clomipramina	28 a 204 ng g ⁻¹	Larvas de Calliphoridae	HPLC-UV	14
Amitriptilina e nortriptilina	2500-5400 ng g ⁻¹	Exúvia de besouro Fezes de besouro Pupário de Phoridae	GC-MS	10
Anfetamina	Não quantificado	Larvas de Calliphoridae e Sarcophagidae	GC-MS	40
Fenobarbital	28,37 µg g ⁻¹	Larvas de Calliphoridae ativas	GC-MS	58
	35,40 µg g ⁻¹	Larvas de Calliphoridae pós-alimentação		
Metadona EDDP	38,7 µg g ⁻¹ 82,8 µg g ⁻¹	Larvas (não especificadas)	LC-MS/MS	33

2.7 Analitos

Overdoses fatais estão geralmente associadas ao uso de substâncias ilícitas, como opiáceos e cocaína, de medicamentos, principalmente aqueles com efeito sobre o sistema nervoso central (SNC),^{64,65} ou de pesticidas, estes principalmente no Brasil e em países em desenvolvimento.⁶⁶

O padrão de consumo de drogas ou medicamentos, bem como o perfil de intoxicação, varia de país para país e, dentro de um país continental como o Brasil, varia nas suas diferentes regiões. Medicamentos são a principal causa de intoxicação no Brasil, sendo responsáveis por 29,9 % dos 103184 casos reportados durante o ano de 2010, com taxa de mortalidade baixa (0,26 %) quando comparada a de pesticidas (2,64 %), a classe mais letal, embora responsável por apenas 7,4 % dos casos de intoxicação (Figuras 2 e 3).⁶⁷ Drogas de abuso são responsáveis por 6,8 % dos casos de intoxicação, com taxa de mortalidade de 0,73 %. No Centro Oeste, o padrão se repete, porém com maior percentual de cura para todas as intoxicações. O percentual de intoxicações por medicamentos se mostra levemente menor, representando 24 % dos 10964 casos, com 0,26 % resultando em morte. Nota-se no Centro Oeste um maior percentual de intoxicação por pesticidas (10,9 %)

e da taxa de óbito por este tipo de intoxicação (4 %). Drogas de abuso são responsáveis por 6 % dos casos de intoxicação, resultando em óbito em 4,1 % dos casos, superando a mortalidade devido a pesticidas.

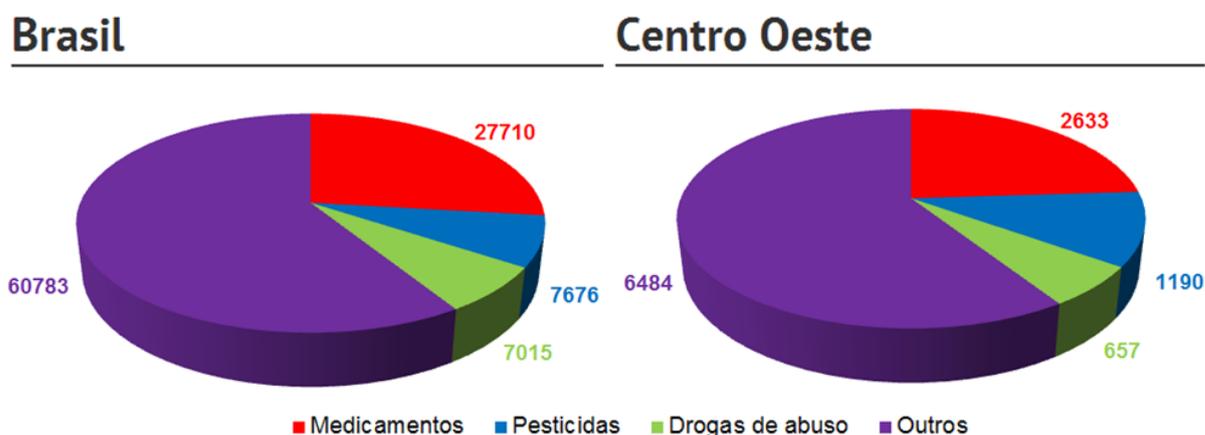


Figura 2. Casos de intoxicação por agente em 2010. Outros inclui produtos veterinários, domissanitários, plantas, alimentos, animais. (Fonte: SINITOX, 2010⁶⁷).

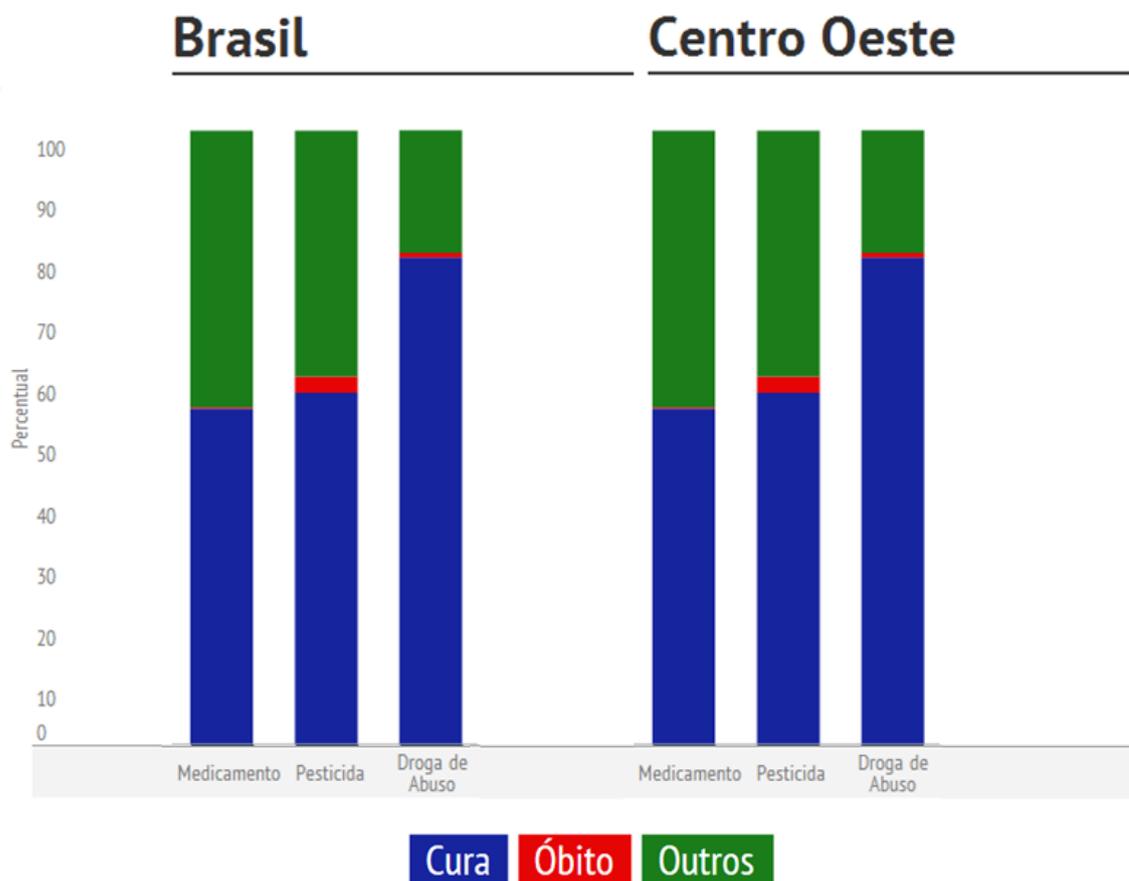


Figura 3. Desenlace dos casos de intoxicação em 2010. Outros inclui sequela, óbitos por outras circunstâncias, cura não informada. (Fonte: SINITOX, 2010⁶⁷).

No Distrito Federal (DF), Campelo e Caldas⁶⁸ coletaram informações relativas às substâncias envolvidas em mortes violentas investigadas pelo Instituto de Medicina Legal da Polícia Civil do Distrito Federal (IML-DF) entre 2006 e 2008. Aproximadamente 22 % das análises de urina foram positivas para cocaína, com um padrão crescente ao longo dos 3 anos. A cocaína foi a segunda substância mais encontrada, sendo superada apenas pelo álcool. Medicamentos foram encontrados em 39 amostras (2 %) de urina analisadas, sendo os benzodiazepínicos a classe mais encontrada. Entre as 25 amostras positivas para pesticidas, 22 revelaram a presença de aldicarbe, principal componente do chumbinho, um raticida comercializado ilegalmente no país. Entre os anos de 2004 e 2007, foram reportados ao Centro de Informação Toxicológica, 709 casos de intoxicação relacionada a pesticidas, dos quais 194 foram devido ao chumbinho, também responsável por 70 % dos casos de autoenvenenamento e 56 % dos casos de morte.⁶⁹

Dados do Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul mostram que dos 10813 casos de intoxicação por medicamentos ocorridos em 2012, 20,0 % dos casos envolvia benzodiazepínicos (50 % destes devido ao clonazepam, seguido de diazepam, alprazolam, bromazepam e flunitrazepam), 16,6 % envolviam antidepressivos (22 % destes devido à amitriptilina, quarto medicamento principal em sua classe) e 8,2 % envolviam anticonvulsivantes (42 % destes devido à carbamazepina).⁷⁰

2.7.1 Aldicarbe, aldicarbe sulfona e aldicarbe sulfóxido

O aldicarbe, inseticida da classe dos carbamatos, é um dos pesticidas de maior toxicidade aguda em uso na agricultura, e sua comercialização foi proibida no Brasil em 2012.⁷¹ O uso de aldicarbe como raticida doméstico na forma de chumbinho, embora não autorizado pelas autoridades brasileiras, ainda é prática comum e tem resultado em inúmeros casos de intoxicação a cada ano, mesmo após a adição de agentes amargantes e eméticos na formulação do produto. O chumbinho é ainda utilizado como agente abortivo e em tentativas de homicídio e suicídio devido à facilidade de acesso.⁷²

Aldicarbe, de fórmula molecular $C_7H_{14}N_2O_2S$ (Figura 4), é facilmente absorvido pela via gastrointestinal, exposição tópica ou inalação, atingindo

rapidamente a corrente sanguínea. No organismo, é rapidamente oxidado a aldicarbe sulfóxido, $C_7H_{14}N_2O_3S$, que é lentamente oxidado a aldicarbe sulfona, $C_7H_{14}N_2O_4S$ (Figura 4), sendo ambos também tóxicos.⁷³ O aldicarbe e seus metabólitos exercem seu efeito tóxico pela inibição reversível da acetilcolinesterase, promovendo estimulação colinérgica devido ao acúmulo de acetilcolina na fenda sináptica. O aldicarbe sulfóxido é mais tóxico que o próprio aldicarbe enquanto o metabólito sulfonado é menos tóxico.⁷³ A intoxicação por aldicarbe causa, além dos sintomas menores como enjojo ou diarreia, depressão respiratória e edema pulmonar agudo.⁷⁴ O aldicarbe é um carbamato altamente tóxico, cerca de 1000 vezes mais tóxico que outros compostos desta classe. A Tabela 3 contém alguns dados toxicológicos do aldicarbe e seus metabólitos.

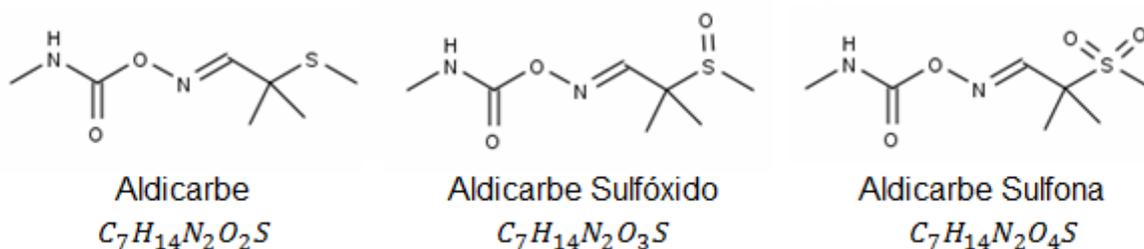


Figura 4. Estrutura molecular do aldicarbe e seus dois metabólitos, aldicarbe sulfóxido e aldicarbe sulfona.

2.7.2 Bromazepam, Clonazepam, Diazepam e Flunitrazepam

Os benzodiazepínicos são um grupo de medicamentos utilizados como agentes ansiolíticos e hipnóticos, e recebem este nome em função de sua estrutura química, que consiste em um anel benzênico fundido a um anel 1,4 diazepina de sete membros (Figura 5). Quase todos também possuem um anel substituinte 5-aril, e as diferentes substâncias são dadas por grupos substituintes diferentes nas posições 1, 2, 3 e 4 do anel diazepina, na posição 7 do anel benzênico ou na posição 2' do anel substituinte 5-aril. Baseado nos grupos substituintes, os benzodiazepínicos podem ser classificados em diferentes subgrupos farmacológicos, como os 2-ceto benzodiazepínicos, tal como o bromazepam e o diazepam, e os 7-nitro benzodiazepínicos, tal como o clonazepam e o flunitrazepam.⁷⁵ A estrutura química de alguns benzodiazepínicos está mostrada na Figura 5.

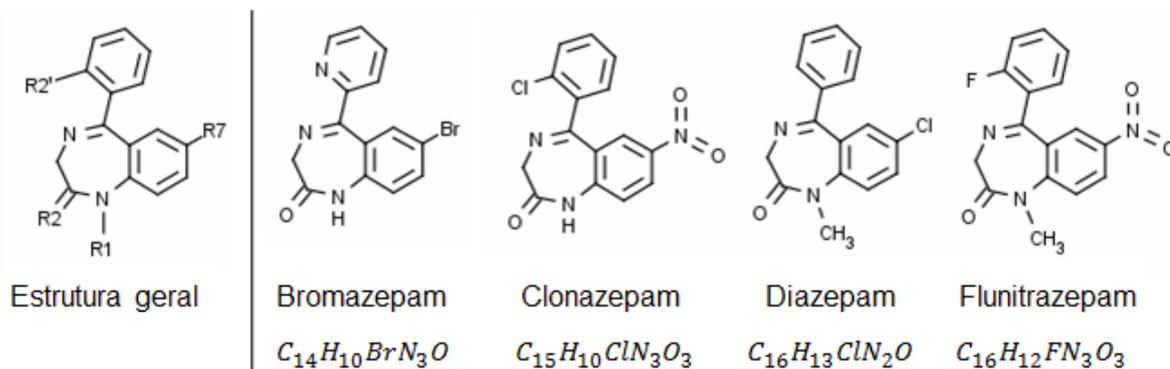


Figura 5. Estrutura molecular geral de benzodiazepínicos e de algumas substâncias dessa classe.

Atualmente, existem cerca de 20 benzodiazepínicos disponíveis para uso clínico, sendo todos semelhantes em suas ações farmacológicas, com maiores diferenças farmacocinéticas que em termos do perfil de atividade.⁷⁶ Os benzodiazepínicos atuam de maneira seletiva nos receptores de ácido gama-aminobutírico (GABA), mediador da transmissão sináptica inibitória do SNC, intensificando a resposta ao GABA, aumentando a frequência de abertura de canais de cloreto de maneira autolimitante e dependente da presença de GABA nas sinapses.⁷⁷ Os benzodiazepínicos são conjugados com ácido glucurônico no fígado e então excretados na urina. Os 2-ceto benzodiazepínicos sofrem reações oxidativas, se tornando derivados 3-OH, normalmente ativos e com longa meia vida, que então são conjugados. Os 7-nitro benzodiazepínicos sofrem redução, formando aminas inativas que são então acetiladas.⁷⁵

Clinicamente, os benzodiazepínicos possuem efeitos sedativos, indutores do sono, ansiolíticos, redutores do tono muscular, anticonvulsivantes e indutores de anestesia. São largamente utilizados, principalmente devido à ampla faixa de segurança e elevado índice terapêutico.⁷⁸ Quando administrados em elevada dose sem coingestão de outros depressores do SNC, os benzodiazepínicos causam sono prolongado sem ocasionar depressão preocupante da função cardíaca ou respiratória, o que é uma vantagem importante uma vez que estes fármacos são muito utilizados em tentativas de suicídio.⁷⁶ Em casos de superdosagem ou intoxicação, a taxa de mortalidade é baixa, e normalmente é necessária apenas a observação clínica do paciente e cuidados de suporte. O uso prolongado de

benzodiazepínicos está associado à tolerância e dependência, sendo este o principal inconveniente do seu uso terapêutico.⁷⁶

A dose letal de benzodiazepínicos não é facilmente estabelecida, devido ao grande número de casos de morte por coingestão de outras substâncias, como barbitúricos, e a ampla variabilidade na intensidade do efeito tóxico entre os indivíduos. Alguns dados da literatura são mostrados na Tabela 3.

O diazepam (Figura 5) é um benzodiazepínico de ação longa metabolizado principalmente a desmetildiazepam (ou nordiazepam), metiloxazepam, oxazepam e temazepam, todos farmacologicamente ativos. Clinicamente, é utilizado para tratamento agudo de transtornos de ansiedade severos, manejo de insônia devido a suas propriedades hipnóticas, como sedativo e anticonvulsivante.

O bromazepam (Figura 5) tem propriedades gerais parecidas com as do diazepam, sendo utilizado no tratamento de transtornos de ansiedade.

O clonazepam (Figura 5) é um benzodiazepínico de ação curta a intermediária. Devido a suas marcantes propriedades antiepilépticas quando comparado a outros benzodiazepínicos, é muito utilizado na clínica como adjuvante no tratamento de convulsões. Seu principal metabólito, um derivado 7-amino, não possui atividade marcante.

O flunitrazepam (Figura 5) é um benzodiazepínico de ação intermediária. O efeito hipnótico causado pelo flunitrazepam é devido aos efeitos sedativo, ansiolítico e relaxante muscular.⁷⁹ É dez vezes mais potente que o diazepam,⁸⁰ sendo utilizado na clínica no tratamento da insônia e como indutor anestésico. O início da sedação causado pelo flunitrazepam é rápido, de 20 a 30 minutos após a ingestão, perdurando por horas. Quando associado ao álcool, causa perda de inibição e amnésia retrógrada, motivos pelos quais é muito utilizado como “droga do estupro” ou “boa noite cinderela”, uma vez que, em solução, não apresenta cor ou sabor característico. É metabolizado no fígado a 7-aminoflunitrazepam e N-desmetilflunitrazepam, este último apresentando atividade farmacológica, porém inferior a do flunitrazepam.

2.7.3 Cocaína e benzoilecgonina

A cocaína, um alcaloide tropânico extraído das folhas de coca, *Erythroxylum coca*, é um anestésico local com propriedades vasoconstritoras. Quando formas mais concentradas da droga se tornaram disponíveis, o abuso dessa substância se tornou comum.⁸¹ No Distrito Federal, estima-se que o consumo anual total esteja na ordem de 1,5 toneladas de cocaína, o que equivale a um consumo de 0,394 kg por ano por 1000 habitantes ou 1,08 mg por dia por habitante.⁸²

A cocaína (Figura 6) é rapidamente absorvida, distribuída, metabolizada e excretada. A principal rota de metabolismo da cocaína envolve a hidrólise, enzimática e não enzimática, de seus dois grupos éster.⁸³ A benzoilecgonina (Figura 6), obtida a partir da desmetilação, é o principal metabólito ativo da cocaína, e a forma na qual grande parte da dose de cocaína é excretada. A cocaína também pode ser metabolizada a metil-éster de ecgonina ou transesterificada a cocaetileno na presença de álcool. Quando fumada na forma de *crack*, também podem ser encontrados os metabólitos anidroecgonina e metil-éster de anidroecgonina.⁸⁴

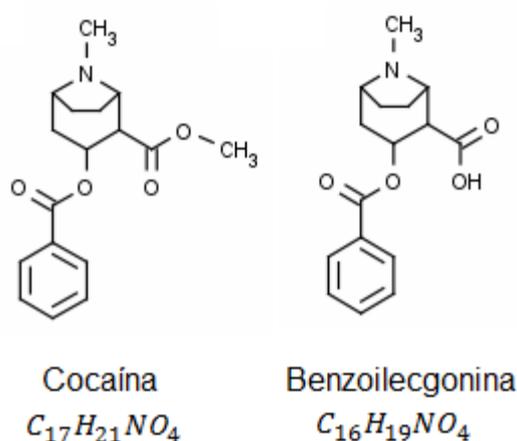


Figura 6. Estrutura molecular da cocaína e benzoilecgonina.

A cocaína é absorvida rapidamente por diversas vias, incluindo a via tópica quando usada como anestésico local. Pode também ser fumada quando na forma de base livre (*crack*), gerando um efeito quase tão rápido quanto a injeção intravenosa, ou inalada quando na forma de sal hidrolórico, que produz uma sensação menos intensa.⁷⁷ Seus efeitos farmacológicos e toxicológicos são devidos principalmente à inibição da recaptação de dopamina no SNC, potencializando os

efeitos periféricos da atividade nervosa simpática e elevado efeito estimulante psicomotor.⁷⁶ O principal efeito adverso agudo é a ocorrência de eventos cardiovasculares severos. Dosagens excessivas podem ocasionar tremores e convulsões, seguido de depressão respiratória e vasomotora. Casos de intoxicação podem ser tratados com a administração de benzodiazepínicos visando reversão da excitação do SNC e do quadro convulsivo. A exposição crônica a cocaína pode levar a tolerância dos efeitos cardiovasculares, levando a overdoses inadvertidas. A síndrome de abstinência envolve depressão severa, ansiedade, irritabilidade, paranoia e desejo intenso por mais cocaína.⁷⁴

A análise da concentração sanguínea de 111 usuários de cocaína que procuraram a emergência médica demonstrou ausência de correlação entre a concentração sanguínea e a gravidade dos sintomas clínicos, desenlace dos casos ou necessidade de tratamento.⁸⁵ Embora haja relatos do consumo de até 10 g em um dia sem resultar em óbito, concentrações bem inferiores podem resultar em quadros de intoxicação (Tabela 3).

2.7.4 Amitriptilina e carbamazepina

A amitriptilina (Figura 7) é um antidepressivo tricíclico que atua inibindo não seletivamente a recaptção de monoaminas na fenda sináptica. A amitriptilina possui três anéis condensados ligados a uma amina terciária com dois grupos metila, que podem ser removidos durante o metabolismo, gerando nortriptilina, uma amina secundária farmacologicamente ativa, que é inativada por hidroxilação e excretada. A amina presente na estrutura dos antidepressivos tricíclicos pode ser protonada em função do seu pKa (9,2 para amitriptilina) e assim, estas substâncias apresentam caráter anfifílico.⁷⁸

A amitriptilina é amplamente utilizada para tratamento de depressão, pânico e dor neuropática, e sua interrupção pode levar a síndrome de abstinência.⁷⁴ A superdosagem deve ser tratada inicialmente com terapia sintomática da excitação, do delírio e das convulsões, posteriormente o caso pode evoluir a coma e depressão respiratória, e resultar em morte súbita por fibrilação ventricular, embora este seja um evento raro.⁷⁶

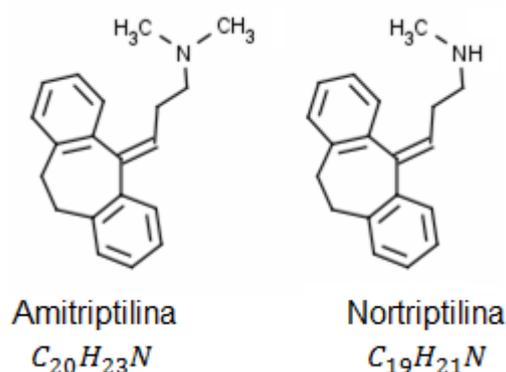
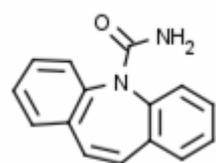


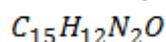
Figura 7. Estrutura molecular da amitriptilina e nortriptilina.

