

APLICAÇÃO DE IMUNOENSAIOS PARA ANÁLISE DE FÁRMACOS E DROGAS DE ABUSO EM SANGUE TOTAL, COM FINALIDADE FORENSE

André Rinaldi Fukushima, Erica Rosa Barreto, Marcos Leilo Fernandes Janaina Ferrari, Welington França, Heloisa Marcal, Alexandre Katafai Pererira, Juliana Ribeiro, Erasmo Soares da Silva e Alice Aparecida da Matta Chasin

Resumo

A técnica de imunoensaio enzimático é amplamente utilizada nos dias de hoje em diversas áreas de diagnose e uma de suas aplicações é na detecção de fármacos e drogas de abuso como cocaína, maconha, benzodiazepínicos, barbitúricos, anfetamínicos, opióides, dentre outros. Uma das principais limitações desta técnica é a sua aplicação estar restrita a matrizes biológicas menos complexas como plasma, soro ou urina. Uma vez que em análises toxicológicas com finalidade forense o material mais adequado, dentre os disponíveis é o sangue total, o objetivo deste trabalho foi padronizar uma metodologia de extração líquido – líquido para fármacos e drogas de abuso nessa matriz e torná-la aplicável à identificação de fármacos pelo EMIT[®].

Palavras chave: Imunoensaio enzimático, fármacos e drogas de abuso, sangue total, toxicologia forense.

Introdução

Os métodos imunoenzimáticos são amplamente utilizados como métodos de rotina na análise de fármacos em fluidos biológicos ou em outras matrizes, podendo ser utilizado de maneira mais restrita ou mais abrangente, sendo assim bastante utilizada por laboratórios de maior ou menor porte, variando desde análise de uma única amostra até métodos automatizados, capazes de realizar centenas de análises por dia. (MOFFAT, 2004).

Em relação à distinção dos tipos de imunoenaios disponíveis, todos baseiam-se no princípio de interação entre antígenos (as moléculas alvo) e anticorpos. Quando aplicado para testes de substâncias, a técnica de imunoensaio utiliza um anticorpo específico para o xenobiótico ou para a classe de fármaco a ser analisada e um modelo classificado da mesma droga ou anticorpo com a finalidade de gerar um sinal mensurável. (MOFFAT, 2004).

Os imunoenaios constituem técnicas de triagem para análise de fármacos e drogas de abuso, em função de sua baixa especificidade e conseqüentemente grande número de falsos positivos, outra característica nos imunoenaios, é o desenvolvimento de *kits* em sua grande maioria para análises em urina. Por ser essa matriz marcador de exposição recente e não

possibilitar correlação com quantificação, sua aplicação em análises toxicológicas com finalidade forense fica restrita à triagem e ainda, nem sempre a urina está disponível nos casos de análise em material de cadáveres. Quando o objetivo é quantificação ou verificação da exposição dos xenobióticos faz-se necessária a utilização de outras matrizes biológicas para a análise.

Entretanto, na realidade do ambiente forense as amostras são em sua maioria, matrizes biológicas complexas como sangue total, conteúdos estomacais, lisados de fígado, rins e em menor parte urina e que são, portanto, de análise inviável no equipamento de EMIT[®]. (MOFFAT, 2004).

O Syva ETS[®] Plus System é um instrumento automatizado do sistema reagente, projetado especificamente para a seleção preliminar de fármacos de abuso em urina, análise qualitativa de vários analitos em soro e a análise quantitativa de álcool etílico na urina, soro ou plasma. O analisador possui um painel completo de acesso aleatório e um carrossel projetado para analisar 16 amostras de urina. (CENTOFANTI & HOUTS, 2001).

Os analisadores EMIT são amplamente utilizados para a monitorização terapêutica de fármacos em soro ou plasma e detecção de fármacos de abuso em urina. (CENTOFANTI & HOUTS, 2001).

Princípios da Técnica de imunoensaio (EMIT)

A Técnica EMIT é baseada na competição entre o xenobiótico presente na amostra e o rotulado com a enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), ligada aos sítios do anticorpo. A atividade enzimática decresce sob a ligação do anticorpo com o xenobiótico, portanto, a amostra pode ser mensurada em termos de atividade enzimática. A atividade enzimática converte a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) para (NADH), resultando em uma variação de absorbância que é medida espectrofotometricamente. A G6PD endógena encontrada no soro não interfere, pois a função de coenzima ocorre apenas com a G6PD bacteriana proveniente da bactéria (*Leucostoc mesenteroides*) empregada na análise. (CENTOFANTI & HOUTS, 2001).

