



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Ana Isabel Coutinho Guedes

**DETERMINAÇÃO *POST MORTEM* DE ETANOL EM  
DIFERENTES TIPOS DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS:  
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UMA  
METODOLOGIA ANALÍTICA POR HS-GC-FID EM  
CONTEXTO FORENSE**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Medicina Legal e Ciências  
Forenses, orientada pelo Professor Doutor Francisco Manuel  
Andrade Corte Real Gonçalves e coorientada pela Mestre Carla  
Maria Pinto Monteiro e apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de Coimbra

outubro de 2020



# FACULDADE DE MEDICINA

## DETERMINAÇÃO *POST MORTEM* DE ETANOL EM DIFERENTES TIPOS DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UMA METODOLOGIA ANALÍTICA POR HS-GC-FID EM CONTEXTO FORENSE

### Ficha Técnica

<b>Tipo de trabalho</b>	<b>Dissertação</b>
<b>Título</b>	<b>Determinação <i>post mortem</i> de etanol em diferentes tipos de amostras biológicas: desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica por HS-GC-FID em contexto forense</b>
<b>Autora</b>	<b>Ana Isabel Coutinho Guedes</b>
<b>Orientador</b>	<b>Professor Doutor Francisco Manuel Andrade Corte Real Gonçalves</b>
<b>Coorientadora</b>	<b>Mestre Carla Maria Pinto Monteiro</b>
<b>Identificação do Curso</b>	<b>2º Ciclo em Medicina Legal e Ciências Forenses</b>
<b>Área Científica</b>	<b>Química e Toxicologia Forenses</b>
<b>Ano</b>	<b>2020</b>

1 2  9 0

UNIVERSIDADE D  
COIMBRA



Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Medicina Legal e Ciências Forenses (Enquadramento Legal da Qualificação: Decreto-Lei n.º 74/2006 com as alterações induzidas pelo Decreto-Lei n.º 107/2008 e Portaria n.º 782/2009).

Dissertação elaborada sob orientação do Professor Doutor Francisco Corte Real e coorientação da Mestre Carla Monteiro.



*Aos meus Pais*





## **Agradecimentos**

Quero agradecer a todos os que com a sua ajuda, cooperação, apoio e paciência me possibilitaram a realização deste trabalho, em especial:

- Ao Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P., na pessoa do Presidente Professor Doutor Francisco Corte Real. Agradeço à instituição que me acolheu nesta etapa da minha vida académica e me proporcionou a possibilidade de realizar esta dissertação nas suas instalações.

- À Coordenadora do Gabinete de Estudos Avançados por delegação do Conselho Científico da FMUC e à Comissão de Ética da FMUC, por terem aprovado o meu plano de trabalho aqui apresentado e por terem disponibilizado toda a logística necessária para a realização desta dissertação.

- A todos os Docentes do 2º ciclo em Medicina Legal e Ciências Forenses, pelos conhecimentos transmitidos e competências partilhadas durante o mestrado.

- A todos os meus Colegas do 2º ciclo em Medicina Legal e Ciências Forenses que marcaram esta etapa da minha vida, obrigada pela amizade e pelos bons momentos passados.

- Ao meu Orientador, Professor Doutor Francisco Corte Real, agradeço pela partilha de novos conhecimentos e por todas as contribuições neste trabalho. O meu enorme e sincero agradecimento pela oportunidade que me deu em poder ingressar neste mestrado. Obrigada por toda a compreensão e conselhos. Agradeço ainda por ter aceite a orientação da minha dissertação.

- À minha Coorientadora, Mestre Carla Monteiro, um agradecimento especial por ter aceite a coorientação desta dissertação e pelo apoio na escolha do tema de dissertação que em muito elevou os meus conhecimentos científicos e a minha vontade de querer fazer mais e melhor. Agradeço ainda toda a sua disponibilidade, paciência e tempo que generosamente sempre me dispensou, por todo o apoio e incentivo, pelas críticas construtivas e pelos conselhos. Agradeço-lhe tudo o que me ensinou ao longo da realização desta dissertação, a atenção e a preocupação que sempre demonstrou para comigo. Aqui fica o meu sincero agradecimento pela forma como me recebeu na sua equipa de trabalho e me fez sentir parte dela, foi extremamente enriquecedor. Um enorme obrigada pela sua simpatia, pela sua capacidade de me fazer sentir à vontade, pelos momentos de descontração e essencialmente pela sua amizade.

- A todos os Profissionais do Serviço de Química e Toxicologia Forenses da Delegação Centro do INMLCF, I.P. por me terem acolhido e ajudado sempre que precisei. Obrigada pelo profissionalismo e companheirismo, obrigada por me integrarem no vosso meio de trabalho.

- À Técnica de Diagnóstico e Terapêutica D. Alda Claro, minha companheira de laboratório todos os dias, agradeço a amizade e os momentos de companheirismo que me proporcionou ao longo de um ano muito intenso. Sou lhe grata por todo o apoio que me deu na componente prática laboratorial, pelos conhecimentos partilhados e pelo incentivo.

- À Eva. Aquela *twin* que Coimbra me deu. O meu sincero obrigada por tudo! Pelo apoio incondicional e preocupação constante. Pelos teus conselhos, por dizeres sempre o que eu precisava de ouvir, pelas tuas palavras tranquilizantes e esperançosas ditas no momento certo e por me ouvires a desabafar ou a reclamar. Pelas tuas sugestões e críticas. Pela tua ajuda e companheirismo que me faziam encarar cada dia com mais motivação. Pela confiança, incentivo e força que sempre me inculciste. Obrigada por fazeres de tudo para que eu te desse um sorriso. Obrigada por não me deixares fracassar. Obrigada pelas mensagens e telefonemas infinitos. Obrigada por estares sempre lá, à minha espera. Obrigada por teres sido minha companheira, minha amiga, meu pilar. Obrigada pela tua amizade! Adoro-te de coração, sabes que foste, és e serás uma pessoa essencial na minha vida. Obrigada Coimbra, levo-vos prá vida!!!

- Aos meus Amigos agradeço pela compreensão da minha ausência, mas acima de tudo pela amizade sincera.

- À minha Família tenho que agradecer por tudo. Obrigada por todo o carinho, pelos conselhos, pela paciência, pelas preocupações, pelo apoio e pela compreensão.

- Por fim e em especial, agradeço aos meus Pais, a quem dedico esta dissertação. Obrigada pela motivação, pelo apoio incondicional, pelo amor e carinho que sempre me transmitiram. Obrigada por todos os incentivos, pelos valores transmitidos e por terem sempre acreditado em mim!!! Agradeço aos dois, por me apoiarem sempre em todos os momentos, por aturarem as minhas neuras, por serem compreensivos com a minha ausência e por me ouvirem a reclamar de tudo! Obrigada pela vossa presença, mesmo à distância. Obrigada pelos sacrifícios, pelo vosso exemplo de coragem, luta e otimismo, e por me mostrarem que apesar de todos os obstáculos que a vida nos apresenta jamais devemos baixar os braços. Sois a minha força e a minha fraqueza, sois o que faz de mim quem sou, em tudo de bom e de mau, sois a minha vida. A vós um enorme obrigada de coração por sempre permitirdes a luta e o concretizar dos meus sonhos, sois as pessoas mais importantes da minha vida, hoje e sempre!

Para que eu concluísse com sucesso este trabalho, foi imprescindível a ajuda e a colaboração de todos estes elementos, que me acompanharam durante esta etapa da minha vida académica. A vós devo um sincero agradecimento. Obrigada!

## Resumo

Embora o procedimento de ensaio para a quantificação do etanol seja um processo relativamente simples, segundo a literatura existem algumas dúvidas relativamente à origem do etanol determinado *post mortem*, uma vez que há a possibilidade de formação e eliminação *post mortem* desta substância, o que pode levar a uma incorreta interpretação dos resultados analíticos. Assim, como referido na literatura, é recomendado analisar para além do sangue outras matrizes biológicas. O uso de diferentes tipos de matrizes biológicas tem como intuito corroborar os resultados obtidos através da análise no sangue. O presente estudo propõe a análise simultânea do humor vítreo e da urina como matrizes biológicas complementares na determinação e quantificação de etanol em casos *post mortem*.

O objetivo deste estudo foi o desenvolvimento e a validação de uma metodologia analítica rápida e fiável para a deteção, identificação e quantificação de etanol simultaneamente em diferentes tipos de matrizes biológicas (humor vítreo, sangue e urina) em situações *post mortem*.

O presente trabalho experimental englobou duas partes distintas. Numa primeira parte, procedeu-se à otimização de um método cromatográfico, já existente no Serviço de Química e Toxicologia Forenses da Delegação do Centro (SQTF-DC) do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses (INMLCF, I.P.), para a determinação de etanol em amostras de sangue num cromatógrafo de gases Varian 450-GC com detetor de ionização de chama, acoplado a um injetor de *headspace* (HS-GC-FID). Para além da otimização das condições cromatográficas, houve a necessidade de alterar o padrão interno usualmente utilizado, o n-propanol, pelo acetonitrilo. A preparação dos *vials* foi realizada por meio da diluição de 100 µL da amostra de interesse em 1 mL de padrão interno (acetonitrilo a 0,1 g/L). Durante a análise cromatográfica foram utilizadas duas colunas capilares (VF-5ms e VF-624ms) com diferentes polaridades, de forma a garantir o cumprimento dos critérios de identificação recomendados para este tipo de análise, ou seja, que todas as substâncias em estudo fossem devidamente identificadas e distinguidas das restantes. Na segunda parte, efetuou-se a validação da metodologia analítica desenvolvida para a deteção, identificação e quantificação de etanol *post mortem* nas diferentes matrizes biológicas.

O etanol foi estudado numa gama de trabalho de 0,10-5,00 g/L e foram avaliados os parâmetros da seletividade, interferentes, modelo de calibração e linearidade, limiares analíticos, precisão, exatidão, arrastamento e estabilidade segundo a norma do *Scientific Working Group for Forensic Toxicology* (SWGTOX). A metodologia desenvolvida apresentou como principal vantagem a redução do intervalo de tempo de análise, permitindo a eluição do analito de interesse e do padrão interno em apenas 3 minutos. Esta metodologia demonstrou ser seletiva e linear na gama de trabalho estudada, com coeficientes de determinação superiores a 0,99. Relativamente aos limiares analíticos, o limite de deteção foi de 0,01 g/L e o limite de quantificação de 0,04 g/L. A metodologia também apresentou baixos níveis de CV para a precisão intermédia e para a repetibilidade e taxas de recuperação próximas de 100% o que demonstra ser uma metodologia precisa

Determinação *post mortem* de etanol em diferentes tipos de amostras biológicas:  
Desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica por HS-GC-FID em contexto forense

e exata. Todos os parâmetros de validação estudados apresentaram resultados considerados satisfatórios segundo a norma SWGTOX.

**Palavras-chave:** Etanol, Acetonitrilo, Matrizes biológicas, Validação, HS-GC-FID

## Abstract

Although the analysis procedure for the quantification of ethanol is a relatively simple process, according to the literature there are some doubts regarding the origin of the ethanol determined *post mortem*, since there is the possibility of formation and *post mortem* elimination of this substance, which can lead to an incorrect interpretation of the analytical results. Thus, as mentioned in the literature, it is recommended to analyze other biological matrices in addition to blood. The use of different types of alternative biological matrices is intended to corroborate the results obtained through blood analysis. The present study proposes the simultaneous analysis of vitreous humor and urine as complementary biological matrices in the determination and quantification of ethanol in *post mortem* cases.

The objective of this study was the development and validation of a fast and reliable analytical methodology for the detection, identification and quantification of ethanol simultaneously in different types of biological matrices (vitreous humor, blood and urine) in *post mortem* situations.

The present experimental work comprised two distinct parts. In the first part, we proceeded to the optimization of a chromatographic method, already existing in the Forensic Chemistry and Toxicology Service of the Center Delegation (SQTF-DC) of the National Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences (INMLCF, I.P.), for the determination of ethanol in blood samples in a Varian 450-GC gas chromatograph with flame ionization detector, coupled to a *headspace* injector (HS-GC-FID). In addition to the optimization of chromatographic conditions, there was a need to change the internal standard usually used, n-propanol, by acetonitrile. The preparation of *vials* was performed by diluting 100  $\mu\text{L}$  of the sample of interest in 1 mL of internal standard (acetonitrile at 0.1 g/L). During the chromatographic analysis, two capillary columns (VF-5ms and VF-624ms) with different polarities were used, in order to ensure compliance with the recommended identification criteria for this type of analysis, that is, that all substances under study were properly identified and distinguished from the rest. In the second part, the analytical methodology developed for the detection, identification and quantification of *post mortem* ethanol in the different biological matrices was validated.

Ethanol was studied in a working range of 0.10-5.00 g/L and the parameters of selectivity, interferences, calibration and linearity model, analytical thresholds, precision, accuracy, entrainment and stability were evaluated according to the Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX). The developed methodology presented as main advantage the reduction of the analysis time interval, allowing the elution of the analyte of interest and the internal standard in just 3 minutes. This methodology proved to be selective and linear in the studied work range, with determination coefficients greater than 0.99. Regarding the analytical thresholds, the detection limit was 0.01 g/L and the quantification limit was 0.04 g/L. The methodology also showed low levels of CV for intermediate precision and for repeatability and recovery rates close to 100%, which proves to be a precise and exact methodology. All validation parameters studied showed results considered satisfactory according to the SWGTOX standard.

Determinação *post mortem* de etanol em diferentes tipos de amostras biológicas:  
Desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica por HS-GC-FID em contexto forense

**Keywords:** Ethanol, Acetonitrile, Biological matrices, Validation, HS-GC-FID

## Índice

Agradecimentos .....	vii
Índice de figuras .....	xv
Índice de tabelas .....	xvii
Índice de equações.....	xix
Abreviaturas.....	xxi
Capítulo I – Introdução.....	1
1.1. Justificação do tema.....	3
1.2. Objetivos.....	4
Capítulo II – Revisão da literatura.....	5
2.1. Etanol.....	7
2.2. Toxicocinética do etanol.....	8
2.3. Efeitos fisiopatológicos e toxicodinâmicos do etanol .....	12
2.4. Interpretação dos resultados do etanol <i>post mortem</i> .....	13
2.5. Cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama e sistema de injeção de <i>headspace</i> (HS-GC-FID).....	18
2.5.1. Cromatografia gasosa (GC).....	18
2.5.2. Detetor de ionização de chama (FID) .....	20
2.5.3. Sistema de <i>headspace</i> (HS).....	21
2.6. Matrizes biológicas.....	22
2.7. Processamento das amostras.....	27
2.8. Validação da metodologia analítica.....	29
2.8.1. Introdução.....	29
2.8.2.1. Seletividade/Especificidade .....	30
2.8.2.2. Identificação de interferentes .....	31
2.8.2.3. Gama de trabalho .....	31
2.8.2.4. Modelo de calibração e linearidade .....	32
2.8.2.5. Limiares analíticos .....	33
2.8.2.5.1. Limite de deteção .....	34
2.8.2.5.2. Limite de quantificação .....	34
2.8.2.6. Precisão .....	34
2.8.2.7. Exatidão .....	36
2.8.2.8. Arrastamento ( <i>Carryover</i> ) .....	36
2.8.2.9. Estabilidade.....	37
Capítulo III – Trabalho experimental .....	39

3.1.	Introdução.....	41
3.2.	Material e métodos .....	41
3.2.1.	Amostras biológicas .....	41
3.2.2.	Padrões, reagentes e material .....	42
3.2.2.1.	Padrões.....	42
3.2.2.2.	Reagentes .....	42
3.2.2.3.	Material.....	42
3.2.3.	Equipamentos.....	43
3.2.3.1.	Aparelhos de uso comum.....	43
3.2.3.2.	Pipetas e doseadores .....	43
3.2.3.3.	Instrumentos analíticos .....	43
3.2.4.	Procedimento analítico .....	44
3.2.4.1.	Preparação das soluções .....	44
3.2.4.2.	Preparação das amostras de ensaio.....	47
3.2.4.3.	Preparação das retas de calibração .....	48
3.2.4.4.	Preparação dos Controlos de Qualidade Internos (CQI).....	49
	Capítulo IV – Resultados e discussão .....	51
4.1.	Introdução.....	53
4.2.	Alteração da metodologia analítica .....	53
4.3.	Desenvolvimento/otimização da metodologia cromatográfica .....	54
4.4.	Análise instrumental (HS-GC-FID) .....	62
4.5.	Identificação das substâncias.....	63
4.6.	Validação da metodologia analítica desenvolvida.....	64
	Capítulo V – Conclusões .....	85
	Capítulo VI – Referências bibliográficas .....	89
	Capítulo VII – Anexos.....	101
7.1.	Alteração da metodologia cromatográfica.....	103
7.2.	Validação da metodologia analítica.....	105
7.2.1.	Seletividade/Especificidade .....	105
7.2.2.	Identificação de interferentes .....	106
7.2.3.	Linearidade e modelo de calibração.....	109
7.2.4.	Limites analíticos: limite de deteção e limite de quantificação .....	111
7.2.5.	Precisão .....	113
7.2.6.	Exatidão.....	116
7.2.7.	Arrastamento ( <i>Carryover</i> ).....	118



## Índice de figuras

Figura 1 –	Estrutura química do etanol	7
Figura 2 –	Disposição do etanol no corpo, mostrando as quantidades relativas metabolizadas pela via oxidativa e não oxidativas e as excretadas na respiração, urina e suor	10
Figura 3 –	Esquema da metabolização e eliminação do etanol no organismo humano	11
Figura 4 –	Esquema do sistema de cromatografia gasosa	19
Figura 5 –	Seção transversal de um detetor de ionização de chama	21
Figura 6 –	A) Coeficientes de partição líquido/ar do etanol em água, sangue total e plasma em temperaturas de equilíbrio de 20-40°C e B) o logaritmo do coeficiente de partição e temperatura	48
Figura 7 –	Cromatogramas obtidos usando o primeiro programa de condições do <i>headspace</i> apresentado na tabela 6	55
Figura 8 –	Cromatogramas obtidos usando o segundo programa de condições do <i>headspace</i> apresentado na tabela 6	55
Figura 9 –	Cromatogramas obtidos usando o terceiro programa de condições do <i>headspace</i> apresentado na tabela 6	56
Figura 10 –	Cromatogramas obtidos usando a temperatura do injetor a 150°C	57
Figura 11 –	Cromatogramas obtidos usando a temperatura do injetor a 200°C	57
Figura 12 –	Cromatogramas obtidos usando a temperatura do injetor a 250°C	57
Figura 13 –	Cromatogramas obtidos usando a temperatura do forno a 40°C e com um fluxo das colunas pneumáticas a 2,5 mL/min	60
Figura 14 –	Cromatogramas obtidos usando a temperatura do forno a 40°C e com um fluxo das colunas pneumáticas a 3 mL/min	60
Figura 15 –	Cromatogramas obtidos usando a temperatura dos detetores a 150°C	61
Figura 16 –	Cromatogramas obtidos usando a temperatura dos detetores a 200°C	61
Figura 17 –	Cromatogramas obtidos usando a temperatura dos detetores a 250°C	61
Figura 18 –	Cromatogramas obtidos usando a temperatura dos detetores a 300°C	62
Figura 19 –	Cromatogramas representativos de um calibrador a 5,00 g/L	64
Figura 20 –	Cromatogramas obtidos para uma amostra de sangue não fortificada	68
Figura 21 –	Cromatogramas obtidos para uma amostra de sangue fortificada com etanol a 0,20 g/L	69
Figura 22 –	Reta de calibração para a coluna VF-5ms ( <i>front</i> )	72
Figura 23 –	Reta de calibração para a coluna VF-624ms ( <i>middle</i> )	72
Figura 24 –	Cromatogramas obtidos de um controlo a 0,49 g/L através do método utilizado na rotina do SQTF-DC para a determinação de etanol no sangue	104

Figura 25 – Cromatogramas obtidos para uma amostra de humor vítreo não fortificada	105
Figura 26 – Cromatogramas obtidos para uma amostra de humor vítreo fortificada	105
Figura 27 – Cromatogramas obtidos para uma amostra de urina não fortificada	105
Figura 28 – Cromatogramas obtidos para uma amostra de urina fortificada	106
Figura 29 – Cromatogramas da análise do Acetaldeído a 5 g/L	106
Figura 30 – Cromatogramas da análise do Acetato de etilo a 5 g/L	106
Figura 31 – Cromatogramas da análise da Acetona a 5 g/L	107
Figura 32 – Cromatogramas da análise do Éter dietílico a 5 g/L	107
Figura 33 – Cromatogramas da análise do Éter dietílico a 1 g/L	107
Figura 34 – Cromatogramas da análise do Isopropanol a 5 g/L	108
Figura 35 – Cromatogramas da análise do Metanol a 5 g/L	108
Figura 36 – Cromatogramas da análise do n-Butanol a 5 g/L	108
Figura 37 – Cromatogramas da análise do n-Propanol a 5 g/L	109
Figura 38 – Cromatogramas de uma amostra branco de reagentes injetada após um calibrador de 2,00 g/L	118
Figura 39 – Cromatogramas de uma amostra branco de reagentes injetada após um calibrador de 4,00 g/L	118
Figura 40 – Cromatogramas de uma amostra branco de reagentes injetada após um calibrador de 5,00 g/L	118

## Índice de tabelas

Tabela 1 –	Efeitos fisiológicos consequentes das diferentes concentrações de álcool no sangue	12
Tabela 2 –	Parâmetros de validação	30
Tabela 3 –	Principais características do sistema HS-GC-FID utilizado	43
Tabela 4 –	Preparação dos calibradores para a reta de calibração	49
Tabela 5 –	Preparação dos controlos de qualidade internos (CQI)	50
Tabela 6 –	Programas das condições do <i>headspace</i> utilizadas no desenvolvimento da presente metodologia analítica	54
Tabela 7 –	Resumo dos $t_R$ obtidos nas diferentes variações da temperatura do forno e do fluxo das colunas pneumáticas	59
Tabela 8 –	Tabela comparativa entre os principais parâmetros analíticos da metodologia de rotina do SQTf-DC e os da presente metodologia otimizada	63
Tabela 9 –	Tempos de retenção das substâncias em estudo	64
Tabela 10 –	Informação sobre as amostras de humor vítreo utilizadas para construir as <i>pools</i>	65
Tabela 11 –	Informação sobre as amostras de sangue utilizadas para construir as <i>pools</i>	66
Tabela 12 –	Informação sobre as amostras de urina utilizadas para construir as <i>pools</i>	67
Tabela 13 –	Resultados obtidos na análise das amostras não fortificadas para o estudo da seletividade	68
Tabela 14 –	Resultados obtidos na análise das amostras fortificadas para o estudo da seletividade	69
Tabela 15 –	Tempos de retenção relativos ( $t_{RR}$ ), em minutos, do etanol em cada uma das amostras nas diferentes matrizes biológicas	70
Tabela 16 –	Tempos de retenção das substâncias interferentes	71
Tabela 17 –	Preparação dos calibradores para o estudo da linearidade	73
Tabela 18 –	Resultados obtidos para a homocedasticidade das variâncias: Teste de Fisher	74
Tabela 19 –	Resultados obtidos no estudo da linearidade	76
Tabela 20 –	Preparação dos calibradores para o estudo dos limiares analíticos	76
Tabela 21 –	Resultados obtidos no estudo dos limiares analíticos	77
Tabela 22 –	Controlos para o estudo da repetibilidade	78
Tabela 23 –	Resumo dos resultados obtidos no estudo da repetibilidade	78
Tabela 24 –	Reta de calibração para o estudo da precisão intermédia e exatidão	79
Tabela 25 –	Controlos para o estudo da precisão intermédia e exatidão	79
Tabela 26 –	Tabela ANOVA (fator único)	80
Tabela 27 –	Cálculo das estimativas da precisão intermédia	80
Tabela 28 –	Resumo dos resultados obtidos no estudo da precisão intermédia	81
Tabela 29 –	Resumo dos resultados obtidos no estudo da exatidão	82
Tabela 30 –	Resultados obtidos no estudo da estabilidade	83

Tabela 31 –	Principais parâmetros cromatográficos do método utilizado na rotina do SQTf-DC no equipamento GCFI002	103
Tabela 32 –	Avaliação da homocedasticidade das variâncias	109
Tabela 33 –	Avaliação da homocedasticidade das variâncias: Teste de Fisher	109
Tabela 34 –	Estudo dos fatores de ponderação	110
Tabela 35 –	Resultados obtidos para o controlo baixo (0,10 g/L) na repetibilidade	113
Tabela 36 –	Resultados obtidos para o controlo médio (0,50 g/L) na repetibilidade	113
Tabela 37 –	Resultados obtidos para o controlo alto (1,20 g/L) na repetibilidade	114
Tabela 38 –	Resultados obtidos referentes à precisão intermédia	114
Tabela 39 –	Resultados obtidos referentes à precisão intermédia para o controlo de gama baixa (0,10 g/L)	114
Tabela 40 –	Resultados obtidos referentes à precisão intermédia para o controlo de gama média (0,50 g/L)	115
Tabela 41 –	Resultados obtidos referentes à precisão intermédia para o controlo de gama alta (1,20 g/L)	115
Tabela 42 –	Resultados obtidos referentes à exatidão para o controlo de gama baixa (0,10 g/L)	116
Tabela 43 –	Resultados obtidos referentes à exatidão para o controlo de gama média (0,50 g/L)	116
Tabela 44 –	Resultados obtidos referentes à exatidão para o controlo de gama alta (1,20 g/L)	117

## Índice de equações

Equação 1 –	Tempo de retenção relativo ( $t_{RR}$ )	63
Equação 2 –	Teste de Fisher: $F_{\text{experimental}}$	73
Equação 3 –	Cálculo do $F_{\text{crítico}}$	74
Equação 4 –	Cálculo do declive da reta (b)	74
Equação 5 –	Cálculo da ordenada na origem (a)	74
Equação 6 –	Erro relativo, em percentagem (ER %)	75
Equação 7 –	Coefficiente de determinação ( $r^2$ )	75
Equação 8 –	Cálculo do limite de deteção (LD)	77
Equação 9 –	Cálculo do limite de quantificação (LQ)	77
Equação 10 –	Recuperação diária ( $R_i$ )	81
Equação 11 –	Recuperação média ( $\bar{R}$ )	81
Equação 12 –	t de <i>student</i> : $t_{\text{experimental}}$	81
Equação 13 –	t de <i>student</i> $U_{\% \bar{R}}$	81
Equação 14 –	Cálculo de $U_{\bar{R}}$ , se $\bar{R}$ não é significativamente diferente de 100%	81
Equação 15 –	Cálculo de $U_{\bar{R}}$ , se $\bar{R}$ é significativamente diferente de 100%	81



## Abreviaturas

Acetil-CoA	Acetil-coenzima A
AD	Álcool desidrogenase
AE	Amostras de ensaio
ALD	Aldeído desidrogenase
AP	Amostras primárias
CoA	Coenzima A
CK	Ciclo de Krebs
COVs	Compostos orgânicos voláteis
CQI	Controlo de qualidade interno
CV	Coeficiente de variação
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
e.g.	Por exemplo, do latim <i>exempli gratia</i>
EEAG	Etil ésteres de ácidos gordos
EtG	Etilglicuronídeo
EtS	Etilsulfato
FID	Detetor de ionização de chama, do inglês <i>Flame ionization detector</i>
GC	Cromatografia gasosa, do inglês <i>Gas chromatography</i>
HS	<i>Headspace</i>
HS-GC-FID	Cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama e sistema de injeção de <i>headspace</i>
INMLCF, I.P.	Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LD	Limite de deteção
LQ	Limite de quantificação
NAD <sup>+</sup>	Dinucleótido de nicotinamida e adenina, do inglês <i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido, do inglês <i>Nicotinamide adenine dinucleotide reduced</i>
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido, do inglês <i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NaF	Fluoreto de sódio

PEth	Fosfatidiletanol
r	Coeficiente de correlação
r <sup>2</sup>	Coeficiente de determinação
rpm	Rotações por minuto
RPM	Redistribuição <i>post mortem</i>
STARLIMS	<i>Laboratory Information Management System</i>
SFA	Síndrome fetal alcoólica
SNC	Sistema Nervoso Central
SOM	Sistema de oxidação microssomal
SQTF	Serviço de Química e Toxicologia Forenses
SQTF-DC	Serviço de Química e Toxicologia Forenses da Delegação do Centro
SWGTOX	<i>Scientific Working standard Group for Forensic Toxicology</i>
TE	Tomas de ensaio
t <sub>R</sub>	Tempo de retenção
t <sub>RR</sub>	Tempo de retenção relativo
UV	Ultravioleta



# **Capítulo I – Introdução**



## 1. Introdução

### 1.1. Justificação do tema

Atualmente, o etanol é a substância psicoativa mais consumida em todo o mundo e tal facto deve-se à sua legalidade, ao baixo custo e à facilidade de acesso na aquisição. O consumo desta substância tanto pode desencadear acidentes de trabalho ou acidentes de viação, como crimes de violência doméstica, agressões sexuais e homicídios, sendo que da intoxicação alcoólica podem ainda resultar o coma ou a morte. Devido aos efeitos legais decorrentes, a quantificação de etanol é a análise mais requerida ao Serviço de Química e Toxicologia Forenses (SQTF) do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses (INMLCF, I.P.). Por conseguinte, o etanol continua a ser a substância psicoativa mais comumente detetada, nomeadamente em análises *post mortem*.

Geralmente, a análise do etanol é um processo relativamente simples, no entanto diversos estudos relatam que existem algumas dúvidas em relação à origem do etanol determinado *post mortem*. Isto deve-se ao facto de haver a possibilidade de produção ou eliminação *post mortem* desta substância, o que pode induzir a uma incorreta interpretação dos resultados analíticos. Existem diversos fatores que devem ser tomados em consideração para uma mais correta interpretação das concentrações de etanol *post mortem*, incluindo a história do caso, o intervalo entre a morte e a análise, o tipo e a localização das amostras recolhidas, a síntese e a redistribuição *post mortem* do etanol, os fatores ambientais em redor do cadáver – fauna e flora, a condição ou decomposição do cadáver e a existência de trauma *ante mortem*. Desta forma, é fundamental distinguir entre o consumo *ante mortem* e a produção de etanol *post mortem*. Para tal, é essencial analisar diversas matrizes de forma a corroborar os resultados obtidos.

Relativamente às matrizes biológicas utilizadas no presente estudo, – humor vítreo, sangue e urina – estas foram selecionadas segundo a sua relevância em contexto forense, a sua representatividade num laboratório de toxicologia forense e a complementaridade relativamente à análise efetuada. De forma a interpretar inequivocamente a origem do etanol é recomendada a sua determinação em diferentes matrizes biológicas. Devido a determinadas características específicas como as suas localizações anatómicas e a menor probabilidade de contaminação microbiana, o humor vítreo e a urina, são as matrizes comumente utilizadas para corroborar os valores obtidos no sangue. A importância da utilização de diferentes amostras biológicas na interpretação dos resultados é a determinação da origem do etanol detetado através da sua presença no sangue e simultaneamente presença ou ausência nas diferentes matrizes biológicas analisadas.

O interesse pela otimização do método cromatográfico usualmente utilizado no SQTF da Delegação do Centro do INMLCF, I.P. deve-se ao elevado número de solicitações submetidas ao mesmo para a realização de análises toxicológicas para a quantificação de etanol em casos de amostras *post mortem*. Tendo em conta a responsabilidade de que se revestem os resultados destas análises, é fundamental o desenvolvimento de metodologias analíticas adaptadas a estes casos.

## 1.2. Objetivos

O objetivo geral do presente estudo foi a otimização e a validação de uma metodologia analítica que permitisse a deteção e a quantificação de etanol simultaneamente em diferentes matrizes biológicas (humor vítreo, sangue e urina) em situações *post mortem*. Para o desenvolvimento da respetiva metodologia utilizou-se um cromatógrafo de gases equipado com um detetor de ionização de chama acoplado a um injetor *headspace* (HS-GC-FID). A escolha deste equipamento tem como justificação o facto de ser a tecnologia utilizada no laboratório do Serviço de Química e Toxicologia Forenses da Delegação do Centro (SQTF-DC) do INMLCF, I.P. para a realização de análises de alcoolemia, bem como por ser um equipamento comumente recomendado na literatura para a análise de substâncias voláteis.

Para alcançar o objetivo principal, incidiu-se sobre os seguintes objetivos parciais:

- Alteração do padrão interno usualmente utilizado no SQTF-DC para a quantificação de etanol em amostras de sangue;
- Otimização de um método cromatográfico, já existente no SQTF-DC, para a determinação de etanol em amostras de sangue;
- Validação da metodologia analítica para a determinação e quantificação *post mortem* de etanol nos diferentes tipos de matrizes biológicas por HS-GC-FID.

## **Capítulo II – Revisão da literatura**



## 2. Revisão da literatura

### 2.1. Etanol

O etanol também designado por álcool etílico ou simplesmente álcool é a substância psicoativa mais consumida em todo o mundo, estando presente no cotidiano do Homem e fazendo parte da História da Humanidade desde a antiguidade (1–8). Atualmente o elevado consumo de etanol deve-se à sua legalidade, ao seu baixo custo e à facilidade de acesso na sua aquisição. O consumo desta substância é favorecido por comemorações familiares e sociais, rituais, festividade, eventos culturais para além de ocasiões de refeição. O etanol é formado pela fermentação do açúcar (glicose) e é o principal composto de todas as bebidas alcoólicas (1,2,7,9–21).

Relativamente ao etanol, a sua fórmula química é  $C_2H_5OH$ , sendo classificado como um álcool devido à presença do grupo hidroxilo (-OH). Existem para além do etanol outros álcoois com interesse forense como o metanol, o isopropanol, o n-propanol e o n-butanol. Dentro da classe química dos álcoois, o etanol é a substância mais conhecida e mais frequentemente encontrada em contexto forense (1,2,7,9,18,21,22).

As propriedades químicas do etanol são essencialmente determinadas pela existência de um grupo hidroxilo numa extremidade e pelo curto comprimento da cadeia alifática simples de dois carbonos, figura 1.

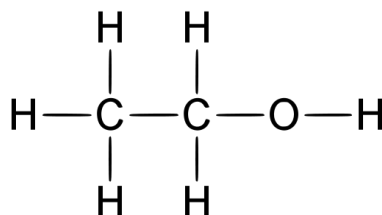


Figura 1 - Estrutura química do etanol (adaptado de (20))

O etanol é um líquido límpido e incolor com um odor e sabor característicos, que ebului à temperatura de aproximadamente  $78^\circ\text{C}$  e funde a  $-115^\circ\text{C}$ . Esta substância é totalmente solúvel em água, álcoois, ésteres e hidrocarbonetos halogenados e apresenta elevada volatilidade. É uma molécula pequena e de baixo peso molecular (46,07 g/mol), ligeiramente polar pelo que atravessa facilmente as membranas biológicas por difusão passiva (1,3,6,7,9,18,21–28).

Devido ao elevado número de solicitações para a realização de exames toxicológicos para o etanol, os laboratórios de toxicologia forense possuem um método relativamente rápido e fiável, no entanto a interpretação dos resultados é complexa devido à possibilidade da sua formação ou perda *post mortem*. Estas diminuições das concentrações de etanol são amplamente atribuídas à evaporação, à oxidação química ou à ação microbiana. Enquanto que os aumentos se devem em grande parte à conversão microbiana de substratos em etanol (1,25,27,29–42).

## **2.2. Toxicocinética do etanol**

A toxicocinética de uma substância descreve a evolução da sua concentração sanguínea e tecidual ao longo do tempo, incluindo as fases de absorção, distribuição, metabolização e eliminação (1,3,22,43).

### **2.2.1. Absorção**

A absorção é o processo pelo qual a substância passa do local de administração para a corrente sanguínea. Dado que existem diversas vias de administração, como a inalação, a ingestão e a injeção, as taxas de absorção e as suas respetivas extensões são diferentes para uma mesma substância. Logo, a via de administração é um fator relevante na fase da absorção. No caso do etanol, este pode ser administrado por via de inalação respiratória visto estar presente em muitos produtos do dia-a-dia como produtos de limpeza, detergentes, produtos de higiene, cosméticos, desinfetantes, tintas, vernizes entre outros, pode também ser administrado via penetração dérmica através da colocação de perfumes, no entanto, a via mais comumente utilizada para a administração de etanol é a via oral (1,2,6,9,18,21–23,43).

A absorção do etanol pode ocorrer desde as mucosas da cavidade oral até ao reto, contudo, o principal local de absorção do etanol é no intestino delgado. Efetivamente, a absorção do etanol ocorre no trato gastrointestinal, onde cerca de 20% da captação ocorre no estômago e a restante na porção proximal do intestino delgado, nomeadamente no duodeno e no jejuno proximal. A absorção no intestino delgado é realizada de forma mais rápida comparativamente à do estômago, devido ao seu elevado peristaltismo, à elevada área de superfície derivada das suas microvilosidades, ao elevado fluxo sanguíneo e ao seu pH ser ideal para a absorção deste tipo de substância (1–3,6–9,17,18,21–24,26,32,43–46).

Porém, existem diversos fatores que podem reduzir ou acelerar a velocidade de absorção do etanol. O consumo simultâneo de alimentos ou a presença destes no estômago pode afetar a taxa de absorção do etanol, uma vez que atrasa o esvaziamento gástrico e consequentemente diminui a taxa de absorção do etanol. Por outro lado, a ingestão de bebidas alcoólicas sem alimentos no estômago, o aumento da motilidade gastrointestinal e o elevado teor alcoólico da bebida acelerarão a taxa de absorção de etanol (1–4,6,8,9,18,22–24,26,44–46).

### **2.2.2. Distribuição**

Após ter entrado na circulação sanguínea durante a fase de absorção, o etanol é distribuído para todos os órgãos, fluidos e tecidos corporais. Devido ao facto de ser uma molécula pequena, com baixo peso molecular e elevada solubilidade em água, o etanol atravessa facilmente as membranas biológicas por difusão passiva (1,2,23–25,32,47).

O etanol sofre metabolismo de primeira passagem, isto é, após ser absorvido no sangue venoso o etanol chega ao fígado através do sistema porta hepático, e só posteriormente entra na circulação sistémica. Este efeito de primeira passagem tem como



objetivo reduzir ou diminuir a concentração do etanol antes que este atinja a circulação sistêmica, diminuindo conseqüentemente a biodisponibilidade deste e os efeitos adversos. Assim, após esta metabolização apenas uma pequena quantidade de etanol vai ser transportada a partir do fígado para o resto do corpo (1,2,4,9,21,23,24,43).

