

DETERMINAÇÃO RÁPIDA DE FÁRMACOS BÁSICOS EM PLASMA POR CROMATOGRAFIA A GÁS COM DETECTOR DE NITROGÊNIO E FÓSFORO

Lilian Feltraco Lizot, Luana Letícia da Silva, Bárbara Spaniol, Marina Venzon Antunes e Rafael Linden*

Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Feevale, Rod. RS 239, 2755, 93352-000 Novo Hamburgo - RS, Brasil

Rafael Lanaro

Centro de Controle de Intoxicações, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Rua Tessália Vieira Camargo, 126, Cidade Universitária, 13083-887 Campinas - SP, Brasil

Recebido em 25/8/11; aceito em 18/12/11; publicado na web em 2/3/12

FAST DETERMINATION OF BASIC DRUGS IN PLASMA BY GAS CHROMATOGRAPHY WITH NITROGEN PHOSPHORUS DETECTOR. A simple and fast method for determination of 40 basic drugs in human plasma employing gas-chromatography with nitrogen-phosphorus detection was developed and validated. Drugs were extracted from 800 μ L of plasma with 250 μ L of butyl acetate at basic pH. Aliquots of the organic extract were directly injected on a column with methylsilicone stationary phase. Total chromatographic run time was 25 min. All compounds were detected in concentrations ranging from therapeutic to toxic levels, with intermediate precision CV% below 11.2 and accuracy in the range of 92-114%.

Keywords: GC-NPD; emergency toxicology; drug screening.

INTRODUÇÃO

A realização de análises toxicológicas capazes de detectar um significativo número de compostos é fundamental no contexto da toxicologia de emergência, assim como em toxicologia forense. Embora já esteja amplamente demonstrado que a identificação definitiva de uma substância requer a utilização associada de múltiplos métodos analíticos,¹ a cromatografia a gás (CG) empregando colunas capilares possui grande aplicabilidade na identificação e quantificação de fármacos em amostras biológicas, com diversos métodos já descritos.²⁻⁸ A elevada reprodutibilidade dos parâmetros de retenção, quando adequadamente expressos, permite a identificação de um grande número de substâncias com base em bancos de dados interlaboratoriais, especialmente no contexto da análise toxicológica sistemática (ATS), devido à disponibilidade de um banco de dados com índices de retenção de aproximadamente 4.000 substâncias.⁹ Entretanto, não existem publicações que descrevam a associação da abordagem qualitativa empregando este banco de dados com uma estratégia de quantificação de múltiplos analitos, especialmente considerando que a determinação quantitativa é fundamental visto que a maioria das substâncias possui efeitos tóxicos dependentes de suas concentrações plasmáticas.¹⁰

Recentemente, diversos métodos para identificação e quantificação de múltiplos analitos em sangue, plasma ou soro em toxicologia clínica e forense foram descritos, baseados principalmente em cromatografia líquida associada à espectrometria de massas.¹¹⁻¹⁴ A intenção destes métodos multianalitos é monitorar múltiplas substâncias de interesse com uma única preparação de amostra e procedimento de análise. Os métodos multianalitos em toxicologia analíticos são preferíveis porque tornam o processo analítico mais simples, rápido, barato e permitem o monitoramento de analitos de diferentes classes terapêuticas em uma única amostra corporal. Isto é relevante porque frequentemente somente uma quantidade limitada de amostra está disponível e o número total de analitos na amostra é desconhecido. Uma alternativa útil e de menor custo para a determinação de múltiplos analitos em um único método é o emprego da

CG-DNP. Dentre as características vantajosas da CG para análises toxicológicas multianalitos estão o baixo custo operacional e a eficiência de separação. A estas qualidades soma-se a sensibilidade e especificidade do detector seletivo de nitrogênio e fósforo (DNP). De fato, considerando que aproximadamente 90% das substâncias de interesse toxicológico podem ser detectadas pelo DNP e a sua relativa insensibilidade a compostos endógenos usuais, a associação CG-DNP é de especial utilidade em análises toxicológicas em bioamostras.⁶ Estas características permitem a injeção direta de extratos orgânicos de amostras biológicas, sem uma etapa de evaporação de solvente, mantendo a sensibilidade necessária para a identificação de substâncias em concentrações toxicologicamente relevantes. Desta forma, a associação proposta permite cumprir a orientação da Academia Nacional de Bioquímica Clínica dos Estados Unidos da América do Norte, que recomenda que testes de triagem toxicológica devem ter seus resultados disponibilizados aos serviços de emergência médica em até 4 h após a coleta das amostras biológicas.¹⁵

