**Determinação de pesticidas em urina em casos de envenenamento através da técnica de DPX e detecção por GC-MS**

A Toxicologia Forense é uma das áreas existentes na perícia criminal que aplica a Toxicologia em favor da lei quase que exclusivamente na decorrência de uma investigação da fatalidade de indivíduos mortos. Geralmente qualquer morte suspeita e/ou não natural é sujeita a passar por uma investigação forense como por exemplo nos casos de mortes que envolvem trauma ou violência, mortes que são potencialmente suspeitas de suicídio ou resultados de atividades criminais.A análise inicia-se no momento da necropsia do corpo com a coleta de diversas amostras biológicas como por exemplo sangue, urina, humor vítreo e conteúdo gástrico para serem posteriormente analisadas por um toxicologista forense.As principais substâncias de interesse forense são o álcool, drogas de abuso, opiáceos, opióides, benzodiazepínicos e outras substâncias como pesticidas que geralmente são encontradas em casos de envenenamento.

Pesticidas são substâncias introduzidas deliberadamente no ambiente visando a prevenção, destruição, repulsão ou amenização de pragas. A exposição dos pesticidas pode ocorrer de diferentes maneiras sendo elas por via oral, dérmica ou por inalação. O contato por via oral acontece através da ingestão de altas doses o que causa grave intoxicação e pode levar a morte, esse tipo de contato é geralmente advindo da ingestão intencional com o objetivo de causar suicídio ou ingestão acidental devido ao incorreto armazenamento.

Casos de envenenamento intencional ou não intencional por pesticidas é o maior problema público de saúde no mundo inteiro. Todos os anos na faixa de 250 a 370 mil pessoas morrem devido a ingestão desse tipo de substância química. A OMS reconhece os casos de envenenamento por pesticidas o principal meio de suicídio no mundo todo, dentre os pesticidas, as substâncias presentes no grupo dos inseticidas são as mais frequentemente encontradas nas análises toxicológicas de material biológico provenientes da autópsia de cadáveres que apresentam morte suspeita ou de maneira não natural, sendo pertinente uma análise toxicológica para consolidar as causas da morte desse indivíduo.A descoberta das causas dessas mortes é de extrema importância para a justiça, sendo assim, métodos de determinação de pesticidas em fluídos biológicos têm sido estudados ao longo dos anos. Desta forma, o desenvolvimento de um método de preparo de amostra rápido e eficiente para a extração desses compostos em amostras de urina suspeitas de envenenamento por pesticidas e aliado a uma técnica instrumental adequada de análise torna-se indispensável.

No desenvolvimento de métodos analíticos geralmente existe a necessidade de uma etapa chamada de preparo de amostra que possui importância fundamental para o sucesso de qualquer método analítico, sendo essa etapa geralmente dependente das características da matriz e também do analito, o que requer uma otimização apropriada de seus diferentes parâmetros de influência. Algumas características são desejadas na etapa de preparo de amostra, sendo elas rapidez, simplicidade, aumento da seletividade e da especificidade, baixo custo, potencial de automação e o uso de quantidades ínfimas ou nenhuma de solventes orgânicos visando assim uma menor agressão ao meio ambiente e sem desperdícios.

Atécnica de extração em fase sólida tem se tornado uma das técnicas mais comuns de concentração de analitos, pois proporcionam características almejáveis no preparo de amostra.Uma das técnicas baseada nesse tipo de extração é a extração em ponteiras descartáveis (DPX – *disposable pipette extraction*) desenvolvida por William E. Brewer, da Universidade da Califórnia, que têm sido aplicada em análises alimentarese de identificação de compostos em diferentes tipos de amostras, como por exemplo, plasma, sangue e urina. A técnica consiste na utilização de uma ponteira que contém material sorvente livremente contido no seu interior que é misturado com a amostra através da aspiração de ar na qual ocorre o equilíbrio de sorção do analito com o sorvente. Como é utilizado menores massas de material sorvente, pequenas quantidades de amostra e de solvente orgânico são requeridas na etapa de extração. Posteriormente a matriz é descartada e os analitos eluídos com um solvente adequado e analisados em um instrumento analítico conveniente. As etapas do processo de extração usado na técnica de DPX está mostrado na Figura 1. As vantagens dessa técnica são o uso de pipetadores multicanais, o fluxo do líquido pode ser bidirecional e como são descartáveis, contaminação é menos recorrente. As análises usando a DPX podem ser realizadas através de diferentes técnicas, sendo a cromatografia líquida e a cromatografia gasosa as mais utilizadas.

 O principal objetivo desse trabalho consiste no desenvolvimento de um procedimento eficiente de preparo de amostra para a extração de pesticidas em urina em casos de envenenamento utilizando a extração em ponteiras descartáveis(DPX) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) como técnica de separação e detecção dos compostos de interesse.

