

INTRODUÇÃO

O abuso e a dependência de etanol são bastante comuns e têm elevado impacto em questões de saúde e sociais (1). Desta forma, torna-se importante o desenvolvimento de metodologias para a quantificação de etanol em determinadas situações médico-legais (2). Uma vez que o etanol é rapidamente eliminado do organismo, a validação de metodologias analíticas para a quantificação dos seus biomarcadores de exposição torna-se bastante útil em toxicologia forense, nomeadamente em contextos laborais, em casos de regulação do poder paternal e em situações post-mortem, auxiliando na distinção entre a ingestão e a formação post-mortem de etanol (3,4).

Os autores apresentam a validação de metodologia analítica para a quantificação de etil-glucuronídeo e etil-sulfato em amostras de sangue, por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa, LC-MS/MS.

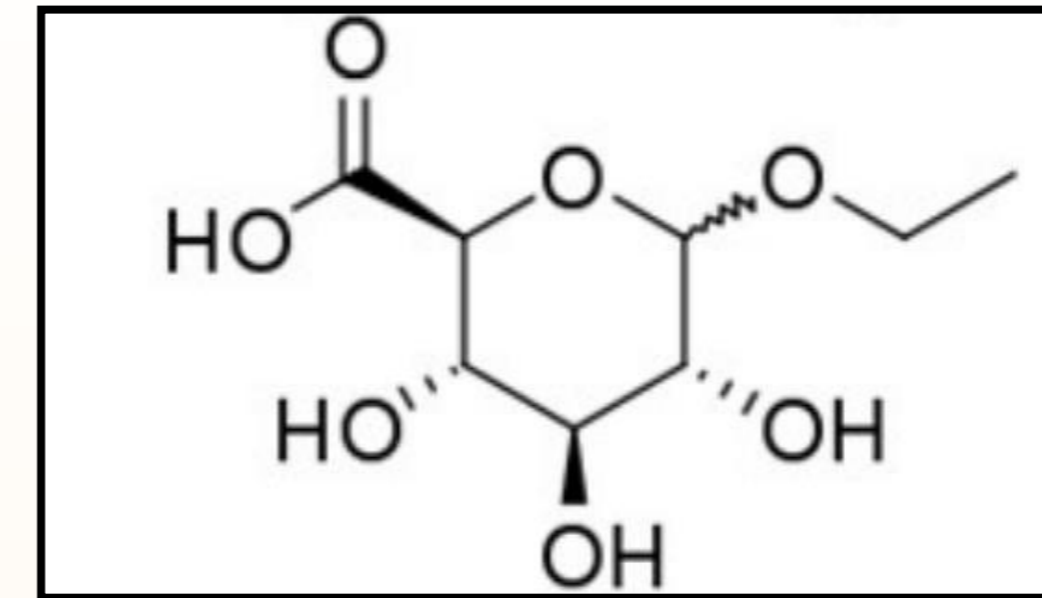


Figura 1 – Estrutura química do etil-glucuronídeo

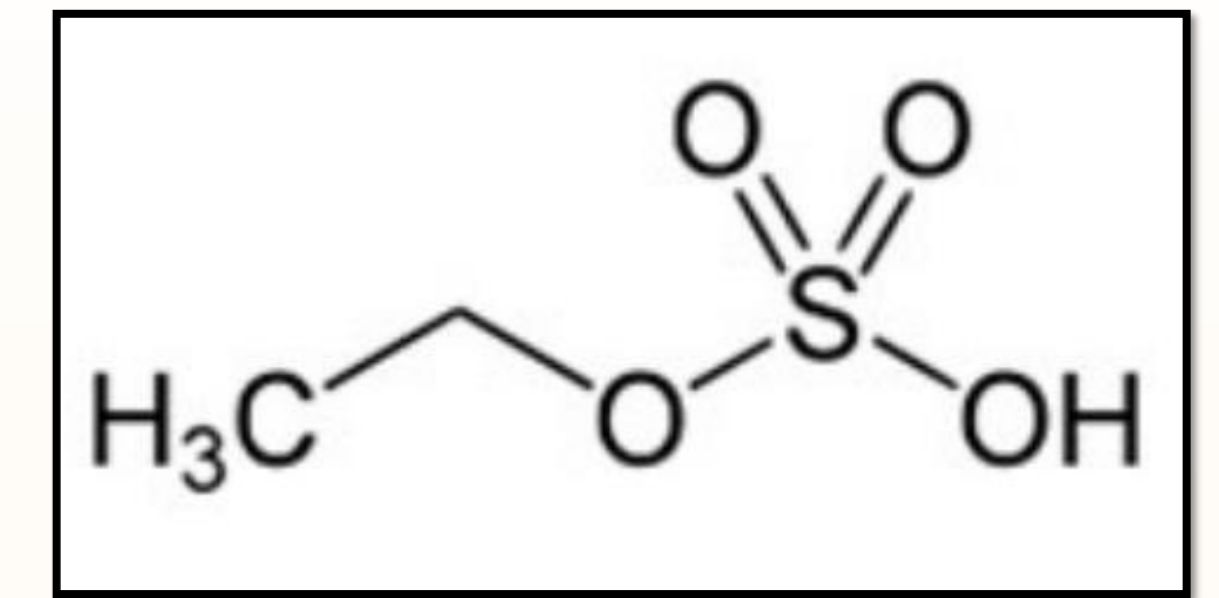


Figura 2 – Estrutura química do etil-sulfato

OBJETIVOS

MATERIAIS & MÉTODOS

O método apresentado foi validado num equipamento de LC-MS/MS da SCIEX, tendo as amostras sido previamente submetidas a um procedimento de precipitação proteica com metanol. A separação cromatográfica foi efetuada recorrendo a uma coluna Acquity UPLC HSS T3 (2,1 × 100 mm; 1,8 μm de tamanho de partícula), usando como fase móvel uma mistura de solução aquosa de formato de amónio 2 mM (ácido fórmico 0,1%) e solução metanólica de formato de amónio 2 mM (ácido fórmico 0,1%), em gradiente. A deteção dos compostos foi efetuada por MRM, tendo a ionização sido feita por electrospray, em modo negativo num detetor de massa QTrap® 6500+, da Sciex.