Desta forma, o objetivo do presente estudo foi desenvolver e validar um método para a determinação de 40 fármacos de caráter básico e relevância toxicológica, associando uma preparação de amostra simples e rápida a um sistema de separação em cromatografia a gás com elevada comparabilidade interlaboratorial, apresentando características adequadas para utilização em toxicologia de emergência. O trabalho descreve de forma pioneira a introdução de um procedimento quantitativo a um método de identificação de substâncias baseado em índices de retenção em CG previamente descrito.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiais e reagentes

Os padrões de fármacos foram obtidos de diversas indústrias farmacêuticas ou da Cerilliant (Round Rock, EUA) e suas estruturas químicas estão disponíveis na Figura 1S, material suplementar. Metanol grau cromatográfico e acetato de butila foram provenientes da Mallinckrodt Baker (Phillipsburg, EUA). Tris-(hidroximetil)-aminometano e hidróxido de sódio foram provenientes da Nuclear (Diadema, Brasil). Água ultrapurificada foi obtida através de um

*e-mail: rafael.linden@feevale.br

sistema Elga Purelab Ultra, proveniente da Elga Labwater (High Wycombe, Reino Unido).

Soluções

Foram preparadas soluções estoque (SE) de todos os analitos através da dissolução de 10 mg da substância, na forma de base, em 10 mL de metanol. Através da mistura de diferentes SE e da diluição com metanol, foram obtidas 5 soluções de trabalho (ST1), com concentração final dos analitos de 100 µg mL⁻¹. A mistura A (ST1 A) conteve bromazepam, buspirona, ciclobenzaprina, diazepam, efedrina, maprotilina, sibutramina, tioridazina e tranilcipromina. A mistura B (ST1 B) conteve amitriptilina, benzocaína, dexfenfluramina, estricnina, haloperidol, nordazepam, nitrazepam, sertralina e venlafaxina. A mistura C (ST1 C) conteve anfepramona, codeína, clomipramina, fenfluramina, fluoxetina, flurazepam, imipramina, levomepromazina e tri-hexafenidila. A mistura D (ST1 D) conteve citalopram, dextrometorfano, femproporex, mazindol, paroxetina e zolpidem. A mistura E (ST1 E) conteve cafeína, clometiazol, lidocaína, carbamazepina, cinarizina, nortriptilina e tramadol. Todas as ST1 (A, B, C, D e E) foram diluídas com metanol a fim de se obter soluções nas concentrações 40 µg mL⁻¹ (ST2), 20 µg mL⁻¹ (ST3), 10 µg mL⁻¹ (ST4) e 4 µg mL⁻¹ (ST5). A solução de trabalho do padrão interno (PI, proadifen, 20 µg mL⁻¹) foi preparada através da diluição da solução estoque com metanol. A solução tampão pH 10 foi preparada através da dissolução de 23,4 g de tris-(hidroximetil)-aminometano em 1000 mL de água ultrapurificada, com posterior ajuste do pH com solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹.

Equipamento e condições cromatográficas

As análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás CP 3800, equipado com um amostrador automático multiuso Varian® PAL e detector de nitrogênio e fósforo, controlados pelo programa Galaxie®, todos provenientes da Varian® (Middelburg, Holanda). A separação foi realizada em uma coluna OV-1 (30 m x 0,32 mm, 1 µm de espessura de filme) contendo metilsilicone como fase estacionária, proveniente da Ohio Valley (Marrietta, EUA). O tempo total de análise cromatográfica foi de 25 min. A temperatura inicial da coluna foi de 140 °C, mantida por 2 min, seguida de um incremento de temperatura de 10 °C por min até atingir 320 °C, sendo esta temperatura mantida por 5 min. O gás de arraste utilizado foi o hélio, proveniente da Linde Gases (Esteio, Brasil) sob fluxo constante de 4 mL min⁻¹. O volume de injeção foi de 2 µL, com injetor mantido a 260 °C no modo de injeção sem divisão de fluxo. O detector foi mantido a 310 °C, com corrente de 3,2 pA.

Reprodutibilidade dos parâmetros de retenção

Os parâmetros de retenção cromatográfica avaliados foram: tempo de retenção absoluto (t_R), tempo de retenção relativo (t_{RR}) e índice de retenção (IR). Estes parâmetros foram determinados em 20 dias não consecutivos e, a partir dos dados obtidos, foram calculados a média, o desvio padrão e coeficiente de variação percentual (CV%) para cada parâmetro da série. Os t_{RR} foram calculados utilizando a Equação 1, onde t_x é o tempo de retenção da substância desconhecida e t_{pi} é o tempo de retenção do padrão interno. Os IR foram determinados através da Equação 2, na qual os tempos de retenção e os índices de retenção das substâncias de referência eluindo imediatamente antes e depois da substância desconhecida são denotados t_n , t_{n+1} , IR_n e IR_{n+1} , respectivamente, e t_x é o tempo de retenção da substância cujo IR será calculado. Para determinação do IR foi empregada como referência uma mistura contendo 10 substâncias em metanol na concentração