Já na circulação sistêmica, a distribuição do etanol é realizada de forma homogênea de acordo com o teor água que os diferentes órgãos e tecidos possuem. Assim, os órgãos e tecidos mais afetados são o fígado, o cérebro, os pulmões, os rins, o coração e os músculos (2,7,9,23–25,32,40,43,47,48). Após a sua distribuição, ocorre o equilíbrio entre a concentração de etanol no sangue e nos diferentes órgãos e tecidos. Este equilíbrio depende tanto de fatores fisiológicos como o gênero, a idade e o peso corporal, como das propriedades físico-químicas da substância, como o tamanho molecular da substância, a dose ingerida, o coeficiente de partição da substância entre o sangue e a outra matriz biológica e a extensão da ligação da substância às proteínas plasmáticas. Nos órgãos e tecidos com elevada taxa de fluxo sanguíneo como o fígado, o cérebro e os rins este equilíbrio ocorre rapidamente, ao contrário do músculo-esquelético onde o equilíbrio demora mais tempo (2–4,7,18,23,43,45,47).

Apesar da maioria das substâncias tóxicas se ligarem a proteínas plasmáticas com afinidade suficiente para que haja a remoção da porção referente aos efeitos adversos, tal não se verifica com o etanol. A ausência de ligação entre o etanol e estas biomoléculas facilita a sua passagem através das membranas celulares e possibilita a manifestação total da sua atividade biológica com efeitos adversos. Exemplo disso é a difusão através da barreira hematoencefálica, onde o etanol atinge rapidamente o sistema nervoso central (SNC). Esta sua distribuição tecidual faz com que haja uma correlação entre os níveis plasmáticos do etanol e o estado comportamental do indivíduo (1,2,6,7,17,18,21,23–25,43).

### **2.2.3. Metabolização**

A principal via de metabolização do etanol é oxidativa e ocorre principalmente no fígado através da ação de vários processos bioquímicos e atividade enzimática. Esta via leva à formação de acetaldeído, ácido acético, dióxido de carbono e água. Geralmente, o etanol é removido do organismo humano através do metabolismo oxidativo sendo o restante excretado inalterado no suor, urina e ar expirado. No entanto, existem outras vias menores de metabolização do etanol, também hepáticas, mas não oxidativas. O resultado dessas vias não oxidativas é essencialmente etilglicuronídeo (EtG), etilsulfato (EtS), fosfatidiletanol (PEth) e etil ésteres de ácidos gordos (EEAG) (1–3,6,7,9,17,18,21–23,26,32,43–46,49), como apresentado na figura 2.

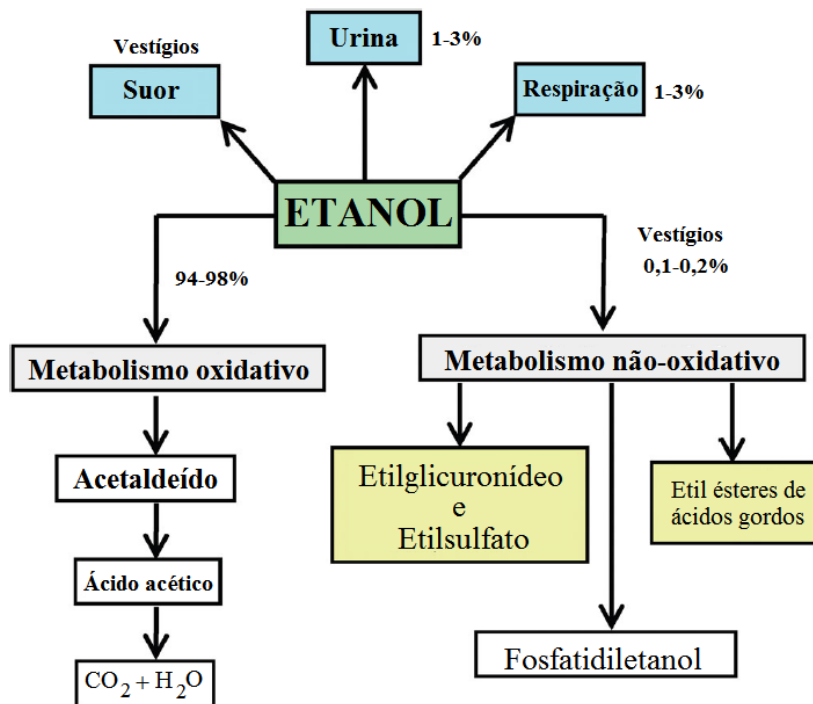


Figura 2 - Disposição do etanol no corpo, mostrando as quantidades relativas metabolizadas pela via oxidativa e não oxidativas e as excretadas na respiração, urina e suor (adaptado de (23))

O metabolismo oxidativo do etanol pode ser dividido em três etapas, (1) oxidação do etanol em acetaldeído; (2) oxidação do acetaldeído em ácido acético e (3) oxidação do ácido acético em dióxido de carbono e água, figura 3.

A primeira etapa, que consiste na conversão do etanol em acetaldeído, é catalisada pela enzima álcool desidrogenase (AD). Esta enzima oxida diversos álcoois primários e secundários, provenientes da ingestão ou da produção endógena. O AD está localizado maioritariamente no citosol hepático, no entanto pode também ser encontrado noutros órgãos. Durante a oxidação do etanol pelo AD, a coenzima dinucleótido de nicotinamida e adenina ( $\text{NAD}^+$ ) é reduzida a NADH (1-4,6,7,17,18,21-24,32,44,46,49).

Para além da principal via metabólica oxidativa mencionada, existem outras duas vias enzimáticas que geralmente ocorrem quando a atividade da AD se encontra saturada sendo elas o sistema de oxidação microsossomal (SOM) pelo citocromo P450 e a catalase. Todas estas vias produzem acetaldeído a partir da oxidação do etanol. O SOM é a segunda via metabólica oxidativa mais relevante e ocorre no retículo endoplasmático. Este processo de oxidação do etanol em acetaldeído requer o envolvimento das isoformas do citocromo P450 e do fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido (NADPH) como cofator. A terceira via metabólica oxidativa ocorre por meio da enzima catalase, uma heme proteína que se encontra nos corpos celulares designados peroxissomas. Para que a reação de oxidação do etanol prossiga através desta via, é necessária a presença de peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). No entanto, a capacidade dos hepatócitos produzirem  $\text{H}_2\text{O}_2$  é reduzida, o que torna a atuação desta via limitada (1,2,4,7,18,21-24,32,44).

Na segunda etapa, após a formação do acetaldeído resultante da primeira etapa de oxidação por meio das três vias metabólicas descritas segue-se a conversão do acetaldeído em ácido acético. Dado que o acetaldeído é uma substância mais tóxica que o etanol, ele é rapidamente oxidado em ácido acético pela enzima aldeído desidrogenase (ALD). Tal como na primeira etapa, a oxidação do acetaldeído em ácido acético requer a presença do cofator coenzima dinucleótido de nicotinamida e adenina ( $\text{NAD}^+$ ) na forma oxidada que será convertida na sua forma reduzida ( $\text{NADH}$ ). O ALD catalisa estas reações nas mitocôndrias das células do fígado, apesar de estar presente noutras células e tecidos (1,3,4,6,7,17,18,21–24,32,44,49).

O ácido acético formado é transportado através da corrente sanguínea para os órgãos e tecidos periféricos onde será oxidado. Na mitocôndria desses órgãos e tecidos, o ácido acético vai-se combinar com a coenzima A (CoA) originando acetilcoenzima A (acetil-CoA) que posteriormente entrará no ciclo de Krebs (CK) e será oxidado dando origem a dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) e água ( $\text{H}_2\text{O}$ ) (1,3,4,6,7,9,18,23,24,32,44).

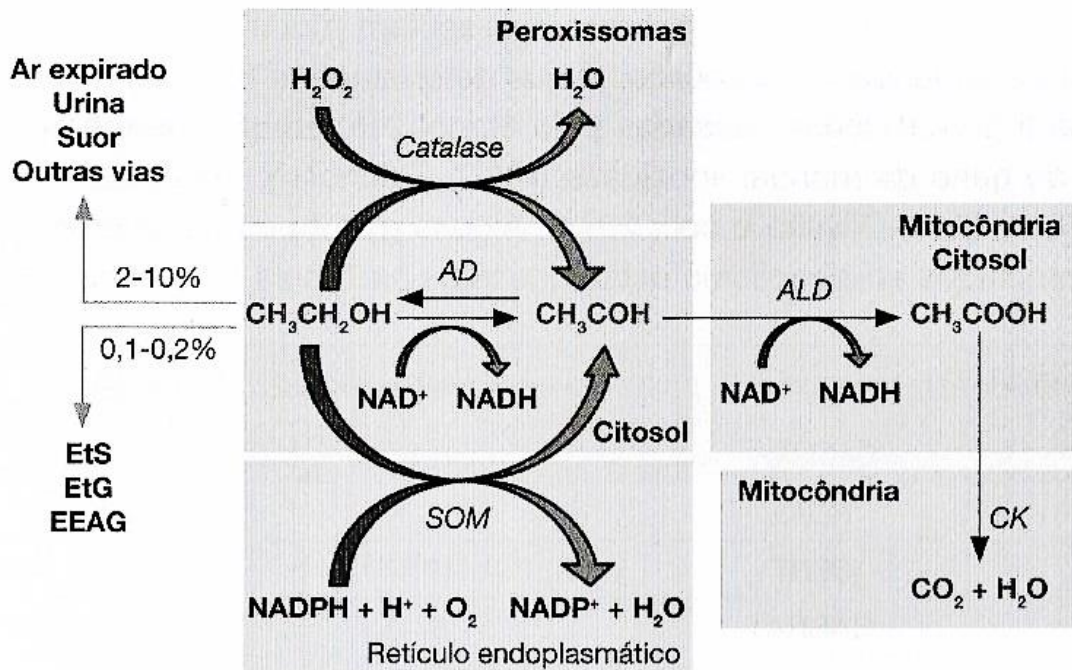


Figura 3 - Esquema da metabolização e eliminação do etanol no organismo humano (adaptado de (7))

#### 2.2.4. Eliminação

Após o consumo de bebidas alcoólicas, cerca de 90-98% do etanol é eliminado segundo o metabolismo oxidativo hepático descrito anteriormente, uma pequena percentagem é excretada na forma inalterada essencialmente através da respiração, urina e suor enquanto o restante etanol ingerido sofre reações de fase II no fígado. Estas reações de fase II envolvem reações de conjugação e originam diversos metabolitos não oxidativos como o EtS, o EtG, o EtH e os EEAG (4,7,9,18,21,23,24,34,43,49).

Existe uma variabilidade de fatores genéticos e ambientais que alteram a taxa de eliminação do etanol como o sexo, a idade, a raça, o estado nutricional, a prática de exercício físico, a coadministração de droga ou fármacos, entre outros (4,24,45).

### 2.3. Efeitos fisiopatológicos e toxicodinâmicos do etanol

A toxicodinâmica de uma substância refere-se à relação entre a dose administrada e a resposta toxicológica observada. No caso do etanol, este atua não só como um depressor do SNC como também noutros sistemas fisiológicos, sendo o grau de afetação nos diferentes sistemas dependente da dose administrada (1,3,4,6,9,10,17,21,34,43,46).

O etanol produz diversos efeitos comportamentais nos seres humanos que variam entre o efeito sedativo (e.g. diminuição da atividade e indução do sono) e o efeito estimulante. Alguns dos possíveis efeitos fisiológicos consequentes das diferentes concentrações de álcool no sangue estão apresentados na tabela 1 (3,4,20,23,44).

Tabela 1 - Efeitos fisiológicos consequentes das diferentes concentrações de álcool no sangue (adaptado de (44))

Concentração de álcool no sangue (g/L)	Efeitos fisiopatológicos
0,10 – 0,50	Alterações na personalidade, como o aumento do sentido de humor, aumento da interação social e da capacidade de conversação. Alívio da ansiedade, um estado de euforia leve associado ao humor, aumento do nível de confiança, desinibições e maior capacidade de resposta em situações de conflito.
0,80 – 1,00	Com o aumento da concentração, os efeitos anteriormente mencionados tornam-se mais evidentes, comprometendo as funções cognitivas e motoras.
1,50 – 2,00	Arrastamento da fala, aumento do tempo de reação, incoordenação dos movimentos musculares e ataxia acentuada. Há um aumento do comprometimento das funções cognitivas, motoras e sensoriais, nomeadamente ao nível da visão, diminuição da sensação de dor, diminuição da concentração e da memória, podendo ocorrer “apagões” onde o indivíduo pós-intoxicação não tem qualquer memória dos episódios que ocorreram durante a intoxicação.

**Tabela 1- Efeitos fisiológicos consequentes das diferentes concentrações de álcool no sangue (adaptado de (44)) (continuação)**

<b>3,00 – 4,00</b>	É alcançado o nível anestésico e são verificados sintomas de intoxicação alcoólica, incontinência, depressão respiratória, hipotermia, diminuição na resposta a estímulos, mudanças rápidas de humor. É neste nível que pode surgir o vômito e o estado de coma.
<b>≥ 5,00</b>	Pode ser atingida a morte através da paralisia dos centros respiratórios no tronco cerebral ou pela asfixia por inalação do vômito.

Apesar dos efeitos descritos, todos os indivíduos reagem de maneira diferente à mesma concentração de etanol devido às variações de fatores individuais, genéticos e ambientais (1–4,6,9,10,17,18,20,21,23,44).

Para além dos efeitos referidos, a ingestão de etanol pode ainda manifestar-se em diversos órgãos e sistemas do indivíduo. Um dos órgãos mais afetado pelo consumo de etanol é o fígado, dado ser o local de metabolização desta substância. Relativamente aos sistemas, os mais afetados são o neurológico, o renal, o gastrointestinal, o dermatológico, o cardiovascular, o nutricional, o músculo-esquelético, o hematológico, o imunológico, o reprodutivo e o endócrino. A ingestão abusiva e por longos períodos de tempo leva a uma série de problemas de saúde em todos estes sistemas (1,2,4,7,24,44,45). O consumo de etanol também aumenta a probabilidade de um indivíduo desenvolver neoplasias, nomeadamente a neoplasia da boca, do esófago, do fígado, do pâncreas, do cólon, do reto, do estômago, da próstata, da mama e da tireoide (7,44,45).

Em relação à gravidez, os efeitos toxicológicos do etanol e dos seus metabolitos não se manifestam somente no indivíduo que ingere a substância como também nos fetos. Dado que o etanol tem a capacidade de atravessar a barreira placentária, atinge o sistema nervoso fetal e promove a síndrome fetal alcoólica (SFA) em filhos de mães consumidoras desta substância (1,2,7,17,18).

## **2.4. Interpretação dos resultados do etanol *post mortem***

A determinação da concentração de etanol no sangue é regularmente utilizada como evidência judicial fazendo parte de diversas investigações forenses. Assim, a concentração de etanol incluída na investigação deve ser devidamente determinada e interpretada, uma vez que esta pode ser um fator causal ou contributivo do crime. No entanto, a interpretação dos resultados obtidos apresenta-se como uma tarefa difícil principalmente quando a amostra é precedente de cadáveres. Dado que existem diferentes origens possíveis para a formação de etanol detetado *post mortem*, esta é uma variável relevante que deve ser considerada na interpretação dos resultados. O etanol detetado *post mortem* pode ser resultante do consumo *ante mortem*, ou seja, da ingestão de etanol após

o consumo de bebidas alcoólicas ou da produção *post mortem* no organismo ou *in vitro* por fermentação microbiana. Em raras situações, o etanol detetado *post mortem* pode ter origem na produção endógena de etanol *ante mortem*. Nestas situações o etanol é produzido endogenamente *in vivo*, sob determinadas condições, como por exemplo infeções ou devido à administração de uma solução intravenosa de glicose (25,27,30,32,34,39,40,50,51).

De acordo com a literatura, existem várias formas de distinguir a origem do etanol como a análise microbiológica das amostras, a análise de outros compostos voláteis produzidos *post mortem* e a determinação de etanol em diferentes matrizes biológicas. Independentemente da análise realizada, tem sido proposto o estudo simultâneo de diversos critérios que auxiliam na determinação da origem do etanol *post mortem* determinado, principalmente nos cadáveres em decomposição. Isto porque as dificuldades na interpretação aumentam com o avançar do estado de decomposição do cadáver. Para distinguir entre a ingestão *ante mortem* de etanol ou a sua síntese endógena é necessário avaliar e correlacionar os seguintes critérios: história do caso, condição das amostras, tipos de micro-organismos presentes, redistribuição *post mortem* de etanol em diferentes matrizes biológicas e a presença de outros compostos voláteis (25,32,52,53).

#### - História do caso

Este critério inclui toda a informação credível da vítima, ou seja, informações pessoais, a rotina diária, se era consumidora ou não de bebidas alcoólicas, informações sobre as ações da vítima horas antes da sua morte, as circunstâncias da morte, os achados autópticos, o historial clínico (se aplicável), entre outros. Estes fatores fazem deste critério o mais importante na distinção da origem do etanol, no entanto nem sempre é possível obter estas informações (39,41,53–56).

#### - Condição das amostras

De forma a obter conclusões válidas acerca dos resultados obtidos na análise do etanol *post mortem*, é relevante ter em consideração a confiabilidade das amostras, assim como o estado do cadáver, por exemplo a indicação se estava queimado, imerso ou com alterações da decomposição cadavérica (9,50,55,57,58). A decomposição cadavérica é um processo que consiste na degradação de um cadáver nos seus respetivos constituintes básicos através da destruição dos tecidos moles pela ação de diversos seres vivos, essencialmente micro-organismos e animais. A complexidade inerente a este processo deve-se ao facto de não haver dois indivíduos iguais nem dois processos de decomposição iguais. Sendo por isso este processo um dos maiores inimigos dos peritos forenses, dado que dificulta a recolha e interpretação dos vestígios (1,27,33,35,39,41,50,51,57,59–67).

Após a recolha das amostras, as condições em que estas se encontram e o seu armazenamento são fatores que devem ser tidos em consideração, uma vez que se não forem realizados os procedimentos essenciais à sua preservação, estas tendem a deteriorar-se. Para evitar ou pelo menos prevenir essa deterioração, as amostras devem ser refrigeradas e armazenadas em tubos com conservante, para impedir a síntese microbiana de etanol *post mortem in vitro* (9,25,32,35,40,41,48,50,56,67).

De forma a evitar a síntese endógena de etanol em amostras *post mortem* é aconselhável a adição de fluoreto de sódio (NaF) às mesmas. A concentração de NaF adicionada varia entre 1 a 5% do volume total da amostra, sendo extremamente essencial na preservação de amostras em casos suspeitos de pacientes diabéticos, de elevadas concentrações de glicose no sangue *peri mortem*, de elevadas concentrações de micro-organismos, de administração de glicose *ante mortem* ou de infeções do tipo peritonite ou septicemia. Para além da adição deste conservante, as amostras *post mortem* devem ser armazenadas a baixas temperaturas, comumente entre os 4°C-5°C, a fim de diminuir a taxa de metabolização microbiana (7,16,28,29,36,39,40,42,44,47,48,50,54,56,57,67,68).

#### - Tipos de micro-organismos presentes

Existem diversas espécies de micro-organismos, nomeadamente bactérias, leveduras e fungos, capazes de sintetizar etanol endógeno, contudo as suas taxas de produção variam conforme as condições do meio. Alguns destes micro-organismos encontram-se presentes no organismo da vítima, existindo, no entanto, outros micro-organismos que habitam no ambiente circundante do cadáver que também são capazes de produzir etanol e outros compostos voláteis (1,7,9,16,32,36,38,40,41,47,48,56,69,70).

*In vivo*, existem vários micro-organismos invasores com funções destrutivas, como vírus, bactérias e parasitas, que são eliminados pelos sistemas de defesa do corpo humano, nomeadamente o sistema imunitário. Logo após a morte, alguns desses sistemas de defesa ainda continuam em funcionamento, mas apenas por um curto período de tempo. A partir do momento em que a temperatura corporal atinge  $\pm 5^{\circ}\text{C}$ , os micro-organismos sobreviventes aos sistemas de defesa começam a multiplicar-se e há a possibilidade de se dissiparem para os vários órgãos e tecidos do cadáver. Após estas invasões microbianas, os micro-organismos aeróbios esgotam o oxigénio presente nos tecidos originando uma redução do oxigénio disponível, criando-se consequentemente condições favoráveis ao desenvolvimento de micro-organismos anaeróbios. Assim sendo, a flora bacteriana varia de acordo com o intervalo *post mortem*, onde inicialmente estão presentes micro-organismos aeróbios e após o consumo do oxigénio, predominam as populações de micro-organismos anaeróbios (7,9,16,38,41,50,59,69–71).

Uma vez que a maioria dos micro-organismos é heterotrófica, estes necessitam de vários substratos e fontes de energia para a sua subsistência. Existem diversas substâncias que podem servir como substrato para esses micro-organismos, como os hidratos de carbono, os aminoácidos e os lípidos. Também existem outras substâncias, presentes em menores quantidades, que podem igualmente ser utilizadas como substratos incluindo, entre outros, galactose, glicerol, glicogénio, glicóis, lactato, lactose, maltose, manitol, piruvato, ribose, sacarose. O etanol *post mortem* pode ser produzido a partir de diversos substratos disponíveis *post mortem*, ainda que com taxas e rendimentos diferentes (7,9,16,22,23,27,29,31,32,36,38–42,47,50,52,54,69,72).

Relativamente à atividade microbiana esta tanto pode originar aumento da concentração de etanol, através da sua síntese endógena, como pode diminuir a concentração de etanol, uma vez que existem micro-organismos capazes de utilizar o

etanol como substrato. Geralmente, quando existem elevadas concentrações de etanol *ante mortem*, ocorre uma subsequente queda *post mortem* derivada do uso de etanol como substrato, posteriormente a esta diminuição dos níveis de etanol pode haver um novo aumento relativo à síntese endógena. Sobretudo nestes casos, a interpretação dos resultados torna-se um obstáculo extremamente desafiante para o toxicologista forense (16,27,32,33,38–40,47,50,56,69,70).

#### - Redistribuição *post mortem* de etanol em diferentes matrizes biológicas

Na toxicologia forense, a gravidade de uma intoxicação é determinada com base na concentração sanguínea da substância em estudo, podendo esta apresentar níveis terapêuticos, tóxicos ou letais. Apesar dessa determinação *in vivo* ser possível, isto é, as concentrações sanguíneas permitem a avaliação da concentração administrada, nos casos *post mortem* isso não se verifica. Embora a preferência da seleção do sangue para as análises toxicológicas, nem sempre as concentrações *post mortem* obtidas nesta matriz refletem as concentrações ante ou *peri mortem*, devido ao movimento da substância após a morte. Este fenómeno é designado de redistribuição *post mortem* (RPM) e dificulta imenso a interpretação dos resultados *post mortem*. Esse movimento poderá alterar as concentrações sanguíneas do analito, principal objetivo das análises quantitativas. Uma vez que os mecanismos envolvidos na RPM são complexos e pouco compreendidos, recomenda-se a análise de amostras com diferentes localizações anatómicas para que possa ser realizada uma comparação e, conseqüentemente, detetar uma possível RPM e evitar erros na interpretação dos resultados (5,29,32,39,43,47,50,52,58,68,70,73–75).

A RPM de etanol é um motivo causador das variações nas concentrações de etanol nas diferentes amostras. Esta redistribuição pode ser favorecida pela difusão *post mortem* de etanol do estômago, presença de lesões traumáticas, episódios de aspiração do vômito, alterações posturais, transporte do cadáver ou movimento contínuo do sangue dentro dos vasos sanguíneos. Nestes casos o sangue recolhido pode originar resultados erróneos dada a elevada probabilidade de contaminação (25,29,32,37,41,47,52,58).

O etanol sofre redistribuição principalmente a partir do trato gastrointestinal e do fígado. Nestes órgãos a RPM pode ocorrer através dois mecanismos distintos: a difusão através dos vasos sanguíneos ou a difusão para os órgãos vizinhos (47,52,58,75).

A observação de uma distribuição atípica, isto é, diferenças significativas nas concentrações de etanol determinadas em dois ou mais órgãos ou tecidos pode ser sugestiva de síntese endógena de etanol. A aplicação deste critério requer a análise de diversas matrizes biológicas, sendo as preferenciais o sangue, o humor vítreo, a urina e a medula óssea. Diversos estudos diferenciam a origem do etanol segundo a sua presença no sangue e presença ou ausência nas diferentes matrizes alternativas. A síntese endógena de etanol foi identificada em casos que demonstraram concentrações positivas de etanol no sangue e negativas no humor vítreo e urina. Por outro lado, um resultado positivo para a concentração de etanol no humor vítreo e na urina foi assinalado como consumo *ante mortem* e não síntese endógena (9,25,33,36,39,41,50,53,76).



- Presença de outros compostos voláteis

Quando o etanol é sintetizado *post mortem*, geralmente, outros compostos orgânicos voláteis (COVs) também são sintetizados. Conclui-se então que a presença simultânea de etanol e destes compostos possa ser sugestiva da ocorrência de síntese endógena de etanol por fermentação microbiana, uma vez que esses COVs geralmente não são constituintes de bebidas alcoólicas nem existem naturalmente no corpo humano (7,9,27,32,36,38,40,41,48,52,53,55,77,78).

Os COVs mais abundantemente detetados durante as análises forenses para a determinação de etanol incluem: acetaldeído, acetona, ácido acético, formaldeído, isobutanol, isopropanol, isómeros do álcool amílico, metanol, n-butanol e n-propanol. Contudo, juntamente com a produção de etanol podem também ser produzidos ácidos, álcoois, aldeídos, cetonas, compostos de enxofre, compostos de nitrogénio, compostos homoaromáticos e ésteres (5,8,9,25,29,31,32,34,36,38,40,41,47,48,52,54,57,59,67,69,77-79).

Diversos estudos referem que a análise de outros compostos voláteis produzidos durante o processo de putrefação permite evidenciar que o etanol determinado no sangue *post mortem* tem origem endógena. Alguns destes compostos voláteis, sobretudo o acetato, o isobutanol, o isopropanol, o n-butanol e o n-propanol podem ser utilizados como indicadores de síntese endógena de etanol (7,9,25,27,31,32,34,36-40,47,48,51,52,56,58,77,78,80,81).

- Outros

Para além dos critérios descritos anteriormente, existem outros que permitem auxiliar a interpretação dos resultados de etanol *post mortem*, nomeadamente a pesquisa de parâmetros bioquímicos. Apesar da atual complexidade existente na interpretação destes biomarcadores, alguns foram estudados e desenvolvidos com o objetivo de auxiliarem na interpretação dos resultados *post mortem*. A análise do etilglicuronídeo (EtG) e do etilsulfato (EtS) contribui para a determinação da origem do etanol, dado que resultados positivos indicam o consumo *ante mortem* de etanol (4,7,9,18,21,23,32,36,37,39).

Apesar da facilidade com que se determina a concentração de etanol numa amostra *post mortem*, a interpretação dos respetivos resultados pode ser complicada. No entanto, através de uma análise meticulosa de todas as informações disponíveis é possível elaborar uma interpretação válida da origem do etanol *post mortem* determinado (25,50,55).

## **2.5. Cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama e sistema de injeção de *headspace* (HS-GC-FID)**

A metodologia analítica utilizada para a determinação qualitativa e quantitativa do etanol em matrizes biológicas é, independentemente de amostras clínicas ou forenses, a cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama utilizando a técnica de *headspace* (HS-GC-FID) (5,11,18,31,38,40,44,52,80,82–84).

### **2.5.1. Cromatografia gasosa (GC)**

Embora existam diversos tipos de sistemas cromatográficos, todos eles possuem fatores comuns como a existência de uma fase móvel e uma fase estacionária, onde ocorre a separação cromatográfica. Esta separação é devida ao facto de diferentes substâncias terem diferentes afinidades tanto para com a fase móvel como para com a fase estacionária. Assim, a cromatografia é definida como “um método físico de separação no qual os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases, uma das quais é estacionária enquanto a outra se move de forma definitiva (fase móvel)” (85–89). A distinção entre cromatografia gasosa e cromatografia líquida deve-se à diferença da fase móvel, sendo que na cromatografia gasosa a fase móvel é um gás enquanto na cromatografia líquida é um líquido (88).

A cromatografia gasosa é uma técnica com capacidade para separar misturas extremamente complexas, segundo as diferenças nos pontos de ebulição e nas polaridades das diversas substâncias que compõem essas misturas. Desta forma, a cromatografia gasosa pode ser aplicada a misturas que contenham analitos voláteis, preferencialmente com pontos de ebulição até 300°C e que sejam termicamente estáveis sendo que esses analitos devem dissolver-se, pelo menos parcialmente, no gás de arraste para que assim seja devidamente transportado durante a análise (32,82,85–88,90).

Para separar os analitos de interesse, a amostra que os contém é introduzida no sistema cromatográfico através de um sistema de injeção e posteriormente será transportada por um gás de arraste (fase móvel) até à coluna onde ocorre a separação cromatográfica (fase estacionária). Este gás atua como fase móvel e deve ser quimicamente inerte, para que não reaja com os analitos presentes na amostra nem com a fase estacionária e puro, isto é, isento de impurezas que possam degradar a fase estacionária (82,85–89,91–94). No interior da coluna cromatográfica, os analitos são separados de acordo com as interações efetuadas entre as fases estacionária e móvel. Depois de separados, os analitos e o gás de arraste são eluídos juntamente da coluna para o detetor, que responde a determinadas propriedades físico-químicas características do analito e será gerada uma resposta do detetor sob a forma de um sinal eletrónico. Este sinal será amplificado e enviado para o sistema de dados (e.g. computador, integrador eletrónico, gravador) onde o cromatograma será construído eletronicamente e será possível proceder à quantificação do analito (82,85–87,89,93). Na figura 4 é apresentado o esquema de um sistema de cromatografia gasosa.

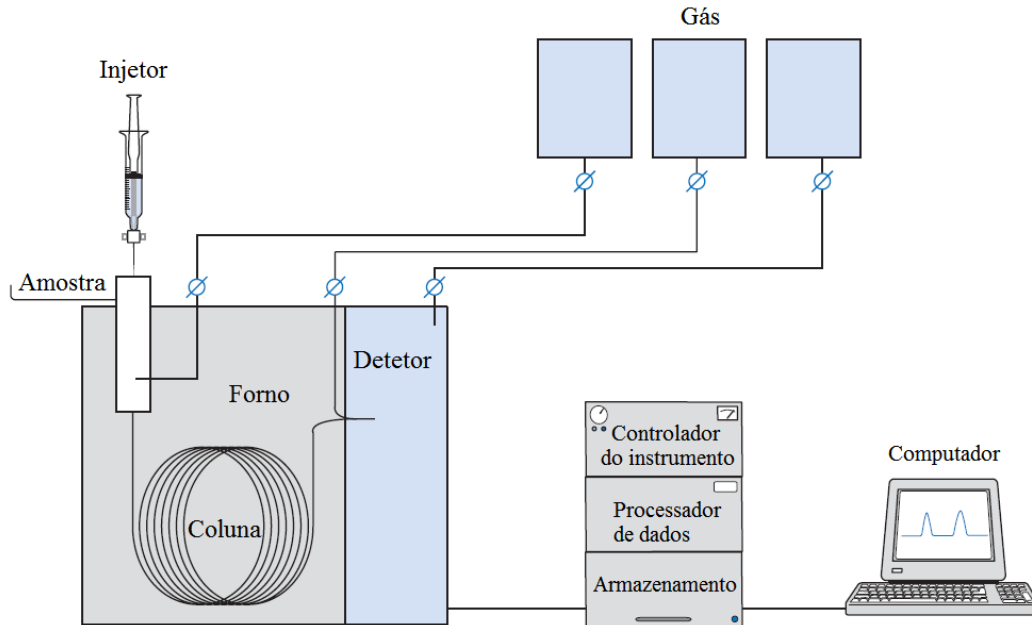


Figura 4 - Esquema do sistema de cromatografia gasosa (adaptado de (95))

Após a conclusão da análise, é obtido um cromatograma onde são apresentados os sinais cromatográficos dos analitos presentes na amostra analisada. Sob determinadas condições cromatográficas, o tempo de retenção de um sinal cromatográfico é característico de um dado analito, o qual fornece uma análise qualitativa, e a altura ou a área desse mesmo sinal cromatográfico é proporcional à quantidade do respectivo analito (84,85,87,93). No entanto, para a análise quantitativa do analito de interesse é necessário comparar a área ou a altura do sinal cromatográfico do respectivo analito com padrões de concentração conhecida, ou seja, com recurso a uma reta de calibração (84,85,87,93,96,97).

Como mencionado anteriormente, a cromatografia gasosa separa as substâncias de acordo com as diferenças no tempo em que estas são eluídas, o que se traduz em tempo de retenção ( $t_R$ ). Essas diferenças na eluição são devidas às características moleculares dos analitos, como o peso molecular e a afinidade destes com as fases estacionária e móvel. Devido a estes fatores haverá taxas de migração variáveis, isto é, alguns analitos movem-se mais lentamente na coluna cromatográfica e permanecem durante mais tempo na fase estacionária originando assim um tempo de retenção superior aos analitos que passam rapidamente por essa mesma fase e chegam ao detetor num menor intervalo de tempo, produzindo um menor tempo de retenção (82,85,88,89). O tempo de retenção de uma determinada substância expressa o tempo desde a injeção da amostra no equipamento até ao momento em que ela sai da coluna e é detetada. Esta medida não é absolutamente específica para cada substância, uma vez que pode haver outras substâncias que possam ter o mesmo tempo de retenção. Neste caso é aconselhável o uso de duas colunas cromatográficas com polaridades diferentes de forma a garantir que todas as substâncias são devidamente identificadas (82,85).

Dado que a cromatografia gasosa é uma técnica simples, multifacetada, de rápida aplicação na separação de analitos com baixo peso molecular e que se encontra bem

estabelecida na literatura, ela apresenta diversas vantagens, nomeadamente a rapidez das análises, a necessidade de baixo volume de amostra, alta precisão e resolução, e ainda fornece resultados confiáveis e robustos (93). Em relação às desvantagens, esta técnica é limitada à análise de amostras voláteis, não sendo adequada a amostras que se degradem a temperaturas elevada nem a analitos altamente polares. Neste último caso pode ser necessário derivatizar os analitos para que seja fornecido um grau de volatilidade, processo este que pode ser complexo e originar erros quantitativos (11,33,87,88,92,96).

A cromatografia gasosa tem diversas aplicações, nomeadamente em laboratórios analíticos industriais, químicos, petroquímicos, ambientais, farmacêuticos e de biotecnologia (11,82,84,87,94,98). Em particular, nas ciências forenses, a cromatografia gasosa pode ser aplicada na análise de resíduos líquidos inflamáveis, explosivos, resíduos orgânicos de arma de fogo, substâncias medicamentosas, drogas ilícitas, controlo de *doping*, pesticidas, petróleo, produtos de decomposição cadavérica e estimativa do intervalo *post mortem* (98).

### **2.5.2. Detetor de ionização de chama (FID)**

O detetor é um dispositivo que se encontra localizado no final da coluna cromatográfica e tem como funções detetar o aparecimento de um analito, após este sair da coluna cromatográfica, e produzir um sinal eletrónico (85–87,89).

O detetor de ionização de chama (FID) é considerado um detetor universal que responde a compostos que contenham principalmente carbono e hidrogénio, sendo que também responde a compostos que contenham somente carbono e não tenham hidrogénio. Este detetor responde linearmente à massa de carbono que flui por ele em tempo unitário, independentemente da estrutura do composto (82,85,87,90,92,97,99). O funcionamento deste detetor depende exclusivamente da conversão das substâncias eluídas em corrente, gerando assim uma resposta única para cada uma delas. Isto deve-se ao facto de que quando as substâncias são eluídas da coluna e entram no FID, estas são queimadas numa chama alimentada a hidrogénio/ar, e após essa combustão, são formados iões que entram num coletor, figura 5. Este coletor consiste em duas placas às quais é aplicada uma diferença de potencial que é alterada à medida que os iões penetram o espaço entre essas duas placas, gerando uma corrente. Como na ausência de amostra não existem praticamente iões a linha de base é estável, observando-se facilmente a conversão da corrente após a eluição dos analitos, o que culminará num cromatograma (82,85–87,90,92,97,99).

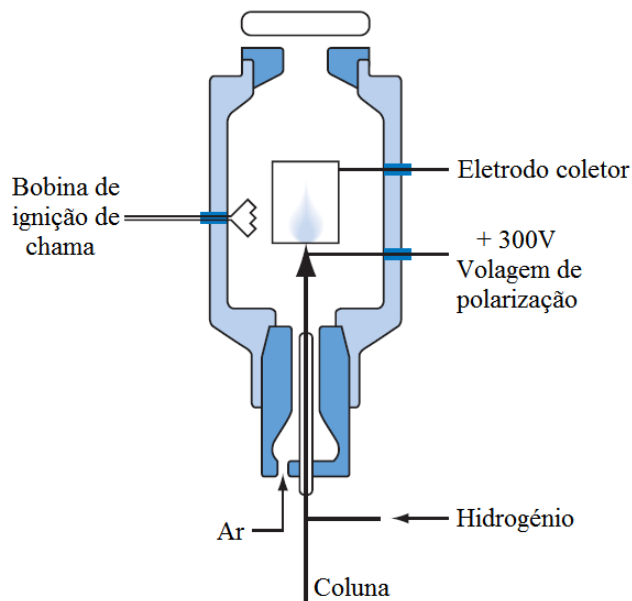


Figura 5 - Seção transversal de um detector de ionização de chama (adaptado de (95))

Dada a sua vasta aplicabilidade e facilidade de operação, o FID é um dos detetores mais comumente utilizado na cromatografia gasosa. É um detetor sensível, que não necessita de grande quantidade de amostra, o seu custo de fabricação é baixo, é fácil de limpar e não requer praticamente manutenção quando opera com colunas capilares, possui um baixo nível de ruído e produz uma resposta rápida que não varia significativamente com fatores como a temperatura do detetor e o fluxo dos gases (82,86,90,92,97,99).

