

20
24

PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO

PERÍCIA CRIMINAL

TOXICOLOGIA FORENSE



VOLUME

10

MJSP



PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO

PERÍCIA CRIMINAL

TOXICOLOGIA FORENSE



**20
24**

**VOLUME
10**

DSUSP

SECRETARIA
NACIONAL DE
SEGURANÇA PÚBLICA

MINISTÉRIO DA
JUSTIÇA E
SEGURANÇA PÚBLICA

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
UNIÃO E RECONSTRUÇÃO

Presidente da República

Luiz Inácio Lula da Silva

Ministro da Justiça e Segurança Pública

Ricardo Lewandowski

Secretário Executivo

Manoel Carlos de Almeida Neto

Secretário Nacional de Segurança Pública

Mario Luiz Sarrubbo

Diretora do Sistema Único de Segurança Pública

Isabel Seixas de Figueiredo

Coordenadora-Geral de Modernização Tecnológica

Beatriz Marques de Jesus Figueiredo

MINISTÉRIO DA JUSTIÇA E SEGURANÇA PÚBLICA
Secretaria Nacional de Segurança Pública
Diretoria do Sistema Único de Segurança Pública

20
24

PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO

PERÍCIA CRIMINAL

TOXICOLOGIA FORENSE

VOLUME
10

SECRETARIA NACIONAL DE SEGURANÇA PÚBLICA

Diretoria do Sistema Único de Segurança Pública
Coordenação - Geral de Modernização Tecnológica
Esplanada dos Ministérios, Bloco "T", Anexo 2, 5º andar, sala 506
Telefone de contato: (61) 2025.9125
E-mail: cgmtec.senasp@mj.gov.br

2024 ©Ministério da Justiça e Segurança Pública
Todos os direitos reservados. É permitida a reprodução total ou parcial desta obra, desde que seja citada a fonte e não seja para venda ou qualquer fim comercial.

Disponível em <http://portal.mj.gov.br>

Tiragem: 2.000 exemplares

Impresso no Brasil

COORDENAÇÃO

Christhiane Pinto Cutrim e Liliane Pires (coordenadora suplente).

REVISÃO DE CONTEÚDO

Ana Vitória Botelho, Christhiane Pinto Cutrim, Fabio Ferreira Real, Franciele Prete Bento, Francisca Dieimes Braga Miguéis Rapini Cleto, Liliane Pires, Rafael Friedrich Davet.

INTEGRANTES DO GRUPO DE TRABALHO

Dayse Fernanda de Souza, Fabrício Souza Pelição, Gabriele Hampel, Marcela Sena Braga e Rafael Friedrich Davet.

CONVIDADO

José Luiz da Costa.

DIAGRAMAÇÃO E PROJETO GRÁFICO

Ana Vitória Botelho, Christhiane Pinto Cutrim, Gabriel Silva Araújo, Franciele Prete Bento, Priscilla Duarte Bittar.

IMPRESSÃO

Senappen e Equipe do Projeto (Re) Integro.

341.4331

P441

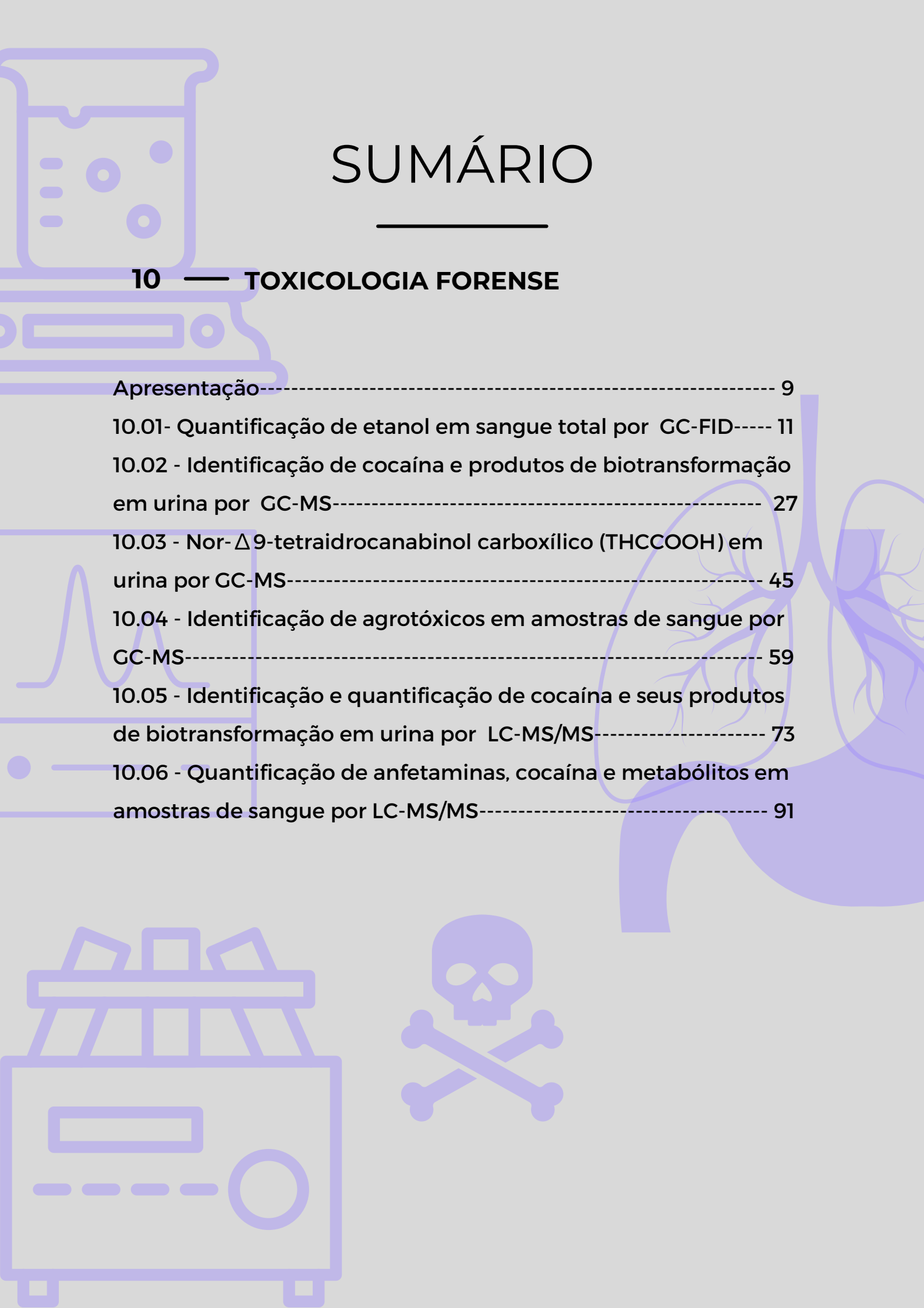
Perícia criminal : toxicologia forense / coordenadoras, Christhiane Pinto Cutrim, Liliane Pires. – Brasília : Secretaria Nacional de Segurança Pública, 2024.
111 p. -- (Procedimentos operacionais padrão ; v. 10)

ISBN 978-85-5506-245-2

1. Perícia criminal - 2. Toxicologia forense - 3. Investigação criminal. I. Cutrim, Christhiane Pinto (coord.). II. Pires, Liliane (coord.). Brasil. Secretaria Nacional de Segurança Pública. III. Título. IV. Série.

CDD

Elaborada por Luciene Maria Sousa CRB1-1655



SUMÁRIO

10 — TOXICOLOGIA FORENSE

Apresentação.....	9
10.01- Quantificação de etanol em sangue total por GC-FID.....	11
10.02 - Identificação de cocaína e produtos de biotransformação em urina por GC-MS.....	27
10.03 - Nor- Δ^9 -tetraidrocanabinol carboxílico (THCCOOH) em urina por GC-MS.....	45
10.04 - Identificação de agrotóxicos em amostras de sangue por GC-MS.....	59
10.05 - Identificação e quantificação de cocaína e seus produtos de biotransformação em urina por LC-MS/MS.....	73
10.06 - Quantificação de anfetaminas, cocaína e metabólitos em amostras de sangue por LC-MS/MS.....	91

APRESENTAÇÃO

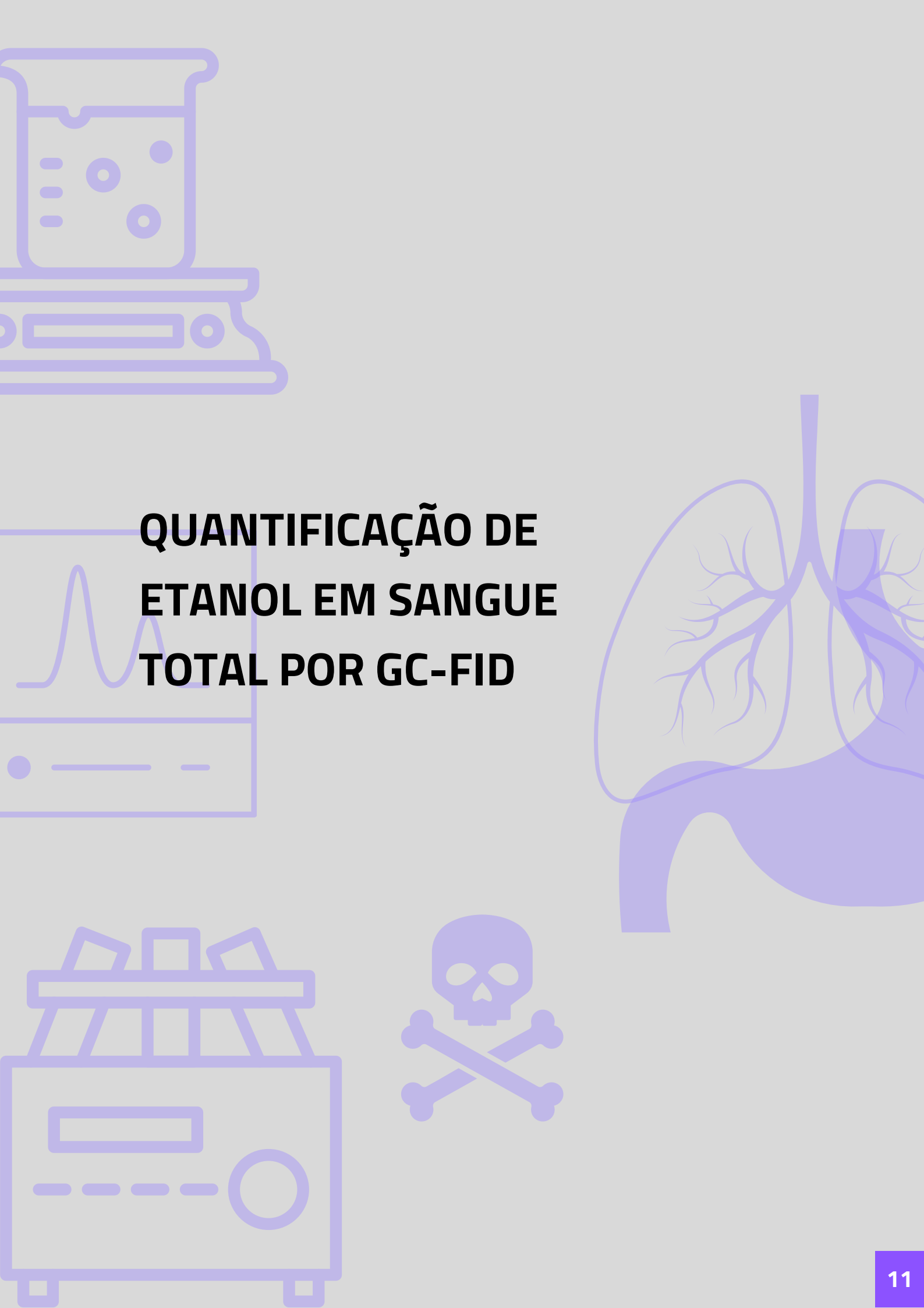
A Secretaria Nacional de Segurança Pública do Ministério da Justiça e Segurança Pública (Senasp) publicou pela primeira vez, em 2013, procedimentos operacionais padronizados (POPs) dedicados exclusivamente às atividades periciais. Tal passo estabeleceu um marco na disseminação de boas práticas na perícia criminal nacional, objetivando a uniformização do processo de produção da prova técnica no país, contribuindo para a garantia dos direitos de todas e de todos os envolvidos em processos criminais, seja na condição de vítima, seja na condição de autor.

Dando continuidade a este trabalho e reconhecendo o avanço da área pericial nos últimos anos, a Senasp agora lança a série Procedimentos Operacionais Padrão - Perícia Criminal. Esta nova coleção foi coordenada pela Diretoria do Sistema Único de Segurança Pública e foi elaborada com a colaboração de representantes do Conselho Nacional dos Dirigentes de Polícia Científica (CONDPC), das associações de profissionais de perícia criminal, da própria Senasp e de conceituados especialistas nos temas abordados.

Os procedimentos operacionais padrão incluídos nesta publicação têm abrangência nacional e visam servir como referência para as Unidades Federativas, respeitando a diversidade das atividades periciais e a necessidade de adaptação às mais diversas realidades locais. O trabalho envolveu a atualização e a elaboração de 56 POPs, que foram validados e testados pelas perícias dos Estados e do Distrito Federal. Foram incluídas abordagens específicas para novos temas prioritários como o feminicídio e os crimes contra o meio ambiente. Além disso, nesta edição, para uma melhor organização, os documentos foram distribuídos em 10 volumes temáticos.

A Senasp expressa sua gratidão a todos os profissionais que contribuíram para esta publicação, essencial para a elucidação de crimes, especialmente os violentos. Em resposta às novas demandas identificadas durante a elaboração deste trabalho, planejamos atualizações e revisões futuras e constantes. Esperamos que estes POPs se tornem um guia confiável, promovendo a eficiência, a coesão e a força das atividades periciais em todo o país, fortalecendo com isso a proteção inegociável dos direitos humanos.

Mario Luiz Sarrubo
Secretario Nacional de Segurança Pública



QUANTIFICAÇÃO DE ETANOL EM SANGUE TOTAL POR GC-FID

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP)

PERÍCIA OFICIAL DE NATUREZA
CRIMINAL



MINISTÉRIO DA JUSTIÇA E
SEGURANÇA PÚBLICA

POP N° 10.01 - TOXICOLOGIA FORENSE

QUANTIFICAÇÃO DE ETANOL EM SANGUE TOTAL POR GC-FID

FINALIDADE

Orientar o profissional de perícia a identificar e quantificar etanol em amostras de sangue total por cromatografia gasosa com amostragem por "headspace" e detecção por ionização em chama (GC-FID).

PÚBLICO ALVO

Peritos Criminais da área de toxicologia forense.

1. ABREVIATURAS E SIGLAS

CQA: amostra de controle de qualidade de alta concentração.

CQB: amostra de controle de qualidade de baixa concentração.

CQM: amostra de controle de qualidade de média concentração.

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético.

FID: da língua inglesa, flame ionization detector (detector por ionização de chama).

GC: da língua inglesa, gas chromatography (cromatografia gasosa).

NaF: fluoreto de sódio.

PI: padrão interno.

q.s.p.: quantidade suficiente para.

2. RESULTADOS ESPERADOS

- Quantificação de etanol por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama com amostragem por "headspace" em amostras de sangue total.

3. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

- Balões volumétricos de 100 e 1000 mL
- Pipeta volumétrica de volume ajustável de 10 - 100 µL
- Pipeta volumétrica de volume ajustável de 100 - 1000 µL

- Frascos de “headspace”
- Etanol PA ou superior
- N-propanol PA ou superior
- Água reagente
- Duas colunas cromatográficas com polaridades distintas e adequadas para a retenção de etanol, como, por exemplo, BAC, ALC, WAX ou 624
- Equipamento de cromatografia gasosa com detector de ionização de chama

4. PROCEDIMENTOS

4.1. Amostra questionada

- A coleta “in vivo” deve ser realizada por punção venosa o mais brevemente possível devido a eliminação do etanol. Deve-se realizar assepsia do local de coleta com material isento de etanol e outros álcoois em sua constituição (p.ex.: antissépticos à base de iodo).
- No caso de coletas “post mortem”, colher sangue, preferencialmente, de vasos calibrosos (veias femoral, subclávia ou jugular interna). Caso não seja possível, colher sangue da cavidade cardíaca. Não coletar sangue acumulado das cavidades torácica e abdominal devido à alta possibilidade de contaminação com outros fluidos biológicos ou conteúdo estomacal.

4.2. Custódia

- Conforme redação dada pela Lei nº 13.964/19 em seu Art. 158-A, a cadeia de custódia é definida como “o conjunto de todos os procedimentos utilizados para manter e documentar a história cronológica do vestígio coletado em locais ou em vítimas de crimes, para rastrear sua posse e manuseio a partir de seu reconhecimento até o descarte”.
- Dentre esses procedimentos, a coleta é considerada uma das etapas mais importantes de todo o processo da cadeia de custódia, pois, quando realizada de forma inadequada, pode destruir os vestígios, inviabilizando sua análise e, consequentemente, a produção da prova pericial.
- No caso da realização do exame de alcoolemia, as amostras devem ser acondicionadas em envelopes com lacre de segurança e numeração individualizada e encaminhadas ao laboratório o mais brevemente possível. Entretanto quando o prazo ultrapassar 48 horas é importante que as amostras sejam congeladas (-20°C). Para prazos inferiores, as amostras devem ser mantidas refrigeradas (2°C a 8°C).

4.3. Preparo de soluções

4.3.1. Solução de PI (N-propanol)

- Adicionar 2 mL do solvente N-propanol grau P.A. em balão volumétrico de 1000 mL.
- Completar o volume do balão volumétrico com água reagente.
- A solução de padrão interno em água pode ser armazenada por até 3 meses sob refrigeração (4°C), ou período superior desde que o laboratório demonstre a estabilidade com estudo próprio.

4.3.2. Soluções dos calibradores

- Os pontos da curva devem ser preparados em balões volumétricos de 100 mL, pipetando os volumes de etanol demonstrados na tabela e completando o volume com água reagente.

Tabela 1 - Preparo dos pontos da curva.

	Concentração final (dg/L)	Volume de etanol (µL)	Volume de água (mL)
Cal1	1,0	12,7	q.s.p. 100
Cal2	5,0	63,0	q.s.p. 100
Cal3	10,0	127,0	q.s.p. 100
Cal4	20,0	253,0	q.s.p. 100
Cal5	30,0	380,0	q.s.p. 100
Cal6	40,0	507,0	q.s.p. 100
Cal7	50,0	634,0	q.s.p. 100

4.3.3. Soluções padrão de controle de qualidade interno

- Os controles devem ser preparados em balões volumétricos de 100 mL, pipetando os volumes de etanol demonstrados na tabela a seguir e completando o volume com água reagente.

Tabela 2 - Preparo dos controles internos

	Concentração final (dg/L)	Volume de etanol (µL)	Volume de água (mL)
CQB	3,0	38,0	q.s.p. 100
CQM	25,0	317,0	q.s.p. 100
CQA	45,0	570,0	q.s.p. 100

- As soluções padrão de etanol em água podem ser armazenadas por até 1 (um) ano sob refrigeração (4°C). Para armazenamento por períodos superiores, o laboratório deve demonstrar a estabilidade com estudo próprio.

4.4. Procedimentos analíticos

4.4.1 Curva de calibração

- A curva de calibração deve ser composta por sete pontos nas concentrações de 1; 5; 10; 20; 30; 40 e 50 dg/L (decigramas de etanol por litro de sangue). Cada ponto deve ser feito em triplicata.
- Os pontos da curva devem ser preparados, da seguinte forma:
 - pipetar 500 µL de cada um dos calibradores (item 4.3.2) em frascos do tipo "headspace" devidamente identificados e acrescentar 500 µL do padrão interno N-propanol (item 4.3.1);
 - fechar o frasco imediatamente.
- A curva de calibração somente será aceita quando:

- curva definida pelo valor médio das replicatas de cada ponto;
 - a inexatidão apresentar erro máximo de $\pm 15\%$, exceto para o Cal 1 para o qual permite-se erro de até $\pm 20\%$;
 - coeficiente de variação das replicatas for menor que 15% (precisão).
- A curva de calibração deverá ser realizada novamente toda vez que forem preparadas novas soluções de PI ou quando os controles de qualidade não estiverem dentro dos critérios de aceitação definidos pelo laboratório. Grandes intervenções no equipamento de GC-FID devem também demandar a realização de nova curva, como no caso de troca de coluna(s) ou outras.

4.4.2. Controle de qualidade interno ("in house")

- Para avaliação da curva de calibração, os controles devem ser preparados em quintuplicata.
- Para análises de rotina, os três níveis de controle deverão ser realizados em duplicata a cada corrida analítica (lote, sequência ou "batch" de amostras), sendo recomendada a análise de um nível de controle a cada 20 injeções.
- Modo de preparo:
 - pipetar 500 μL das soluções de controle no frasco de "headspace" devidamente identificados e acrescentar 500 μL do padrão interno N-propanol;
 - fechar o frasco de "headspace" imediatamente.

4.4.3. Branco de análise

- É recomendada a análise de pelo menos um branco a cada sequência analítica.
- Modo de preparo:
 - pipetar 500 μL do padrão interno N-propanol e 500 μL de água reagente em frasco de "headspace" devidamente identificado;
 - fechar o frasco de "headspace" imediatamente.

4.4.4. Amostras questionadas

- pipetar 500 µL de sangue total no frasco de "headspace" devidamente identificado;
- acrescentar 500 µL do padrão interno N-propanol;
- fechar o frasco de "headspace" imediatamente.

4.5. Método cromatográfico

- Os parâmetros descritos abaixo têm caráter exemplificativo, sendo que cada laboratório deve se adequar de acordo com a configuração de seus respectivos equipamentos:

4.5.1. Colunas cromatográficas

- Utilizar duas colunas com polaridades distintas e adequadas para a retenção de etanol, bem como para a completa resolução cromatográfica entre diferentes substâncias orgânicas voláteis. Colunas comercialmente conhecidas como BAC, ALC, WAX ou 624 podem ser utilizadas.

4.5.2. Condições do cromatógrafo em fase gasosa

- Modo de injeção: split 1:10.
- Temperatura do injetor: 200°C.
- Fluxo gás de arraste (N₂): 1,5 a 3,0 mL/min.
- Modo fluxo: constante.
- Temperatura da coluna: 40°C (isotérmico).

4.5.3. Condições do detector (FID)

- Temperatura: 250°C.
- Make-up (N₂): 24 mL/min.
- H₂: 32 mL/min.
- Ar: 200 mL/min.

4.5.4. Condições do injetor automático

- Modo de injeção: headspace.
- Temperatura da seringa: 60°C.

- Temperatura do forno de incubação: 60°C.
- Tempo de incubação: 20 minutos.
- Velocidade de incubação: 500 rpm (velocidade média).
- Volume de injeção: 250 µL.

4.6. Avaliação dos resultados

- Avaliar o TR do etanol em ambos os cromatogramas, que pode possuir uma variação $\pm 2\%$ conforme o controle.
- Avaliar a presença e o TR do padrão interno em ambos os cromatogramas, que pode possuir uma variação $\pm 2\%$ conforme o controle.
- A ausência do PI determina obrigatoriamente a repetição da preparação desta amostra.
- Para aprovação da corrida analítica, no mínimo 67% (sessenta e sete por cento) do total de CQs e no mínimo 50% (cinquenta por cento) dos CQs de cada concentração devem apresentar desvio menor ou igual a 15% (quinze por cento) em relação aos seus respectivos valores nominais (RDC n° 27 de 2012, Anvisa).
- As amostras que apresentarem resultados positivos deverão ser testadas novamente, com outra porção da amostra sendo submetida a todo processo analítico.
- O Anexo B traz exemplos de cromatogramas de amostras submetidas à análise de dosagem alcoólica.

5. PONTOS CRÍTICOS

- O método, antes de sua aplicação na rotina de análises, deve ser validado, conforme normas vigentes.
- Como o método é quantitativo, a calibração e verificação de micropipetas, vidrarias, balanças, entre outros, devem ser realizadas periodicamente de acordo com a política de qualidade interna.
- Tratando-se de métodos desenvolvidos no laboratório, recomenda-se fortemente a participação em programas de proficiência interlaboratoriais (controle de qualidade externo) para exames de alcoolemia.
- O uso de colunas apolares, como as de fase estacionária 100% dimetilsiloxano (p.ex.: DB1, HP-1, RTX-1) ou 5% fenil - 95% dimetilsiloxano (p.ex.: DB-5, HP-5, RTX-5) não é recomendável por não permitir retenção e separação adequadas para análise de etanol em sangue.