A dose terapêutica de amitriptilina varia de 75 a 300 mg ao dia para adultos ou 0,1 a 2 mg kg⁻¹ para crianças.⁷⁴ As concentrações séricas terapêuticas vão de 100 a 250 ng mL⁻¹, sendo concentrações acima de 500 ng mL⁻¹ consideradas tóxicas.⁸⁶

A carbamazepina é um dos anticonvulsivantes, ou antiepiléticos, mais amplamente utilizado na clínica, particularmente no tratamento de crises parciais complexas, dor neuropática e doença maniaco-depressiva. A carbamazepina (Figura 8), quimicamente derivada dos antidepressivos tricíclicos, é bastante lipossolúvel, metabolizada no fígado a carbamazepina-10,11-epóxido, farmacologicamente ativa, e posteriormente excretada pela urina, ligada ao ácido glucurônico.⁸³ Age diminuindo a excitabilidade da membrana por meio da inibição dos canais de sódio voltagem-dependentes, sendo um indutor das enzimas microsossomais hepáticas, acelerando o metabolismo de diversos outros medicamentos, razão pela qual normalmente é utilizada combinada com outros antiepiléticos.⁷⁶ Efeitos tóxicos podem surgir devido à ação anticolinérgica, depressão do SNC e depressão do miocárdio, podendo ocasionar em morte. O tratamento de casos de intoxicação normalmente envolve cuidados de suporte e administração de benzodiazepínicos em casos de convulsão.⁷⁴



Carbamazepina

**Figura 8.** Estrutura molecular da carbamazepina.

A dose terapêutica de carbamazepina varia de 400 a 1600 mg por dia, levando a concentrações séricas terapêuticas entre 4 e 12 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Concentrações séricas acima de 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ podem levar a coma e convulsões. Embora haja relatos de adultos sobrevivendo a ingestão de 40 g de carbamazepina, com cuidado intensivo, alguns casos de intoxicação podem ocorrer após ingestão de quantidades bem inferiores.⁷⁴

A Tabela 3 mostra algumas informações toxicológicas e farmacológicas de algumas das substâncias investigadas neste estudo.

Tabela 3. Informações de toxicidade aguda e/ou dose terapêutica das substâncias avaliadas neste estudo.

Substância	Informação
Aldicarbe	DL ₅₀ de 0,65 mg kg ⁻¹ em ratos pela via oral. ⁸⁷ DL ₅₀ de 3,5 mg kg ⁻¹ em coelhos pela via dérmica. ⁸⁷ Doses de 0,26 mg kg ⁻¹ resultam em intoxicação grave. ⁷⁴
Aldicarbe sulfóxido	DL ₅₀ de 0,49 mg kg ⁻¹ em ratos pela via oral. ⁸⁸ DL ₅₀ >20 mg kg ⁻¹ em coelhos pela via dérmica. ⁸⁸
Aldicarbe sulfona	DL ₅₀ de 20 mg kg ⁻¹ em ratos pela via oral. ⁸⁸ DL ₅₀ >20 mg kg ⁻¹ em coelhos pela via dérmica. ⁸⁸
Clonazepam	Faixa terapêutica de 20 a 80 ng mL ⁻¹ no sangue. ⁸⁶ Concentrações sanguíneas acima de 80 ng mL ⁻¹ são consideradas tóxicas. ⁸⁶
Diazepam	Dose terapêutica de 2 a 10 mg por dia. ⁷⁴ Ingestão de 2 g é apenas levemente tóxica. ⁷⁴
Flunitrazepam	Dose terapêutica de 1 a 4 mg por dia. ⁸⁹ Ingestão de 28 mg resultou em morte de um idoso. ⁹⁰ Concentração média do metabólito (7-aminoflunitrazepam) em casos de intoxicação é de 0,45 $\mu\text{g mL}^{-1}$ na ausência de outras substâncias e 0,16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ nos casos de coingestão de álcool (concentração média 1,6 g L ⁻¹). ⁸⁹

Tabela 3. Continuação

Substância	Informação
Cocaína	<p>Análise da concentração sanguínea de 111 usuários de cocaína demonstrou concentração máxima de $3,9 \text{ mg L}^{-1}$, e concentrações de $0,029$ a $0,387 \text{ mg L}^{-1}$ nos casos de óbito.⁸⁵</p> <p>Há relatos de concentrações tóxicas em humanos de $3,6 \text{ mg kg}^{-1}$ pela via inalatória, de 714 mg kg^{-1} pela via oral e $1,8 \text{ mg kg}^{-1}$ pela via intravenosa, e dose letal de $7,4 \text{ mg kg}^{-1}$ pela via oral.⁷⁴</p>
Amitriptilina	<p>DL_{50} de 305 mg kg^{-1} em camundongos pela via oral.⁷⁴</p> <p>Doses de 10 a 30 mg kg^{-1} em crianças são consideradas tóxicas, sendo uma dose de 250 mg capaz de levar uma criança a óbito.⁹¹</p> <p>Um estudo de 24 casos de intoxicação envolvendo amitriptilina mostrou concentrações sanguíneas variando de 1 a $12,8 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$, enquanto nos casos fatais, as concentrações variaram de 2 a $15,6 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$.⁹²</p>
Carbamazepina	<p>Doses de $3,2 \text{ g}$ para adultos e $1,6 \text{ g}$ para crianças são consideradas letais.⁷⁴</p> <p>Intoxicação resultando em concentração sérica de $871 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ resultou em morte após 72 h.⁹³</p> <p>16 casos de morte por intoxicação revelaram 4 suicídios sem presença de outra substância, com concentrações sanguíneas de 16 a $99 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. 4 casos com coingestão de álcool (concentrações de até $2,6\%$ no sangue) apresentaram concentrações de carbamazepina de 7 a $50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ no sangue. Em 5 casos, foi identificada a presença de outras substâncias (benzodiazepínicos, fenobarbital e morfina) em concentrações terapêuticas, e carbamazepina entre 2 e $11 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$.⁹⁴</p>

3. METODOLOGIA

3.1 Amostras biológicas

3.1.1 Desenvolvimento e validação do método

Para obtenção de amostras em quantidade suficiente para o desenvolvimento e a validação do método proposto, larvas de insetos necrófagos foram criadas entre julho e agosto de 2012, na Estação Experimental de Biologia, da Universidade de Brasília, localizada à Avenida L4 Norte, Brasília, DF (15° 52' Latitude Sul e 47° 55' Longitude Oeste), em uma área de mata junto ao lago Paranoá. Foi utilizada uma armadilha constituída de uma gaiola de experimentação animal para ratos composta de recipiente plástico rígido e uma grade. O recipiente foi forrado com uma camada de papelão para garantir a conservação do calor e umidade e sobre o papelão foram colocadas vísceras suínas moídas. O recipiente foi coberto com uma grade que permitiu a entrada dos insetos, mas não a retirada das vísceras por animais.

Após em média 8 dias, as larvas ativas em diferentes estágios de desenvolvimento foram coletadas sem identificação taxonômica. As larvas coletadas foram levadas ao Laboratório de Toxicologia da Universidade de Brasília, onde foram lavadas com água corrente e mortas por congelamento em freezer, e armazenadas a -20 °C até a homogeneização. Este procedimento foi realizado 3 vezes no período de julho a setembro de 2012. Larvas coletadas em ocasiões diferentes foram homogeneizadas em liquidificador industrial (Waring Commercial, EUA, modelo 38BL52 LBC10) até a formação de uma pasta homogênea, que foi armazenada a -20 °C até a análise. Este material será referido neste estudo como matriz branca.

3.1.2 Amostras reais

Foram coletadas 27 amostras de larvas de cadáveres que deram entrada no Instituto Médico Legal (IML) da Polícia Civil do Distrito Federal (PC-DF) entre os anos de 2009 e 2012. As larvas, de diferentes estágios de desenvolvimento, foram coletadas pelo técnico do IML João Batista Afonso dos Santos e armazenadas em

potes plásticos a -20 °C até a análise. Não foi realizada identificação das espécies coletadas.

Para as amostras identificadas, dados de gênero, idade, causa da morte e resultados de exames toxicológicos foram obtidos dos registros dos casos de óbito no IML.

3.2 Materiais e Reagentes

Metanol (MeOH), acetonitrila (ACN), acetato de etila (AcOEt), todos grau HPLC, foram adquiridos da Merck (Alemanha). Ácido acético glacial e cloreto de sódio, NaCl, foram obtidos da J.T.Baker (EUA), ácido fórmico da Sigma-Aldrich (EUA) e formiato de amônio da Fluka (Suíça). Água ultrapura foi obtida pelo sistema de purificação Milli-Q (Millipore, EUA).

Padrões de referência certificados de carbamazepina (pureza 96%) e cloridrato de amitriptilina (pureza 100%) foram obtidos junto ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS, Brasil). Bromazepam (pureza 100%), clonazepam (pureza 100,1%), diazepam (pureza 99,7%) e flunitrazepam (pureza 99,7%) foram gentilmente cedidos pela Roche (Brasil). Cocaína e benzoilecgonina (pureza não informada) foram fornecidas pelo Instituto Nacional de Criminalística da Polícia Federal (Brasil). Aldicarbe (pureza 98%), aldicarbe sulfóxido (pureza 99%) e aldicarbe sulfona (pureza 99%) foram adquiridos da Dr. Ehrenstorfer GmbH (Alemanha).

3.3 Preparo das soluções

Soluções estoque dos padrões sólidos foram preparadas em metanol com concentração em torno de 1,000 mg mL⁻¹. Para tanto, a massa necessária de cada padrão foi pesada em balança analítica Shimadzu® AUW220D (5 casas decimais) e então dissolvida em metanol e o volume completado para 10,0 mL em balão volumétrico calibrado (Laborglass®). A solução resultante foi armazenada em vial âmbar a -20 °C.

Soluções estoque contendo todos os analitos foram preparadas a partir das soluções estoque de cada analito, e a partir destas, soluções mistas de trabalho, conforme ilustrado na Figura 9. Todas as soluções foram preparadas em metanol utilizando pipetas automáticas calibradas de volumes variados e balões calibrados de 10,0 mL, com exceção da cocaína, que foi pipetada com pipeta Hamilton® (100µL e 50µL). Todas as soluções foram armazenadas em vial âmbar a -20 °C.

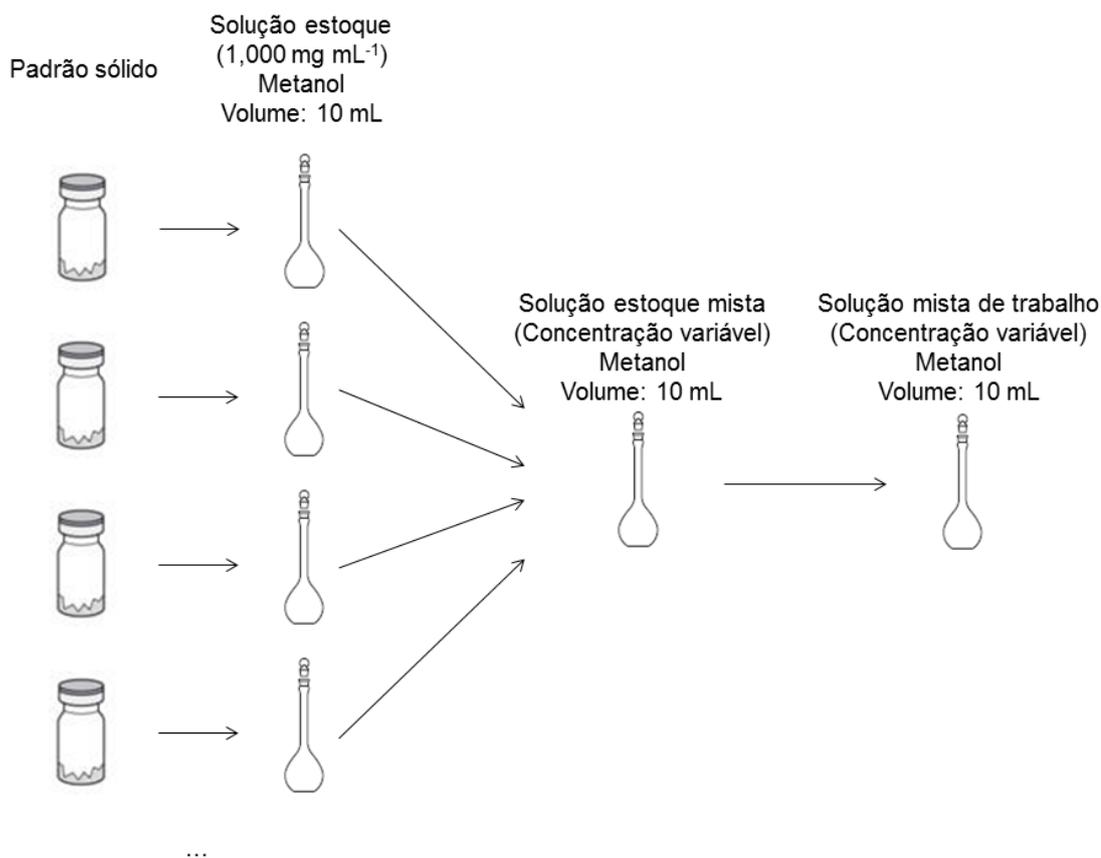


Figura 9. Esquema de preparo de soluções

3.4 Instrumentação analítica

A análise por LC-MS/MS foi realizada em um Sistema LC Shimadzu, equipado com bomba binária (LC-20AD), degaseificador (DGU-20A5), amostrador automático (SIL-20AC), forno de coluna (CTO-20AC) e controladora (CBM-20A) com interface para o espectrômetro de massas triplo quadrupolo (4000QTRAP, AB SCIEX, EUA) com fonte *Turbo Ion Spray*® (ionização por eletronebulização, *electrospray ionization*). O software de controle utilizado foi o Analyst® V 1.5.2. Foi

utilizada a coluna Phenomenex® Luna C18(2) (150 mm x 2 mm i.d., tamanho de partícula 5 µm e 100Å) com a respectiva pré-coluna, mantidas em forno a 40 °C.

Na ionização por eletronebulização, a fase móvel com o analito dissolvido flui através de um capilar sob forte campo elétrico (3 a 4 kV). Na saída do capilar, a grande diferença de potencial causa a formação de gotículas carregadas, que na presença de fluxo de nitrogênio sob aquecimento evaporam e diminuem de tamanho liberando íons. Estes íons são então puxados desta região a pressão atmosférica para a região de vácuo dentro do espectrômetro de massa.⁹⁵ Neste estudo, a ionização foi feita no modo positivo, que gera íons positivos mono carregados, $[M+H]^+$, ou $[M+NH_4]^+$ quando ocorre a formação de aduto com amônio.

A espectroscopia de massa *in tandem* é utilizada para a identificação de compostos em misturas complexas através do uso de três quadrupolos: o primeiro, Q_1 , seleciona as massas desejadas entre os íons formados na fonte (íon precursor), estes íons sofrem fragmentação na célula de colisão (Q_2) e, no terceiro quadrupolo, Q_3 , esses fragmentos são identificados (íon produto), conforme ilustrado na Figura 10. Para a análise, foi utilizado o modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM), no qual os dois analisadores de massa são ajustados para monitorar pares de íons precursores e íons produto de modo que apenas íons com a transição exata sejam monitorados.

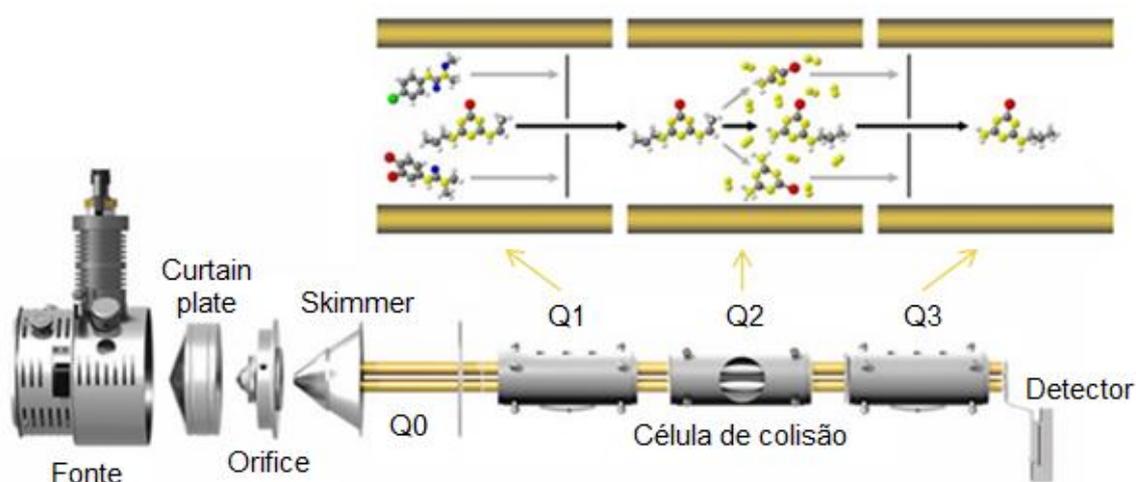


Figura 10. Funcionamento de um espectrômetro de massas triplo quadrupolo no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM) (Adaptado de ABSciex e Notijenck).

A escolha dos fragmentos monitorados para cada analito foi feita através de uma otimização automática do equipamento, gerando um método MRM de modo a diminuir as perdas na ionização e obtendo os parâmetros de voltagem das lentes. Este procedimento otimiza, para cada transição, o *declustering potential* (DP), que controla a diferença de potencial entre o orifício e o quadrupolo de transmissão, o potencial de saída da célula de colisão (CXP, *collision cell exit potential*) e a energia de colisão (CE, *collision energy*) na célula de colisão. O método MRM foi otimizado com uma solução mista na concentração de 200 ng mL⁻¹ em metanol/água (50:50) e formiato de amônio (5 mmol L⁻¹), necessário para a formação do aduto [M+NH₄]⁺ para identificação do aldicarbe, injetada diretamente no espectrômetro de massas. Foram selecionados dois íons produto para cada íon precursor, o mais intenso para quantificação e o segundo para confirmação.

A otimização dos parâmetros da fonte de íons foi feita por meio da injeção de 20 µL de uma solução mista de 20 ng mL⁻¹ em metanol/água (50:50) e formiato de amônio 5 mmol L⁻¹ no cromatógrafo sem coluna, com fase móvel metanol/água (50:50) e formiato de amônio 5 mmol L⁻¹, utilizando-se o método MRM obtido, num fluxo de 0,5 mL min⁻¹. Esse procedimento otimiza os seguintes parâmetros:

- EP (*entrance potential*): orienta o íon para dentro do quadrupolo de transmissão;
- GS1 (*Gas 1*): controla o gás do eletronebulizador, sendo responsável pela formação das gotículas na fonte;
- GS2 (*Gas 2*): controla o fluxo do gás auxiliar no eletronebulizador, que é utilizado para evaporar as gotas pulverizadas;
- TEM (*Temperature*): controla a temperatura do gás auxiliar na fonte;
- CUR (*Curtain gas*): controla o fluxo de gás da interface *curtain gas*, localizada entre o *curtain plate* e o orifício;
- IS (*Ion spray voltage*): controla a tensão aplicada no capilar da fonte;
- CAD (*Collision gas*): controla a pressão do gás de colisão na célula de colisão.

Após a otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas, foi desenvolvido o método de separação por cromatografia líquida. Inicialmente, foram

avaliadas corridas isocráticas com fases móveis constituídas de diferentes proporções de água/metanol e formiato de amônio 5 mmol L^{-1} . Foram então testados gradientes entre a fase móvel A: Água + formiato de amônio 5 mmol L^{-1} e a fase móvel B: Metanol + formiato de amônio 5 mmol L^{-1} , sempre com fluxo de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ e volume de injeção de $5 \text{ }\mu\text{L}$. A proporção das fases móveis foi avaliada visando uma boa separação cromatográfica dos analitos, em um curto tempo de análise com boa resolução dos picos.

Para avaliação dos limites de detecção e quantificação do equipamento, foram injetadas soluções mistas com concentrações decrescentes dos analitos e avaliada qual concentração resultava em uma relação sinal-ruído de 3 e 10, respectivamente.

3.5 Desenvolvimento do método de extração

O método de extração utilizado neste trabalho foi uma adaptação do método de extração sólido líquido com purificação a baixas temperaturas (ESL-PBT) utilizado por Rubensam *et al.*⁹⁶ para análise de medicamentos em carne bovina. O método consiste na extração sólido líquido com acetonitrila e água seguida de uma etapa de congelamento que promove a separação da fase orgânica da fase aquosa, que congela junto à matriz. A fase orgânica é então filtrada e levada à análise.

O procedimento testado inicialmente está representado na Figura 11. A amostra de larva foi fortificada com 16 ng de cada substância (concentração final $6,4 \text{ ng mL}^{-1}$) utilizando $40 \text{ }\mu\text{L}$ de uma solução mista contendo $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$ de cada substância, com exceção da benzoilecgonina que foi incluída no estudo após a etapa de desenvolvimento e otimização do método. A filtração foi feita através de filtro $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ de PTFE modificado e o volume completado para aproximadamente $2,5 \text{ mL}$ em tubo tipo Falcon.

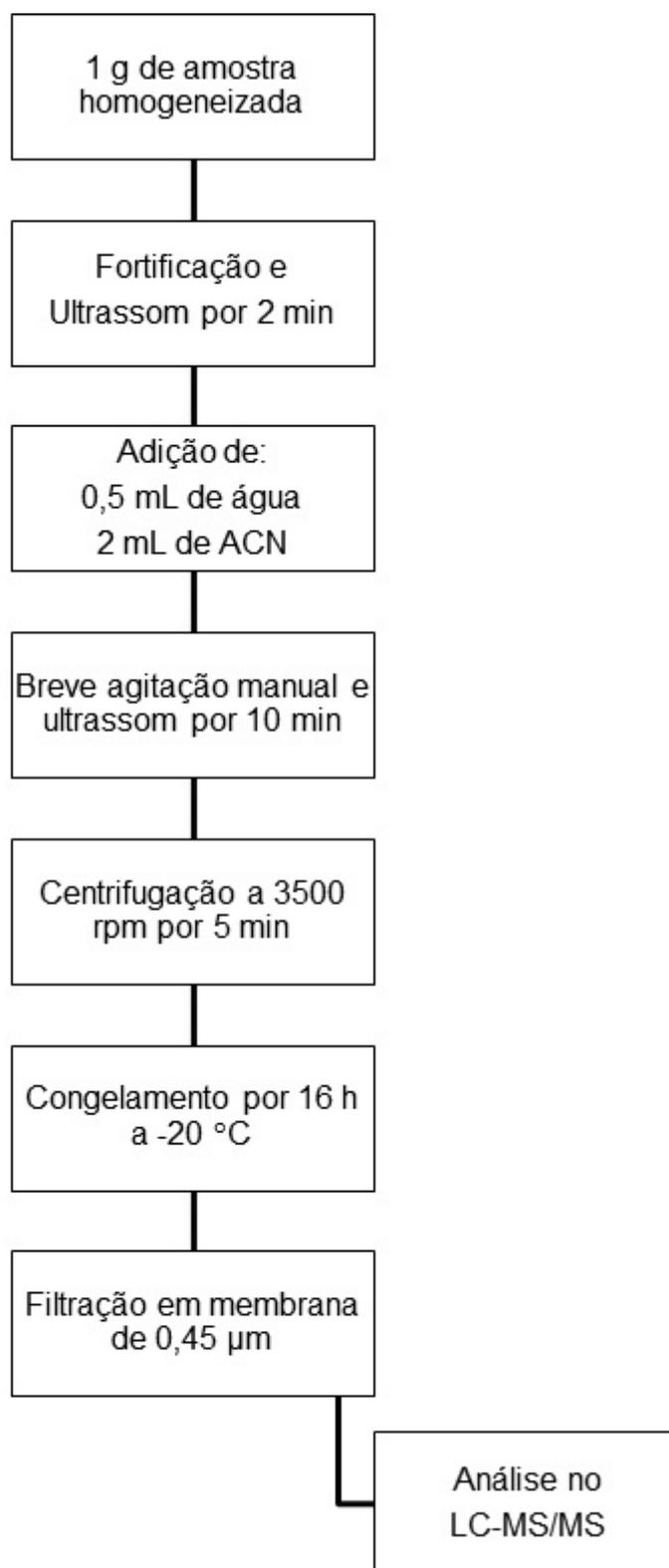


Figura 11. Fluxograma de extração sólido líquido com purificação a baixas temperaturas.