de 100 µg mL⁻¹ (solução de calibração de índices de retenção). Esta solução conteve fenfluramina (IR = 1230), efedrina (IR = 1365), cafeína (IR = 1800), venlafaxina (IR = 2083), amitriptilina (IR = 2194), ciclobenzaprina (IR = 2233), citalopram (IR = 2380), levomepromazina (IR = 2525), flurazepam (IR = 2780) e buspirona (IR = 3221). Em cada dia do experimento foi injetado 1 µL da solução de trabalho de proadifen, da solução de calibração de índices de retenção e das cinco diferentes soluções de trabalho.

$$t_{RRx} = \frac{t_x}{t_{pi}} \quad (1)$$

$$IR_x = (IR_{n+1} - IR_n) \frac{(t_x - t_n)}{(t_{n+1} - t_n)} + IR_n \quad (2)$$

Preparação das amostras

As amostras foram preparadas em microtubos de polipropileno de 1,5 mL, adicionando-se 800 µL de plasma (amostra clínica, solução analítica ou controle), 250 µL de solução pH 10, 50 µL de solução de trabalho de PI (proadifen, 20 µg mL⁻¹) e 250 µL de acetato de butila. A mistura foi homogeneizada em vórtex por 40 s e, em seguida, centrifugada a 12.000 g por 20 min. A fase orgânica foi transferida para um frasco do amostrador automático, o qual foi inserido no equipamento para posterior análise cromatográfica.

Especificidade

A especificidade foi avaliada através do processamento, com o método descrito, de 6 amostras de plasma de voluntários que não estavam utilizando quaisquer medicamentos, a fim de se avaliar a presença de picos endógenos.

Linearidade

A partir da diluição de 40 µL das ST1, ST2, ST3, ST4 e ST5 com 760 µL de plasma foram obtidas soluções analíticas nas concentrações 5, 2, 1, 0,5 e 0,2 µg mL⁻¹ dos diferentes fármacos, com exceção dos fármacos cafeína, carbamazepina e lidocaína, cujas soluções analíticas foram preparadas na faixa de 2 a 50 µg mL⁻¹. As soluções analíticas foram analisadas em quadruplicata e as curvas analíticas foram construídas calculando-se a razão entre as áreas dos picos dos diferentes analitos e a área do pico do padrão interno (y) e comparando-se estas razões com as concentrações nominais das soluções analíticas (x). As curvas foram ajustadas através do método dos mínimos quadrados empregando regressão linear ponderada, com fator ponderal 1/x.

Precisão e exatidão

As amostras de controle de qualidade foram preparadas através de adição de 80 µL das ST2 e ST5 a 720 µL de plasma a fim de obter as concentrações 4 e 0,4 µg mL⁻¹ de cada analito, com exceção dos fármacos cafeína, carbamazepina e lidocaína, para os quais as concentrações das amostras controle foram 40 e 4 µg mL⁻¹ (controle de qualidade baixo, CQB e controle de qualidade alto, CQA). As amostras de controle de qualidade foram analisadas como descrito no item Preparação de amostras, em triplicata em 3 dias diferentes. As precisões intra- e interensaios foram determinadas por ANOVA com a variável agrupadora "dia" e foram expressas como CV%. A exatidão foi definida como a porcentagem da concentração nominal representada pela concentração calculada pela curva analítica. O critério de aceitação para a exatidão foram valores dentro de uma faixa de ± 15% do valor nominal e para precisão foi de um CV de até 15%.¹⁶

Aplicação do método

O método foi aplicado a 8 amostras de pacientes atendidos no serviço de emergência médica de um hospital geral, suspeitos de intoxicações. As amostras de sangue foram obtidas por punção venosa para tubos com EDTA, o plasma foi separado por centrifugação e o plasma foi mantido a -20 °C até a análise.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A aplicação da CG para análise toxicológica sistemática e identificação de fármacos em toxicologia clínica e forense requer a utilização de parâmetros de retenção de elevada precisão, sendo

que diferentes formas de expressar a retenção têm sido utilizadas. A separação cromatográfica empregou fase estacionária metilsilicone, que permitiu uma adequada resolução e dispersão de retenção dos diferentes analitos em um tempo razoável. Conforme apresentado na Tabela 1, o mais impreciso dos parâmetros de retenção avaliados foi o t_{R} , com CV% médio de 0,34 (faixa de 0,11 a 1,83). Uma alternativa para aumentar a precisão é expressar a retenção relacionada a uma substância de referência, o t_{RR} . Empregou-se proadifen como padrão interno, tanto para retenção como para quantificação dos analitos, visto apresentar tempo de retenção intermediário (média de 15,34 min), não ser utilizado como fármaco ou droga de abuso e apresentar comportamento cromatográfico adequado. O t_{RR} apresentou um CV% médio de 0,301 (faixa de 0,061 a 1,084), levemente inferior ao t_{R} .