****Nesse trabalho foram utilizados uma solução contendo uma mistura dos seguintes pesticidas: aldicarbe, oxamil, propoxur, carbofurano, 3-hidroxicarbofurano, carbaril, metiocarbe, terbufós, metilparation, clorpirifós e endosulfan) preparada a partir de padrões adquiridos da Sigma Aldrich, ponteiras de DPX comerciais de 1 mL adquiridas na DPXLabs contendo RP-20mg como fase extratora, solventes como acetato de etila, acetonitrila e metanol adquiridos da Sigma Aldrich e água ultrapura. As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo gasoso acoplado a um detector de espectrometria de massas da marca Shimadzu e modelo GC-MS-QP 2010 Plus. Na separação cromatográfica foi empregada uma coluna da marca Restek de modelo Rtx®-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm de espessura do filme).



 **Figura 1.** Processo de extração com DPX. **Figura 2.** Resultado da otimização da extração.

Para o desenvolvimento do método foram realizados diferentes ensaios de otimização dos principais parâmetros que afetam a eficiência da extração dos analitos adicionados inicialmente em água ultrapura, sendo eles o modo de ciclo de extração, o tempo e o número de ciclos de extração, o solvente de dessorção, o tempo e o número de ciclos de dessorção e a otimização da etapa de limpeza.

Os resultados obtidos no estudo do modo de ciclo de extração que foi avaliado em dois modos distintos, um em que a alíquota utilizada para a extração era sempre nova proveniente do frasco contendo a amostra e o outro era sempre da mesma alíquota, sendo o primeiro modo o que mostrou melhor resultado. Na etapa de extração foi avaliado a quantidade de ciclos e o tempo de extração, como mostrado na Figura 2 o melhor resultado foi 5 ciclos de extração de 30 segundos. No estudo da dessorção líquida primeiramente realizou-se um estudo do melhor solvente, na qual acetato de etila, metanol e acetonitrila foram testados e o acetato de etila mostrou-se mais eficiente. Depois, foi realizado o estudo do ciclo e do tempo de dessorção sendo fixado o volume de 200 µL de solvente e diferentes números de ciclos e de tempo de extração, sendo 5 ciclos de 15 segundos o que apresentou melhor eficiência de dessorção. Na etapa de limpeza entre cada extração foi estudado número de ciclos com os solventes metanol e acetato de etila e volume de 500 µL, sendo metanol o que apresentou melhor limpeza com 3 ciclos de 10 segundos.

Baseado nesses resultados da otimização da etapa de extração a próxima etapa do desenvolvimento do trabalho que está sendo realizada é obtenção de uma curva analítica para a quantificação desses pesticidas em amostras de urina, na qual os analitos são adicionados em concentrações conhecidas em amostra de urina coletada de voluntários, seguido da etapa de extração e de dessorção para posterior quantificação no cromatógrafo gasoso. Feito isso, será realizada a validação do método baseado em alguns parâmetros de mérito como linearidade, exatidão, precisão e recuperação.

 A partir do método de extração já desenvolvido e da curva analítica em fase de obtenção será possível extrair, detectar e quantificar esses compostos em amostras de urina suspeitas de envenenamento que serão fornecidas pelo Instituto Geral de Perícias de Santa Catarina (IGP-SC), na qual esse proposto método vai contribuir muito para as análises futuras em casos de envenenamento por pesticidas realizadas nesse órgão em prol da justiça do Estado de Santa Catarina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. LEVINE, B. *Principles of Forensic Toxicology.* 2ª edição: New York, 2005.

2. KLAASSEN, C.D., WATKINS III, J.B. *Fundamentos em Toxicologia.* 2º edição: São Paulo, 2012.

3. PINTO, M. A. L.; QUEIROZ, M. E. C. . Extração em ponteiras descartáveis: fundamentos teóricos e aplicações. *Scientia Chromatographica.*2015, *15*, 101-108.

4. SCHROEDER, J. L. M., L.J. ; SMITH, R.K.; BREWER, W.E.; .CLELLAND, B.L; MORGAN, S.L. . The analysis of Δ9-Tetrahydrocannabinol (THC) and metabolites in Whole Blood and 11-nor-Δ9-Tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid (THCc) in Urine using Disposable Pipette Extraction with Confirmation and Quantification by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology.* 2008, *32*, 659-666.

5. GUAN, H.; BREWER, W. E.; MORGAN, S. L. New approach to multiresidue pesticide determination in foods with high fat content using disposable pipette extraction (DPX) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *J Agric Food Chem*. 2009, *57*, 10531-10538.