A figura 1 mostra um esquema do funcionamento do EMIT

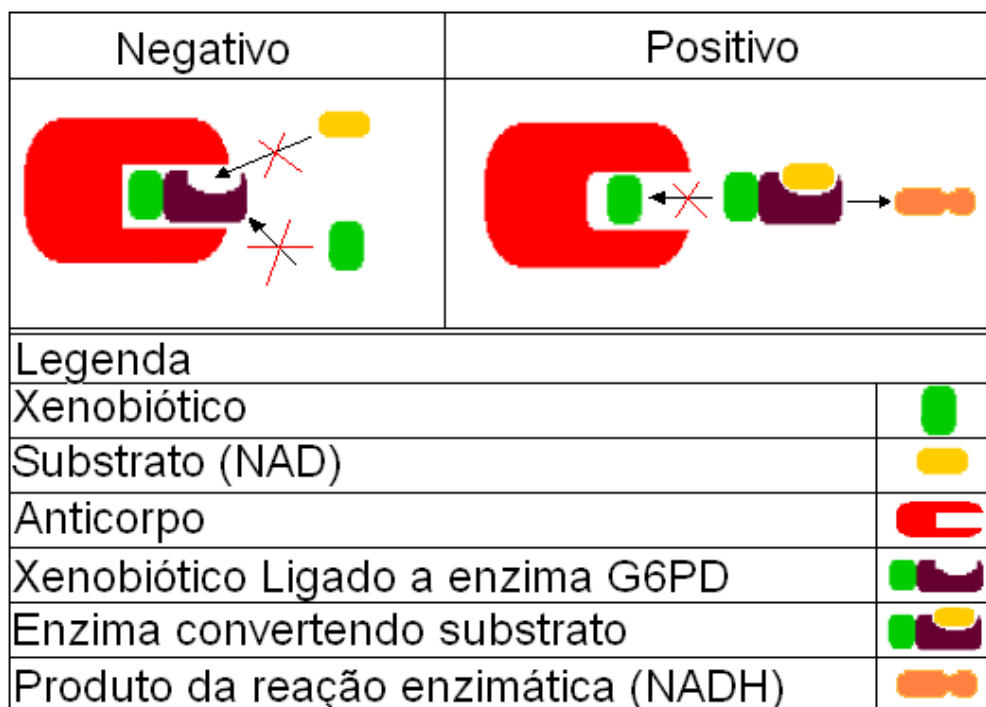


FIGURA 1. Representação esquemática do EMIT

Limitações da Técnica de imunoenensaio

1- Reatividade Cruzada

Compostos semelhantes às moléculas previamente testadas podem positivar o teste. Deve-se a esse fato o teste ser presuntivo, e não conclusivo. (CENTOFANTI & HOUTS, 2001).

2- Controle de temperatura e pH.

O sistema não deve ser exposto diretamente à luz solar ou temperaturas extremas durante a operação. Ele requer uma faixa de temperatura de 20 a 28°C; ainda, o pH deve ser mantido numa faixa adequada para a análise. (CENTOFANTI & HOUTS, 2001).

3- Matrizes Biológicas

O método foi desenvolvido para trabalhar com matrizes biológicas “limpas” como soro, plasma, urina, LCR, demonstrando uma impossibilidade de análise direta em matrizes como sangue total putrefato, conteúdos estomacais, entre outros tipos de matrizes. (VAZ, 2007).

A adaptação de imunoenaios para outras matrizes que não as de origem pode ser útil se devidamente otimizada. O método empregado no presente trabalho foi o ETS[®] Plus System (EMIT[®]) (*Enzyme-multiplied Immunoassay Technique*) que é um ensaio homogêneo utilizado na determinação de fármacos (haptenos) em amostras. (VAZ, 2007).

Frente a essa dificuldade analítica idealizou-se uma maneira de estabelecer um método para a utilização dessas matrizes mais complexas no aparelho de EMIT[®]. Para isso foram delineados processos de extração em sangue total de acordo com as características das substâncias que devem ser cuidadosamente avaliadas.