3.5.1 Otimização do método de extração

A otimização da metodologia de extração foi realizada para 10 das 11 substâncias, com exceção da benzoilecgonina, por meio de otimizações univariadas e um planejamento fatorial 2^2 com ponto central avaliando a composição e a acidificação do solvente extrator. As análises univariadas avaliaram o efeito dos seguintes fatores sobre a recuperação do método: volume de solvente adicionado, adição de sal, tempo de congelamento, agitação.

O volume do solvente foi testado na proporção 1 g amostra:0,5 mL água:2 mL ACN e com o dobro de solvente (1 g amostra:1,5 mL água:4 mL ACN), assumindo-se que as larvas sejam compostas de 50% de água, de forma a manter a proporção água: acetonitrila em 1:2 utilizada por Rubensam *et al.*⁹⁶

As etapas seguintes da otimização foram realizadas com amostras de larva fortificadas de modo que a concentração no extrato final fosse 10 vezes o limite de quantificação do equipamento para cada analito (1 a 10 ng mL⁻¹). Para avaliar o efeito *salting-out* provocado pela adição de cloreto de sódio durante a extração, foi comparado o método inicial com a adição de 0,2 g de NaCl após a adição do solvente. Todos os testes foram feitos em triplicata.

Em seguida, foi realizado um planejamento fatorial avaliando a composição do solvente extrator (X) e a acidificação da fase extratora (Y). Para avaliação da composição do solvente extrator, foram testadas diferentes proporções de ACN e AcOEt. O nível -1 correspondeu à adição de 1,625 mL ACN e 0,375 mL AcOEt, maior proporção que não causa separação de fases.⁹⁷ A acidificação da fase extratora foi testada sem adição de ácido, com adição de ácido acético (pKa = 4,75) ou ácido fórmico (pKa = 3,75). A Tabela 4 mostra o delineamento do experimento realizado. Todos os níveis foram realizados em triplicata. O efeito de cada fator e da interação entre eles foi avaliado em função da variação da recuperação seguindo os procedimentos descritos por Neto *et al.*⁹⁸

Tabela 4. Planejamento fatorial 2² com ponto central para otimização da ESL-PBT.

Ensaio	Fatores codificados			Fatores originais	
	X	Y	XY	X	Y
1	+1	-1	-1	2 ACN	Ác. Fórmico 1%
2	+1	+1	+1	2 ACN	-
3	-1	-1	+1	1,625 ACN + 0,375 AcOEt	Ác. Fórmico 1%
4	-1	+1	-1	1,625 ACN + 0,375 AcOEt	-
5	0	0	0	1,8 ACN + 0,2 AcOEt	Ác. Acético 1%

X – Composição do solvente extrator; Y – Acidificação da fase extratora.

Para avaliar a influência do tempo de congelamento na recuperação dos analitos, foram avaliados os seguintes tempos: 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 14 h e 16 h. O congelamento por 12 h foi excluído por impor uma rotina desconfortável. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e o volume completado para 5 mL em balão volumétrico. Este teste foi realizado com amostras fortificadas de modo que a concentração no extrato final fosse 5 vezes o limite de quantificação do equipamento para cada analito (0,5 a 5 ng mL⁻¹).

A influência da agitação foi avaliada em triplicata comparando-se o procedimento normal com a agitação manual por um minuto antes de levar ao ultrassom. O tratamento estatístico dos dados foi realizado no programa *Statistical Package for Social Sciences* versão 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

3.6 Validação

A seletividade do método foi verificada pela comparação dos cromatogramas obtidos de matriz branca e matriz branca fortificada com os 11 analitos (1 a 40 ng mL⁻¹). A ausência de resposta, no mesmo tempo de retenção, dos fragmentos monitorados para cada analito na matriz branca indica que o método é seletivo.

O efeito matriz e a recuperação foram avaliados pela comparação das áreas obtidas para cada analito nos cromatogramas de três conjuntos distintos: [1] analito em solução; [2] matriz branca fortificada pós-extração e [3] matriz branca fortificada pré-extração.⁹⁹ O experimento foi realizado em sextuplicata e avaliou

cinco níveis de concentração. O efeito matriz, que representa a diferença de sinal provocado pela presença da matriz, foi calculado comparando-se as médias das áreas obtidas em cada nível na matriz branca fortificada pós-extração com o área obtida no analito em solução, segundo a Equação 1. A recuperação é estimada pela comparação da área do analito na presença de matriz (fortificação pós-extração) com a obtida no extrato resultante da fortificação pré-extração (Equação 2), e permite avaliar as perdas durante o processo de extração. A eficiência do processo é dada pela variação da intensidade do sinal devido ao efeito matriz e a perdas durante o processo, e pode ser calculada pela comparação da área obtida com a fortificação pré-extração com a área do analito em solução, através da Equação 3. Uma interpretação gráfica destes parâmetros está representada na Figura 12.

$$\text{Efeito matriz (\%)} = \frac{\text{área obtida na fortificação pós-extração} \times 100}{\text{área obtida com o analito em solução}} - 100 \quad (1)$$

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{área obtida na fortificação pré-extração} \times 100}{\text{área obtida na fortificação pós-extração}} \quad (2)$$

$$\text{Eficiência do processo (\%)} = \frac{\text{área obtida na fortificação pré-extração} \times 100}{\text{área obtida com o analito em solução}} = \frac{\text{efeito matriz} \times \text{recuperação}}{100} \quad (3)$$

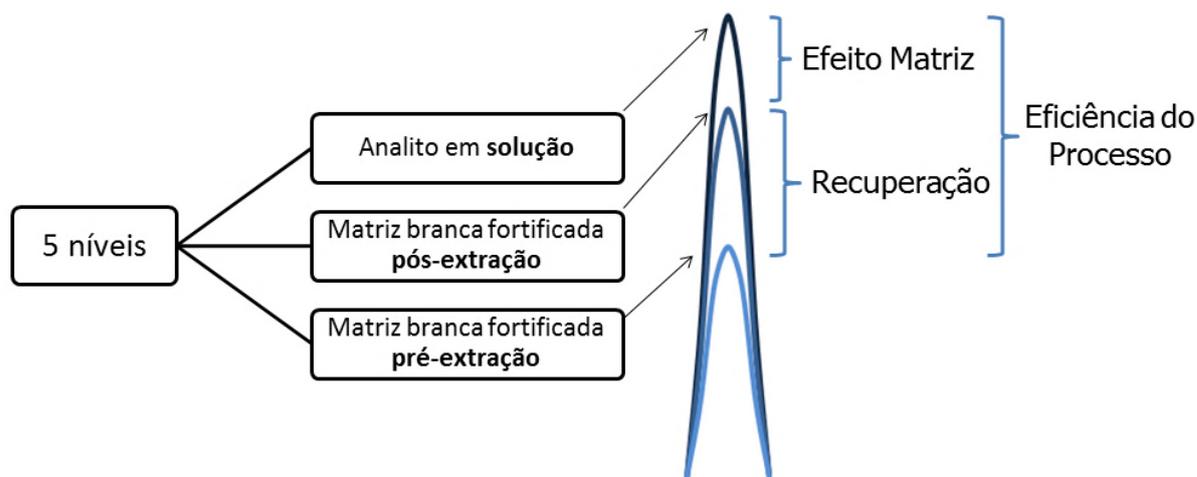


Figura 12. Representação gráfica do efeito matriz, recuperação e eficiência do processo.

A avaliação estatística da diferença entre as médias dos três grupos testados (analito em solução, em matriz branca fortificada pós-extração e em matriz branca fortificada pré-extração) foi feita através de uma análise de variância (*one way ANOVA*) em cada nível de fortificação. Quando a ANOVA indicou que havia diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos, testes *post hoc* de comparações múltiplas foram realizados para indicar quais grupos diferiam entre si. Após teste de homogeneidade das variâncias os grupos com variância igual foram avaliados pelo teste de Tukey DHS e os que apresentaram variâncias diferentes, pelo teste de Games-Howell.

A linearidade foi avaliada através da construção de uma curva de 5 pontos em sextuplicata em matriz extraída (fortificação pós-extração). As concentrações utilizadas estão mostradas na Tabela 5.

Tabela 5. Concentrações da curva para avaliação da linearidade.

Analito	Concentração (ng mL ⁻¹)				
	1º ponto	2º ponto	3º ponto	4º ponto	5º ponto
Aldicarbe sulfóxido	8,0	16	40	120	400
Aldicarbe sulfona	1,2	2,4	6,0	36	120
Amitriptilina	0,6	1,2	3,0	18	60
Clonazepam	0,6	1,2	3,0	18	60
Bromazepam	0,5	1,0	2,5	15	50
Diazepam	0,5	1,0	2,5	15	50
Flunitrazepam	0,4	0,8	2,0	12	40
Cocaína	0,4	0,8	2,0	12	40
Benzoilecgonina	0,4	0,8	2,0	12	40
Aldicarbe	0,4	0,8	2,0	12	40
Carbamazepina	0,2	0,4	1,0	6,0	20

Para cada analito, foi avaliada a homocedasticidade dos resíduos da regressão linear ordinária através do teste de Cochran e observação do gráfico de resíduos. Em caso de heterocedasticidade, foi utilizada regressão por mínimos quadrados ponderados. A ponderação pelo inverso da variância, $\frac{1}{s^2}$, foi comparada com seis fatores de ponderação, $\ln(x)$, $\frac{1}{x}$, $\frac{1}{x^2}$, $\ln(y)$, $\frac{1}{y}$ e $\frac{1}{y^2}$, com base no erro percentual relativo (EPR), dado pela Equação 4. O melhor peso foi o que resultou na menor soma dos valores absolutos de EPR para as seis replicatas ao longo dos 5 níveis testados.¹⁰⁰ A linearidade da faixa foi avaliada através do coeficiente de correlação linear (aceito quando significativo, $\alpha = 0,05$) e o ajuste do modelo aos

dados experimentais, pela observação do gráfico de resíduos normalizados. As regressões foram realizadas no software Analyst ® V 1.5.2.

$$EPR (\%) = \frac{[]_{encontrada} - []_{nominal}}{[]_{nominal}} \times 100 \quad (4)$$

A precisão do procedimento analítico foi avaliada pela repetitividade e pela precisão intermediária utilizando matriz branca fortificada pré-extração e quantificação por meio da curva analítica selecionada nos testes de linearidade. A repetitividade foi avaliada pela análise de amostras fortificadas em 3 níveis (LOQ, 5xLOQ e 100xLOQ) em sextuplicata no mesmo dia pelo mesmo analista. A repetitividade foi considerada satisfatória quando o coeficiente de variação (CV) foi menor que 20 %.¹⁰¹ A precisão intermediária foi avaliada em 7 replicatas no LOQ em dias diferentes e em 7 replicatas em nível 5 vezes o LOQ por analistas diferentes em dias diferentes. A precisão intermediária foi considerada satisfatória quando o CV foi menor que 30 %.¹⁰¹

Após a escolha da curva de calibração utilizada para quantificação das amostras, a exatidão do método validado foi avaliada pela comparação das concentrações calculadas para as amostras dos ensaios de precisão com a concentração teórica após a fortificação pré-extração, em termos percentuais.

O LOQ do método foi definido como a menor concentração testada que apresentou precisão dentro dos valores estabelecidos (CV < 20 % para repetitividade e CV < 30 % para precisão intermediária).¹⁰¹

3.7 Amostras reais

As 27 amostras de larvas coletadas no IML-DF foram homogeneizadas individualmente por maceração em gral e pistilo após congelamento com nitrogênio líquido. Este procedimento de maceração, embora diferente do utilizado nas amostras utilizadas no desenvolvimento e validação, foi testado também com amostras brancas antes de ser utilizado nas amostras reais. 1 g das amostras foi utilizada para análise. Para amostras que apresentaram massa inferior a 1 g, toda a massa disponível foi analisada.

As amostras foram analisadas em bateladas de 10 amostras. A quantificação foi feita utilizando uma curva em matriz extraída, preparada a cada batelada, constituída de cinco níveis de concentração (Tabela 5), e analisada utilizando regressão por mínimos quadrados ponderados.

3.7.1 Controle de qualidade interno

Junto a cada batelada analisada, foram analisadas amostras de controle de qualidade interno em triplicata para avaliar a confiabilidade do método validado durante a análise de rotina. Cada controle de qualidade consistiu de uma amostra de matriz branca fortificada pré-extração no nível intermediário (1 a 40 ng mL⁻¹, correspondendo à concentração do terceiro ponto da curva analítica) extraída junto às amostras reais e quantificadas por meio da mesma curva analítica. Quando a exatidão e a precisão avaliadas para estas amostras permaneceram dentro dos limites estabelecidos durante a validação, o método foi considerado confiável para a análise de rotina.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização de parâmetros instrumentais

Para cada analito, buscou-se como íon precursor a molécula protonada, com exceção do aldicarbe, que forma um aduto estável com amônio, justificando o uso de formiato de amônio como aditivo.¹⁰² As transições a serem monitoradas foram escolhidas com base na intensidade do sinal. A transição com maior intensidade foi selecionada para quantificação e uma segunda transição foi selecionada para confirmação, baseado em informações da literatura.¹⁰²⁻¹⁰⁷

O modo otimização automática do método MRM disponível no equipamento promoveu o ajuste dos parâmetros para cada transição visando otimizar o processo de fragmentação de modo a maximizar a intensidade das transições. A Tabela 6 mostra os parâmetros otimizados para cada analito.

Tabela 6. Parâmetros MRM para cada analito.

Analito	Massa (g mol ⁻¹)	Íon Precursor	DP (V)	Transição (massas em m/z)	CE (V)	CXP (V)
Aldicarbe	190	[M+NH ₄] ⁺	31	q 208 → 116	11	8
				c 208 → 89	23	14
Aldicarbe sulfóxido	206	[M+H] ⁺	51	q 207 → 132	11	10
				c 207 → 89	21	6
Aldicarbe sulfona	222	[M+H] ⁺	66	q 223 → 86	21	6
				c 223 → 148	15	10
Amitriptilina	277	[M+H] ⁺	21	q 278 → 233	25	18
				c 278 → 91	39	6
Bromazepam	316	[M+H] ⁺	86	q 317 → 182	45	12
				c 317 → 209	39	16
Benzoilecgonina*	289	[M+H] ⁺	66	q 290 → 168	27	12
				c 290 → 105	45	6
Carbamazepina	236	[M+H] ⁺	41	q 237 → 194	29	14
				c 237 → 192	33	14
Clonazepam	315	[M+H] ⁺	76	q 316 → 270	37	22
				c 316 → 214	53	16
Cocaína	303	[M+H] ⁺	26	q 304 → 182	29	14
				c 304 → 82	45	4
Diazepam	283	[M+H] ⁺	81	q 284 → 193	45	14
				c 284 → 222	39	16
Flunitrazepam	313	[M+H] ⁺	86	q 314 → 268	37	20
				c 314 → 239	49	18

*adicionada apenas na etapa de validação.

q – quantificação; c - confirmação

A otimização do DP minimiza a formação de *clusters* (agrupamentos) de íons no solvente, facilitando a formação de íons isolados que podem então entrar no espectrômetro de massas. A CE regula a quantidade de energia que os íons precursores recebem quando são acelerados dentro da célula de colisão, seu ajuste adequa a fragmentação de modo a otimizar a formação dos íons produto monitorados. A CXP é responsável por guiar e acelerar os íons para fora da célula da célula de colisão, para seguirem para o terceiro quadrupolo.

A otimização dos parâmetros da fonte de íons resultou nos valores resumidos na Tabela 7.

Tabela 7. Parâmetros da fonte de íons após otimização.

Parâmetros da Fonte	Valor
<i>Entrance Potencial</i> (EP)	10 V
<i>Curtain gas</i> (CUR)	20 psi
<i>Colision Gas</i> (CAD)	Medium
<i>Ion Spray Voltage</i> (IS)	4000 V
Temperatura (TEM)	650 °C
<i>Ion Source Gas</i> (GS1)	45 psi
<i>Ion Source Gas</i> (GS2)	50 psi

4.2 Separação cromatográfica

Uma grande vantagem do uso da espectroscopia de massas acoplada ao cromatógrafo líquido é a elevada seletividade desta técnica, que permite a identificação do analito com base na presença de duas transições (quantificação e confirmação) em um mesmo tempo de retenção e com a mesma abundância relativa observada nos padrões analíticos. Mesmo que haja coeluição de diferentes compostos, ainda é possível distingui-los em função das transições específicas monitoradas. Após testar diferentes proporções de corridas isocráticas que não resultaram em separação adequada dos picos em tempo hábil, foram testados diferentes gradientes. Foi utilizado um gradiente (Figura 13) de água e metanol, ambos com aditivo formiato de amônio 5 mmol L⁻¹, necessário para a formação do aduto [M+NH₄]⁺ do aldicarbe. Após a eluição de todos os compostos, foi necessária a passagem de fase móvel com alta proporção de metanol para limpar a coluna de

modo a evitar a retenção de elementos da matriz que interferiam na corrida subsequente. Além disso, entre duas corridas, foi intercalada uma etapa de equilíbrio de 10 min com a proporção inicial dos solventes (água:metanol 70:30) para reestabelecer as condições iniciais da corrida.

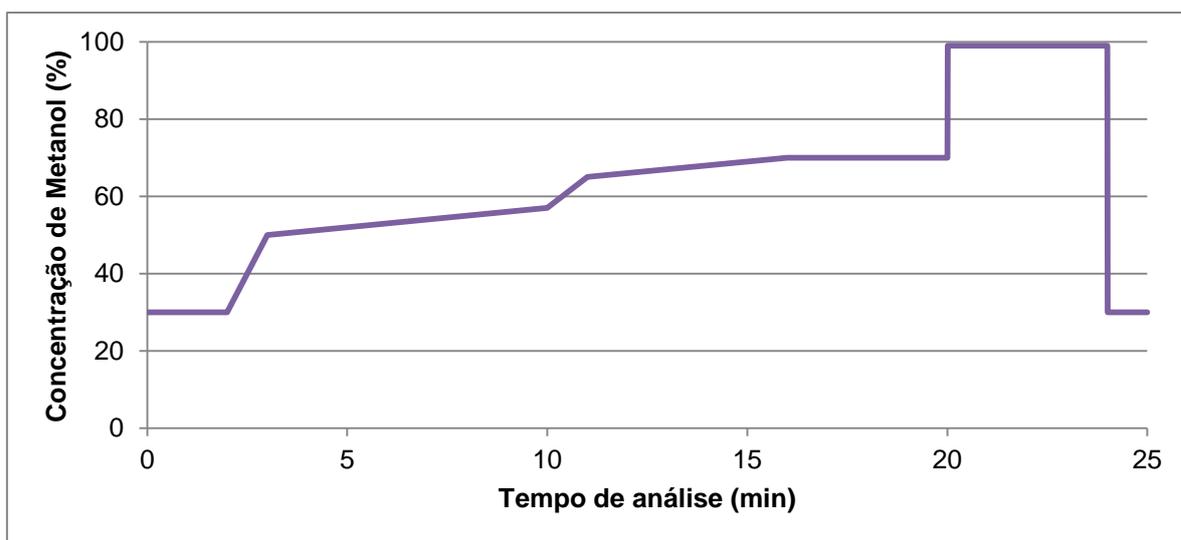


Figura 13. Gradiente de fase móvel utilizado na corrida cromatográfica.

Com este gradiente, foi possível promover a separação cromatográfica adequada dos analitos, conforme demonstrado na Figura 14. Embora a espectroscopia de massa em tandem seja uma técnica bastante sensível e capaz de distinguir os compostos mesmo em casos de sobreposição dos picos, a separação cromatográfica dos analitos previne a supressão ou aumento do sinal analítico devido a possíveis mudanças na ionização em função da presença de compostos coeluentes.

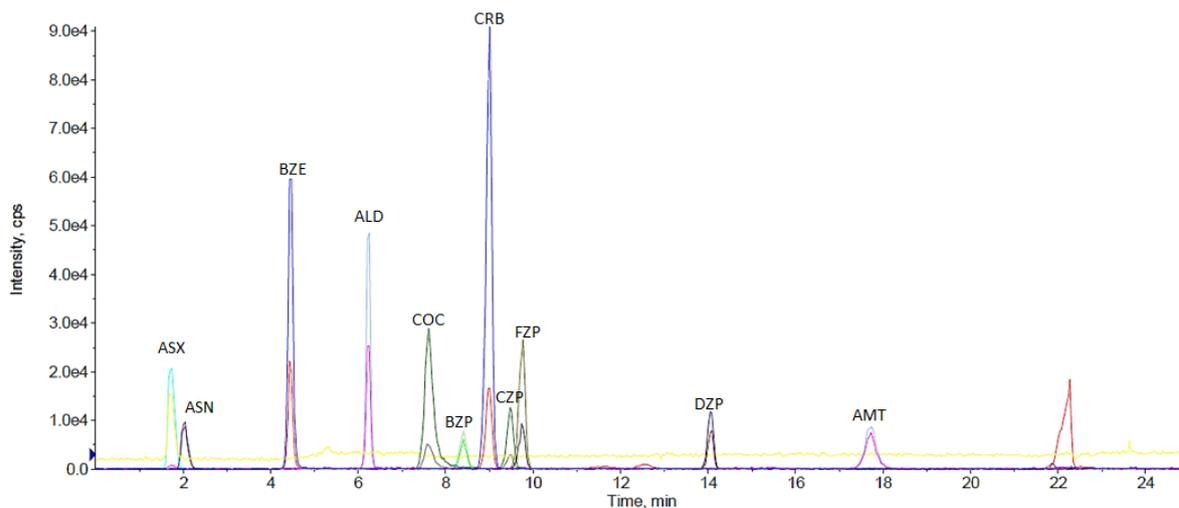


Figura 14. Cromatograma MRM a 20 ng mL^{-1} indicando as transições de quantificação (mais intensa) e de confirmação (menos intensa) para cada analito. ASX – aldicarbe sulfóxido, ASN – aldicarbe sulfona, BZE – benzoilecgonina, ALD – aldicarbe, COC – cocaína, BZP – bromazepam, CRB – carbamazepina, CZP – clonazepam, FZP – flunitrazepam, DZP – diazepam, AMT – amitriptilina.