No entanto, o FID, por ser um detetor ionizante, requer o uso de gases inflamáveis como o hidrogénio para alimentar a chama que irá destruir a amostra no final da análise impossibilitando a recuperação desta (86,97).

### 2.5.3. Sistema de *headspace* (HS)

Dado que a maioria das amostras não está preparada para uma introdução direta nos equipamentos, são necessários procedimentos de preparação de amostras como a extração, limpeza ou derivatização para que a amostra esteja pronta a ser analisada. Este método de preparação é uma etapa crucial no desenvolvimento de uma metodologia analítica que tem como objetivo converter uma matriz numa amostra com configuração adequada para a análise por separação ou por outra técnica analítica (87,91,94,96,100,101).

O método de preparação de amostras mais habitualmente utilizado é a extração onde o analito de interesse é separado da matriz da amostra com uma seletividade satisfatória. Durante este processo o analito é distribuído entre duas fases através de fenómenos de difusão (52,94,101–103). O facto de os analitos voláteis poderem ser injetados diretamente na coluna do cromatógrafo gasoso faz com que a análise de compostos voláteis seja simples, no entanto pode ser difícil extrair os analitos das matrizes,

nomeadamente amostras biológicas, solo, alimentos, cosméticos, polímeros, entre outras. Esta questão pode ser solucionada com recurso à técnica de *headspace* (91,94,101).

Relativamente ao procedimento de extração desta técnica, este inicia-se com a colocação do padrão interno e de uma amostra sólida ou líquida num frasco de *headspace*. O volume desta mistura deve ser baixo comparativamente à capacidade total do frasco de *headspace*, de modo a que haja espaço livre acima da amostra. Após isto, o frasco será fechado hermeticamente e colocado num forno onde será termostaticado, ou seja, estará sob condições de temperatura e pressão constantes durante um intervalo de tempo pré-definido. De seguida, os analitos de interesse presentes na amostra são difundidos para a fase gasosa acima da amostra (espaço de cabeça). Quando a concentração dos analitos na fase gasosa atingir um nível de equilíbrio termodinâmico com a concentração presente na amostra, é retirada uma alíquota do espaço de cabeça com o auxílio de uma seringa, após penetração do septo pela agulha da seringa. Posteriormente essa alíquota é introduzida no injetor aquecido do cromatógrafo gasoso e a partir daí a amostra é transportada pelo gás de arraste até à coluna cromatográfica onde os analitos serão separados e analisados de acordo com as interações efetuadas entre as fases estacionária e móvel (84,85,91,93,94,96,101–104).

Para o desenvolvimento de uma metodologia que inclua um sistema de extração por *headspace* devem ser otimizados parâmetros como a temperatura da seringa, a temperatura e o tempo de incubação e a agitação do frasco (84).

Esta técnica é relativamente barata e simples, apresentando como principais vantagens a ausência de contaminação do injetor e da coluna mesmo após um grande número de injeções, uma vez que a matriz da amostra não é injetada, o que consequentemente também é vantajoso a nível do gasto de consumíveis no equipamento (5,18,25,84,91,93,96,101,103,105). Além disto, há baixa possibilidade de formação de artefactos durante a análise o que se traduz num cromatograma limpo, ou seja, contendo apenas sinais cromatográficos para os analitos de interesse (84,96). A principal desvantagem que esta técnica apresenta é uma menor sensibilidade quando comparada com outras técnicas de extração. Apesar desta desvantagem, a sua aplicação na toxicologia forense não é comprometida (99).

## **2.6. Matrizes biológicas**

Qualquer matriz biológica que tenha estado em contacto com uma substância tóxica é uma potencial amostra a ser submetida a exames toxicológicos, no mínimo para a realização de análises qualitativas de forma a corroborar a interpretação dos resultados (47,104,106). A seleção das matrizes depende de diversos fatores como o objetivo da análise, o tipo de investigação (*ante mortem* ou *post mortem*), a disponibilidade, a integridade da amostra, a facilidade de recolha, as condições de conservação da matriz, as características físico-químicas das substâncias de interesse e os aspetos analíticos como a técnica utilizada (1,29,46,52,58,67,104).

Para a realização de análises toxicológicas *post mortem*, o sangue e a urina são as matrizes convencionais mais relevantes. Contudo, existem outras matrizes biológicas que

têm demonstrado vantagens como a sua disponibilidade, a estabilidade dos analitos e uma maior janela de detecção quando comparadas com as matrizes convencionais (1,35,52,57,67,74,104).

Nos casos *in vivo* geralmente são recolhidas amostras de sangue, urina, vômito, aspirado gástrico, ar expirado, fluido oral, unhas e cabelo (46,57,66–68,72,104). Enquanto nos casos *post mortem*, o sangue (periférico e central), a urina, o humor vítreo, o conteúdo gástrico e órgãos como o pulmão e o fígado são as amostras usualmente recolhidas durante a autópsia (1,11,29,33,36,52,66–68,72,74,104). No entanto, outras matrizes como baço, bÍlis, cabelos, cérebro, coágulos sanguíneos, coração, líquido cefalorraquidiano, líquido sinovial, medula óssea, músculo-esquelético, ossos, rim e unhas podem ser recolhidas com o objetivo de complementar a análise toxicológica (1,5,11,25,27,29,32,33,39,47,52,58,66–68,72,74).

De acordo com a literatura, a indicação da causa de morte pode auxiliar nas escolhas das matrizes biológicas a analisar. Em situações específicas, como o afogamento as matrizes mais adequadas à análise de etanol são o sangue, a urina, o cérebro e o líquido do seio paranasal. Nos casos em que há uma hemorragia subdural aguda derivada de um traumatismo craniano, e a vítima sobreviveu por algumas horas, o sangue pode não ser a matriz mais apropriada devido à continuação das funções vitais, nomeadamente a metabolização do etanol. Logo, os tecidos cerebrais localizados nas proximidades do local da hemorragia e os coágulos sanguíneos são a melhor escolha, porque refletirão a concentração do etanol no momento da lesão. Por sua vez, em corpos exumados, a matriz mais adequada para a análise de etanol é o músculo-esquelético. Para interpretar inequivocamente a origem e concentração de etanol, principalmente em situações de putrefação, é recomendado que diferentes amostras sejam recolhidas e analisadas, sendo as mais comumente requisitadas são o sangue, o humor vítreo, a urina, a bÍlis, o cérebro, o líquido cefalorraquidiano e a medula óssea (5,8,25,27,29,36,39,66,75).

Dado que a glicose é o principal substrato para a produção de etanol endógeno, e uma vez que o corpo humano não armazena esta substância de forma uniforme, é espectável que os órgãos e tecidos que possuam elevada capacidade de armazenamento desta substância sejam mais suscetíveis à produção de etanol endógeno (1,5,9,16,25,38,40–42,47,53,56). Deste modo, a escolha das matrizes biológicas a utilizar nas análises para a determinação da origem do etanol *post mortem* é crucial. Apesar de o sangue ser a amostra preferencial para as análises toxicológicas, nos casos de determinação da origem do etanol *post mortem*, a análise desta matriz deve ser corroborada com a análise de outros órgãos e tecidos para uma correta interpretação dos resultados, evitando assim resultados falso positivos (5,27).

Sendo o coração, o fígado, o músculo-esquelético e os pulmões os órgãos com maior capacidade de armazenamento de glicose, constituem matrizes inapropriadas para a determinação de etanol *post mortem* (16,25,41,47). Desta forma, as matrizes biológicas selecionadas para o presente estudo foram o sangue, a urina e o humor vítreo, no entanto existem outras potenciais matrizes como o cérebro e o líquido cefalorraquidiano. A seleção destas matrizes deve-se ao facto de estas, em indivíduos saudáveis, apresentarem baixa concentração de glicose bem como localizações anatómicas isoladas de possíveis

contaminações microbianas. Tais características são fundamentais na distinção entre a ingestão *ante mortem* e a produção endógena de etanol (25,41,53).

Neste caso, as diversas matrizes não devem ser utilizadas como substitutas do sangue, mas sim como matrizes complementares que corroborem os seus resultados e forneçam informações adicionais para a investigação.

### 2.6.1. Sangue

Apesar da sua complexidade, o sangue é a amostra de eleição para detetar, quantificar e interpretar as concentrações de substâncias tóxicas em toxicologia. Isto porque os dados disponíveis na literatura relativos às concentrações de substâncias tóxicas encontradas durante o monitoramento *ante mortem* e as concentrações potencialmente fatais e não fatais encontradas em amostras *post mortem* são reportadas no sangue (5,10,11,16,18,21,27,29,40,57,66,68,72,74,77,79,104).

Se o objetivo da análise for a quantificação de substâncias tóxicas, o recomendado é utilizar uma amostra de sangue total, uma vez que no recurso a amostras de plasma ou soro as substâncias de interesse podem ser perdidas (1,44,47,68,104). Dependendo do local de recolha da amostra de sangue pode obter-se sangue periférico ou sangue central, e consequentemente concentrações sanguíneas *post mortem* diferentes. A recolha das amostras de sangue periférico deve ser efetuada nos vasos periféricos como a veia femoral, subclávia ou ilíaca, no entanto em casos de indisponibilidade destas, o sangue central pode ser recolhido nas cavidades cardíaca ou abdominal (1,9,11,29,33,36,47,50,52,57,67,68,75,77,104).

O sangue é um fluido complexo, constituído maioritariamente por água (aproximadamente 80%), proteínas solúveis, gorduras, sais e células suspensas (29,32,67,74,75,104). Esta é a matriz mais adequada para a realização de análises quantitativas, sendo por isso aplicada como amostra de rotina nos laboratórios de toxicologia (57,72). No entanto, a interpretação dos resultados obtidos a partir da análise do sangue torna-se complicada nos casos em que as substâncias sofrem redistribuição *post mortem*, o que requer a consideração destes fenómenos aquando da recolha de sangue. Nestes casos, é crucial a análise de uma amostra de sangue periférico uma vez que as concentrações das substâncias tóxicas nesta matriz se mantêm constantes comparativamente ao sangue central onde as concentrações normalmente são superiores devido a RPM. Desta forma, as concentrações sanguíneas *post mortem* de muitas substâncias variam mediante o local da recolha, essencialmente as substâncias suscetíveis a RPM, sendo de extrema importância avaliar o local de onde o sangue foi recolhido (52,68,80,104).

A maior vantagem da utilização do sangue como matriz biológica relaciona-se com a capacidade de correlação entre a concentração da substância tóxica presente no sangue e a condição clínica do indivíduo. Outra vantagem é a possibilidade de detetar substâncias imediatamente após a sua administração, sem que estas tenham sido metabolizadas, fornecendo uma boa correlação entre a dose ingerida *ante mortem* e a concentração determinada (104). Comparativamente a outras matrizes, o sangue apresenta uma maior



aplicabilidade em diversas metodologias analíticas existentes e uma enorme quantidade de estudos realizados e publicados (29,57,67).

Relativamente ao sangue periférico, este é menos suscetível a fenómenos de RPM, o que se traduz numa menor probabilidade de contaminação devido ao seu isolamento em relação aos órgãos internos do tórax e do abdómen (9,33,36,47,52,70,72,74,104). Dada a sua localização, a recolha de sangue central pode apresentar maior contaminação interna da amostra em consequência do desconhecimento da rutura de órgãos, penetração da agulha no trato gastrointestinal ou por infiltrações de fluidos gástricos ou viscerais (9,33,47,57,66,67,80,104,107).

O sangue deve ser a amostra selecionada para as análises quantitativas, à exceção de solicitações legais ordenadas pelo tribunal que recorram a outras matrizes biológicas com justificação de estas terem disponibilidade exclusiva (57,66).

### **2.6.2. Urina**

A urina é, para além do sangue, uma matriz convencionalmente utilizada em análises toxicológicas forenses, e resulta de uma ultrafiltração do sangue pelos rins. Esta matriz é constituída essencialmente por água, aproximadamente 98%, sendo que a restante percentagem são substâncias orgânicas (ureia, ácido úrico e creatinina) e inorgânicas (iões de cloreto e sódio). A urina, ao contrário do sangue, é livre de proteínas e lípidos, salvo em casos patológicos onde podem ser detetados níveis significativos destes macronutrientes. A quantidade média diária de urina formada por um indivíduo saudável é de aproximadamente 1200 mL. Como principal via de eliminação de substâncias, a urina é comumente utilizada para a análise de metabolitos. Dada a sua constituição, a urina pode ser facilmente utilizada como amostra de rastreio para a maioria dos testes de triagem, nomeadamente imunoensaios, de modo a fornecer informação qualitativa sobre a exposição a uma determinada substância. A identificação de uma substância na urina confirma o seu consumo, mas não fornece informação sobre a quantidade ingerida nem o intervalo de ingestão. A ausência da substância na urina pode indicar que a morte ocorreu imediatamente após o consumo, não chegando a haver a metabolização da substância (9,10,29,33,43,46,52,57,67,68,72,74,75,79,104,106).

A presença de substâncias tóxicas e dos seus respetivos metabolitos nesta matriz é indicativa de um consumo prolongado. No entanto, há substâncias que são rapidamente metabolizadas, logo a substância original não será detetada na urina ou caso seja detetada será em concentrações baixas. Posto isto, a urina tem um elevado potencial para fornecer informações sobre a exposição *ante mortem*. Existem diversos fatores que afetam a concentração das substâncias tóxicas na urina, principalmente o volume de urina disponível, a depuração glomerular, a taxa de metabolismo e o pH da urina (16,29,33,67,68,106).

Esta matriz apresenta diversos aspetos positivos como a facilidade de recolha, a disponibilidade de grandes volumes, uma janela de deteção superior a outras matrizes, nomeadamente o sangue e o reduzido número de interferentes endógenos quando comparada com outras matrizes biológicas. Para além destas vantagens, a urina normalmente apresenta alta estabilidade sob congelamento, o que permite um

armazenamento a longo prazo de amostras positivas. Porém, é uma matriz que nem sempre está disponível nas autópsias, sendo que por vezes a bexiga encontra-se aparentemente vazia durante a autópsia. Outras desvantagens incluem a facilidade de adulteração e de contaminação por parte de algumas bactérias ou leveduras que fermentam hidratos de carbono, nomeadamente a glicose e produzem etanol endógeno. No caso de indivíduos diabéticos ou com infeções do trato urinário é necessário a adição de um conservante para prevenir a produção deste tipo de etanol. Esta matriz deve ser utilizada para análises qualitativas dada a baixa correlação entre a concentração da substância na urina e no sangue, isto porque a urina é recolhida a partir de um reservatório, a bexiga, e não é um fluido circulante como o sangue, logo não está em equilíbrio com os tecidos (5,7,9,10,16,29,33,36,39,41,44,46–48,50,52–54,57,67,72,75,104,106).

### 2.6.3. Humor vítreo

O humor vítreo é um fluido viscoso, incolor e não vascularizado que se encontra localizado no interior do olho protegido pela estrutura óssea do globo ocular. Este fluido é constituído principalmente por água, cerca de 99%, proteínas, essencialmente colagénio e ácido hialurónico, e outras substâncias como sódio, potássio, cálcio, cloreto, ureia, creatinina, glicose e lactato. O volume disponível desta matriz num recém-nascido é de aproximadamente 1 mL enquanto num adulto varia entre 2-3 mL em cada globo ocular. Devido ao seu volume limitado, o fluido de ambos os olhos pode ser combinado no mesmo recipiente (9,21,29,30,33,52,57,67,68,72,75,104,106,108–111).

Esta matriz tem particular interesse nas análises toxicológicas *post mortem*, uma vez que exhibe grande estabilidade e resistência perante fenómenos de putrefação e de RPM. Isto deve-se ao facto de se encontrar no interior da câmara ocular, sob um meio estéril, protegido da contaminação externa e invasão de micro-organismos, juntamente com o distanciamento dos principais órgãos das cavidades torácica e abdominal. Assim, a sua utilização é indicada essencialmente em casos de cadáveres carbonizados, em processo de decomposição ou politraumatizados, ou em que não haja outra matriz disponível, nomeadamente sangue (1,7,21,27,29,30,32,33,41,47,50,52,57,67,68,72,104,106,109,112).

Dada a sua localização anatómica, o humor vítreo torna-se menos suscetível a contaminações bacterianas e fúngicas, sendo por isso utilizado para distinguir entre a ingestão *ante mortem* de etanol e a sua formação *post mortem* (1,5,9,10,27,29,32,39,41,47,52,53,57,67,68,79,106,113). Apesar da presença de glicose no interior do olho, a fermentação não ocorre dado o seu ambiente estéril mesmo em estágios avançados de decomposição (10,33,67,104).

As substâncias tóxicas e os seus metabolitos chegam ao humor vítreo através da passagem pela barreira hemato-retiniana, por difusão passiva. A ausência de esterases, enzimas responsáveis pela hidrólise de determinadas substâncias, faz com que a presença da substância original seja predominante relativamente aos metabolitos (7,9,33,68,72,104,106,112).

Nos casos de análise para a determinação de etanol *post mortem*, esta matriz é útil quando o sangue não se encontra disponível, se encontra disponível mas contaminado ou

simplesmente para corroborar os resultados obtidos no sangue (1,5,7,27,47,72). Se a análise realizada com humor vítreo for positiva, pode-se presumir que houve consumo *ante mortem*, descartando-se assim a possibilidade de produção de etanol *post mortem*. Caso a análise ao humor vítreo dê um resultado negativo para o etanol, mas as amostras de sangue forem positivas, deve-se suspeitar de produção endógena de etanol devido a fenómenos *post mortem* (8,27,32,47,48,72,74).

A principal vantagem do humor vítreo para a análise de etanol comparativamente a outras matrizes biológicas é a estabilidade desta matriz perante fenómenos de putrefação, dada a baixa probabilidade que ocorra a síntese *post mortem* de etanol resultante do seu isolamento anatómico (5,7,21,29,30,32,33,57,67,68,72,75,104,109). Para além desta vantagem, esta matriz permanece limpa e estéril após a recolha, tem a possibilidade de ser utilizada em diversas metodologias analíticas, é útil na determinação de diversas substâncias de interesse toxicológico e tem elevada proteção contra modificações *post mortem* como a contaminação, a putrefação e a redistribuição *post mortem* (27,32,33,57,72,74,75,80,109). As principais desvantagens da utilização do humor vítreo são o volume limitado de amostra, que limita consequentemente o número de ensaios e a dificuldade de interpretação dos resultados obtidos através da análise com humor vítreo dada a reduzida informação científica presente na literatura (33,104,109).

## 2.7. Processamento das amostras

A toxicologia forense é uma área da toxicologia que tem como objetivo realizar análises químicas para detetar e quantificar a presença de substâncias tóxicas e relacionar a sua concentração com a toxicidade da substância. Pretende assim investigar casos que possam estar relacionados com intoxicações e com as suas respetivas consequências, fatais ou não, auxiliando no esclarecimento de questões judiciais e judiciais em diversos domínios do direito, essencialmente penal, civil e do trabalho (25,35,36,50,66,74,106,114).

As análises toxicológicas *post mortem* requerem a junção de conhecimentos no âmbito da química analítica, toxicologia fundamental e da medicina legal devido às características das matrizes biológicas, da aplicação de tecnologias analíticas e a dificuldade de interpretação dos resultados (52,66,106).

Devido às repercussões legais, é necessário um registo da cadeia de custódia que demonstre que as evidências associadas a um determinado caso permaneceram intactas numa área segura descartando possíveis episódios de adulteração, manipulação e extravio. A cadeia de custódia é a documentação existente no laboratório onde se registam todas as operações realizadas com cada amostra, desde a sua recolha até à sua destruição. A quebra da cadeia de custódia para além de comprometer a credibilidade da instituição que a manipula pode também comprometer a integridade da amostra e consequentemente invalidar os resultados analíticos. Todos os registos devem especificar ao máximo a sequência dos factos pelos quais a amostra passou sobretudo as datas e a identificação dos profissionais que contactaram com a amostra, principalmente na sua recolha, transporte e receção, análises realizadas e destruição para garantir a sua segurança e integridade. Este documento deve responder a questões como quem coletou

a amostra, de que amostra se trata, quando é que foi recolhida, onde esteve armazenada e a que condições, entre outras. De forma a garantir a cadeia de custódia, a solicitação toxicológica deve acompanhar as amostras dentro de um invólucro selado de modo a que qualquer violação seja evidente (1,33,46,52,67,68,106).

O processamento das amostras inicia-se com a receção destas, documentando o registo de entrada e a abertura do invólucro que as contém. Posteriormente as amostras de tecidos devem ser pesadas e as amostras de fluidos medidas, registando todas as irregularidades caso existam, como o mau acondicionamento, volume inadequado, entre outras. Após este procedimento, o toxicologista forense realizará um teste de triagem para determinar se existem substâncias tóxicas na amostra. Após o resultado confirmatório, é determinada a quantidade de substância presente na amostra. A quantificação da substância é necessária para indicar se a quantidade específica é compatível com a intoxicação (29,33,52,68). Geralmente os métodos de triagem são efetuados com recurso a imunoensaios e os métodos de confirmação utilizam técnicas de cromatografia (33,52,74).

O perito deve assegurar que a seleção e recolha são efetuadas de modo adequado tendo em consideração a análise pretendida. O ideal seria recolher as amostras no menor tempo após a morte. Caso não seja possível, deve-se proceder à refrigeração do cadáver de modo a minimizar as alterações nas concentrações das substâncias devido a alterações *post mortem*. Independentemente do tipo de amostra, o tempo decorrido entre a morte e a recolha da mesma é um fator importante tendo em conta as diferentes janelas de deteção (25,32,34,50,68,72).

Apesar das alterações *post mortem* que ocorrem no cadáver serem praticamente incontornáveis, existem erros na preservação, acondicionamento e armazenamento das amostras que podem influenciar as concentrações obtidas, interferindo cumulativamente na análise e na interpretação dos resultados obtidos (72). Para minimizar estes erros, a nível da recolha das amostras, devem ser utilizados recipientes apropriados ao volume da respetiva amostra para que o espaço livre seja o menor possível de forma a diminuir a perda oxidativa e a volatilização do analito, assim como a introdução de substâncias contaminantes (35,67,68,83).

Para evitar que haja a deterioração do analito e/ou da matriz biológica antes da análise, a preservação das amostras deve ser complementada com o uso de um conservante. Dado que o sangue é a matriz convencional para a quantificação de substâncias tóxicas, a sua preservação deve ser efetuada com fluoreto de sódio a 1%, enquanto para as restantes amostras esta preservação é facultativa (7,18,25,29,33,35,36,42,46,50,57,66–68,72). O uso de um conservante tem por objetivo a redução ou inibição da decomposição das amostras, impedindo a perda de qualquer componente. O fluoreto de sódio especificamente atua como inibidor da glicólise. No entanto, é de extrema importância que o analista tenha conhecimento se houve a adição de algum conservante à matriz em estudo e qual, uma vez que pode ser necessário alterar o procedimento analítico (7,29,35,49,57,68).

O uso de conservantes pode ser combinado com medidas físicas apropriadas como o armazenamento das amostras em recipientes hermeticamente fechados e mantidos a

baixas temperaturas garantindo que não haja alterações significativas no teor do analito de interesse na amostra. Esse armazenamento deve ser a 4°C se as amostras forem analisadas num curto espaço de tempo ou a -20°C caso sejam analisadas num maior espaço de tempo e a repetição dos ciclos de congelação/descongelação deve ser evitada. O armazenamento deve ter lugar num ambiente seguro e adequado, somente acessível a pessoal autorizado de forma a garantir a segurança e integridade das amostras (7,9,11,25,32–36,40,46,48,50,52,57,66,67,72).

## **2.8. Validação da metodologia analítica**

### **2.8.1. Introdução**

Na prática, a metodologia analítica é um processo que envolve a realização de um conjunto de experiências e procedimentos estatísticos que estimam a eficácia dessa mesma metodologia, no entanto este processo é suscetível a erros, aleatórios e/ou sistemáticos, que podem alterar de forma significativa o valor do resultado final da análise. Logo, é de elevada importância que num laboratório de toxicologia forense todos os métodos sejam devidamente validados. Sendo fundamental que estes laboratórios disponham de normas e critérios objetivos e que sejam capazes de demonstrar através da validação que os métodos internos que executam originam resultados credíveis. Uma vez que pode ser necessário ir justificar esses resultados em tribunal, a validação nesses casos é um suporte de extrema confiança que os corrobora, sendo por isso uma garantia da qualidade analítica. Com o objetivo de garantir que a nova metodologia analítica fornece resultados interpretáveis e fiáveis, a mesma deve ser submetida a um processo de avaliação designado de validação (50,100,115).

A validação de uma metodologia analítica é efetuada após a seleção e a otimização da mesma e pretende comprovar, através de evidências objetivas, que as características de desempenho do procedimento satisfazem os requisitos para as aplicações analíticas pretendidas. Assim sendo, o principal objetivo da validação de uma metodologia analítica é demonstrar a sua credibilidade nos resultados analíticos obtidos para a determinação de uma concentração do analito numa matriz específica, satisfazendo os requisitos de qualidade impostos por entidades reguladoras. A validação também permite avaliar a qualidade do desempenho da metodologia analítica, uma vez que possibilita a identificação e a quantificação de erros e incertezas inerentes ao procedimento analítico. Assim sendo, os resultados obtidos através da validação são fundamentais para os laboratórios efetuarem o controlo de qualidade interno das análises de rotina. A validação não deve ser somente realizada quando um laboratório cria ou desenvolve uma nova metodologia, mas sempre que seja necessário verificar se os parâmetros são adequados para a utilização numa determinada análise (29,33,50,77,100,115).

Os parâmetros de validação a estudar dependem das características do ensaio, do tipo e da complexidade da amostra e do tipo de metodologia em questão, isto é, análises qualitativas ou quantitativas. Na maioria dos casos, em toxicologia forense, a análise qualitativa não é suficientemente adequada para a interpretação dos resultados, pelo que é indispensável a realização de ensaios quantitativos. As realizações destes ensaios quantitativos têm como objetivo distinguir entre concentrações terapêuticas e tóxicas para

posteriormente formular conclusões médico-legais apropriadas. No entanto, cabe a cada laboratório analisar quais são os parâmetros que deve incluir no seu plano de validação (100).

Dado que o objetivo do presente estudo é o desenvolvimento e a validação de uma metodologia analítica para análises qualitativas e quantitativas, os parâmetros de validação avaliados foram selecionados com base no procedimento operacional em vigor no SQTf-DC e na norma SWGTOX e, estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros de validação

Parâmetro	Qualitativo	Quantitativo
Seletividade/Especificidade	✓	✓
Análise de interferentes	✓	✓
Gama de trabalho		✓
Linearidade e modelo de calibração		✓
Limite de detecção	✓	✓
Limite de quantificação		✓
Repetibilidade		✓
Precisão intermédia		✓
Exatidão		✓
Arrastamento ( <i>carryover</i> )	✓	✓
Estabilidade	✓	✓

## 2.8.2. Definição dos parâmetros de validação

### 2.8.2.1. Seletividade/Especificidade

A especificidade e a seletividade são parâmetros que indicam a confiabilidade da análise. Estes dois termos estão estritamente relacionados entre si, uma vez que refletem a mesma característica, sendo por isso frequentemente utilizados com conceitos sobreponíveis, o que pode causar alguma confusão. Estes parâmetros definem a capacidade que uma metodologia analítica tem para medir inequivocamente e diferenciar o(s) analito(s) de interesse na presença de interferências específicas que possam estar presentes na amostra. Exemplos destas interferências são os componentes da matriz, impurezas, produtos de degradação, metabolitos ou outras substâncias de comportamento similar ao do analito de interesse. Em particular, a especificidade refere-se a metodologias analíticas que produzem apenas uma resposta para um único analito. Por outro lado, a seletividade refere-se à capacidade que as metodologias têm para separar fisicamente as substâncias de uma mistura, produzindo uma resposta para diversas substâncias em simultâneo, sendo possível a sua distinção (100,115–119).

No âmbito do presente estudo, o termo mais adequado será a seletividade. Neste caso, se for gerado um sinal analítico, diferenciado de todos os outros sinais, em resposta exclusivamente à presença do analito de interesse, considera-se uma metodologia seletiva. Se a seletividade de uma metodologia analítica não estiver assegurada, outros

parâmetros como a linearidade, a precisão e a exatidão ficarão comprometidos (120–123). Deste modo, a seletividade deve ser um dos primeiros parâmetros a avaliar no decorrer do desenvolvimento de uma metodologia analítica. No entanto, este parâmetro deve ser reavaliado ao longo do processo de validação, visto que podem ocorrer eventos como a degradação das amostras e consequente formação de novas substâncias que não foram observadas numa fase inicial e que podem ser capazes de gerar problemas ao nível da identificação e quantificação do analito de interesse (120,124,125).

Existem diferentes formas de avaliar a seletividade de uma metodologia analítica. Uma delas consiste na demonstração da falta de resposta em amostras brancas, ou seja, na comparação dos resultados obtidos para amostras fortificadas com o analito em estudo (controlo positivo) e na ausência deste (controlo negativo). Em cromatografia, analisa-se o cromatograma das amostras fortificadas comparando os sinais cromatográficos adquiridos para o analito de interesse e para o padrão interno com os de referência. Nesta análise, os tempos de retenção do analito e do padrão interno devem coincidir com os tempos de retenção das referências e ao mesmo tempo estes devem ser distinguíveis dos restantes componentes. O estudo deste parâmetro deve incluir não só o analito como o padrão interno de forma a verificar também a ausência de interferência entre ambos (124,125).

### **2.8.2.2. Identificação de interferentes**

Dá-se o nome de interferente a qualquer substância, que não fazendo parte do estudo, pode, caso esteja presente, comprometer a identificação, análise e quantificação dos compostos relevantes. Podem ser distinguidas interferências de matriz e interferências de analitos comuns. Na análise das interferências de analitos comuns, e de acordo com o tipo de estudo efetuado, são selecionadas substâncias, que possam interferir com os compostos em estudo. Assim, as substâncias a analisar terão de ser idênticas àquelas que realmente participam no estudo (126).

No caso de uma análise de voláteis, outros voláteis comuns deverão ser avaliados através do estudo de amostras provenientes de casos anteriormente analisados ou pela fortificação de amostras brancas. No contexto deste trabalho, os tempos de retenção dos possíveis interferentes serão comparados com os tempos de retenção das substâncias em estudo nas duas colunas cromatográficas utilizadas na presente metodologia. No caso de algum interferente comprometer, de alguma forma, a correta interpretação dos resultados obtidos, encontramos-nos perante uma inconformidade, o que leva à impossibilidade, dependendo de diversos fatores (e.g. relevância da impureza interferente, nível de interferência), de quantificar o analito de interesse (126).

### **2.8.2.3. Gama de trabalho**

A gama de trabalho de uma metodologia analítica corresponde ao intervalo entre a concentração mais baixa e a concentração mais alta para a quantificação dos analitos em estudo, tendo sido selecionada com base na gama de concentrações esperada segundo um determinado estudo. Durante o desenvolvimento da metodologia, a gama de trabalho

selecionada deve fornecer resultados com uma incerteza aceitável, isto é, com valores de precisão, exatidão e linearidade adequados (117,119).

Relativamente à quantificação das substâncias, devem ser evitadas extrapolações, e caso não se consiga quantificar com exatidão uma determinada concentração por estar num nível demasiado baixo, o resultado deve ser expresso como sendo inferior à concentração do calibrador mais baixo ou indicar a expressão “concentração vestigial”. É fundamental confirmar regularmente este parâmetro no decorrer da validação, e para tal é necessário considerar a linearidade da metodologia e o procedimento de calibração desenvolvido (127). Deste modo, entre a concentração do calibrador mais baixo e a concentração do calibrador mais alto a resposta do método deve obedecer a uma tendência linear. Assim, durante a validação deste parâmetro é necessário confirmar esta relação linear, demonstrando que a gama de trabalho do equipamento é compatível com a gama de trabalho escolhida para a metodologia em estudo e verificar se o procedimento de calibração proposto é adequado (117). A gama de trabalho selecionada não tem de coincidir obrigatoriamente com o intervalo de concentrações dos calibradores utilizados para a elaboração da reta de calibração.

#### **2.8.2.4. Modelo de calibração e linearidade**

A seleção do modelo de calibração a usar é de extrema relevância para a obtenção de resultados quantitativos confiáveis, sendo que este deve descrever a relação entre as razões das áreas dos sinais cromatográficos do analito e do padrão interno ( $y$ ) e a concentração do analito na amostra ( $x$ ). O analista deve selecionar o modelo de calibração mais simples que descreva adequadamente a relação concentração-resposta, o fator de ponderação assim como a equação da reta ( $y = a + bx$ , onde “ $a$ ” é a ordenada na origem e “ $b$ ” é o declive da reta). Quando uma metodologia analítica é capaz de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito de interesse dentro da gama de trabalho designa-se de linearidade (33,100,115,118,119).

Para o estudo da linearidade de uma metodologia analítica devem ser avaliados os cálculos de regressão linear, nomeadamente o coeficiente de correlação ( $r$ ), o coeficiente de determinação ( $r^2$ ), a interceção da reta na origem e o estudo dos resíduos de  $y$ , ou seja, a soma dos valores residuais e a sua distribuição gráfica (100).

Após a elaboração de um gráfico que estabeleça a linearidade de forma reprodutível entre a razão das áreas do analito e do padrão interno em função da concentração do analito de interesse, podem ser calculados os coeficientes de regressão ( $a$  e  $b$ ) e o coeficiente de correlação ( $r$ ) em que  $-1 \leq r \leq +1$ . Quando  $r = -1$  indica a presença de uma correlação negativa, ou seja, todos os pontos do gráfico estarão em linha reta de declive negativo; se  $r = 0$  indica total ausência de correlação linear entre  $x$  e  $y$ ; e se  $r = 1$ , todos os pontos estarão em linha reta de declive positivo, representando uma correlação positiva, que é o pretendido (117).

Relativamente ao coeficiente de determinação, o valor aceite para este parâmetro depende dos critérios internos do laboratório e da metodologia analítica utilizada, no entanto as retas de calibração devem assumir valores de coeficientes de determinação



superiores a 0,995. Isto porque quanto mais próximo de 1 menor é a incerteza associada e a dispersão do conjunto de pontos experimentais, o que consequentemente evidencia um ajuste ideal (33).

Quanto aos valores residuais, estes representam as diferenças entre o valor de  $y$  real e o valor de  $y$  previsto com base na reta de regressão, para cada valor de  $x$ . Se estes valores, calculados através de regressão linear simples, se apresentarem distribuídos aleatoriamente em torno de zero confirma-se a linearidade do método. Por outro lado, se os valores residuais apresentarem tendências sistemáticas indicam não linearidade (100,115).

Efetivamente o modelo de calibração mais utilizado é o linear onde é obtida uma relação linear entre a razão dos sinais e a concentração do analito, que é calculado através de uma linha de regressão segundo o método dos mínimos quadrados, simples ou ponderados, dependendo da homocedasticidade da resposta. A homocedasticidade deve ser verificada através de um procedimento estatístico apropriado, como o teste de F: duas amostras para variância entre as variações nos níveis de concentração mais baixo e mais alto (100,115).

A avaliação do comportamento da variância é de extrema relevância para a seleção do modelo de regressão a utilizar. No modelo de regressão de mínimos quadrados simples geralmente assume-se que a variância das diferenças entre os valores teóricos e os valores experimentais obtidos é constante em toda a gama de trabalho, verificando-se homocedasticidade. Assim, neste método os diferentes calibradores utilizados na elaboração da reta de calibração têm igual contributo para o estudo da regressão. Contudo, quando se observa heterocedasticidade, isto é, oscilações na variância ao longo da gama de trabalho, significa que há uma maior contribuição por parte dos calibradores mais concentrados do que os calibradores de menor concentração. Nestes casos, pode haver problemas na exatidão das quantificações efetuadas na gama baixa da reta de calibração, sendo por isso necessária a inclusão de um fator de ponderação que minimize a contribuição dos calibradores mais concentrados. Normalmente, os fatores de ponderação que são utilizados para compensar adequadamente a heterocedasticidade são o  $1/x$  e o  $1/x^2$ , isto é, o inverso da concentração ou o inverso da concentração ao quadrado, respetivamente. A conveniência do modelo de calibração selecionado deve ser confirmada através de testes estatísticos para ajuste do modelo, uma vez que a avaliação do modelo de calibração através do seu coeficiente de correlação não é suficiente. Depois de definido o modelo de calibração, as retas de calibração utilizadas para o estudo de outros parâmetros podem ser preparadas com um menor número de calibradores e com menos réplicas, eventualmente sem necessidade de qualquer replicação (100,115,118).

#### **2.8.2.5. Limiares analíticos**

Os limiares analíticos de uma metodologia analítica correspondem ao limite de deteção (LD) e ao limite de quantificação (LQ). O LD e o LQ estabelecem a concentração a partir da qual é possível detetar e quantificar, respetivamente, o analito em estudo.

### **2.8.2.5.1. Limite de detecção**

O limite de detecção (LD) de uma metodologia analítica corresponde ao ponto em que um determinado valor medido é maior que a incerteza a ele associada, ou seja, é a menor concentração de analito presente numa amostra que pode ser detetada, mas não necessariamente quantificada com um valor exato e preciso (115,117,119). Geralmente o LD é expresso em concentração e deriva do menor sinal detetado com razoável segurança e certeza estatística para um determinado procedimento analítico. O LD corresponde à menor concentração que é possível distinguir do branco, isto é, de uma amostra que não contém o analito mas contém a mesma matriz (121).

Em cromatografia, é recomendado que este menor sinal detetado resulte de um sinal cromatográfico com uma altura pelo menos 3 vezes maior que o nível de ruído da linha de base (115). Este método apenas é aplicável a procedimentos analíticos que apresentem ruído na linha de base, tendo esta relação sinal/ruído de ser igual ou superior a 3:1. Para além deste método de sinal/ruído, existe outro método pelo qual o LD e o limite de quantificação (LQ) podem ser determinados (117): o desvio padrão da resposta com base no declive da reta de calibração. Neste método é estudada uma reta de calibração usando amostras que contêm o analito de interesse numa gama próxima à do LD esperado.