- A utilização de apenas uma coluna cromatográfica é permitida somente nos casos de detecção por espectrometria de massas.
- A produção endógena de etanol em decorrência da putrefação da amostra deve ser avaliada pela constatação da presença de picos de outros voláteis, como acetaldeído, acetona e metanol.
- As características da técnica de GC-FID requerem do laboratório condições de infraestrutura adequadas, como por exemplo, rede elétrica dimensionada, estabilizada e com nobreak, sala climatizada (temperatura e umidade controladas) e central de gases de acordo com a legislação vigente.

6. ESTRUTURA BÁSICA DO LAUDO

6.1. Identificação do material

- Identificação, descrição e lacre da amostra questionada.

6.2. Exames realizados

- Determinação da concentração de etanol em sangue total por GC-FID.

6.3. Resultados obtidos

- Os critérios de identificação do analito devem ser avaliados em todas as corridas. Os resultados analíticos deste procedimento podem ser apresentados na forma de tabela, conforme exemplo abaixo:

Analito	Resultado
Álcool etílico	Detectado

NÃO DETECTADO: ausência de picos no tempo de retenção esperado, ou valor obtido nas análises encontra-se abaixo do valor de sensibilidade analítica do analito.

DETECTADO: presença de pico no tempo de retenção esperado (verificado no controle positivo), com valor obtido nas análises acima do valor de sensibilidade analítica do analito.

6.4. Conclusão

- **NÃO DETECTADO:** "As análises realizadas não detectaram a presença de etanol na amostra".

- **DETECTADO:** “As análises realizadas detectaram na amostra a concentração de xxxx dg de etanol por litro de sangue”.

7. REFERÊNCIAS

ANSI/ASB Standard 113, Standard for Identification Criteria in Forensic Toxicology. First Edition (2023). [Online]; 2023. [acesso em]. Disponível em: <https://www.aafs.org/academy-standards-board>.

BRASIL. Anvisa. RESOLUÇÃO - RDC Nº 27, DE 17 DE MAIO DE 2012. [Online]; 2012; [acesso em 06 dez 2023]. Disponível em https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027_17_05_2012.html

BRASIL. Lei no 13.964 de 24 de dezembro de 2019. Aperfeiçoa a legislação penal e processual penal. [Online]; 2019; [acesso e 06 dez 2023]. Disponível em https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2019/lei/l13964.htm

BRASIL. Compilado dos Relatórios Técnicos Finais. **Câmaras Técnicas de cadeia de custódia: Discussão, Diagnóstico e Recomendações pós Lei n. 13.964/2019.** [acesso em 15 mar 2024]. Disponível em <https://dspace.mj.gov.br/handle/1/12006>

COSTA, R.A.R. et al. **Diretrizes para o exame toxicológico de quantificação de etanol em sangue (alcoolemia).** Sociedade Brasileira de Toxicologia – SBTOX e Sociedade Brasileira de Ciências Forenses – SBCF. [Online]; 2020. [acesso em 06 dez 2023]. Disponível em <https://www.sbtox.org/diretrizes>.

8. GLOSSÁRIO

BRANCO: amostra que não contém o analito de interesse ou outras substâncias interferentes.

CALIBRAÇÃO: conjunto de operações sob condições especificadas, que estabelece a correspondência entre os valores indicados por um instrumento de medida e um material de referência, com fins de padronização ou ajuste de instrumentos ou de procedimentos.

CONTROLE DE QUALIDADE EXTERNO: determinação da exatidão e do desempenho do processo analítico, realizada por meio de comparações interlaboratoriais conduzidas por Provedor de Ensaio de Proficiência, também conhecido como Programas de Ensaio de Proficiência.

CONTROLE DE QUALIDADE INTERNO: procedimentos feitos internamente por meio de controles a fim de avaliar a precisão do sistema analítico e se este está operando dentro dos limites de tolerância pré-definidos.

CQB: amostra de controle de qualidade de baixa concentração (até 3 vezes o limite inferior de quantificação do método).

CQM: amostra de controle de qualidade de média concentração, em concentração próxima à média entre os limites inferior e superior de quantificação.

CQA: amostra de controle de qualidade de alta concentração, em concentração entre 75 (setenta e cinco) e 90% (noventa por cento) da maior concentração da curva de calibração.

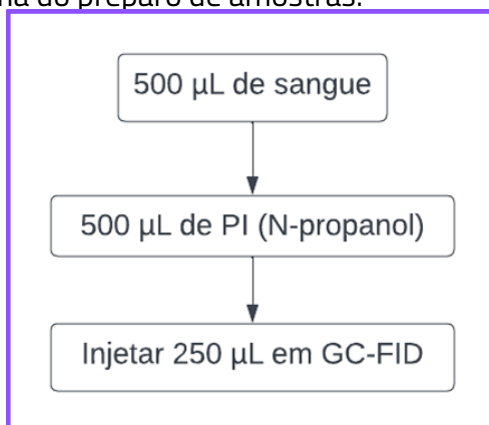
PADRÃO INTERNO: substância química proveniente de uma solução padrão de concentração fixa, adicionada em uma mesma quantidade aos padrões de calibração, amostras de CQs e amostras em estudo.

VALIDAÇÃO: é a avaliação sistemática de um método por meio de ensaios experimentais de modo a confirmar e fornecer evidências objetivas de que os requisitos específicos para seu uso pretendido são atendidos.

9. ANEXOS

ANEXO A- FLUXOGRAMA DO PREPARO DE AMOSTRAS

Figura 1 - Fluxograma do preparo de amostras.



ANEXO B - EXEMPLOS DE CROMATOGRAMAS

Figura 2 - Amostra negativa, sem picos na região do Etanol.

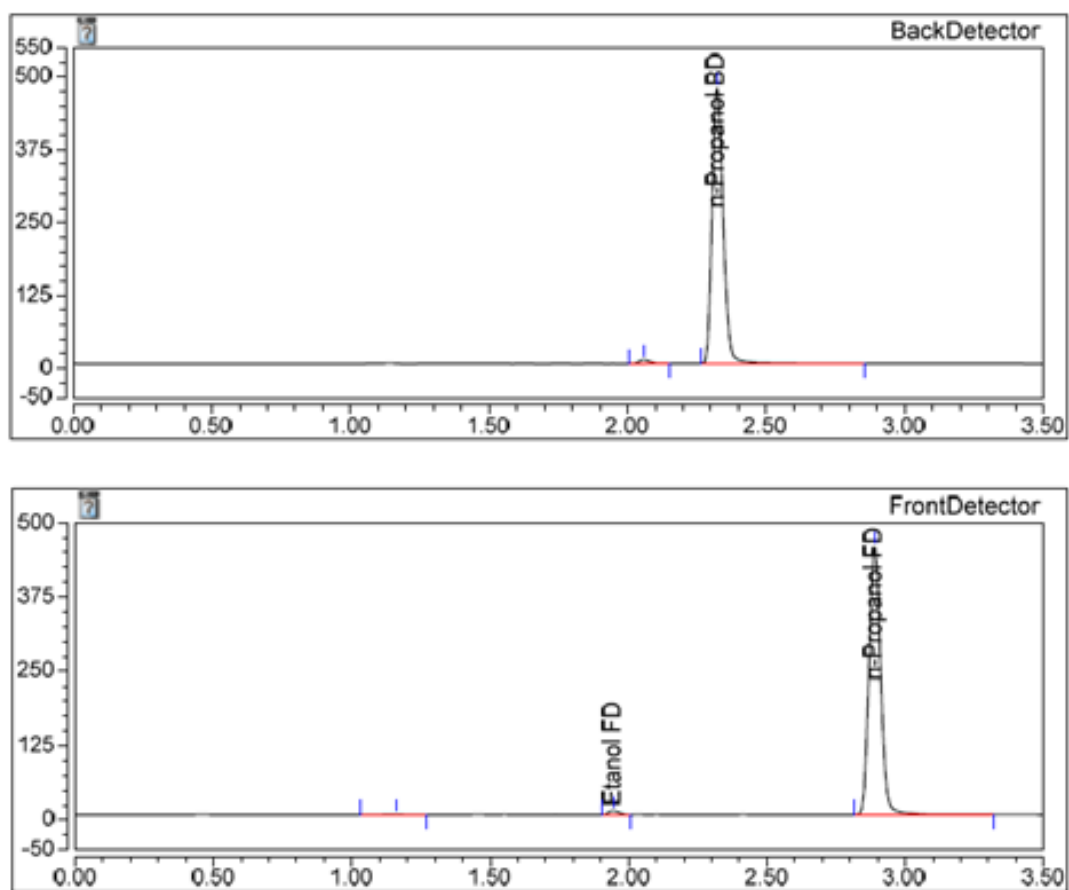


Figura 3 - Exemplo de amostra positiva.

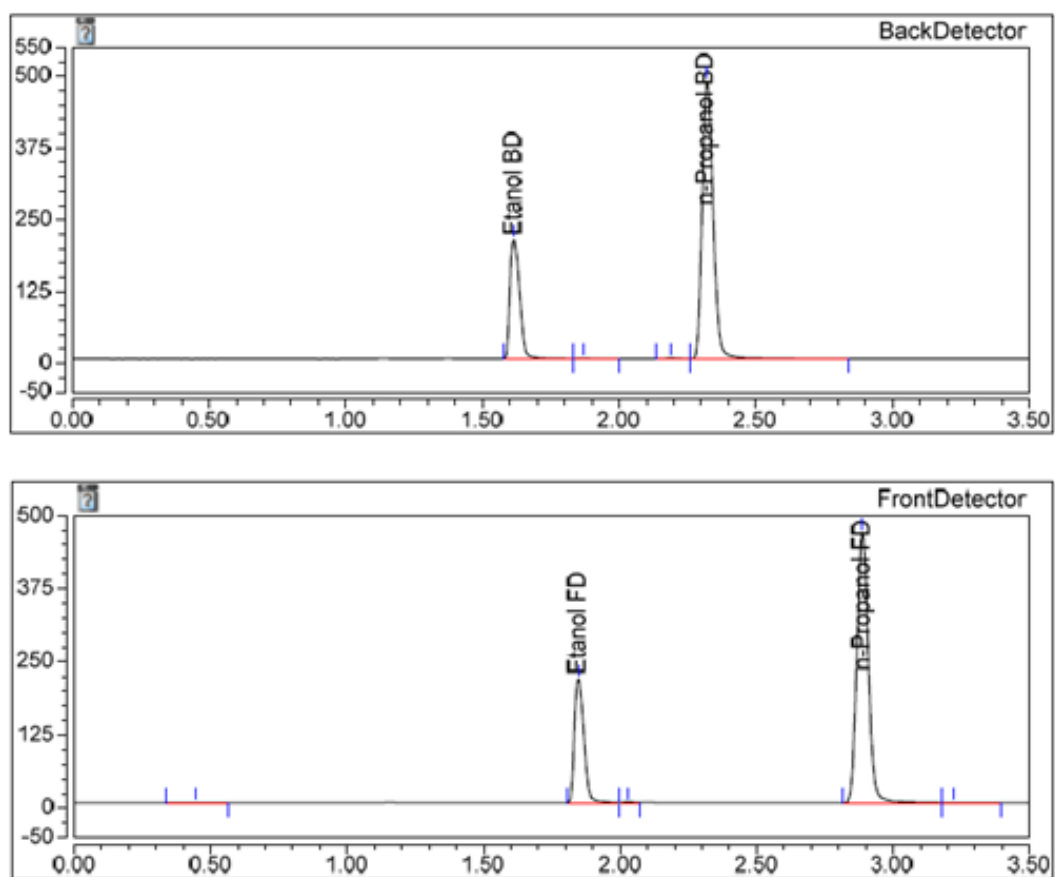


Figura 4 - Amostra negativa, com pico interferente no tempo do etanol em um dos detectores (FrontDetector), que não se confirma no outro (Back Detector).

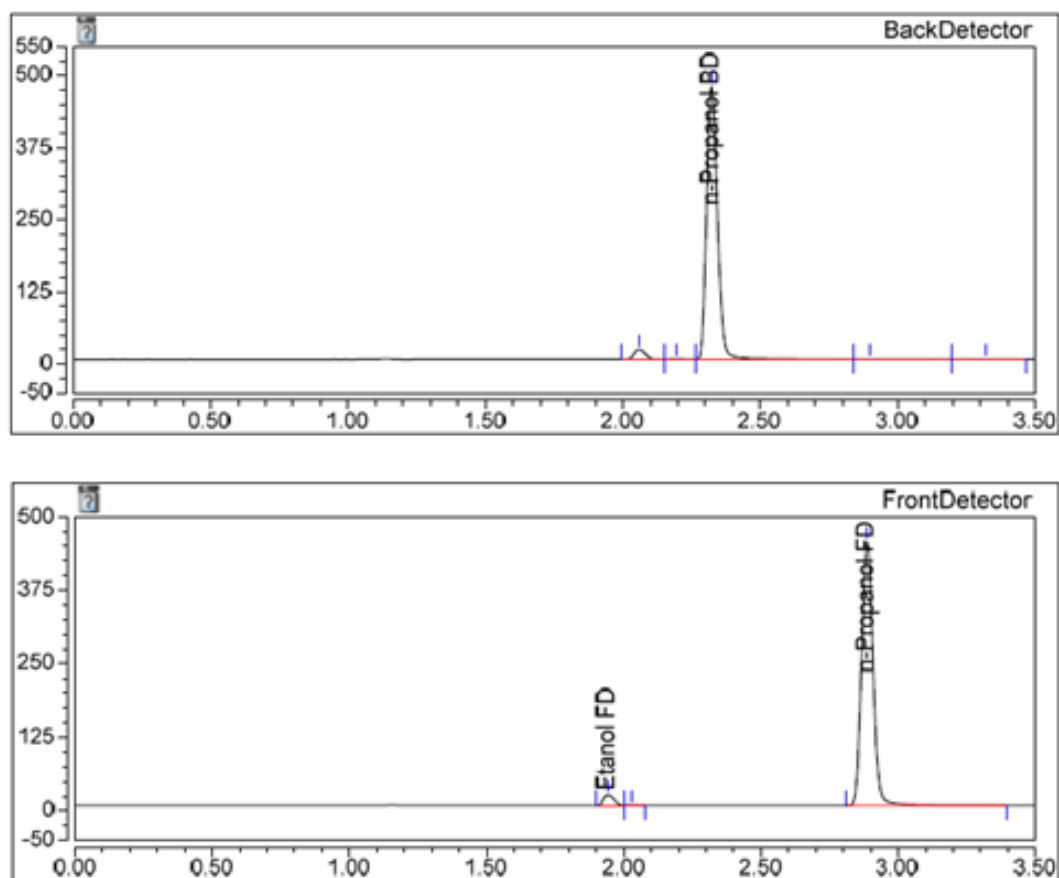
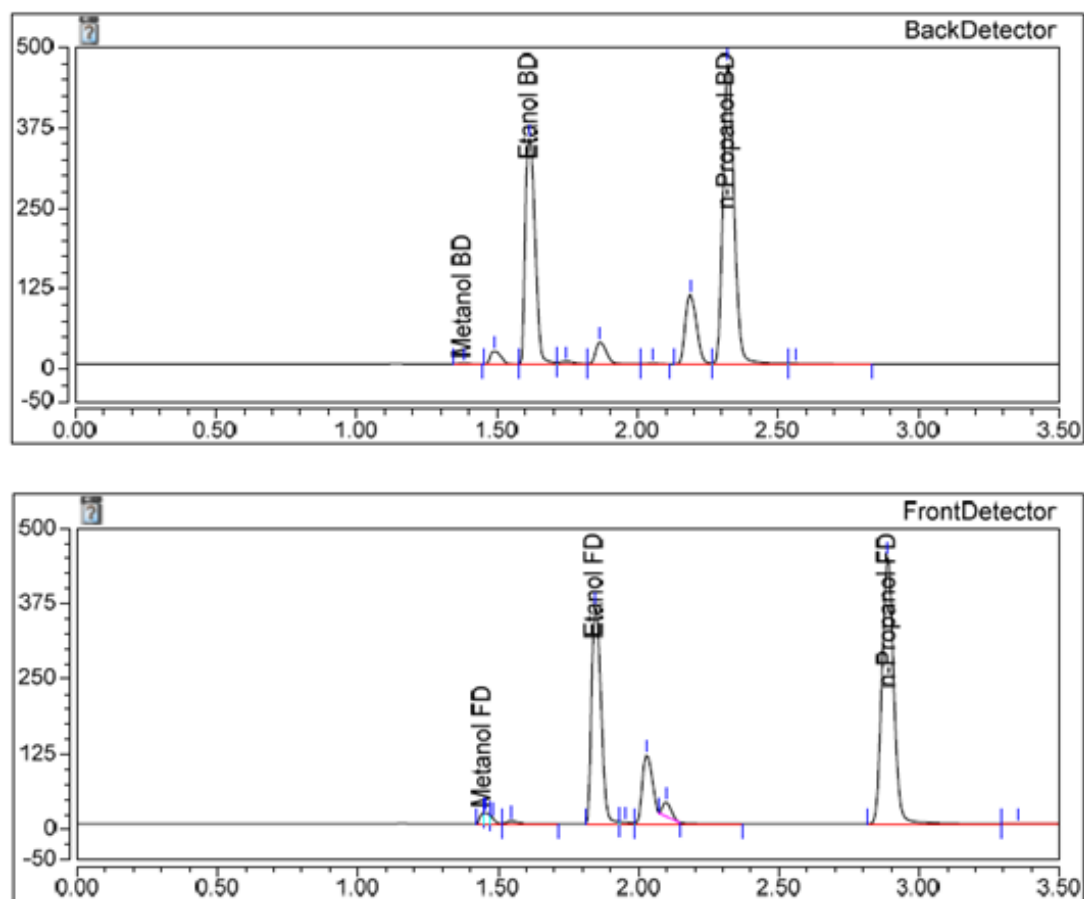
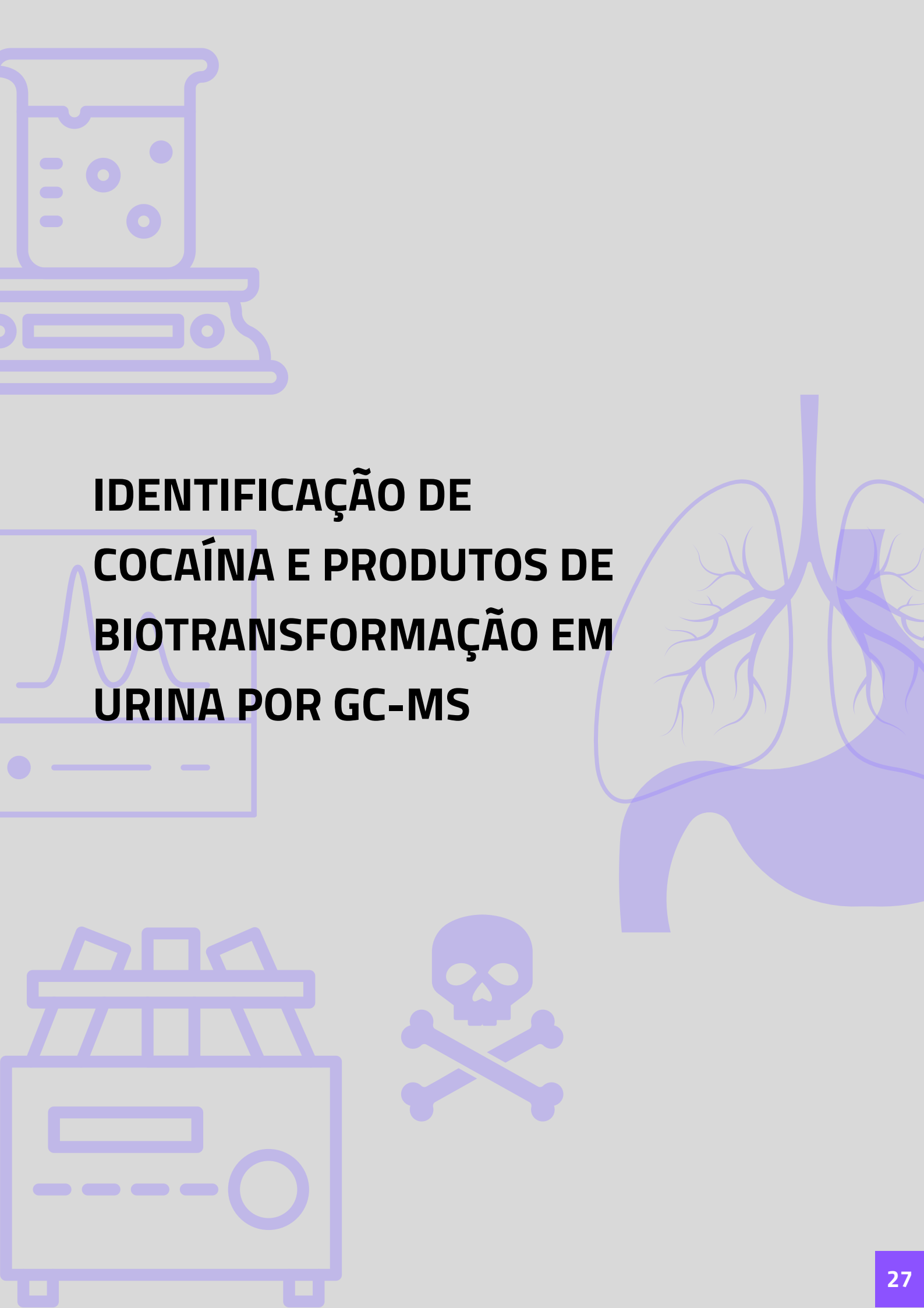


Figura 5 - Cromatograma de cadáver putrefeito, com picos adicionais referentes a substâncias formadas durante o processo de putrefação.





IDENTIFICAÇÃO DE COCAÍNA E PRODUTOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO EM URINA POR GC-MS

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP)

PERÍCIA OFICIAL DE NATUREZA
CRIMINAL



MINISTÉRIO DA JUSTIÇA E
SEGURANÇA PÚBLICA

POP N° 10.02 - TOXICOLOGIA FORENSE

IDENTIFICAÇÃO DE COCAÍNA E PRODUTOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO EM URINA
POR GC-MS

FINALIDADE

Orientar o profissional de perícia a identificar e confirmar a presença de cocaína, cocaetileno e benzoilecgonina em amostras de urina por extração líquido-líquido e cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS).

PÚBLICO ALVO

Peritos Criminais da
área de toxicologia
forense.

1. ABREVIATURAS E SIGLAS

BSTFA: N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida.

GC: da língua inglesa, gas chromatography (cromatografia gasosa).

MS: da língua inglesa, mass spectrometer (espectrometria de massas).

MSTFA: N-Metill-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida.

PI: padrão interno.

TMCS: trimetilclorosilano.

TMS: trimetilsilil.

5MS: (5% fenil) dimetilpolisiloxano.

2. RESULTADOS ESPERADOS

- Identificação e confirmação de cocaína e seus metabólitos (benzoilecgonina e cocaetileno) por GC-MS em amostras de urina.

3. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

- Agente derivatizante BSTFA com 1% de TMCS ou MSTFA
- Banho-seco
- Béqueres de 5mL ou 10mL
- Centrífuga
- Cloreto de sódio (NaCl)

- Clorofórmio P.A.
- Coluna do tipo 5MS 30 metros, 0,25 µm de diâmetro, 0,25 µm de filme
- Equipamento de cromatografia gasosa acoplado a espectrômetro de massas
- Etanol P.A.
- Fosfato dibásico de sódio P.A. (Na_2HPO_4)
- Fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4)
- Homogeneizador orbital
- Materiais de referência certificados de cocaína, cocaetileno, benzoilecgonina e benzoilecgonina deuterada (d3 ou d8)
- Micropipetas automáticas
- Pipeta graduada de 5mL
- Pipetas "Pasteur"
- Sulfato de sódio (Na_2SO_4)
- Tubos de centrifuga de 10mL
- "Vials" de 2 mL
- Vórtex

4. PROCEDIMENTOS

4.1. Amostra questionada

- A coleta de urina em indivíduos vivos deve ser, obrigatoriamente, assistida por agente público responsável pela cadeia de custódia naquele momento. Quaisquer substâncias que possam ser adicionadas à amostra (água, álcool gel, sabonete líquido, etc.) deverão ser removidas do local de coleta.
- Em casos "post mortem", deve-se coletar urina por punção direta da bexiga logo após a abertura da cavidade abdominal.
- A urina humana possui baixa atividade enzimática, normalmente não tem glicose e apresenta risco menor de contaminação por bactérias e leveduras após a morte, se coletada diretamente por punção da bexiga e, portanto, não requer adição de conservantes durante a coleta. O frasco plástico coletor universal ou frasco plástico de fundo cônico tipo "falcon" são recomendados para o acondicionamento da amostra. Atentar-se para a perfeita vedação das tampas, a fim de evitar vazamentos.