4.3 LOD e LOQ do equipamento

Os valores de LOD e LOQ do equipamento foram estabelecidos para definir a concentração utilizada inicialmente no desenvolvimento do método de extração. O LOD e LOQ do equipamento foram definidos como a menor concentração capaz de gerar uma relação sinal-ruído de 3 e 10, respectivamente. As soluções testadas foram de $1,0$ a $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$. Para os compostos que apresentaram relação sinal-ruído maior que 10 no menor nível testado, $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$, este foi definido como LOQ do equipamento. Os valores obtidos (Tabela 8) se mostraram satisfatórios para o desenvolvimento do método, uma vez que estão bem abaixo dos encontrados em casos reais (Tabela 2).

4.4 Extração sólido-líquido com purificação a baixa temperatura (ESL-PBT)

O método adaptado de Rubensam *et al.*⁹⁶ foi escolhido por consistir em apenas uma etapa, aliado a baixo gasto de solvente e utilização um solvente de polaridade intermediária, capaz de extrair substâncias com diferentes características físico-químicas e polaridade, como os analitos selecionados para este estudo.

Tabela 8. LOD e LOQ no equipamento LC-MS/MS 4000 Q-Trap (AB SCIEX) para os compostos analisados.

Analito	Concentração (ng mL ⁻¹)	
	LOQ	LOD
Aldicarbe	0,2	0,1
Aldicarbe sulfóxido	1,0	0,3
Aldicarbe sulfona	0,3	0,1
Amitriptilina	0,3	0,1
Bromazepam	0,1	ND
Benzoilecgonina*	0,2	ND
Carbamazepina	0,1	ND
Clonazepam	0,3	0,1
Cocaína	0,1	ND
Diazepam	0,1	ND
Flunitrazepam	0,1	ND

*composto adicionado apenas na etapa de validação.

ND = não determinado.

Não há relatos de uso de ESL-PBT em amostras entomológicas, embora Wood *et al.*⁴³ tenham validado um método de extração de 10 benzodiazepínicos em larvas utilizando adição de 1,2 mL de acetonitrila gelada (temperatura não especificada) a uma única larva homogeneizada com 400 µL de água, seguido de centrifugação e análise por LC-MS/MS. Embora o procedimento não especifique se há congelamento da fase aquosa durante o processo, o princípio da extração utilizada é basicamente o mesmo da ESL-PBT, e demonstrou resultados satisfatórios.

A ESL-PBT tem sido usada para determinação de cocaína em fígado humano *post mortem*,¹⁰⁸ antiparasitários em músculo bovino⁹⁶ e pesticidas em tomate¹⁰⁹ e manteiga¹¹⁰. É uma variação da extração líquido-líquido com purificação a baixa temperatura, que tem sido utilizada para determinação de benzodiazepínicos em urina,¹¹¹ antiparasitários em leite¹¹² e pesticidas em óleos,^{113,114} água,⁹⁷ mel¹¹⁵ e leite.¹¹⁶

Com base no peso médio de cada larva de terceiro ínstar, estimado em aproximadamente 100 mg após pesagem de dez larvas aleatórias, decidiu-se por utilizar 1 g de amostra, que corresponderia à massa de cerca de 10 larvas de

terceiro ínstar, quantidade esta facilmente encontrada em cadáveres em avançado estado de decomposição. Conforme demonstrado na Tabela 1, esta quantidade está abaixo da utilizada em muitos métodos publicados.

4.4.1 Otimização do método de extração sólido-líquido com purificação a baixa temperatura

Para avaliar a influência do volume de solvente adicionado, foi realizado um teste t de Student para amostras independentes entre triplicatas com a extração normal e utilizando o dobro de solvente. Para clonazepam uma das replicatas do controle foi excluída pelo teste de Grubbs ($\alpha=0,05$). Os resultados estão mostrados na Tabela 9. O efeito do volume de solvente sobre a recuperação do método só foi significativo para um analito, clonazepam, $t(3)=-7,423$, $p=0,005$. Assim, optou-se por continuar a trabalhar com a proporção inicial (2 mL de ACN para cada grama de amostra), visando menor gasto de solvente.

Tabela 9. Efeito do volume de solvente adicionado na recuperação.

Analito	Normal ^a		Dobro do solvente ^b	
	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)
Aldicarbe	67,6	10,3	78,4	11,2
Aldicarbe sulfóxido	39,0	12,1	42,1	8,3
Aldicarbe sulfona	56,1	11,6	65,6	12,0
Amitriptilina	68,5	17,6	69,2	7,8
Bromazepam	61,7	12,6	69,1	2,3
Carbamazepina	75,2	8,7	81,8	9,8
Clonazepam	52,6 e 50,5	3,0	68,3	4,1
Cocaína	64,8	9,3	75,7	13,5
Diazepam	72,5	4,9	64,8	12,0
Flunitrazepam	65,6	11,1	77,7	11,6

^a1 g amostra:0,5 mL água:2 mL ACN. ^b1 g amostra:1,5 mL água:4 mL ACN
Valores em negrito são diferentes significativamente ($\alpha=0,05$)

Foi avaliado o efeito *salting-out* através da adição de cloreto de sódio para decidir se este fator seria incluído no planejamento fatorial. A avaliação por meio de um teste t de Student para amostras independentes revelou ausência de diferença

significativa para 9 dos 10 compostos. Para o aldicarbe, houve diferença significativa entre as recuperações sem adição de sal ($M=68,8\pm 3,8$) e com adição de sal ($M=56,0\pm 5,2$), $t(4)=3,468$, $p=0,026$. Em função da diminuição da recuperação de aldicarbe e ausência de efeito para os outros analitos, optou-se por não incluir o efeito *salting-out* no planejamento fatorial e não incluir a adição de sal nos experimentos subsequentes. Em seguida, foi realizado um planejamento fatorial avaliando a composição do solvente (X) e a acidificação da fase extratora (Y). Cada ponto foi realizado em triplicata, e os efeitos avaliados pelas porcentagens de recuperação. A recuperação média de cada ponto experimental foi utilizada para estimar o efeito de cada fator, bem como da interação XY, através da equação 5:

$$\text{Efeito} = \bar{R}_{(+1)} - \bar{R}_{(-1)} \quad (5)$$

Onde $\bar{R}_{(+1)}$ é a média da recuperação no nível +1 e $\bar{R}_{(-1)}$, a média no nível -1. O intervalo de confiança foi calculado pela equação 6, onde o erro-padrão do efeito, $s(\text{efeito})$, é dado pela equação 7:

$$IC = \text{efeito} \pm t_v \times s(\text{efeito}) \quad (6)$$

$$s(\text{efeito}) = \sqrt{\frac{s^2}{2}} \quad (7)$$

Onde t_v é o ponto da distribuição de Student com $\nu = 10$ graus de liberdade e s^2 é a variância média dos pontos experimentais.

O efeito foi considerado estatisticamente significativo quando o intervalo de confiança não incluía o zero (o efeito tem valor absoluto maior que o produto do desvio padrão do efeito pelo valor de t tabelado).

Os resultados (Tabela 10) mostram que a acidificação da fase extratora diminui significativamente ($\alpha = 0,05$) a recuperação de carbamazepina em cerca de 6% quando comparada ao procedimento normal. Embora não significativo para os outros analitos, o efeito da acidificação também foi deletério para todas as outras substâncias, com exceção da cocaína, e portanto, optou-se por não adicionar ácido durante a etapa de extração.

Tabela 10. Resultado do planejamento fatorial 2² com ponto central para otimização da ESL-PBT, avaliando composição do solvente (X) e acidificação da fase extratora (Y).

Analito	Recuperação média	Efeito			IC*
		X	Y	XY	
Aldicarbe	72,9±1,9	-9,1	3,4	3,9	±3,9
Aldicarbe sulfóxido	35,8±2,5	-1,2	2,3	3,6	±5,0
Aldicarbe sulfona	52,1±2,0	-0,1	3,0	0,6	±4,0
Amitriptilina	72,3±13,3	9,4	2,3	11,1	±26,6
Bromazepam	59,9±4,5	-2,4	7,6	1,4	±9,0
Carbamazepina	70,8±2,3	-3,3	6,3	3,1	±4,6
Clonazepam	63,9±3,7	-3,4	6,2	2,4	±7,3
Cocaína	68,6±5,1	5,9	-2,4	2,0	±10,2
Diazepam	69,9±5,0	3,5	1,8	5,8	±9,9
Flunitrazepam	65,7±4,1	-5,7	6,9	4,1	±8,2

*IC: intervalo de confiança

O efeito da composição do solvente se mostrou significativo para o aldicarbe, sendo que a extração com ACN pura apresentou recuperação 9% menor quando comparada com a utilização de ACN com AcOEt. Embora para os outros analitos o efeito da composição do solvente não seja significativo, a diminuição da polaridade da fase extratora com a adição de AcOEt foi deletério para algumas substâncias. Uma vez que o efeito foi significativo apenas para um analito, o qual apresentava a melhor recuperação média nos experimentos, e de maneira a manter o processo de extração mais simples com a adição de apenas um solvente, optou-se por não adicionar acetato de etila ao processo de extração, mantendo-se a adição de apenas 2 mL de ACN.

A interação entre os efeitos da composição do solvente extrator e sua acidificação foi significativa apenas para o aldicarbe, sendo o valor do efeito desta interação cerca de 4 %.

A avaliação do tempo de congelamento sobre a recuperação do método foi avaliada nos tempos 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 14 h e 16 h. A Figura 15 mostra a recuperação média (n=3) para cada analito em cada tempo de congelamento. O gráfico mostra um padrão de aumento das recuperações em 6 h e 10 h para grande

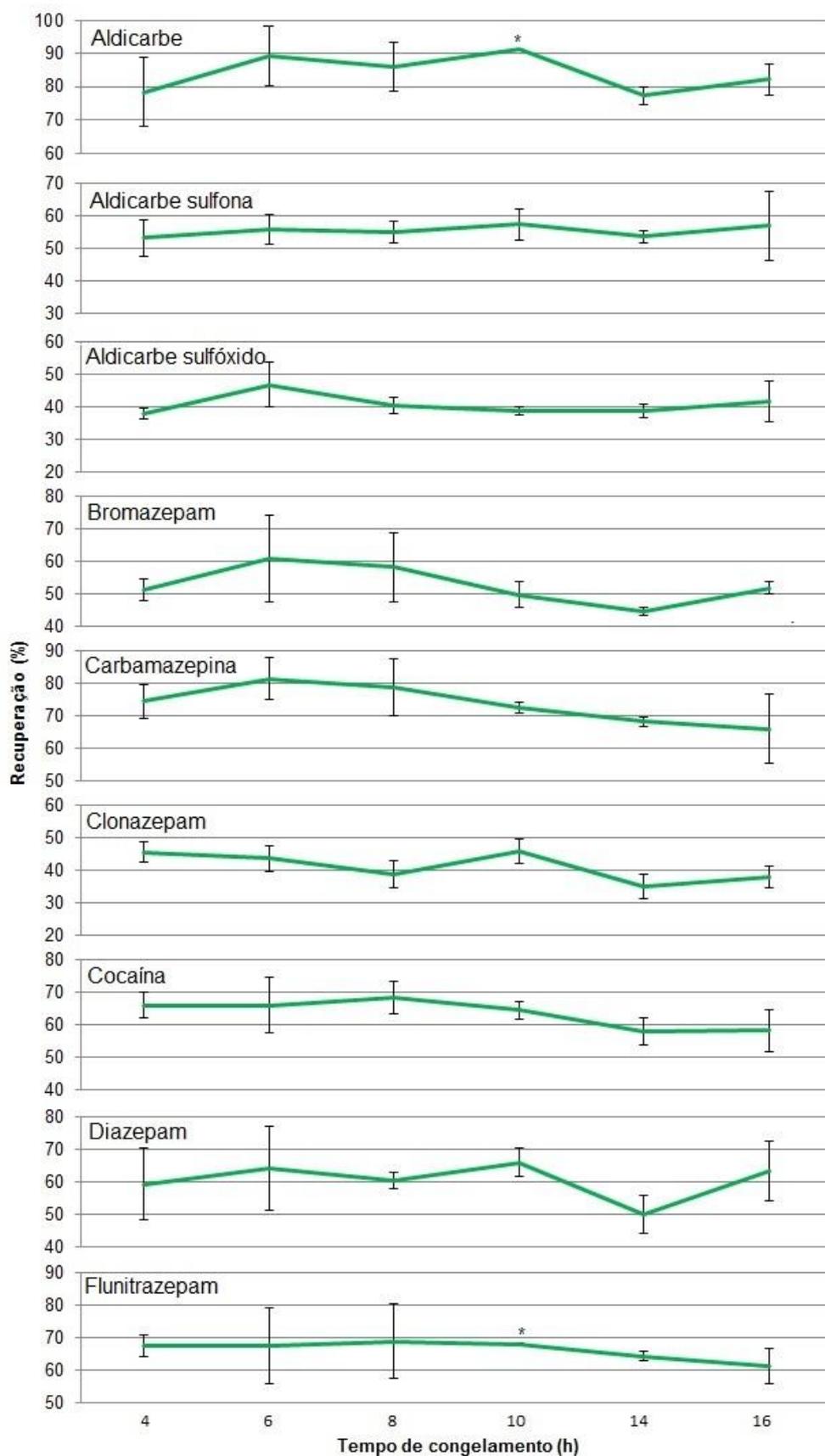


Figura 15. Efeito do tempo de congelamento sobre a recuperação (n=3) dos analitos (concentrações de 0,5 a 5 ng mL⁻¹ dependendo do analito). *Erro menor que 0,5%.

parte dos analitos. Um teste t de Student para amostras independentes entre estes dois tempos não mostrou diferença significativa para nenhum dos analitos ($p > 0,05$), levando a escolha do tempo de 6 h para os testes futuros em função de o menor tempo possibilitar a realização da análise em um dia só, além da comodidade relacionada ao congelamento por 6 h. Os resultados obtidos neste teste demonstram a robustez do método no que tange o tempo de congelamento, uma vez que a ausência de diferença significativa entre os diferentes tempos de congelamento permite que a amostra seja congelada de 4 a 16 h sem alteração significativa na recuperação dos analitos.

A recuperação média para os analitos se mostrou inferior a encontrada nos experimentos anteriores pois neste o extrato final foi completado para 5 mL (visando melhorar a precisão), e portanto a concentração nominal de cada analito estava reduzida a metade, comprometendo a recuperação. Os resultados para a amitriptilina foram omitidos devido a uma falha na integração dos picos nos cromatogramas desta análise em função do *dwell time* para o composto não estar corretamente ajustado.

A influência da inclusão de uma etapa de agitação manual por um minuto antes de levar a amostra para extração no ultrassom foi avaliada em triplicata. Quando comparada ao controle, sem agitação, notou-se uma diminuição da variabilidade das recuperações, avaliada em função do CV, embora não tenha havido diferença significativa na recuperação de 8 compostos. A agitação promoveu melhora significativa na recuperação de diazepam, $t(4)=4,326$ ($p=0,012$), e piora na de carbamazepina $t(4)=-4,347$ ($p=0,012$). Ainda assim, devido ao efeito de diminuição do CV para todos os compostos com exceção da cocaína, a etapa de agitação manual foi incluída no processo de extração.

O método otimizado (Figura 16) se mostra simples, de fácil execução, adequado para processamento de várias amostras, com baixo gasto de solvente e resulta em extratos relativamente limpos que podem ser analisados diretamente por LC-MS/MS, sem necessidade de etapas de *clean-up* subsequentes.

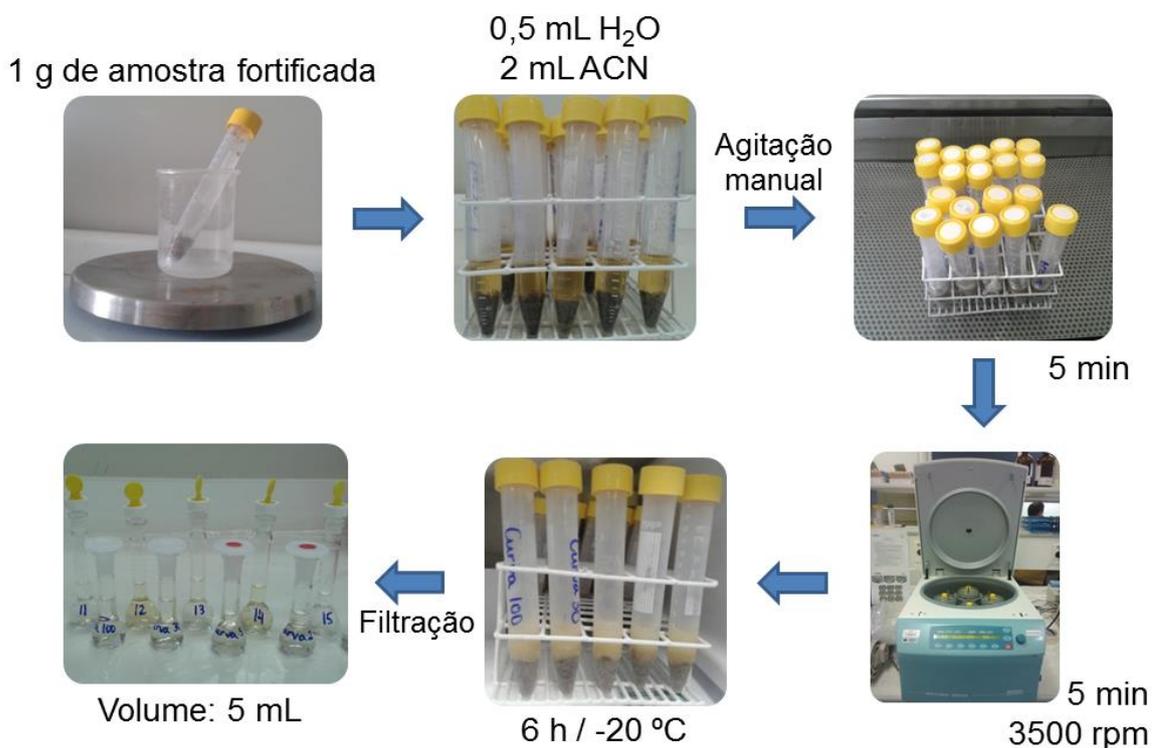


Figura 16. Fluxograma do método ESL-PBT otimizado para amostras fortificadas.

No método desenvolvido, a análise quantitativa é realizada completando-se o volume do filtrado para 5 mL em balão volumétrico e injeção sem tratamento subsequente, mesma maneira usada por Goulart *et al.*¹¹⁶ Alguns trabalhos que utilizaram ESL-PBT contam com uma etapa de evaporação do filtrado após o congelamento e reconstituição do extrato antes da análise.^{112,115}

O método ESL-PBT quando utilizado em outras matrizes fez uso de maiores quantidades de amostra, por exemplo, 4 g de tomate,¹⁰⁹ 2 g de fígado humano¹⁰⁸ ou 5 g de carne bovina.⁹⁶ A diminuição da quantidade de amostra para 1 g se mostrou possível, sendo os resultados obtidos considerados satisfatórios. A proporção de solvente utilizada, 2:1 em relação à água, é a mesma otimizada por Rubensam *et al.*⁹⁶ para análise em carne, onde proporções maiores que esta resultaram em aumento da coextração de componentes da matriz sem aumentar a recuperação dos analitos.

O método conta com um tempo de congelamento de 6h, da mesma maneira que o utilizado por de Pinho *et al.*¹⁰⁹ e Marthe *et al.*,¹¹⁰ permitindo a análise

das amostras em um dia, sem necessidade de congelamento *overnight*, como utilizado por diversos autores.^{108,112,116} Magalhães *et al.*¹¹¹ relatam que o congelamento gradual promove melhor migração dos analitos para fase orgânica, quando compararam o efeito do congelamento em freezer por 1 h com o do congelamento por nitrogênio líquido por 8 segundos sobre a recuperação de benzodiazepínicos em urina. Ainda assim, quando analisado apenas o tempo de congelamento no freezer, o congelamento por mais tempo não parece aumentar a recuperação, uma vez que grande parte dos analitos apresentou menor recuperação em tempos maiores (14 h e 16 h), diferentemente dos resultados encontrados por Rubensam *et al.*,⁹⁶ em que o congelamento por 12 h resultou em um extrato com menos interferentes que quando congelado por apenas 6 h.

O coeficiente de partição octanol-água (K_{OW}) é um parâmetro de lipossolubilidade das moléculas, sendo maior para moléculas mais apolares e menor para moléculas mais polares. A Figura 17 mostra que as moléculas mais polares (aldicarbe sulfona e aldicarbe sulfóxido) apresentaram menores recuperações, enquanto é possível ver uma tendência de aumento da recuperação à medida que o valor de K_{OW} aumenta. Essa correlação ($r=0,60$, $p=0,035$) é explicada uma vez que a acetonitrila é um solvente relativamente apolar, e portanto é melhor para a extração de moléculas menos polares, embora na presença de pequenas quantidades de água, a mistura ACN-água se torne mais polar que ACN pura¹¹⁷ e a polaridade intermediária desta mistura possibilite a extração de diversos analitos polares e apolares.

A solubilidade em água, por outro lado, afeta negativamente a recuperação (Figura 18; $r=-0,76$, $p=0,006$), uma vez que os analitos mais solúveis em água podem permanecer retidos na fase aquosa congelada durante o processo de extração. Aldicarbe e cocaína apresentaram alta recuperação apesar da alta solubilidade em água. Aldicarbe sulfona e aldicarbe sulfóxido apresentam elevada solubilidade em água, fator que, assim como o baixo valor de K_{OW} destes analitos, está relacionado com a menor recuperação destes analitos no método desenvolvido. A influência da solubilidade em água na recuperação dos analitos parece exercer maior influência que o coeficiente de partição.