Material e método

1) Amostras

Foi obtido um pool de sangue total negativo para os xenobióticos pesquisados, e preparados padrões dos respectivos xenobióticos e fármacos pesquisados na rotina, no equipamento ETS[®] Plus System (EMIT[®]), a saber:

- Anfetamínicos - sendo o protótipo utilizado como padrão adicionado o femproporex;
- Barbitúricos - sendo o protótipo utilizado como padrão adicionado o fenobarbital ácido;
- Benzodiazepínicos - sendo o protótipo utilizado como padrão adicionado o diazepam;
- Canabinóides - sendo o protótipo utilizado como padrão adicionado o 11-hidroxitetrahydrocannabinol;
- Cocaína - sendo o protótipo utilizado como padrão adicionado o cloridrato de cocaína.
- Opióides - sendo o protótipo utilizado como padrão adicionado, sulfato de morfina.

2) Soluções e reagentes utilizados.

Mistura de solventes extratores

- Éter: Clorofórmio na proporção de 2:1 da marca Nuclear[®]
- n-Hexano da marca Nuclear[®]

Corretivo de pH alcalinizante e corretivo de pH acidificante

Solução de Hidróxido de sódio a 10%, solução de ácido sulfúrico a 10%

Tampão

- Tampão fosfato 7,4
- Tampão de *ringer* 10,97; adicionado 20% de Polietilenoglicol 6000 (PEG 6000).
- Padrões previamente preparados em etanol.

Cloridrato de cocaína 0,1%, Cloridrato de femproporex (anfetamínico) 0,1%, Sulfato de Morfina (Opióide) 0,1%, Fenobarbital ácido 0,1% (Barbitúrico), Diazepam (0,1%) (Benzodiazepínico), 11-hidroxitetrahydrocannabinol 5 ug/mL (canabinóide).

Sulfato de sódio anidro da marca Vetec[®]

3) Vidrarias e aparelhos

-Agitador horizontal elétrico para tubos do tipo bandeja, com 15 suportes para 15 tubos por vez, modelo Ika[®] HS260 Basic.

-Tubos plásticos e de vidro com tampas; os tubos plásticos possuem tampas de rosquear e 50 mL de capacidade, e os tubos de vidro possuem tampas de vidro jateado e 50 mL de capacidade.

-Papel filtro qualitativo marca Qualy[®]

-Béqueres com capacidade de 80 mL.

-Pipetas automáticas autorreguláveis da marca Kacil[®] e suas respectivas ponteiros da marca Eppendorf[®].

-Capilares de vidro da marca Satelit[®]

4) Equipamento

-ETS[®] Plus System (EMIT[®])

O ETS[®] Plus System (EMIT[®]) pode ser visualizado na figura 2. Inclui um teclado alfanumérico e um *display* para o operador interagir com o sistema, um carrossel que suporta 16 amostras ou calibradores, 6 frascos de reagentes, frascos de reserva para o *buffer* e água, um pipetador para aspirar volumes de amostras e reagentes o qual realiza a mistura e o aquecimento dos mesmos até temperaturas adequadas, e acondiciona posteriormente a mistura de amostra com reagente nas cubetas em temperatura regulada, um microprocessador que controla o fotômetro e a impressora. O sistema pode ser programado para rodar seis diferentes configurações no painel em uma modalidade, acesso randômico ou modo de grupo. Múltiplas análises podem ser efetuadas em um único recipiente de amostra. É possível programar prontamente, embora o software seja simples.

Os reagentes, calibradores e controle para o EMIT[®] são liofilizados e devem ser reconstituídos antes do uso. Uma vez reconstituídos, os reagentes têm validade de 12 semanas. O reagente A contém anticorpos, substrato, NAD e estabilizadores. O reagente B contém enzimas rotuladas de drogas, proteínas de grande peso molecular e estabilizantes. Os calibradores e os controles estão preservados em matriz de soro ou urina. O *buffer* é fornecido como um concentrado, e deve ser diluído com água antes de ser colocado no reservatório do analisador.