### **2.8.2.5.2. Limite de quantificação**

Por outro lado, o limite de quantificação (LQ) representa a concentração mínima injetada capaz de produzir resultados quantitativos com precisão e exatidão aceitável no âmbito da aplicação da respetiva metodologia. Em cromatografia, a fórmula de cálculo é muito similar à do LD, exceto que para o LQ é exigida uma altura de sinal cromatográfico pelo menos 10 vezes superior à do ruído da linha de base, o que corresponde a uma relação sinal/ruído de 10:1 (100,115,117,119). Assim sendo, o LQ define aquela concentração de analito que é quantificável com um coeficiente de variação não superior a 10% (115,117). O valor do LQ é sempre superior ao valor do LD (121,127,128).

### **2.8.2.6. Precisão**

A precisão é um parâmetro com elevada importância na validação de uma metodologia analítica, dado que considera todas as variações que podem ocorrer em condições operacionais durante o uso rotineiro da metodologia. O objetivo deste parâmetro é determinar a variabilidade típica da aplicabilidade da metodologia e não a variabilidade mínima. Como a precisão de uma metodologia analítica depende da concentração do analito, este parâmetro deve ser avaliado em toda a gama de trabalho. Este parâmetro avalia até que ponto os resultados individuais obtidos pela metodologia desenvolvida concordam entre uma série de medições obtidas (e.g. média) a partir de uma amostra homogênea, sob condições específicas. Estas condições específicas são um aspeto importante na avaliação da precisão, uma vez que elas determinam o tipo de estimativa de precisão obtida, desta forma devem ser especificadas em cada caso (115–118).

A precisão de uma metodologia pode ser avaliada através de três estimativas diferentes: repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade. A precisão é geralmente expressa por parâmetros estatísticos que descrevem a dispersão dos resultados em relação ao valor médio, como o desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação (CV) (100,115–118).

#### **2.8.2.6.1. Repetibilidade**

Das três estimativas existentes para avaliar a precisão, a repetibilidade é a que requer menor variação nas condições operacionais. A repetibilidade, também designada por precisão intra-ensaio, corresponde à precisão obtida sob as mesmas condições experimentais (e. g. mesmo laboratório, condições ambientais, analista, procedimento de medição, instrumentação de medição, o lote de reagentes, equipamentos e as suas calibrações) durante um curto intervalo de tempo (100,115,116,118,119).

#### **2.8.2.6.2. Precisão intermédia**

A precisão intermédia expressa as variações que podem ocorrer no mesmo laboratório, ou seja, traduz os resultados observados quando um ou mais fatores são alterados. As fontes de variação podem incluir diferentes dias, analistas, instrumentação, equipamentos, reagentes, colunas, entre outros. O estudo da precisão intermédia deve ser alargado por um intervalo de tempo superior à repetibilidade, a fim de fornecer uma variabilidade analítica representativa da rotina laboratorial a longo prazo. Deste modo, a precisão intermédia é o parâmetro mais representativo da variação dos resultados dentro do mesmo laboratório (100,115,116,118,119).

#### **2.8.2.6.3. Reprodutibilidade**

A reprodutibilidade estuda e compara o grau de concordância dos resultados obtidos em diferentes laboratórios para a análise da mesma amostra, como estudos colaborativos, normalmente aplicados à padronização de metodologias. As condições que podem variar neste parâmetro são os laboratórios, os analistas e a instrumentação de medição (100,115,116,118,119). Segundo a IUPAC, só devem ser retiradas conclusões sobre os resultados obtidos em ensaios interlaboratoriais que tenham a participação mínima de oito laboratórios (128). Nestes ensaios interlaboratoriais, os resultados só devem ser comparados caso a metodologia analítica e o equipamento utilizado sejam similares. Se entre os diferentes laboratórios, o objetivo da análise for o mesmo, no entanto haja recurso a diferentes metodologias, as diferenças nas condições utilizadas devem ser especificadas para que os resultados possam ser comparados. Os resultados obtidos neste parâmetro devem ser expressos através do desvio padrão, do desvio padrão relativo (DPR) e do intervalo de confiança (115).

### 2.8.2.7. Exatidão

A exatidão de uma metodologia analítica descreve o grau de concordância entre os resultados da concentração medida pelo método e um valor aceite como referência convencional, ou seja, é a capacidade que a metodologia analítica possui em proporcionar resultados o mais próximos possíveis do valor aceite como verdadeiro. Este valor de referência pode ser obtido de várias formas, nomeadamente através do uso de material de referência certificado, participação em ensaios interlaboratoriais ou realização de ensaios de recuperação. Outra alternativa de demonstrar a exatidão de uma metodologia é através da comparação dos resultados obtidos por essa metodologia com os resultados de um método de referência pré-estabelecido cujo erro sistemático seja conhecido e não significativo. Uma vez que nem sempre existem métodos pré-estabelecidos nem material de referência certificado, e comparação entre laboratórios requer a aprovação por parte dos mesmos para utilizarem a metodologia proposta, a avaliação da exatidão é normalmente realizada segundo um ensaio de recuperação. Este ensaio consiste na fortificação de amostras brancas através da adição de uma concentração conhecida do analito de interesse. Posteriormente as amostras são analisadas conforme o procedimento selecionado e as respetivas concentrações são calculadas através da reta de calibração (117–119).

Durante o desenvolvimento da metodologia é essencial que este parâmetro seja avaliado em toda a gama de trabalho, uma vez que é afetado pelos componentes do erro sistemático (*bias*) e do erro aleatório (precisão) (100,115,116,118). No entanto, a exatidão é frequentemente utilizada para avaliar somente o erro sistemático, isto é, o *bias* (115).

### 2.8.2.8. Arrastamento (*Carryover*)

O *carryover* é um parâmetro essencial na validação de metodologias que incluam sistemas de *autosampler*, uma vez que os efeitos deste parâmetro podem estar diretamente relacionados com a utilização de um amostrador automático. Neste caso, os resíduos podem resultar de amostras previamente injetadas, retenções na agulha do amostrador automático ou na porta do injetor. O *carryover* também pode ter origem na coluna, caso se depositem resíduos de uma amostra previamente injetada. Este parâmetro traduz-se assim no facto de aparecerem vestígios de analitos numa amostra, provenientes de uma amostra anteriormente analisada, originando deste modo falso positivos (126,129,130).

O objetivo da avaliação deste parâmetro é demonstrar a ausência de arrastamento de analitos antes da aquisição da amostra seguinte. Se se observar arrastamento durante o desenvolvimento da metodologia, este deve ser eliminado ou pelo menos monitorizado de modo a avaliar o seu impacto durante a validação da metodologia, principalmente na quantificação das amostras em estudo. Uma possível medida de monitorização é a injeção de amostras brancas entre as amostras em estudo e após a análise dos calibradores e controlos de altas concentrações (126,129,130).

### **2.8.2.9. Estabilidade**

Dado que os laboratórios de toxicologia são obrigados por lei a armazenar as amostras por um longo período de tempo de modo a permitir a reanálise, se solicitada, o conhecimento deste parâmetro é fundamental. Assim, a estabilidade pretende demonstrar que a concentração de um analito de interesse presente numa amostra não sofre alterações quando sujeito a condições específicas por um determinado intervalo de tempo. No entanto, este parâmetro pode ser influenciado por muitos fatores como as propriedades físico-químicas da substância, as características da amostra, o procedimento de recolha, o recipiente selecionado e o uso de conservantes ou aditivos (29,50,115,119).

O estudo da estabilidade constitui assim um pré-requisito para a obtenção de resultados válidos e reprodutíveis, garantindo que as análises são realizadas antes de uma possível degradação das amostras. Deste modo, o principal objetivo da estabilidade é estimar o intervalo de tempo permitido entre a recolha e a análise das amostras sem que haja alteração na concentração do analito de interesse (115). A estabilidade pode ser avaliada segundo a influência da temperatura de conservação (e.g. ciclos de congelação/descongelação), a duração da conservação, a resistência às temperaturas a que as substâncias ficam sujeitas durante a análise cromatográfica, entre outras. No decurso do estudo deste parâmetro deve estar assegurado que as amostras estão sujeitas a condições equivalentes às da rotina do laboratório (126,129,131,132).



## **Capítulo III – Trabalho experimental**





### **3. Trabalho experimental**

#### **3.1. Introdução**

Para que seja possível analisar qualitativa e quantitativamente o etanol em diferentes amostras biológicas, é essencial selecionar uma metodologia analítica que forneça resultados fiáveis e reprodutíveis. Caso contrário, os resultados podem levar a uma incorreta interpretação dos mesmos e a consequências legais injustificadas que podem ser posteriormente contestadas em tribunal. Neste processo contínuo de garantia da qualidade, a validação da metodologia é o passo fulcral entre o desenvolvimento da mesma e o controlo de qualidade interno durante a aplicação da metodologia na rotina de um laboratório.

#### **3.2. Material e métodos**

##### **3.2.1. Amostras biológicas**

Todas as amostras biológicas *post mortem* (humor vítreo, sangue e urina) necessárias para a realização deste projeto foram obtidas a partir de recolhas efetuadas em autópsias realizadas na Unidade Funcional de Patologia Forense do Serviço de Clínica e Patologia Forenses da Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses ou em Gabinetes Médico-Legais e Forenses dependentes da Delegação do Centro. No total utilizaram-se 53 amostras biológicas, recolhidas em 2016, distribuídas da seguinte forma: 23 de humor vítreo, 10 de sangue e 20 de urina.

No entanto também foram utilizadas 10 amostras de sangue *in vivo* que foram recolhidas no âmbito da legislação aplicável à condução rodoviária durante o ano de 2016. Estas amostras foram obtidas a partir de recolhas em estabelecimentos oficiais de saúde de acordo com a Portaria n.º 902-B/2007, de 13 de agosto, posteriormente enviadas para análise no INMLCF, I.P. (133).

Evidencia-se que todas as amostras de humor vítreo, sangue e urina utilizadas no presente estudo se encontravam fora do prazo legal estipulado para a sua conservação no INMLCF, I.P.. Relativamente à conservação das amostras biológicas no INMLCF, I.P., estas devem ser preservadas até que o tribunal dê ordem de destruição ou findo o tempo legal das mesmas. As amostras biológicas recolhidas no âmbito das perícias médico-legais, depois de serem analisadas permanecem armazenadas no SQTf do INMLCF, I.P. durante o período de dois anos, após o qual o serviço pode proceder à sua destruição, salvo se o tribunal tiver comunicado ordem em contrário. Quanto às amostras biológicas recolhidas no âmbito da legislação aplicável à condução rodoviária, o INMLCF, I.P. garante o armazenamento das mesmas até: à comprovação de testes negativos; ou até ao final do prazo para interposição de impugnação contenciosa; ou até ao trânsito em julgado da sentença no caso de ação judicial. Terminado este período, o INMLCF, I.P. pode proceder à destruição das amostras, salvo se existir ordem judicial em contrário (134,135).

Inicialmente, todas estas amostras biológicas foram seriadas, através do procedimento de ensaio para a determinação de etanol no sangue, em vigor à data no SQTF-DC, de modo a verificar a presença ou ausência de etanol. Esta seriação foi realizada no mais curto prazo após a receção das amostras e, posteriormente, o resultado foi inserido no *software Laboratory Information Management System (STARLIMS)* disponível no SQTF-DC do INMLCF, I.P.. Após uma pesquisa no STARLIMS foram selecionados os processos cujo o resultado obtido da análise toxicológica no sangue tenha sido negativo. Depois de selecionadas as amostras de sangue com resultado negativo, procedeu-se à consulta do respetivo processo, a fim de verificar a existência de outras matrizes biológicas (humor vítreo e urina) para posterior utilização destas. Até serem analisadas, todas estas amostras foram armazenadas numa câmara frigorífica a uma temperatura de cerca de -8°C.

### **3.2.2. Padrões, reagentes e material**

#### **3.2.2.1. Padrões**

- Acetaldeído (Merck, Alemanha)
- Acetato de etilo (Merck, Alemanha)
- Acetona (Merck, Alemanha)
- Acetonitrilo (Merck, Alemanha)
- Etanol (Merck, Alemanha)
- Éter dietílico (Merck, Alemanha)
- Isopropanol (Merck, Alemanha)
- Metanol (Riedel-de-Haën, Alemanha)
- n-Butanol (VWR Chemicals, EUA)
- n-Propanol (Merck, Alemanha)

#### **3.2.2.2. Reagentes**

Água ultrapura Milli-Q obtida através de um sistema de purificação de água (com lâmpada UV) da Millipore o qual apresentava uma resistividade de  $18,2 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$  à temperatura ambiente.

#### **3.2.2.3. Material**

- Balões volumétricos de 5, 50, 1000 mL
- Cápsulas de alumínio para *vials* (VWR Chemicals)
- Frasco de vidro de 1000 mL
- Gobelés
- Suporte de tubos
- Suporte de *vials*
- Tubos de plásticos de 10 mL com tampa de rosca
- *Vials* de 10 mL (VWR Chemicals)

### 3.2.3. Equipamentos

#### 3.2.3.1. Aparelhos de uso comum

- Câmaras frigoríficas (Liebherr)
- Congelador (Balay)
- Homogeneizador de amostras (GFL)
- Hotte Kottermann AP 800
- Vórtex Sotel

#### 3.2.3.2. Pipetas e doseadores

- Doseador de mão Eppendorf Multipette Plus com *combitips* de 10 mL
- Micropipeta monocanal de volume fixo de 100  $\mu$ L (Eppendorf Research)
- Micropipeta monocanal de volume variável de 100, 200, 1000  $\mu$ L (Eppendorf Research e Gilson)
- Pipetas graduadas de 5 e 10 mL

#### 3.2.3.3. Instrumentos analíticos

Como instrumento analítico foi utilizado um sistema cromatográfico HS-CG-FID da marca Varian® modelo 450-GC, dotado de um detetor de ionização de chama, acoplado a um injetor de *headspace* CTC Combi PAL. Na tabela 3 são apresentadas as principais características do sistema HS-GC-FID utilizado.

Tabela 3 - Principais características do sistema HS-GC-FID utilizado

Componente	Principais características
Injetor automático	Injeção de <i>headspace</i>
Cromatógrafo gasoso	Coluna analítica 1: VF-624ms 30m x 0,25mm x 1,40 $\mu$ m (Varian CP 910215, ou equivalente)
	Coluna analítica 2: VF-5ms 30m x 0,25mm x 0,50 $\mu$ m (Varian CP 8945, ou equivalente)
Detetor	Ionização de chama (FID)

O processamento dos dados analíticos foi efetuado com recurso a um *software* específico (*Galaxie Chromatography Data System*).

### **3.2.4. Procedimento analítico**

#### **3.2.4.1. Preparação das soluções**

##### **3.2.4.1.1. Soluções precursoras de padrões de referência**

###### **3.2.4.1.1.1. Solução contendo 2,5 g/L de etanol**

Dilui-se 158  $\mu\text{L}$  de etanol em água ultrapura até perfazer um volume de 50 mL. Este procedimento foi repetido duas vezes, de forma a obter duas soluções de 2,5 g/L – a) e b), visto que as soluções precursoras dos calibradores e dos controlos devem ser independentes.

###### **3.2.4.1.1.2. Solução contendo 10 g/L de etanol**

Dilui-se 633  $\mu\text{L}$  de etanol em água ultrapura até perfazer um volume de 50 mL.

##### **3.2.4.1.2. Solução de trabalho de padrão interno**

###### **3.2.4.1.2.1. Solução contendo 0,10 g/L de acetonitrilo**

Dilui-se 127  $\mu\text{L}$  de acetonitrilo em água ultrapura até perfazer um volume de 1000 mL.

##### **3.2.4.1.3. Soluções de trabalho de padrões de referência (calibradores para a elaboração da reta de calibração)**

###### **3.2.4.1.3.1. Solução contendo 0,10 g/L**

Dilui-se 200  $\mu\text{L}$  da solução descrita em 3.2.4.1.1.1. a) em água ultrapura até perfazer um volume de 5 mL.

###### **3.2.4.1.3.2. Solução contendo 0,25 g/L**

Dilui-se 500  $\mu\text{L}$  da solução descrita em 3.2.4.1.1.1. a) em água ultrapura até perfazer um volume de 5 mL.

###### **3.2.4.1.3.3. Solução contendo 0,50 g/L**

Dilui-se 1 mL da solução descrita em 3.2.4.1.1.1. a) em água ultrapura até perfazer um volume de 5 mL.

###### **3.2.4.1.3.4. Solução contendo 1,00 g/L**

Dilui-se 2 mL da solução descrita em 3.2.4.1.1.1. a) em água ultrapura até perfazer um volume de 5 mL.

#### **3.2.4.1.3.5. Solução contendo 2,00 g/L**

Dilui-se 4 mL da solução descrita em 3.2.4.1.1.1. a) em água ultrapura até perfazer um volume de 5 mL.

#### **3.2.4.1.3.6. Solução contendo 4,00 g/L**

Dilui-se 2 mL da solução descrita em 3.2.4.1.1.2. em água ultrapura até perfazer um volume de 5 mL.

#### **3.2.4.1.3.7. Solução contendo 5,00 g/L**

Dilui-se 2,5 mL da solução descrita em 3.2.4.1.1.2. em água ultrapura até perfazer um volume de 5 mL.

#### **3.2.4.1.4. Soluções de trabalho de padrões de referência (calibradores para o estudo da linearidade)**

Para o estudo da linearidade foram utilizados 10 calibradores, 7 dos quais eram coincidentes com os utilizados no estudo da gama de trabalho (3.2.4.1.3.). Desta forma, apenas foram preparadas as 3 soluções seguintes para completar os calibradores utilizados no estudo da linearidade.

#### **3.2.4.1.4.1. Solução contendo 0,75 g/L**

Dilui-se 1,5 mL da solução descrita em 3.2.4.1.1.1. a) em água ultrapura até perfazer um volume de 5 mL.

#### **3.2.4.1.4.2. Solução contendo 3,00 g/L**

Dilui-se 1,5 mL da solução descrita em 3.2.4.1.1.2. em água ultrapura até perfazer um volume de 5 mL.

#### **3.2.4.1.4.3. Solução contendo 4,50 g/L**

Dilui-se 2,250 mL da solução descrita em 3.2.4.1.1.2. em água ultrapura até perfazer um volume de 5 mL.

#### **3.2.4.1.5. Solução de trabalho de padrões de referência (calibradores para o estudo dos limiares analíticos)**

#### **3.2.4.1.5.1. Solução contendo 0,025 g/L**

Dilui-se 50 µL da solução descrita em 3.2.4.1.1.1. a) em água ultrapura até perfazer um volume de 5 mL.

**3.2.4.1.5.2. Solução contendo 0,05 g/L**

Dilui-se 100  $\mu\text{L}$  da solução descrita em 3.2.4.1.1.1. a) em água ultrapura até perfazer um volume de 5 mL.

**3.2.4.1.5.3. Solução contendo 0,15 g/L**

Dilui-se 300  $\mu\text{L}$  da solução descrita em 3.2.4.1.1.1. a) em água ultrapura até perfazer um volume de 5 mL.

**3.2.4.1.5.4. Solução contendo 0,20 g/L**

Dilui-se 400  $\mu\text{L}$  da solução descrita em 3.2.4.1.1.1. a) em água ultrapura até perfazer um volume de 5 mL.

**3.2.4.1.5.5. Solução contendo 0,30 g/L**

Dilui-se 600  $\mu\text{L}$  da solução descrita em 3.2.4.1.1.1. a) em água ultrapura até perfazer um volume de 5 mL.

**3.2.4.1.6. Soluções de trabalho de padrões de referência  
(calibradores para a identificação de interferentes)**

**3.2.4.1.6.1. Solução contendo 5 g/L de acetaldeído**

Dilui-se 32  $\mu\text{L}$  da solução de armazenamento em água ultrapura até perfazer um volume de 5 mL.

**3.2.4.1.6.2. Solução contendo 5 g/L de acetato de etilo**

Dilui-se 28  $\mu\text{L}$  da solução de armazenamento em água ultrapura até perfazer um volume de 5 mL.

**3.2.4.1.6.3. Solução contendo 5 g/L de acetona**

Dilui-se 32  $\mu\text{L}$  da solução de armazenamento em água ultrapura até perfazer um volume de 5 mL.

**3.2.4.1.6.4. Solução contendo 5 g/L de éter dietílico**

Dilui-se 35  $\mu\text{L}$  da solução de armazenamento em água ultrapura até perfazer um volume de 5 mL.

**3.2.4.1.6.5. Solução contendo 1 g/L de éter dietílico**

Dilui-se 32  $\mu\text{L}$  da solução descrita em 3.2.4.1.6.4 em água ultrapura até perfazer um volume de 5 mL.

#### **3.2.4.1.6.6. Solução contendo 5 g/L de isopropanol**

Dilui-se 31  $\mu$ L da solução de armazenamento em água ultrapura até perfazer um volume de 5 mL.

#### **3.2.4.1.6.7. Solução contendo 5 g/L de metanol**

Dilui-se 32  $\mu$ L da solução de armazenamento em água ultrapura até perfazer um volume de 5 mL.

#### **3.2.4.1.6.8. Solução contendo 5 g/L de n-butanol**

Dilui-se 31  $\mu$ L da solução de armazenamento em água ultrapura até perfazer um volume de 5 mL.

#### **3.2.4.1.6.9. Solução contendo 5 g/L de n-propanol**

Dilui-se 31  $\mu$ L da solução de armazenamento em água ultrapura até perfazer um volume de 5 mL.

#### **3.2.4.1.7. Soluções de trabalho de referência (Controles de Qualidade Internos)**

##### **3.2.4.1.7.1. Solução contendo 0,10 g/L**

Dilui-se 200  $\mu$ L da solução descrita em 3.2.4.1.1.1. b) em água ultrapura até perfazer um volume de 5 mL.

##### **3.2.4.1.7.2. Solução contendo 0,50 g/L**

Dilui-se 1 mL da solução descrita em 3.2.4.1.1.1. b) em água ultrapura até perfazer um volume de 5 mL.

##### **3.2.4.1.7.3. Solução contendo 1,20 g/L**

Dilui-se 2,400 mL da solução descrita em 3.2.4.1.1.1. b) em água ultrapura até perfazer um volume de 5 mL.

#### **3.2.4.2. Preparação das amostras de ensaio**

No presente estudo, as amostras primárias (AP) funcionaram como amostras de ensaio (AE) e, segundo o procedimento em vigor no Serviço de Química e Toxicologia Forenses, a preparação das amostras de ensaio inicia-se com a homogeneização das mesmas através da sua colocação num homogeneizador sob agitação suave durante pelo menos 10 minutos até atingirem uma temperatura próxima da temperatura ambiente. Posteriormente, identificam-se todas as tomas de ensaio (TE) de forma legível, para evitar a ocorrência de erros.

De seguida, realiza-se a diluição das AE através da adição do padrão interno, em *vials* de 10 mL pela seguinte ordem: 1 mL da solução de padrão interno e 100  $\mu$ L de solução de trabalho de padrões de referência ou amostra. Tendo em conta as características das substâncias estudadas, nomeadamente as suas volatilidades, cada um dos *vials* foi imediatamente fechado após a preparação do calibrador ou controlo a analisar, de modo a evitar a perda das substâncias.

### 3.2.4.3. Preparação das retas de calibração

O recomendado seria preparar os calibradores nas diferentes matrizes biológicas utilizadas no estudo, no entanto, sempre que tal facto não se verifique, o analista deve justificar devidamente o motivo que levou à substituição das matrizes biológicas (136).

No presente estudo, as diferentes matrizes biológicas foram substituídas por água ultrapura, de forma a garantir a realização do mesmo em tempo útil e a validação simultânea de uma metodologia analítica que permitisse a análise de etanol em diferentes tipos de matrizes biológicas. Esta substituição foi possível, uma vez que as matrizes biológicas utilizadas são maioritariamente constituídas por água e que os seus coeficientes de partição mantêm igual tendência em água e nas diferentes matrizes.

Segundo o estudo do Alan Jones (137), no qual foi utilizada a técnica analítica HS-GC, verificou-se que o coeficiente de partição líquido/ar do etanol no sangue, água e urina não apresentou variações significativas.

Uma vez que a ligação entre o etanol e os diversos constituintes do sangue é insignificante, este apresenta-se em equilíbrio entre a fase aquosa dos fluidos biológicos e a fase gasosa sobrejacente, como se pode observar na figura 6 (138,139).

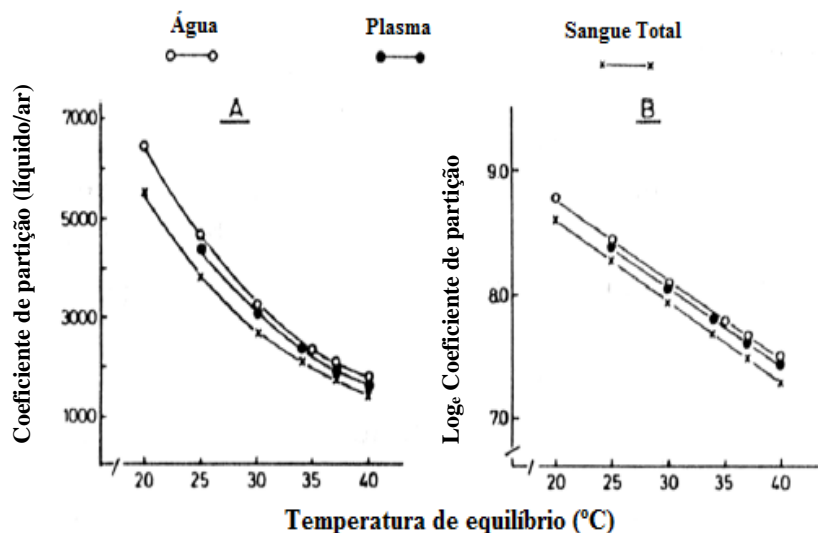


Figura 6 - A) Coeficientes de partição líquido/ar do etanol em água, sangue total e plasma em temperaturas de equilíbrio de 20-40°C e B) o logaritmo do coeficiente de partição e temperatura (adaptado de (138))



Tendo em consideração o supracitado, tanto os calibradores como os controlos de qualidade internos utilizados para o estudo dos parâmetros de validação foram preparados em água ultrapura, à exceção dos utilizados no estudo da seletividade e da estabilidade, os quais foram preparados nas matrizes biológicas em estudo, nomeadamente sangue, humor vítreo e urina.

As retas de calibração foram construídas com sete pontos distribuídos ao longo da gama de trabalho, e os calibradores foram preparados como descrito no ponto 3.2.4.2., sendo a fortificação apresentada na tabela 4.

**Tabela 4 - Preparação dos calibradores para a reta de calibração**

	Solução de trabalho de padrões de referência ( $\mu\text{L}$ )		Solução de PI a 0,1 g/L (mL)
Calibrador 1 (0,10 g/L)	100	3.2.4.1.3.1.	1
Calibrador 2 (0,25 g/L)	100	3.2.4.1.3.2.	1
Calibrador 3 (0,50 g/L)	100	3.2.4.1.3.3.	1
Calibrador 4 (1,00 g/L)	100	3.2.4.1.3.4.	1
Calibrador 5 (2,00 g/L)	100	3.2.4.1.3.5.	1
Calibrador 6 (4,00 g/L)	100	3.2.4.1.3.6.	1
Calibrador 7 (5,00 g/L)	100	3.2.4.1.3.7.	1

#### **3.2.4.4. Preparação dos Controlos de Qualidade Internos (CQI)**

Para o controlo de qualidade interno foram seleccionados três controlos positivos (0,10; 0,50 e 1,20 g/L), que foram preparados em água ultrapura, pela mesma razão que os calibradores, e um controlo negativo constituído por branco de reagentes. A análise dos controlos positivos permite avaliar o desempenho da metodologia analítica. E, por sua vez, o controlo negativo permite detetar a presença de substâncias interferentes e a ocorrência de contaminações e arrastamentos. Deste modo, a preparação das amostras de controlo positivas foi efetuada como apresentado na tabela 5, através da adição de 1 mL da solução de padrão interno a 100  $\mu\text{L}$  da solução de trabalho de padrões de referência. Na amostra de controlo negativa o volume da solução de trabalho foi substituído por um volume equivalente de água ultrapura.

**Tabela 5 - Preparação dos controlos de qualidade internos (CQI)**

	Solução de trabalho de padrões de referência ( $\mu\text{L}$ )		Solução de PI a 0,10 g/L (mL)
Controlo positivo (0,10 g/L)	100	3.2.4.1.7.1.	1
Controlo positivo (0,50 g/L)	100	3.2.4.1.7.2.	1
Controlo positivo (1,20 g/L)	100	3.2.4.1.7.3.	1
Branco de reagentes	100	Água ultrapura	1

## **Capítulo IV – Resultados e discussão**



## 4. Resultados e discussão

### 4.1. Introdução

Este estudo baseou-se no desenvolvimento/otimização do método (analítico e cromatográfico) usado para a determinação de etanol em amostras de sangue no SQTf-DC. Todo o seu desenvolvimento foi efetuado no equipamento analítico utilizado no SQTf-DC (HS-GC-FID) para a determinação desta substância.

Relativamente à metodologia utilizada na rotina do SQTf-DC (anexo 7.1.), considerou-se indispensável a seleção de um outro padrão interno, assim como a otimização da metodologia cromatográfica. Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos da validação dos parâmetros após estas alterações.

### 4.2. Alteração da metodologia analítica

Por se tratar de um procedimento analítico cromatográfico para a quantificação de uma substância, é recomendado o desenvolvimento de um método de calibração, sendo o comumente utilizado neste caso, o método de padrão interno. De modo a garantir a confiabilidade da metodologia, isto é, a precisão e linearidade da análise quantitativa, deve ser incluído um padrão interno em todo o processo de validação. Neste tipo de calibração, uma substância (padrão interno) é adicionada, na mesma concentração, a todas as amostras, pontos da reta de calibração e controlos de qualidade internos (25,33,84,85,90–92).

A adição do padrão interno tem como objetivo normalizar pequenas variações do efeito de matriz. O padrão interno deve ter a mesma natureza química do analito de interesse para que os seus comportamentos sejam semelhantes quando sujeitos às mesmas condições, deve ser detetado simultaneamente com o analito de interesse, no entanto com sinais distintos e não deve estar presente na amostra (84,85,90,92).

Para a seleção do padrão interno é necessário ter em consideração para além da semelhança química com o analito, a técnica utilizada, o equipamento e as colunas cromatográficas. Entre os compostos que já foram descritos como padrão interno na análise de etanol em laboratórios forenses estão incluídos o acetonitrilo, a butanona, o n-butanol, o n-propanol e o t-butanol. No entanto, o n-propanol e o n-butanol não devem ser utilizados como padrão interno, em amostras forenses, uma vez que podem ser produzidos *post mortem* simultaneamente com o etanol. Assim, o acetonitrilo foi o padrão interno selecionado, dado que não é de alguma forma um produto da atividade microbiana nem é um ingrediente de qualquer bebida alcoólica. Além disso, o acetonitrilo preenche todos os critérios que um padrão interno deve ter para a análise de etanol (7,38,41,84,92,105).

O procedimento analítico utilizado para o presente estudo é o que se encontra descrito no Procedimento de Ensaio utilizado para a determinação de etanol na rotina do SQTf-DC (140), contudo, houve alteração do padrão interno. Para a quantificação de etanol no SQTf-DC, utiliza-se o n-propanol como padrão interno, porém, na presente metodologia,

para a quantificação de etanol em situações *post mortem*, selecionou-se o acetonitrilo em substituição do n-propanol, pelas razões supracitadas.

### 4.3. Desenvolvimento/otimização da metodologia cromatográfica

O presente estudo consiste na otimização do método cromatográfico utilizado no SQTf-DC, para a análise de etanol em sangue. Um dos parâmetros a otimizar é o tempo de incubação das amostras no *headspace*, porque nos permite obter um método mais rápido, no entanto, existem outros fatores que condicionam este parâmetro como a temperatura da seringa e a temperatura de incubação. Inicialmente foram otimizados os parâmetros do *headspace* onde os controlos (0,10; 0,50 e 1,20 g/L) foram injetados variando-se a temperatura da seringa (60, 70 e 80°C), a temperatura de incubação (50, 60 e 70°C) e o tempo de incubação (8,10 e 12 minutos). Efetuaram-se diversas combinações entre a temperatura da seringa, a temperatura de incubação e o respetivo tempo. Inicialmente foi fixada a temperatura da seringa em 60°C bem como a temperatura de incubação em 50°C, realizando análises com variação nos tempos de incubação, ou seja, 8, 10 e 12 minutos. Posteriormente, a temperatura da seringa manteve-se fixa em 60°C, a temperatura de incubação foi aumentada para os 60°C, e realizaram-se novamente três análises distintas com variações no tempo de incubação. Este procedimento foi realizado até que todas as combinações possíveis tivessem sido analisadas.

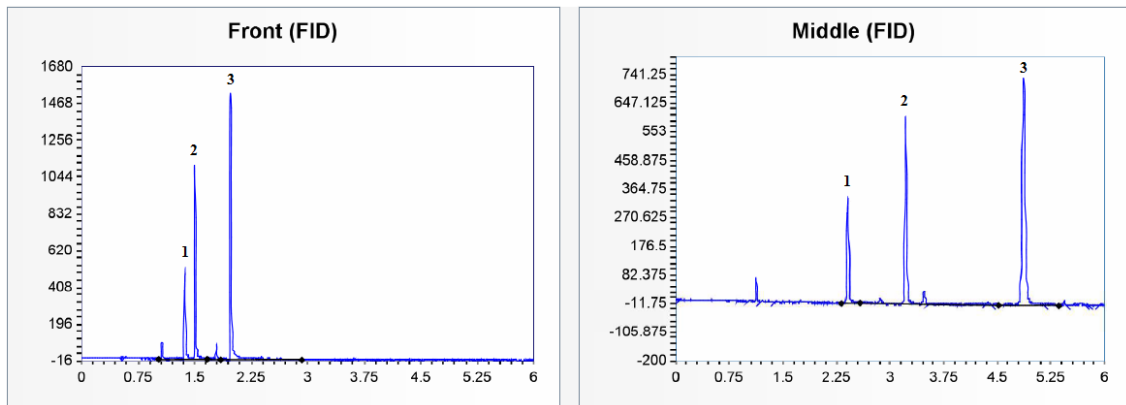
Na tabela 6 estão representadas, a título de exemplo, algumas das combinações analisadas.

Tabela 6 - Programas das condições do *headspace* utilizadas no desenvolvimento da presente metodologia analítica

Programa	Temperatura da seringa (°C)	Temperatura de incubação (°C)	Tempo de incubação (min)
1º	80	50	
2º	60	60	8
3º	70	70	

Por observação da figura 7, é possível verificar a existência de muito ruído na linha de base, dada a elevada diferença entre a temperatura da seringa (80°C) e a temperatura do forno do *headspace* (50°C). Através da análise das diferentes combinações constatou-se que o ruído na linha de base atenuaria com a diminuição na diferença entre as temperaturas da seringa e de incubação, como é apresentado nas figuras 8 e 9.

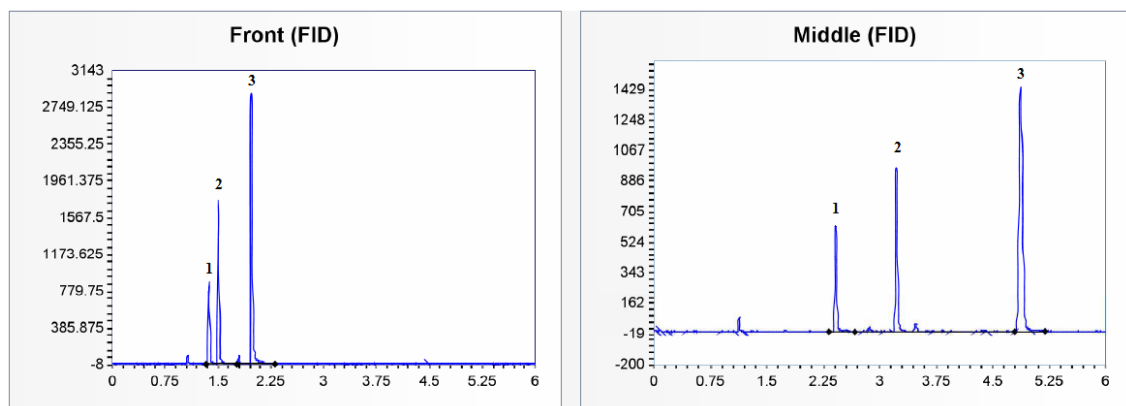
De modo a avaliar a variação resultante da diferença entre as temperaturas da seringa e de incubação, analisaram-se os controlos em corridas onde estas duas temperaturas eram iguais. Todos os cromatogramas apresentados são referentes a controlos à concentração de 0,50 g/L que estiveram a incubar durante 8 minutos, não sendo este um fator variável entre eles.



**Figura 7 - Cromatogramas obtidos usando o primeiro programa de condições do *headspace* apresentado na tabela 6. Sinal cromatográfico: (1) – Etanol; (2) – Acetonitrilo; (3) – n-Propanol**

Assumindo que as condições cromatográficas são iguais, nas figuras 8 e 9 são apresentados dois cromatogramas obtidos na análise de um controlo a 0,50 g/L sob o 2º e 3º programa de condições, respetivamente. Foram realizadas análises sob as mesmas condições referidas, apenas com variação no tempo de incubação, sendo que não foram observadas diferenças significativas, optando-se assim pelo menor tempo de incubação testado, isto é, 8 minutos.

Através da análise dos cromatogramas das restantes concentrações concluiu-se que os parâmetros do *headspace* que forneciam melhores resultados eram: Temperatura de seringa = 70°C, temperatura do forno do *headspace* = 70°C e tempo de incubação = 8 minutos (3º programa de condições do *headspace*, apresentado na tabela 6).