Tabela 1. Reprodutibilidade dos parâmetros de retenção de 40 fármacos básicos (n = 20)

Substância	Tempo de retenção (min)			Tempo de retenção relativo			Índice de retenção			
	Média	DP	CV%	Média	DP	CV%	Média	Referência ⁷	DP	CV%
Amitriptilina*	13,83	0,02	0,11	0,932	0,001	0,093	2194	2194	-	-
Anfepramona	6,63	0,03	0,46	0,447	0,002	0,403	1502	n.d.	1,5	0,10
Benzocaína	7,15	0,03	0,41	0,482	0,002	0,371	1549	1545	2,5	0,16
Bromazepam	17,09	0,14	0,79	1,152	0,009	0,787	2660	2665	0,9	0,04
Bupirona*	22,23	0,04	0,19	1,498	0,002	0,160	3221	3221	-	-
Cafeína*	9,95	0,04	0,35	0,670	0,002	0,285	1800	1800	-	-
Carbamazepina	14,61	0,02	0,13	0,984	0,001	0,085	2283	2285	1,6	0,07
Ciclobenzaprina*	14,18	0,03	0,19	0,956	0,001	0,141	2195	2195	-	-
Cinarizina	20,38	0,02	0,11	1,374	0,001	0,086	3011	n.d.	1,5	0,03
Citalopram*	15,46	0,02	0,12	1,042	0,001	0,090	2380	2380	-	0,05
Clometiazol	3,79	0,02	0,63	0,256	0,002	0,679	1234	1227	0,1	0,07
Clomipramina	15,67	0,03	0,18	1,056	0,001	0,134	2407	2415	1,8	0,01
Codeína	15,42	0,03	0,17	1,039	0,001	0,096	2374	2375	1,4	0,07
Dexfenfluramina	3,81	0,05	1,27	0,256	0,004	1,382	1236	n.d.	1,2	0,06
Dextrometorfano	13,35	0,02	0,15	0,900	0,001	0,064	2141	2145	1,8	0,10
Diazepam	15,81	0,03	0,16	1,065	0,002	0,162	2425	2428	2,4	0,09
Efedrina*	5,12	0,03	0,51	0,345	0,002	0,525	1365	1365	-	-
Estricnina	21,22	0,06	0,28	1,430	0,003	0,221	3109	3116	5,5	0,10
Femproporex	7,53	0,02	0,23	0,508	0,001	0,122	1583	n.d.	1,2	0,18
Fenfluramina*	3,76	0,05	1,41	0,254	0,004	1,427	1230	1230	-	-
Fluoxetina	10,51	0,02	0,22	0,707	0,001	0,135	1856	1859	1,7	0,11
Flurazepam*	18,37	0,03	0,13	1,238	0,001	0,094	2780	2780	-	0,09
Haloperidol	19,59	0,03	0,13	1,320	0,001	0,075	2925	2930	1,2	0,04
Imipramina	14,06	0,03	0,23	0,948	0,002	0,172	2220	2230	0,1	0,04
Levomepromazina*	16,56	0,02	0,15	1,116	0,001	0,124	2525	2525	-	-
Lidocaína	10,73	0,02	0,14	0,723	0,000	0,063	1880	1870	1,4	0,06
Maprotilina	15,05	0,02	0,14	1,014	0,001	0,107	2352	2356	1,4	0,08
Mazindol	15,07	0,02	0,14	1,016	0,001	0,097	2346	2325	2,1	0,06
Nitrazepam	18,11	0,02	0,13	1,222	0,001	0,061	2745	2740	1,3	0,09
Nordazepam	16,25	0,02	0,13	1,095	0,002	0,153	2484	2490	2,1	0,05
Nortriptilina	13,99	0,02	0,15	0,942	0,001	0,106	2213	2215	0,7	0,09
Paroxetina	16,81	0,31	1,83	1,133	0,021	1,824	2570	2580	1,6	0,06
Sertralina	15,32	0,02	0,12	1,032	0,001	0,092	2369	2368	1,1	0,05
Sibutramina	10,63	0,02	0,16	0,717	0,000	0,055	1869	n.d.	1,5	0,08
Tioridazina	20,95	0,03	0,14	1,412	0,002	0,114	3096	3115	1,8	0,06
Tramadol	11,44	0,02	0,19	0,771	0,001	0,083	1951	1943	1,5	0,08
Tranilcipromina	3,61	0,04	1,05	0,243	0,003	1,084	1221	1220	1,0	0,09
Trihexafenidila	14,37	0,03	0,18	0,968	0,001	0,125	2252	2245	1,7	0,08
Venlafaxina*	12,73	0,02	0,13	0,858	0,001	0,092	2083	2083	-	-
Zolpidem	18,36	0,02	0,11	1,237	0,001	0,086	2780	2780	1,5	0,05
Média geral			0,34			0,301				0,07

*Substâncias presentes na mistura de calibração de IR (desvio padrão e CV% não calculados). n.d.: não disponível na ref. 7.