4.2. Custódia

- Conforme redação dada pela Lei nº 13.964/19 em seu Art. 158-A, a cadeia de

custódia é definida como "conjunto de todos os procedimentos utilizados para manter e documentar a história cronológica do vestígio coletado em locais ou em vítimas de crimes, para rastrear sua posse e manuseio a partir de seu reconhecimento até o descarte".

- Dentre esses procedimentos, a coleta é considerada uma das etapas mais importantes de todo o processo da cadeia de custódia, pois, quando realizada de forma inadequada, pode destruir os vestígios, inviabilizando sua análise e, consequentemente, a produção da prova pericial.
- As amostras devem ser acondicionadas em envelopes com lacre de segurança e numeração individualizada e encaminhadas ao laboratório o mais brevemente possível. Entretanto, quando o prazo ultrapassar 48 horas é importante que as amostras sejam congeladas (-20°C). Para prazos inferiores, as amostras podem ser mantidas refrigeradas (2°C a 8°C).

4.3. Preparo de soluções

4.3.1. Solução de Tampão fosfato pH 7,0

- Em um béquer, pesar 11,876 g de Na_2HPO_4 e transferir quantitativamente para balão volumétrico de 1L.
- Pesar 9,078 g de KH_2PO_4 e transferir quantitativamente para o mesmo balão volumétrico.
- Agitar até que ocorra a completa dissolução dos sais pesados.
- Completar o volume com água reagente q.s.p. 1 L.

4.3.2. Solução clorofórmio:etanol (8:2)

- Adicionar 800 mL de clorofórmio P.A e 200 mL de etanol P.A, em um frasco com capacidade para 1L, e misturar até formar uma solução homogênea;

4.3.3. Solução de PI (benzoilecgonina deuterada)

- Realizar diluição do material certificado de referência de benzoilecgonina-d3 (ou d8) com metanol, a fim de se obter uma solução com concentração final de $10\text{ }\mu\text{g/mL}$.

4.4. Procedimentos analíticos

- Recomenda-se a análise de, ao menos, uma amostra sabidamente positiva

(controle positivo) e uma amostra sabidamente negativa (controle negativo) concomitante à análise das amostras de rotina.

4.4.1. Preparo das amostras questionadas

- Identificar os tubos de centrífuga.
- Pipetar 2 mL de amostra (urina) em um tubo de centrífuga de 10 mL.
- Acrescentar 20 µL do padrão interno benzoilecgonina-d3 (ou d8) na concentração de 10 µg/mL no tubo.
- Adicionar 0,6 g de cloreto de sódio.
- Agitar vigorosamente por 1 minuto (vórtex).
- Adicionar 1,5 mL de tampão fosfato pH 7.
- Acrescentar 4 mL de clorofórmio: etanol (8:2).
- Agitar suavemente por 30 minutos (em homogeneizador orbital, por exemplo). Agitações vigorosas favorecem a formação de emulsão.
- Centrifugar a 2000 rpm por 10 minutos.
- Adicionar 0,5 g de sulfato de sódio em um béquer de 5 a 10mL, devidamente identificado.
- Após a centrifugação, levar o frasco para a capela e recolher a fase orgânica (inferior) com o auxílio de pipeta "Pasteur", transferindo-a para o béquer contendo sulfato de sódio.
- Verificar se a fase orgânica se encontra livre de água e, caso afirmativo, transferi-la para outro béquer, devidamente identificado. Caso ainda contenha água na fase orgânica, repetir o procedimento anterior (transferência para outro béquer e adição de sal).
- Secar a amostra em banho-seco à 40°C com auxílio de fluxo de gás nitrogênio (N₂), caso disponível.

4.4.2. Preparo do controle negativo

- Repetir todos os itens descritos em 4.4.1 utilizando uma amostra sabidamente negativa, seja esta de fonte conhecida, ou analisada previamente para comprovar a ausência dos analitos, ou adquirida comercialmente para esse fim.

4.4.3. Preparo do controle positivo

- Adicionar 20 µL dos materiais de referência certificados de cocaína, cocaetileno e benzoilecgonina na concentração de 10 µg/mL em uma

alíquota (2 mL) de amostra sabidamente negativa (ver item 4.4.2).

- Proceder como descrito em 4.4.1.

4.4.4. Derivatização

- Ressolubilizar as amostras questionadas e os controles negativo e positivo adicionando 300 µL de clorofórmio:etanol (8:2) e agitando suavemente béquer.
- Transferir para "vials" de 2 mL, devidamente identificados.
- Evaporar até a secura em banho-seco à 40°C com auxílio de fluxo de gás nitrogênio (N₂), caso disponível.
- Acrescentar 40 µL de BSTFA com 1% de TMCS ou MSTFA e tampar o "vial".
- Deixar em banho-seco à 80°C por 20 minutos.
- Aguardar esfriar, transferir o conteúdo do "vial" para um "insert", fechar o frasco imediatamente e injetar 1µL no GC/MS de acordo com as condições estabelecidas do item 4.5.

4.5. Método cromatográfico

- Os parâmetros descritos abaixo têm caráter exemplificativo, sendo que cada laboratório deve adequar-se de acordo com a configuração de seus respectivos equipamentos:

4.5.1 Coluna cromatográfica

- Coluna do tipo 5MS 30 metros, 0,25 µm de diâmetro, 0,25 µm de filme.

4.5.2 Condições do cromatógrafo em fase gasosa

- Modo de injeção: splitless.
- Temperatura do injetor: 270°C.
- Fluxo de 1.0 mL/min – modo fluxo constante.
- Rampa: temperatura inicial de 100°C mantida por 1 minuto, sobe 10°C/minuto até 130°C, sobe 20°C/minuto até 230°C, mantendo a temperatura por 5 minutos, e até 290°C, mantendo por 5 minutos essa temperatura final.
- Tempo total de corrida: 21 minutos.
- Temperatura da linha de transferência: 290°C.

4.5.3. Condições do espectrômetro de massas

- Solvent delay: 5 minutos.
- EMV mode: relative.
- Modo de aquisição: scan.
- Faixa de scan: 75 – 400 m/z.
- Temperatura da fonte: 230°C.
- Temperatura do quadrupolo: 150°C.

4.6. Avaliação dos resultados

- A interpretação dos resultados obtidos deve ser realizada tendo como referência a análise do controle positivo e do controle negativo. O controle positivo é uma amostra preparada propositalmente com concentrações no valor de "cut off" para análise confirmatória, qual seja 100 ng/mL. Assim, o método deve ser capaz de identificar a presença de todos analitos nessa amostra. De forma semelhante, a análise do controle negativo não deve acusar a presença de nenhum analito, exceto do padrão interno (benzoilecgonina d3 ou d8).
- Dos três analitos alvo, somente a benzoilecgonina reage com o derivatizante, sendo que os íons pesquisados se referem ao produto da reação de sililação, isto é, Benzoilecgonina-TMS.
- A abundância relativa dos íons obtidos e o tempo de retenção de cada analito devem ser avaliados conforme o resultado fornecido pela análise do controle positivo. A variação permitida de tempo de retenção é de 2% em comparação com o tempo cadastrado no método (resultante dos experimentos de validação analítica).
- Para a análise do espectro de massas é desejável a utilização de pelo menos 3 íons diagnóstico com abundância igual ou superior a 5% em relação ao pico base, com exceção do PI, para o qual se monitora 2 íons. Além disso, a variação das abundâncias relativas de cada fragmento deve obedecer o disposto na tabela a seguir:

Tabela 1 - Tolerâncias máximas permitidas para as abundâncias relativas dos íons diagnósticos.

Intensidade relativa ao pico base	Abundância relativa permitida
> 50 %	± 20 %
> 20 % até 50 %	± 20 %
> 10 % até 20 %	± 20 %
≤ 10 %	± 50 %

- A tabela 2 mostra os íons diagnóstico (quantificador e qualificadores) para todos os analitos.

Tabela 2 - Íons diagnóstico dos analitos pesquisados no método.

Analito	Íon quantificador	Íons qualificadores
Benzoilecgonina-d3 TMS (PI)	243	85
Benzoilecgonina-d8 TMS (PI)	243	85
Cocaína	182	82, 303
Cocaetileno	196	82, 318
Benzoilecgonina TMS	240	82, 361

- Este método pode ser utilizado como método de triagem e/ou confirmação, a depender dos recursos disponíveis em cada laboratório. Caso o método seja utilizado para fins de triagem, considerar o "cut off" de 150 ng/mL.
- Se a análise for realizada como ferramenta única as amostras que apresentarem resultados positivos deverão ser testadas novamente, com outra porção da amostra sendo submetida a todo processo analítico.

As amostras que apresentarem resultado abaixo do “cut off” não precisam ser submetidas a nova análise, sendo o resultado reportado como **NÃO DETECTADO**.

- O Anexo B traz exemplo de cromatograma e espectros de massas da cocaína, do cocaetileno e da benzoilecgonina TMS. As abundâncias relativas de cada analito devem ser determinadas por cada laboratório.

5. PONTOS CRÍTICOS

- O método, antes de sua aplicação na rotina de análises, deve ser validado, conforme normas vigentes.
- Se a análise for realizada como ferramenta única, os resultados positivos deverão ser testados novamente com outra porção da amostra.
- Tanto a benzoilecgonina-d3 quanto a benzoilecgonina-d8 podem ser utilizadas como padrão interno. Entretanto, caso haja mudança da benzoilecgonina utilizada como padrão interno, o método deverá ser revalidado.
- As características da técnica de GC-MS requerem do laboratório condições de infraestrutura adequadas, como por exemplo, rede elétrica dimensionada, estabilizada e com nobreak, sala climatizada (temperatura e umidade controladas), central de gases de acordo com a legislação vigente, concentradores de amostra (banho seco com fluxo de nitrogênio), material de referência certificados.

6. ESTRUTURA BÁSICA DO LAUDO

6.1. Identificação do material

- Identificação, descrição e lacre da amostra questionada.

6.2. Exames realizados

- Identificação de cocaína e metabólitos (benzoilecgonina e cocaetileno) em urina por GC-MS.

6.3. Resultados obtidos

- Os critérios de identificação do analito devem ser avaliados em todas

as corridas. Os resultados analíticos deste procedimento podem ser apresentados na forma de tabela, conforme exemplo abaixo:

Analito	Resultado
Cocaína	Detectado
Benzoilecgonina	Detectado
Cocaetileno	Não detectado

- **NÃO DETECTADO:** Ausência de picos no tempo de retenção esperado, ou presença de picos com abundância relativa dos íons diagnóstico diferente do esperado, ou resultado abaixo do limite de detecção.
- **DETECTADO:** presença de pico no tempo de retenção esperado, com respectivo espectro de massas que contemple os íons diagnóstico com a abundância relativa esperada.

6.4. Conclusão

- **NÃO DETECTADO:** "As análises realizadas não detectaram a presença de cocaína e seus produtos de biotransformação na amostra".
- **DETECTADO:** "As análises realizadas detectaram a presença de cocaína e seus produtos de biotransformação na amostra".

7. REFERÊNCIAS

Australian/New Zealand Specialist Advisory Group in Toxicology (TOXSAG). **MS Identification Guidelines in Forensic Toxicology** - An Australian Approach. TIAFT Bulletin 2012; 42(2): 52-5.

BRASIL. Compilado dos **Relatórios Técnicos Finais. Câmaras Técnicas de cadeia de custódia: Discussão, Diagnóstico e Recomendações pós Lei n. 13.964/2019**. [acesso em 15 mar 2024]. Disponível em <https://dspace.mj.gov.br/handle/1/12006>

BRASIL. Lei no 13.964 de 24 de dezembro de 2019. Aperfeiçoa a legislação penal e processual penal. [Online]; 2019; [acesso e 06 dez 2023]. Disponível em https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2019/lei/l13964.htm

BRASIL. Compilado dos Relatórios Técnicos Finais. Câmaras Técnicas de cadeia de custódia: Discussão, Diagnóstico e Recomendações pós Lei n. 13.964/2019. [acesso em 15 mar 2024]. Disponível em <https://dspace.mj.gov.br/handle/1/12006>

CHASIN, A. A. M.; LIMA, I. V. Detecção de cocaína, cocaetilen e benzoilecgonina em urina por cromatografia em camada delgada de alta eficiência e cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massa. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 11, n. 2, p. 7-12, 1998.

SMITH F. P. (Ed) Handbook of Forensic Drug Analysis. Amsterdam: **Elsevier Academic Press**, 2005.

8. GLOSSÁRIO

CUT OFF (valores de corte): São valores estabelecidos para separar duas categorias, positiva e negativa. Utilizado em análises clínicas e toxicológicas, onde os resultados das amostras que estão abaixo deste valor são considerados negativos, e os resultados acima desse valor são considerados positivos.

ÍON DIAGNÓSTICO: termo utilizado em espectrometria de massas para íons que são considerados característicos para o composto analisado.

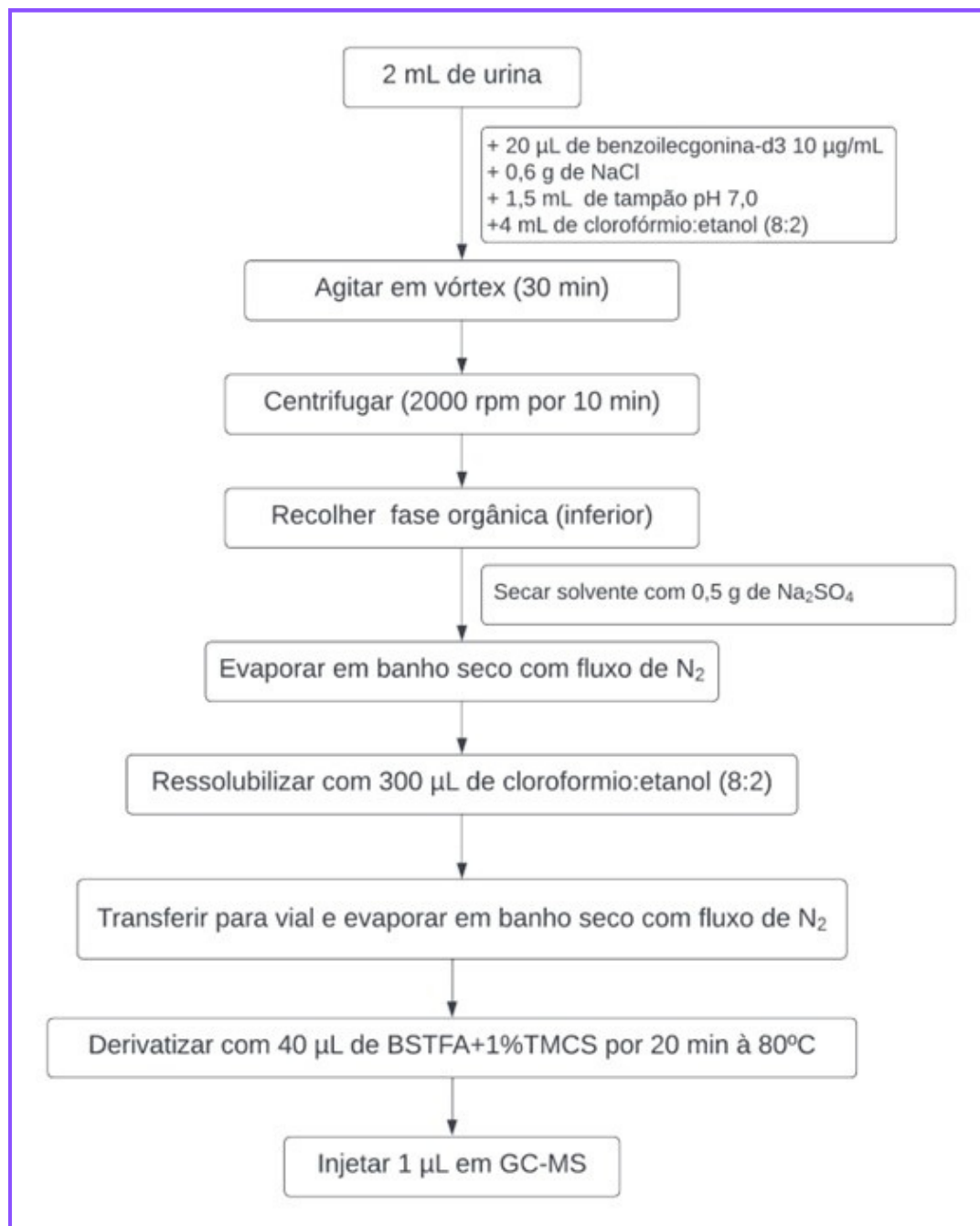
PADRÃO INTERNO: substância química proveniente de uma solução padrão de concentração fixa, adicionada em uma mesma quantidade aos padrões de calibração, amostras de controles e amostras em estudo.

VALIDAÇÃO: é a avaliação sistemática de um método por meio de ensaios experimentais de modo a confirmar e fornecer evidências objetivas de que os requisitos específicos para seu uso pretendido são atendidos.

9. ANEXOS

ANEXO A– FLUXOGRAMA DO PREPARO DE AMOSTRA

Figura 1 - Preparo de amostras.



ANEXO B -EXEMPLOS DE CROMATOGRAMAS E ESPECTROS DE MASSAS

Figura 2 - Cromatograma de íons extraídos da cocaína (a), cocaetileno (b) e benzoilecgonina TMS (c).

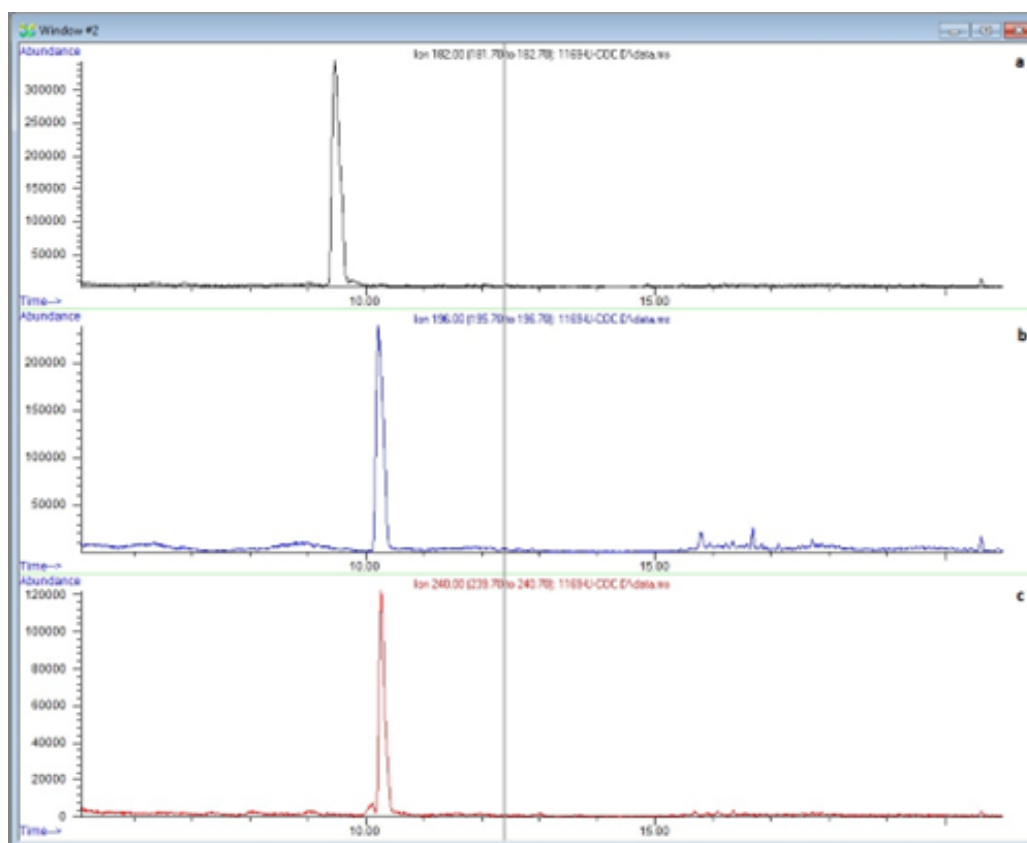


Figura 3 - Exemplo de espectro de massas e abundâncias relativas dos íons diagnóstico da cocaína.

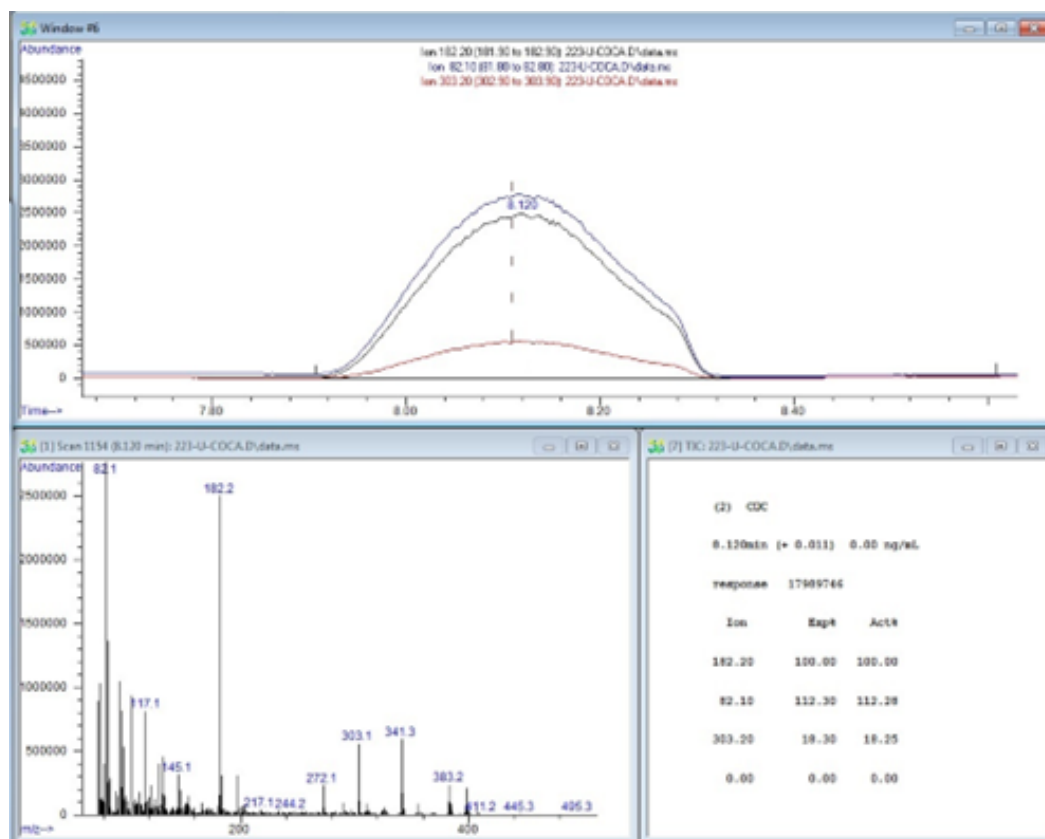


Figura 4 - Exemplo de espectro de massas e abundâncias relativas dos íons diagnóstico do cocaetileno.