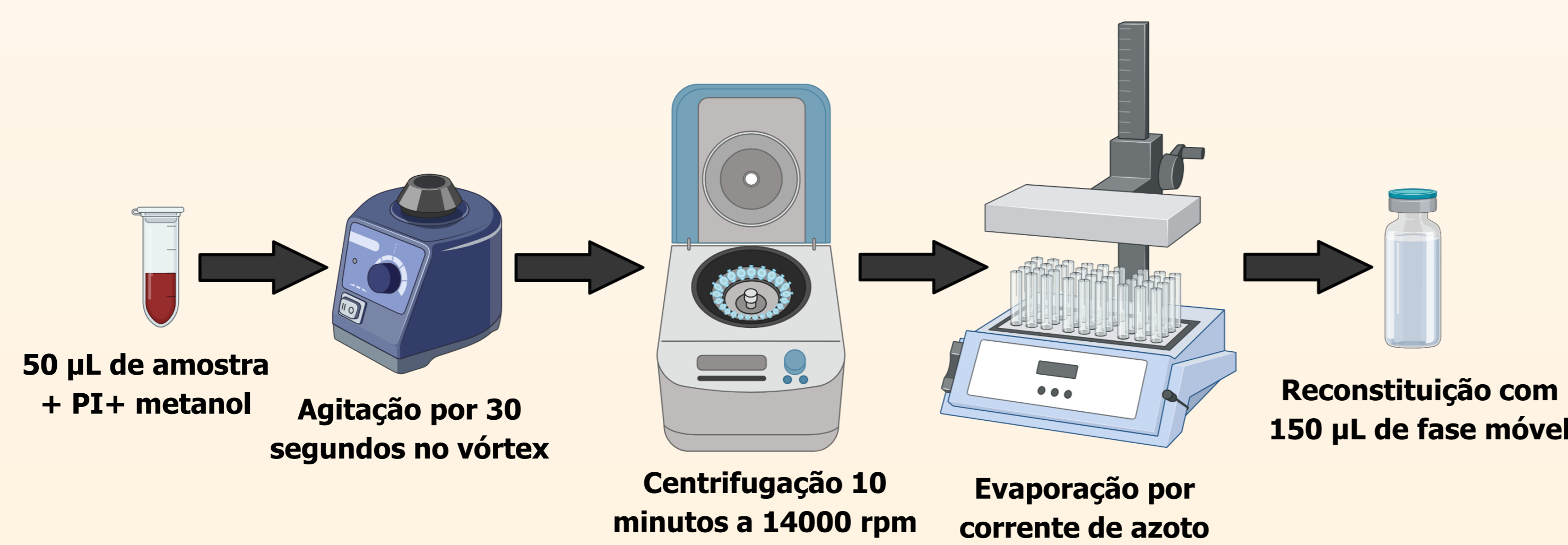


Figura 3 – Representação esquemática da preparação da amostra por precipitação proteica, criada com Biorender.com



Figura 4 – Sistema de LC-MS/MS

Tabela 1 – Parâmetros associados ao LC-MS/MS

Coluna Cromatográfica	Acquity UPLC HSS T3 (2,1 mm i.d. × 100 mm; 1,8 μm)
Temperatura de operação	40 °C
Volume de injeção	10 μm
Ionização	Electrospray Negativo
Modo de aquisição	MRM (Multiple Reaction Monitoring)

Tabela 2 – Fase móvel e respetivas condições do gradiente

Fase Móvel	Solução aquosa de formato de amónio 2 mM (ácido fórmico 0,1%) (A) : Solução metanólica de formato de amónio 2 mM (ácido fórmico 0,1%) (B) (gradiente)	
Fluxo	0,4 mL/min	
Tempo (min)	% Fase móvel A	% Fase móvel B
0	99	1
2,80	99	1
2,81	5	95
3,00	5	95
3,01	99	1
6,00	99	1

Tabela 3 – Transições iónicas e condições utilizadas na deteção por MRM

	Transição (Da)	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
EtG 1	221,0 > 75,0	-25	-18	-9
EtG 2	221,0 > 85,0	-25	-20	-11
EtG-D5	226,0 > 75,0	-10	-20	-11
EtS 1	124,9 > 97,0	-20	-20	-10
EtS 2	124,9 > 80,1	-20	-20	-10
EtS-D5	129,9 > 80,1	-20	-20	-11

RESULTADOS

O método demonstrou ser **específico e seletivo**. Para os **limites de deteção e quantificação** foi assumido o valor de **100 ng/mL** para os dois compostos, apesar da determinação destes através do método do desvio padrão residual e declive da curva de calibração ter resultado em valores inferiores. O **rendimento de extração** foi calculado a **2 níveis de concentração, 700 ng/mL e 3000 ng/mL** tendo-se obtido resultados médios de **82%** para o **etil-glucuronídeo** e de **99%** para o **etil-sulfato**. A **linearidade** foi avaliada entre as concentrações de **100 e 10000 ng/mL**, tendo sido selecionado o fator de ponderação $\frac{1}{x^2}$, dos vários fatores estudados, visto ser o que se revelou mais adequado tendo em vista tanto o fator de correlação (r^2), como o somatório dos resíduos. A **precisão** foi avaliada em dois níveis de concentração, tendo-se obtido **coeficientes de variação** na ordem dos **15%** para o **nível baixo** (100 ng/mL) e de **8%** para o **nível alto** (10000 ng/mL), para ambos os compostos. A **veracidade** foi avaliada através de **ensaios de recuperação**, tendo-se obtido valores na ordem dos **80% ao nível do limite de quantificação** e de **95-99%** no **nível alto de concentração** (10000 ng/mL), para ambos os compostos.