A utilização de uma mistura de fármacos para determinar IR (Figura 1) como forma de expressar a retenção permitiu obter uma precisão marcadamente superior, com CV% médio de 0,07 (faixa de 0,01 a 0,18). Além disto, os valores de IR obtidos foram semelhantes àqueles disponíveis em um grande banco de dados de retenção de substâncias de interesse toxicológico publicado pela *The International Association of Forensic Toxicologists* (TIAFT) em 1992, demonstrando também sua utilidade interlaboratorial.⁹ As diferenças entre os valores de IR determinados e os existentes na publicação da TIAFT foram de 0 a 21 unidades de IR, dentro da janela de busca recomendada de ± 25 unidades para identificação de substâncias por CG em ATS.¹ Desta forma, o método proposto pode também indicar a presença de substâncias que não foram testadas na validação do método, mas que estão presentes no banco de dados da TIAFT, especialmente quando associados a outros métodos de análise e um processamento computacional adequado.^{1,17} Esta característica é especialmente útil quando dados clínicos do paciente estão disponíveis, o que pode dispensar a necessidade de uma identificação quimicamente inequívoca. Também se destaca que a determinação dos índices de retenção empregou uma mistura de fármacos amplamente disponíveis como referência, diferentemente de outros autores que utilizaram séries homólogas não disponíveis comercialmente.^{4,6,7}

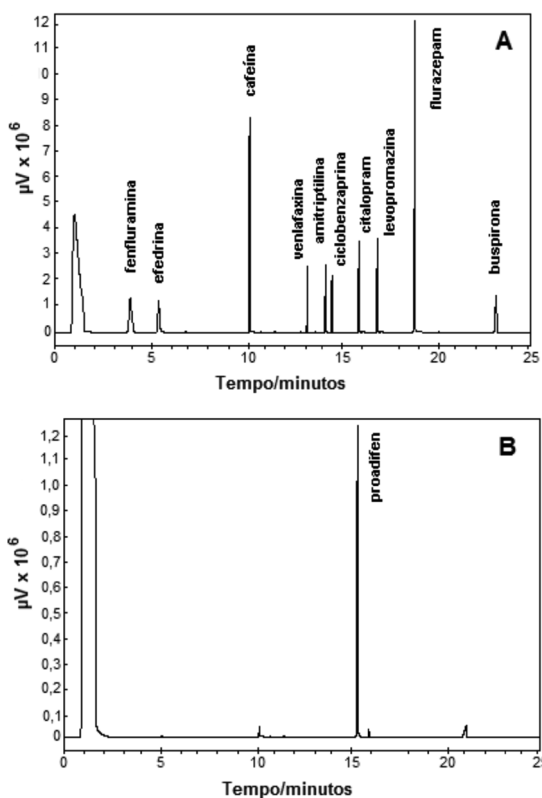


Figura 1. A: solução de calibração de índices de retenção. B: amostra de plasma "branco" adicionada de padrão interno, conforme descrito na preparação das amostras

A preparação das amostras utilizou um procedimento simples e rápido de extração líquido-líquido, sem etapa de evaporação de solvente, o qual se mostrou efetivo para os fármacos avaliados. Análises de amostras isentas de fármacos apresentaram poucos picos interferentes, com áreas relativamente pequenas, os quais tiveram tempos de retenção médios de 5,03; 10,18; 15,81 e 21,32 min (Figura 1). Apenas o pico endógeno de 15,81 min apresenta coeluição com um dos fármacos avaliados, o diazepam, sendo que as áreas determinadas apresentam contribuição insignificante na quantificação deste composto nas

concentrações usualmente encontradas. A sensibilidade e a especificidade com respeito aos interferentes endógenos caracterizam a utilidade do detector de nitrogênio e fósforo na determinação de fármacos em bioamostras. Além disto, a estratégia de preparação de amostra empregada, associada a um tempo de análise cromatográfica de 25 min, permitiu que todo o ciclo analítico de uma amostra fosse realizado em aproximadamente 35 min. Este tempo rápido de análise é fundamental especialmente no contexto da toxicologia de emergência, onde os resultados podem ser utilizados para determinar condutas terapêuticas.