**Figura 8 - Cromatogramas obtidos usando o segundo programa de condições do *headspace* apresentado na tabela 6. Sinal cromatográfico: (1) – Etanol; (2) – Acetonitrilo; (3) – n-Propanol**

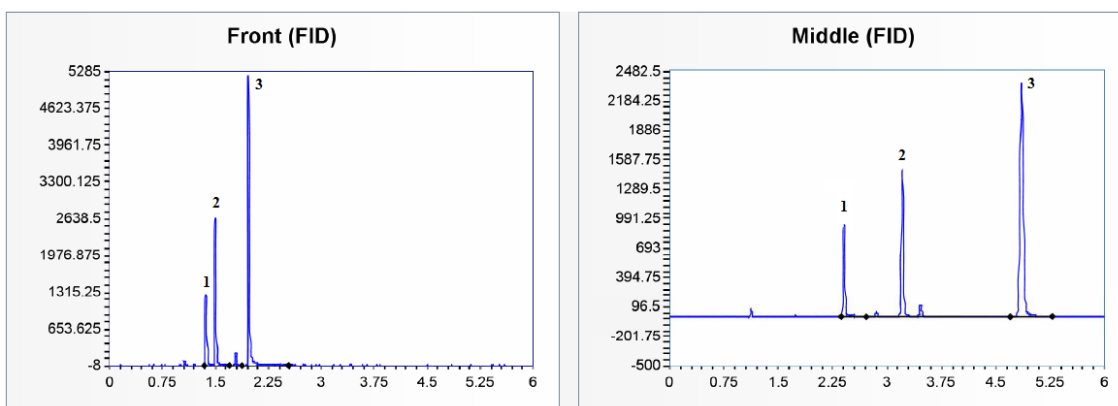


Figura 9 - Cromatogramas obtidos usando o terceiro programa de condições do *headspace* apresentado na tabela 6. Sinal cromatográfico: (1) – Etanol; (2) – Acetonitrilo; (3) – n-Propanol

Depois de otimizados os parâmetros do *headspace* procedeu-se à otimização das condições cromatográficas, onde controlos com as mesmas concentrações foram analisados sob variações da temperatura do injetor (150, 200 e 250°C), da temperatura do forno (35 e 40°C), do fluxo das colunas pneumáticas (2,5 e 3 mL/min), da temperatura dos detetores (150, 200, 250 e 300°C), do fluxo do gás de arraste – hélio (5, 15, 25, 50 mL/min) e dos fluxos dos gases combustores – hidrogénio (30, 35 e 40 mL/min) e ar (300, 350 e 400 mL/min).

A otimização das condições cromatográficas iniciou-se com o ajuste da temperatura do injetor. O injetor é o dispositivo necessário para a introdução da amostra no cromatógrafo gasoso, e este localiza-se na extremidade inicial da coluna cromatográfica. O injetor deve estar aquecido a uma temperatura elevada, no mínimo cerca de 50°C acima do ponto de ebulição do analito menos volátil presente na amostra. Esta temperatura deve ser suficientemente alta para permitir que a amostra seja instantaneamente transportada, contudo salvaguardando a sua resistência ao calor para que a mesma não se decomponha (86,89,94).

Neste caso, como o acetonitrilo é menos volátil que o etanol, e o seu ponto de ebulição é de aproximadamente 82°C, o injetor deveria operar no mínimo a 130°C.

Nas figuras 10, 11 e 12, são apresentados os cromatogramas obtidos da análise de um controlo médio à temperatura de 150, 200 e 250°C, respetivamente. Evidencia-se que estas análises foram realizadas já com as condições do *headspace* otimizadas.

Tendo em consideração as três diferentes concentrações analisadas no processo de otimização das condições cromatográficas, os cromatogramas obtidos apresentavam similaridades, pelo que a discussão será baseada somente numa concentração (0,50 g/L). Apesar de não serem observadas diferenças significativas entre os três cromatogramas apresentados, na figura 12 é visível um ligeiro ruído na linha de base, que poderia ter um impacto relevante no decorrer da otimização dos restantes parâmetros. E, uma vez que a resposta analítica é semelhante entre a figura 10 e 11, optou-se por manter a temperatura do injetor a 200°C dada a definição dos sinais cromatográficos.



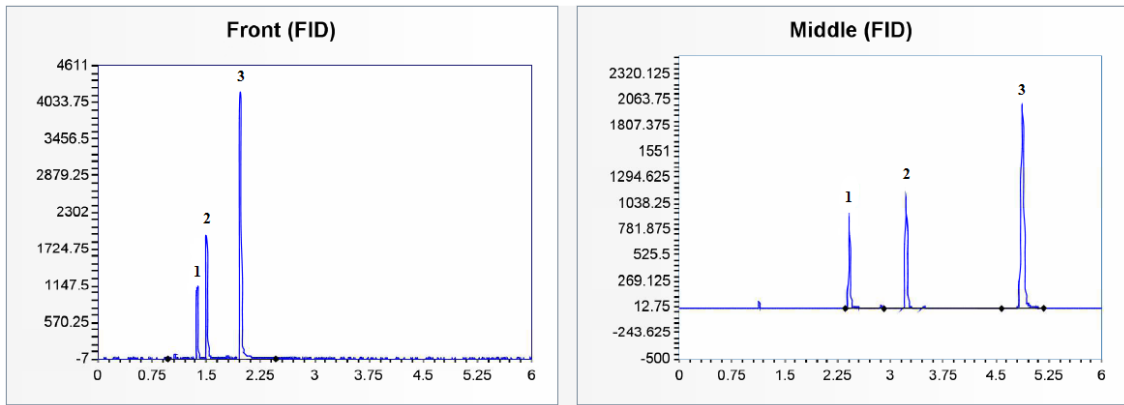


Figura 10 - Cromatogramas obtidos usando a temperatura do injetor a 150°C.  
Sinal cromatográfico: (1) – Etanol; (2) – Acetonitrilo; (3) – n-Propanol

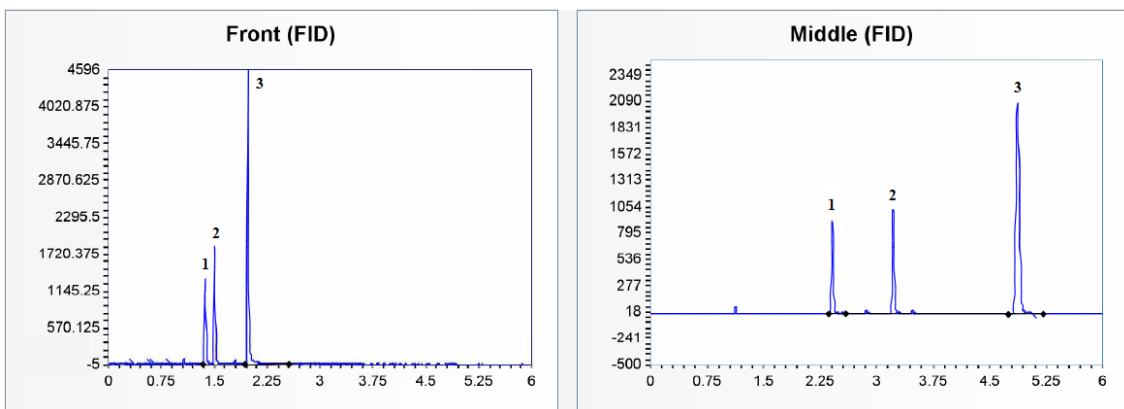


Figura 11 - Cromatogramas obtidos usando a temperatura do injetor a 200°C.  
Sinal cromatográfico: (1) – Etanol; (2) – Acetonitrilo; (3) – n-Propanol

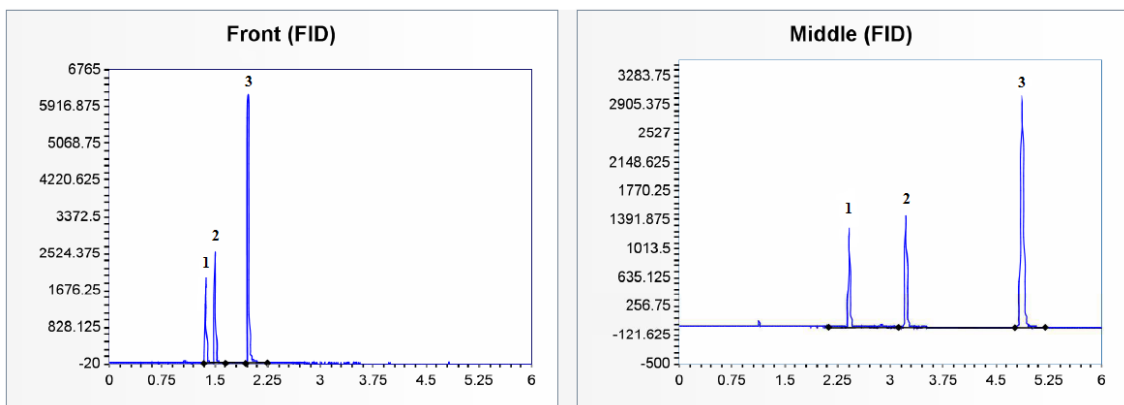


Figura 12 - Cromatogramas obtidos usando a temperatura do injetor a 250°C.  
Sinal cromatográfico: (1) – Etanol; (2) – Acetonitrilo; (3) – n-Propanol

O forno termostatzado tem como função controlar a temperatura da(s) coluna(s) durante a realização da análise. Este pode ser operado por dois métodos distintos: programação de temperatura ou programação isotérmica. No método da programação da temperatura, a temperatura da coluna é aumentada segundo um gradiente à medida que a análise decorre. Nestes casos, a análise inicia com uma temperatura baixa, para que os analitos com menor ponto de ebulição eluam, e aumenta para que os analitos menos voláteis, ou seja, com pontos de ebulição maiores também eluam. Este método é adequado para separar misturas complexas que tenham uma extensa faixa de pontos de ebulição. Tendo em consideração que a metodologia analítica desenvolvida pretende analisar somente duas substâncias, o analito de interesse – etanol e o padrão interno – acetonitrilo, não foi necessário introduzir um gradiente térmico, operando-se assim numa temperatura isotérmica, isto é, a temperatura da coluna foi mantida constante durante toda a análise (85,86).

Dado que um dos objetivos do presente estudo é a redução do tempo de análise, o tempo de corrida é um dos parâmetros cromatográficos a otimizar. Diretamente relacionado a este parâmetro está a temperatura do forno e o fluxo das colunas pneumáticas.

Na tabela 7 são apresentados os tempos de retenção obtidos para as diferentes substâncias após realizadas alterações na temperatura do forno (35 e 40°C) simultaneamente com variações no fluxo das colunas pneumáticas (2,5 e 3 mL/min).

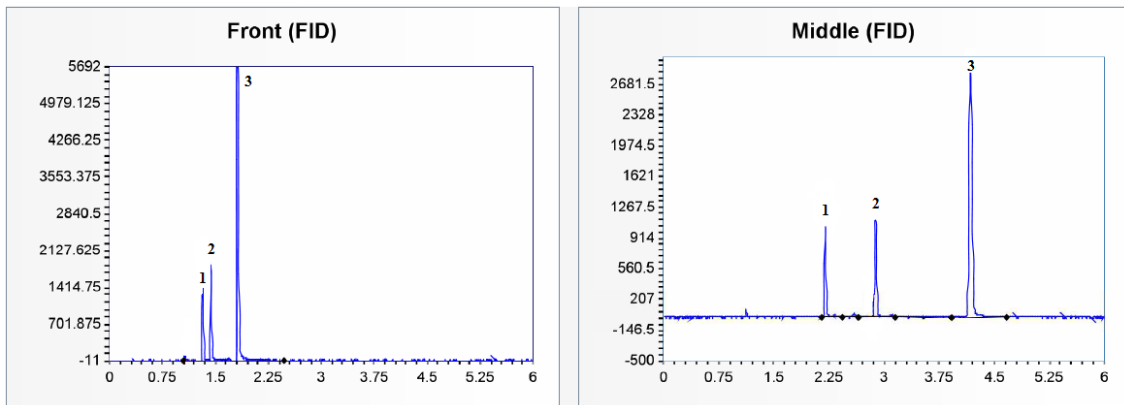
Através da análise da tabela 7 verifica-se que, quanto menor for a temperatura do forno, neste caso uma temperatura de 35°C, maior serão os tempos de retenção das substâncias em relação à temperatura de 40°C. O mesmo se verifica relativamente ao fluxo das colunas pneumáticas, isto é, quanto menor for o fluxo utilizado, como um fluxo de 2,5 mL/min, mais tempo demoram os analitos a eluir e conseqüentemente apresentam tempos de retenção superiores em comparação às análises realizadas com um fluxo superior, ou seja, de 3 mL/min.

Desta forma, e com o objetivo de diminuir o tempo de corrida, constata-se que com a temperatura do forno fixa em 40°C e um fluxo das colunas pneumáticas de 3 mL/min é evidente uma diminuição dos tempos de retenção comparativamente a todas as restantes análises realizadas. No entanto é necessário verificar se os cromatogramas obtidos nestas condições apresentam estabilidade na linha de base, boa separação cromatográfica e uma boa definição dos sinais cromatográficos.

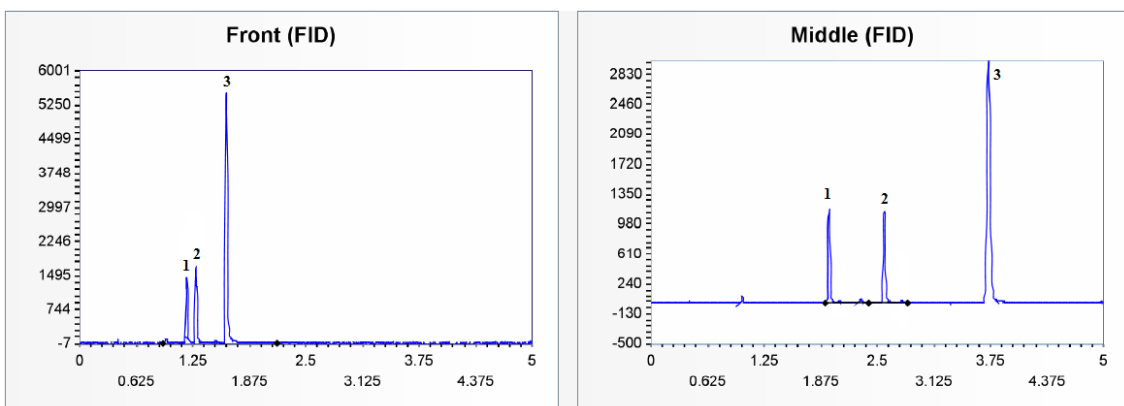
**Tabela 7 - Resumo dos  $t_R$  obtidos nas diferentes variações da temperatura do forno e do fluxo das colunas pneumáticas**

<b>Temperatura do forno (°C)</b>	<b>35</b>		<b>40</b>	
<b>Fluxo das colunas (mL/min)</b>	<b>2,5</b>	<b>3</b>	<b>2,5</b>	<b>3</b>
<b><i>Front</i> – Tempo de retenção (min)</b>				
<b>Etanol</b>	1,37	1,24	1,34	1,19
<b>Acetonitrilo</b>	1,50	1,37	1,43	1,30
<b>n-propanol</b>	1,97	1,88	1,88	1,65
<b><i>Middle</i> -Tempo de retenção (min)</b>				
<b>Etanol</b>	2,42	2,19	2,18	1,98
<b>Acetonitrilo</b>	3,23	2,44	2,90	2,60
<b>n-propanol</b>	4,90	4,37	4,20	3,75

Nas figuras 13 e 14 são apresentados dois cromatogramas obtidos durante a otimização simultânea da temperatura do forno e do fluxo das colunas pneumáticas. Através da análise dos cromatogramas verifica-se que com uma temperatura do forno de 40°C e um fluxo de 2,5 mL/min a linha de base apresenta mais ruído e como espectável os compostos demoram mais tempo a eluir. Em contrapartida, com a mesma temperatura do forno e um fluxo de 3 mL/min a linha de base mostra-se estável e os compostos eluem mais rapidamente, apresentando assim tempos de retenção mais baixos. Para além destas observações, a seleção de um fluxo de 3 mL/min demonstra uma boa separação cromatográfica, sinais cromatográficos bem definidos e conseqüentemente é possível diminuir o tempo de corrida comparativamente ao outro fluxo analisado. As variações selecionadas foram a temperatura do forno isotérmica a 40°C simultaneamente com um fluxo nas colunas pneumáticas de 3 mL/min.



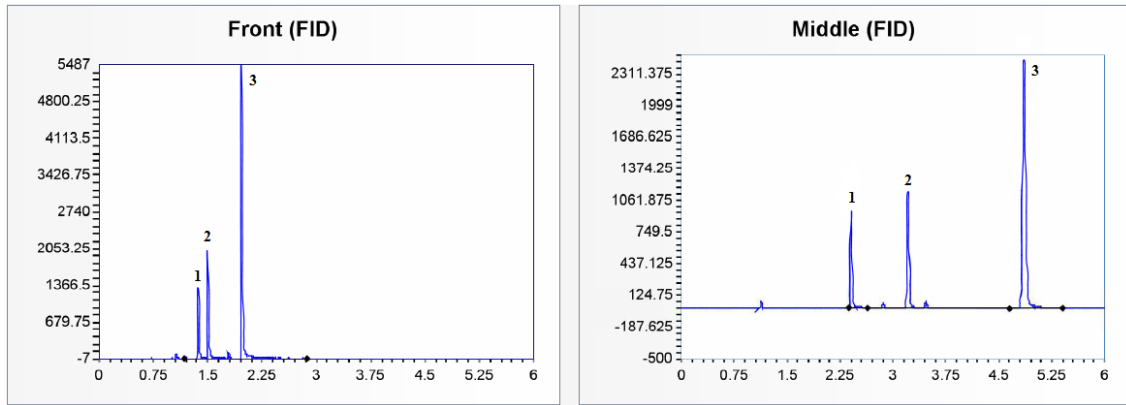
**Figura 13 - Cromatogramas obtidos usando a temperatura do forno a 40°C e com um fluxo das colunas pneumáticas a 2,5 mL/min. Sinal cromatográfico: (1) – Etanol; (2) – Acetonitrilo; (3) – n-Propanol**



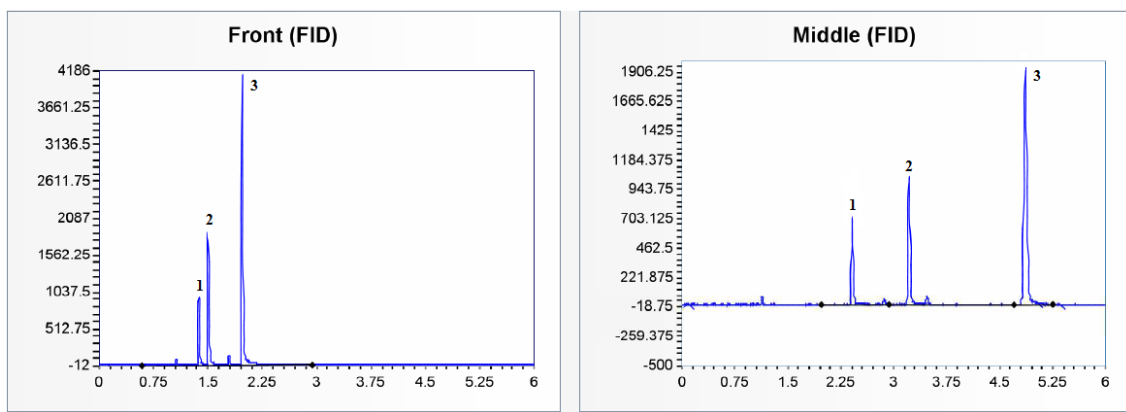
**Figura 14 - Cromatogramas obtidos usando a temperatura do forno a 40°C e com um fluxo das colunas pneumáticas a 3 mL/min. Sinal cromatográfico: (1) – Etanol; (2) – Acetonitrilo; (3) – n-Propanol**

Por último otimizou-se a temperatura dos detetores (150, 200, 250 e 300°C) e os fluxos dos gases utilizados pelo equipamento: hélio (5, 15, 25, 50 mL/min); hidrogénio (30, 35 e 40 mL/min) e ar (300, 350 e 400 mL/min). Nas figuras 15, 16, 17 e 18 são apresentados os cromatogramas obtidos da análise de um controlo médio para as diferentes temperaturas dos detetores. Por comparação, as figuras 16 e 17 apresentaram maior ruído na linha de base, pelo que foram descartadas. Entre as figuras 15 e 18, as que apresentaram maior estabilidade na linha de base, optou-se por definir a temperatura dos detetores a 300°C (figura 18), uma vez que, segundo a literatura, a altura do pico cresce em proporção ao aumento da temperatura do FID (85,141).

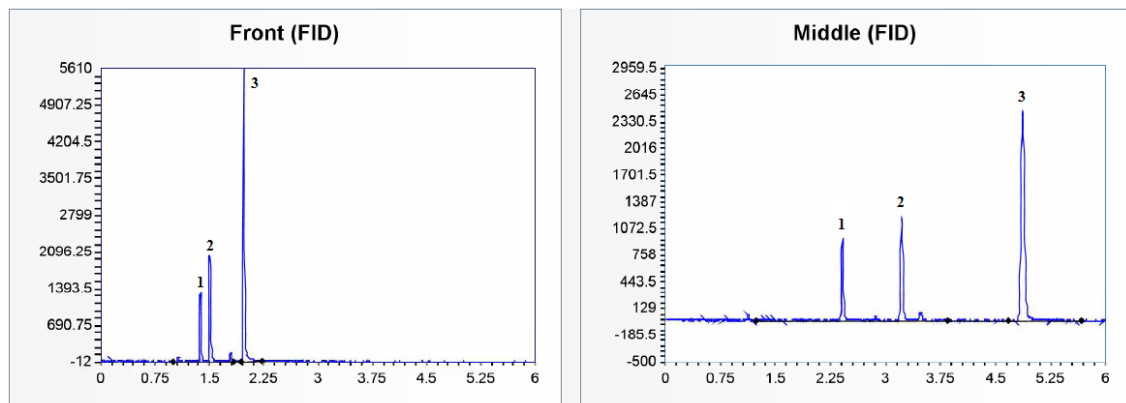
Relativamente aos gases utilizados durante a análise, o hélio foi o gás de arraste, desempenhando assim um papel importante dado que é ele que transporta a amostra desde o injetor até à coluna cromatográfica e consequentemente até ao detetor, atuando como fase móvel. O fluxo selecionado para este gás foi de 15 mL/min. Quanto aos gases combustores, o hidrogénio e o ar, estes operaram a 30 e 300 mL/min, respetivamente. Com estes fluxos de gases os cromatogramas apresentaram uma linha de base estável e foram suficientes para destruir totalmente a amostra no final da análise não havendo contaminações nas subsequentes.



**Figura 15 - Cromatogramas obtidos usando a temperatura dos detectores a 150°C.  
Sinal cromatográfico: (1) – Etanol; (2) – Acetonitrilo; (3) – n-propanol**



**Figura 16 - Cromatogramas obtidos usando a temperatura dos detectores a 200°C.  
Sinal cromatográfico: (1) – Etanol; (2) – Acetonitrilo; (3) – n-propanol**



**Figura 17 - Cromatogramas obtidos usando a temperatura dos detectores a 250°C.  
Sinal cromatográfico: (1) – Etanol; (2) – Acetonitrilo; (3) – n-propanol**

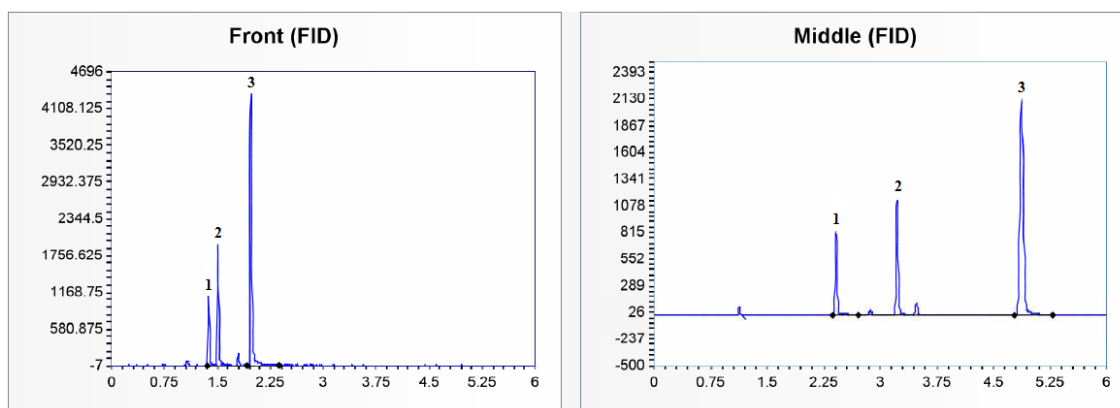


Figura 18 - Cromatogramas obtidos usando a temperatura dos detetores a 300°C.  
Sinal cromatográfico: (1) – Etanol; (2) – Acetonitrilo; (3) – n-propanol

Depois de estarem otimizadas todas as condições essenciais à análise em estudo fixou-se o tempo de corrida em 3 minutos, por ser suficiente para a eluição das duas substâncias de interesse, apresentando uma separação cromatográfica entre a substância de interesse e o padrão interno suficiente para a sua determinação.

#### 4.4. Análise instrumental (HS-GC-FID)

Antes das amostras serem injetadas, os *vials* foram incubados durante 8 minutos, no forno do injetor automático de *headspace* que se manteve a 70°C. Outras condições analíticas do *headspace* foram: temperatura da seringa a 70°C, agitação 250 rotações por minuto (rpm) com agitação ON durante 5 segundos e OFF por 2 segundos. O volume de injeção foi de 500 µL.

As condições cromatográficas utilizadas foram as seguintes: A temperatura do injetor foi mantida a 200°C. A temperatura do forno foi de 40°C mantendo-se isotérmica durante 3 minutos, tempo total de cada ciclo analítico. O hélio foi utilizado como gás de arraste e o fluxo da coluna pneumática foi mantido constante a 3 mL/min. Os detetores foram mantidos a 300°C. Os fluxos para os gases utilizados foram os seguintes: hélio (*make-up*) – 15 mL/min, hidrogénio – 30 mL/min e ar – 300 mL/min. Na tabela 8 é possível observar a comparação entre os principais parâmetros analíticos da metodologia utilizada na rotina do SQTF-DC, para a determinação de etanol em amostras de sangue, e os otimizados no presente estudo.

**Tabela 8 - Tabela comparativa entre os principais parâmetros analíticos da metodologia de rotina do SQTf-DC e os da metodologia otimizada**

<b>Componente</b>	<b>Metodologia de rotina</b>	<b>Metodologia otimizada</b>
<b>Padrão interno</b>	n-Propanol	Acetonitrilo
<b>Condições do <i>headspace</i></b>		
<b>Incubação</b>	12 min a 55°C	8 min a 70°C
<b>Agitação</b>	5 sec ON (250 rpm) e 2 sec OFF	
<b>Seringa</b>	70°C	
<b>Condições cromatográficas</b>		
<b>Injetor</b>	200°C	
<b>Forno</b>	6 min a 35°C	3 min a 40°C
<b>Fluxo das colunas pneumáticas</b>	2,5 mL/min	3 mL/min
<b>Detetores</b>	290°C	300°C
<b>He (<i>make-up</i>)</b>	25 mL/min	15 mL/min
<b>H<sub>2</sub></b>	30 mL/min	
<b>Ar</b>	300 mL/min	

#### 4.5. Identificação das substâncias

Para a determinação por HS-GC-FID do etanol presente nas amostras em estudo foi utilizado um critério de identificação de substâncias: o tempo de retenção relativo ( $t_{RR}$ ). O  $t_{RR}$  pode ser calculado através da razão entre o tempo de retenção do analito e o tempo de retenção do padrão interno (equação 1), visto que o padrão interno está sujeito às mesmas condições analíticas que o analito de interesse.

Para que o resultado seja considerado positivo é necessário que ambos os critérios sejam cumpridos, ou seja, é essencial que o cromatograma revele a presença de um sinal cromatográfico cujo  $t_{RR}$  seja idêntico ao da substância de referência analisada nas mesmas condições (aceitando-se uma variação de  $\pm 0,7\%$ ) e que esse mesmo sinal apresente uma concentração igual ou superior a 0,10 g/L (142–146).

$$t_{RR} = \frac{t_{R_{Analito}}}{t_{R_{Padr\tilde{a}o\ Interno}}} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

$t_{R_{Analito}}$  é o tempo de retenção do analito;

$t_{R_{Padr\tilde{a}o\ Interno}}$  é o tempo de retenção do padrão interno.

Com o objetivo de garantir que todas as substâncias em estudo fossem devidamente identificadas e distinguidas entre si, foram utilizadas duas colunas cromatográficas com polaridades diferentes.

Para a referida análise, todas as amostras foram preparadas à concentração de 5 g/L e analisadas juntamente com o padrão interno. Deste modo foi possível conhecer o tempo de retenção associado a cada uma das substâncias.

Na figura 19 encontram-se dois cromatogramas obtidos após a análise de um calibrador de etanol a 5,00 g/L, à direita a coluna *Middle* (VF-624ms) que foi a coluna utilizada para a identificação e quantificação de todas as substâncias em estudo e à esquerda a coluna *Front* (VF-5ms) que foi utilizada como coluna de confirmação.

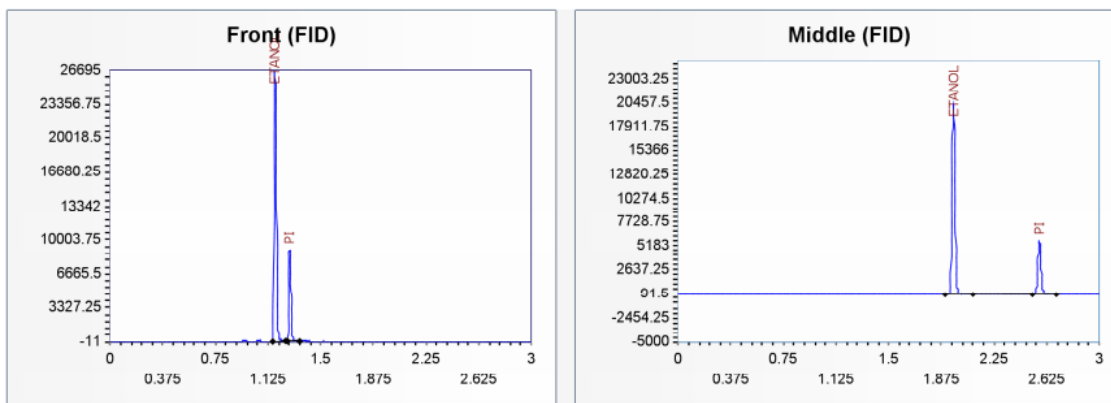


Figura 19 - Cromatogramas representativos de um calibrador a 5,00 g/L

Com recurso ao *software* do equipamento cromatográfico foi possível determinar os tempos de retenção do analito de interesse e do padrão interno em cada uma das colunas, os quais se encontram na tabela 9.

Tabela 9 - Tempos de retenção das substâncias em estudo

Substância		VF-624ms <i>Middle</i>	VF-5ms <i>Front</i>
<b>Etanol</b>	Analito de interesse	1,97	1,18
<b>Acetonitrilo</b>	Padrão interno	2,58	1,28

#### 4.6. Validação da metodologia analítica desenvolvida

Apesar de ser um processo moroso, a validação é indispensável para conferir credibilidade à metodologia analítica desenvolvida (100). Para garantir a fiabilidade, utilidade e reprodutibilidade da metodologia analítica desenvolvida, efetuou-se a validação da mesma de acordo com as normas do SWGTOX (126). Em geral, foram avaliados os parâmetros considerados mais significativos e que devem ser estudados num processo de validação de uma metodologia analítica para determinações qualitativas e quantitativas de um ou mais analitos numa determinada matriz biológica.

De seguida, são apresentados os procedimentos e os resultados obtidos para cada um dos parâmetros.



#### 4.6.1. Seletividade/Especificidade

Para avaliar este parâmetro utilizou-se um total 63 amostras de matrizes biológicas distribuídas da seguinte maneira: 23 – humor vítreo (tabela 10), 20 – sangue (tabela 11) e 20 – urina (tabela 12), todas elas negativas para o etanol após efetuada a análise de rotina por HS-GC-FID. Para cada matriz biológica, as amostras foram agrupadas de forma aleatória, em grupos de quatro (500 µL de cada amostra). Após a formação de 10 misturas (*pools*) com 2 mL cada, estas foram homogeneizadas, e posteriormente foram preparadas 2 alíquotas de 100 µL de cada uma das *pools*, criando-se assim dois grupos com 10 alíquotas cada. As amostras do primeiro grupo foram preparadas através da adição de 1 mL de padrão interno à matriz biológica. As restantes amostras, referentes ao segundo grupo, foram fortificadas com a substância em estudo numa concentração de 0,20 g/L e 1 mL de padrão interno. A positividade/negatividade das amostras foi avaliada com base na presença/ausência de sinais cromatográficos e no critério de identificação de substâncias, isto é, o tempo de retenção relativo.

**Tabela 10 - Informação sobre as amostras de humor vítreo utilizadas para constituir as *pools***

Amostra	Idade	Sexo	Informação disponível	Análises solicitadas
1	80	M	Acidente de viação	A, M
2	51	F	Acidente de viação	A, D, M, P
3	47	F	-	A, D, M, P
4	77	F	-	A, MC
5	33	M	Acidente de viação	A, D, M
6	49	F	Morte natural	A, D, M, P
7	80	M	Morte natural	A, M, P
8	55	M	Acidente de viação	A, DA, MD
9	78	F	Morte natural	A, MD, P, MC
10	68	M	-	A, MD
11	87	F	Suicídio	A, MD, P
12	37	F	-	A, DA, MD, P
13	61	F	-	A, DA, MD, P
14	62	M	Acidente de viação	A, DA
15	45	M	-	A, DA, MD, P
16	69	M	Morte natural	A
17	83	M	Suicídio	A, MD, P
18	49	M	Suicídio	A, DA, MD
19	62	M	-	A, DA, MD, P

Determinação *post mortem* de etanol em diferentes tipos de amostras biológicas:  
Desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica por HS-GC-FID em contexto forense

**Tabela 10 - Informação sobre as amostras de humor vítreo utilizadas para constituir as *pools* (continuação)**

20	67	M	Morte natural	A, P, MC
21	53	M	Morte natural	A, DA, MD, P, MC
22	22	M	Acidente de viação	A, DA
23	33	M	-	A, DA, MD

Abreviaturas utilizadas nesta tabela: F (Feminino); M (Masculino); A (Alcoolemia); DA (Drogas de Abuso); MD (Medicamentos); P (Pesticidas); MC (Monóxido de Carbono) - (Informação não disponível).

**Tabela 11 - Informação sobre as amostras de sangue utilizadas para constituir as *pools***

Amostra	Idade	Sexo	Informação disponível	Análises solicitadas
1	82	M	Acidente de viação	A, DA
2	37	F	Acidente de viação	A, DA
3	71	M	Acidente de viação	A, DA
4	81	M	Acidente de viação	A, DA
5	18	M	Acidente de viação	A, DA
6	37	M	Acidente de viação	A, DA
7	45	F	Acidente de viação	A, DA
8	20	M	Acidente de viação	A, DA
9	32	M	Acidente de viação	A, DA
10	65	M	Acidente de viação	A, DA
11	35	M	-	A, DA, MD, P
12	67	M	-	A, DA, P
13	71	F	-	A, DA, MD, P
14	80	M	Acidente doméstico	A, MD
15	72	F	-	A, MD
16	83	M	Suicídio	A, DA, MD, P
17	77	M	Suicídio	A, DA, MD, P
18	75	M	Morte natural	A, MD
19	50	F	-	A, DA, MD, P
20	93	F	Morte natural	A, MD

Abreviaturas utilizadas nesta tabela: F (Feminino); M (Masculino); A (Alcoolemia); DA (Drogas de Abuso); MD (Medicamentos); P (Pesticidas); - (Informação não disponível).

**Tabela 12 - Informação sobre as amostras de urina utilizadas para constituir as *pools***

Amostra	Idade	Sexo	Informação disponível	Análises solicitadas
1	42	F	-	A
2	14	F	Suspeita de intoxicação	A, DA, MD
3	52	M	-	A
4	35	M	-	A, DA, MD, P
5	67	M	-	A, MD, P
6	71	F	-	A, DA, MD, P
7	50	F	-	A, DA, MD, P
8	81	F	-	A, MD, P
9	75	F	-	A, DA, MD, P
10	90	M	-	A
11	51	F	Suicídio	A, DA, MD, P
12	44	M	-	A, DA, MD, P
13	41	M	Acidente de trabalho	A, DA
14	74	M	Suicídio	A, DA, MD, P
15	75	M	-	A, MD
16	83	M	-	A, MD, P
17	76	M	-	A, MD, P
18	47	M	-	A, DA, MD, P
19	78	M	Suicídio	A, DA, MD, P
20	67	M	-	A, DA, MD, P, MC

Abreviaturas utilizadas nesta tabela: F (Feminino); M (Masculino); A (Alcoolemia); DA (Drogas de Abuso); MD (Medicamentos); P (Pesticidas); MC (Monóxido de Carbono); - (Informação não disponível).

Por observação dos cromatogramas obtidos da análise de amostras não fortificadas foi possível verificar a inexistência de quaisquer sinais cromatográficos capazes de interferir na correta determinação e quantificação das substâncias de interesse. A título de exemplo são apresentados na figura 20 os cromatogramas obtidos da análise de uma amostra aleatória de sangue não fortificada. A análise dos resultados confirmou que em todas as amostras das diferentes matrizes biológicas, às quais não foi adicionado etanol, apresentaram resultados negativos, tabela 13.