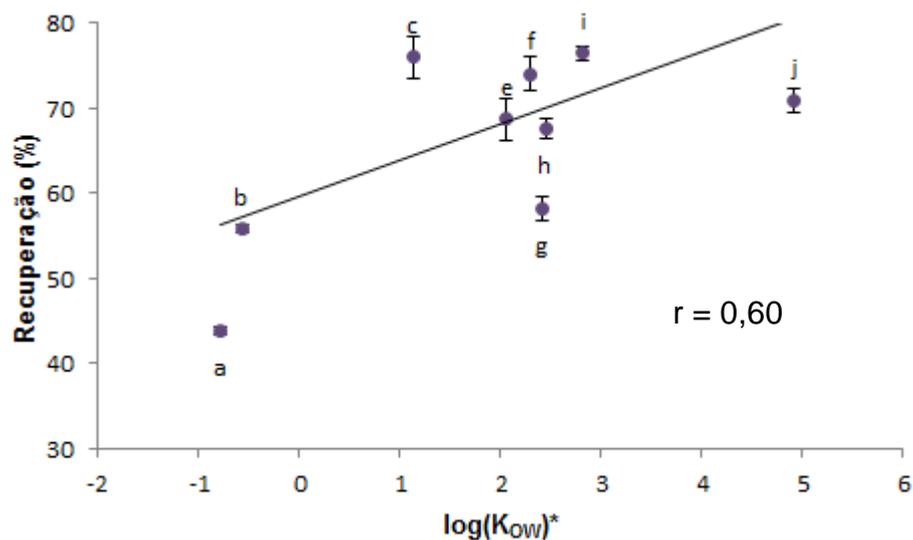


Figura 17. Influência do coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) dos analitos em sua recuperação ($n=3$). a – aldicarbe sulfóxido, b – aldicarbe sulfona, c – aldicarbe, d – bromazepam, e – flunitrazepam, f – cocaína, g – clonazepam, h – carbamazepina, i – diazepam, j – amitriptilina, *valores obtidos junto a SRC.¹¹⁸

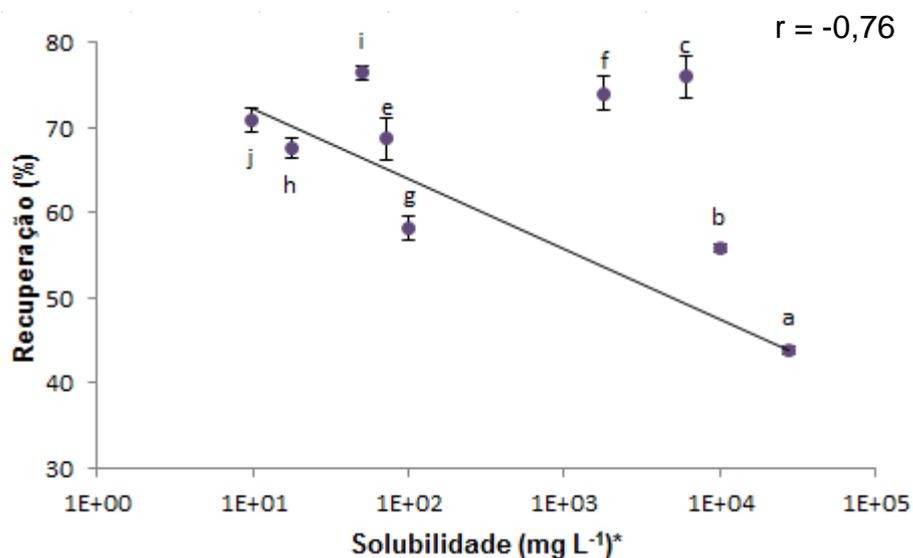


Figura 18. Influência da solubilidade em água dos analitos em sua recuperação ($n=3$). a – aldicarbe sulfóxido, b – aldicarbe sulfona, c – aldicarbe, d – bromazepam, e – flunitrazepam, f – cocaína, g – clonazepam, h – carbamazepina, i – diazepam, j – amitriptilina, *valores obtidos junto a SRC.¹¹⁸

4.5 Validação

4.5.1 Seletividade

A Figura 19 ilustra a seletividade do método por meio de cromatogramas obtidos da extração de matriz branca e de matriz branca fortificada. A matriz branca não apresentou nenhum pico interferente no mesmo tempo de retenção dos 11 analitos, indicando que as condições de extração e análise cromatográfica foram satisfatórias, evidenciando a seletividade do método.

É possível ver na Figura 19 a existência de dois picos para o aldicarbe sulfóxido, não presente no cromatograma da Figura 14. A separação do pico pode ter ocorrido devido à presença de isômeros do aldicarbe sulfóxido, embora o mesmo fenômeno não tenha sido observado para o aldicarbe e o aldicarbe sulfona.

4.5.2 Efeito matriz, recuperação e eficiência do processo

A supressão ou aumento do sinal analítico devido a compostos coeluentes é um fenômeno recorrente na análise por LC-MS/MS e afeta diversos parâmetros de validação, como LOQ, linearidade e precisão.¹¹⁹ O efeito matriz na ionização por *electrospray* é causado pela interferência de diferentes compostos na ionização dos analitos de interesse, esta interferência pode ocorrer ainda na fase líquida, mas também após a evaporação do solvente por meio da competição pelas cargas e pela superfície da gota, aumento da viscosidade e da tensão superficial acarretando em menor formação de gotículas, entre outros.^{120,121}

O valor obtido para efeito matriz calculado pela Equação 1 representa a discrepância do valor encontrado na matriz branca fortificada pós-extração em relação ao analito em acetonitrila, tomado como referência (zero). Valores positivos indicam aumento do sinal analítico e valores negativos, supressão do sinal. A Figura 20 mostra o efeito matriz médio encontrado nos 5 níveis analisados (0,2 a 400 ng mL⁻¹). Para o bromazepam foi observado grande aumento do sinal analítico devido à presença de matriz, com grande variação entre os diferentes níveis testados. Pequeno aumento do sinal analítico foi verificado para a carbamazepina e a benzoilecgonina e uma pequena supressão do sinal para o aldicarbe. Para os outros

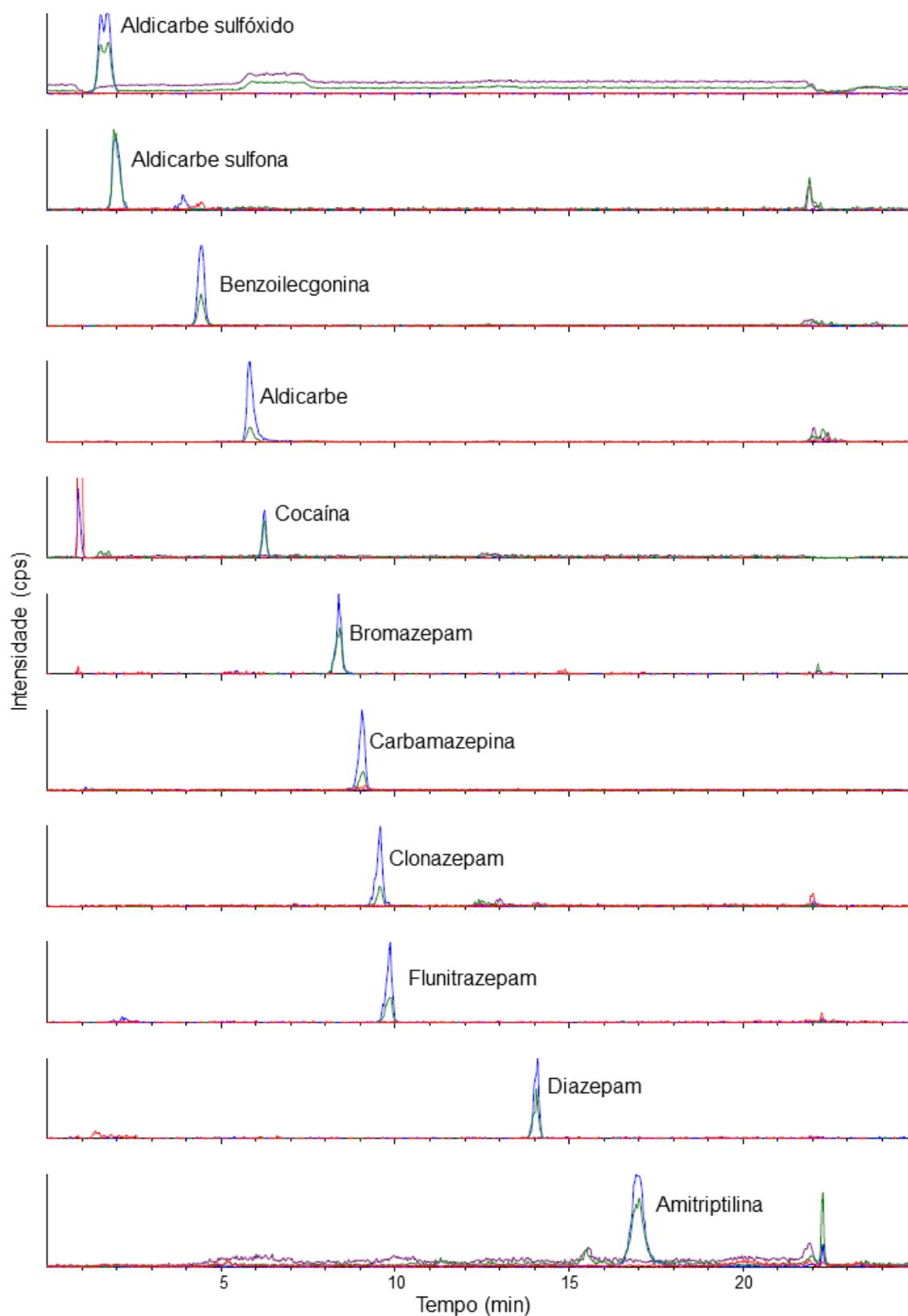


Figura 19. Cromatogramas MRM sobreposto da matriz branca (vermelho – transição de quantificação; roxo – transição de confirmação) e da matriz branca fortificada pós-extração (azul – transição de quantificação; verde – transição de confirmação). Cps: contagens por segundo.

analitos foi observada uma supressão do sinal moderada, chegando a 34% de supressão para o clonazepam.

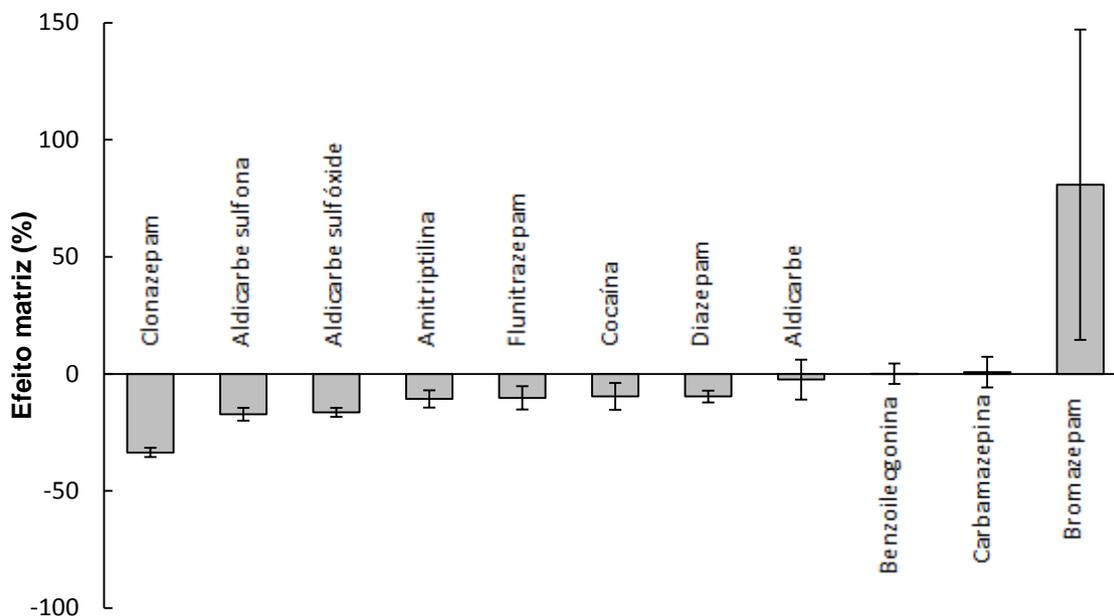


Figura 20. Média do efeito matriz percentual encontrado após ESL-PBT e análise por LC-MS/MS com ionização por eletronebulização, avaliado em 5 níveis de concentração (0,2 – 400 ng mL⁻¹).

A Tabela 11 mostra que o efeito matriz varia muito nos diferentes níveis avaliados. Para alguns analitos, como a benzoilecgonina e o aldicarbe, a matriz ocasiona tanto supressão quanto aumento do sinal analítico quando avaliados diferentes níveis, indicando que o efeito matriz não é dependente apenas do composto, como também da concentração, embora não haja uma relação explícita entre a concentração e o efeito matriz. Segundo o MAPA,¹⁰¹ para aceitação da inexistência do efeito matriz, nenhum nível de fortificação testado deve apresentar efeito matriz. Assim, todos os analitos com exceção da carbamazepina e da benzoilecgonina apresentaram efeito matriz significativo após ESL-PBT e análise por LC-MS/MS com ionização por eletronebulização, por apresentarem diferença de médias significativa em pelo menos um nível.

Analitos com menor tempo de retenção normalmente estão sujeitos a efeito matriz mais intenso, uma vez que os constituintes da matriz responsáveis pelo aumento ou supressão do sinal analítico costumam ser polares, saindo no início da corrida cromatográfica de fase reversa.^{121,122} Bonfiglio *et al.*,¹²³ ao avaliarem o efeito

matriz para três substâncias em plasma utilizando diferentes métodos de extração e análise por LC-MS/MS com ionização por eletronebulização, relataram que a intensidade do efeito matriz é dependente do composto, sendo maior para a cafeína, composto mais polar analisado. A Figura 21, porém, mostra a ausência de correlação significativa ($r=0,11$, $p=0,745$) entre a polaridade do analito e a intensidade do efeito matriz em valores absolutos. Entre os compostos analisados, aldicarbe sulfóxido e aldicarbe sulfona, embora tenham menor tempo de retenção, estão sujeitos a efeito matriz menos intenso que analitos como o bromazepam e o clonazepam, menos polares e com tempos de retenção intermediários. Benzodiazepínicos como o bromazepam e o clonazepam estão mais sujeitos a efeito de matriz do que substâncias mais básicas, pois a protonação destas moléculas é mais facilmente afetada por componentes da matriz.¹²³ O analito com maior massa molar (bromazepam) apresentou maior efeito matriz (Figura 22), embora não haja uma correlação significativa ($r=0,42$, $p=0,205$) entre a massa e a intensidade do efeito matriz.

Tabela 11. Efeito matriz encontrado após ESL-PBT e análise por LC-MS/MS com ionização por eletronebulização nos 5 níveis testados.

Analito	Efeito matriz por nível de concentração (%)				
	1	2	3	4	5
Bromazepam	+153±64	+137±74	+85±43	+28±20	+1,1±6,8
Carbamazepina	+12±18	-2±8,7	-1,5±6,9	-2,4±6,4	-2,6±3,8
Benzoilecgonina	+3,4±7,4	+6±14	-3±12	-3±12	-2,9±8,9
Aldicarbe	+4±30	-12±16	-9±14	+9±11	-4,0±7,7
Diazepam	-6±11	-11±14	-9,3±9,6	-12,4±8,5	-9,9±7,6
Cocaína	+1±12	-13,1±7,8	-12,5±8,6	-12,0±9,0	-11,1±6,5
Flunitrazepam	-2±11	-14,6±8,5	-10,9±9,0	-12,3±8,9	-11,5±5,2
Amitriptilina	-7,3±6,3	-14,7±9,3	-7±13	-14±11	-10±10
Aldicarbe sulfóxido	-14,4±6,3	-16±13	-19±11	-17,7±9,4	-14,7±7,6
Aldicarbe sulfona	-16,9±8,7	-21±11	-17±11	-18,0±9,5	-13,6±7,0
Clonazepam	-30,8±6,4	-32,9±7,6	-33,4±7,5	-34,4±8,7	-36,1±5,0

Valores em negrito são estatisticamente significativos ($\alpha=0,05$).

Nível 1: 0,2 – 8,0 ng mL⁻¹; Nível 2: 0,4 – 16 ng mL⁻¹; Nível 3: 1,0 – 40 ng mL⁻¹;
Nível 4: 6,0 – 120 ng mL⁻¹; Nível 5: 20 – 400 ng mL⁻¹.

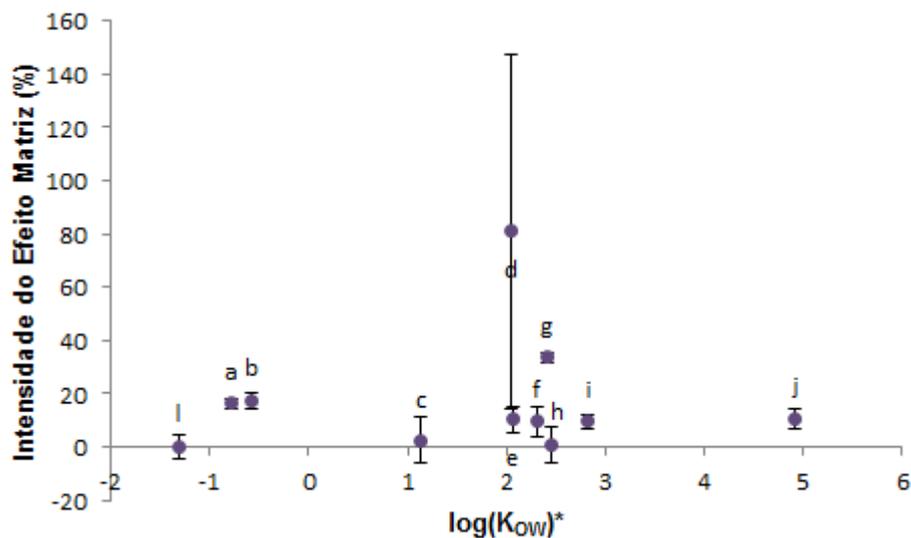


Figura 21. Correlação do coeficiente de partição octanol-água e o efeito matriz. a – aldicarbe sulfóxido, b – aldicarbe sulfona, c – aldicarbe, d – bromazepam, e – flunitrazepam, f – cocaína, g – clonazepam, h – carbamazepina, i – diazepam, j – amitriptilina, l – benzoilecgonina, *valores obtidos junto a SRC.¹¹⁸

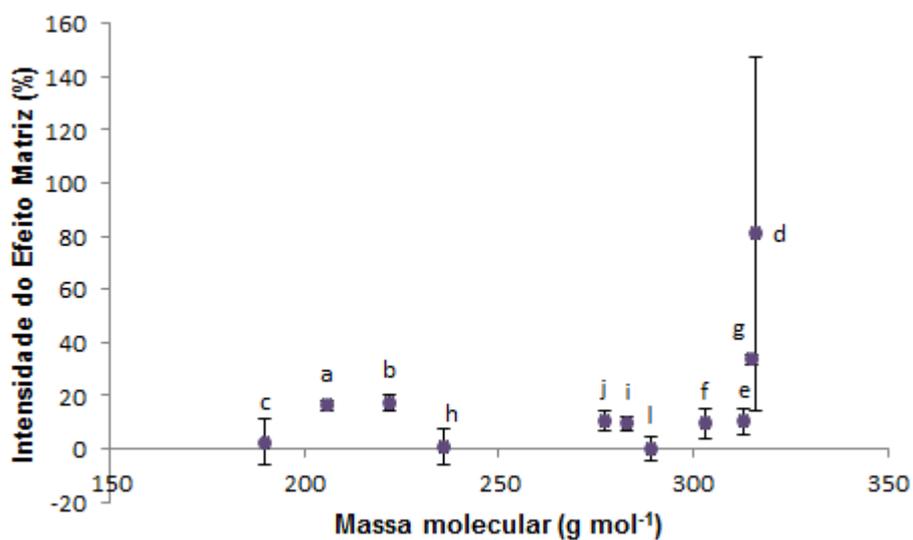


Figura 22. Correlação da massa molecular de cada analito e o efeito matriz. a – aldicarbe sulfóxido, b – aldicarbe sulfona, c – aldicarbe, d – bromazepam, e – flunitrazepam, f – cocaína, g – clonazepam, h – carbamazepina, i – diazepam, j – amitriptilina, l – benzoilecgonina.

A recuperação do método, dada pela Equação 2, compara a área do analito em matriz branca fortificada pré-extração com a fortificada pós-extração, de modo a quantificar as perdas no processo de extração. A Tabela 12 mostra a recuperação nos cinco níveis avaliados. O aldicarbe apresentou maior recuperação em todos os níveis, tendo ultrapassado 100% no segundo menor nível testado (0,8 ng mL⁻¹). O aldicarbe sulfóxido e a benzoilecgonina apresentaram recuperações médias menores que 50%.

Tabela 12. Recuperação após ESL-PBT nos 5 níveis testados.

Analito	Recuperação por nível de concentração (%)				
	1	2	3	4	5
Aldicarbe	95±26	118±18	93±11	68,8±6,7	78,4±5,5
Flunitrazepam	63,7±6,2	86,6±7,7	81,2±6,2	68,5±5,1	78,3±4,1
Diazepam	59,6±8,0	80,1±8,8	75,7±6,8	66,3±5,3	74,0±6,2
Amitriptilina	65±12	89±14	68,7±9,6	62,6±5,9	66,3±6,9
Carbamazepina	71±12	75,9±9,6	71,1±2,6	62,2±2,9	68,1±4,0
Aldicarbe sulfona	57,9±6,2	73,8±6,8	68,3±7,2	60,7±4,9	68,8±6,1
Clonazepam	56±12	73±11	67,1±9,0	66,3±9,1	66,1±5,4
Bromazepam	43,3±7,8	66±13	69,4±7,7	60,3±6,1	68,5±5,7
Cocaína	54,2±4,4	65,4±5,5	63,0±4,8	58,1±4,0	62,7±5,6
Aldicarbe sulfóxido	40,8±3,5	51,6±6,2	50,7±6,7	48,5±5,0	52,1±7,7
Benzoilecgonina	29,5±3,3	36,9±6,1	36,4±3,1	38,8±3,7	39,1±6,0

Valores em negrito indicam recuperações que não são significativamente ($\alpha=0,05$) diferentes de 100%.

Nível 1: 0,2 – 8,0 ng mL⁻¹; Nível 2: 0,4 – 16 ng mL⁻¹; Nível 3: 1,0 – 40 ng mL⁻¹; Nível 4: 6,0 – 120 ng mL⁻¹; Nível 5: 20 – 400 ng mL⁻¹.

A variação da recuperação em cada nível testado foi menor que 20% para todos os analitos, exceto o aldicarbe (CV = 20,5%), indicando uma consistência aceitável da recuperação ao longo das diferentes concentrações avaliadas. Embora a recuperação tenha se mostrado menor no menor nível testado para metade dos analitos, não há uma relação clara entre a concentração e a recuperação.

A eficiência do processo tem como objetivo avaliar os erros sistemáticos advindos do procedimento analítico, realizadas até a leitura instrumental da

resposta. Um valor de 100% indicaria que a resposta do analito não é afetada pelo procedimento, sendo quantificado com veracidade ideal. Os valores encontrados (Tabela 13) mostram que para o bromazepam, a soma do efeito matriz positivo (aumento do sinal analítico) e uma recuperação média de 60% resultaram em uma eficiência do processo superior 100% em três dos níveis testados. Para os demais analitos, a recuperação inferior a 100% e a supressão do sinal para grande parte dos analitos, resultaram em eficiências inferiores a 100% em todos os níveis avaliados, inclusive inferior a 70% para 8 analitos. Para nove analitos, a diferença de média entre as áreas dos analitos em solução e na matriz branca com fortificação pré-extração foi significativa em todos os níveis, com exceção do aldicarbe e do bromazepam.

Tabela 13. Eficiência do processo após ESL-PBT e análise por LC-MS/MS nos 5 níveis testados.

Analito	Eficiência do processo por nível de concentração (%)				
	1	2	3	4	5
Bromazepam	109±28	156±55	128±30	77±11	69,2±5,4
Aldicarbe	99±20	104±12	84±12	74,8±5,8	75,3±5,4
Carbamazepina	80±11	74,4±7,4	70,0±4,9	60,7±3,1	66,4±4,0
Flunitrazepam	62,6±6,0	74,0±6,8	72,3±6,9	60,1±5,1	69,3±4,2
Diazepam	56,2±8,9	72±11	68,6±8,3	58,1±4,2	66,7±5,5
Amitriptilina	60±11	76±12	64±11	53,8±5,2	59,3±4,7
Cocaína	54,5±5,4	56,9±6,1	55,1±6,4	51,1±4,3	55,8±5,1
Aldicarbe sulfona	48,1±4,4	58,3±8,9	57,0±6,1	49,7±4,6	59,5±4,8
Clonazepam	38,4±8,5	48,8±4,7	44,7±5,6	43,5±5,2	42,2±2,7
Aldicarbe sulfóxido	34,9±2,4	43,1±5,9	41,2±4,3	39,9±3,3	44,4±5,7
Benzoilecgonina	30,5±3,6	39,1±7,7	35,3±4,8	37,7±4,6	37,9±6,3

Valores em negrito não são estatisticamente significativos ($\alpha=0,05$).