A Tabela 2 apresenta os resultados dos estudos de validação para os 40 fármacos avaliados neste estudo. As faixas lineares foram ajustadas de acordo com as concentrações esperadas destas substâncias, tanto em utilizações terapêuticas como tóxicas, com coeficientes de determinação entre 0,9811 a 0,999. A precisão intraensaios apresentou valores de CV% entre 3,4 e 12,5 para o CQB e de 1,9 a 9,5 para o CQA. A precisão intermediária apresentou CV% entre 3,3 e 11,2% para o CQB e de 2,8 a 10,3 para o CQA, todos dentro dos limites de aceitação para métodos bioanalíticos.¹⁶ A exatidão também apresentou valores aceitáveis, entre 96 e 109% para o CQB e de 92 a 109% para o CQA, especialmente considerando que o propósito deste desenvolvimento é o diagnóstico de intoxicações, onde as concentrações encontradas tendem a ser marcadamente superiores às mensuradas no uso terapêutico de fármacos.

O método foi aplicado a 8 amostras provenientes de pacientes com suspeita de intoxicação por fármacos, atendidos em um serviço de urgência médica de um hospital universitário (Tabela 3). Nestes casos foram identificadas e quantificadas as substâncias amitriptilina (1 amostra), femproporex (1 amostra) e carbamazepina (6 amostras), sendo que 3 pacientes apresentaram concentrações de carbamazepina superiores a 10 $\mu\text{g/mL}$, o que pode caracterizar uma exposição tóxica (Figura 2). Cabe destacar que os valores calculados de T_{RR} e

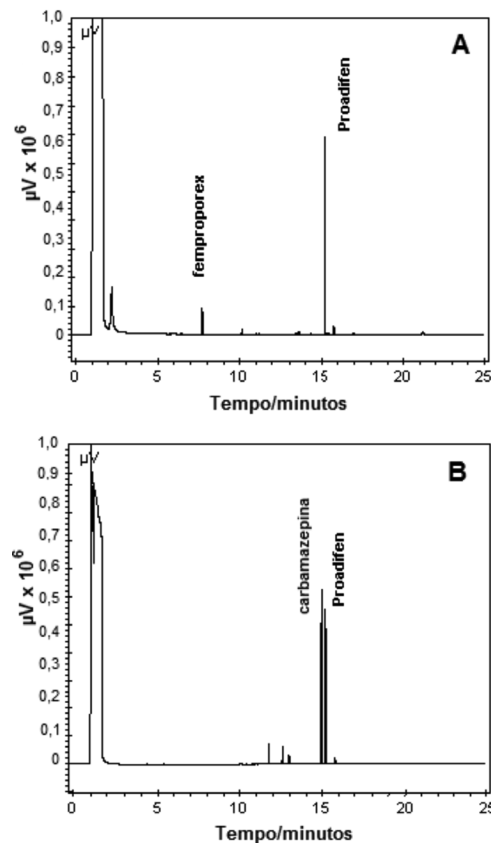


Figura 2. A: amostra de paciente contendo femproporex ($0,21 \mu\text{g mL}^{-1}$). B: amostra de paciente contendo carbamazepina ($20,51 \mu\text{g mL}^{-1}$)