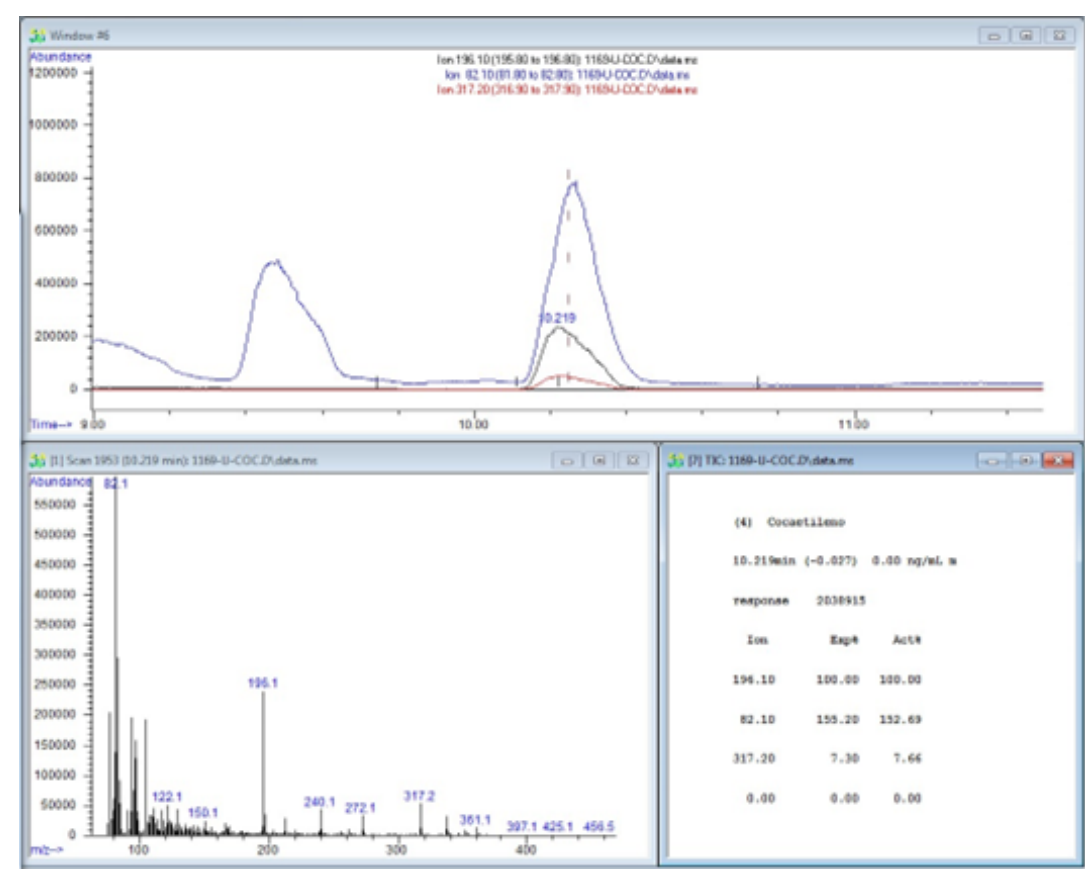
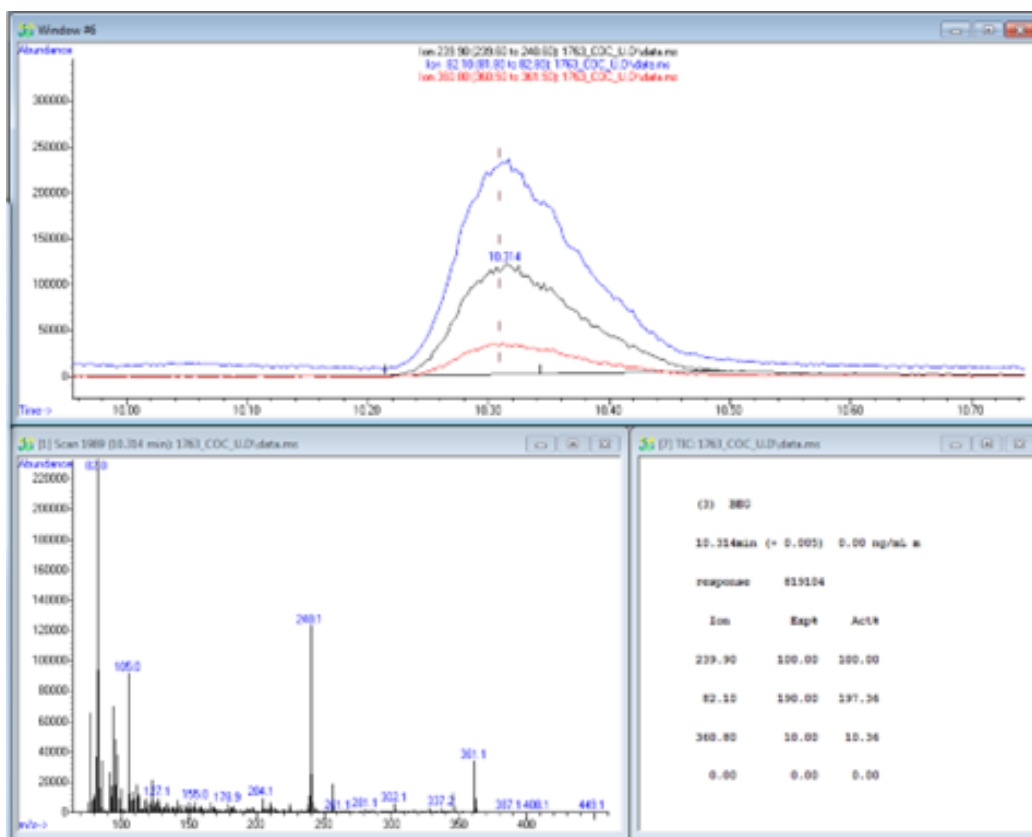


Figura 5 - Exemplo de espectro de massas e abundâncias relativas dos íons diagnóstico da benzoilecgonina.



**IDENTIFICAÇÃO DE ÁCIDO 11-
NOR- Δ^9 -
TETRAIDROCANABINOL
CARBOXÍLICO (THCCOOH) EM
URINA POR GC-MS**

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP)

PERÍCIA OFICIAL DE NATUREZA
CRIMINAL



MINISTÉRIO DA JUSTIÇA E
SEGURANÇA PÚBLICA

POP N° 10.03 - TOXICOLOGIA FORENSE

IDENTIFICAÇÃO DE ÁCIDO 11-NOR- Δ 9-TETRAIDROCANABINOL CARBOXÍLICO (THCCOOH) EM URINA POR GC-MS

FINALIDADE

Orientar o profissional de perícia a identificar e confirmar a presença de ácido 11-nor- Δ 9-tetraidrocanabinol carboxílico (THCCOOH) em amostras de urina por extração líquido-líquido e cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS).

PÚBLICO ALVO

Peritos Criminais da área de toxicologia forense.

1. ABREVIATURAS E SIGLAS

BSTFA: N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamida

GC: da língua inglesa, gas chromatography (cromatografia gasosa)

MS: da língua inglesa, mass spectrometer (espectrometria de massas)

PI: padrão interno

THC-COOH: ácido 11-nor- Δ 9-tetraidrocanabinol carboxílico

TMCS: trimetilclorosilano

TMS: trimetilsilil

5MS: (5% fenil) dimetilpolisiloxano

2. RESULTADOS ESPERADOS

- Identificação e confirmação do ácido 11-nor- Δ 9-tetraidrocanabinol carboxílico por GC-MS em amostras de urina.

3. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

- Ácido acético PA concentrado
- Ácido fosfórico (H₃PO₄)
- Balões volumétricos de 100 e 1000 mL

- Banho seco
- Béqueres de 5mL
- BSTFA com 1% de TMCS
- Centrífuga
- Coluna cromatográfica do tipo 5MS 30 metros, 0,25 μm de diâmetro, 0,25 μm de filme
- Equipamento de cromatografia gasosa com espectrometria de massa
- Hidróxido de potássio (KOH)
- Homogeneizador orbital ou semelhante
- Materiais de referência certificados de THC-COOH e de THC-COOH d3 ou d9
- N-hexano PA
- Pipetas de vidro
- Sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4)
- Tubos de centrifuga cônicos de vidro de 15mL
- Vórtex

4. PROCEDIMENTOS

4.1. Amostra questionada

- A coleta de urina em indivíduos vivos deve ser, obrigatoriamente, assistida por agente público responsável pela cadeia de custódia naquele momento. Quaisquer substâncias que possam ser adicionadas à amostra (água, álcool gel, sabonete líquido, etc.) deverão ser removidas do local de coleta.
- Em casos "post mortem", deve-se coletar urina por punção direta da bexiga logo após a abertura da cavidade abdominal.
- A urina humana possui baixa atividade enzimática, normalmente não tem glicose e apresenta risco menor de contaminação por bactérias e leveduras após a morte, se coletada diretamente por punção da bexiga e, portanto, não requer adição de conservantes durante a coleta. O frasco plástico coletor universal ou frasco plástico de fundo cônico tipo "falcon" são recomendados para o acondicionamento da amostra. Atentar-se para a perfeita vedação das tampas, a fim de evitar vazamentos.

4.2. Custódia

- Conforme redação dada pela Lei nº 13.964/19 em seu Art. 158-A, a cadeia de custódia é definida como "o conjunto de todos os procedimentos utilizados para manter e documentar a história cronológica do vestígio coletado em

locais ou em vítimas de crimes, para rastrear sua posse e manuseio a partir de seu reconhecimento até o descarte”.

- Dentre esses procedimentos, a coleta é considerada uma das etapas mais importantes de todo o processo da cadeia de custódia, pois, quando realizada de forma inadequada, pode destruir os vestígios, inviabilizando sua análise e, consequentemente, a produção da prova pericial.
- As amostras devem ser acondicionadas em envelopes com lacre de segurança e numeração individualizada e encaminhadas ao laboratório o mais brevemente possível. Entretanto, quando o prazo ultrapassar 48 horas é importante que as amostras sejam congeladas (-20°C). Para prazos inferiores, as amostras podem ser mantidas refrigeradas (2°C a 8°C).

4.3. Preparo de soluções:

4.3.1. Hidróxido de Potássio (KOH) 10 M

- Pesar 56 g de KOH e transferir quantitativamente para balão volumétrico de 100 mL, contendo cerca de 50 mL de água reagente.
- Esperar a solução esfriar e completar o volume do balão com água reagente.

4.3.2 Ácido fosfórico (H_3PO_4) 50 mM

- Em um balão volumétrico de 1L, adicionar vagarosamente 3,4 mL de ácido fosfórico P.A. em cerca de 500 mL de água reagente.
- Homogeneizar e completar o volume com água reagente.

4.3.2 Solução de PI (11-nor- Δ^9 -tetraidrocanabinol carboxílico-d3)

- Realizar diluição do material de referência certificado de 11-nor- Δ^9 -tetraidrocanabinol carboxílico-d3 (THC-COOH-d3) com metanol, a fim de se obter uma solução com concentração final de $1\text{ }\mu\text{g/mL}$.

4.4. Procedimentos analíticos

- Deve-se realizar a análise de, ao menos, uma amostra sabidamente positiva (controle positivo) e uma amostra sabidamente negativa (controle negativo) concomitante à análise das amostras de rotina.

4.4.1. Preparo da amostra questionada

- **Hidrólise**

- Aliquotar 5 mL de urina em tubo de centrífuga de vidro de 15 mL.
- Acrescentar 75 µL do PI a 1 µg/mL.
- Adicionar 0,3 mL de KOH 10 M.
- Hidrolisar em banho de água ou bloco de aquecimento à 56°C por 15 min.
- Deixar esfriar na bancada até temperatura ambiente.

- **Extração**

- Adicionar 0,4 mL de ácido acético concentrado.
- Adicionar 3 mL de ácido fosfórico 50 mM.
- Verificar o pH, que deve estar entre 4 e 5, caso necessário ajustar o pH, adicionando mais ácido fosfórico.
- Adicionar 5 mL de n-hexano.
- Agitar suavemente por 15 minutos (ex: em homogeneizador orbital). Agitações vigorosas favorecem a formação de emulsão.
- Centrifugar a 2000 rpm por 10 minutos.
- Após a centrifugação, recolher a fase orgânica (superior) com o auxílio da pipeta "Pasteur" de vidro.
- Transferir a fase orgânica para o béquer contendo 0,5 g de sulfato de sódio.
- Verificar se a fase orgânica se encontra livre de água e, caso afirmativo, transferi-la para outro béquer, devidamente identificado. Caso ainda contenha água na fase orgânica, repetir o procedimento anterior (transferência para outro béquer e adição de sal).
- Secar a amostra em banho-seco à 40°C com auxílio de fluxo de gás nitrogênio (N₂), caso disponível.

4.4.2. Preparo do controle negativo

- Repetir todos os itens descritos em 4.4.1 utilizando uma amostra sabidamente negativa, seja esta de fonte conhecida, ou analisada previamente para comprovar a ausência dos analitos, ou adquirida comercialmente para esse fim.

4.4.3 Preparo do controle positivo

- Adicionar 75 µL do material de referência certificado de ácido 11-nor- Δ^9 -tetraidrocanabinol carboxílico (THC-COOH) na concentração de 1 µg/mL em uma alíquota (5 mL) de amostra sabidamente negativa (ver item 4.4.2), resultando em uma concentração final de 15 ng/mL (valor de "cut off").
- Proceder como descrito em 4.4.1.

4.4.4. Derivatização

- Ressolubilizar as amostras questionadas e os controles negativo e positivo com aproximadamente 300 µL de hexano.
- Transferir para "vials" de 2 mL, devidamente identificados.
- Evaporar até a secura em banho-seco à 40°C com auxílio de fluxo de gás nitrogênio (N₂), caso disponível.
- Adicionar 40µL de BSTFA com 1% de TMCS e tampar o "vial".
- Colocar por 20 minutos em banho-seco à 80°C.
- Aguardar esfriar, transferir o conteúdo do "vial" para um "insert", fechar o frasco imediatamente e injetar 1µL no GC/MS de acordo com as condições estabelecidas do item 4.5.

4.5. Método cromatográfico

- Os parâmetros descritos abaixo têm caráter exemplificativo, sendo que cada laboratório deve adequar-se de acordo com a configuração de seus equipamentos:

4.5.1. Coluna cromatográfica

- Coluna do tipo 5MS 30 metros, 0,25 µm de diâmetro, 0,25 µm de filme.

4.5.2. Condições do cromatógrafo em fase gasosa

- Modo de injeção: splitless.
- Temperatura do injetor: 270°C.
- Fluxo: 1.0 mL/min.
- Modo fluxo: constante.
- Rampa: temperatura inicial de 100°C mantida por 1 minuto, sobe 10°C/minuto até 130°C, sobe 20°C/minuto até 230°C mantendo a temperatura por 5 minutos e até 290°C mantendo por 5 minutos essa temperatura final.

- Tempo total de corrida: 21 minutos.
- Temperatura da linha de transferência: 290°C.
- 4.5.3 Condições do espectrômetro de massas.
- Solvent delay: 5 minutos.
- EMV mode: relative.
- Acquisition mode: scan.
- Faixa de scan: 75 – 400 m/z.
- MS source: 230°C.
- MS quad: 150°C .

4.6. Avaliação dos resultados

- A interpretação dos resultados obtidos deve ser realizada tendo como referência a análise dos controles positivo e negativo. O controle positivo é uma amostra preparada propositalmente com concentrações no valor de “cut off” para essa análise, qual seja 15 ng/mL. Assim, o método deve ser capaz de identificar a presença do analito a partir dessa concentração na amostra de urina, comparando-se a relação das áreas analito/ padrão interno na amostra com a relação analito/padrão interno no controle positivo. De forma semelhante, a análise do controle negativo não deve acusar a presença de nenhum analito, exceto do padrão interno (THC-COOH-d3).
- A abundância relativa dos íons obtidos e o tempo de retenção de cada analito devem ser avaliados conforme o resultado fornecido pela análise do controle positivo. A variação permitida de tempo de retenção é de 2% em comparação com o tempo cadastrado no método (resultante da validação do método).
- Para a análise do espectro de massas é desejável a utilização de pelo menos 3 íons diagnósticos com abundância igual ou superior a 5% em relação ao pico base, exceto para o PI para o qual é permitido o monitoramento de 2 íons diagnósticos. Além disso, a variação das abundâncias relativas de cada fragmento deve obedecer o disposto na tabela a seguir:

Tabela 1 - Tolerâncias máximas permitidas para as abundâncias relativas dos íons diagnósticos.

Intensidade relativa ao pico base	Abundância relativa permitida
> 50 %	± 20 %
> 20 % até 50 %	± 20 %
> 10 % até 20 %	± 20 %
≤ 10 %	± 50 %

A tabela 2 mostra os íons (base e diagnósticos) para todos os analitos.

Tabela 2 - Íons base e diagnósticos dos analitos pesquisados no método.

Analito	Íon quantificador	Íons qualificadores
Ácido 11-nor- Δ^9 -tetraidrocanabinol carboxílico-d3 - TMS	374 (íon base)	476
Ácido 11-nor- Δ^9 -tetraidrocanabinol carboxílico - TMS	371 (íon base)	473, 488

- Este método pode ser utilizado como método de triagem e/ou confirmação, a depender dos recursos disponíveis em cada laboratório. Caso o método seja utilizado para fins de triagem, considerar o "cut-off" de 50 ng/mL.
- Se a análise for realizada como ferramenta única de pesquisa de THC-COOH, as amostras que apresentarem resultados positivos deverão ser testadas novamente, com outra porção da amostra sendo submetida a todo processo analítico.
- As amostras que apresentarem resultado abaixo do "cut-off" (15 ng/mL) não precisam ser submetidas a nova análise, sendo o resultado reportado como NÃO DETECTADO.
- O Anexo B traz exemplos de espectros de massas do THC-COOH TMS. As abundâncias relativas devem ser determinadas por cada laboratório.

5. PONTOS CRÍTICOS

- O método, antes de sua aplicação na rotina de análises, deve ser validado, conforme normas vigentes.
- Se a análise for realizada como ferramenta única, os resultados positivos deverão ser testados novamente com outra porção da amostra.
- Tanto o ácido 11-nor- Δ^9 -tetraidrocanabinol carboxílico-d3, quanto o ácido 11-nor- Δ^9 -tetraidrocanabinol carboxílico-d9 podem ser utilizadas como padrão interno. Entretanto, caso haja mudança da THC-COOH utilizada como padrão interno, o método deverá ser revalidado.
- As características da técnica de GC-MS requerem do laboratório condições de infraestrutura adequadas, como por exemplo, rede elétrica dimensionada, estabilizada e com nobreak, sala climatizada (temperatura e umidade controladas), central de gases de acordo com a legislação vigente, concentradores de amostra (banho seco com fluxo de nitrogênio), material de referência certificados.

6. ESTRUTURA BÁSICA DO LAUDO

6.1. Identificação do material

- Identificação, descrição e lacre da amostra questionada.

6.2. Exames realizados

- Identificação de 11-nor- Δ^9 -tetraidrocanabinol carboxílico em urina por GC-MS.

6.3. Resultados obtidos

- Os critérios de identificação do analito devem ser avaliados em todas as corridas. Os resultados analíticos deste procedimento podem ser apresentados na forma de tabela, conforme exemplo abaixo:

Analito	Resultado*
11-nor- Δ^9 -tetraidrocanabinol	Detectado

*limite de detecção: 15 ng/mL

- **NÃO DETECTADO:** Ausência de picos no tempo de retenção esperado, ou presença de picos com abundância relativa dos íons diagnóstico diferente do esperado, ou resultado abaixo do limite de detecção.
- **DETECTADO:** presença de pico no tempo de retenção esperado, com respectivo espectro de massas que contemple os íons diagnóstico com a abundância relativa esperada.

6.4. Conclusão

- **NÃO DETECTADO:** “As análises realizadas não detectaram a presença de 11-nor- Δ^9 -tetraidrocanabinol carboxílico na amostra”.
- **DETECTADO:** “As análises realizadas detectaram a presença de 11-nor- Δ^9 -tetraidrocanabinol carboxílico na amostra”.

7. REFERÊNCIAS

Australian/New Zealand Specialist Advisory Group in Toxicology (TOXSAG). **MS Identification Guidelines in Forensic Toxicology - An Australian Approach**. TIAFT Bulletin 2012; 42(2): 52-5.

BRASIL. Compilado dos **Relatórios Técnicos Finais. Câmaras Técnicas de cadeia de custódia: Discussão, Diagnóstico e Recomendações pós Lei n. 13.964/2019**. [acesso em 15 mar 2024]. Disponível em <https://dspace.mj.gov.br/handle/1/12006>

BRASIL. Lei no 13.964 de 24 de dezembro de 2019. Aperfeiçoa a legislação penal e processual penal. [Online]; 2019; [acesso e 06 dez 2023]. Disponível em https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2019/lei/l13964.htm

BRASIL. Compilado dos Relatórios Técnicos Finais. Câmaras Técnicas de cadeia de custódia: Discussão, Diagnóstico e Recomendações pós Lei n. 13.964/2019. [acesso em 15 mar 2024]. Disponível em <https://dspace.mj.gov.br/handle/1/12006>

MEATHERALL, R.C.; GARRIOTT, J.C. A sensitive thin-layer chromatography procedure for the detection of urinary 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid. **J Anal Toxicology**, vol. 12, 1988.

8. GLOSSÁRIO

CUT OFF (VALORES DE CORTE): São valores estabelecidos para separar duas categorias, positiva e negativa. Utilizado em análises clínicas e toxicológicas, onde os resultados das amostras que estão abaixo deste valor, são considerados negativos, e os resultados acima desse valor são considerados positivos.

ÍON DIAGNÓSTICO: termo utilizado em espectrometria de massas para íons que são considerados característicos para o composto analisado.

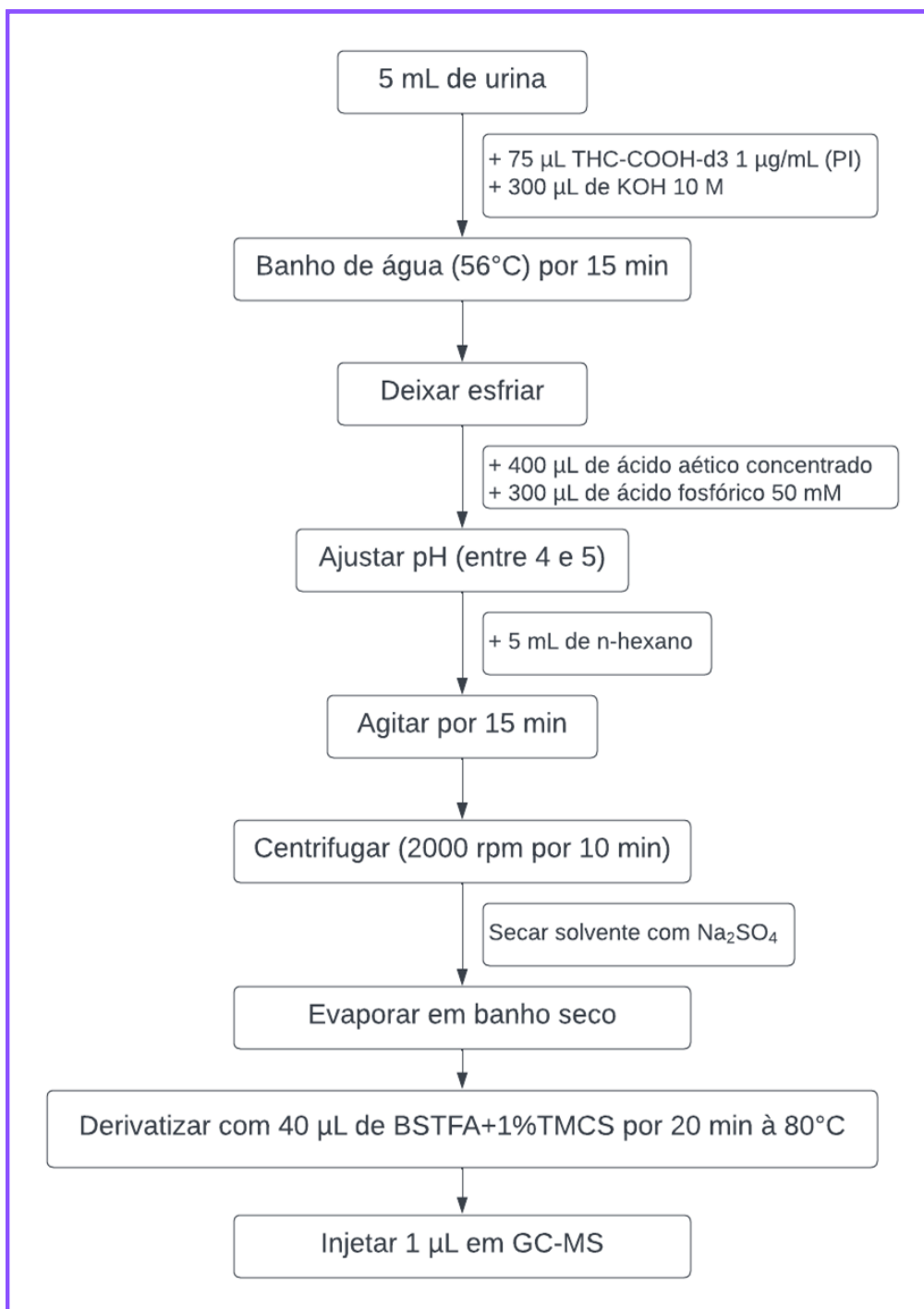
PADRÃO INTERNO: substância química proveniente de uma solução padrão de concentração fixa, adicionada em uma mesma quantidade aos padrões de calibração, amostras de controles e amostras em estudo.

VALIDAÇÃO: é a avaliação sistemática de um método por meio de ensaios experimentais de modo a confirmar e fornecer evidências objetivas de que os requisitos específicos para seu uso pretendido são atendidos.

9. ANEXOS

ANEXO A - FLUXOGRAMA

Figura 1 - Fluxograma do preparo de amostras.



ANEXO B -EXEMPLOS DE CROMATOGRAMAS E ESPECTROS DE MASSAS

Figura 2: Cromatograma de íons extraídos do THC-COOH (TR = 17,394 min).