Nível 1: 0,2 – 8,0 ng mL⁻¹; Nível 2: 0,4 – 16 ng mL⁻¹; Nível 3: 1,0 – 40 ng mL⁻¹;

Nível 4: 6,0 – 120 ng mL⁻¹; Nível 5: 20 – 400 ng mL⁻¹.

A presença de efeito matriz significativo para nove analitos e a eficiência do processo inferior a 70% para oito dos analitos tornou necessária a realização de curva analítica construída a partir de extratos de matriz branca fortificados com os analitos antes da extração (curva em matriz extraída).

4.5.3 Linearidade

A linearidade foi avaliada com a construção de uma curva analítica de 5 níveis em matriz branca fortificada pré-extração com seis replicatas autênticas. A homocedasticidade dos resíduos da curva foi avaliada após regressão por mínimos quadrados ordinários através do teste de Cochran e observação da distribuição dos resíduos. A Tabela 14 traz os valores calculados pelo teste de Cochran para cada analito. Para todos os analitos, os valores calculados foram maiores do que o valor tabelado, indicando heterocedasticidade dos resíduos, fato também visualizado através da observação do gráfico de resíduos (Figura 23) e da variância em função da concentração (Figura 24), ilustrados para o aldicarbe sulfona, indicando que a variância depende da concentração do analito.

Tabela 14. Teste de Cochran para homocedasticidade dos resíduos resultantes da regressão por mínimos quadrados ordinários para 5 níveis de concentração em sextuplicata.

Analito	C calculado
Aldicarbe	0,891
Aldicarbe sulfona	0,977
Aldicarbe sulfóxido	0,981
Amitriptilina	0,881
Benzoilecgonina	0,976
Bromazepam	0,930
Carbamazepina	0,732
Clonazepam	0,659
Cocaína	0,987
Diazepam	0,963
Flunitrazepam	0,917
$C_{\text{tab}, \alpha=0,05} = 0,506$	

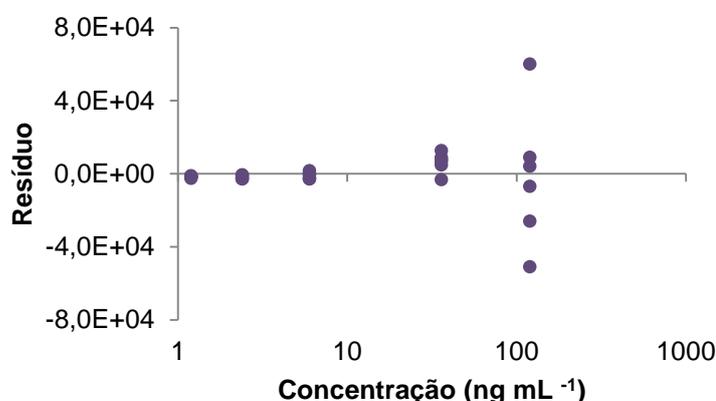


Figura 23. Resíduos da regressão por mínimos quadrados ordinários para o aldicarbe sulfona.

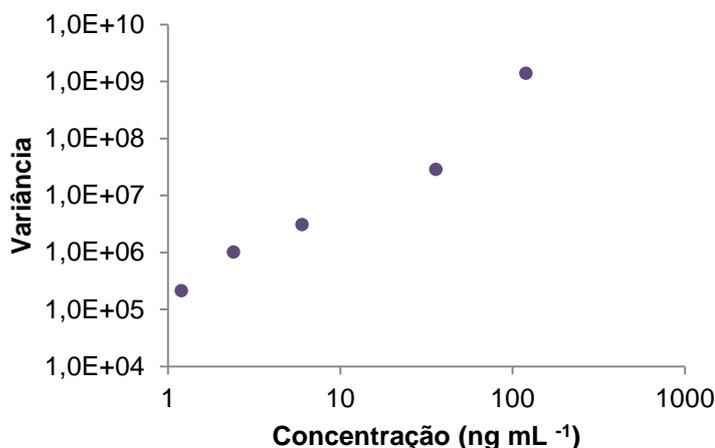


Figura 24. Variância dos resíduos da regressão por mínimos quadrados ordinários em função da concentração para o aldicarbe sulfona.

O melhor fator de ponderação para a regressão por mínimos quadrados ponderados foi então avaliado. A ponderação usual pelo inverso da variância é pouco conveniente para a análise de rotina, uma vez que, para o cálculo da variância, se torna necessária a análise de replicatas da curva de calibração a cada análise. Fatores de ponderação empíricos devem então ser avaliados de modo a aumentar a influência dos pontos com menor variância e diminuir a influência dos pontos com maior variância ao estimar os parâmetros da regressão.¹⁰⁰ Os parâmetros estimados normalmente estão próximos aos estimados pela regressão ordinária, porém o erro associado a eles é menor.¹²⁵

Para cada analito, o melhor fator de ponderação (que apresentou a menor soma dos valores absolutos do EPR ao longo dos cinco níveis de concentração; Apêndice I) está apresentado na Tabela 15, bem como a equação da reta de regressão e o coeficiente de correlação de Pearson e sua respectiva estatística t_{rw} .

Tabela 15. Regressão por mínimos quadrados ponderados.

Analito	Melhor peso	Equação da reta	r_w	t_{rw}
Aldicarbe	$1/y^2$	$y = 2,36E+04 x + 8,04E+02$	0,99729	71,7
Aldicarbe sulfona	$1/x^2$	$y = 5,06E+03 x + 8,32E+02$	0,99643	62,5
Aldicarbe sulfóxido	$1/x$	$y = 9,43E+03 x - 3,33E+03$	0,99231	42,4
Amitriptilina	$1/x^2$	$y = 1,03E+04 x + 1,61E+03$	0,98457	29,2
Benzoilecgonina	$1/x^2$	$y = 2,19E+04 x - 1,46E+03$	0,98335	28,6
Bromazepam	$1/y^2$	$y = 5,36E+03 x - 7,03E+02$	0,99008	37,3
Carbamazepina	$1/y^2$	$y = 5,16E+04 x + 5,69E+03$	0,99369	46,9
Clonazepam	$1/x^2$	$y = 4,97E+03 x + 3,65E+02$	0,98174	27,3
Cocaína	$1/x^2$	$y = 1,70E+04 x + 9,75E+02$	0,99358	46,5
Diazepam	$1/y^2$	$y = 8,05E+03 x - 6,01E+01$	0,99470	51,2
Flunitrazepam	$1/x$	$y = 1,54E+04 x + 5,24E+02$	0,99943	154

O coeficiente de correlação adaptado pela ponderação, que avalia o grau de dependência entre as duas variáveis foi calculado pela Equação 8.¹⁰⁰ Para aceitação da linearidade, foi calculado a estatística t_{rw} , através da Equação 9.¹⁰¹

$$r_w = \frac{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i y_i - \sum w_i x_i \cdot \sum w_i y_i}{\sqrt{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i^2 - (\sum w_i x_i)^2} \cdot \sqrt{\sum w_i \cdot \sum w_i y_i^2 - (\sum w_i y_i)^2}} \quad (8)$$

$$t_{rw} = |r_w| \sqrt{\frac{N - 2}{1 - r_w^2}} \quad (9)$$

Onde w_i é o peso para cada valor, x_i a concentração em cada nível, y_i é a área para cada replicata e N é o número de replicatas independentes utilizadas na regressão.

Os valores de t_{rw} calculados estão acima do valor de t crítico bilateral ($\alpha = 0,05$) para 28 graus de liberdade (27 para flunitrazepam e carbamazepina, que apresentaram um valor extremo eliminado pelo teste de Grubbs para o cálculo da regressão), demonstrando que existe uma correlação linear significativa entre as variáveis e, portanto, a faixa da curva de calibração é linear para todos os analitos.¹⁰¹

Para avaliação do ajuste do modelo de regressão linear ponderada, foi avaliado o gráfico de resíduos normalizados,¹⁰¹ uma vez que o teste de falta de ajuste através das médias quadráticas da ANOVA normalmente utilizados não é apropriado para regressão ponderada.¹¹⁹ O resíduo normalizado é dado pela Equação 10, na qual o desvio padrão do resíduo em cada nível ($s_{res,yi}$) é dado pela Equação 11, onde $y_{i,j}$ é a área obtida para cada replicata em cada nível, \hat{y}_i é a área estimada pela regressão ponderada para cada nível e n é o número de replicatas autênticas em cada nível.

$$\text{resíduo}_{\text{normalizado}} = \frac{\text{resíduo}}{\text{desvio padrão do resíduo em cada nível}} \quad (10)$$

$$s_{res,yi} = \sqrt{\frac{\sum (y_{i,j} - \hat{y}_i)^2}{n - 1}} \quad (11)$$

Quando os resíduos normalizados apresentaram distribuição aleatória e envoltório retangular, o modelo foi considerado ajustado aos dados, demonstrando que a ponderação foi efetiva em compensar pela heterocedasticidade dos dados experimentais. Para todos os analitos, os resíduos normalizados não apresentaram padrão indicativo de falta de ajuste, como formato de um cone crescente (indicando que a heterocedasticidade não foi corretamente estimada pelas replicatas) ou em forma de U (indicando a necessidade de uma regressão polinomial com grau superior a um), conforme ilustrado na Figura 25 para o aldicarbe sulfona.

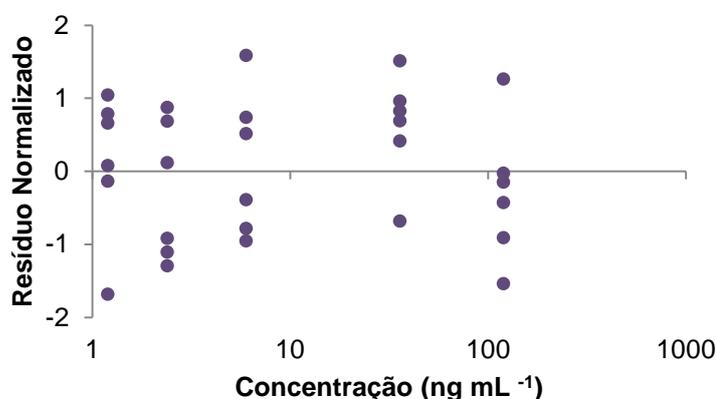


Figura 25. Resíduos normalizados da regressão por mínimos quadrados ponderados (utilizando ponderação $1/x^2$) para o aldicarbe sulfona.

Durante os ensaios de linearidade, foi avaliada a razão entre as áreas obtidas para o íon de quantificação e o íon de confirmação e variação do tempo de retenção dos analitos, apresentados na Tabela 16. A razão entre os íon se manteve relativamente constante, com CV menor que 20% para todos os analitos, sendo maior (17,7 %) para o clonazepam, e menor (8,34%) para a amitriptilina. O tempo de retenção dos analitos sofreu variação inferior a 1% para grande parte dos analitos, sendo superior a 1% apenas para os primeiros compostos a eluïrem, aldicarbe sulfona (1,23%) e aldicarbe sulfóxido (5,30%), embora esta variação ainda seja baixa.

4.5.4 Precisão e Exatidão

Os resultados dos ensaios de precisão estão apresentados na Tabela 16. Todos os analitos apresentaram CV menor que 20% para repetitividade e menor que 30% para precisão intermediária nos diferentes níveis testados, demonstrando que o método apresenta precisão satisfatória para a faixa de concentração avaliada.¹⁰¹

A exatidão nestes ensaios foi avaliada através da comparação da concentração esperada presente após a fortificação com a concentração calculada utilizando-se a regressão por mínimos quadrados ponderados construída a partir de curva em matriz extraída. A exatidão para os níveis de concentração mais elevados (Tabela 16) variou de 87,7 a 108%, demonstrando que o método apresenta exatidão satisfatória em concentrações mais elevadas. No menor nível testado, a exatidão variou de 88,1 a 117% para grande parte dos analitos, dentro da faixa de 50 a 120% recomendada,¹⁰¹ com exceção da amitriptilina (122%), carbamazepina (127%) e clonazepam (126%), embora estes ainda apresentem exatidão aceitável considerando o baixo nível de concentração avaliado.

Tabela 16. Razão iônica e tempo de retenção resultantes dos ensaios de linearidade e exatidão e precisão obtidos nos ensaios de repetitividade e precisão intermediária com matriz branca fortificada pré-extração.

Analito	Razão iônica (n= 30) Média (CV%)	Tempo de retenção (min, n= 30) Média (CV%)	Repetitividade (n=6)			Precisão Intermediária (n=13)	
			Nível 1	Nível 3	Nível 5	Nível 1	Nível 3
			Exatidão (CV%)	Exatidão (CV%)	Exatidão (CV%)	Exatidão (CV%)	Exatidão (CV%)
Aldicarbe	1,43 (12,5)	6,33 (0,13)	88,1 (9,05)	104 (7,47)	102 (4,55)	93,6 (9,73)	95,7 (11,4)
Aldicarbe sulfona	1,00 (9,09)	2,00 (1,23)	111 (3,59)	102 (6,28)	99,4 (6,68)	102 (13,7)	97,9 (9,70)
Aldicarbe sulfóxido	1,44 (16,1)	1,67 (5,30)	98,7 (8,13)	95,5 (7,24)	107 (12,0)	91,4 (10,0)	104 (16,3)
Amitriptilina	1,45 (8,34)	16,6 (0,43)	122 (14,8)	100 (10,5)	98,9 (3,74)	122 (12,4)	102 (10,5)
Benzoilecgonina	2,92 (12,5)	4,50 (0,31)	107 (9,61)	87,7 (7,27)	98,0 (15,0)	113 (10,8)	91,7 (13,4)
Bromazepam	1,25 (15,0)	8,53 (0,28)	100 (15,4)	108 (6,80)	99,7 (8,69)	103 (14,3)	98,5 (14,8)
Carbamazepina	4,69 (9,14)	9,21 (0,20)	127 (18,2)	105 (2,83)	100 (5,36)	101 (30,0)	97,8 (10,3)
Clonazepam	4,03 (17,7)	9,71 (0,26)	126 (16,9)	107 (7,80)	93,0 (7,34)	117 (15,7)	94,5 (15,4)
Cocaína	5,18 (12,1)	5,83 (0,22)	100 (4,81)	89,1 (5,20)	100 (8,90)	107 (9,42)	89,9 (8,74)
Diazepam	1,63 (10,3)	14,2 (0,18)	110 (11,4)	102 (8,40)	101 (7,12)	106 (14,2)	94,4 (12,1)
Flunitrazepam	2,79 (13,8)	9,99 (0,16)	110 (6,51)	101 (4,81)	99,1 (4,89)	106 (13,5)	90,6 (12,1)

Nível 1: 0,2 – 8,0 ng mL⁻¹; Nível 3: 1,0 – 40 ng mL⁻¹; Nível 5: 20 – 400 ng mL⁻¹.

4.5.5 Limites de quantificação e detecção

O limite de quantificação foi determinado como o menor nível testado que apresentou CV menor que 20% no ensaio de repetitividade e menor que 30% nos ensaios de precisão intermediária. Os valores obtidos (Tabela 17) apresentam mesma ordem de grandeza de outros métodos validados neste tipo de matriz,^{2,26,33,36,43,59,60} e estão muito abaixo dos valores encontrados nos casos reais relatados na literatura, indicando que o método desenvolvido é suficientemente sensível para aplicação nas análises de amostras oriundas de cadáveres suspeitos de intoxicação.

Um baixo limite de quantificação é desejável para que o método seja capaz de quantificar xenobióticos mesmo em casos de coingestão com outras substâncias, onde a concentração da substância é bastante inferior a concentração letal, mas sua determinação ainda pode auxiliar na elucidação da *causa mortis*.³⁶ O limite de detecção do método corresponde a um terço do limite de quantificação estabelecido.

Tabela 17. Valores de limite de quantificação (LOQ) do método ESL-PBT e análise por LC-MS/MS.

Analito	LOQ	
	No extrato (ng mL ⁻¹)	Na larva (ng g ⁻¹)
Aldicarbe sulfóxido	8,0	40
Aldicarbe sulfona	1,2	6,0
Amitriptilina	0,6	3,0
Clonazepam	0,6	3,0
Bromazepam	0,5	2,5
Diazepam	0,5	2,5
Flunitrazepam	0,4	2,0
Cocaína	0,4	2,0
Benzoilecgonina	0,4	2,0
Aldicarbe	0,4	2,0
Carbamazepina	0,2	1,0

4.6 Análise de amostras reais

O método validado foi utilizado para análise de amostras reais coletadas de cadáveres em avançado estado de putrefação que apresentavam colonização por larvas no ato de entrada no IML-DF. Foram coletadas 27 amostras, com massa entre 0,30 e 16,80 g. Destas amostras, cinco não possuíam identificação visível que possibilitasse a obtenção de informação relacionada à sua origem junto aos registros do IML. Das 22 amostras identificadas, 17 originaram de cadáveres do sexo masculino e cinco do sexo feminino. A idade dos indivíduos identificados variou de 13 a 53 anos (média 32,6 e moda 37), sendo que em 5 casos não foi relatada a idade. A Figura 26 mostra a causa da morte dos 22 indivíduos com amostras identificadas. Testes toxicológicos com tecidos ou fluidos não foram realizados em nenhum destes casos devido ao avançado grau de putrefação dos cadáveres. Mais da metade (54,5%) não teve a causa da morte determinada, provavelmente em função do avançado estado de putrefação dos cadáveres. Estudo anterior conduzido com dados do IML-DF mostrou que menos de 6% das mortes violentas ocorridas entre 2006 e 2008 não tiveram a causa morte determinada.⁶⁸

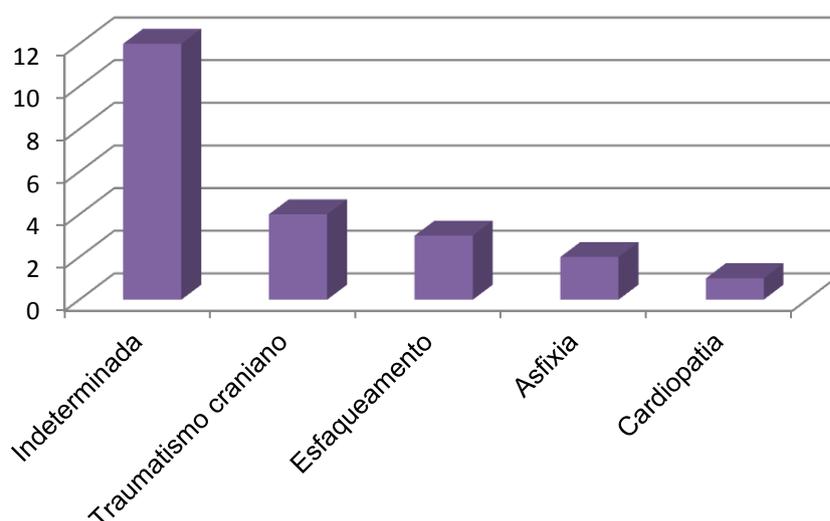


Figura 26. Causa da morte para as 22 amostras identificadas analisadas.

Extratos de amostras positivas, mas com níveis menores que o LOQ, foram concentrados 5 vezes e reanalisados. As que se apresentaram acima da faixa de linearidade do método foram diluídas 3x e reanalisadas.

A Tabela 18 resume os 10 casos positivos encontrados (37 % das amostras analisadas), sendo duas positivas para mais de um analito investigado.

Tabela 18. Concentrações encontradas nas amostras entomológicas positivas para ao menos um analito investigado.

Amostra	Característica da amostra	Massa analisada, g	Concentração do analito (ng g ⁻¹)				
			BZE	COC	CRB	DZP	AMT
A	Homem, 19 anos, morto por esfaqueamento	1,02	0,84	1,00	< LOQ	3,39	ND
B	Sem identificação	1,01	ND	ND	ND	4,43	ND
C	Mulher, idade e causa morte indeterminadas	1,00	177	392	ND	ND	ND
D	Homem, idade e causa morte indeterminadas	1,02	4,36	ND	ND	ND	ND
E	Sem identificação	1,01	ND	ND	ND	5,89	ND
F	Sem identificação	0,30	2,44	ND	ND	ND	ND
G	Homem, 51 anos, causa da morte indeterminada	0,55; 0,57	ND	ND	2,21; 503	ND	ND
H	Mulher, 47 anos, causa da morte indeterminada	1,01	ND	4,63	ND	ND	ND
I	Sem identificação	1,03	ND	ND	ND	6,70	ND
J	Homem, idade e causa da morte indeterminada	0,39	ND	ND	ND	ND	16,3

BZE – benzoilecgonina, COC – cocaína, CRB – carbamazepina, DZP – diazepam, AMT – amitriptilina, ND – não detectado.

A amostra A, coletada de um homem de 19 anos morto por esfaqueamento, continha diazepam, benzoilecgonina, cocaína e traços de carbamazepina (< LOQ após concentração do extrato 5 vezes). Quatro amostras

(14,8%) foram positivas para diazepam (3,39 a 6,70 ng g⁻¹). A frequência de detecção de benzodiazepínicos neste estudo se mostra bastante superior a encontrada para benzodiazepínicos em casos *post-mortem* no Distrito Federal entre 2006 e 2008 (4,6%).⁶⁸ No melhor de nosso conhecimento, estas são as primeiras amostras entomológicas positivas para diazepam, apesar de métodos para determinação de medicamentos desta classe neste tipo de matriz tenham sido desenvolvidos.^{23,43}

Estudos mostram que a presença de diazepam durante o desenvolvimento larval aumenta o peso médio e a taxa de crescimento de insetos como *C. albiceps* e *C. putoria*.²³ A determinação de diazepam em imaturos encontrados em cadáveres não apenas auxilia na elucidação da *causa mortis* como também indica a necessidade de ajuste no cálculo do intervalo decorrido após a morte, se este foi feito com base no desenvolvimento dos espécimes entomológicos.

A amostra G foi positiva para carbamazepina, representando o primeiro caso relatado de determinação de carbamazepina em amostras entomológicas, bem como o primeiro método desenvolvido para tal fim. Duas replicatas foram coletadas em potes diferentes, sem informação do local da coleta de cada replicata. As replicatas foram analisadas separadamente para evitar possível diluição dos analitos. As concentrações encontradas nas duas replicatas diferiram em duas ordens de grandeza, reforçando estudos anteriores que indicam ausência de repetitividade de larvas coletadas de diferentes locais do cadáver.^{8,33,126} Em casos de suspeita de intoxicação, a análise de amostras coletadas de diferentes regiões do cadáver possibilita a obtenção de informações a cerca da distribuição do analito nos tecidos corporais, o que pode indicar se a exposição à substância foi recente ou remota.

Cinco amostras continham cocaína e/ou seu metabólito benzoilecgonina (18,5%). Nos dois casos onde ambos analitos foram detectados (A e C), a concentração do metabólito foi menor. A amostra A continha também diazepam e a amostra C apresentou as maiores concentrações no estudo. A concentração de cocaína encontrada é maior que a reportada por Manhoff *et al.*⁵¹ em amostra de tecido mumificado e fezes de besouro (90 ng g⁻¹), porém menor que a encontrada por Nolte *et al.*⁵² na análise de larvas coletadas no cadáver de um usuário de drogas

de abuso (490 ng g^{-1}), que apresentou também benzoilecgonina (30 ng g^{-1}), numa proporção com relação a cocaína menor que a encontrada neste estudo. Concentrações menores de benzoilecgonina ou ausência deste metabolito (amostra H) indicam que a exposição a cocaína tenha ocorrido nas horas imediatamente anteriores ao óbito, podendo auxiliar na construção do cenário e na possível identificação da causa da morte. Duas amostras (D e F) apresentaram apenas benzoilecgonina, uma indicação da exposição remota à droga, indicando que houve tempo para a metabolização antes do óbito.