Tabela 2. Dados de validação para 40 fármacos básicos

Substância	Intervalo linear ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Curva analítica	r^2	Precisão intraensaios (CV%)		Precisão intermediária (CV%)		Exatidão (%)	
				CQB*	CQA**	CQB*	CQA**	CQB*	CQA**
Amitriptilina	0,2 – 5,0	$y = 0,884x - 0,085$	0,9990	4,4	2,1	3,3	4,1	109	103
Anfepramona	0,2 – 5,0	$y = 0,748x - 0,076$	0,9930	5,5	2,5	5,7	3,6	98	102
Benzocaína	0,2 – 5,0	$y = 0,312x - 0,079$	0,9877	7,8	3,1	7,7	4,5	93	98
Bromazepam	0,2 – 5,0	$y = 0,355x - 0,066$	0,9911	7,1	5,9	6,6	5,3	92	97
Buspirona	0,2 – 5,0	$y = 1,140x - 0,012$	0,9995	10,1	6,3	9,5	7,5	108	103
Cafeína	2,0 – 50,0	$y = 1,080x - 0,161$	0,9980	12,5	7,4	11,1	8,2	93	102
Carbamazepina	2,0 – 50,0	$y = 0,057x - 0,022$	0,9990	6,9	3,1	5,8	5,1	95	99
Ciclobenzaprina	0,2 – 5,0	$y = 0,463x + 0,031$	0,9998	6,1	3,9	7,3	5,8	96	103
Cinarizina	0,2 – 5,0	$y = 0,680x - 0,144$	0,9850	12,2	3,0	11,2	4,1	92	101
Citalopram	0,2 – 5,0	$y = 0,775x - 0,026$	0,9990	3,4	3,9	4,1	4,3	97	100
Clometiazol	0,2 – 5,0	$y = 0,746x - 0,087$	0,9910	9,1	3,8	8,8	4,1	95	106
Clomipramina	0,2 – 5,0	$y = 1,057x - 0,026$	0,9990	4,5	1,9	5,1	2,8	97	101
Codeína	0,2 – 5,0	$y = 1,011x + 0,025$	0,9960	4,6	7,1	5,3	5,2	104	106
Dexfenfluramina	0,2 – 5,0	$y = 0,114x + 0,034$	0,9981	7,8	6,1	5,8	7,2	106	98
Dextrometorfano	0,2 – 5,0	$y = 0,389x + 0,010$	0,9970	4,6	6,9	5,1	7,4	105	103
Diazepam	0,2 – 5,0	$y = 1,308x + 0,091$	0,9999	7,3	8,8	6,9	9,2	110	98
Efedrina	0,2 – 5,0	$y = 0,312x + 0,055$	0,9853	11,3	9,5	10,8	7,7	114	107
Estricnina	0,2 – 5,0	$y = 0,051x + 0,033$	0,9811	10,8	6,1	9,5	6,5	112	107
Femproporex	0,2 – 5,0	$y = 0,503x + 0,037$	0,9960	3,8	4,4	3,5	4,9	95	99
Fenfluramina	0,2 – 5,0	$y = 0,315x + 0,086$	0,9861	7,1	2,5	7,3	3,1	104	102
Fluoxetina	0,2 – 5,0	$y = 0,307x + 0,024$	0,9930	9,2	7,9	8,5	8,8	107	103
Flurazepam	0,2 – 5,0	$y = 1,117x - 0,071$	0,9920	10,3	1,9	8,5	3,1	96	98
Haloperidol	0,2 – 5,0	$y = 0,163x + 0,088$	0,9901	8,9	3,3	9,1	5,4	108	103
Imipramina	0,2 – 5,0	$y = 1,066x - 0,044$	0,9990	9,3	2,3	8,5	3,4	99	101
Levomepromazina	0,2 – 5,0	$y = 0,788x - 0,055$	0,9891	9,7	2,7	8,7	5,3	97	103
Lidocaína	2,0 – 50,0	$y = 0,883x - 0,053$	0,9990	8,2	4,8	7,9	4,6	97	99
Maprotilina	0,2 – 5,0	$y = 0,673x - 0,033$	0,9885	9,0	8,8	8,3	7,7	104	105
Mazindol	0,2 – 5,0	$y = 0,291x - 0,026$	0,9970	6,9	4,3	5,7	4,8	97	104
Nitrazepam	0,2 – 5,0	$y = 0,436x + 0,074$	0,9970	7,4	8,5	7,8	7,9	109	98
Nordazepam	0,2 – 5,0	$y = 1,010x - 0,098$	0,9997	6,8	4,7	6,5	5,3	94	105
Nortriptilina	0,2 – 5,0	$y = 0,798x - 0,093$	0,9934	5,9	6,3	6,6	5,1	102	106
Paroxetina	0,2 – 5,0	$y = 0,218x - 0,045$	0,9821	7,8	5,2	7,2	4,9	107	97
Sertralina	0,2 – 5,0	$y = 0,312x - 0,033$	0,9980	8,3	3,5	7,1	4,2	96	102
Sibutramina	0,2 – 5,0	$y = 0,661x + 0,011$	0,9993	8,8	8,2	7,6	8,3	98	104
Tioridazina	0,2 – 5,0	$y = 0,571x + 0,024$	0,9990	6,5	7,2	8,1	7,3	108	102
Tramadol	0,2 – 5,0	$y = 0,102x + 0,069$	0,9980	6,7	2,2	6,6	5,3	95	105
Tranilcipromina	0,2 – 5,0	$y = 0,427x + 0,073$	0,9835	11,8	7,1	6,6	10,3	113	109
Trihexafenidila	0,2 – 5,0	$y = 0,655x + 0,027$	0,9915	6,9	3,2	7,1	4,5	101	99
Venlafaxina	0,2 – 5,0	$y = 0,158x + 0,067$	0,9970	6,5	5,9	6,3	5,8	104	96
Zolpidem	0,2 – 5,0	$y = 0,297x - 0,023$	0,9910	7,9	5,5	6,8	5,9	104	106

*CQB: Controle de qualidade alto. Concentração de $0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$, exceto para cafeína, carbamazepina e lidocaína onde a concentração é de $4 \mu\text{g mL}^{-1}$. **CQA: Controle de qualidade alto. Concentração de $4 \mu\text{g mL}^{-1}$, exceto para cafeína, carbamazepina e lidocaína onde a concentração é de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$