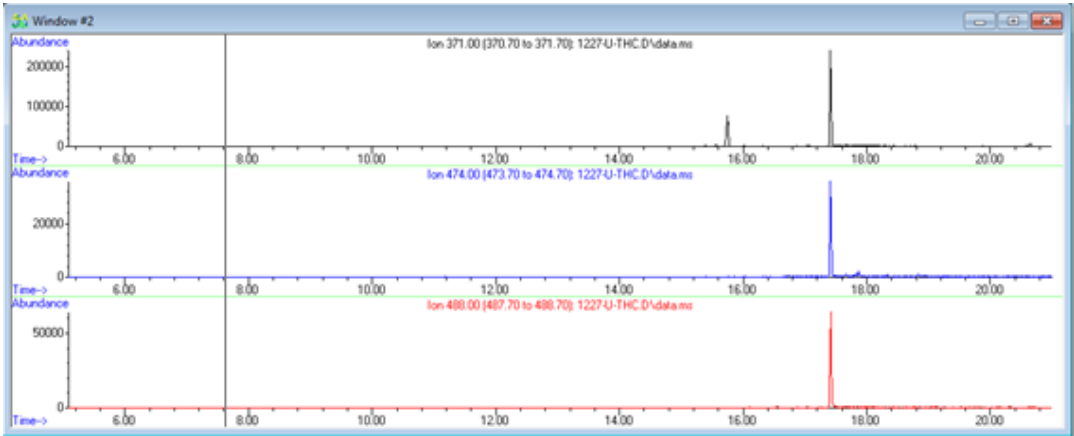
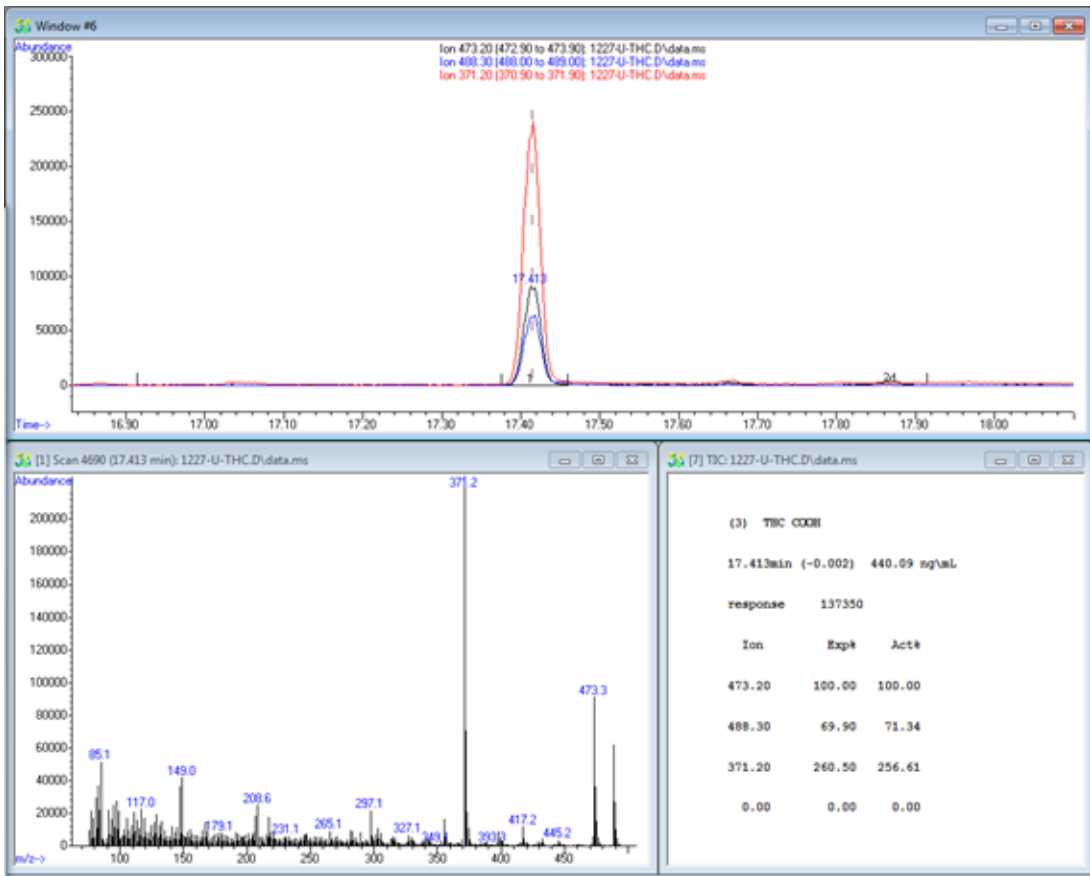
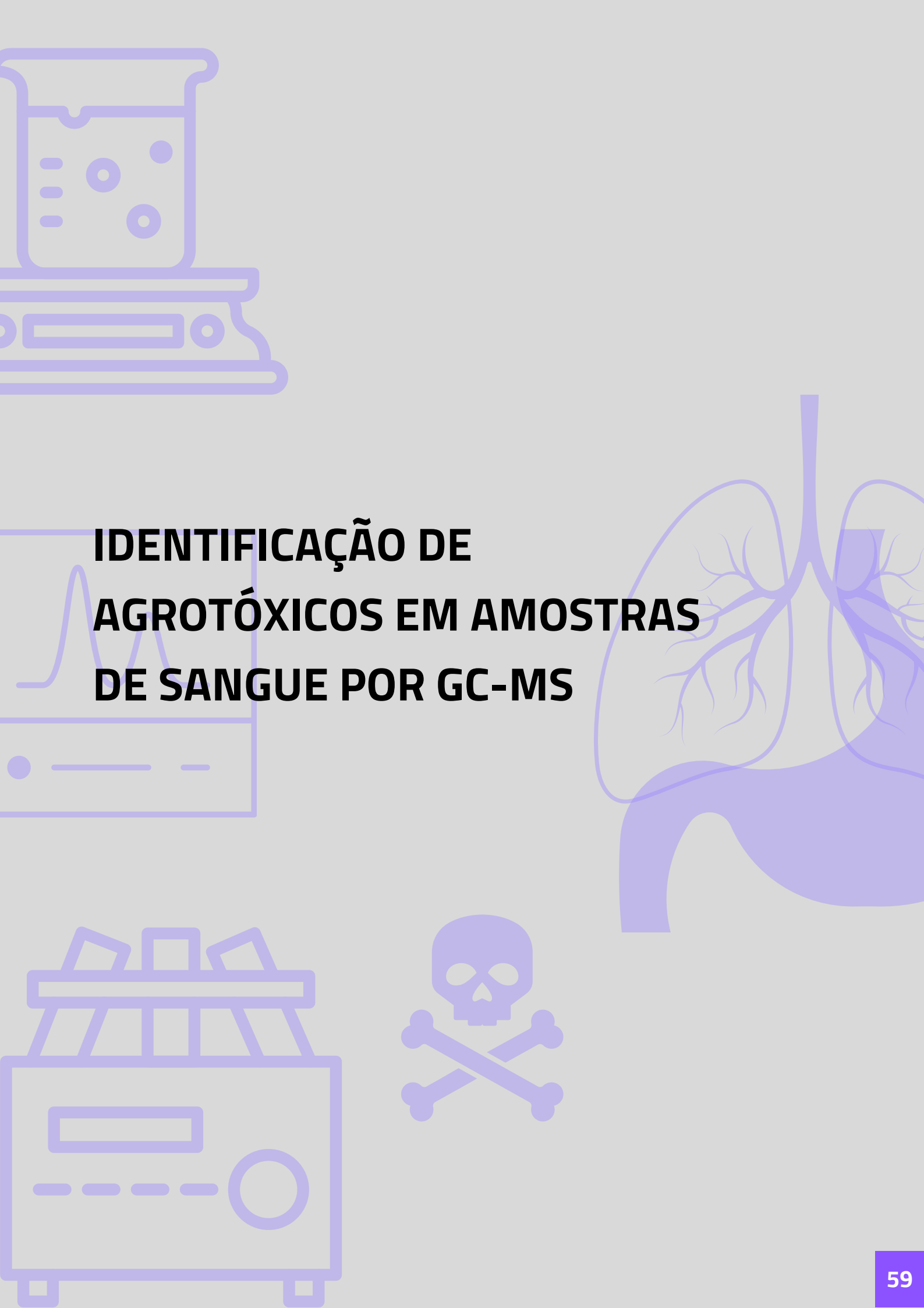


Figura 3: Exemplo de espectro de massas e abundâncias relativas dos íons diagnóstico do THC-COOH.





IDENTIFICAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM AMOSTRAS DE SANGUE POR GC-MS

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP)

PERÍCIA OFICIAL DE NATUREZA
CRIMINAL



MINISTÉRIO DA JUSTIÇA E
SEGURANÇA PÚBLICA

POP N° 10.04 - TOXICOLOGIA FORENSE

IDENTIFICAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM AMOSTRAS DE SANGUE POR GC-MS

FINALIDADE

Orientar o profissional de perícia a identificar e confirmar a presença de agrotóxicos de diferentes classes químicas em amostras de sangue por extração líquido-líquido e cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS).

PÚBLICO ALVO

Peritos Criminais da área de toxicologia forense.

1. ABREVIATURAS E SIGLAS

GC: da língua inglesa, gas chromatography (Cromatografia Gasosa).

MS: da língua inglesa, mass spectrometry (Espectrometria de massas).

PI: padrão interno.

q.s.p.: quantidade suficiente para.

TPP: Trifenilfosfato.

5MS: (5% fenil) dimetilpolisiloxano.

2. RESULTADOS ESPERADOS

- Identificação e/ou confirmação de agrotóxicos por GC-MS em amostras de sangue.

3. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

- Banho seco
- Béquer de 5 mL
- Centrífuga
- Clorofórmio P.A.
- Coluna do tipo 5MS 30 metros, 0,25 µm de diâmetro, 0,25 µm de filme
- Equipamento de cromatografia gasosa acoplado a espectrômetro de massas

- Hexano P.A.
- Materiais de referência de agrotóxicos de diferentes classes químicas (carbamatos, organofosforados, piretróides, herbicidas)
- Trifenilfosfato (TPP)
- Metanol P.A.
- Micropipetas automáticas
- Pipetas de vidro
- Ponteiras
- Tolueno P.A.
- Tubo de centrífuga de 2 mL
- Vórtex

4. PROCEDIMENTOS

4.1. Amostra questionada

- A coleta “in vivo” deve ser realizada por punção venosa o mais brevemente possível. Caso também seja solicitada a análise de alcoolemia na amostra coletada, a assepsia do local de coleta deve ser realizada com material isento de etanol e outros álcoois em sua constituição (p.ex.: antissépticos à base de iodo).
- No caso de coletas “post mortem”, colher sangue, preferencialmente, de vasos calibrosos (veias femoral, subclávia ou jugular interna). Caso não seja possível, colher sangue da cavidade cardíaca. Não coletar sangue acumulado das cavidades torácica e abdominal devido a alta possibilidade de contaminação com outros fluidos biológicos ou conteúdo estomacal.

4.2. Custódia

- Conforme redação dada pela Lei nº 13.964/19 em seu Art. 158-A, a cadeia de custódia é definida como “o conjunto de todos os procedimentos utilizados para manter e documentar a história cronológica do vestígio coletado em locais ou em vítimas de crimes, para rastrear sua posse e manuseio a partir de seu reconhecimento até o descarte”.
- Dentre esses procedimentos, a coleta é considerada uma das etapas mais importantes de todo o processo da cadeia de custódia, pois, quando realizada de forma inadequada, pode destruir os vestígios, inviabilizando sua análise e, consequentemente, a produção da prova pericial.

- As amostras devem ser acondicionadas em envelopes com lacre de segurança e numeração individualizada e encaminhadas ao laboratório o mais brevemente possível. Entretanto, quando o prazo ultrapassar 48 horas é importante que as amostras sejam congeladas (-20°C). Para prazos inferiores, as amostras podem ser mantidas refrigeradas (2°C a 8°C).

4.3. Preparo de soluções

4.3.1. Solução de PI (TPP)

- Em um balão volumétrico de 10 mL, pesar 0,1 g de TPP.
- Completar o volume com metanol q.s.p. 10 mL.
- A concentração final do PI é $10\text{ }\mu\text{g/mL}$.

4.3.2. Solução de padrões de agrotóxicos

- Os padrões de agrotóxicos estão comercialmente disponíveis em diversas apresentações (na forma de “pool” ou individuais) e deverão ser preparados observando o solvente de diluição original para o preparo de soluções em concentração final de $10\text{ }\mu\text{g/mL}$.
- Sugere-se o uso de agrotóxicos de diferentes classes químicas (carbamatos, organofosforados, piretróides, dentre outros).

4.3.3. Solução de tolueno:clorofórmio (4:1)

- Misturar 400 mL de tolueno com 100 mL de clorofórmio.

4.4. Procedimentos analíticos

- Recomenda-se a análise de, ao menos, uma amostra sabidamente positiva (controle positivo) e uma amostra sabidamente negativa (controle negativo) concomitante à análise das amostras de rotina.

4.4.1. Preparo das amostras questionadas

- Identificar os tubos de centrifuga.

- Pipetar 0,5 mL de sangue total referente a cada amostra.
- Acrescentar 10 μ L de padrão TPP 10 μ g/mL.
- Pipetar 1,5 mL da solução tolueno:clorofórmio (4:1) com o auxílio de pipeta de vidro.
- Homogeneizar no vórtex por 5 min.
- Centrifugar por 10 minutos a 2.000 rpm.
- Retirar a fase orgânica com auxílio de pipeta "Pasteur" e transferir para um "vial".
- Secar a amostra em banho-seco à 40°C com auxílio de fluxo de gás nitrogênio (N₂), caso disponível.
- Reconstituir com 50 μ L de hexano e transferir para "vial" com "insert".
- Injetar 1 μ L no GC/MS de acordo com as condições estabelecidas do item 4.5.

4.4.2. Preparo do controle negativo

- Repetir todos os itens descritos em 4.4.1 utilizando uma amostra sabidamente negativa, seja esta de fonte conhecida, ou analisada previamente para comprovar a ausência dos analitos, ou adquirida comercialmente para esse fim.

4.4.3. Preparo do controle positivo

- Adicionar 10 μ L dos materiais de referência (pool ou individuais) de agrotóxicos disponíveis na concentração de 10 μ g/mL em uma alíquota (0,5 mL) de amostra sabidamente negativa, de modo que a concentração final seja de 200 ng/mL.
- Proceder como descrito em 4.4.1.

4.5. Método cromatográfico

- Os parâmetros descritos abaixo têm caráter exemplificativo, sendo que cada laboratório deve adequar-se de acordo com a configuração de seus respectivos equipamentos:

4.5.1. Coluna cromatográfica

- Coluna do tipo 5MS 30 metros, 0,25 μ m de diâmetro, 0,25 μ m de filme.

4.5.2. Condições do cromatógrafo em fase gasosa

- Modo de injeção: splitless.
- Temperatura do injetor: 280°C.
- Fluxo de 1.3 mL/min.
- Modo: fluxo constante.
- Rampa: temperatura inicial de 80°C, sobe 10°C/min até 180°C, sobe 5°C/min até 200°C e sobe 15°C/min até 300°C. Essa temperatura final é mantida por 6 min.
- Tempo total de corrida: aproximadamente 27 min.
- Temperatura da linha de transferência: 300°C.

4.5.3. Condições do espectrômetro de massas

- Solvent delay: 2,4 min.
- EMV mode: relative.
- Modo de aquisição: scan.
- Faixa de scan: 40 – 550 m/z.
- Temperatura da fonte: 230°C.
- Temperatura do quadrupolo: 150°C.

4.6. Avaliação dos resultados

- A interpretação dos resultados obtidos deve ser realizada tendo como referência a análise do controle positivo e do controle negativo. O controle positivo é uma amostra preparada pela adição dos materiais de referência de agrotóxicos disponíveis no laboratório. Para tal finalidade, sugere-se a adição de padrões para a obtenção de concentrações finais de 200 ng/mL para todos os analitos, sendo esse considerado o limite de detecção. Assim, o método deve ser capaz de identificar a presença dos analitos a partir dessa concentração na amostra de sangue, comparando-se a relação de áreas analito/ padrão interno na amostra com a relação analito/padrão interno no controle positivo. De forma semelhante, a análise do controle negativo não deve acusar a presença de nenhum analito, exceto do padrão interno (TPP) que, obrigatoriamente, deve estar presente.

- Na concentração de 200 ng/mL, o método deve ser capaz de identificar a presença de todos os analitos adicionados na amostra, com exceção de alguns carbamatos termolábeis listados na Tabela 2, cuja sensibilidade analítica é superior a 200 ng/mL.
- A abundância relativa dos íons obtidos e o tempo de retenção de cada analito devem ser avaliados conforme o resultado fornecido pela análise do controle positivo. A variação permitida de tempo de retenção é de 2% em comparação com o tempo cadastrado no método (resultante dos experimentos de validação analítica).
- Para a análise do espectro de massas é desejável a utilização de pelo menos 3 íons diagnósticos com abundância igual ou superior a 5% em relação ao pico base, com exceção do PI, para o qual se monitora 2 íons. Além disso, a variação das abundâncias relativas de cada fragmento deve obedecer ao disposto na tabela a seguir:

Tabela 1 - Tolerâncias máximas permitidas para as abundâncias relativas dos íons diagnósticos.

Intensidade relativa ao pico base	Abundância relativa permitida
> 50 %	± 20 %
> 20 % até 50 %	± 20 %
> 10 % até 20 %	± 20 %
≤ 10 %	± 50 %

- A tabela 2 mostra os agrotóxicos (na concentração de 200 ng/mL) detectados pelo método proposto.

Tabela 2 - Lista de agrotóxicos identificados pelo método.

Acefato	Dimetoato	Ometoato
Aldicarbe*	Dimetomorph**	Oxamyl*
Ametrina	Dioxacarb	Picoxistrobina
Azoxistrobina	Diuron	Primicarb
Bendiocarb	Epoxiconazol	Procloraz
Benfuracarb	Ethiofencarb	Profam
Bifenazate	Fenobucarb	Promecarb
Butocarboxim	Fenoxycarb	Propiconazol**
Carbaril	Fenuron	Propoxur
Carbofuram	Fipronil	Pyraclostrobina
Carboxin	Flutriafol	Tebuconazol
Ciproconazol	Malation	Tebutiron
Clorpirifós	Methiocarb	Terburbós
Cycluron	Metomyl*	Tetraconazol
Dicrotofós	Mevinfós	Tiabendazol
Dietofencarb	Naftol	Tiobencarb
Difeconazol**	OH-Carbofuram	Triadimenol

*Analitos termolábeis cuja sensibilidade analítica é superior a 200 ng/mL.

**Analitos que naturalmente apresentam dois picos no cromatograma em função da existência de isomeria.

- Este método pode ser utilizado como método de triagem e/ou confirmação, a depender dos recursos disponíveis em cada laboratório.
- Se a análise for realizada como ferramenta única de pesquisa de agrotóxicos, as amostras que apresentarem resultados positivos deverão ser testadas novamente, com outra porção da amostra sendo submetida a todo processo analítico. As amostras que apresentarem resultado abaixo do limite de detecção não precisam ser submetidas a nova análise, sendo o resultado reportado como **NÃO DETECTADO**.
- O Anexo B traz exemplos de cromatogramas de íons totais de um controle positivo contendo todos os analitos e o espectro de massas do padrão interno. As abundâncias relativas de cada analito devem ser determinadas por cada laboratório.

5. PONTOS CRÍTICOS

- O método, antes de sua aplicação na rotina de análises, deve ser validado, conforme normas vigentes.
- Se a análise for realizada como ferramenta única, os resultados positivos deverão ser testados novamente com outra porção da amostra.
- Este método também é capaz de identificar vários medicamentos e drogas de abuso, devendo cada laboratório avaliar a aplicação para tal finalidade.
- A quantidade de agrotóxicos comercialmente disponível no Brasil é enorme e, por isso, cada laboratório deve priorizar a inclusão de analitos considerando especialmente a prevalência regional dos agrotóxicos e seu histórico de uso em casos forenses.
- O aldicarbe e outros agrotóxicos da classe dos carbamatos são detectados por GC-MS apenas em concentrações mais elevadas, devido a sua termolabilidade e consequente degradação no injetor/coluna. Cada laboratório deve testar os limites de detecção do método para cada analito.
- As características da técnica de GC-MS requerem do laboratório condições de infraestrutura adequadas, como por exemplo, rede elétrica dimensionada, estabilizada e com nobreak, sala climatizada (temperatura e umidade controladas), central de gases de acordo com a legislação vigente, concentradores de amostra (banho seco com fluxo de nitrogênio), material de referência certificados.

6. ESTRUTURA BÁSICA DO LAUDO

6.1. Identificação do material

- Identificação, descrição e lacre da amostra questionada.

6.2. Exames realizados

- Identificação de agrotóxicos em sangue por GC-MS.

6.3. Resultados obtidos

- Os critérios de identificação do analito devem ser avaliados em todas as corridas. Os resultados analíticos deste procedimento podem ser apresentados na forma de tabela, conforme exemplo abaixo:

Analito	Resultado*
Carbamatos (aldicarbe, aldicarbe sulfona, aldicarbe sulfóxido, carbaril, carbofurano, carbofurano fenol, 3-OH-carbofurano, carboxina, oxamil, metomil, metiocarbe, propoxur, tiobencarbe)	Detectado Aldicarbe
Organofosforados (acefato, azinfós metílico, clorpirifós, clorpirifós oxon, demeton-S-metílico, diazinona, diclorvós, dimetoato, dissulfoton, etiona, fenamifós, malationa, merfós, metamidofós, metidationa, ometoato, parationa metílica, pirazofós, pirimifós metílico, profenofós, vinclozolina)	Não detectado
Outros (1-naftol, nitrofen, bifentrin, azoxistribina, difenoconazol, flutriafol, cimoxanil, clorantraniliprole, diurom, fipronil, imidacloprido, metalaxil, metoxifenoazida, picoxistrobina)	Não detectado

- **NÃO DETECTADO:** Ausência de picos no tempo de retenção esperado, ou presença de picos com abundância relativa dos íons diagnóstico diferente do esperado, ou resultado abaixo do limite de detecção.
- **DETECTADO:** presença de pico no tempo de retenção esperado, com respectivo espectro de massas que contemple os íons diagnóstico com a abundância relativa esperada.

6.4. Conclusão

- **NÃO DETECTADO:** “As análises realizadas não detectaram a presença de XXXX (nomear os agrotóxicos inseridos no método) na amostra”.
- **DETECTADO:** “As análises realizadas detectaram a presença de XXXX (nomear os agrotóxicos identificados) na amostra”.

7. REFERÊNCIAS

Australian/New Zealand Specialist Advisory Group in Toxicology (TOXSAG). **MS Identification Guidelines in Forensic Toxicology - An Australian Approach**. TIAFT Bulletin 2012; 42(2): 52-5.

BRASIL. Compilado dos **Relatórios Técnicos Finais. Câmaras Técnicas de cadeia de custódia: Discussão, Diagnóstico e Recomendações pós Lei n. 13.964/2019**. [acesso em 15 mar 2024]. Disponível em <https://dspace.mj.gov.br/handle/1/12006>.

BRASIL. Lei no 13.964 de 24 de dezembro de 2019. Aperfeiçoa a legislação penal e processual penal. [Online]; 2019; [acesso e 06 dez 2023]. Disponível em https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2019/lei/l13964.htm.

SMITH F. P. (Ed) Handbook of Forensic Drug Analysis. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005.

8. GLOSSÁRIO

CUT OFF (VALORES DE CORTE): São valores estabelecidos para separar duas categorias, positiva e negativa. Utilizado em análises clínicas e toxicológicas, onde os resultados das amostras que estão abaixo deste valor, são considerados negativos, e os resultados acima desse valor são considerados positivos.

ÍON DIAGNÓSTICO: termo utilizado em espectrometria de massas para íons que são considerados característicos para o composto analisado.

PADRÃO INTERNO: substância química proveniente de uma solução padrão de concentração fixa, adicionada em uma mesma quantidade aos padrões de calibração, amostras de controles e amostras em estudo.