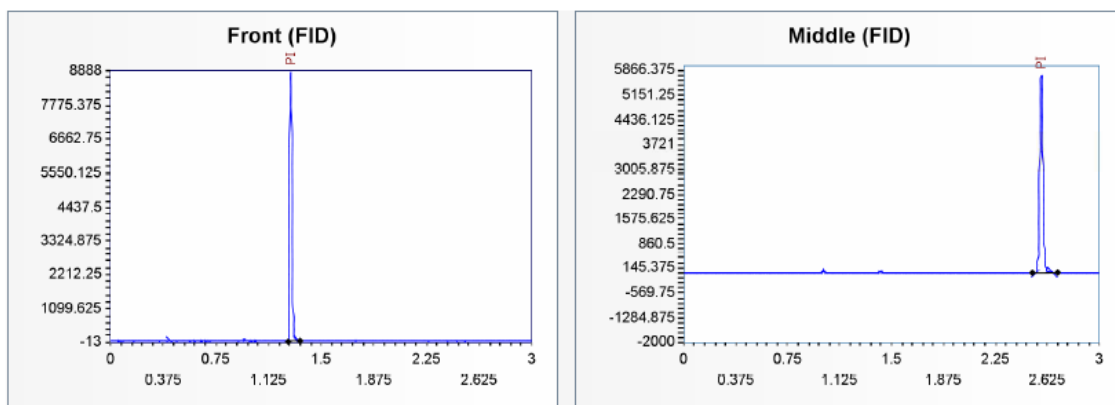


Figura 20 - Cromatogramas obtidos para uma amostra de sangue não fortificada - Colunas VF-5ms (à esquerda) e VF-624ms (à direita)

Tabela 13 - Resultados obtidos na análise das amostras não fortificadas para o estudo da seletividade

<b>Análise das amostras não fortificadas</b>			
<b>Amostra</b>	<b>Humor vítreo</b>	<b>Sangue</b>	<b>Urina</b>
<b>Pool 1</b>	Negativo	Negativo	Negativo
<b>Pool 2</b>	Negativo	Negativo	Negativo
<b>Pool 3</b>	Negativo	Negativo	Negativo
<b>Pool 4</b>	Negativo	Negativo	Negativo
<b>Pool 5</b>	Negativo	Negativo	Negativo
<b>Pool 6</b>	Negativo	Negativo	Negativo
<b>Pool 7</b>	Negativo	Negativo	Negativo
<b>Pool 8</b>	Negativo	Negativo	Negativo
<b>Pool 9</b>	Negativo	Negativo	Negativo
<b>Pool 10</b>	Negativo	Negativo	Negativo
<b>Percentagem de falso positivos: 0%</b>			

Por outro lado, a análise dos cromatogramas obtidos da análise de uma amostra de sangue fortificada apresentam somente o sinal analítico do analito de interesse e do padrão interno, verificando-se também a ausência de outros sinais interferentes, figura 21.

Os cromatogramas obtidos para as restantes matrizes biológicas (fortificadas e não fortificadas) encontram-se no anexo 7.2.1.. Nas amostras às quais foi adicionado o analito de interesse (etanol a 0,20 g/L), todas foram consideradas positivas, tabela 14. Esta positividade foi confirmada através da análise dos tempos de retenção relativos.

A percentagem de falso positivos e de falso negativos foi de 0%, obedecendo-se assim aos critérios de aceitação em vigor no SQTf-DC, onde para os respetivos parâmetros a percentagem de falso positivos deve ser de 0% e inferior a 10% para os falso negativos.

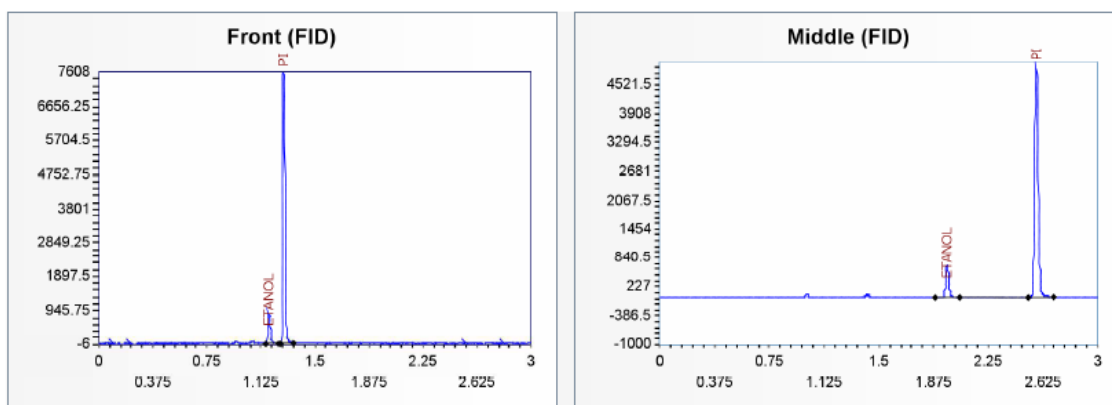


Figura 21 - Cromatogramas obtidos para uma amostra de sangue fortificada com etanol a 0,20 g/L - Colunas VF-5ms (à esquerda) e VF-624ms (à direita)

Tabela 14 - Resultados obtidos na análise das amostras fortificadas para o estudo da seletividade

Análise das amostras fortificadas			
Amostra	Humor vítreo	Sangue	Urina
Pool 1	Positivo	Positivo	Positivo
Pool 2	Positivo	Positivo	Positivo
Pool 3	Positivo	Positivo	Positivo
Pool 4	Positivo	Positivo	Positivo
Pool 5	Positivo	Positivo	Positivo
Pool 6	Positivo	Positivo	Positivo
Pool 7	Positivo	Positivo	Positivo
Pool 8	Positivo	Positivo	Positivo
Pool 9	Positivo	Positivo	Positivo
Pool 10	Positivo	Positivo	Positivo
<b>Percentagem de falso negativos: 0%</b>			

Os resultados referentes aos tempos de retenção relativos ( $t_{RR}$ ) encontram-se na tabela 15. O critério  $t_{RR}$  foi cumprido em todas as *pools*, para as diferentes matrizes biológicas, verificando-se uma variação inferior a  $\pm 0,7\%$ .

**Tabela 15 - Tempos de retenção relativos ( $t_{RR}$ ), em minutos, do etanol em cada uma das amostras nas diferentes matrizes biológicas**

Amostra	Matriz biológica		
	Humor vítreo	Sangue	Urina
<b>Pool 1</b>	0,764	0,764	0,764
<b>Pool 2</b>	0,764	0,764	0,764
<b>Pool 3</b>	0,763	0,764	0,764
<b>Pool 4</b>	0,767	0,764	0,764
<b>Pool 5</b>	0,763	0,764	0,764
<b>Pool 6</b>	0,763	0,764	0,764
<b>Pool 7</b>	0,760	0,764	0,764
<b>Pool 8</b>	0,764	0,764	0,764
<b>Pool 9</b>	0,763	0,764	0,764
<b>Pool 10</b>	0,763	0,764	0,764

#### 4.6.2. Identificação de interferentes

De forma a estudar a possível existência de interferentes que possam condicionar a correta interpretação dos resultados analíticos obtidos, selecionaram-se e analisaram-se, individualmente, as substâncias: acetaldeído, acetato de etilo, acetona, éter dietílico, isopropanol, metanol, n-butanol e n-propanol. A seleção destas substâncias teve por base o facto de estas estarem referenciadas na literatura como sendo as mais amplamente detetadas nas análises forenses para a determinação de etanol *post mortem*. Para além deste critério de seleção, estas substâncias também são detetadas num procedimento validado no SQTF-DC para a determinação de voláteis.

Segundo a norma SWGTOX, as amostras devem ser fortificadas com soluções interferentes a altas concentrações, desta forma foram preparadas soluções individuais a 5 g/L, exceto o éter dietílico que demonstrou uma elevada resposta em comparação aos sinais cromatográficos do etanol e do padrão interno, sendo por isso analisado numa concentração de 1 g/L. Para a preparação de todos os *vials* foi pipetado 1 mL de padrão interno, 100  $\mu$ L de etanol a 5 g/L e 100  $\mu$ L da solução interferente.

A coluna utilizada para a análise das diferentes substâncias foi a VF-624ms (*middle*) e a coluna VF-5ms (*front*) foi utilizada com o objetivo de confirmar os resultados obtidos, devendo esta ser sempre tomada em consideração.

Através da análise dos cromatogramas foi possível verificar que só apenas 4 das substâncias analisadas é que eluíram, na coluna VF-624ms, dentro do intervalo de corrida de 3 minutos, sendo elas o acetaldeído, a acetona, o éter dietílico e o metanol. Todas estas substâncias exibiram tempos de retenção diferentes e distantes das substâncias de interesse (analito e padrão interno). Como as restantes substâncias, o acetato de etilo, o isopropanol, o n-butanol e o n-propanol não eluíram durante este intervalo de corrida na coluna VF-624ms, não interferem com os resultados obtidos.

Dos 8 interferentes analisados, à exceção da acetona, todos eluíram na coluna VF-5ms (coluna de confirmação), sendo que duas substâncias, o acetaldeído e metanol, exibiram o mesmo tempo de retenção de 1,05 minutos. Apesar de nenhuma substância se sobrepor aos sinais do etanol e do acetonitrilo, o sinal cromatográfico do éter dietílico é o que mais se aproxima do sinal do padrão interno, mantendo, no entanto, uma boa separação cromatográfica deste.

Por observação da tabela 16, conclui-se que todos os interferentes analisados eluem pelo menos numa das colunas utilizadas, excetuando o acetaldeído, o éter dietílico e o metanol, que eluem em ambas. Os respetivos cromatogramas são apresentados no anexo 7.2.2..

**Tabela 16 - Tempos de retenção das substâncias interferentes**

<b>Interferente</b>	<b>VF-624ms</b>	<b>VF-5ms</b>
<b>Acetaldeído</b>	1,43	1,05
<b>Acetato de etilo</b>	-	2,10
<b>Acetona</b>	2,33	-
<b>Éter dietílico</b>	2,10	1,35
<b>Isopropanol</b>	-	1,60
<b>Metanol</b>	1,45	1,05
<b>n-Butanol</b>	-	2,80
<b>n-Propanol</b>	-	1,60

### **4.6.3. Gama de trabalho**

Para o estudo da gama de trabalho utilizaram-se 7 concentrações uniformemente distribuídas ao longo da gama pretendida. A gama de trabalho foi avaliada segundo a relação entre a concentração analisada e a resposta analítica (razão entre as áreas do analito e do padrão interno), através de cálculos estatísticos de regressão. Com base no gráfico e na respetiva linha de tendência pode-se avaliar se o procedimento de calibração desenvolvido é ou não apropriado para a análise em estudo.

Com o estudo da gama de trabalho procurou-se avaliar se, num determinado intervalo de concentrações, as áreas dos sinais cromatográficos eram diretamente proporcionais às concentrações utilizadas. O analito de interesse, neste caso o etanol, foi estudado numa gama de concentrações entre 0,10-5,00 g/L. Para além das gamas de trabalho descritas na literatura com evidências de possível produção de etanol *post mortem*, a seleção do intervalo de concentrações utilizado no presente estudo teve também em consideração a gama de trabalho utilizada na rotina laboratorial do SQTf-DC para a quantificação de etanol no sangue. A compilação de toda esta informação, juntamente com o facto de a concentração de etanol ser considerada positiva a partir dos 0,10 g/L, originou a gama de trabalho definida.

É importante fazer uma análise visual antes de qualquer avaliação estatística de forma a observar se os pontos, quando dispostos num gráfico, apresentam uma relação linear aparente. Pela análise das figuras 22 e 23, que apresentam as retas de calibração obtidas

para as colunas VF-5ms e VF-624ms, respetivamente, verifica-se através do valor do coeficiente de determinação,  $r^2$ , que as áreas dos sinais cromatográficos são diretamente proporcionais às concentrações analisadas, dado que as duas retas de calibração apresentam valores de  $r^2$  superiores a 0,99.

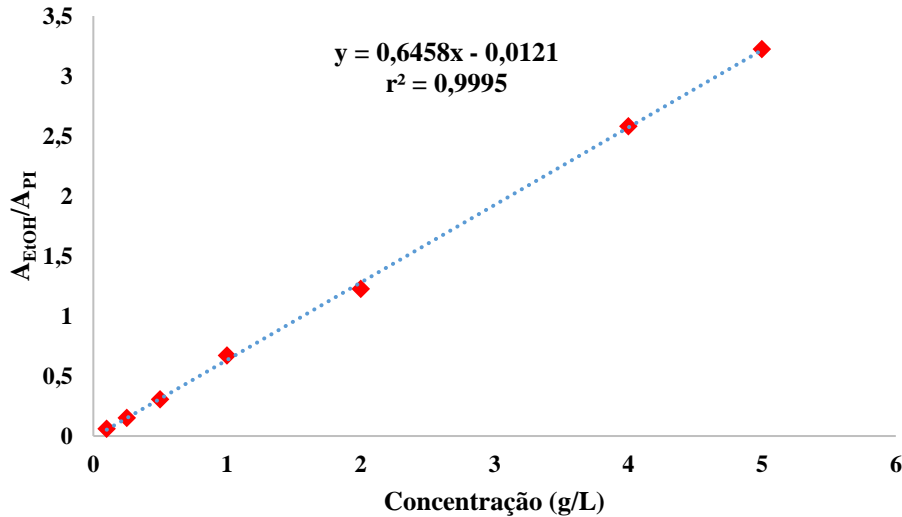


Figura 22 - Reta de calibração para a coluna VF-5ms (*front*)

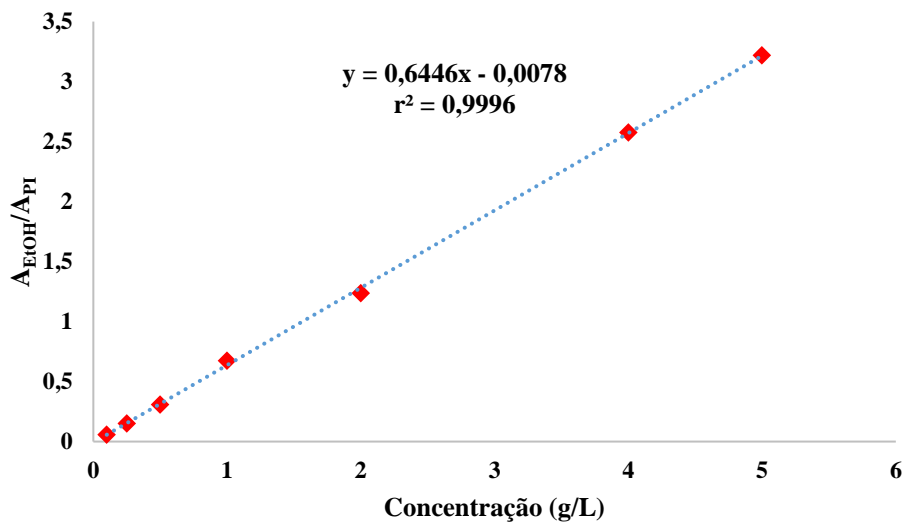


Figura 23 - Reta de calibração para a coluna VF-624ms (*middle*)

#### 4.6.4. Linearidade e modelo de calibração

Segundo a norma SWGTOX, o número de calibradores utilizados na construção da reta deve ser suficiente para definir, adequadamente, a relação concentração-resposta. A linearidade foi avaliada através da análise de 10 calibradores de concentrações conhecidas e uniformemente distribuídas em função do intervalo de concentrações da gama de trabalho pré-definido. Foi preparada uma reta de calibração, como descrito na tabela 17, com soluções de trabalho distribuídas entre 0,10 e 5,00 g/L.



Dada a associação entre o modelo de calibração e a homocedasticidade do método, este último parâmetro foi estudado juntamente com a linearidade. Foram analisados os calibradores de concentração baixa (0,10 g/L) e alta (5,00 g/L) em quintuplicado, de forma a demonstrar se a variância dos erros se mantém contante ou não. Caso a variância se mantenha constante, o método demonstra homocedasticidade, caso contrário, isto é, se se verificar diferenças nos valores das variâncias, o método apresenta heterocedasticidade.

**Tabela 17 - Preparação dos calibradores para o estudo da linearidade**

	Solução de trabalho de padrões de referência (µL)		Solução de PI a 0,1 g/L (mL)
Calibrador 0,10 g/L	100	3.2.4.1.3.1.	1
Calibrador 0,25 g/L	100	3.2.4.1.3.2.	1
Calibrador 0,50 g/L	100	3.2.4.1.3.3.	1
Calibrador 0,75 g/L	100	3.2.4.1.4.1.	1
Calibrador 1,00 g/L	100	3.2.4.1.3.4.	1
Calibrador 2,00 g/L	100	3.2.4.1.3.5.	1
Calibrador 3,00 g/L	100	3.2.4.1.4.2.	1
Calibrador 4,00 g/L	100	3.2.4.1.3.6.	1
Calibrador 4,50 g/L	100	3.2.4.1.4.3.	1
Calibrador 5,00 g/L	100	3.2.4.1.3.7.	1

Previamente ao estudo da linearidade, deve-se avaliar a homocedasticidade das variâncias para definir qual o modelo de calibração a utilizar. Para tal, recorreu-se a um teste de Fisher (F), no qual o valor de F experimental ( $F_{exp}$ ) é calculado através da equação 2.

$$F_{exp} = \frac{S_2^2}{S_1^2} \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

$S_1^2$  é a variância da razão entre as áreas do analito e do padrão interno das alíquotas fortificadas com concentração igual ao calibrador de menor concentração;

$S_2^2$  é a variância da razão entre as áreas do analito e do padrão interno das alíquotas fortificadas com concentração igual ao calibrador de maior concentração.

O valor obtido a partir desta equação deve ser comparado com o valor teórico de  $F$  ( $F_{crit}$ ), dado pela equação 3. Se  $F_{exp} \leq F_{crit}$  a hipótese nula é verdadeira, ou seja, existe homocedasticidade e pode-se utilizar o modelo de regressão linear simples. Por outro lado, se  $F_{exp} > F_{crit}$  a função de calibração apresenta heterocedasticidade e deve-se recorrer a um modelo de regressão linear ponderada.

$$F_{crit} = (f_1; f_2; 0,95) \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

$f_1$  são os graus de liberdade ( $n-1$ ) correspondentes ao primeiro conjunto de alíquotas (calibrador de maior concentração);

$f_2$  são os graus de liberdade ( $n-1$ ) correspondentes ao segundo conjunto de alíquotas (calibrador de menor concentração);

**0,95** corresponde a um nível de confiança de 95%.

Na tabela 18 apresentam-se o valor de  $F_{exp}$  obtido para o etanol, assim como o valor tabelado da distribuição de Fisher ( $F_{crit}$ ) para  $n-1$  graus de liberdade a um nível de confiança de 95%. Através da sua observação conclui-se que há heterocedasticidade, dado que se verifica que o  $F_{exp} > F_{crit}$ . Os resultados obtidos no estudo da homocedasticidade das variâncias podem ser consultados sob forma mais detalhada no anexo 7.2.3.. Dado que a função de calibração evidencia heterocedasticidade e como não se pretende diminuir a gama de trabalho, é fundamental introduzir um fator de ponderação ( $w$ ) que reduza os efeitos da contribuição dos calibradores mais concentrados. Os fatores de ponderação estudados foram  $w = : 1/x; 1/x^2; 1/x^{1/2}; 1/y; 1/y^2; 1/y^{1/2}$ .

**Tabela 18 - Resultados obtidos para a homocedasticidade das variâncias: Teste de Fisher**

Substância	Homocedasticidade	
	$F_{critico}$	$F_{experimental}$
Etanol	6,39	492,69

Considerando um modelo de regressão linear ponderada ( $y = bx + a$ ), o declive da reta ( $b$ ) e a ordenada na origem ( $a$ ) são calculados através das equações 4 e 5, respetivamente.

$$b = \frac{\sum wi \times \sum wixiyi - \sum wixi \times \sum wiyi}{\sum wi \times \sum wixi^2 - (\sum wixi)^2} \quad \text{Equação 4}$$

$$a = \frac{\sum wixi^2 \times \sum wiyi - \sum wixi \times \sum wixiyi}{\sum wi \times \sum wixi^2 - (\sum wixi)^2} \quad \text{Equação 5}$$

Para a seleção do fator de ponderação, deve-se analisar simultaneamente o somatório dos resíduos ( $\Sigma \text{res}$ ) em percentagem, que é calculado através da soma dos erros relativos associados a cada calibrador (equação 6) e o coeficiente de determinação ( $r^2$ ), segundo a equação 7. Sendo assim, o fator de ponderação mais adequado é aquele que apresentar o menor valor do  $\Sigma \text{res}$  e um  $r^2$  próximo da unidade, isto porque quanto menor for o valor do  $\Sigma \text{res}$  melhor será o ajuste dos valores experimentais relativamente aos teóricos e quanto maior for o valor de  $r^2$  mais forte é a correlação entre as duas variáveis e mais linear é o modelo de regressão proposto.

$$ER (\%) = \frac{C_{Exp} - C_{Teor}}{C_{Teor}} \times 100 \quad \text{Equação 6}$$

Onde:

**ER** é o erro relativo, em percentagem;

**C<sub>exp</sub>** é a concentração experimental;

**C<sub>teor</sub>** é a concentração teórica.

$$r^2 = \left( \frac{\Sigma wi \times \Sigma wixiyi - \Sigma wixi \times \Sigma wiyi}{\sqrt{\Sigma wi \times \Sigma wixi^2 - (\Sigma wixi)^2} \times \sqrt{\Sigma wi \times \Sigma wiyi^2 - (\Sigma wiyi)^2}} \right)^2 \quad \text{Equação 7}$$

O fator de ponderação foi determinado através da análise das retas de calibração obtidas no estudo da precisão intermédia, isto é, cinco retas de calibração com sete pontos preparadas em cinco dias diferentes. Após a injeção das amostras, efetuou-se a análise das retas de calibração com aplicação dos diferentes fatores de ponderação, a partir dos quais se calcularam o somatório dos resíduos e o coeficiente de determinação para cada reta. Os resultados obtidos deste estudo encontram-se no anexo 7.2.3..

Com base no estudo efetuado selecionou-se o fator de ponderação  $w = 1/x^2$ , uma vez que se verificou ser o que minimizava os efeitos da contribuição dos calibradores mais concentrados. Este fator de ponderação apresentou o menor valor do  $\Sigma \text{res}$  e um valor de  $r^2$  satisfatório.

Após terem sido avaliados a homocedasticidade e o fator de ponderação, procedeu-se à avaliação da linearidade. Os critérios de aceitação referentes à linearidade foram os seguintes:  $r^2$  superior a 0,99, a inclusão do valor zero na interseção da reta com o eixo das ordenadas tendo em consideração um intervalo de confiança de 95% e a análise do gráfico dos valores residuais.

Na tabela 19 estão resumidos os resultados obtidos para o estudo da linearidade e no anexo 7.2.3. são apresentados, sob a forma de gráficos e tabelas os restantes dados, nomeadamente o tratamento estatístico dos resultados.

**Tabela 19 - Resultados obtidos no estudo da linearidade**

Equação	r <sup>2</sup>	Erro padrão (S <sub>y/x</sub> )	Intervalo da interseção da ordenada na origem	
			95 % inf.	95 % sup.
y = 0,6411 x - 0,0039	0,9987	0,0445	0,6651	2,4441

Considerando os resultados obtidos no estudo da linearidade pôde-se concluir que a quantificação do etanol, considerando um fator de ponderação de  $1/x^2$ , é linear na gama de trabalho estudada (0,10-5,00 g/L).

#### 4.6.5. Limiares analíticos: limite de deteção e limite de quantificação

A determinação dos limiares analíticos foi efetuada através do estudo de uma reta de calibração. Para estabelecer o limite de deteção e o limite de quantificação do etanol, foi preparada uma reta de calibração com 7 pontos, distribuídos o mais uniformemente possível e próximos do limite de deteção esperado. A reta de calibração foi construída através da preparação de calibradores com concentrações crescentes das soluções de trabalho e o respetivo padrão interno, como apresentado na tabela 20.

**Tabela 20 - Preparação dos calibradores para o estudo dos limiares analíticos**

	Solução de trabalho de padrões de referência (µL)		Solução de PI a 0,1 g/L (mL)
Calibrador 0,025 g/L	100	3.2.4.1.5.1.	1
Calibrador 0,05 g/L	100	3.2.1.5.2.	1
Calibrador 0,10 g/L	100	3.2.4.1.3.1.	1
Calibrador 0,15 g/L	100	3.2.4.1.5.3.	1
Calibrador 0,20 g/L	100	3.2.4.1.5.4.	1
Calibrador 0,25 g/L	100	3.2.4.1.3.2.	1
Calibrador 0,30 g/L	100	3.2.4.1.5.5.	1

Depois de construída a reta de calibração foram determinadas a equação da mesma, o seu coeficiente de determinação e o erro padrão associado. Tais valores demonstraram-se satisfatórios, dado que se encontravam dentro dos critérios de aceitação pretendidos. A determinação do LD e do LQ foi baseada nos parâmetros da reta de calibração, utilizando

o desvio padrão da resposta analítica obtida e o declive da reta de calibração. Estes cálculos foram efetuados através das equações 8 e 9.

$$LD = \frac{3,3 \times S_{y/x}}{b} \quad \text{Equação 8}$$

$$LQ = \frac{10 \times S_{y/x}}{b} \quad \text{Equação 9}$$

Onde:

$S_{y/x}$  é o desvio padrão residual da reta de calibração;

$b$  é o declive da reta de calibração.

Após a construção da reta de calibração, utilizando o fator de ponderação  $1/x^2$ , foram calculados os LD e LQ através das equações referidas anteriormente e os resultados obtidos estão resumidos na tabela 21. No anexo 7.2.4. encontram-se os resultados complementares.

Tabela 21 - Resultados obtidos no estudo dos limiares analíticos

Equação	$r^2$	Erro padrão ( $S_{y/x}$ )	LD (g/L)	LQ (g/L)
$y = 0,6254 x - 0,0026$	0,9976	0,0024	0,013	0,038

Tendo em consideração a gama de trabalho definida para a presente metodologia (0,10-5,00 g/L) os limiares analíticos calculados são adequados, denotando-se ainda um intervalo relativamente ao calibrador menos concentrado cuja concentração é de 0,10 g/L.

## 4.6.6. Precisão

### 4.6.6.1. Repetibilidade

A repetibilidade da metodologia foi estudada através da análise de 5 replicados independentes dos controlos de qualidade internos nos 3 níveis de concentração distintos: baixo (0,10 g/L), médio (0,50 g/L) e alto (1,20 g/L) no mesmo dia. Na tabela 22 estão apresentadas as concentrações dos CQI, bem como os respetivos volumes utilizados.

**Tabela 22 - Controlos para o estudo da repetibilidade**

	Solução de trabalho de padrões de referência ( $\mu\text{L}$ )	Solução de PI a 0,10 g/L (mL)
Controlo positivo (0,10 g/L)	100	3.2.4.1.7.1.
Controlo positivo (0,50 g/L)	100	3.2.4.1.7.2.
Controlo positivo (1,20 g/L)	100	3.2.4.1.7.3.

Uma vez aplicado o procedimento de ensaio, foram obtidos os tempos de retenção e as áreas dos sinais cromatográficos para o analito e o padrão interno, em cada replicado. Para a avaliação deste parâmetro calculou-se a média dos tempos de retenção relativos e das razões das áreas entre o analito e o padrão interno, os respetivos desvios padrão e coeficientes de variação.

A tabela 23 resume os resultados obtidos para os três níveis de concentração estudados. No anexo 7.2.5.1. encontram-se os restantes dados e cálculos efetuados.

**Tabela 23 - Resumo dos resultados obtidos no estudo da repetibilidade**

Concentração (g/L)	t <sub>RR</sub>			Áreas relativas		
	Média	Desvio padrão	CV (%)	Média	Desvio padrão	CV (%)
<b>0,10</b>	0,762	0,002	0,2	0,057	0,002	2,7
<b>0,50</b>	0,764	0,000	0,0	0,293	0,004	1,5
<b>1,20</b>	0,762	0,002	0,2	0,729	0,027	3,7

Através dos cálculos efetuados verificou-se que as percentagens dos CV referentes ao t<sub>RR</sub> foram inferiores a 0,7% e os CV das áreas relativas foram inferiores a 10% para todos os CQI analisados cumprindo-se assim os critérios de aceitação da norma SWGTOX.

#### 4.6.6.2. Precisão intermédia

A precisão intermédia foi estudada ao longo de 5 dias consecutivos através da análise de diferentes retas de calibração. Adicionalmente foram preparadas amostras controlo nas concentrações baixa, média e alta da gama de trabalho (0,10 g/L, 0,50 g/L e 1,20 g/L) que foram analisadas em triplicado com as retas de calibração. A preparação dos calibradores e controlos encontra-se nas tabelas 24 e 25.

**Tabela 24 - Reta de calibração para o estudo da precisão intermédia e exatidão**

	Solução de trabalho de padrões de referência ( $\mu\text{L}$ )		Solução de PI a 0,1 g/L (mL)
Calibrador 1 (0,10 g/L)	100	3.2.4.1.3.1.	1
Calibrador 2 (0,25 g/L)	100	3.2.4.1.3.2.	1
Calibrador 3 (0,50 g/L)	100	3.2.4.1.3.3.	1
Calibrador 4 (1,00 g/L)	100	3.2.4.1.3.4.	1
Calibrador 5 (2,00 g/L)	100	3.2.4.1.3.5.	1
Calibrador 6 (4,00 g/L)	100	3.2.4.1.3.6.	1
Calibrador 7 (5,00 g/L)	100	3.2.4.1.3.7.	1

**Tabela 25 - Controlos para o estudo da precisão intermédia e exatidão**

	Solução de trabalho de padrões de referência ( $\mu\text{L}$ )		Solução de PI a 0,10 g/L (mL)
Controlo positivo (0,10 g/L)	100	3.2.4.1.7.1.	1
Controlo positivo (0,50 g/L)	100	3.2.4.1.7.2.	1
Controlo positivo (1,20 g/L)	100	3.2.4.1.7.3.	1

Os resultados obtidos para o estudo da precisão intermédia foram tratados com recurso à ferramenta estatística ANOVA (fator único), utilizando as equações abaixo apresentadas nas tabelas 26 e 27. Segundo a norma SWGTOX é recomendado que as determinações do coeficiente de variação sejam determinadas de duas formas distintas, entre execuções analíticas e dentro das execuções analíticas.

Tabela 26 - Tabela ANOVA (fator único)

Fonte	Média Quadrática (MQ)	Graus de liberdade
Entre grupos	$MS_{run} = \frac{n \sum_{i=1}^p (\bar{x}_i - \bar{\bar{x}})^2}{p - 1}$	$p - 1$
Dentro do grupo	$MS_r = \frac{\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (x_{ij} - \bar{x}_i)^2}{p (n - 1)}$	$p (n-1)$
Total		$pn - 1$

Onde:

$p$  é o número de sequências de análises para cada nível de concentração (uma sequência por cada dia);

$n$  é o número de replicados em cada sequência;

$x_{ij}$  representa a concentração de um replicado individual (replicado  $j$ ) obtido na sequência  $i$ ;

$\bar{x}_i$  representa a média da concentração de  $n$  replicados obtidos na sequência  $i$ ;

$\bar{\bar{x}}$  é a média das médias de  $p$  sequências.

Tabela 27 - Cálculo das estimativas da precisão intermédia

Precisão	Expressão
Repetibilidade ( $S_r$ )	$S_r = \sqrt{MS_r}$
<i>Between-run precision</i> ( $S_{run}$ )	$S_{run} = \sqrt{\frac{MS_{run} - MS_r}{n}}$
Precisão intermédia ( $S_1$ )	$S_1 = \sqrt{(S_r^2) + (S_{run}^2)}$

Na tabela 28 encontram-se resumidos os resultados obtidos no estudo da precisão intermédia para as três concentrações estudadas (0,10; 0,50 e 1,20 g/L). No anexo 7.2.5.2. encontram-se os resultados obtidos, de forma mais detalhada.



Tabela 28 - Resumo dos resultados obtidos no estudo da precisão intermédia

Concentração (g/L)		S <sub>r</sub>	S <sub>run</sub>	Precisão intermédia	% CV	Desvio padrão
Esperada	Obtida					
0,10	0,09	0,004	0,007	0,008	3,0	0,003
0,50	0,49	0,013	0,009	0,016	2,5	0,012
1,20	1,17	0,028	0,025	0,038	2,2	0,025

#### 4.6.7. Exatidão

Para avaliar a exatidão foi estudada a recuperação da metodologia, isto é, a razão entre o valor observado e o valor esperado, com o objetivo de detetar a existência de erros sistemáticos, definir fatores de correlação e, se relevante, estimar a incerteza associada à recuperação da metodologia ( $U_{\bar{R}}$ ).

Através dos resultados obtidos para a precisão intermédia, calculou-se, para cada nível de concentração, a recuperação para cada dia ( $R_i$ ) (equação 10) e a recuperação média ( $\bar{R}$ ) (equação 11). Posteriormente, para avaliar se a recuperação média era significativamente diferente de 100%, aplicou-se, em cada concentração, um teste *t* de *student*, no qual o valor experimental ( $t_{Exp}$ ) é calculado através das equações 12 e 13 e o valor crítico ( $t_{crit}$ ) é dado pela distribuição bi-caudal para  $p-1$  graus de liberdade num intervalo de confiança a 95%. Considerando um intervalo de confiança a 95%, o valor de *t* de *student* bilateral tabelado para 4 graus de liberdade é de 2,78.

Foi aplicado o teste estatístico – *t* de *student*, para cada nível de concentração, de forma a verificar se a recuperação média era ou não significativamente diferente de 100%: se  $t_{Exp} < t_{crit}$  então  $\bar{R}$  não é significativamente diferente de 100% e  $U_{\bar{R}}$  é calculado com base na equação 14; caso contrário, se  $t_{Exp} > t_{crit}$   $\bar{R}$  é significativamente diferente 100% e  $U_{\bar{R}}$  é calculado através da equação 15, de modo a contemplar este fator adicional de incerteza.

$$R_i = \frac{C_{Obsi}}{C_{Fortf}}$$

Equação 10

$$\bar{R} = \frac{\sum_{i=1}^p R_i}{p}$$

Equação 11

$$t_{Exp} = \frac{|1 - \bar{R}|}{U_{\% \bar{R}}}$$

Equação 12

$$U_{\% \bar{R}} = \frac{S_{Obs}}{\sqrt{p}}$$

Equação 13

$$U_{\bar{R}} = \frac{U_{\% \bar{R}}}{\bar{R}}$$

Equação 14

$$U_{\bar{R}} = \frac{\sqrt{(U_{\% \bar{R}})^2 + \left(\frac{1 - \bar{R}}{K}\right)^2}}{\bar{R}}$$

Equação 15

Onde:

$S_{Obs}$  é o desvio padrão de  $p$  valores de  $R_i$  obtidos em condições de precisão intermédia;

$R_i$  é a recuperação média de  $n$  replicados obtidos em condições de repetibilidade;

$K$  é o fator de expansão da incerteza expandida.

Na tabela 29 encontram-se resumidos os resultados obtidos no estudo da exatidão. Em anexo (7.2.6.) encontram-se os resultados obtidos, de forma mais detalhada.

**Tabela 29 - Resumo dos resultados obtidos no estudo da exatidão**

<b>Concentração (g/L)</b>	<b>Recuperação (%)</b>	<b>t<sub>Exp</sub></b>	<b>t<sub>Crit</sub></b>	<b>Incerteza de R (%)</b>
<b>0,10</b>	94,43	1,73		3,4
<b>0,50</b>	98,53	1,41	2,78	1,1
<b>1,20</b>	97,75	2,03		1,1

É possível verificar através da análise da tabela 29 que o valor de  $t_{\text{Crit}}$  é superior ao  $t_{\text{Exp}}$  calculado para todos os CQI (gama baixa, média e alta). Portanto, o etanol apresenta recuperações médias não significativamente diferentes de 100% para as três concentrações analisadas, não evidenciando a existência de erros sistemáticos na metodologia.

#### **4.6.8. Arrastamento (*Carryover*)**

O estudo de eventuais fenómenos de arrastamento pode ser efetuado simultaneamente com alguns dos parâmetros de validação estudados, nomeadamente gama de trabalho, linearidade ou precisão intermédia. Contudo, no presente estudo, a avaliação deste parâmetro foi analisada, simultaneamente, com o estudo da precisão intermédia. Deste modo, preparou-se uma sequência analítica onde uma alíquota de branco de reagentes foi injetada imediatamente a seguir à análise dos calibradores mais concentrados da gama de trabalho selecionada (2,00; 4,00 e 5,00 g/L). Este procedimento foi realizado com o objetivo de averiguar a presença de fenómenos de arrastamento.

Segundo a norma SWGTOX, para que se conclua sobre a ausência de fenómenos de arrastamento é necessário que os cromatogramas obtidos na análise das amostras branco de reagentes, injetadas entre os calibradores mais concentrados, não apresentem nenhum sinal cromatográfico correspondente ao analito de interesse.

A análise dos cromatogramas dos brancos de reagentes não evidenciou a presença de nenhum sinal cromatográfico suscetível de contaminação, pelo que se conclui que não há evidências de fenómenos de arrastamento na gama de trabalho utilizada.

A título de exemplo, no anexo 7.2.7., são apresentados três cromatogramas de brancos de reagentes analisados imediatamente após a análise dos calibradores mais concentrados (2,00; 4,00 e 5,00 g/L, respetivamente).

#### **4.6.9. Estabilidade**

Inicialmente foram criadas duas *pools* para cada uma das matrizes a analisar (humor vítreo, urina e sangue) e estas foram posteriormente fortificadas com o analito de interesse em dois níveis de concentrações 0,10 e 1,20 g/L, CQI baixo e alto respetivamente. Após

a fortificação das *pools*, foram preparadas 3 amostras (como descrito no ponto 3.2.4.2.) que foram analisadas no próprio dia, sendo as *pools* imediatamente congeladas. Passadas 24 horas, todas as *pools* foram deixadas a descongelar à temperatura ambiente, e foram preparadas e analisadas novamente 3 amostras de ambas as concentrações para cada matriz, completando-se assim o primeiro ciclo de congelamento/descongelamento. O ciclo de congelamento/descongelamento e a respetiva análise foi repetido mais uma vez, após 182 dias.

A média dos resultados obtidos (razão entre a área do analito e a área do padrão interno) foi comparada com a média das razões iniciais para ambas as concentrações de cada matriz e considerou-se que a amostra era estável quando a variação da concentração se encontrava dentro do erro aceitável (*bias*) para a metodologia em estudo, ou seja,  $\pm 10\%$  da média das razões iniciais. Os resultados obtidos neste estudo encontram-se na tabela 30.

**Tabela 30 - Resultados obtidos no estudo da estabilidade**

<b>Humor vítreo</b>		
	[0,10] g/L	[1,20] g/L
Dia 1	0,067	0,731
Dia 2	0,066	0,744
Dia 3	0,064	0,719

<b>Sangue</b>		
	[0,10] g/L	[1,20] g/L
Dia 1	0,059	0,803
Dia 2	0,058	0,760
Dia 3	0,056	0,799

<b>Urina</b>		
	[0,10] g/L	[1,20] g/L
Dia 1	0,062	0,727
Dia 2	0,061	0,717
Dia 3	0,061	0,707

De acordo com a tabela 30, o etanol manteve-se estável ao fim de 6 meses em ambas as concentrações nas diferentes matrizes biológicas.