Figura 2 – Equipamento ETS[®] Plus System (EMIT[®])

Métodos

Foi realizado o procedimento de pipetagem de 5mL do pool de sangue total previamente testado e negativo para os xenobioticos pesquisados, para tubos plásticos com rosca, em seguida foram adicionados 25, 50 e 100 μ L, com a finalidade de utilizar concentrações de 5 μ g/mL, 10 μ g/mL e 20 μ g/mL dos padrões previamente preparados. A cada tubo, em triplicata, foi realizada a homogeneização do conjunto sangue mais adicionado de padrões, por meio de agitação, e em seguida foi corrigido o pH para 9,0 com hidróxido de sódio a 10%, para os analitos que apresentavam características alcalinas e para aqueles que apresentavam características ácidas o pH foi corrigido para 3,0 com ácido sulfúrico a 10%. Após as correções de pH, foram adicionados cerca de 40 mL de solvente extrator. Todos os tubos foram hermeticamente fechados e acondicionados no agitador elétrico horizontal, e agitados vigorosamente por cerca de 50 minutos. Após essa agitação, foram filtrados sobre sulfato de sódio anidro e acondicionados em capela até completa evaporação do solvente. Foi realizada então a ressuspensão desse material aderido nas paredes e fundo do *becker*, com a adição de cerca de 0,5mL de água destilada. Com auxílio de um capilar de vidro, esse extrato foi utilizado diretamente no equipamento EMIT[®] como matriz de análise. A figura 3, demonstra de maneira esquemática os passos dos processos utilizados.

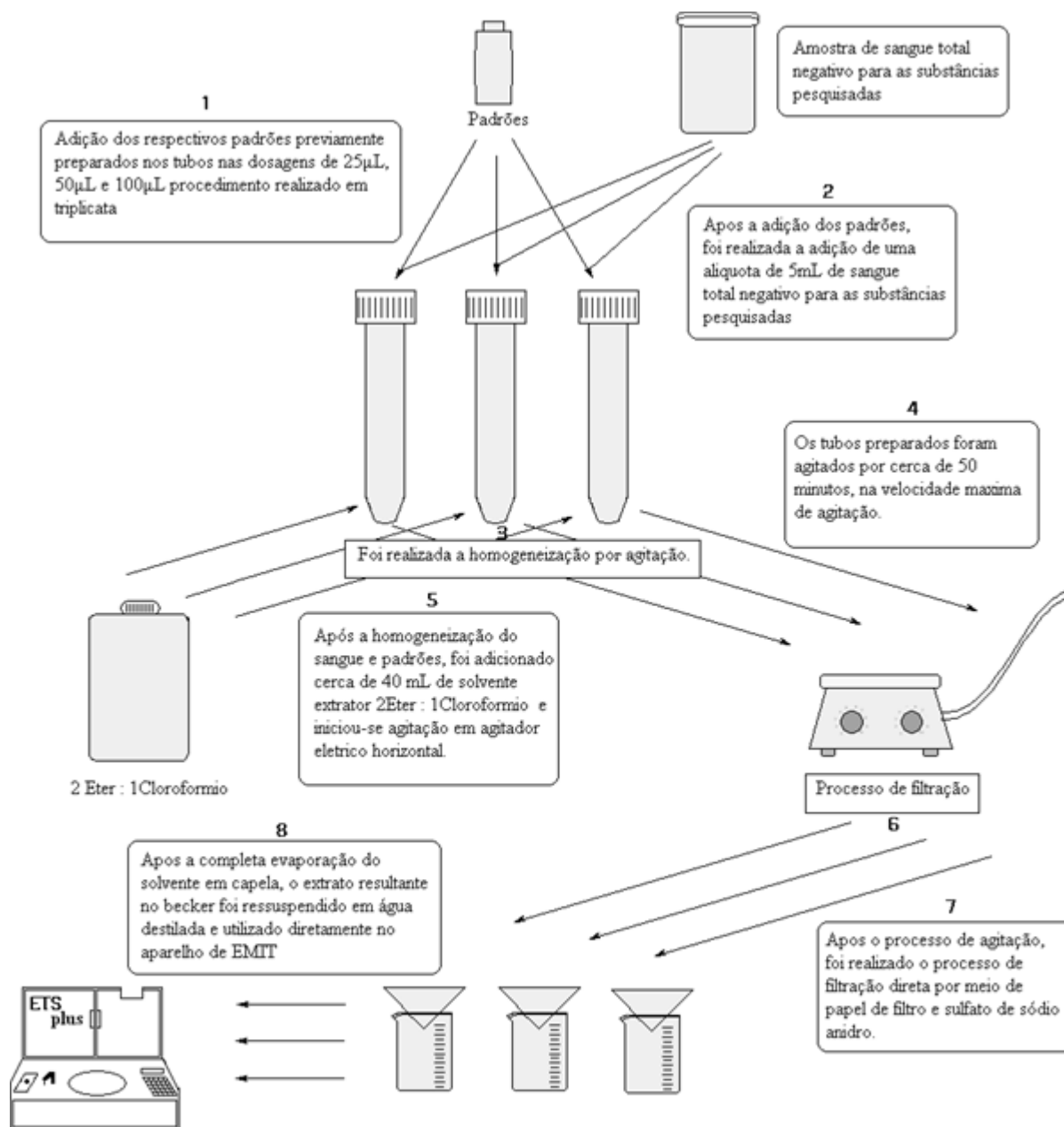


Figura 3 - Fluxograma demonstrando as etapas de trabalho durante os ensaios realizados