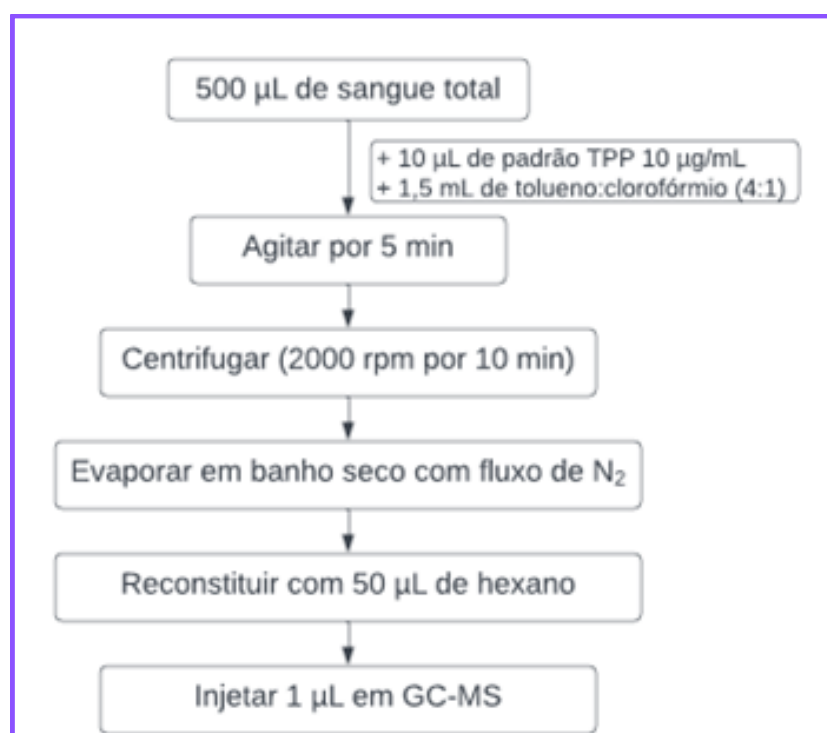
POOL: Mistura de duas ou mais amostras ou padrões em uma única solução.

VALIDAÇÃO: é a avaliação sistemática de um método por meio de ensaios experimentais de modo a confirmar e fornecer evidências objetivas de que os requisitos específicos para seu uso pretendido são atendidos.

9. ANEXOS

ANEXO A - FLUXOGRAMA DO PREPARO DE AMOSTRA

Figura 1 - Preparo de amostras.



ANEXO B - EXEMPLOS DE CROMATOGRAMAS E ESPECTROS DE MASSAS

Figura 2 - Cromatograma de íons totais (TIC) de um controle positivo.

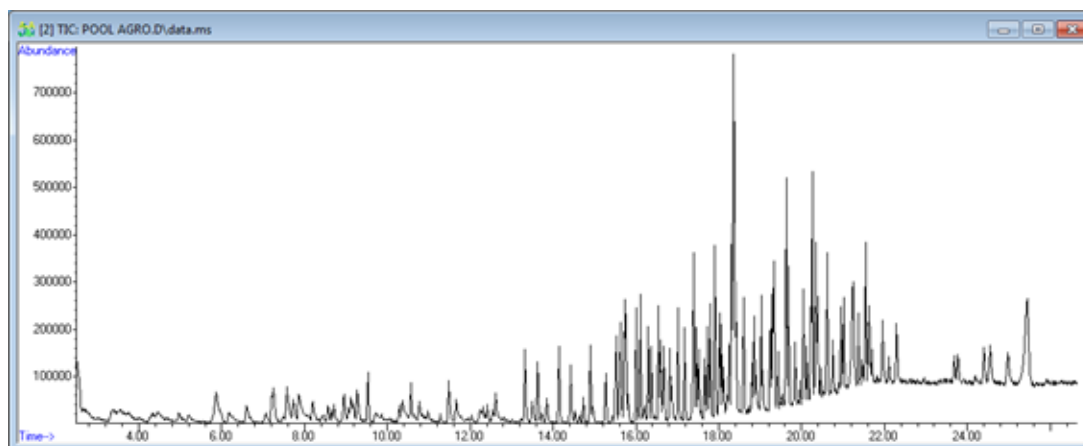
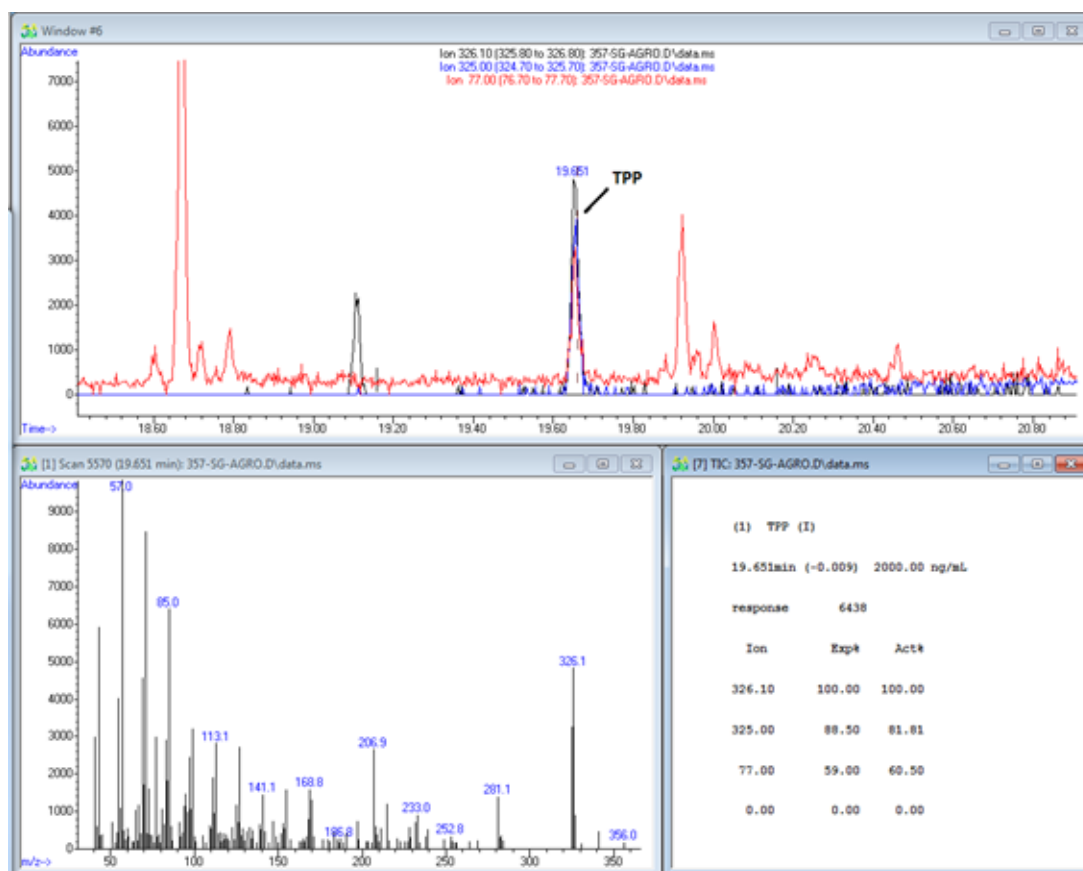
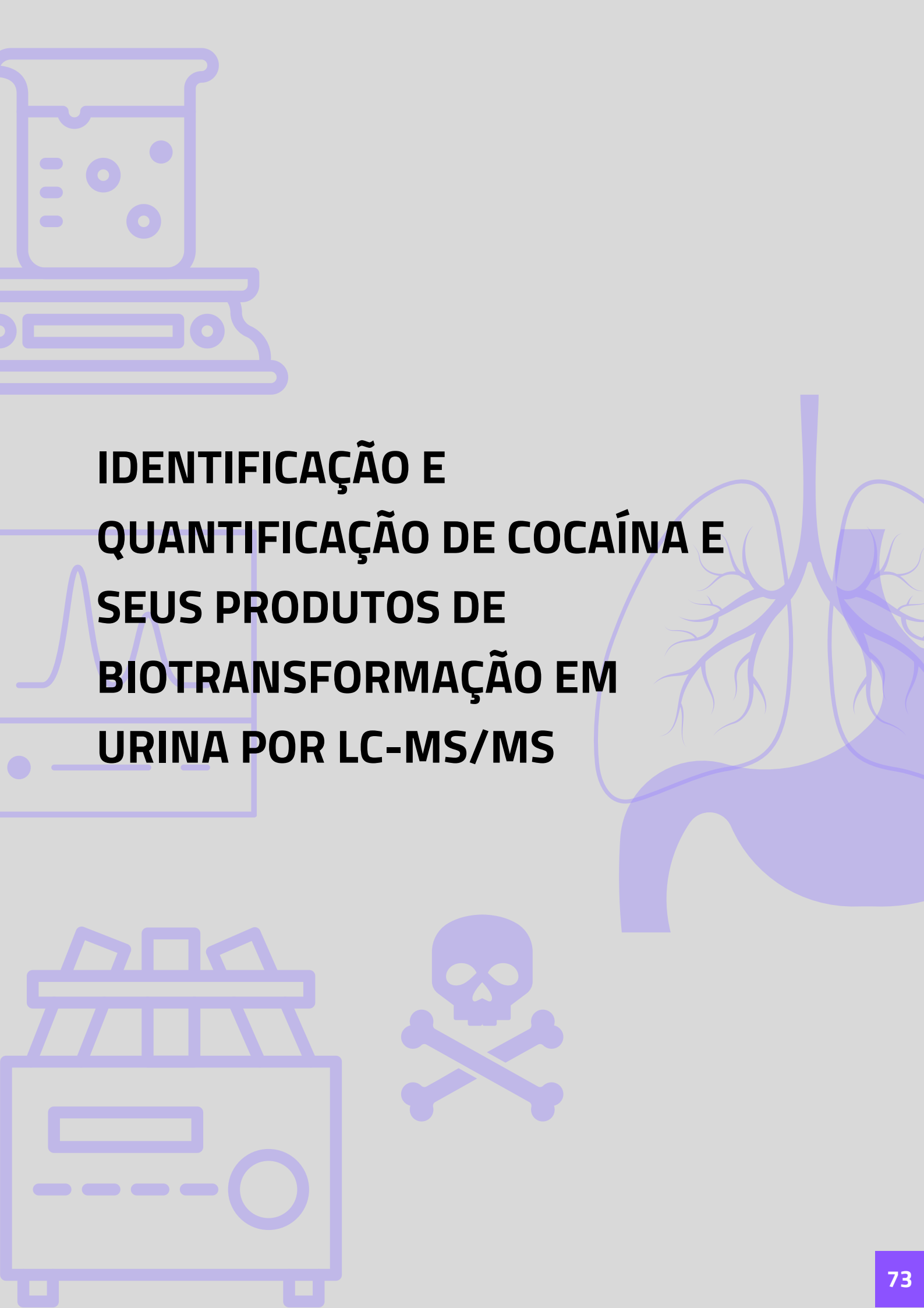


Figura 3 - Exemplo de espectro de massas e abundâncias relativas dos íons diagnóstico do padrão interno (TPP).





IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COCAÍNA E SEUS PRODUTOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO EM URINA POR LC-MS/MS

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP)

PERÍCIA OFICIAL DE NATUREZA
CRIMINAL



MINISTÉRIO DA JUSTIÇA E
SEGURANÇA PÚBLICA

POP N° 10.05 - TOXICOLOGIA FORENSE

IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COCAÍNA E SEUS PRODUTOS DE
BIOTRANSFORMAÇÃO EM URINA POR LC-MS/MS

FINALIDADE

Orientar o profissional de perícia a identificar e quantificar cocaína, benzoilecgonina e cocaetileno em amostras de urina por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS), para confirmação da exposição à cocaína.

PÚBLICO ALVO

Peritos Criminais da área de toxicologia forense.

1. ABREVIATURAS E SIGLAS

CQA: amostra de controle de qualidade de alta concentração

CQB: amostra de controle de qualidade de baixa concentração

CQM: amostra de controle de qualidade de média concentração

FM: fase móvel

LC-MS/MS: da língua inglesa, liquid chromatography with tandem mass spectrometry (cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial)

LD: limite de detecção

LIQ: limite inferior de quantificação

LSQ: limite superior de quantificação

MRC: material de referência certificado

2. RESULTADOS ESPERADOS

- Quantificação de cocaína, benzoilecgonina e cocaetileno por LC-MS/MS em amostras de urina, para confirmação da exposição à cocaína.

3. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

- Micropipetas
- Ponteiras
- Vortéx
- Centrífuga para tubos de 2 mL
- “Vials” de 2 mL
- Tampa rosqueável com septo para “vial” de 2 mL
- Água reagente
- Metanol grau HPLC ou superior
- Ácido fórmico grau HPLC ou superior
- Formiato de amônio grau HPLC ou superior
- Acetonitrila grau HPLC
- MRC de cocaína
- MRC de cocaetileno
- MRC de benzoilecgonina
- MRC de benzoilecgonina-d8
- Coluna cromatográfica com fase estacionária bifenil com dimensões 100 mm x 2,1 mm, 2,7 µm
- Equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência acoplado à espectrometria de massas do tipo triplo quadrupolo

4. PROCEDIMENTOS

4.1. Amostra questionada

- A coleta de urina em indivíduos vivos deve ser assistida, obrigatoriamente, por agente público responsável pela cadeia de custódia naquele momento. Quaisquer substâncias que possam ser adicionadas à amostra (água, álcool gel, sabonete líquido, etc.) deverão ser removidas do local de coleta.
- Em casos “post mortem”, deve-se coletar urina por punção direta da bexiga logo após a abertura da cavidade abdominal.
- A urina humana possui baixa atividade enzimática, normalmente não tem glicose e apresenta risco menor de contaminação por bactérias e leveduras após a morte. Portanto, não requer adição de conservantes durante a coleta. O frasco plástico coletor universal ou frasco plástico de fundo cônico tipo “falcon” são recomendados para o acondicionamento da amostra. Atentar-se com a perfeita vedação das tampas, a fim de evitar vazamentos.

4.2. Custódia

- Conforme redação dada pela Lei nº 13.964/19 em seu Art. 158-A, a cadeia de custódia é definida como “o conjunto de todos os procedimentos utilizados para manter e documentar a história cronológica do vestígio coletado em locais ou em vítimas de crimes, para rastrear sua posse e manuseio a partir de seu reconhecimento até o descarte”.
- Dentre esses procedimentos, a coleta é considerada uma das etapas mais importantes de todo o processo da cadeia de custódia, pois, quando realizada de forma inadequada, pode destruir os vestígios, inviabilizando sua análise e, consequentemente, a produção da prova pericial.
- As amostras devem ser acondicionadas em envelopes com lacre de segurança e numeração individualizada e encaminhadas ao laboratório o mais brevemente possível. Entretanto quando o prazo ultrapassar 48 horas é importante que as amostras sejam congeladas (-20°C). Para prazos inferiores, as amostras podem ser mantidas refrigeradas (2°C a 8°C).

4.3. Preparo de soluções

4.3.1 Solução estoque dos MRCs

- Deve-se preparar uma única solução estoque com os três analitos - cocaína, benzoilecgonina e cocaetileno na concentração individual de 100 µg/mL.
- Para o preparo de 1 mL dessa solução estoque, considerando que a concentração dos respectivos MRCs está a 1 mg/mL, proceder conforme segue:
 - Adicionar, com auxílio de micropipeta, 700 µL de acetonitrila para “vial” âmbar de 2 mL.
 - Transferir 100 µL do material de referência certificado de cada analito a 1 mg/mL (cocaína, cocaetileno e benzoilecgonina).
 - Fechar o frasco com tampa rosqueável e septo de silicone, homogeneizar em vórtex por 10 segundos e armazenar em freezer (-20°C) até seu respectivo período de validade. O prazo de validade da solução será aquele referente ao menor prazo dentre os componentes na mistura, ou seja, menor data de validade dentre cocaína, cocaetileno e benzoilecgonina. Concentração final de 100 µg/mL.

4.3.2. Solução de trabalho dos MRCs

- A partir da solução padrão estoque (100 µg/mL), realizar diluições em acetonitrila para preparo dos calibradores e controles, conforme tabela abaixo. As soluções de controle de qualidade devem ser preparadas em maior volume final (1 mL) em comparação ao dos calibradores (0,5 mL), devido a quantidade de controles utilizados na rotina. As soluções devem ser preparadas, identificadas e armazenadas em "vials" com capacidade para 2 mL. As soluções devem ser armazenadas em freezer (-20°C) até seu respectivo período de validade.
 - Identificar cada "vial" individualmente com as identificações da coluna 1 da Tabela 1.
 - Adicionar, com auxílio de micropipeta, o volume de acetonitrila descrito na coluna 2 da Tabela 1 para o "vial" correspondente.
 - Adicionar, com auxílio de micropipeta, o volume de solução estoque indicado para cada nível de concentração, conforme coluna 3 da Tabela 1;
 - Fechar o frasco com tampa rosqueável para "vial" de 2 mL.
 - Homogeneizar em vórtex.
 - Armazenar em freezer (-20°C). As concentrações finais de cada solução de trabalho são apresentadas na coluna 4 da Tabela 1.

Tabela 1 - Preparo de soluções de trabalho para calibradores e controles a partir da solução estoque de cocaína, benzoilecgonina e cocaetileno a 100 µg/mL cada.

Identificação	Volume de acetonitrila (µL)	Volume de solução estoque (µL)	Concentração final (µg/mL)
CAL1	475	25*	0,5
CAL2	450	50*	1,0
CAL3	475	25	5,0
CAL4	462,5	37,5	7,5
CAL5	450	50	10

CAL6	425	75	15
CAL7	400	100	20
CQB	985	15	1,5
CQM	915	85	8,5
CQA	840	160	16

*O CAL1 e o CAL2 devem ser preparados a partir do CAL5 (10 µg/mL).

4.3.3. Solução de PI (benzoilecgonina-d8)

- Considerando o MRC de benzoilecgonina-d8 na concentração de 100 µg/mL, realizar diluição com acetonitrila, conforme descrito abaixo, a fim de se obter solução de trabalho do padrão interno a 4 µg/mL:
 - Identificar adequadamente um “vial” âmbar com capacidade para 2 mL.
 - Adicionar, com auxílio de micropipeta, 480 µL de acetonitrila.
 - Adicionar, com auxílio de micropipeta, 20 µL do MRC de benzoilecgonina-d8 (100 µg/mL).
 - Fechar o frasco com tampa rosqueável adequada.
 - Homogeneizar em vórtex.
 - Armazenar em freezer (-20°C) até seu respectivo período de validade.

4.3.4. Fase Móvel

- Solução de formiato de amônio 1 mol/L.
 - Dissolver 6,31 g de formiato de amônio em 100 mL de água reagente.
- Fase móvel A – Água com 0,1% de ácido fórmico e 2 mmol/L de formiato de amônio.
 - Em balão volumétrico de 500 mL, contendo 100 mL de água reagente, adicionar 500 µL de Ácido Fórmico grau LC-MS e 1 mL do formiato de

amônio 1 mol/L.

- Completar o volume do balão com água reagente q.s.p. 500 mL.
- Fase móvel B – Metanol com 0,1 % de Ácido Fórmico e 2 mmol/L de formiato de amônio.
 - Em balão volumétrico de 500 mL, contendo 100 mL de metanol grau LC-MS, adicionar 500 µL de Ácido Fórmico grau LC-MS e 1 mL do formiato de amônio 1 mol/L.
 - Completar o volume do balão com metanol grau LC-MS q.s.p. 500 mL.

4.4. Procedimentos analíticos

4.4.1. Preparo de calibradores e controles

- Identificar previamente microtubos de polipropileno (com capacidade para 1,5 ou 2 mL) com as informações presentes na coluna 1 da Tabela 2, além de um tubo de controle de qualidade negativo (NEG).
- Transferir, com auxílio de micropipeta, 90 µL de amostra branco (urina) para cada microtubo.
- Adicionar, com auxílio de micropipeta, 10 µL da solução de trabalho correspondente no respectivo microtubo (solução de trabalho CAL1 no microtubo CAL1, etc).
- Na amostra de controle de qualidade negativa (NEG), adicionar 10 µL de metanol.
- Tampar os microtubos e homogeneizar em vórtex por 10 s.
- As concentrações finais dos analitos nas amostras de urina são apresentadas na coluna 4 da Tabela 2.
- Seguir com o procedimento de preparo descrito em 4.4.2.

Tabela 2 - Preparo de calibradores e controles para análise de cocaína, benzoilecgonina e cocaetileno em urina por LC-MS/MS.

Identificação do microtubo	Volume de amostra branco (µL)	Solução de trabalho		Concentração final dos analitos na urina (ng/mL)
		Ident. da solução	Volume (µL)	
NEG	90	-	10*	-
CAL1	90	CAL1	10	50
CAL2	90	CAL2	10	100
CAL3	90	CAL3	10	500
CAL4	90	CAL4	10	750
CAL5	90	CAL5	10	1000
CAL6	90	CAL6	10	1500
CAL7	90	CAL7	10	2000
CQB	90	CQB	10	150
CQM	90	CQM	10	850
CQA	90	CQA	10	1600

*No NEG pipetar 10 µL de metanol.

4.4.2. Preparo das amostras questionadas

- Identificar microtubos (com capacidade para 1,5 ou 2 mL) utilizando caneta para anotação em vidro ou etiqueta. Cada microtubo deve conter o respectivo número de identificação da amostra, ou a identificação do calibrador ou controle conforme apresentado na Tabela 2.

- Adicionar 100 μL da amostra no respectivo microtubo.
- Adicionar, com auxílio de micropipeta, 25 μL da solução de trabalho de padrão interno em cada microtubo.
- Adicionar, com auxílio de micropipeta, 500 μL de acetonitrila gelada.
- Fechar os microtubos e agitar em vórtex por 5 min.
- Centrifugar os microtubos a 14.000 rpm por 5 min.
- Identificar "vials" com capacidade para 2 mL utilizando caneta para anotação em vidro. Cada "vial" deve conter o respectivo número de identificação da amostra, ou a identificação do calibrador ou controle conforme apresentado na Tabela 2.
- Transferir 400 μL do sobrenadante de cada amostra/calibrador/controle para o respectivo "vial".
- Fechar os "vials" com tampa rosqueável e septo.
- Homogeneizar em vórtex por 10 s.
- Injetar 1 μL no sistema LC-MS/MS.

4.5. Método cromatográfico

- Os parâmetros descritos abaixo têm caráter exemplificativo, sendo que cada laboratório deve adequar-se de acordo com a configuração de seus respectivos equipamentos.

4.5.1. Coluna cromatográfica

- Coluna cromatográfica com fase estacionária bifenil com dimensões 100 mm x 2,1 mm, 2,7 μm .

4.5.2. Condições do cromatógrafo em fase líquida

- Volume de injeção: 1 μL .
- Temperatura do amostrador: 10°C.
- Temperatura da coluna: 40°C.
- Fase móvel em gradiente de eluição: Inicia com 5% de B, seguido por aumento linear até 100% de B em 9 min; manter em 100% de B por 2 min; retornar à condição inicial em 0,1 min e aguardar estabilização por 2,4 min.
- Tempo total de análise: 13,5 min.

4.5.3. Condições do espectrômetro de massas

- Fonte de ionização: electrospray operando em modo positivo.
- Temperatura de interface: 400°C.
- Temperatura da linha de dessolvatação: 200°C.
- Vazão de gás de aquecimento (ar): 15 L/min.
- Vazão de gás de secagem (N₂): 5 L/min.
- Vazão do gás de nebulização (N₂): 3 L/min.

4.5.4. Aquisição de dados

- A aquisição de dados é feita por meio do modo monitoramento de reações múltiplas (MRM). Para cada composto devem ser selecionadas duas transições, sendo a primeira para quantificação e a segunda para confirmação (por razão de MRM).
- Os valores de tempo de retenção, conforme método cromatográfico descrito acima, as transições e os parâmetros de espectrometria de massas dos analitos e do padrão interno estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3: Tempo de retenção e transições MRM para determinação de cocaína, benzoilecgonina e cocaetileno em urina por LC-MS/MS.

Substância	Tempo de Retenção (min)	Transições MRM*	Tempo de leitura (msec)	Energia de colisão (eV)
Benzoilecgonina	3,064	<u>290.2>105.1</u> 290.2>168.1	100 100	-31 -20
Benzoilecgonina-d8	3,041	<u>298.1>110.1</u> 298.1>171.1	100 100	-34 -20
Cocaína	3,800	<u>304.1>182.1</u> 304.1>105.1	100 100	-20 -30
Cocaetileno	3,900	<u>318.1>196.1</u> 318.1>105.1	100 100	-20 -30

*Transição sublinhada: utilizada para quantificação.

Obs.: Condições baseadas no equipamento Shimadzu HPLC modelo Nexera e espectrômetro de massas triplo quadrupolo modelo 8045. Os parâmetros abordados no item 4.5 podem receber nomenclaturas diferentes conforme os fabricantes.