A amostra J apresentou amitriptilina na concentração de $16,3 \text{ ng g}^{-1}$. Amitriptilina já havia sido quantificada por Miller *et al.*¹⁰ em pupários de mosca e exúvias e fezes de besouro em um caso de morte por intoxicação múltipla (3400 a 5400 ng g^{-1}) e em larvas de mosca por Tracqui *et al.* (133 ng g^{-1}).⁸

Aldicarbe, normalmente na forma do raticida ilegal chumbinho, tem sido reportado como uma das principais substâncias envolvidas em casos letais envolvendo substâncias químicas no Distrito Federal,⁶⁸ principalmente casos de suicídio.⁶⁹ Nos casos investigados pelo IML-DF,⁶⁸ este pesticida foi detectado no conteúdo gástrico do indivíduo em 13,3% dos casos analisados. Este estudo porém, não detectou nenhuma amostra de larva contendo aldicarbe, ou seus metabólitos aldicarbe sulfona ou sulfóxido, possivelmente em função do pequeno número de amostras analisadas ou de algum efeito do aldicarbe sobre a colonização do cadáver ou o desenvolvimento das moscas.

Nenhuma amostra analisada apresentou os benzodiazepínicos clonazepam, bromazepam e flunitrazepam, este último comumente utilizado como “boa noite cinderela”. A ausência de alguma substância em larvas obtidas de cadáveres em putrefação não deve ser interpretada como sua ausência nos tecidos, uma vez que o acúmulo de xenobióticos nas larvas depende de fatores como o local do cadáver no qual a larva se alimenta, o tropismo dos xenobióticos por diferentes tecidos humanos, a capacidade da larva de metabolizar estas substâncias, o efeito do xenobióticos no desenvolvimento larval, além da concentração do xenobióticos nos tecidos humanos.^{14,32,34,55,124}

4.6.1 Controle de qualidade interno

As amostras de controle de qualidade interno analisadas junto as diferentes bateladas de amostras reais apresentaram exatidão e precisão adequadas (Figura 27), indicando que o método validado é confiável para análise das amostras reais. Embora a construção do *boxplot* das 12 replicatas evidencie dois pontos extremos, um para a amitriptilina e um para o aldicarbe sulfona, o teste de Grubbs não demonstrou nenhum ponto extremo significativamente diferente ($\alpha=0,05$) e os 2 pontos foram mantidos, sendo que estes analitos apresentaram CVs de 9,24% e 7,93% respectivamente. A exatidão média variou de 96% para o bromazepam a 114% para a carbamazepina e a precisão, de 5% para o flunitrazepam a 15% para a carbamazepina.

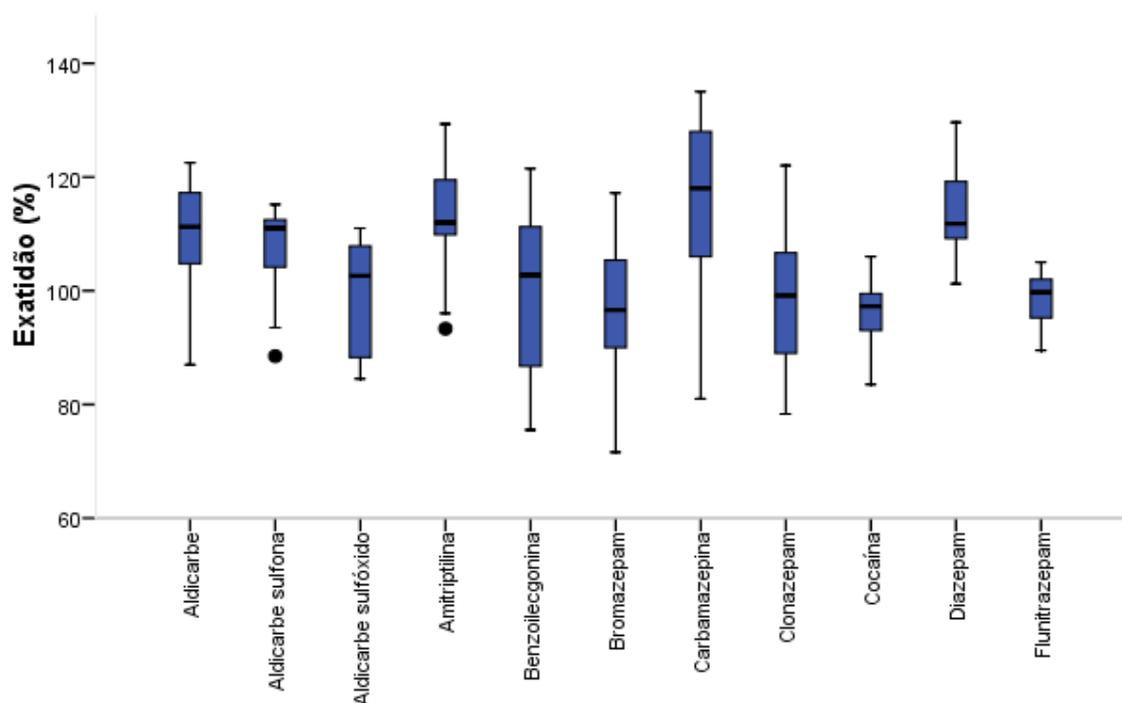


Figura 27. Exatidão para as 12 amostras de controle de qualidade extraídas junto às amostras reais.

5. CONCLUSÕES

O desenvolvimento de métodos multiclasses rápidos e sensíveis para análise de larvas ou insetos necrófagos é importante em casos forenses onde o cadáver se encontra em avançado estado de putrefação, quando normalmente não são encontrados tecidos humanos. O método de extração ESL-PBT e análise por LC-MS/MS otimizado neste estudo foi validado para a determinação simultânea de 11 substâncias em larvas de insetos necrófagos. O método proposto é simples, rápido e com baixo gasto de solvente, se mostrando adequado para aplicação em amostras reais coletadas de cadáveres suspeitos de intoxicação. Este é o primeiro método multiclasses validado para análise de espécimes entomológicos.

O método validado foi aplicado com êxito para análise de 27 amostras de larvas coletadas pelo IML-DF de cadáveres em avançado estado de putrefação. Em nenhum dos casos havia informação de análises toxicológicas, e a maioria não teve a causa da morte determinada após a perícia. Dez das amostras analisadas foram positivas para ao menos uma substância investigada e uma das amostras continha substâncias de diferentes classes químicas. Metade dos casos positivos apresentaram cocaína ou seu principal metabólito, benzoilecgonina, em concentrações quantificáveis, apesar de sua baixa meia vida *in vivo* e rápida degradação, tanto enzimática quanto não enzimática.

Seis analitos investigados não foram detectados em quaisquer amostras analisadas: bromazepam, clonazepam, flunitrazepam, e aldicarbe e seus metabólitos, aldicarbe sulfona e aldicarbe sulfóxido, mesmo o aldicarbe sendo o principal responsável por intoxicações letais no Distrito Federal.

Este é o primeiro estudo brasileiro de investigação de intoxicação pelo uso de amostras entomotoxicológicas, sendo o segundo no mundo a utilizar um método validado para tal fim. Os achados deste estudo sugerem que o método é capaz de suprir a demanda original da Polícia Civil, ampliando o arsenal analítico a disposição da perícia para casos de putrefação avançada. Nesses casos, recomenda-se ao IML a coleta de larvas, preferencialmente, do terceiro instar (larvas maiores), em um pote plástico, como um coletor universal normalmente utilizado para amostras biológicas. Sempre que possível, recomenda-se coletar ao menos até a marca de 10 mL destes coletores, para garantir quantidade suficiente de amostra

para a análise. A amostra deve ser armazenada a -20°C , ou quando disponível, em freezer -80° , para melhor preservar sua integridade. É essencial que a amostra seja claramente identificada, e que esta identificação não seja comprometida durante o armazenamento da amostra. Além do número do laudo, a identificação deve conter informação da data e local de coleta da amostra (região abdominal, cérebro, membros).

REFERÊNCIAS

1. Drummer, O. H.; Gerostamoulos, J. Postmortem drug analysis: analytical and toxicological aspects. **Ther Drug Monit**, v. 24, n. 2, p. 199-209, 2002.
2. Kharbouche, H.; Augsburger, M.; Cherix, D.; Sporkert, F.; Giroud, C.; Wyss, C.; Champod, C.; Mangin, P. Codeine accumulation and elimination in larvae, pupae, and imago of the blowfly *Lucilia sericata* and effects on its development. **Int J Legal Med**, v. 122, n. 3, p. 205-211, 2008.
3. Byrd, J. H.; Peace, M. R. Entomotoxicology: Drugs, Toxins, and Insects in: **Forensic Chemistry Handbook**, p. 483-499, 2012.
4. Gosselin, M.; Wille, S. M R.; Fernandez, M. M. R.; Di Fazio, V.; Samyn, N.; De Boeck, G.; Bourel, B. Entomotoxicology, experimental set-up and interpretation for forensic toxicologists. **Forensic Sci Int**, v. 208, n. 1-3, p. 1-9, 2011.
5. Goff, M. L.; Brown, W. A.; Omori, A. I.; LaPointe, D. A. Preliminary observations of the effects of phencyclidine in decomposing tissues on the development of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae). **J Forensic Sci**, v. 39, n. 1, p. 123-128, 1994.
6. Sohal, R.; Lamb, R. Intracellular deposition of metals in the midgut of the adult housefly, *Musca domestica*. **J Insect Physiol**, v. 23, n. 11, p. 1349-1354, 1977.
7. Sohal, R.; Lamb, R. Storage-excretion of metallic cations in the adult housefly, *Musca domestica*. **J Insect Physiol**, v. 25, n. 2, p. 119-124, 1979.
8. Tracqui, A.; Keyser-Tracqui, C.; Kintz, P.; Ludes, B. Entomotoxicology for the forensic toxicologist: much ado about nothing? **Int J Legal Med**, v. 118, n. 4, p. 194-196, 2004.
9. Amendt, J.; Richards, C. S.; Campobasso, C. P.; Zehner, R.; Hall, M J R. Forensic entomology: applications and limitations. **Forensic Sci Med Pathol**, v. 7, n. 4, p. 379-392, 2011.
10. Miller, M. L.; Lord, W. D.; Lee Goff, M.; Donnelly, B. Isolation of amitriptyline and nortriptyline from fly puparia (Phoridae) and beetle exuviae (Dermestidae) associated with mummified human remains. **J Forensic Sci**, v. 39, p. 1305-1313, 1994.
11. Smith, K. G. **A manual of forensic entomology**. Oxford, 1986.
12. Amendt, J.; Krettek, R.; Zehner, R. Forensic entomology. **Naturwissenschaften**, v. 91, n. 2, p. 51-65, 2004.
13. Bourel, B.; Tournel, G.; Hédouin, V.; Goff, M. L.; Gosset, D. Determination of drug levels in two species of necrophagous Coleoptera reared on substrates containing morphine. **J Forensic Sci**, v. 46, n. 3, p. 600-603, 2001.
14. Kintz, P.; Godelar, B.; Tracqui, A.; Mangin, P.; Lugnier, A. A.; Chaumont, A. J. Fly larvae: a new toxicological method of investigation in forensic medicine. **J Forensic Sci**, v. 35, n. 1, p. 204-207, 1990.
15. Goff, M. L.; Brown, W. A.; Hewadikaram, K. A.; Omori, A. I. Effect of heroin in decomposing tissues on the development rate of *Boettcherisca peregrina* (Diptera, Sarcophagidae) and implications of this effect on estimation of

- postmortem intervals using arthropod development patterns. **J Forensic Sci**, v. 36, n. 2, p. 537-542, 1991.
16. Goff, M. L.; Brown, W. A.; Omori, A. I. Preliminary observations of the effect of methamphetamine in decomposing tissues on the development rate of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae) and implications of this effect on the estimations of postmortem intervals. **J Forensic Sci**, v. 37, n. 3, p. 867-872, 1992.
 17. Goff, M. L.; Brown, W. A.; Omori, A. I.; LaPointe, D. A. Preliminary observations of the effect of methamphetamine in decomposing tissues on the development rate of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae). **J Forensic Sci**, v. 39, n. 1, p. 123-128, 1994.
 18. Simkiss, K.; Daniels, S.; Smith, R. H. Effects of population density and cadmium toxicity on growth and survival of blowflies. **Environ Pollut**, v. 81, n. 1, p. 41-45, 1993.
 19. Goff, M. L.; Brown, W. A.; Omori, A. I.; LaPointe, D. A. Preliminary observations of the effects of amitriptyline in decomposing tissues on the development of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae) and implications of this effect to estimation of postmortem interval. **J Forensic Sci**, v. 38, n. 2, p. 316-322, 1993.
 20. O'Brien, C.; Turner, B. Impact of paracetamol on *Calliphora vicina* larval development. **Int J Legal Med**, v. 118, n. 4, p. 188-189, 2004.
 21. Musvasva, E.; Williams, K. A.; Muller, W. J.; Villet, M. H. Preliminary observations on the effects of hydrocortisone and sodium methohexital on development of *Sarcophaga (Curranella) tibialis* Macquart (Diptera: Sarcophagidae), and implications for estimating post mortem interval. **Forensic Sci Int**, v. 120, n. 1-2, p. 37-41, 2001.
 22. Oliveira, H. G.; Gomes, G.; Morlin Jr, J. J.; Von Zuben, C. J.; Linhares, A. X. The effect of Buscopan on the development of the blow fly *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae). **J Forensic Sci**, v. 54, n. 1, p. 202-206, 2009.
 23. Carvalho, L. M.; Linhares, A. X.; Trigo, J. R. Determination of drug levels and the effect of diazepam on the growth of necrophagous flies of forensic importance in southeastern Brazil. **Forensic Sci Int**, v. 120, n. 1-2, p. 140-144, 2001.
 24. Bourel, B.; Hédouin, V.; Martin-Bouyer, L.; Bécart, A.; Tournel, G.; Deveaux, M.; Gosset, D. Effects of morphine in decomposing bodies on the development of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). **J Forensic Sci**, v. 44, n. 2, p. 354-358, 1999.
 25. George, K. A.; Archer, M. S.; Green, L. M.; Conlan, X. A.; Toop, T. Effect of morphine on the growth rate of *Calliphora stygia* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) and possible implications for forensic entomology. **Forensic Sci Int**, v. 193, n. 1-3, p. 21-25, 2009.
 26. Liu, X.; Shi, Y.; Wang, H.; Zhang, R. Determination of malathion levels and its effect on the development of *Chrysomya megacephala* (Fabricius) in South China. **Forensic Sci Int**, v. 192, n. 1-3, p. 14-18, 2009.

27. Yan-Wei, S.; Xiao-Shan, L.; Hai-Yang, W.; Run-Jie, Z. Effects of malathion on the insect succession and the development of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) in the field and implications for estimating postmortem interval. **Am J Forensic Med Pathol**, v. 31, n. 1, p. 46-51, 2010.
28. Gunatilake, K.; Goff, M. L. Detection of organophosphate poisoning in a putrefying body by analyzing arthropod larvae. **J Forensic Sci**, v. 34, n. 3, p. 714-716, 1989.
29. Rashid, R. A.; Osman, K.; Ismail M. I.; Zuha R. M.; Hassan R. A. Determination of malathion levels and the effect of malathion on the growth of *Chrysomya megacephala* (Fabricius) in malathion-exposed rat carcass. **Trop Biomed**, v. 25, n. 3, p. 184-190, 2008.
30. Sadler, D. W.; Fuke, C.; Court, F.; Pounder, D. J. Drug accumulation and elimination in *Calliphora vicina* larvae. **Forensic Sci Int**, v. 71, n. 3, p. 191-197, 1995.
31. Introna, F.; Campobasso, C. P.; Goff, M. L. Entomotoxicology. **Forensic Sci Int**, v. 120, n. 1-2, p. 42-47, 2001.
32. Wilson, Z.; Hubbard, S.; Pounder, D. J. Drug analysis in fly larvae. **Am J Forensic Med Pathol**, v. 14, n. 2, p. 118-120, 1993.
33. Gosselin, M.; Fernandez, M. M. R.; Wille, S. M R.; Samyn, N.; De Boeck, G.; Bourel, B. Quantification of methadone and its metabolite 2-ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine in third instar larvae of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **J Anal Toxicol**, v. 34, n. 7, p. 374-380, 2010.
34. Sadler, D. W.; Chuter, G.; Seneveratne, C.; Pounder, D. J. Barbiturates and analgesics in *Calliphora vicina* larvae. **J Forensic Sci**, v. 42, n. 6, p. 1214-1215, 1997.
35. Bourel, B.; Fleurisse, L.; Hédouin, V.; Cailliez, J. C.; Creusy, C.; Gosset, D.; Goff, M. L. Immunohistochemical contribution to the study of morphine metabolism in Calliphoridae larvae and implications in forensic entomotoxicology. **J Forensic Sci**, v. 46, n. 3, p. 596-599, 2001.
36. Bushby, S. K.; Thomas, N.; Priemel, P. A.; Coulter, C. V.; Rades, T.; Kieser, J. A. Determination of methylphenidate in Calliphorid larvae by liquid-liquid extraction and liquid chromatography mass spectrometry--forensic entomotoxicology using an in vivo rat brain model. **J Pharm Biomed Anal**, v. 70, p. 456-461, 2012.
37. Hédouin, V.; Bourel, B.; Martin-Bouyer, L.; Bécart, A.; Tournel, G.; Deveaux, M.; Gosset, D. Determination of drug levels in larvae of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) reared on rabbit carcasses containing morphine. **J Forensic Sci**, v. 44, n. 2, p. 351-353, 1999.
38. Pien, K.; Laloup, M.; Pipeleers-Marichal, M.; Grootaert, P.; De Boeck, G.; Samyn, N.; Boonen, T.; Vits, K.; Wood, M. Toxicological data and growth characteristics of single post-feeding larvae and puparia of *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) obtained from a controlled nordiazepam study. **Int J Legal Med**, v. 118, n. 4, p. 190-193, 2004.

39. Barnes, K. M.; Gennard, D. E.; Dixon, R. A. An assessment of the antibacterial activity in larval excretion/secretion of four species of insects recorded in association with corpses, using *Lucilia sericata* Meigen as the marker species. **Bull Entomological Res**, v. 100, n. 6, p. 635-640, 2010.
40. Definis-Gojanović, M.; Sutlović, D.; Britvić, D.; Kokan, B. Drug analysis in necrophagous flies and human tissues. **Arh Hig Rada Toksikol**, v. 58, n. 3, p. 313-316, 2007.
41. Kintz, P.; Tracqui, A.; Ludes, B.; Waller, J.; Boukhabza, A.; Mangin, P.; Lugnier, A. A.; Chaumont, A. J. Fly larvae and their relevance in forensic toxicology. **Am J Forensic Med Pathol**, v. 11, n. 1, p. 63-65, 1990.
42. Introna, F.; Lo Dico, C.; Caplan, Y. H.; Smialek, J. E. Opiate analysis in cadaveric blowfly larvae as an indicator of narcotic intoxication. **J Forensic Sci**, v. 35, n. 1, p. 118-122, 1990.
43. Wood, M.; Laloup, M.; Pien, K.; Samyn, N.; Morris, M.; Maes, R A A.; de Bruijn, E. A.; Maes, V.; De Boeck, G. Development of a rapid and sensitive method for the quantitation of benzodiazepines in *Calliphora vicina* larvae and puparia by LC-MS-MS. **J Anal Toxicol**, v. 27, n. 7, p. 505-512, 2003.
44. Gunn, J. A.; Shelley, C.; Lewis, S. W.; Toop, T.; Archer, M. The determination of morphine in the larvae of *Calliphora stygia* using flow injection analysis and HPLC with chemiluminescence detection. **J Anal Toxicol**, v. 30, n. 8, p. 519-523, 2006.
45. El-Samad, L. M.; El-Moaty, Z. A.; Makemer, H. M. Effects of Tramadol on the Development of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) and Detection of the Drug Concentration in Postmortem Rabbit Tissues and Larvae. **J Entomol**, v. 8, 2011.
46. Bourel, B.; Tournel, G.; Hedouin, V.; Deveaux, M.; Goff, M. L.; Gosset, D. Morphine extraction in necrophagous insects remains for determining ante-mortem opiate intoxication. **Forensic Sci Int**, v. 120, n. 1-2, p. 127-131, 2001.
47. Parry, S.; Linton, S. M.; Francis, P. S.; O'Donnell, M. J.; Toop, T. Accumulation and excretion of morphine by *Calliphora stygia*, an Australian blow fly species of forensic importance. **J Insect Physiol**, v. 57, n. 1, p. 62-73, 2011.
48. Sadler, D. W.; Richardson, J.; Haigh, S.; Bruce, G.; Pounder, D. J. Amitriptyline accumulation and elimination in *Calliphora vicina* larvae. **Am J Forensic Med Pathol**, v. 18, n. 4, p. 397-403, 1997.
49. Beyer, J. C.; Enos, W. F.; Stajić, M. Drug identification through analysis of maggots. **J Forensic Sci**, v. 25, n. 2, p. 411-412, 1980.
50. Kintz, P.; Tracqui, A.; Mangin, P. Toxicology and fly larvae on a putrefied cadaver. **J Forensic Sci Soc**, v. 30, n. 4, p. 243-246, 1990.
51. Manhoff, D. T.; Hood, I.; Caputo, F.; Perry, J.; Rosen, S.; Mirchandani, H. G. Cocaine in decomposed human remains. **J Forensic Sci**, v. 36, n. 6, p. 1732-1735, 1991.
52. Nolte, K. B.; Pinder, R. D.; Lord, W. D. Insect larvae used to detect cocaine poisoning in a decomposed body. **J Forensic Sci**, v. 37, n. 4, p. 1179-1185, 1992.