## **Capítulo V – Conclusões**



## 5. Conclusões

A determinação da origem do etanol *post mortem* apresenta-se como uma etapa crucial durante a interpretação dos resultados obtidos. Isto deve-se ao facto de existirem diferentes origens possíveis para a formação de etanol detetado *post mortem*. A metodologia analítica desenvolvida no presente estudo para a deteção, identificação e quantificação de etanol teve como objetivo considerar esta variável relevante durante a interpretação dos resultados. Desta forma, o presente estudo pretendeu auxiliar na distinção da origem do etanol *post mortem* através da análise em diferentes tipos de matrizes biológicas (humor vítreo, sangue e urina). Para alcançar esse objetivo, desenvolveu-se uma metodologia analítica onde se selecionou um padrão interno adequado à análise, otimizou-se uma metodologia cromatográfica com o propósito de diminuir o tempo de cada análise e validou-se essa mesma metodologia. Os resultados obtidos no desenvolvimento e validação da metodologia permitem concluir que:

- ✓ O acetonitrilo, como padrão interno, cumpriu todos os requisitos exigidos para o uso de um padrão interno na análise de etanol *post mortem* por HS-GC-FID. A utilização deste permitiu obter uma boa resposta analítica na metodologia desenvolvida e corrigir o problema na análise de amostras em situações já descritas anteriormente.
- ✓ A metodologia analítica desenvolvida demonstrou ser capaz de analisar o etanol simultaneamente com o padrão interno selecionado (acetonitrilo), num intervalo de corrida de 3 minutos, com apenas 8 minutos de incubação no forno do *headspace* o que traduz numa redução de 7 minutos por análise.
- ✓ A metodologia analítica desenvolvida e validada apresentou resultados de seletividade, precisão e exatidão satisfatórios.
- ✓ Para além destes parâmetros, a metodologia também mostrou uma resposta analítica linear para a gama de trabalho estudada, assim como limiares analíticos apropriados.

Em suma, a presente metodologia foi validada para a determinação de etanol *post mortem* em três matrizes biológicas diferentes (humor vítreo, sangue e urina) e permitiu reduzir o tempo de análise comparativamente ao método utilizado na rotina do SQTF-DC para a determinação de etanol em amostras de sangue.





## **Capítulo VI – Referências bibliográficas**



## 6. Referências bibliográficas

1. Hunsaker DM, Hunsaker JC. Postmortem alcohol interpretation. In: Tsokos M, editor. *Forensic Pathology Reviews*. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.; 2004. p. 307–38.
2. Fernandes LMP, de Andrade EF, Monteiro MC, Cartágenes SC, Lima RR, Prediger RD, et al. Ethanol: Neurotoxicity and brain disorders. In: Watson RR, Zibadi S, editors. *Addictive Substances and Neurological Disease: Alcohol, Tobacco, Caffeine, and Drugs of Abuse in Everyday Lifestyles*. 1st ed. Academic Press; 2017. p. 201–15.
3. Perry PJ, Doroudgar S, Van Dyke P. Ethanol forensic toxicology. *J Am Acad Psychiatry Law*. 2017;45(4):429–38.
4. Chan L-N, Anderson GD. Pharmacokinetic and pharmacodynamic drug interactions with ethanol (alcohol). *Clin Pharmacokinet*. 2014;53(12):1115–36.
5. Chun H-J, Poklis JL, Poklis A, Wolf CE. Development and validation of a method for alcohol analysis in brain tissue by headspace gas chromatography with flame ionization detector. *J Anal Toxicol*. 2016;40(8):653–8.
6. Saukko P, Knight B. Forensic aspects of alcohol. In: Saukko P, Knight B, editors. *Knight's Forensic Pathology*. 3rd ed. CRC Press; 2004. p. 552–9.
7. Bairros AV de, Pego AMF, Yonamine M. Etanol. In: Dinis-Oliveira RJ, Carvalho FD, Bastos M de L, editors. *Toxicologia Forense*. Pactor; 2015. p. 249–77.
8. Gill JR. From death to death certificate: What do the dead say? *J Med Toxicol*. 2017;13(1):111–6.
9. Robertson S. Interpretation of measured alcohol levels in fatal aviation accident victims. Australian Government; 2005.
10. Monteiro C, Franco JM, Proença P, Castañera A, Claro A, Vieira DN, et al. Qualitative and quantitative analysis of a group of volatile organic compounds in biological samples by HS-GC/FID: Application in practical cases. *Forensic Sci Int*. 2014;243:137–43.
11. Hunsaker JC, Shields LBE, Frost BE, Dukes GD. Alcohol: blood and body fluid analysis. In: Payne-James J, Byard RW, editors. *Encyclopedia of Forensic and Legal Medicine*. 2nd ed. Elsevier Ltd.; 2016. p. 108–18.
12. Palha AP. Alcoolismo. In: Oliveira A, editor. *O essencial da saúde*. 1ª. QuidNovi; 2007.
13. Breda JJR da S. Problemas ligados ao álcool em Portugal - Contributos para uma estratégia compreensiva. Universidade do Porto; 2010.
14. Cabral L do R, Farate CM da C, Duarte JC. Representações sociais sobre o álcool em estudantes do ensino superior. *Rev Enferm Ref*. 2007;2(4):69–80.
15. Cabral L do R. Consumo de bebidas alcoólicas em rituais/praxes académicas. Universidade do Porto; 2007.
16. Corry JEL. Possible sources of ethanol ante- and post-mortem: its relationship to the biochemistry and microbiology of decomposition. *J Appl Bacteriol*. 1978 Feb;44(1):1–56.

17. Croom EL. The Role of Toxicokinetics and Toxicodynamics in Developmental and Translational Toxicology. In: Hughes CL, Waters MD, editors. *Translational Toxicology - Defining a New Therapeutic Discipline*. Humana Press Inc.; 2016. p. 45–81.
18. Goullé JP, Guerbet M. Éthanol: Pharmacocinétique, métabolisme et méthodes analytiques. *Ann Pharm Françaises*. 2015;73(5):313–22.
19. Mello MLM de, Barrias J, Breda J. Álcool e problemas ligados ao álcool em Portugal. 2001.
20. Koob GF, Le Moal M. Alcohol. In: Koob GF, Le Moal M, editors. *Neurobiology of Addiction*. 1st ed. Academic Press; 2006. p. 173–241.
21. Jones AW. Biochemical and physiological research on the disposition and fate of ethanol in the body. In: Garriott JC, editor. *Medicolegal Aspects of Alcohol*. 5th ed. Lawyers & Judges Publishing Company, Inc.; 2008. p. 47–156.
22. Jones AW. Forensic science aspects of ethanol metabolism. In: Maehly A, Williams RL, Yinon J, Jones AW, Totty RN, Turner BD, et al., editors. *Forensic Science Progress*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH; 1991. p. 31–89.
23. Jones AW. Alcohol, its absorption, distribution, metabolism, and excretion in the body and pharmacokinetic calculations. *Wiley Interdiscip Rev Forensic Sci*. 2019;1(5):1–26.
24. Cederbaum AI. Alcohol metabolism. *Clin Liver Dis*. 2012;16(4):667–85.
25. Fredrick C, Kgelberg AWJ. Interpreting results of ethanol analysis in postmortem specimens: a review of the literature. *Forensic Sci Int*. 2007;165(1):10–29.
26. Dubowski KM. Absorption, distribution and elimination of alcohol: highway safety aspects. *J Stud Alcohol*. 1985;(10):98–108.
27. Lima IV de, Midio AF. Origin of blood ethanol in decomposed bodies. *Forensic Sci Int*. 1999;106(3):157–62.
28. Dasgupta A. Alcohol: Use, abuse, and issues with blood alcohol level. In: Dasgupta A, editor. *Alcohol and its Biomarkers*. Elsevier; 2015. p. 1–36.
29. Skopp G. Preanalytic aspects in postmortem toxicology. *Forensic Sci Int*. 2004;142(2–3):75–100.
30. Caplan YH, Levine B. Vitreous humor in the evaluation of postmortem blood ethanol concentrations. *J Anal Toxicol*. 1990;14(5):305–7.
31. Boumba VA, Economou V, Kourkoumelis N, Gousia P, Papadopoulou C, Vougiouklakis T. Microbial ethanol production: Experimental study and multivariate evaluation. *Forensic Sci Int*. 2012;215(1–3):189–98.
32. Ziavrou K, Boumba VA, Vougiouklakis TG. Insights into the origin of postmortem ethanol. *Int J Toxicol*. 2005;24(2):69–77.
33. McDermott SD. Postmortem toxicology. In: Moffat AC, Osselton MD, Widdop B, editors. *Clarke's analysis of drugs and poisons*. 4th ed. Pharmaceutical Press; 2011. p. 176–89.
34. Behnoush B, Bazmi E, Akhgari M, Hashemi Nazari SS, Sardari Iravani F. Evaluation of ethanol and n-propanol in victims. *Iran J Toxicol*. 2010;3(3):311–6.

35. Wongchanapai W, Dokpuang D, Sasithonrojanachai S, Tamtakerngkit S. Stability of postmortem blood ethanol under experimental conditions. *Siriraj Med J*. 2008;60(2):62–5.
36. Hanzlick RL. Postmortem ethanol concentrations and postmortem ethanol production. *Acad Forensic Pathol Int*. 2014;4(2):156–60.
37. López EG, Reyes PI, Hernández-Cueto C, Castillo JDL Del, Aroca CMB, Cañadas EV. Distribución postmortem del acetato y etanol en cadáveres humanos tras el consumo de etanol y drogas de abuso. *Actual Medica*. 2012;97(787):16–20.
38. Boumba VA, Ziavrou KS, Vougiouklakis T. Biochemical pathways generating post-mortem volatile compounds co-detected during forensic ethanol analyses. *Forensic Sci Int*. 2008;174(2–3):133–51.
39. Athanaselis S, Stefanidou M, Koutselinis A. Interpretation of postmortem alcohol concentrations. *Forensic Microbiol*. 2005;149(2–3):289–91.
40. Lewis RJ, Johnson RD, Angier MK, Vu NT. Ethanol formation in unadulterated postmortem tissues. *Forensic Sci Int*. 2004;146(1):17–24.
41. Carol L. O'Neal AP. Postmortem production of ethanol and factors that influence interpretation. *Am J Forensic Med Pathol*. 1996;17(1):8–20.
42. Blackmore DJ. The bacterial production of ethyl alcohol. *J Forensic Sci Soc*. 1968;8(2):73–8.
43. Drummer OH. Pharmacokinetics and metabolism. In: Moffat AC, Osselton MD, Widdop B, editors. *Clarke's analysis of drugs and poisons*. 4th ed. Pharmaceutical Press; 2011. p. 388–400.
44. Dasgupta A, Wahed A. Testing for ethyl alcohol (alcohol) and other volatiles. In: Dasgupta A, Wahed A, editors. *Clinical Chemistry, Immunology and Laboratory Quality Control*. Elsevier; 2014. p. 317–35.
45. Seitz HK, Mueller S. Alcohol: Metabolism, toxicity and its impact on nutrition. 3rd ed. *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier; 2014. 1–13 p.
46. Williams RH, Leikin JB. Medicolegal issues and specimen collection of ethanol testing. *Lab Med*. 1999;30(8):530–7.
47. Péliissier-Alicot A-L, Gaulier J-M, Champsaur P, Marquet P. Mechanisms underlying postmortem redistribution of drugs: a review. *J Anal Toxicol*. 2003;27(8):533–44.
48. Johnson RD, Lewis RJ, Angier MK, Vu NT. The formation of ethanol in postmortem tissues. *Oklahoma*; 2004.
49. Helander A, Dahl H. Urinary tract infection: A risk factor for false-negative urinary ethyl glucuronide but not ethyl sulfate in the detection of recent alcohol consumption. *Clin Chem*. 2005;51(9):1728–30.
50. Castle JW, Butzbach DM, Walker GS, Lenehan CE, Reith F, Kirkbride KP. Microbial impacts in postmortem toxicology. In: Carter DO, Tomberlin JK, Benbow ME, Metcalf JL, editors. *Forensic Microbiology*. 1st ed. John Wiley & Sons Ltd.; 2017. p. 212–44.
51. Moriya F, Hashimoto Y. Postmortem production of ethanol and n-propanol in the brain of drowned persons. *Am J Forensic Med Pathol*. 2004;25(2):131–3.

52. Carvalho VM, Fontes LR, Lima IV de, Fuzinato DV. Toxicologia post mortem. In: Oga S, Camargo MM de A, Batistuzzo JA de O, editors. Fundamentos de Toxicologia. 4ª Edição. Editora Atheneu São Paulo; 2014.
53. Pajunen T, Vuori E, Lunetta P. Epidemiology of alcohol-related unintentional drowning: is post-mortem ethanol production a real challenge? *Inj Epidemiol.* 2018;5(39).
54. Sutlovic D, Nestic M, Kovacic Z, Gusic S, Mlinarek T, Salamunic I, et al. Microbial ethanol production in postmortem urine sample. *Med Sci Law.* 2013;53(4):243–6.
55. Bazmi E, Behnoush B, Akhgari M, BazmiSh. Interpretation of ethanol analysis in postmortem specimens. *Iran J Toxicol.* 2008;2(1).
56. Yajima D, Motani H, Kamei K, Sato Y, Hayakawa M, Iwase H. Ethanol production by *Candida albicans* in postmortem human blood samples: Effects of blood glucose level and dilution. *Forensic Sci Int.* 2006;164(2–3):116–21.
57. Dubowski KM. Manual for analysis of ethanol in biological liquids. Oklahoma; 1977.
58. Leikin JB, Watson WA. Post-mortem toxicology: What the dead can and cannot tell us. *J Toxicol - Clin Toxicol.* 2003;41(1):47–56.
59. Ioani BG, Manea C, Hanganu B, Statescu L, Solovastru LG, Manoilescu I. The chemistry decomposition in human corpses. *Rev Chim.* 2017;68(6):1352–6.
60. Hau TC, Hamzah NH, Lian HH, Hamzah SPAA. Decomposition process and post mortem changes: Review. *Sains Malaysiana.* 2014;43(12):1873–82.
61. Tsokos M. Postmortem changes and artifacts occurring during the early postmortem interval. In: Tsokos M, editor. *Forensic Pathology Reviews*. 1st ed. Humana Press Inc.; 2005. p. 183–237.
62. Shkrum MJ, Ramsay DA. Postmortem changes: The “Great Pretenders.” In: Shkrum MJ, Ramsay DA, editors. *Forensic Pathology of Trauma - Common Problems for the Pathologist*. 1st ed. Humana Press Inc.; 2007. p. 23–64.
63. Caruso JL. Decomposition Changes in Bodies Recovered from Water. *Acad Forensic Pathol.* 2016;6(1):19–27.
64. Pinheiro J. Decay process of a cadaver. In: Schmitt A, Cunha E, Pinheiro J, editors. *Forensic Anthropology and Medicine*. 1st ed. Humana Press Inc.; 2006. p. 85–116.
65. Saukko P, Knight B. The pathophysiology of death. In: Saukko P, Knight B, editors. *Knight’s Forensic Pathology*. 3rd ed. CRC Press; 2004. p. 52–97.
66. Dinis-Oliveira RJ, Carvalho FD, Duarte JA, Magalhães T. Recomendações gerais para a colheita de amostras biológicas em toxicologia forense. In: Dinis-Oliveira RJ, Carvalho FD, Bastos M de L, editors. *Toxicologia Forense*. Pactor; 2015. p. 103–8.
67. Kerrigan S. Sampling, storage and stability. In: Negrusz A, Cooper G, editors. *Clarke’s Analysis of Drug and Poisons*. 2nd ed. Pharmaceutical Press; 2013. p. 335–56.
68. Franco JM. Recomendações para colheita e acondicionamento de amostras em toxicologia forense. Coimbra; 2013. (Rev01). Report No.: NP-INMLCF-009.

69. Paczkowski S, Schütz S. Post-mortem volatiles of vertebrate tissue. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011;91(4):917–35.
70. Butzbach DM. The influence of putrefaction and sample storage on post-mortem toxicology results. *Forensic Sci Med Pathol*. 2010;6(1):35–45.
71. Carter DO, Tibbett M. Cadaver decomposition and soil: Processes. In: Carter DO, Tibbett M, editors. *Soil Analysis in Forensic Taphonomy: Chemical and Biological Effects of Buried Human Remains*. 1st ed. CRC Press; 2008. p. 29–51.
72. Dinis-Oliveira RJ, Vieira DN, Magalhães T. Guidelines for collection of biological samples for clinical and forensic toxicological analysis. *Forensic Sci Res*. 2016;1(1):42–51.
73. McIntyre IM, Escott CM. Postmortem drug redistribution. *J Forensic Res*. 2012;3(6).
74. Drummer OH. Toxicology: Methods of analysis, postmortem. In: Payne-James J, Byard RW, editors. *Encyclopedia of Forensic and Legal Medicine*. 2nd ed. Elsevier Ltd.; 2016. p. 608–14.
75. Lappas NT, Lappas CM. *Forensic Toxicology: Principles and Concepts*. 1st ed. Lappas NT, Lappas CM, editors. Forensic Toxicology: Principles and Concepts. Shirley Decker-Lucke; 2016.
76. Canfield D V., Brink CJD, Johnson RD, Lewis RJ, Dubowski KM. Postmortem ethanol testing procedures available to accident investigators. 2007.
77. Liang H, Kuang S, Guo L, Yu T, Rao Y. Assessment of the role played by n-propanol found in postmortem blood in the discrimination between antemortem consumption and postmortem formation of ethanol using rats. *J Forensic Sci*. 2016;61(1):122–6.
78. Boumba VA, Kourkoumelis N, Ziavrou KS, Fragkouli K, Vougiouklakis T. Patterns of the most abundant volatiles detected in post-mortem blood. *Rom J Leg Med*. 2012;20(2):147–54.
79. Honey D, Caylor C, Luthi R, Kerrigan S. Comparative alcohol concentrations in blood and vitreous fluid with illustrative case studies. *J Anal Toxicol*. 2005;29(5):365–9.
80. Furumiya J, Nishimura H, Nakanishi A, Hashimoto Y. Postmortem endogenous ethanol production and diffusion from the lung due to aspiration of wood chip dust in the work place. *Leg Med*. 2011;13(4):210–2.
81. Wang H, Xu H, Li W, Li B, Shi Q, Ma K, et al. Forensic appraisal of death due to acute alcohol poisoning: three case reports and a literature review. *Forensic Sci Res*. 2019;1–7.
82. Dawling S. Gas chromatography. In: Moffat AC, Osselton MD, Widdop B, editors. *Clarke's analysis of drugs and poisons*. 4th ed. Pharmaceutical Press; 2011. p. 636–717.
83. Flanagan RJ. Volatile substances. In: Moffat AC, Osselton MD, Widdop B, editors. *Clarke's analysis of drugs and poisons*. 4th ed. Pharmaceutical Press; 2011. p. 230–42.
84. Bernal E. Determination of volatile substances in forensic samples by static

- headspace gas chromatography. In: Salih B, Çelikbiçak Ö, editors. *Gas Chromatography in Plant Science, Wine Technology, Toxicology and Some Specific Applications*. InTechOpen; 2012. p. 197–224.
85. Stauffer E, Dolan JA, Newman R. Gas chromatography and gas chromatography–mass spectrometry. In: Stauffer E, Dolan JA, Newman R, editors. *Fire Debris Analysis*. 1st ed. Academic Press; 2008. p. 235–93.
  86. LibreTexts. Gas chromatography. Chemistry. 2019. p. 1–12.
  87. CHROMacademy. Theory and instrumentation of GC: Introduction. 2019. p. 1–24.
  88. Coskun O. Separation techniques: Chromatography. *North Clin Istanbul*. 2016;3(2):156–60.
  89. Wang Z, Paré JRJ. Gas chromatography (GC): Principles and applications. In: Paré JRJ, Bélanger JMR, editors. *Instrumental Methods in Food Analysis*. 1st ed. Ottawa: Elsevier Science; 1997. p. 61–91.
  90. Group TL. Flame ionisation detector. Germany; 2019.
  91. Majors RE. Sample preparation fundametal for chormatography. Agilent Technologies. Mississauga, Canadá; 2013.
  92. McMinn D. Detectors: General (Flame ionization detectors and thermal conductivity detectors). In: Cooke M, Poole CF, editors. *Encyclopedia of separation science*. 1st ed. Academic Press; 2000. p. 443–7.
  93. Kolb B, Ettre LS. *Static Headspace – Gas Chromatography : Theory and Practice*. 2nd ed. *Static Headspace – Gas Chromatography : Theory and Practice*. John Wiley & Sons, Inc.; 2006.
  94. Falaki F. Sample preparation techniques for gas chromatography. In: Kusch P, editor. *Gas Chromatography - Derivatization, Sample Preparation, Application different*. InTechOpen; 2019.
  95. Dawling S, Jickells S, Negrusz A. Gas chromatography. In: Jickells S, Negrusz A, editors. *Clarke’s Analytical Forensic Toxicology*. Pharmaceutical Press; 2008. p. 469–512.
  96. LibreTexts. Headspace analysis. Chemistry. 2019. p. 1–3.
  97. Klee MS. Detectors. In: Poole C, editor. *Gas Chromatography*. 1st ed. Elsevier; 2012. p. 307–47.
  98. Kabir A, Furton KG. Applications of Gas Chromatography in Forensic Science. In: Poole C, editor. *Gas Chromatography*. 1st ed. Elsevier; 2012. p. 563–604.
  99. Holm T. Aspects of the mechanism of the flame ionization detector. *J Chromatogr A*. 1999;842(1–2):221–7.
  100. Peters FT. Method development and validation. In: Moffat AC, Osselton MD, Widdop B, editors. *Clarke’s analysis of drugs and poisons*. 4th ed. Pharmaceutical Press; 2011. p. 334–49.
  101. Mariotti K de C, Ortiz RS, Limberger RP. Sequência Analítica em Toxicologia Forense. In: Dinis-Oliveira RJ, Carvalho FD, Bastos M de L, editors. *Toxicologia Forense*. Pactor; 2015. p. 109–30.



102. Kolb B. Headspace Gas Chromatography. In: Cooke M, Pool CF, editors. Encyclopedia of separation science. 1st ed. Academic Press; 2000. p. 489–96.
103. Sithersingh MJ, Snow NH. Headspace-Gas Chromatography. In: Poole C, editor. Gas Chromatography. 1st ed. Elsevier; 2012. p. 221–33.
104. Bordin DCM, Monedeiro FF da SS, Campos EG de, Alves MNR, Bueno LHP, Martinis BS de. Técnicas de preparo de amostras biológicas com interesse forense. *Sci Chromatogr.* 2015;7(2):125–43.
105. Portari GV, Marchini JS, Jordão AA. Validation of a manual headspace gas chromatography method for determining volatile compounds in biological fluids. *Lab Med.* 2008;39(1):42–5.
106. Dinis-Oliveira RJ, Carvalho F, Duarte JA, Remião F, Marques A, Santos A, et al. Collection of biological samples in forensic toxicology. *Toxicol Mech Methods.* 2010;20(7):363–414.
107. Moore SJ, Porter AC, Ezell AE, Hume AS, Ho IK. The rapid determination of ethanol in postmortem brain samples by solvent extraction and gas chromatography. *J Food Drug Anal.* 1993;1(3):245–9.
108. Bishop PN. Structural macromolecules and supramolecular organisation of the vitreous gel. *Prog Retin Eye Res.* 2000;19(3):323–44.
109. Levine BS, Jufer RA. Drugs-of-abuse testing in vitreous humor. In: Jenkins AJ, Caplan YH, editors. *Drug Testing in Alternate Biological Specimens.* 1st ed. Humana Press Inc.; 2008. p. 117–30.
110. Bos KJ, Holmes DF, Meadows RS, Kadler KE, McLeod D, Bishop PN. Collagen fibril organisation in mammalian vitreous by freeze etch/rotary shadowing electron microscopy. *Micron.* 2001;32(3):301–6.
111. Whikehart DR. *Biochemistry of the eye.* 2nd ed. Whikehart DR, editor. Butterworth-Heinemann; 2003.
112. Brunet B, Mura P. L’humeur vitrée en toxicologie médico-légale: Revue de la littérature et applications. *Ann Toxicol Anal.* 2012;24(1):9–15.
113. Fucci N, De Giovanni N, De Giorgio F, Liddi R, Chiarotti M. An evaluation of the Cozart® RapiScan system as an on-site screening tool for drugs of abuse in a non-conventional biological matrix: Vitreous humor. *Forensic Sci Int.* 2006;156(2–3):102–5.
114. Dinis-Oliveira RJ, Magalhães T, Carvalho FD. Introdução à Toxicologia Forense. In: Dinis-Oliveira RJ, Carvalho FD, Bastos M de L, editors. *Toxicologia Forense. Pactor;* 2015. p. 1–8.
115. Peters FT, Drummer OH, Musshoff F. Validation of new methods. *Forensic Sci Int.* 2007;165(2–3):216–24.
116. Ermer J, Nethercote P. *Method validation in pharmaceutical analysis.* 2nd ed. Ermer J, Nethercote P, editors. Wiley-VCH; 2015.
117. Brito NM, Junior OP de A, Polese L, Ribeiro ML. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. *Pestic Rev Ecotoxicologia e Meio Ambient.* 2003;13:129–46.
118. Rozet E, Ceccato A, Hubert C, Ziemons E, Oprean R, Rudaz S, et al. Analysis of

- recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. *J Chromatogr A*. 2007;1158(1-2):111-25.
119. Hartmann C, Smeyers-Verbeke J, Massart DL, McDowall RD. Validation of bioanalytical methods. *J Pharm Biomed Anal*. 1998;17(2):193-218.
  120. Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSF, Melo LFC. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim Nova*. 2004;27(5):771-80.
  121. Taverniers I, De Loose M, Van Bockstaele E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Anal Chem*. 2004;23(8):535-52.
  122. Vessman J. Selectivity or specificity? Validation of analytical methods from the perspective of an analytical chemist in the pharmaceutical industry. *J Pharm Biomed Anal*. 1996;14(8-10):867-9.
  123. Huber L. Validation and Qualification in Analytical Laboratories. 2 nd. Informa Healthcare; 2007.
  124. Kalra K. Method Development and Validation of Analytical Procedures. In: Shoyama Y, editor. *Quality Control of Herbal Medicines and Related Areas*. InTech; 2011. p. 3-16.
  125. Zakeri-Milani P, Islambulchilar Z, Majidpour F, Jannatabadi E, Lotfpour F, Valizadeh H. Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1). ICH Harmonised Tripartite Guideline. 2005.
  126. SWGTOX. Scientific working group for forensic toxicology (SWGTOX) - Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. *J Anal Toxicol*. 2013;37(7):452-74.
  127. Eurachem. The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 2 nd. Eurachem Guide. 2014.
  128. Thompson M, Ellison SLR, Wood R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem*. 2002;74(5):835-55.
  129. Booth B, Kadavil J. *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*. Biopharmaceutics. 2013.
  130. SOFT/AAFS. *Forensic toxicology laboratory guidelines*. 2006.
  131. Peters FT, Maurer HH. Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology - A review. *Accredit Qual Assur*. 2002;7(11):441-9.
  132. Causon R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis - Viewpoint and discussion. *J Chromatogr B Biomed Appl*. 1997;689(1):175-80.
  133. Portaria n.º 902-B/2007 de 13 de Agosto dos Ministérios da Administração Interna, da Justiça e da Saúde. *Diário da República*: 1.ª série, n.º 155 2007 p. 5266-(2)-5266-(8).
  134. Lei n.º 45/2004 de 19 de Agosto. *Diário da República*: I série-A, n.º 195 2004 p. 5362-8.
  135. Lei n.º 18/2007 de 17 de Maio. *Diário da República*: 1.ª série, n.º 95 2007 p. 3357-

60.

136. Bioanalytical Method Validation - Guidance for Industry. Biopharmaceutics. 2018.
137. Jones AW, Fransson M. Blood analysis by headspace gas chromatography: Does a deficient sample volume distort ethanol concentration? *Med Sci Law*. 2003;43(3):241–7.
138. Jones AW. Determination of Liquid/Air Partition Coefficients for Dilute Solutions of Ethanol in Water, Whole Blood, and Plasma. *J Anal Toxicol*. 1983;7(4):193–7.
139. Harger RN, Raney BB, Bridwell EG, Kitchel MF. The partition ratio of alcohol between air and water, urine and blood; estimation and identification of alcohol in these liquids from analysis of air equilibrated with them. *Chemistry* (Easton). 1950;
140. SQTF-DC. Procedimento de Ensaio - Quantificação de Etanol no Sangue. Coimbra; 2019. (PE-SQTF-C-401). Report No.: Rev03.
141. Spanjers C. Trying to find the optimal FID temperature for sensitivity. *Making Chemical Analysis Easy*. 2017.
142. World Anti-Doping Agency (WADA). Minimum Criteria for Chromatographic Mass-Spectrometric Confirmation of the Identity of Analytes for Doping Control Purposes. WADA Technical Document - TD2015IDCR. 2015.
143. Kristensen HG, De Kaste D, Turakka L. Chromatographic separation techniques. In: *European Pharmacopoeia 50*. 5 th. European Pharmacopoeia; 2004. p. 69–73.
144. Pharmacopoeia US. Chromatography. 2013. (USP31–NF26). Report No.: 621.
145. *Chromatography Today*. How Much Retention Time Variation Should I Expect? *Chromatography Today*. 2014.
146. SQTF-DC. Procedimento Operacional - Avaliação, Cálculo e Expressão de resultados. Coimbra; (PO-SQTF-C-009). Report No.: Rev02.



## **Capítulo VII – Anexos**



## 7. Anexos

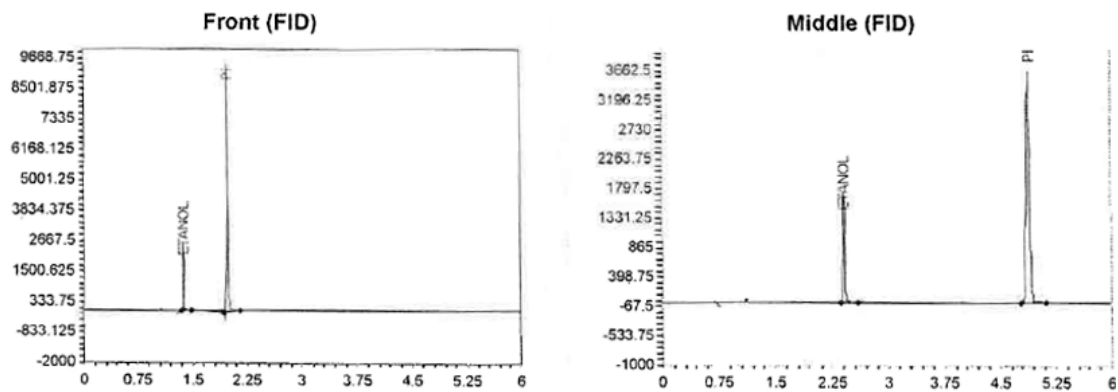
### 7.1. Alteração da metodologia cromatográfica

Tabela 31 - Principais parâmetros cromatográficos do método utilizado na rotina do SQTf-DC no equipamento GCFI002 (adaptado de (140))

<b>CTC CombiPAL</b>	
<b>Método <i>headspace</i></b>	
<b>Modo de injeção</b>	Seringa
<b>Temperatura da seringa</b>	70°C
<b>Tempo de descarga da seringa</b>	15 s
<b>Incubação</b>	
<b>Temperatura do forno</b>	55°C
<b>Tempo de incubação</b>	12 min
<b>rpm na incubação</b>	250 rpm
<b>Agitação ON</b>	5 s
<b>Agitação OFF</b>	2 s
<b>Injeção</b>	
<b>Volume de injeção</b>	500 µL
<b>Injetor – <i>Front (Split/Splitless)</i></b>	
<i>Split state</i>	ON
<i>Razão split</i>	1.20
<b>Temperatura</b>	200°C
<b>Injetor – <i>Middle (Split/Splitless)</i></b>	
<i>Split state</i>	ON
<i>Razão split</i>	1:30
<b>Coluna – VARIAN <i>Front (VF5MS)</i></b>	
<b>Comprimento</b>	30 m
<b>Diâmetro interno</b>	0,25 mm
<b>Espessura da fase</b>	0,50 µm
<b>Pressão</b>	1 bar
<b>Fluxo Gás de arraste</b>	2,5 mL/min
<b>Coluna – VARIAN <i>Middle (VF624MS)</i></b>	
<b>Comprimento</b>	30 m
<b>Diâmetro interno</b>	0,25 mm
<b>Espessura da fase</b>	1,40 µm
<b>Pressão</b>	1 bar
<b>Fluxo Gás de arraste</b>	1,0 mL/min
<b>Forno</b>	
<b>Temperatura</b>	35°C
<b>Tempo</b>	6 min

Determinação *post mortem* de etanol em diferentes tipos de amostras biológicas:  
Desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica por HS-GC-FID em contexto forense

Detetor – <i>Front</i>	
Temperatura	290°C
Detetor – <i>Middle</i>	
Temperatura	290°C
Fluxo de gases	
<i>Make-up</i> (Hélio)	25 mL/min
H <sub>2</sub>	30 mL/min
Ar	300 mL/min



Front (FID)

Peak Name	Retention time [minute]	Peak Area [ $\mu$ V.minute]	Peak Quantity [g/l]
ETANOL	1.3767	53.9	0.49
PI	1.9783	217.4	0
	3.355	271.3	0.49

Middle (FID)

Peak Name	Retention time [minute]	Peak Area [ $\mu$ V.minute]	Peak Quantity [g/l]
ETANOL	2.4233	50.1	0.52
PI	4.8967	193.5	0
	7.32	243.6	0.52

Figura 24 - Cromatogramas obtidos de um controlo a 0,49 g/L através do método utilizado na rotina do SQTf-DC para a determinação de etanol no sangue



## 7.2. Validação da metodologia analítica

### 7.2.1. Seletividade/Especificidade

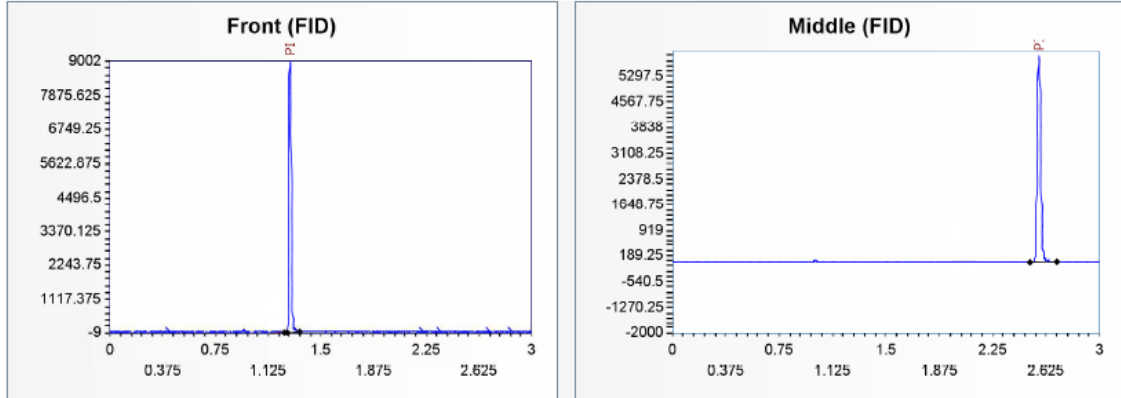


Figura 25 - Cromatogramas obtidos para uma amostra de humor vítreo não fortificada - Colunas VF-5ms (à esquerda) e VF-624ms (à direita)

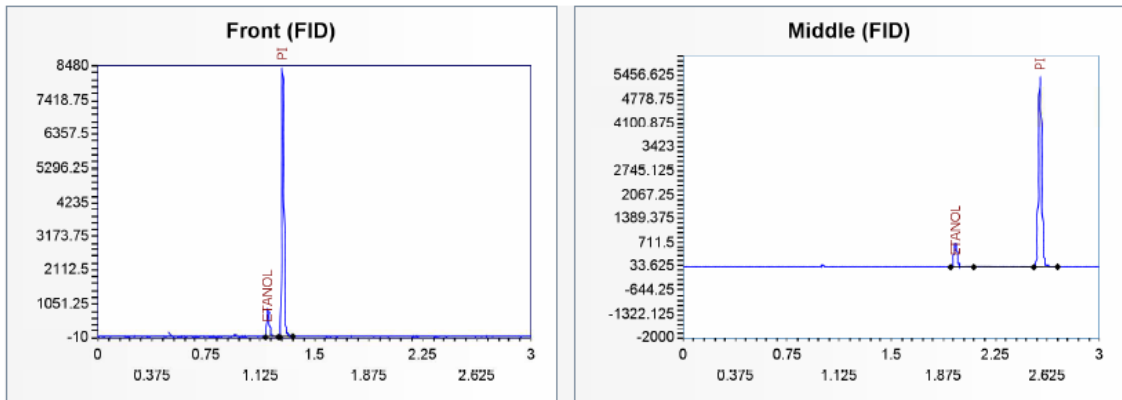


Figura 26 - Cromatogramas obtidos para uma amostra de humor vítreo fortificada - Colunas VF-5ms (à esquerda) e VF-624ms (à direita)

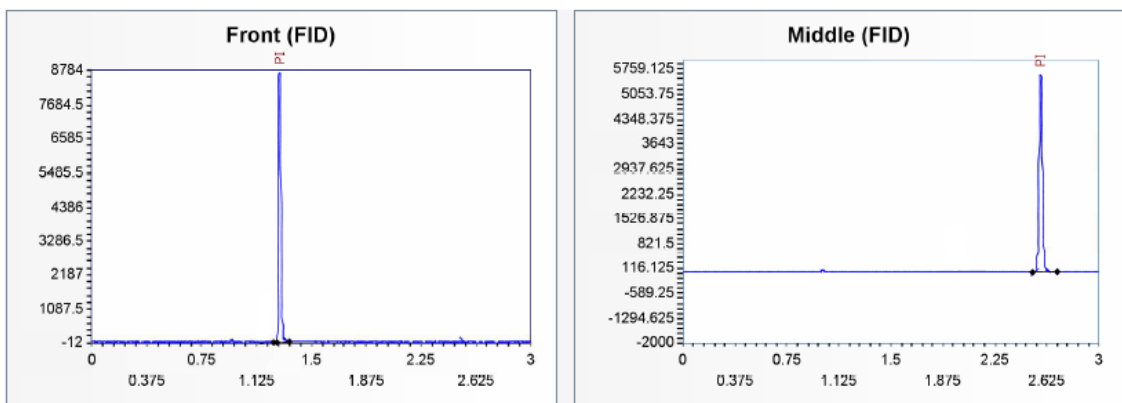


Figura 27 - Cromatogramas obtidos para uma amostra de urina não fortificada - Colunas VF-5ms (à esquerda) e VF-624ms (à direita)