Resultados

Os resultados estão apresentados nas tabelas a seguir. O resultados das triplicatas dos xenobioticos pesquisados (citados anteriormente no presente artigo) foram tratados considerando-se como sendo situação “interensaios” (corridas diferentes). Os parâmetros avaliados foram a média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV).

Tabela 1 – Resultados obtidos dos adicionados de cloridrato de cocaína.

Concentração ¹	Cutoff ²	Resultado ²	Média	DP	CV(%)	Interpretação.
5µg/mL	543	666				+
5µg/mL	543	575	595	64	11	+
5µg/mL	543	543				+
10µg/mL	543	655				+
10µg/mL	543	641	645	8	1	+
10µg/mL	543	640				+
20µg/mL	543	763				+
20µg/mL	543	720	697	80	11	+
20µg/mL	543	608				+

Tabela 2 – Resultados obtidos dos adicionados de Femproporex.

Concentração ¹	Cutoff ²	Resultado ²	Média	DP	CV(%)	Interpretação.
5µg/mL	630	820				+
5µg/mL	630	784	778	45	6	+
5µg/mL	630	730				+
10µg/mL	630	839				+
10µg/mL	630	827	830	8	1	+
10µg/mL	630	825				+
20µg/mL	630	887				+
20µg/mL	630	873	875	12	1	+
20µg/mL	630	864				+

² Os resultados são expressos em absorbância com medição em 340 nm (U.V).

¹ Concentração de adicionado por mL de sangue total

Tabela 3– Resultados obtidos dos adicionados de Fenobarbital ácido.

Concentração ¹	Cutoff ²	Resultado ²	Média	DP	CV(%)	Interpretação.
5µg/mL	303	451				+
5µg/mL	303	447	448	2	1	+
5µg/mL	303	447				+
10µg/mL	303	497				+
10µg/mL	303	491	491	6	1	+
10µg/mL	303	485				+
20µg/mL	303	555				+
20µg/mL	303	546	542	16	3	+
20µg/mL	303	524				+

Tabela 4 – Resultados obtidos dos adicionados de Diazepam.

Concentração ¹	Cutoff ²	Resultado ²	Média	DP	CV(%)	Interpretação.
5µg/mL	388	683				+
5µg/mL	388	663	669	12	2	+
5µg/mL	388	660				+
10µg/mL	388	685				+
10µg/mL	388	678	678	7	1	+
10µg/mL	388	670				+
20µg/mL	388	700				+
20µg/mL	388	690	684	20	3	+
20µg/mL	388	661				+

² Os resultados são expressos em absorbância com medição em 340 nm (U.V).¹ Concentração de adicionado por mL de sangue total

Tabela 5 – Resultados obtidos dos adicionados de Sulfato de Morfina

Concentração ¹	Cutoff ²	Resultado ²	Média	DP	CV(%)	Interpretação.
5µg/mL	364	556				+
5µg/mL	364	555	587	19	3	+
5µg/mL	364	523				+
10µg/mL	364	579				+
10µg/mL	364	570	566	15	3	+
10µg/mL	364	550				+
20µg/mL	364	590				+
20µg/mL	364	586	587	2	0,5	+
20µg/mL	364	586				+

Tabela 6 – Resultados obtidos dos adicionados de 11-hidroxitetrahydrocannabinol

Concentração ¹	Cutoff ²	Resultado ²	Média	DP	CV(%)	Interpretação.
2,5µg/mL	645	590				-
2,5µg/mL	645	604	597	10	2	-
5µg/mL	645	605				-
5µg/mL	645	593	599	8	1	-

Tabela 7 – Resultados obtidos do sangue total negativo para os xenobióticos pesquisados.