Tabela 3. Resultados obtidos na análise de amostras de plasma de pacientes suspeitos de intoxicações

Amostra	t_{RR}	IR	Substância	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração tóxica ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ^s
1	0,509	1582	Femproporex	0,21	n.d.
2	0,936	2194	Amitriptilina	0,23	>0,5
3	0,982	2282	Carbamazepina	15,12	>10
4	0,982	2282	Carbamazepina	20,51	>10
5	0,982	2282	Carbamazepina	8,63	>10
6	0,982	2282	Carbamazepina	15,44	>10
7	0,982	2282	Carbamazepina	5,88	>10
8	0,982	2282	Carbamazepina	7,95	>10

n.d.: não disponível na literatura

IR nas amostras clínicas apresentaram grande similaridade com os valores obtidos na validação do método. No entanto, o uso de IR nas condições instrumentais empregadas permite ampliar o número de substâncias potencialmente identificadas através da comparação com um amplo banco de dados já disponível,⁹ cuja comparabilidade com os resultados obtidos foi demonstrada neste estudo.

CONCLUSÕES

Foi desenvolvido e validado um método para identificação e quantificação de 40 fármacos básicos em plasma humano empregando extração líquido-líquido, sem etapa de evaporação de solvente, seguida de análise por cromatografia gasosa com detector de nitrogênio e fósforo. A retenção dos compostos foi caracterizada através de seus índices de retenção, os quais apresentaram excelente reprodutibilidade e, especialmente, comparabilidade com amplas bases de dados já disponíveis. O método mostrou-se apropriado para aplicação em toxicologia de emergência devido a sua sensibilidade, rapidez e especificidade.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Está disponível em <http://quimicanova.s bq.org.br>, na forma de arquivo PDF e com acesso livre.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). Ao Instituto de Toxicologia da PUCRS pelo fornecimento de materiais empregados no estudo.

REFERÊNCIAS

1. Linden, R.; Feltraco, L. L.; Comerlato, L. C.; Kellermann, E.; Antunes, M. V.; *Forensic Sci. Int.* **2010**, *202*, 53.
2. Manca, D.; Ferron, U.; Weber, J.; *Clin. Chem.* **1989**, *35*, 601.
3. Drummer, O. H.; Horomidis, S.; Koutis, S.; Syrjanen, M. L.; Tippet, P.; *J. Anal. Toxicol.* **1994**, *18*, 134.
4. Rasanen, I.; Ojanpera, I.; Vartiovaara, J.; Vuori, E.; Sunila, P.; *J. High Resol. Chrom.* **1996**, *19*, 313.
5. Torre, C. S.; Martínez, M. A.; Almarza, E.; *Forensic Sci. Int.* **2005**, *155*, 193.
6. Rasanen, I.; Kontinen, J.; Nokua, I.; Ojanperä, E.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2003**, *788*, 243.
7. Gergov, M.; Nokua, J.; Rasanen, I.; Ojanpera, I.; *Prob. Forensic Sci.* **2000**, *43*, 70.
8. Turcant, A.; Premel-Cabic, A.; Cailleux, A.; Allain, P.; *Clin. Chem.* **1988**, *34*, 1492.
9. Zeeuw, R. A.; Franke, J. P.; Maurer, H. H.; Pflieger, K.; *Gas chromatographic retention indices of toxicologically relevant substances on packed or capillary columns with dimethylsilicone stationary phases*, 3rd ed., VCH: Weinheim, 1992.
10. Schulz, M.; Schmoldt, A.; *Pharmazie* **2003**, *58*, 447.
11. Kirchherr, H.; Kuhn-Velten, W. N.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2006**, *843*, 100.
12. Remane, D.; Meyer, M. R.; Peters, F. T.; Wissenbach, D. K.; Maurer, H. H.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *397*, 2303.
13. Bassan, D. M.; Erdmann, F.; Krull, R.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *400*, 43.
14. Remane, D.; Meyer, M. R.; Wissenbach, D. K.; Maurer, H. H.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *401*, 1341.
15. Wu, A. H. B.; McKay, C.; Broussard, L. A.; Hoffman, R. S.; Kwong, T. C.; Moyer, T. P.; Otten, E. M.; Welch, S. L.; Wax, P.; *Clin. Chem.* **2003**, *49*, 357.
16. Shah, V. P.; Midha, K. K.; Findlay, J. W. A.; Hill, H. M.; Hulse, J. D.; McGilveray, I. J.; McKay, G.; Miller, K. J.; Patnaik, R. N.; Powell, M. L.; Tonelli, A.; Viswanathan, C. T.; Yacobi, A.; *Pharm. Res.* **2000**, *17*, 1551.
17. Linden, R.; Kellermann, E.; Sartori, S.; Souto, A. A.; *Quim.Nova* **2007**, *30*, 468.