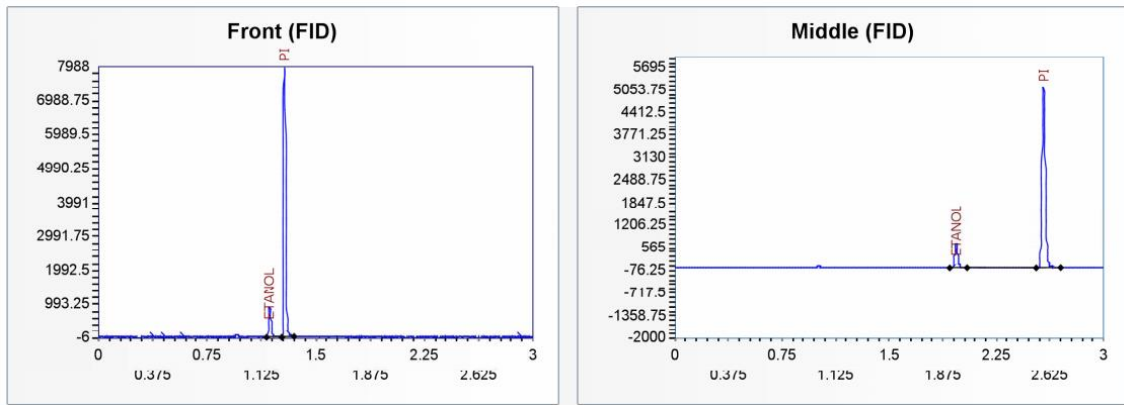


Figura 28 - Cromatogramas obtidos para uma amostra de urina fortificada - Colunas VF-5ms (à esquerda) e VF-624ms (à direita)

### 7.2.2. Identificação de interferentes

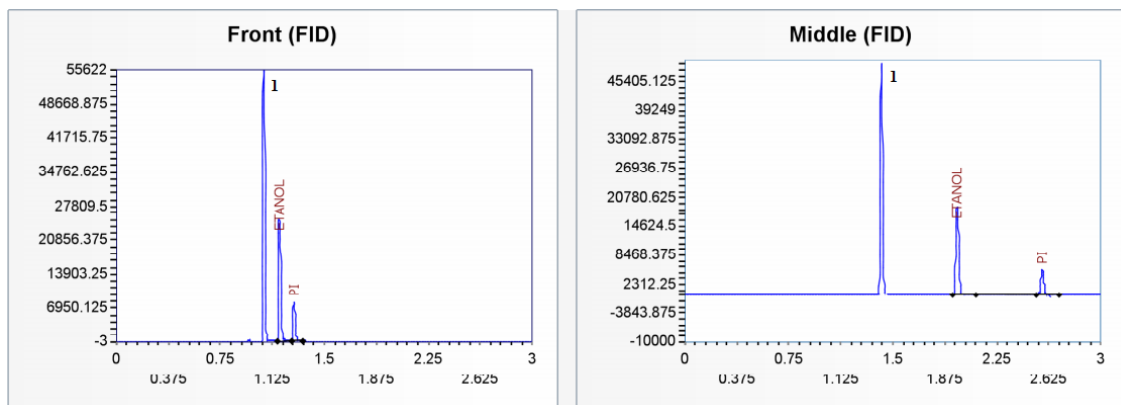


Figura 29 - Cromatogramas da análise do Acetaldeído a 5 g/L. Sinal cromatográfico: (1) – Acetaldeído

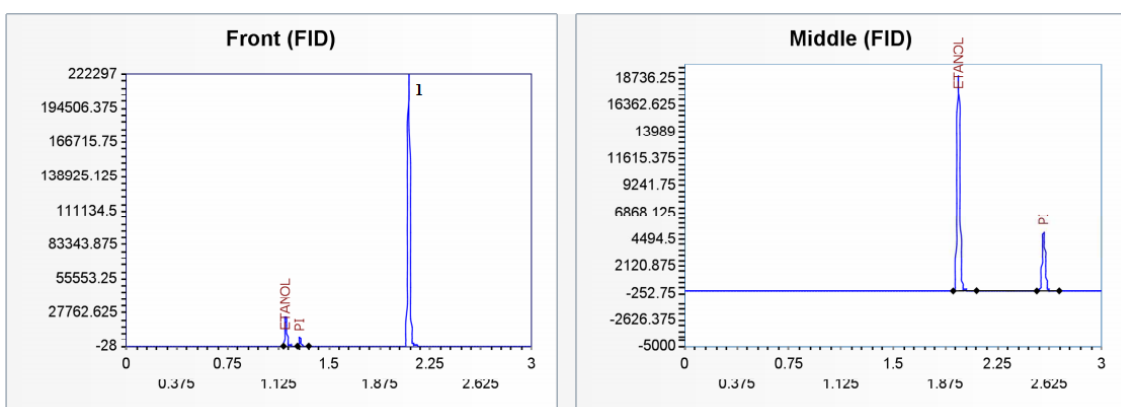


Figura 30 - Cromatogramas da análise do Acetato de etilo a 5 g/L. Sinal cromatográfico: (1) – Acetato de etilo

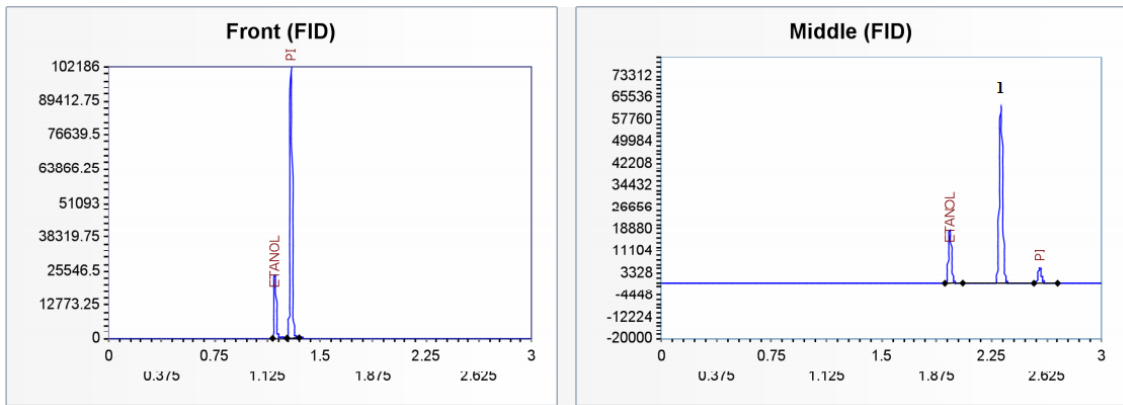


Figura 31 - Cromatogramas da análise da Acetona a 5 g/L. Sinal cromatográfico: (1) – Acetona

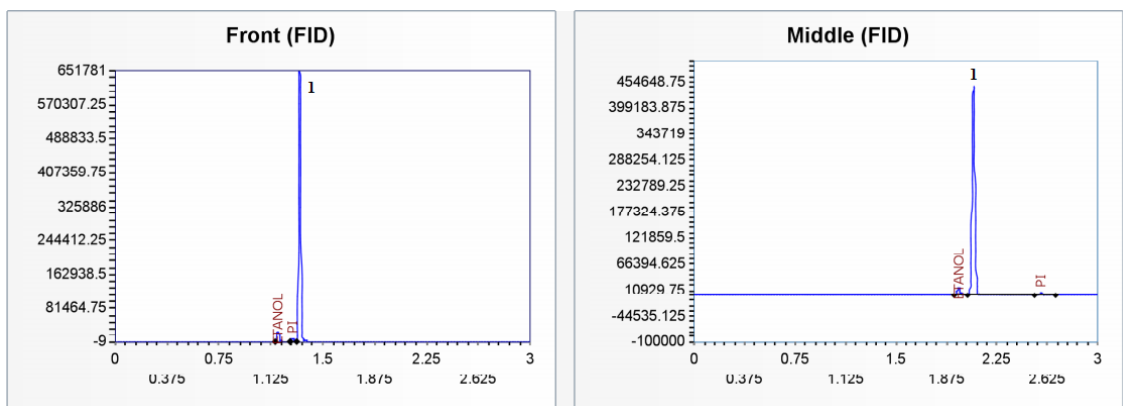


Figura 32 - Cromatogramas da análise do Éter dietílico a 5 g/L. Sinal cromatográfico: (1) – Éter dietílico

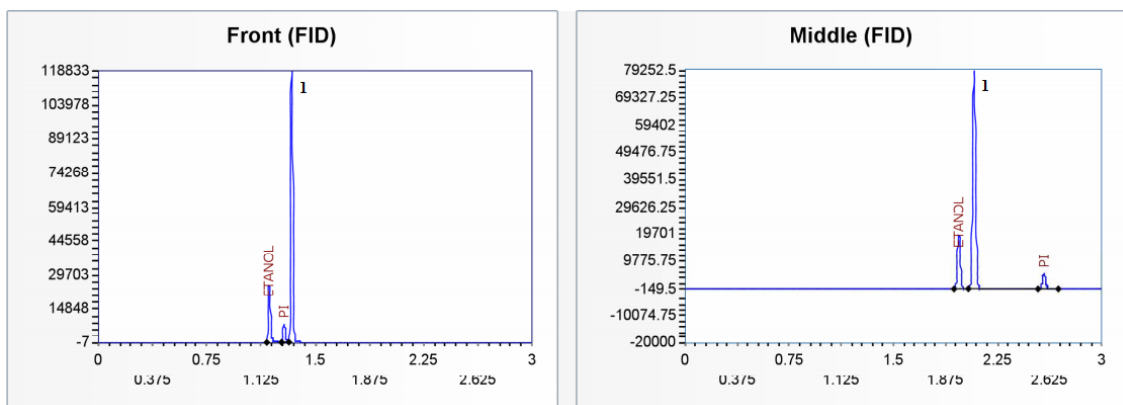


Figura 33 - Cromatogramas da análise do Éter dietílico a 1 g/L. Sinal cromatográfico: (1) – Éter dietílico

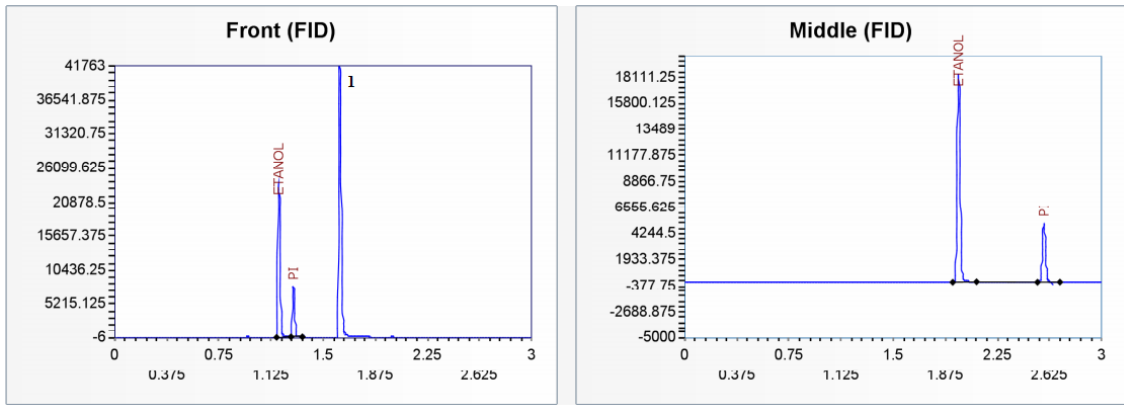


Figura 34 - Cromatogramas da análise do Isopropanol a 5 g/L. Sinal cromatográfico: (1) – Isopropanol

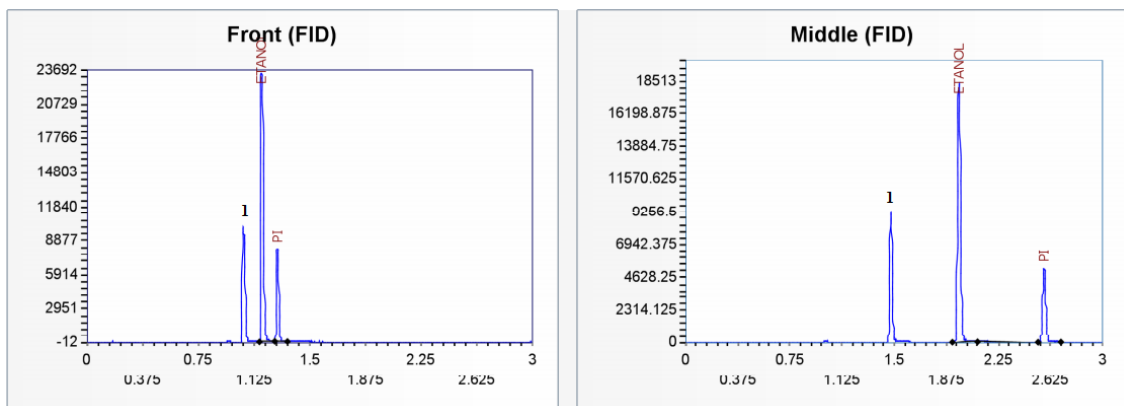


Figura 35 - Cromatogramas da análise do Metanol a 5 g/L. Sinal cromatográfico: (1) – Metanol

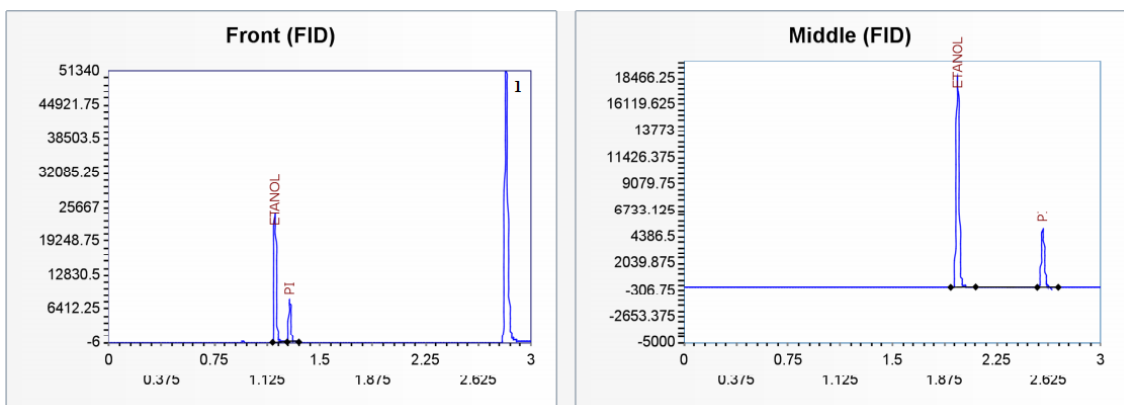


Figura 36 - Cromatogramas da análise do n-Butanol a 5 g/L. Sinal cromatográfico: (1) – n-Butanol

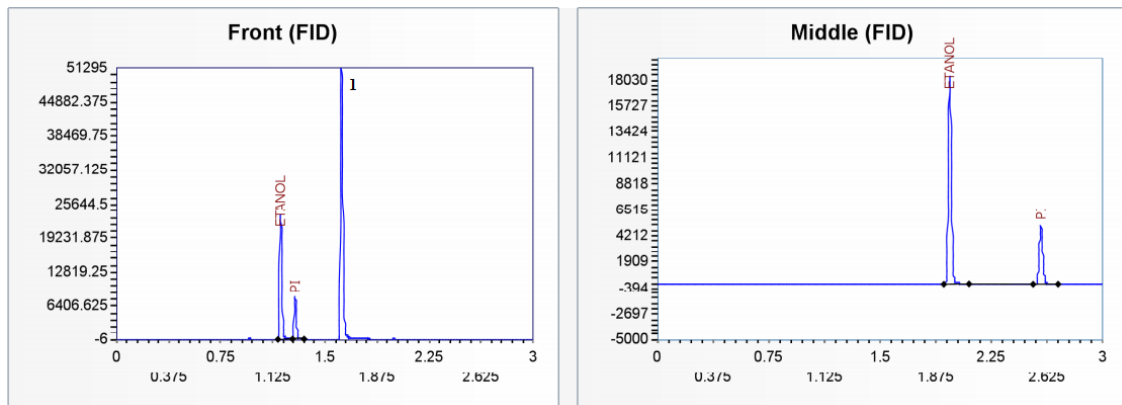


Figura 37 - Cromatogramas da análise do n-Propanol a 5 g/L. Sinal cromatográfico: (1) – n-Propanol

### 7.2.3. Linearidade e modelo de calibração

Tabela 32 - Avaliação da homocedasticidade das variâncias

0,10 g/L		5,00 g/L		$F_{Exp} (S_2^2/S_1^2)$
Concentração (g/L)	Variância ( $S_1^2$ )	Concentração (g/L)	Variância ( $S_2^2$ )	
0,11		4,93		
0,11		4,93		
0,10	0,000027	5,00	0,013343	492,69
0,10		5,15		
0,11		5,15		

Tabela 33 - Avaliação da homocedasticidade das variâncias: Teste de Fisher

Replicados	0,10 g/L	5,00 g/L	Teste F: duas amostras para variâncias		
	$A_{Analito}/API$		Variável 1	Variável 2	
1	0,066	3,133	Média	0,1039	5,0340
2	0,065	3,133	Variância	2,7E-05	0,0133
3	0,058	3,176	Observações	5	5
4	0,061	3,276	Graus de liberdade	4	4
5	0,064	3,279	P( $F \leq f$ ) uni-caudal	1,23E-05	
<b>F experimental</b>			492,69		
<b>F crítico uni-caudal</b>			6,39		

Tabela 34 - Estudo dos fatores de ponderação

	Fator de ponderação	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média
$\Sigma$ resíduos (%)	1/x	11,06	16,36	8,76	20,74	16,70	14,72
	1/x <sup>2</sup>	10,27	13,19	8,08	16,53	15,44	<b>12,70</b>
	1/x <sup>1/2</sup>	10,22	22,01	9,06	22,04	20,25	16,72
	1/y	11,15	16,29	8,84	21,19	16,69	14,83
	1/y <sup>2</sup>	10,36	13,29	8,20	16,69	15,53	12,81
	1/y <sup>1/2</sup>	10,28	21,98	9,14	22,41	20,21	16,80
r <sup>2</sup>	1/x	0,9998	0,9997	0,9999	0,9993	0,9994	0,9996
	1/x <sup>2</sup>	0,9994	0,9993	0,9996	0,9982	0,9991	<b>0,9991</b>
	1/x <sup>1/2</sup>	0,9999	0,9998	0,9999	0,9995	0,9995	0,9997
	1/y	0,9998	0,9997	0,9999	0,9993	0,9994	0,9996
	1/y <sup>2</sup>	0,9994	0,9992	0,9996	0,9980	0,9991	0,9991
	1/y <sup>1/2</sup>	0,9999	0,9998	0,9999	0,9995	0,9995	0,9997

Considerando um modelo de regressão linear ponderada  $w = 1/x^2$

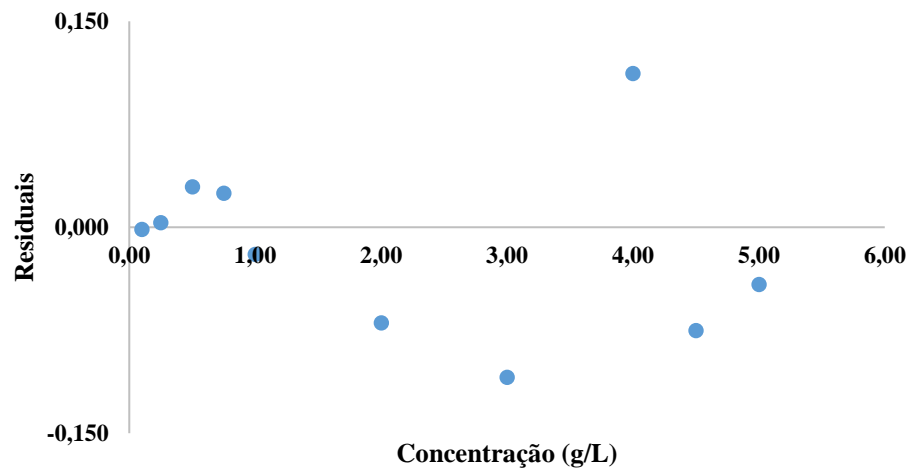
Concentração (g/L)	A <sub>Analito</sub>	A <sub>PI</sub>	A <sub>Analito</sub> /A <sub>PI</sub>
0,10	9,6	162,4	0,0591
0,25	26,1	164,8	0,1584
0,50	57,3	170,8	0,3355
0,75	81,8	166,0	0,4928
1,00	100,8	161,4	0,6245
2,00	198,0	160,5	1,2336
3,00	335,1	181,2	1,8493
4,00	438,0	166,4	2,6322
4,50	459,2	162,1	2,8328
5,00	501,0	157,8	3,1749

Estatística de regressão	
R	0,9993
Quadrado de R	0,9987
Erro padrão	0,0445
Observações	10

	Coefficientes	Erro padrão	95 % inferior	95 % superior
Ordenada na origem	- 0,0039	0,3857	0,6651	2,4441
Declive	0,6411	0,0120	- 0,0452	0,0103

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,0607	-0,0016
2	0,1552	0,0032
3	0,3061	0,0294
4	0,4680	0,0248
5	0,6442	-0,0197
6	1,3032	-0,0696
7	1,9586	-0,1093
8	2,5204	0,1118
9	2,9081	-0,0753
10	3,2166	-0,0417

**Desenho de residuais**



#### 7.2.4. Limiares analíticos: limite de deteção e limite de quantificação

Considerando um modelo de regressão linear ponderada  $w = 1/x^2$

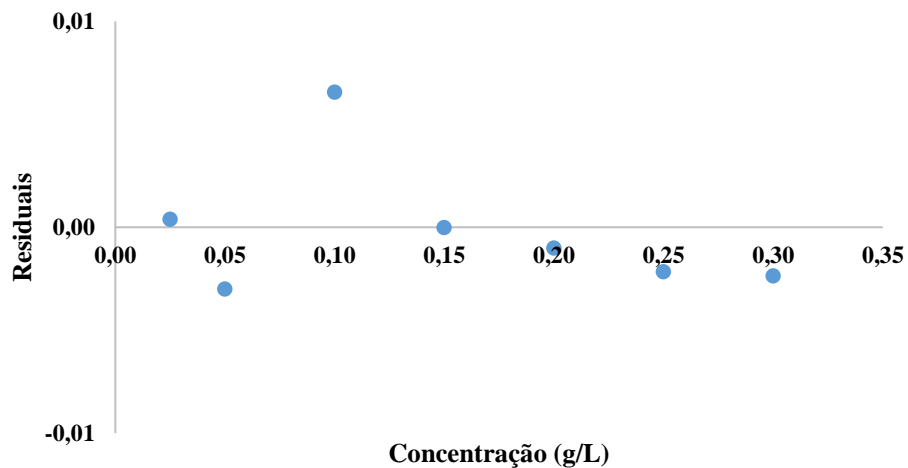
Concentração (g/L)	A <sub>Analito</sub>	API	A <sub>Analito</sub> /API
0,025	2,2	166,6	0,013
0,05	4,4	163,7	0,027
0,10	10,4	162,0	0,064
0,15	15,1	165,5	0,091
0,20	20,1	165,1	0,122
0,25	25,8	169,7	0,152
0,30	29,4	160,6	0,183

<b>Estatística de regressão</b>	
<b>R</b>	0,9988
<b>Quadrado de R</b>	0,9976
<b>Erro padrão</b>	0,0024
<b>Observações</b>	7

	<b>Coefficientes</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>95 % inferior</b>	<b>95 % superior</b>
<b>Ordenada na origem</b>	- 0,0026	0,0217	0,0611	0,1727
<b>Declive</b>	0,6254	3,5E-5	1,6E-4	1,4E-5

<b>Observação</b>	<b>Y previsto</b>	<b>Residuais</b>
<b>1</b>	0,0129	0,0003
<b>2</b>	0,0297	-0,0028
<b>3</b>	0,0573	0,0069
<b>4</b>	0,0911	0,0001
<b>5</b>	0,1228	-0,0011
<b>6</b>	0,1547	-0,0027
<b>7</b>	0,1862	-0,0031

### Desenho de residuais





## 7.2.5. Precisão

### 7.2.5.1. Repetibilidade

Considerando um modelo de regressão linear ponderada  $w = 1/x^2$

Tabela 35 - Resultados obtidos para o controlo baixo (0,10 g/L) na repetibilidade

Gama baixa – 0,10 g/L						
Replicados	TR <sub>Analito</sub>	TR <sub>PI</sub>	TRR	A <sub>Analito</sub>	API	A <sub>Analito</sub> /API
1	1,97	2,59	0,761	8,7	158,8	0,055
2	1,97	2,59	0,761	9,4	160,4	0,059
3	1,97	2,58	0,764	9,2	158,8	0,058
4	1,97	2,59	0,761	9,1	158,1	0,058
5	1,97	2,58	0,764	9,2	157,0	0,059
<b>Média</b>			0,762			0,057
<b>Desvio</b>			0,002			0,002
<b>Padrão</b>						
<b>% CV</b>			0,2			2,7

Tabela 36 - Resultados obtidos para o controlo médio (0,50 g/L) na repetibilidade

Gama média – 0,50 g/L						
Replicados	TR <sub>Analito</sub>	TR <sub>PI</sub>	TRR	A <sub>Analito</sub>	API	A <sub>Analito</sub> /API
1	1,97	2,58	0,764	45,2	157,2	0,288
2	1,97	2,58	0,764	50,2	168,4	0,298
3	1,97	2,58	0,764	45,8	155,9	0,294
4	1,97	2,58	0,764	45,5	157,6	0,289
5	1,97	2,58	0,764	47,5	161,3	0,294
<b>Média</b>			0,764			0,293
<b>Desvio</b>			0,000			0,004
<b>Padrão</b>						
<b>% CV</b>			0,0			1,5

Tabela 37 - Resultados obtidos para o controlo alto (1,20 g/L) na repetibilidade

<b>Gama alta – 1,20 g/L</b>						
<b>Replicados</b>	<b>TR<sub>Analito</sub></b>	<b>TR<sub>PI</sub></b>	<b>TRR</b>	<b>A<sub>Analito</sub></b>	<b>A<sub>PI</sub></b>	<b>A<sub>Analito</sub>/A<sub>PI</sub></b>
<b>1</b>	1,97	2,59	0,761	111,6	159,8	0,698
<b>2</b>	1,97	2,59	0,761	119,2	158,6	0,752
<b>3</b>	1,97	2,58	0,764	120,1	158,8	0,756
<b>4</b>	1,97	2,59	0,761	107,7	153,2	0,703
<b>5</b>	1,97	2,58	0,764	116,5	158,2	0,736
<b>Média</b>			0,762			0,729
<b>Desvio</b>			0,002			0,027
<b>Padrão</b>						
<b>% CV</b>			0,2			3,7

### 7.2.5.2. Precisão intermédia

Considerando um modelo de regressão linear ponderada  $w = 1/x^2$

Tabela 38 - Resultados obtidos referentes à precisão intermédia

<b>Data</b>	<b>1º Dia</b>	<b>2º Dia</b>	<b>3º Dia</b>	<b>4º Dia</b>	<b>5º Dia</b>
<b>r<sup>2</sup></b>	0,9994	0,9993	0,9996	0,9996	0,9974
<b>Declive</b>	0,6444	0,6375	0,6235	0,6421	0,6243
<b>a</b>	0,0023	- 0,0020	- 0,0032	- 0,0020	- 0,0012

Tabela 39 - Resultados obtidos referentes à precisão intermédia para o controlo de gama baixa (0,10 g/L)

<b>Gama baixa – 0,10 g/L</b>					
<b>Replicado 1</b>	0,09	0,10	0,10	0,09	0,10
<b>Replicado 2</b>	0,08	0,09	0,10	0,09	0,10
<b>Replicado 3</b>	0,08	0,10	0,10	0,09	0,10
<b>Média</b>	0,08	0,10	0,10	0,09	0,10
<b>Recuperação</b>	82,41	98,41	100,18	93,09	98,07
<b>Concentração média</b>			0,09		
<b>Recuperação média</b>			94,43		
<b>Repetibilidade (S<sub>r</sub>)</b>			0,004		
<b>Between-run precision (S<sub>run</sub>)</b>			0,007		
<b>Precisão intermédia</b>			0,008		
<b>CV (%)</b>			3,0		

Tabela 40 - Resultados obtidos referentes à precisão intermédia para o controlo de gama média (0,50 g/L)

<b>Gama média – 0,50 g/L</b>					
<b>Replicado 1</b>	0,49	0,50	0,51	0,49	0,51
<b>Replicado 2</b>	0,46	0,49	0,49	0,49	0,49
<b>Replicado 3</b>	0,48	0,51	0,48	0,48	0,52
<b>Média</b>	0,48	0,50	0,49	0,49	0,51
<b>Recuperação</b>	95,33	100,00	98,67	97,33	101,33
<b>Concentração média</b>	0,49				
<b>Recuperação média</b>	98,53				
<b>Repetibilidade (S<sub>r</sub>)</b>	0,013				
<b><i>Between-run precision</i> (S<sub>run</sub>)</b>	0,009				
<b>Precisão intermédia</b>	0,016				
<b>CV (%)</b>	2,5				

Tabela 41 - Resultados obtidos referentes à precisão intermédia para o controlo de gama alta (1,20 g/L)

<b>Gama Alta – 1,20 g/L</b>					
<b>Replicado 1</b>	1,09	1,23	1,19	1,17	1,21
<b>Replicado 2</b>	1,17	1,21	1,14	1,15	1,15
<b>Replicado 3</b>	1,14	1,21	1,21	1,15	1,17
<b>Média</b>	1,14	1,21	1,18	1,16	1,18
<b>Recuperação</b>	94,60	101,27	98,18	96,40	98,31
<b>Concentração média</b>	1,17				
<b>Recuperação média</b>	97,75				
<b>Repetibilidade (S<sub>r</sub>)</b>	0,028				
<b><i>Between-run precision</i> (S<sub>run</sub>)</b>	0,025				
<b>Precisão intermédia</b>	0,038				
<b>CV (%)</b>	2,2				

### 7.2.6. Exatidão

Considerando um modelo de regressão linear ponderada  $w = 1/x^2$

Tabela 42 - Resultados obtidos referentes à exatidão para o controlo de gama baixa (0,10 g/L)

<b>Gama baixa – 0,10 g/L</b>					
<b>Data</b>	<b>1º Dia</b>	<b>2º Dia</b>	<b>3º Dia</b>	<b>4º Dia</b>	<b>5º Dia</b>
<b>Média</b>	0,08	0,10	0,10	0,09	0,10
<b>Recuperação (%)</b>	82,41	98,41	100,18	93,09	98,07
<b>Recuperação média</b>			94,43		
<b>Desvio padrão</b>			7,22		
<b>CV (%)</b>			7,6		
<b>N</b>			5		
<b>T<sub>exp</sub></b>			1,7251		
<b>T<sub>crit</sub></b>			2,7764		
<b>Incerteza de R%</b>			3,4		
<b>Incerteza padrão relativo</b>			0,034		

Tabela 43 - Resultados obtidos referentes à exatidão para o controlo de gama média (0,50 g/L)

<b>Gama média – 0,50 g/L</b>					
<b>Data</b>	<b>1º Dia</b>	<b>2º Dia</b>	<b>3º Dia</b>	<b>4º Dia</b>	<b>5º Dia</b>
<b>Média</b>	0,48	0,50	0,49	0,49	0,51
<b>Recuperação (%)</b>	95,33	100,00	98,67	97,33	101,33
<b>Recuperação média</b>			98,53		
<b>Desvio padrão</b>			2,33		
<b>CV (%)</b>			2,4		
<b>N</b>			5		
<b>T<sub>exp</sub></b>			1,4084		
<b>T<sub>crit</sub></b>			2,7764		
<b>Incerteza de R%</b>			1,1		
<b>Incerteza padrão relativo</b>			0,011		

Determinação *post mortem* de etanol em diferentes tipos de amostras biológicas:  
Desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica por HS-GC-FID em contexto forense

**Tabela 44 - Resultados obtidos referentes à exatidão para o controlo de gama alta (1,20 g/L)**

<b>Gama alta – 1,20 g/L</b>					
<b>Data</b>	<b>1º Dia</b>	<b>2º Dia</b>	<b>3º Dia</b>	<b>4º Dia</b>	<b>5º Dia</b>
<b>Média</b>	1,14	1,22	1,18	1,16	1,18
<b>Recuperação (%)</b>	94,60	101,27	98,18	96,40	98,31
<b>Recuperação média</b>	97,75				
<b>Desvio padrão</b>	2,48				
<b>CV (%)</b>	2,5				
<b>N</b>	5				
<b>T<sub>exp</sub></b>	2,025				
<b>T<sub>crit</sub></b>	2,7764				
<b>Incerteza de R%</b>	1,1				
<b>Incerteza padrão relativo</b>	0,011				

### 7.2.7. Arrastamento (*Carryover*)

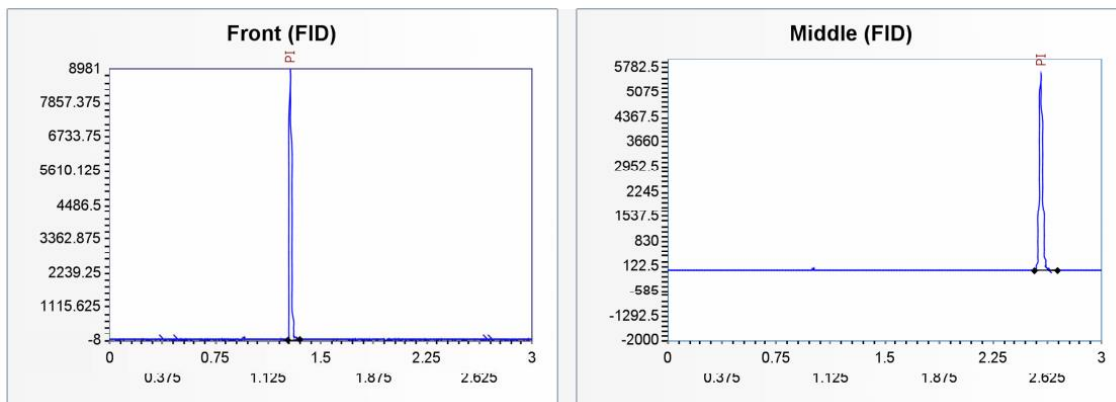


Figura 38 - Cromatogramas de uma amostra branco de reagentes injetada após um calibrador de 2,00 g/L

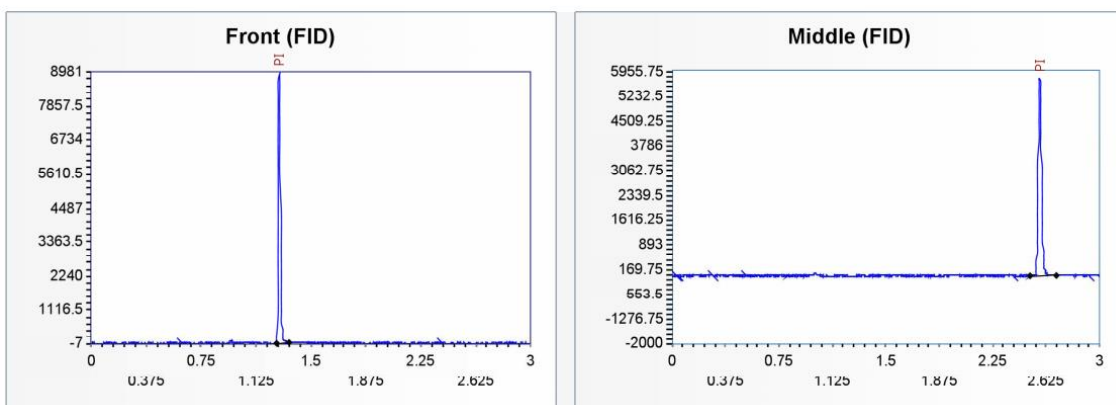


Figura 39 - Cromatogramas de uma amostra branco de reagentes injetada após um calibrador de 4,00 g/L

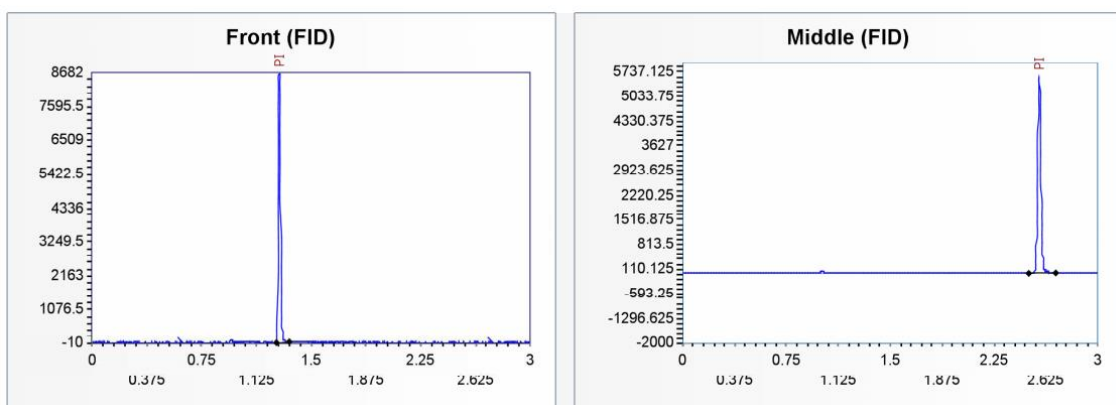


Figura 40 - Cromatogramas de uma amostra branco de reagentes injetada após um calibrador de 5,00 g/L