53. Wohlenberg, N.; Lindsey, T.; Backer, R.; Nolte, K. Nortriptyline in maggots, muscle, hair, skin and bone in skeletonized remains. **TIAFT Bulletin**, v. 22, n. 3, p. 19-22, 1992.
54. Kintz, P.; Tracqui, A.; Mangin, P. Analysis of opiates in fly larvae sampled on a putrefied cadaver. **J Forensic Sci Soc**, v. 34, n. 2, p. 95-97, 1994.
55. Hédouin, V.; Bourel, B.; Bécart, A.; Tournel, G.; Deveaux, M.; Goff, M. L.; Gosset, D. Determination of drug levels in larvae of *Protophormia terraenovae* and *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) reared on rabbit carcasses containing morphine. **J Forensic Sci**, v. 46, n. 1, p. 12-14, 2001.
56. Levine, B.; Golle, M.; Smialek, J. E. An unusual drug death involving maggots. **Am J Forensic Med Pathol**, v. 21, n. 1, p. 59-61, 2000.
57. Wolff, M.; Builes, A.; Zapata, G.; Morales, G.; Benecke, M. Detection of Parathion (O, O-diethyl O-(4-nitrophenyl) phosphorothioate) by HPLC in insects of forensic importance in Medellín, Colombia. **Aggrawal's Internet J Forensic Med Toxicol**, v. 5, n. 1, p. 6-11, 2004.
58. Campobasso, C. P.; Gherardi, M.; Caligara, M.; Sironi, L.; Introna, F. Drug analysis in blowfly larvae and in human tissues: a comparative study. **Int J Legal Med**, v. 118, n. 4, p. 210-214, 2004.
59. Wolff, M.; Zapata, G.; Morales, G.; Benecke, M. Detección y cuantificación de Propoxur en la sucesión de insectos de importancia médico-legal. **Rev Colombiana Entomol**, v. 32, n. 2, p. 159-164, 2006.
60. Gosselin, M.; Di Fazio, V.; Wille, S. M. R.; Fernandez, M. M. R.; Samyn, N.; Bourel, B.; Rasmont, P. Methadone determination in puparia and its effect on the development of *Lucilia sericata* (Diptera, Calliphoridae). **Forensic Sci Int**, v. 209, n. 1-3, p. 154-159, 2011.
61. Mahat, N. A.; Jayaprakash, P. T.; Zafarina, Z. Malathion extraction from larvae of *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) for determining death due to malathion. **Trop Biomed**, v. 29, n. 1, p. 9-17, 2012.
62. Peters, F. T.; Drummer, O. H.; Musshoff, F. Validation of new methods. **Forensic Sci Int**, v. 165, n. 2, p. 216-224, 2007.
63. Nuorteva, P. Sarcosaprophagous insects as forensic indicators. In: Tedeschi, C.G.; Eckert, W. G.; Tedeschi, I. G. *Forensic Medicine, a Study in Trauma and Environmental Harzads. Vol II. Physical Trauma.* p. 1072-1095, Saunders, Philadelphia, 1977 APUD Smith, K. G. **A Manual of Forensic Entomology.** Oxford, 1986.
64. Webb, L.; Oyefeso, A.; Schifano, F.; Cheeta, S.; Pollard, M.; Ghodse, A H. Cause and manner of death in drug-related fatality: an analysis of drug-related deaths recorded by coroners in England and Wales in 2000. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 72, n. 1, p. 67-74, 2003.
65. Hadidi, M. S.; Ibrahim, M. I.; Abdallat, I. M.; Hadidi, K. A. Current trends in drug abuse associated fatalities--Jordan, 2000—2004. **Forensic Sci Int**, v. 186, n. 1, p. 44-47, 2009.
66. Konradsen, F.; van der Hoek, W.; Cole, D. C.; Hutchinson, G.; Daisley, H.; Singh, S.; Eddleston, M. Reducing acute poisoning in developing countries—

- options for restricting the availability of pesticides. **Toxicology**, v. 192, n. 2, p. 249-261, 2003.
67. SINITOX, 2010 -
http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?tpl=home#,
 acessado setembro, 2013.
 68. Campelo, E. L. C.; Caldas, E. D. Postmortem data related to drug and toxic substance use in the Federal District, Brazil, from 2006 to 2008. **Forensic Sci Int**, v. 200, n. 1, p. 136-140, 2010.
 69. Caldas, E. D.; Rebelo, F. M.; Heliodoro, V. O.; Magalhães, A. F. A.; Rebelo, R. M. Poisonings with pesticides in the Federal District of Brazil. **Clin toxicol**, v. 46, n. 10, p. 1058-1063, 2008.
 70. CIT, 2012 -
http://www.cit.rs.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=137&Itemid=61, acessado em setembro, 2013.
 71. Brasil. 2012. - <http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/cqYR>, acessado em setembro, 2013.
 72. Brasil. **Nota técnica da reavaliação do ingrediente ativo aldicarbe**. ANVISA. Brasília, p. 4, 2012.
 73. FAO, 1994 -
http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Reports_1991-2006/Report1994.pdf, acessado em setembro, 2013.
 74. MICROMEDEX® Healthcare Series, 2013. - <http://www-micromedexsolutions-com.ez54.periodicos.capes.gov.br/micromedex2/librarian>, acessado em setembro, 2013.
 75. Chouinard, G.; Lefko-singh, K.; Teboul, E. Metabolism of anxiolytics and hypnotics: benzodiazepines, buspirone, zopiclone, and zolpidem. **Cell Mol Neurobiol**, v. 19, n. 4, p. 533-552, 1999.
 76. Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Moore, P. K. **Farmacologia**. 6. ed.; Elsevier, 2008.
 77. Offermanns, S.; Rosenthal, W. **Encyclopedia of Molecular Pharmacology**. 2. ed. [S.l.]: Springer Verlag, 2008.
 78. Lullmann, H.; Mohr, K.; Hein, L.; Bieger, D. **Color Atlas of Pharmacology**. 3. ed.: Thieme, 2005.
 79. Negrusz, A.; Gaensslen, R. Analytical developments in toxicological investigation of drug-facilitated sexual assault. **Anal Bioanal Chem**, v. 376, n. 8, p. 1192-1197, 2003.
 80. Mattila, M.; Larni, H. Flunitrazepam: a review of its pharmacological properties and therapeutic use. **Drugs**, v. 20, n. 5, p. 353-374, 1980.
 81. Klaassen, C. D. **Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons**. 7. ed.: McGraw-Hill, 2007.
 82. Maldaner, A. O.; Schmidt, L. L.; Locatelli, M. A. F.; Jardim, W. F.; Sodr e, F. F.; Almeida, F. V.; Pereira, C. E. B.; Silva, C. M. Estimating cocaine consumption in

- the Brazilian Federal District (FD) by sewage analysis. **J Braz Chem Soc**, v. 23, n. 5, p. 861-867, 2012.
83. Brunton, L. L.; Parker, K; Blumenthal, D; Buxton, I. **The Goodman and Gilman's Manual of Pharmacology and Therapeutics**. 2. ed.: McGraw-Hill Professional, 2008.
84. Feitosa, R. S.; Sodré, F. F.; Maldaner, A. O. Drogas de abuso em águas naturais e residuárias urbanas: ocorrência, determinação e aplicações forenses. **Quim Nova**, v. 36, n. 2, p. 291-305, 2013.
85. Blaho, K; Logan, B; Winbery, S; Park, L; Schwilke, E. Blood cocaine and metabolite concentrations, clinical findings, and outcome of patients presenting to an ED. **Am J Emergency Med**, v. 18, n. 5, p. 593-598, 2000.
86. Basow, D. S., 2013. - www.uptodate.com, acessado em setembro, 2013.
87. Risher, J. F.; Mink, F. L.; Stara, J. F. The toxicologic effects of the carbamate insecticide aldicarb in mammals: a review. **Environ Health Perspectives**, v. 72, p. 267-281, 1987.
88. JMPR. Pesticide residues in food - 1992 evaluations. Part II - Toxicology., 1992. - <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v92pr03.htm>, acessado em setembro, 2013.
89. Drummer, O. H.; Syrjanen, M. L.; Corder, S. M. Deaths involving the benzodiazepine flunitrazepam. **Am J Forensic Med Pathol**, v. 14, n. 3, p. 238-243, 1993.
90. Heyndrickx, B. Fatal intoxication due to flunitrazepam. **J Anal Toxicol**, v. 11, n. 6, p. 278, 1987.
91. Deegan, C.; O'Brien, K. Amitriptyline poisoning in a 2-year old. **Paediatr Anaesthesia**, v. 16, n. 2, p. 174-177, 2006.
92. Bolster, M.; Curran, J.; Busuttill, A. A five year review of fatal self-ingested overdoses involving amitriptyline in Edinburgh 1983-'87. **Hum Exp Toxicol**, v. 13, n. 1, p. 29-31, 1994.
93. De Rubeis, D.; Young, G. Continuous EEG monitoring in a patient with massive carbamazepine overdose. **J Clin Neurophysiol**, v. 18, n. 2, p. 166-168, 2011.
94. Klys, M.; Bystrowska, B.; Bujak-Gizycka, B. Postmortem toxicology of carbamazepine. **J Anal Toxicol**, v. 27, n. 4, p. 243-248, 2003.
95. Dass, C. **Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry**. New Jersey: John Wiley, 2007.
96. Rubensam, G.; Barreto, F.; Hoff, R. B.; Pizzolato, T. M. Determination of avermectin and milbemycin residues in bovine muscle by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and fluorescence detection using solvent extraction and low temperature cleanup. **Food Control**, v. 29, p. 55-60, 2013.
97. Vieira, H. P.; Neves, A. A.; Queiroz, M. E. L. R. Otimização e validação da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) para piretróides em água e análise por CG. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 535-540, 2007.

98. Neto, B. B.; Scarmino, I. S.; Bruns, R. E. Como variar tudo ao mesmo tempo. In: **Como fazer experimentos**. Cap. 3. 4. ed. Artmed Editora S.A., 2010
99. Matuszewski, B. K.; Constanzer, M. L.; Chavez-Eng, C. M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. **Anal Chem**, v. 75, n. 13, p. 3019-3030, 2003.
100. Almeida, A. M.; Castel-Branco, M. M.; Falcão, A. C. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. **J Chromatogr B**, v. 774, p. 215-222, 2002.
101. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA)/Brasil. Manual da Garantia da Qualidade Analítica. 2011. http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/Laborat%C3%B3rios/RCA/Manual/Manual%20de%20Garantia%20Analitica%20ultima%20versao.rar, acessado em setembro, 2013.
102. Jardim, A. N. O. Resíduos de pesticidas em alimentos: validação de metodologia analítica, análise em frutas e avaliação da exposição da população brasileira pelo método probabilístico. **Tese de doutorado**, Universidade de Brasília, 2012.
103. De Castro, A.; Concheiro, M.; Quintela, O.; Cruz, A.; López-Rivadulla, M. LC-MS/MS method for the determination of nine antidepressants and some of their main metabolites in oral fluid and plasma Study of correlation between venlafaxine concentrations in both matrices. **J Pharm Biomed Anal**, v. 48, p. 183-193, 2008.
104. Moore, C.; Coulter, C.; Crompton, K. Determination of cocaine, benzoylecgonine, cocaethylene and norcocaine in human hair using solid-phase extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. **J Chromatogr B**, v. 859, p. 208-212, 2007.
105. Lendoiro, E.; Quintela, O.; de Castro, A.; Cruz, A.; Lopes-Rivadulla, M.; Concheiro, M. Target screening and confirmation of 35 licit and illicit drugs and metabolites in hair by LC-MS/MS. **Forensic Sci Int**, v. 217, p. 207-215, 2012.
106. Lopes, B. R.; Barreiro, J. C.; Baraldi, P. T.; Cass, Q. B. Quantification of carbamazepine and its active metabolite by direct injection of human milk serum using liquid chromatography tandem ion trap mass spectrometry. **J Chromatogr B**, v. 889-890, p. 17-23, 2010.
107. Rust, K. Y.; Baumgartner, M. R.; Meggiolaro, N.; Kraemer, T. Detection and validated quantification of 21 benzodiazepines and 3 “z-drugs” in human hair by LC-MS/MS. **Forensic Sci Int**, v. 215, n. 1-3, p. 64-72, 2012.
108. Magalhães, E. J.; de Queiroz, M. E. L. R.; Penido, M. L. O.; Paiva, M. A. R.; Teodoro, J. A. R.; Augusti, R.; Nascentes, C. C. Determination of cocaine in postmortem human liver exposed to overdose. Application of an innovative and efficient extraction/clean up procedure and gas chromatography-mass spectrometry analysis. **J Chromatogr A**, v. 1309, p. 15-21, 2013.
109. De Pinho, G. P.; Neves, A. A.; de Queiroz, M. E. L. R.; Silvério, F. O. Pesticide determination in tomatoes by solid-liquid extraction with purification at low temperature and gas chromatography. **Food Chem**, v. 121, p. 251-256, 2010.

110. Marthe, D. B.; Bittencourt, L. M.; de Queiroz, M. E. L. R.; Neves, A. A. Desenvolvimento de metodologia para determinação de piretroides em manteiga. **Quim Nova**, v. 33, n. 6, p. 1389-1393, 2010.
111. Magalhães, E. J.; Nascentes, C. C.; Augusti, R.; de Queiroz, M. E. L. R.; da Silva, J. C. C.; Afonso, R. J. C. F. Fast Determination of Benzodiazepines in Human Urine via Liquid-Liquid Extraction with Low Temperature Partitioning and LC-HRMS. **Am J Anal Chem**, v. 3, p. 118-124, 2012.
112. Rubensam, G.; Barreto, F.; Hoff, R. B.; Kist, T. L.; Pizzolato, T. M. A liquid-liquid extraction procedure followed by a low temperature purification step for the analysis of macrocyclic lactones in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and fluorescence detection. **Anal Chim Acta**, v. 705, p. 24-29, 2011.
113. Jiang, Y.; Li, Y.; Jiang, Y.; Li, J.; Pan, C. Determination of Multiresidues in Rapeseed, Rapeseed Oil, and Rapeseed Meal by Acetonitrile Extraction, Low-Temperature Cleanup, and Detection by Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry. **J Agric Food Chem**, v. 60, p. 5089-5098, 2012.
114. Lentza-Rizos, C.; Avramides, E. J.; Cherasco, F. Low-temperature clean-up method for the determination of organophosphorus insecticides in olive oil. **J Chromatogr A**, v. 912, p. 135-142, 2001.
115. De Pinho, G. P.; Neves, A. A.; de Queiroz, M. E. L. R.; Silvério, F. O. Optimization of the liquid-liquid extraction method and low temperature purification (LLE-LTP) for pesticide residue analysis in honey samples by gas chromatography. **Food Control**, v. 21, p. 1307-1311, 2010.
116. Goulart, S. M.; de Queiroz, M. E. L. R.; Nevez, A. A.; de Queiroz, J. H. Low-temperature clean-up method for the determination of pyrethroids in milk using gas chromatography with electron capture detection. **Talanta**, v. 75, p. 1320-1323, 2008.
117. SRC. FatePointers Search Module – Physprop, 2013. - <http://esc.syrres.com/fatepointer/search.asp>, acessado em setembro, 2013.
118. Zarzycki, P. K.; Zarzycka, M. B.; Slaczka, M. M.; Clifton, V. L. Acetonitrile, the polarity chameleon. **Anal Bioanal Chem**, v. 397, p. 905-908, 2010
119. Peters, F. T. Method Validation using LC-MS. In: POLETTINI, A. **Applications of Liquid Chromatography–Mass Spectrometry in Toxicology**. Pharmaceutical Press, 2006. Cap. 4.
120. Trufelli, H.; Palma, P.; Famiglini, G.; Cappiello, A. An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry. **Mass Spectrom Rev**, v. 30, n. 3, p. 491-509, 2011.
121. Souverain, S.; Rudaz, S.; Veuthey, J.-L. Matrix effect in LC-ESI-MS and LC-APCI-MS with off-line and on-line extraction procedures. **J Chromatogr A**, v. 1058, p. 61-66, 2004.
122. Olsson, A. O.; Nguyen, J. V.; Sadowski, M. A.; Barr, D. B. A liquid chromatography/electrospray ionization–tandem mass spectrometry method for quantification of specific organophosphorus pesticide biomarkers in human urine. **Anal Bioanal Chem**, v. 376, p. 808-815, 2003.

123. Bonfiglio, R.; King, R.C.; Olah, T.V.; Merkle, K. The Effects of Sample Preparation Methods on the Variability of the Electrospray Ionization Response for Model Drug Compounds. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v. 13, p. 1175-1185, 1999.
124. Broecker, S.; Herre, S.; Pragst, F. General unknown screening in hair by liquid chromatography–hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC–QTOF-MS). **Forensic Sci Int**, v. 218, p. 68-81, 2012.
125. Rodriguez, E. A. Regression and anova under heterogeneity. **Research paper (M.S.)**, Southern Illinois University Carbondale, 2007.
126. Hédouin, V.; Bourel, B.; Martin-Bouyer, L.; Bécart, A.; Tournel, G.; Deveaux, M.; Gosset, D. Morphine perfused rabbits: a tool for experiments in forensic entomotoxicology. **J Forensic Sci**, v. 44, n. 2, p. 347-350, 1999.

Apêndice 1. Avaliação dos fatores de ponderação para regressão por mínimos quadrados ponderada.

Analito	Peso	Equação obtida	r	$\Sigma EPR $
Aldicarbe	1	y= 2,28E+04 x + 5,66E+03	0,99854	525,32
	1/x	y= 2,31E+04 x + 1,54E+03	0,99858	163,80
	1/x ²	y= 2,38E+04 x + 7,57E+02	0,99715	136,15
	1/y	y= 2,31E+04 x + 1,55E+03	0,99859	164,43
	1/y ²	y= 2,36E+04 x + 8,04E+02	0,99729	135,61
	ln x	y= 2,25E+04 x + 1,25E+04	NC	1265,37
	ln y	y= 2,27E+04 x + 6,55E+03	0,99844	616,8
	1/s ²	y= 2,36E+04 x + 7,80E+02	0,99756	144,54
Aldicarbe sulfona	1	y= 4,96E+03 x + 2,68E+03	0,99754	347,08
	1/x	y= 5,01E+03 x + 9,97E+02	0,99829	156,46
	1/x ²	y= 5,06E+03 x + 8,32E+02	0,99643	154,77
	1/y	y= 5,00E+03 x + 9,95E+02	0,99829	157,51
	1/y ²	y= 5,03E+03 x + 7,88E+02	0,99652	159,81
	ln x	y= 4,93E+03 x + 5,68E+03	NC	840,20
	ln y	y= 4,96E+03 x + 3,07E+03	0,99731	410,01
	1/s ²	y= 5,13E+03 x + 7,28E+02	0,99846	162,49
Aldicarbe sulfóxido	1	y= 9,20E+03 x + 2,32E+04	0,98947	505,55
	1/x	y= 9,43E+03 x - 3,33E+03	0,99231	249,09
	1/x ²	y= 9,43E+03 x - 3,34E+03	0,99096	249,11
	1/y	y= 9,31E+03 x - 2,59E+03	0,99250	253,93
	1/y ²	y= 9,19E+03 x - 1,75E+03	0,99077	258,76
	ln x	y= 9,14E+03 x + 4,09E+04	NC	737,88
	ln y	y= 9,19E+03 x + 2,79E+04	0,98879	567,49
	1/s ²	y= 9,80E+03 x - 6,30E+03	0,99173	267,49
Amitriptilina	1	y= 9,92E+03 x + 5,71E+03	0,99852	708,56
	1/x	y= 1,01E+04 x + 1,90E+03	0,99786	275,93
	1/x ²	y= 1,03E+04 x + 1,61E+03	0,98457	270,64
	1/y	y= 1,01E+04 x + 1,72E+03	0,99797	276,46
	1/y ²	y= 1,03E+04 x + 1,23E+03	0,98798	271,63
	ln x	y= 9,73E+03 x + 1,48E+04	NC	2226,81
	ln y	y= 9,90E+03 x + 6,68E+03	0,99845	867,80
	1/s ²	y= 1,04E+04 x - 9,07E+02	0,99658	471,21
Benzoilecgonina	1	y= 2,13E+04 x + 7,09E+03	0,98552	1213,52
	1/x	y= 2,21E+04 x - 1,64E+03	0,98913	348,16
	1/x ²	y= 2,19E+04 x - 1,46E+03	0,98335	347,27
	1/y	y= 2,16E+04 x - 1,59E+03	0,98907	355,07
	1/y ²	y= 2,08E+04 x - 1,13E+03	0,98225	360,81
	ln x	y= 2,07E+04 x + 2,62E+04	NC	3526,82
	ln y	y= 2,12E+04 x + 9,51E+03	0,98415	1498,59
	1/s ²	y= 2,22E+04 x - 1,60E+03	0,98409	433,98
Bromazepam	1	y= 4,72E+03 x + 4,77E+03	0,99681	2132,32
	1/x	y= 5,08E+03 x - 7,23E+00	0,99683	297,60
	1/x ²	y= 5,62E+03 x - 7,76E+02	0,99033	269,36
	1/y	y= 4,99E+03 x - 1,10E+02	0,99677	275,39
	1/y ²	y= 5,36E+03 x - 7,03E+02	0,99008	245,60
	ln x	y= 4,49E+03 x + 1,39E+04	NC	6295,47
	ln y	y= 4,69E+03 x + 6,04E+03	0,99654	2684,52
	1/s ²	y= 5,10E+03 x - 4,58E+02	0,99546	247,68

Analito	Peso		Equação obtida		r	$\Sigma EPR $
Carbamazepina	1	y=	5,00E+04	x + 1,22E+04	0,99790	645,56
	1/x	y=	5,10E+04	x + 6,50E+03	0,99797	233,73
	1/x ²	y=	5,15E+04	x + 6,22E+03	0,98977	221,05
	1/y	y=	5,09E+04	x + 6,45E+03	0,99796	233,79
	1/y ²	y=	5,16E+04	x + 5,69E+03	0,99369	213,82
	ln x	y=	4,96E+04	x + 1,67E+04	NC	1095,42
	ln y	y=	4,99E+04	x + 1,34E+04	0,99777	764,85
	1/s ²	y=	5,44E+04	x + 4,59E+03	0,99896	243,67
Clonazepam	1	y=	4,42E+03	x + 5,00E+03	0,99485	1705,47
	1/x	y=	4,67E+03	x + 8,86E+02	0,99234	372,13
	1/x ²	y=	4,97E+03	x + 3,65E+02	0,98174	347,75
	1/y	y=	4,61E+03	x + 8,46E+02	0,99322	372,80
	1/y ²	y=	4,86E+03	x + 2,54E+02	0,98447	358,68
	ln x	y=	4,23E+03	x + 1,39E+04	NC	5244,69
	ln y	y=	4,39E+03	x + 6,08E+03	0,99469	2118,94
	1/s ²	y=	4,60E+03	x + 8,14E+02	0,99253	366,27
Cocaína	1	y=	1,69E+04	x + 4,17E+03	0,99616	609,52
	1/x	y=	1,72E+04	x + 6,94E+02	0,99692	217,48
	1/x ²	y=	1,70E+04	x + 9,75E+02	0,99358	214,33
	1/y	y=	1,71E+04	x + 6,52E+02	0,99688	219,59
	1/y ²	y=	1,68E+04	x + 9,57E+02	0,99332	217,25
	ln x	y=	1,66E+04	x + 1,22E+04	NC	1806,99
	ln y	y=	1,69E+04	x + 5,11E+03	0,99583	748,85
	1/s ²	y=	1,81E+04	x + 5,95E+02	0,99686	252,32
Diazepam	1	y=	7,44E+03	x + 6,72E+03	0,99779	1768,58
	1/x	y=	7,91E+03	x + 4,91E+02	0,99818	224,81
	1/x ²	y=	8,38E+03	x - 1,71E+02	0,99409	239,16
	1/y	y=	7,80E+03	x + 4,65E+02	0,99813	213,7
	1/y ²	y=	8,05E+03	x - 6,01E+01	0,99470	195,21
	ln x	y=	7,12E+03	x + 1,94E+04	NC	5415,03
	ln y	y=	7,40E+03	x + 8,28E+03	0,99759	2196,73
	1/s ²	y=	7,82E+03	x + 1,47E+02	0,99782	185,08
Flunitrazepam	1	y=	1,52E+04	x + 2,45E+03	0,99971	351,15
	1/x	y=	1,54E+04	x + 5,24E+02	0,99943	104,54
	1/x ²	y=	1,55E+04	x + 4,00E+02	0,99781	106,29
	1/y	y=	1,54E+04	x + 5,02E+02	0,99946	104,57
	1/y ²	y=	1,54E+04	x + 3,71E+02	0,99782	108,76
	ln x	y=	1,50E+04	x + 6,23E+03	NC	968,68
	ln y	y=	1,52E+04	x + 2,94E+03	0,99971	430,72
	1/s ²	y=	1,52E+04	x + 5,61E+01	0,99980	142,59

NC – não calculado