4.6. Avaliação dos resultados

4.6.1. Critérios de identificação

- Avaliar o tempo de retenção, relação sinal/ruído e a razão entre as transições MRM da cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno e do padrão interno. Os critérios de identificação do analito no presente método são:
 - Tempo de retenção absoluto com variação menor do que $\pm 5\%$ em relação ao tempo médio de retenção observado para os calibradores.
 - Relação sinal/ruído superior a 3 para as transições MRM qualificadoras e quantificadoras.
 - Razão entre as duas transições MRM com variação máxima de acordo com o estabelecido na tabela 4, com relação ao valor médio das razões observadas para os calibradores.

Tabela 4 - Tolerâncias máximas permitidas para as razões de MRM.

Razão entre as transições MRM	Variação máxima permitida
> 50 %	$\pm 20 \%$
> 20 % até 50 %	$\pm 25 \%$
> 10 % até 20 %	$\pm 30 \%$
$\leq 10 \%$	$\pm 50 \%$

4.6.2. Avaliação dos calibradores

- Os calibradores devem atender a todos os critérios de identificação do analito citados anteriormente em 4.6.1.
- Deve-se ter pelo menos 6 calibradores com concentração calculada com inexatidão de até $\pm 20\%$ dos valores nominais.
- Coeficiente de correlação (r) deve ser maior ou igual a 0,99.

4.6.3. Avaliação dos controles positivos

- Os controles positivos devem atender a todos os critérios de identificação do analito citados anteriormente em 4.6.1.
- Concentração calculada com variação de até $\pm 20\%$ dos valores nominais.

4.6.4. Avaliação dos controles negativos

- Ausência de pico cromatográfico que atenda aos critérios de identificação do analito citados anteriormente.

4.6.5. Avaliação das amostras

- A avaliação das amostras deverá ser feita após a validação dos resultados dos controles (negativos e positivos), conforme descrito nos itens 4.6.3 e 4.6.4. Caso os controles não atendam às especificações necessárias, as amostras deverão ser reanalisadas em conjunto com novo grupo de controles ou calibradores.
- A amostra apresentará resultado positivo (detectado) se observados todos os critérios apresentados em 4.6.1.
- O Anexo B traz um exemplo de cromatograma da benzoilecgonina.

5. PONTOS CRÍTICOS

- O método, antes de sua aplicação na rotina de análises, deve ser validado, conforme normas vigentes.
- A validade dos resultados obtidos deve ser avaliada através da análise dos calibradores e controles, a cada conjunto de amostras analisadas.
- Como o método é quantitativo, a calibração e verificação de micropipetas, vidrarias, balanças, entre outros, devem ser realizadas periodicamente de acordo com a política de qualidade interna.
- Amostras muito concentradas (acima do limite superior de quantificação) devem ser analisadas com cautela, pois a razão entre as transições MRM pode ser alterada se houver saturação do detector do LC-MS/MS, levando a uma interpretação errônea deste critério de identificação e consequentemente a um resultado falso negativo. Nesses casos a diluição da amostra e reanálise deve ser considerada.
- Tanto a benzoilecgonina-d8 quanto a benzoilecgonina-d3 podem ser utilizadas como padrão interno. Entretanto, caso haja mudança da

benzoilecgonina utilizada como padrão interno, o método deverá ser revalidado.

- Dependendo da sensibilidade do instrumento LC-MS/MS disponível no laboratório, o volume de injeção ou a diluição da amostra podem ser ajustados.
- Este procedimento traz a descrição de um procedimento quantitativo, mas que pode ser adaptado para realização de exames qualitativos.
- As características da técnica de LC-MS/MS requerem do laboratório condições de infraestrutura adequadas, como por exemplo, rede elétrica dimensionada, estabilizada e com nobreak, sala climatizada (temperatura e umidade controladas), sistema de ultrapurificação de água com manutenção periódica de filtros, membranas e lâmpadas, concentradores de amostra (banho seco com fluxo de nitrogênio), ultracentrífuga de microtubos ou filtros de amostra, materiais de referência certificados.

6. ESTRUTURA BÁSICA DO LAUDO

6.1. Identificação do material

- Identificação, descrição e lacre da amostra.

6.2. Exames realizados

- Determinação da concentração de cocaína e seus produtos de biotransformação em urina por LC-MS/MS.

6.3. Resultados obtidos

- Os critérios de identificação do analito devem ser avaliados em todas as corridas. Os resultados analíticos deste procedimento podem ser apresentados na forma de tabela, conforme exemplo abaixo:

Analito	Resultado*
Cocaína	155 ng/mL
Cocaetileno	Não detectado
Benzoilecgonina	> 2000 ng/mL

*limite de detecção:
50 ng/mL

- **NÃO DETECTADO:** Ausência de picos no tempo de retenção esperado, ou presença de picos com abundância relativa dos íons diagnósticos diferente do esperado, ou valor obtido nas análises encontra-se abaixo do valor de sensibilidade analítica do analito.
- **DETECTADO:** presença de pico no tempo de retenção esperado, com respectivo espectro de massas que contemple os íons diagnóstico com a abundância relativa esperada.

6.4. Conclusão

- Abaixo é apresentado um exemplo de conclusão, baseado no exemplo de resultado supracitado.
- As análises realizadas detectaram a presença de cocaína na concentração de 155 ng/mL e benzoilecgonina em concentração superior a 2000 ng/mL. Não foi detectada a presença de cocaetilenos na amostra analisada.
- Caso nenhum dos analitos seja detectado na amostra analisada, a conclusão pode ser escrita como:
- As análises realizadas não detectaram a presença de cocaína e seus produtos de biotransformação na amostra.

7. REFERÊNCIAS

ANSI/ASB Standard 036. **Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology**. 1a. edição, 2019. [acesso em 26 FEV 2024]. Disponível em: https://www.aafs.org/sites/default/files/media/documents/036_Std_e1.pdf.

ANSI/ASB Standard 113. Standard for Identification Criteria in Forensic Toxicology. 1a. edição, 2022. [acesso em 29 jan 2024]. Disponível em: <https://www.aafs.org/asb-standard/standard-identification-criteria-forensic-toxicology#>.

BRASIL. Compilado dos **Relatórios Técnicos Finais. Câmaras Técnicas de cadeia de custódia: Discussão, Diagnóstico e Recomendações pós Lei n. 13.964/2019**. [acesso em 15 mar 2024]. Disponível em <https://dspace.mj.gov.br/handle/1/12006>.

BRASIL. Lei no 13.964 de 24 de dezembro de 2019. Aperfeiçoa a legislação penal e processual penal. [Online]; 2019; [acesso em 06 dez 2023]. Disponível em https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2019/lei/l13964.htm.

BRASIL. Anvisa. RESOLUÇÃO - RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017. Publicado em: 25/07/17; [Online]; 2017; [acesso em 06 dez 2023]. Disponível em https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401.

EWDTs. **European Workplace Drug Testing Society - European Guidelines for Workplace Drug Testing in Urine. Versão 3 (2022)**. [acesso em 29 jan 2024]. Disponível em: <https://www.ewdts.org/data/uploads/documents/2022-10-ewdts-guidelines-urine-final.pdf>.

8. GLOSSÁRIO

BRANCO: amostra que não contém o analito de interesse ou outras substâncias interferentes.

CALIBRAÇÃO: conjunto de operações sob condições especificadas, que estabelece a correspondência entre os valores indicados por um instrumento de medida e um material de referência, com fins de padronização ou ajuste de instrumentos ou de procedimentos.

COMPARAÇÃO INTERLABORATORIAL: organização, realização e avaliação de medições ou ensaios nos mesmos ou em itens similares por dois ou mais laboratórios, de acordo com as condições predeterminadas.

CONTROLE DE QUALIDADE EXTERNO: determinação da exatidão e do desempenho do processo analítico, realizada por meio de comparações interlaboratoriais conduzidas por Provedor de Ensaio de Proficiência, também conhecido como Programas de Ensaio de Proficiência.

CONTROLE DE QUALIDADE INTERNO: procedimentos feitos internamente por meio de controles a fim de avaliar a precisão do sistema analítico e se este está operando dentro dos limites de tolerância pré-definidos.

PADRÃO INTERNO: substância química proveniente de uma solução padrão de concentração fixa, adicionada em uma mesma quantidade aos padrões de calibração, amostras de CQs e amostras em estudo.

VALIDAÇÃO: é a avaliação sistemática de um método por meio de ensaios experimentais de modo a confirmar e fornecer evidências objetivas de que os requisitos específicos para seu uso pretendido são atendidos;

CQB: amostra de controle de qualidade de baixa concentração (até 3 vezes o limite inferior de quantificação do método).

CQM: amostra de controle de qualidade de média concentração, em concentração próxima à média entre os limites inferior e superior de quantificação.

CQA: amostra de controle de qualidade de alta concentração, em concentração entre 75 (setenta e cinco) e 90% (noventa por cento) da maior concentração da curva de calibração.

LIQ: limite inferior de quantificação, menor concentração do analito na curva de calibração.

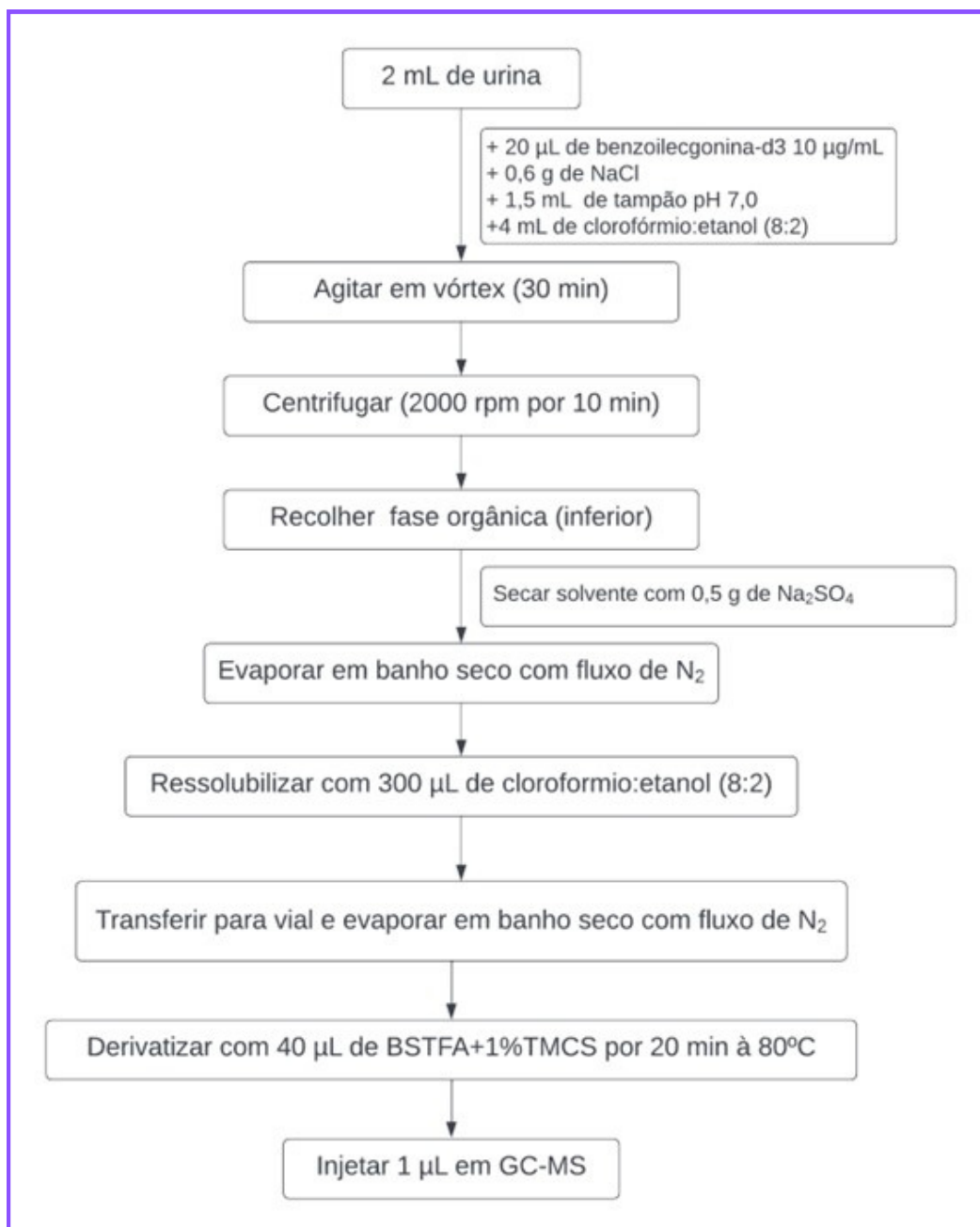
LSQ: limite superior de quantificação, maior concentração do analito na curva de calibração.

LD: limite de detecção, menor concentração do analito que pode ser detectada no método.

9. ANEXOS

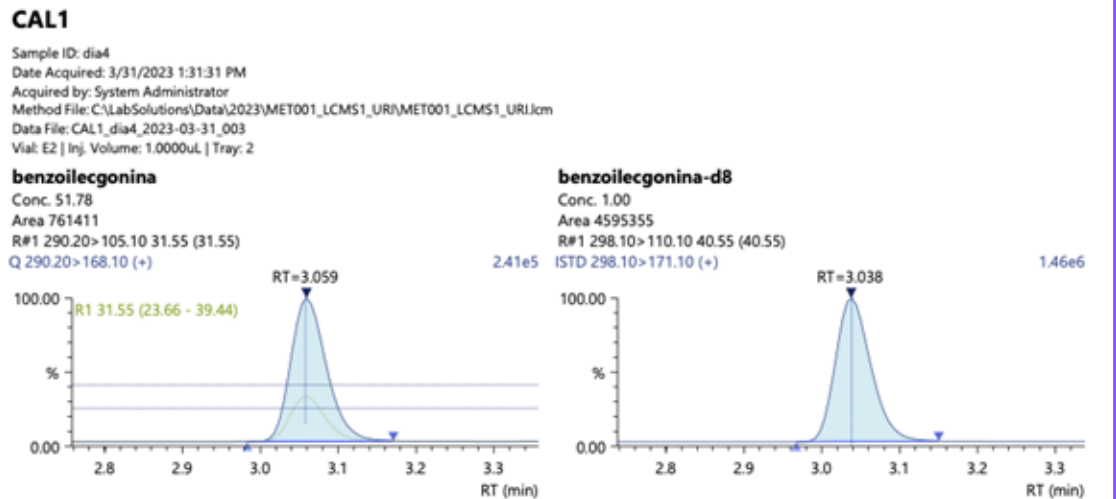
ANEXO A - FLUXOGRAMA

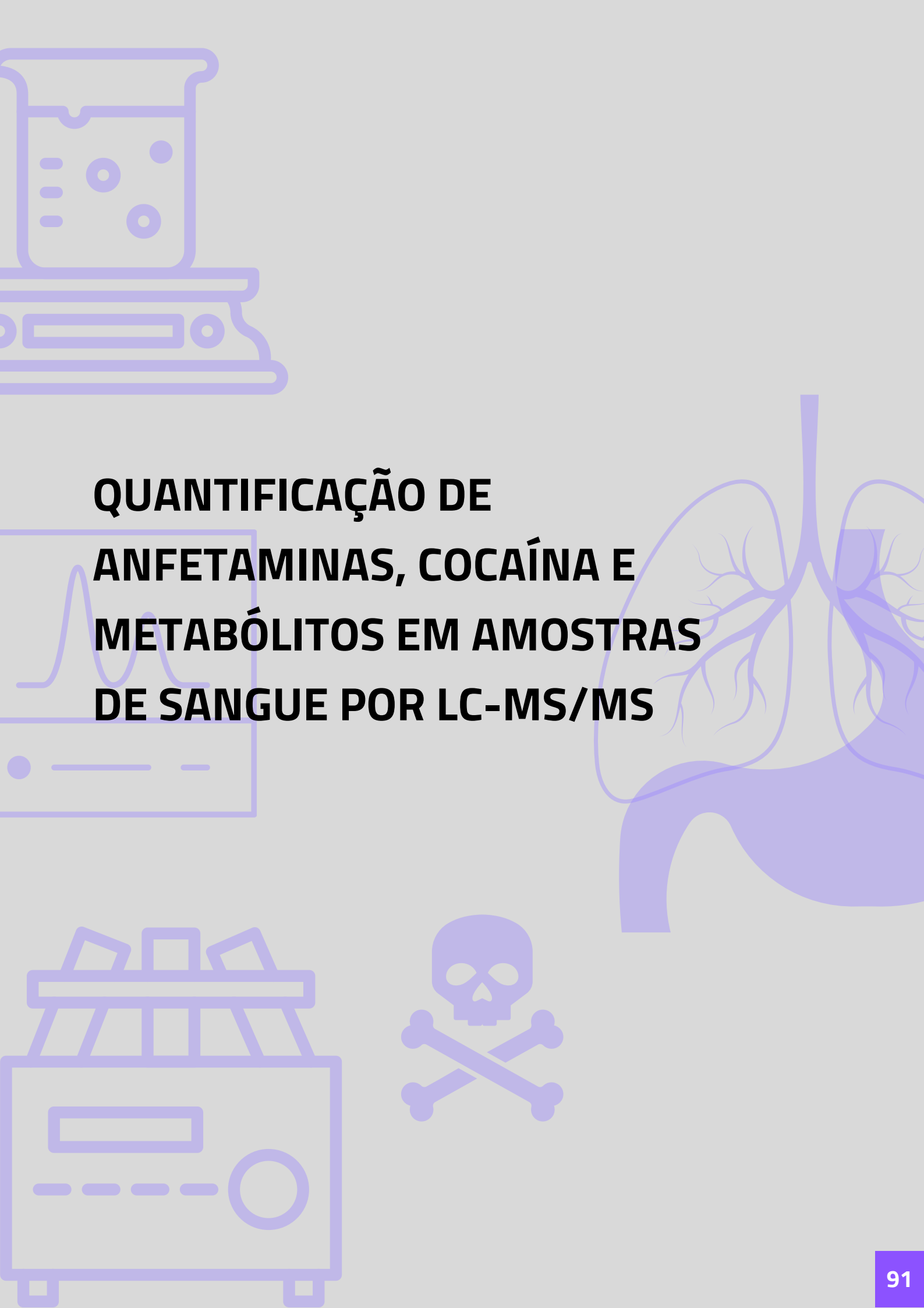
Figura 1 - Preparo de amostras.



ANEXO B - EXEMPLO DE CROMATOGRAMAS

Figura 2 - Cromatograma do calibrador 1 (50 ng/mL).





QUANTIFICAÇÃO DE ANFETAMINAS, COCAÍNA E METABÓLITOS EM AMOSTRAS DE SANGUE POR LC-MS/MS

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP)

PERÍCIA OFICIAL DE NATUREZA
CRIMINAL



MINISTÉRIO DA JUSTIÇA E
SEGURANÇA PÚBLICA

POP N° 10.06 - TOXICOLOGIA FORENSE

QUANTIFICAÇÃO DE ANFETAMINAS, COCAÍNA E METABÓLITOS EM AMOSTRAS DE SANGUE POR LC-MS/MS

FINALIDADE

Orientar o profissional de perícia a realizar análises quantitativas para anfetaminas, cocaína e seus metabólitos em amostras de sangue por extração líquido-líquido e cromatografia em fase líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS).

PÚBLICO ALVO

Peritos Criminais da área de toxicologia forense.

1. ABREVIATURAS E SIGLAS

AEME: anidroecgonina metil éster

ANF: anfetamina

ANF-d11: anfetamina-d11

BEG: benzoilecgonina;

BEG-d3: benzoilecgonina-d3

COC: cocaína

COC-d3: cocaína-d3

CE: cocaetileno

MDA: 3,4 Metilenodioxianfetamina

MDMA: 3,4 Metilenodioximetanfetamina

MDMA-d5: 3,4 Metilenodioximetanfetamina-d5

MET: metanfetamina

MET-d14: metanfetamina-d14

MRC: material de referência certificado

LC-MS/MS: da língua inglesa, liquid chromatography with tandem mass spectrometry (cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial)

PI: padrão interno

q.s.p.: quantidade suficiente para

2. RESULTADOS ESPERADOS

- Confirmação e quantificação de anfetaminas, cocaína e seus metabólitos por LC-MS/MS em amostras de sangue.

3. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

- Microtubos tipo eppendorf de 2 mL
- Micropipetas automáticas
- Ponteiras
- Vórtex
- Microcentrífuga
- "Vial" 2 mL
- Banho seco com fluxo de nitrogênio
- Ácido Fórmico grau LC-MS
- Metanol grau HPLC
- Acetonitrila grau HPLC
- MRC de cocaína
- MRC de cocaetileno
- MRC de anidroecgonina metil éster (AEME)
- MRC de benzoilecgonina
- MRC de anfetamina
- MRC de metanfetamina
- MRC de femproporex
- MRC de anfepramona
- MRC de MDA
- MRC de MDMA
- MRC de cocaína-d3
- MRC de benzoilecgonina-d3
- MRC de metilenodioximetanfetamina-d5
- MRC de anfetamina-d11
- MRC de metanfetamina-d14
- Coluna cromatográfica Fenil-hexil, 2,1 x 30mm, 1,8µm
- Equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência acoplado à espectrometria de massas sequencial (triplo quadrupolo).

4. PROCEDIMENTOS

4.1. Amostra questionada

- A coleta "in vivo" deve ser realizada por punção venosa o mais brevemente possível. Caso também seja solicitada a análise de alcoolemia na amostra coletada, a assepsia do local de coleta deve ser realizada com material isento de etanol e outros álcoois em sua constituição (p.ex.: antissépticos à base de iodo);
- No caso de coletas "post mortem", colher sangue, preferencialmente, de vasos calibrosos (veias femoral, subclávia ou jugular interna). Caso não seja possível, colher sangue da cavidade cardíaca. Não coletar sangue acumulado das cavidades torácica e abdominal devido à alta possibilidade de contaminação com outros fluidos biológicos ou conteúdo estomacal.

4.2. Custódia

- Conforme redação dada pela Lei no 13.964/19 em seu Art. 158-A, a cadeia de custódia é definida como "o conjunto de todos os procedimentos utilizados para manter e documentar a história cronológica do vestígio coletado em locais ou em vítimas de crimes, para rastrear sua posse e manuseio a partir de seu reconhecimento até o descarte".
- Dentre esses procedimentos, a coleta é considerada uma das etapas mais importantes de todo o processo da cadeia de custódia, pois, quando realizada de forma inadequada, pode destruir os vestígios, inviabilizando sua análise e, conseqüentemente, a produção da prova pericial.
- As amostras devem ser acondicionadas em envelopes com lacre de segurança e numeração individualizada e encaminhadas ao laboratório o mais brevemente possível. Entretanto quando o prazo ultrapassar 48 horas é importante que as amostras sejam congeladas (-20°C). Para prazos inferiores, as amostras podem ser mantidas refrigeradas (2°C a 8°C).

4.3. Preparo de soluções

4.3.1. Soluções de padrões internos

- Padrão interno de COC-d3 1 µg/mL.

- Diluir, com acetonitrila, o MRC de COC-d3 a partir da concentração de 1 mg/mL. Serão necessárias 3 diluições sucessivas de 1:10 para a obtenção das concentrações desejadas de 100, 10 e 1 µg/mL. A solução de COC-d3 1 µg/mL será utilizada como solução de trabalho.
- Padrão interno de BEG-d3 10 µg/mL.
 - Diluir, com metanol, o MRC de BEG-d3 a partir da concentração de 1 mg/mL. Serão necessárias 2 diluições sucessivas de 1:10 para a obtenção das concentrações desejadas de 100, 10 µg/mL. A solução de BEG-d3 10 µg/mL será utilizada como solução de trabalho.
- Padrão interno de MDMA-d5 1 µg/mL.
 - Diluir, com acetonitrila, o MRC de MDMA-d5 a partir da concentração de 1 mg/mL. Serão necessárias 3 diluições sucessivas de 1:10 para a obtenção das concentrações desejadas de 100, 10 e 1 µg/mL. A solução de MDMA-d5 1 µg/mL será utilizada como solução de trabalho.
- Padrão interno de ANF-d11 1 µg/mL.
 - Diluir, com acetonitrila, o MRC de ANF-d11 a partir da concentração de 1 mg/mL. Serão necessárias 3 diluições sucessivas de 1:10 para a obtenção das concentrações desejadas de 100, 10 e 1 µg/mL. A solução de ANF-d11 1 µg/mL será utilizada como solução de trabalho.
- Padrão interno de MET-d14 1 µg/mL.
 - Diluir, com acetonitrila, o MRC de MET-d14 a partir da concentração de 1 mg/mL. Serão necessárias 3 diluições sucessivas de 1:10 para a obtenção das concentrações desejadas de 100, 10 e 1 µg/mL. A solução de MET-d14 1 µg/mL será utilizada como solução de trabalho.