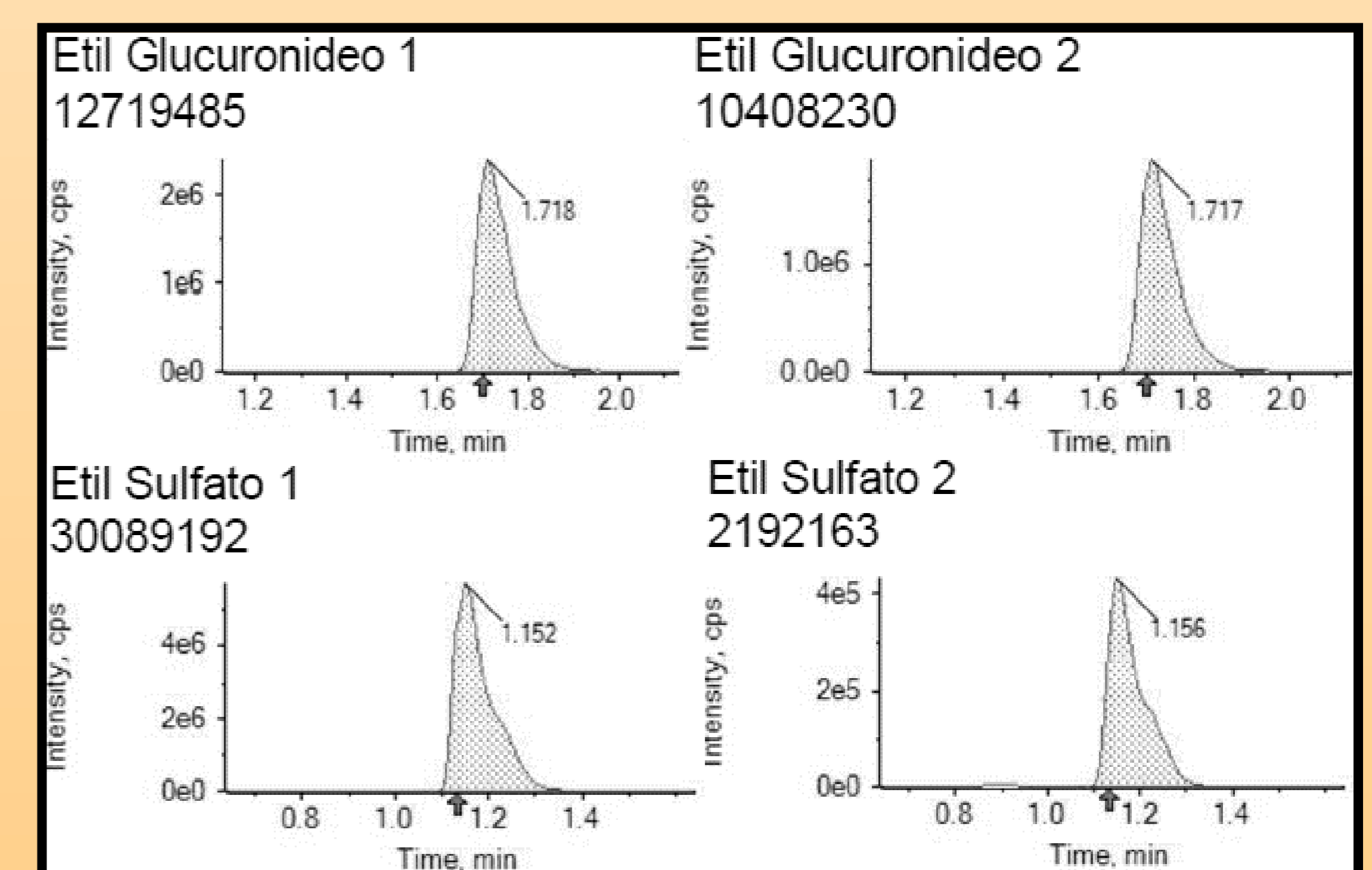


Figura 5 – Representação cromatográfica do EtG (A e B) e do EtS (C e D), em modo MRM

DISCUSSÃO & CONCLUSÕES

A determinação destes biomarcadores associada à determinação direta do etanol, contribuirá para uma resposta mais abrangente em contexto forense, permitindo detetar a exposição ao etanol com maior sensibilidade, através duma técnica específica e seletiva, com limiares analíticos, precisão e veracidade adequados ao propósito.