4.3.2. Soluções de padrões dos analitos agrupados em pools

- Pool de COC, CE e AEME nas concentrações de 100, 10, 1 e 0,1 µg/mL.

- Em um “vial” devidamente identificado, acrescentar 100 µL de cada MRC (COC, CE e AEME) na concentração de 1 mg/mL e acrescentar 700 µL de acetonitrila. Dessa forma, obtém-se um pool desses analitos na concentração de 100 µg/mL.
- A partir do pool de 100 µg/mL, fazer 3 diluições sucessivas de 1:10, com acetonitrila, para a obtenção das concentrações desejadas de 10, 1 e 0,1 µg/mL.
- Pool de anfetamina, metanfetamina, femproporex, anfepramona, MDA e MDMA nas concentrações de 100, 10, 1 e 0,1 µg/mL.
 - Em um vial devidamente identificado, acrescentar 100 µL de cada MRC (anfetamina, metanfetamina, femproporex, anfepramona, MDA e MDMA) na concentração de 1 mg/mL e acrescentar 400 µL de metanol. Dessa forma, obtém-se um pool desses analitos na concentração de 100 µg/mL.
 - A partir do pool de 100 µg/mL, fazer 3 diluições sucessivas de 1:10, com metanol, para a obtenção das concentrações desejadas de 10, 1 e 0,1 µg/mL.
- Padrão de BEG nas concentrações de 1, 10 e 100 µg/mL;
 - Diluir o MRC de BEG a partir da concentração de 1 mg/mL. Serão necessárias 3 diluições sucessivas de 1:10, com metanol, para a obtenção das concentrações desejadas de 100, 10 e 1 µg/mL.

4.3.3.Fase Móvel

- Fase móvel A – Água com 0,1% de ácido fórmico.
 - Adicionar 500 µL de Ácido Fórmico grau LC-MS q.s.p. 500 mL de água reagente.
- Fase móvel B – Metanol com 0,1 % de Ácido Fórmico.
 - Adicionar 500 µL de Ácido Fórmico grau LC-MS q.s.p. 500 mL de metanol grau LC-MS.

4.4. Procedimentos analíticos

- Recomenda-se a análise de 3 níveis de controles positivos (CQB, CQM e CQA) e uma amostra sabidamente negativa (controle negativo) concomitante à análise dos calibradores e das amostras de rotina.

4.4.1 Preparo da curva de calibração e controles positivos

- Pipetar 0,1 mL de sangue nos microtubos devidamente identificados (6 calibradores e 3 controles positivos).
- Adicionar os padrões internos: 10 µL de COC-d3, ANF-d11, MET-d14 e MDMA-d5 1 µg/mL e 10 µL de BEG-d3 10 µg/mL.
- Adicionar os volumes dos padrões para cada calibrador e controle, conforme especificado nas tabelas 1 e 2 abaixo.
- A seguir, proceder conforme preparo descrito em 4.4.2, preparo das amostras questionadas.

Tabela 1 - Pontos da curva de calibração (COC, CE, AEME, ANF, MET, femproporex, anfepramona, MDA e MDMA).

Calibradores e Controles	Concentrações	Volume pool cocaína e metabólitos	Volume pool de anfetaminas	Solução de trabalho
1	10 ng/mL	10 µL	10 µL	0,1 µg/mL
2	50 ng/mL	5 µL	5 µL	1 µg/mL
3	100 ng/mL	10 µL	10 µL	1 µg/mL
4	200 ng/mL	20 µL	20 µL	1 µg/mL
5	500 ng/mL	5 µL	5 µL	10 µg/mL
6	1000 ng/mL	10 µL	10 µL	10 µg/mL

CQB	25 ng/mL	25 µL	25 µL	0,1 µg/mL
CQM	300 ng/mL	30 µL	30 µL	1 µg/mL
CQA	800 ng/mL	8 µL	8 µL	10 µg/mL

Tabela 2 - Pontos da curva de calibração (BEG).

Calibradores e Controles	Concentrações	Volume padrão de BEG	Solução de trabalho
1	100 ng/mL	10 µL	1 µg/mL
2	200 ng/mL	20 µL	1 µg/mL
3	500 ng/mL	5 µL	10 µg/mL
4	1000 ng/mL	10 µL	10 µg/mL
5	2000 ng/mL	20 µL	10 µg/mL
6	5000 ng/mL	5 µL	100 µg/mL
CQB	300 ng/mL	30 µL	1 µg/mL
CQM	1500 ng/mL	15 µL	10 µg/mL
CQA	4000 ng/mL	4 µL	100 µg/mL

4.4.2. Preparo das amostras questionadas

- Pipetar 0,1 mL de sangue de cada amostra questionada nos microtubos devidamente identificados.
- Adicionar os padrões internos: 10 µL de COC-d3, ANF-d11, MET-d14 e MDMA-d5 1 µg/mL e 10 µL de BEG-d3 10 µg/mL.
- Adicionar 850 µL de acetonitrila mantida à temperatura de -20°C.
- Agitar em vórtex por 5 min.
- Centrifugar por 10 min a 14000 rpm.
- Retirar fase orgânica (600 µL), sem ressuspender o sedimento.
- Transferir para um "vial" identificado.
- Evaporar em banho seco à 40°C, sob fluxo de nitrogênio.
- Reconstituir com 500 µL de fase móvel A.
- Injetar 5 µL no LC-MS/MS de acordo com as condições estabelecidas do item 4.5.

4.4.3. Preparo do controle negativo

- Repetir todos os itens descritos em 4.4.2 utilizando uma amostra sabidamente negativa, seja esta de fonte conhecida, ou analisada previamente para comprovar a ausência dos analitos, ou adquirida comercialmente para esse fim.

4.5. Método cromatográfico

- Os parâmetros descritos abaixo têm caráter exemplificativo, e foram baseados no equipamento Agilent HPLC modelo 1290 e espectrômetro de massas triplo quadrupolo modelo 6430. Cada laboratório deve adequar-se de acordo com a configuração de seus respectivos equipamentos, sabendo que os parâmetros abordados neste item podem receber nomenclaturas diferentes conforme os fabricantes

4.5.1. Coluna cromatográfica

- Coluna cromatográfica Fenil-hexil, 2,1 x 30mm, 1,8µm.

4.5.2. Condições do cromatógrafo em fase líquida

- Volume de injeção: 5 µL.

- Temperatura da coluna: 60°C.
- Fluxo: 0,4 mL/min.
- Rampa de gradiente de solvente conforme tabela 3.

Tabela 3 - Rampa de gradiente de fase móvel.

Tempo (min)	A (%)	B (%)
0.0	95	5
1.5	95	5
5.0	10	90
6.0	10	90
6.1	95	5

- Tempo pós corrida: 1 min.
- Tempo total de corrida: 7.1 min.

4.5.3. Condições do espectrômetro de massas

- Gas temp: 300°C.
- Gas flow: 6 L/min.
- Nebulizer: 15 psi.
- Capilar: 4.000 V (Delta EMV + 300).

4.5.4. Aquisição de dados

- A aquisição de dados é feita por meio do modo monitoramento de reações múltiplas (MRM). Para cada composto devem ser selecionadas duas transições, sendo a primeira para quantificação e a segunda para confirmação (por razão entre as MRMs).

- Os valores de tempo de retenção, conforme método cromatográfico descrito acima, as transições e os parâmetros de espectrometria de massas dos analitos e dos padrões internos estão demonstrados na tabela 4.

Tabela 4 - Tempo de retenção, transições MRM e outros parâmetros de aquisição para a determinação de anfetaminas, cocaína e metabólitos em sangue por LC-MS/MS.

Substância	Tempo de Retenção (min)	Transições MRM*	Fragmentor	Energia de colisão
Anfetamina-d11	4,08	$\frac{147.2 > 130}{147.2 > 98}$	59 59	2 14
MDMA-d5	4,53	$\frac{199.1 > 165}{199.1 > 107}$	64 64	10 26
Metanfetamina-d14	4,42	$\frac{164.2 > 130}{164.2 > 98}$	69 69	26 6
Benzoilecgonina-d3	5,13	<u>293.1 > 171.1</u>	130	16
Cocaína-d3	5,72	$\frac{307.2 > 185.1}{307.2 > 85}$	105 105	17 33
Anfepramona	-	$\frac{206.2 > 105.1}{206.2 > 77.1}$	114 114	23 55
Anfetamina	4,10	$\frac{136.1 > 119}{136.1 > 91.2}$	50 50	5 13
Femproporex	-	$\frac{189.1 > 119.1}{189.1 > 91.1}$	84 84	6 22
MDA	4,32	$\frac{180.1 > 163}{180.1 > 135}$	54 54	5 12

MDMA	4,55	$\frac{194.1 > 163}{194.1 > 105}$	64 64	9 25
Metanfetamina	4,44	$\frac{150.1 > 119}{150.1 > 91}$	65 65	5 17
AEME	1,73	$\frac{182.1 > 118.1}{182.1 > 91}$	128 128	21 25
Benzoilecgonina	5,16	$\frac{290.1 > 105.1}{290.1 > 168.1}$	130 130	28 16
Cocaína	5,75	$\frac{304.1 > 182.1}{304.1 > 105.1}$	105 105	17 33
Cocaetileno	6,26	$\frac{318.2 > 196.1}{318.2 > 82}$	95 95	17 29

*Transição sublinhada: utilizada para quantificação.

4.6. Avaliação dos resultados

4.6.1. Critérios de identificação

- Avaliar o tempo de retenção, relação sinal/ruído e a razão entre as transições MRM de anfetaminas, cocaína e metabólitos e dos padrões interno. Os critérios de identificação dos analitos no presente método são:
 - Tempo de retenção absoluto com variação menor do que $\pm 5\%$ em relação ao tempo médio de retenção observado para os calibradores.
 - Relação sinal/ruído superior a 3 para as transições MRM qualificadoras e quantificadoras.
 - Razão entre as duas transições MRM com variação máxima de acordo com o estabelecido na tabela 5, com relação ao valor médio das razões observadas para os calibradores.

Tabela 5: Tolerâncias máximas permitidas para as razões de MRM.

Razão entre as transições MRM	Variação máxima permitida
> 50 %	$\pm 20 \%$
> 20 % até 50 %	$\pm 25 \%$
> 10 % até 20 %	$\pm 30 \%$
$\leq 10 \%$	$\pm 50 \%$

4.6.2. Avaliação dos calibradores

- Os calibradores devem atender a todos os critérios de identificação do analito citados anteriormente em 4.6.1.
- Deve-se ter pelo menos 5 calibradores com concentração calculada com inexatidão de até $\pm 20\%$ dos valores nominais.
- Coeficiente de correlação (r) deve ser maior ou igual a 0,99.

4.6.3. Avaliação dos controles positivos

- Os controles positivos (CQB, CQM e CQA) devem atender a todos os critérios de identificação do analito citados anteriormente em 4.6.1.
- Concentração calculada com variação de até $\pm 20\%$ dos valores nominais.

4.6.4. Avaliação dos controles negativos

Ausência de pico cromatográfico que atenda aos critérios de identificação dos analitos citados anteriormente.

4.6.5. Avaliação das amostras

- A avaliação das amostras deverá ser feita após a validação dos resultados

dos controles (negativo e positivos), conforme descrito nos itens 4.6.3 e 4.6.4. Caso os controles não atendam às especificações necessárias, as amostras deverão ser reanalisadas em conjunto com novo grupo de controles e calibradores.

- A amostra apresentará resultado positivo (detectado) se observados todos os critérios apresentados em 4.6.1.
- O Anexo B traz um exemplo decromatograma de um controle positivo contendo as transições MRM de todos os analitos pesquisados pelo método, exceto femproporex e anfepramona. As abundâncias relativas de cada analito devem ser determinadas por cada laboratório.

5. PONTOS CRÍTICOS

- O método, antes de sua aplicação na rotina de análises, deve ser validado, conforme normas vigentes.
- A validade dos resultados obtidos deve ser avaliada através da análise dos calibradores e controles, a cada conjunto de amostras analisadas.
- Como o método é quantitativo, a calibração e verificação de micropipetas, vidrarias, balanças, entre outros, devem ser realizadas periodicamente de acordo com a política de qualidade interna.
- Tratando-se de um método desenvolvido no laboratório, recomenda-se fortemente a participação do laboratório em programas de proficiência interlaboratoriais (controle de qualidade externo) para exames de determinação de anfetaminas, cocaína e metabólitos em sangue.
- Amostras muito concentradas (acima do limite superior de quantificação) devem ser analisadas com cautela, pois a razão entre as transições MRM pode ser alterada se houver saturação do detector, levando a uma interpretação errônea deste critério de identificação e consequentemente a um resultado falso negativo. Nesses casos a diluição da amostra e reanálise deve ser considerada.
- Dependendo da sensibilidade do instrumento LC-MS/MS disponível no laboratório, o volume de injeção ou a diluição da amostra podem ser ajustados.
- Este procedimento traz a descrição de um procedimento quantitativo, mas que pode ser adaptado para realização de exames qualitativos.
- A preparação das soluções padrão dos analitos em pool é necessária para que não haja modificação da matriz dada à adição excessiva de solvente

orgânico.

- As características da técnica de LC-MS/MS requerem do laboratório condições de infraestrutura adequadas, como por exemplo, rede elétrica dimensionada, estabilizada e com nobreak, sala climatizada (temperatura e umidade controladas), sistema de ultrapurificação de água com manutenção periódica de filtros, membranas e lâmpadas, concentradores de amostra (banho seco com fluxo de nitrogênio), microcentrífuga de microtubos ou filtros de amostra, materiais de referência certificados, dentre outros.

6. ESTRUTURA BÁSICA DO LAUDO

6.1. Identificação do material

- Identificação, descrição e lacre da amostra.

6.2. Exames realizados

- Confirmação e quantificação de anfetaminas, cocaína e seus metabólitos por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em amostras de sangue.

6.3. Resultados obtidos

- Os critérios de identificação das substâncias devem ser avaliados em todas as corridas. Os resultados analíticos deste procedimento podem ser apresentados na forma de tabela, conforme exemplo abaixo:

Substância	Resultado*
Cocaína	155 ng/mL
Cocaetileno	Não detectado
Benzoilecgonina	> 5000 ng/mL

Anidroecgonina metil éster	Não detectado
Anfetamina	Não detectado
Metanfetamina	Não detectado
Femproporex	Não detectado
Anfepramona	Não detectado
MDA	Não detectado
MDMA	Não detectado

*limite de quantificação: 10 ng/mL, exceto para benzoilecgonina, cujo valor é 100 ng/mL.

- **NÃO DETECTADO:** Ausência de picos no tempo de retenção esperado, ou presença de picos com abundância relativa dos íons diagnósticos diferente do esperado, ou resultado abaixo do valor de sensibilidade analítica do analito.
- **DETECTADO:** presença dos picos referentes às duas transições MRM no tempo de retenção esperado com a abundância relativa entre as transições conforme preconizada no método.

6.4. Conclusão

- Abaixo é apresentada um exemplo de conclusão, baseado no exemplo de resultado supracitado.
 - As análises realizadas detectaram a presença de cocaína na concentração de 155 ng/mL e benzoilecgonina em concentração superior a 5000 ng/mL. As demais substâncias pesquisadas não foram detectadas na amostra.

- Caso nenhum dos analitos seja detectado na amostra analisada, a conclusão pode ser escrita como:
 - As análises realizadas não detectaram a presença de anfetaminas, cocaína e seus metabólitos na amostra.

7. REFERÊNCIAS

Australian/New Zealand Specialist Advisory Group in Toxicology (TOXSAG). **MS Identification Guidelines in Forensic Toxicology - An Australian Approach**. TIAFT Bulletin 2012; 42(2): 52-5.

BRASIL. Compilado dos Relatórios Técnicos Finais. Câmaras Técnicas de cadeia de custódia: Discussão, Diagnóstico e Recomendações pós Lei n. 13.964/2019. [acesso em 15 mar 2024]. Disponível em <https://dspace.mj.gov.br/handle/1/12006>.

BRASIL. Lei no 13.964 de 24 de dezembro de 2019. Aperfeiçoa a legislação penal e processual penal. [Online]; 2019; [acesso e 06 dez 2023]. Disponível em https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2019/lei/l13964.htm.

8. GLOSSÁRIO

BRANCO: amostra que não contém o analito de interesse ou outras substâncias interferentes.

CALIBRAÇÃO: conjunto de operações sob condições especificadas, que estabelece a correspondência entre os valores indicados por um instrumento de medida e um material de referência, com fins de padronização ou ajuste de instrumentos ou de procedimentos.

COMPARAÇÃO INTERLABORATORIAL: organização, realização e avaliação de medições ou ensaios nos mesmos ou em itens similares por dois ou mais laboratórios, de acordo com as condições predeterminadas.

CONTROLE DE QUALIDADE EXTERNO: determinação da exatidão e do desempenho do processo analítico, realizada por meio de comparações interlaboratoriais conduzidas por Provedor de Ensaio de Proficiência, também conhecido como Programas de Ensaio de Proficiência.

CONTROLE DE QUALIDADE INTERNO: procedimentos feitos internamente por meio de controles a fim de avaliar a precisão do sistema analítico e se este está operando dentro dos limites de tolerância pré-definidos.

CQA: amostra de controle de qualidade de alta concentração, em concentração entre 75 (setenta e cinco) e 90% (noventa por cento) da maior concentração da curva de calibração.

CQB: amostra de controle de qualidade de baixa concentração (até 3 vezes o limite inferior de quantificação do método).

CQM: amostra de controle de qualidade de média concentração, em concentração próxima à média entre os limites inferior e superior de quantificação.

PADRÃO INTERNO: substância química proveniente de uma solução padrão de concentração fixa, adicionada em uma mesma quantidade aos padrões de calibração, amostras de CQs e amostras em estudo.

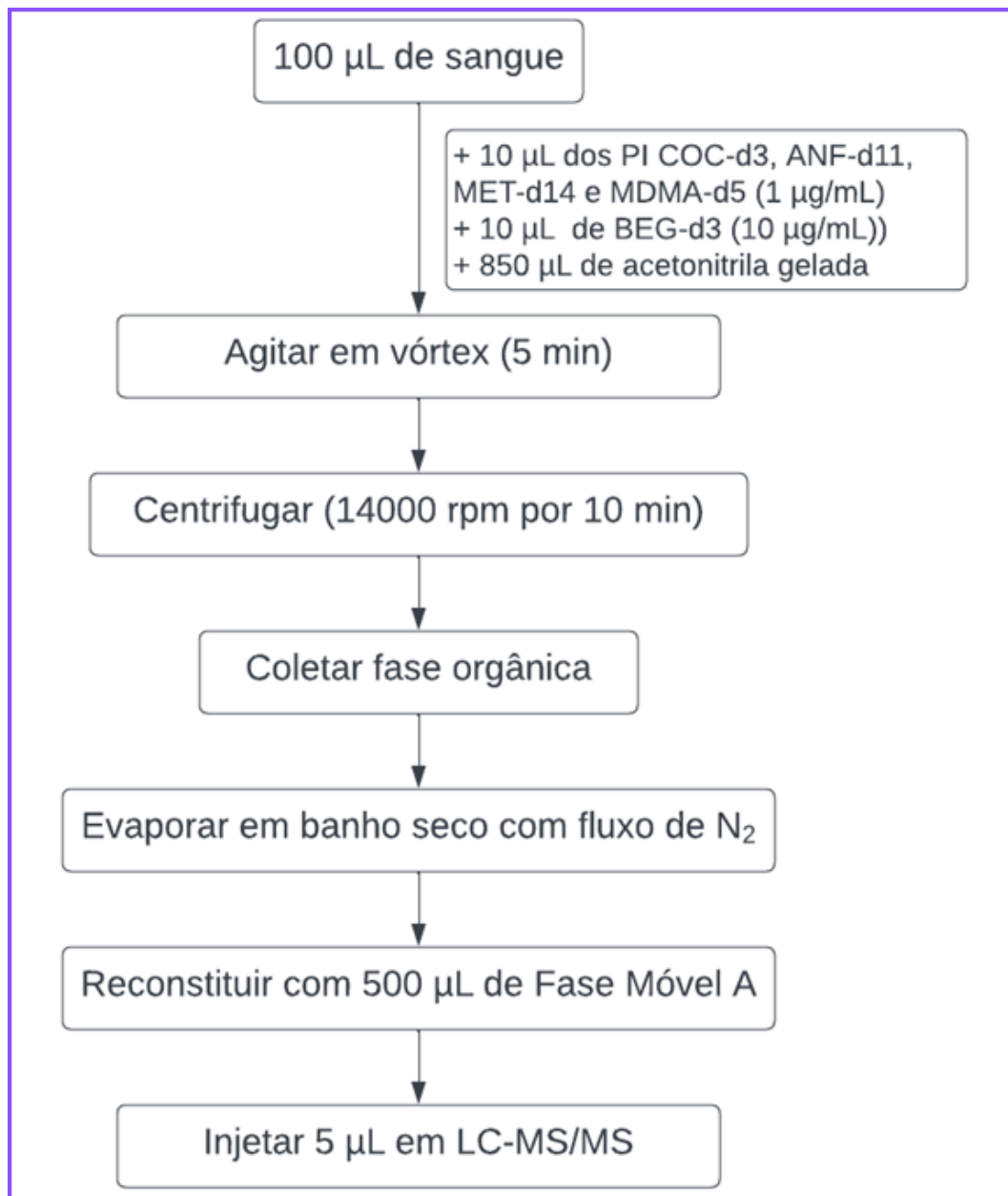
POOL: Mistura de duas ou mais amostras ou padrões em uma única solução.

VALIDAÇÃO: é a avaliação sistemática de um método por meio de ensaios experimentais de modo a confirmar e fornecer evidências objetivas de que os requisitos específicos para seu uso pretendido são atendidos.

9. ANEXOS

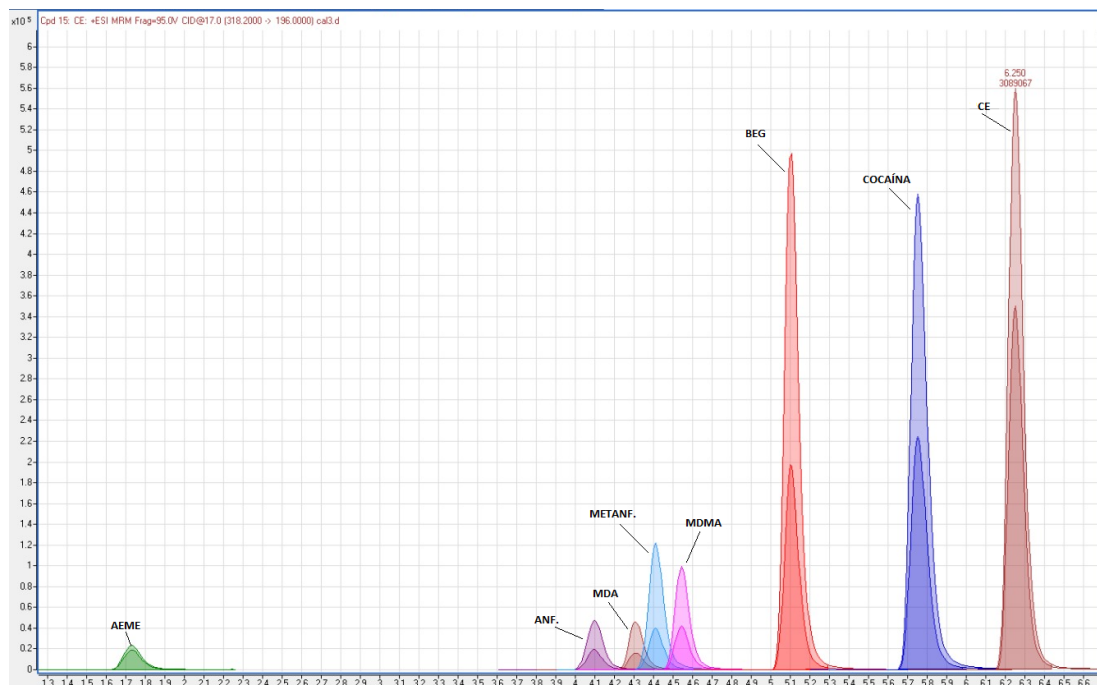
ANEXO A - FLUXOGRAMA DO PREPARO DE AMOSTRA

Figura 1 - Preparo de amostras.



ANEXO B - EXEMPLOS DE CROMATOGRAMA

Figura 2 - Cromatograma com os picos dos analitos pesquisados no método.



— • **DSUSP**

SECRETARIA
NACIONAL DE
SEGURANÇA PÚBLICA

MINISTÉRIO DA
JUSTIÇA E
SEGURANÇA PÚBLICA