Nome do Composto	Máximo ²	Negativo ²	Desvio	Cutoff ²	Valor ²	Resultado.
Cocaína	692	447	6	543	457	-
Femproporex	708	428	5	630	419	-
Fenobarbital ácido	552	317	0	303	224	-
Diazepam	479	317	4	388	328	-
Sulfato de Morfina	450	276	5	364	272	-
Cannabis	817	588	4	654	619	-

² Os resultados são expressos em absorbância com medição em 340 nm (U.V).

¹ Concentração de adicionado por mL de sangue total

² Os resultados são expressos em absorbância com medição em 340 nm (U.V).

¹ Concentração de adicionado por mL de sangue total

Discussão e Conclusão

A análise toxicológica em urina é, sem dúvida, um importante instrumento para se verificar a exposição recente a drogas de abuso (YONAMINE, 2000). Porém, existe dificuldade de obtenção deste tipo de matriz no ambiente forense, sendo a rotina em sua grande maioria feita com a utilização de outras matrizes, como sangue total cadavérico, conteúdo gástrico, lisados de fígado e rins, e/ou urina (em menor quantidade).

Considerando a dificuldade de obtenção de urina, na ampliação da utilização do aparelho de imunoenensaio se vislumbrou uma maneira da utilização de outra matriz que não a urina, utilizando o mesmo equipamento e kits utilizados para a investigação de fármacos de abuso em urina, e segundo os resultados, verificou-se a aplicabilidade do aparelho e kits para sangue total, com prévia extração e transformação na matriz compatível com o ensaio, a aquosa.

Outro ponto a ser discutido neste trabalho é a falta de literatura específica que pudesse nortear os rumos da pesquisa prática e avaliar a aplicabilidade do método para a técnica avaliada.

Os resultados foram satisfatórios para todos os xenobioticos utilizados no experimento, com exceção do canabinóide que não apresentou valor mínimo de *cutoff* para positivar o extrato, porém, os resultados obtidos no procedimento realizado para o adicionado de 11-hidroxitetrahydrocannabinol apresentou valores abaixo do *cutoff* e acima do negativo, o que não pode ser necessariamente considerado um resultado negativo, como pode ser visualizado nas tabelas 6 e 7. Widdop, (2001,) esclarece dizendo que apenas uma pequena parte do THC é excretada na urina e conseqüentemente os métodos imunoenzimáticos são projetados para detectar o metabólito oxidado inativo 11-nor- δ -9-tetrahydrocannabinol-9-ácido carboxílico (11-COOH-THC), portanto pode-se pressupor duas alternativas, os processos de extração se mostram inadequados para extrair a quantidade suficiente da molécula em questão, ou a especificidade pelo 11-nor- δ -9-tetrahydrocannabinol-9-ácido carboxílico, impede com que o imunoenensaio detecte o composto utilizado como padrão. As suposições citadas não foram pesquisadas em parte prática por falta de tempo e impossibilidade de aquisição dos padrões para testes posteriores.

Ainda, em todos os ensaios realizados com extração tamponada, os resultados da comprovação da negatividade do extrato do sangue para os canabinóides com um valor alto, muito próximo ao *cutoff* podendo ser um resultado sugestivo de reações inespecíficas com alguma substância extraída em ambiente tamponado. Nenhuma informação que comprove ou rejeite esta hipótese foi encontrada na literatura a respeito deste assunto, e outras pesquisa necessitam ser efetuadas para sua verificação. Os coeficientes de variação calculados nos

ensaios em triplicata encontram-se em intervalos entre 0,5 e 11% o que representa valores de precisão bastante aceitáveis nesse tipo de análise, uma vez que considera-se aceitável em análises toxicológicas com finalidade forense, CV de, até, 20% (CHASIN, 2001).

Conclui-se, portanto, que o procedimento de extração líquido-líquido, com ajuste de pH respectivo para cada fármaco pesquisado, demonstra eficácia no processo de extração, e a posterior ressuspensão em água destilada e utilização no aparelho EMIT® demonstrou ser conduta satisfatória para todos os protótipos pesquisados, com exceção do 11-hidroxitetrahydrocannabinol;

A dificuldade de interpretação de resultados dos métodos imunoenzimáticos deve ser avaliada cuidadosamente, definindo os níveis de positivo, negativo, ou valores que não podem ser classificados como negativos ou positivos, sendo que o fenômeno de “pró-zona” deve ser pesquisado para a confirmação ou refutação neste método especificamente.

A extrema eficácia demonstrada para a análise de Cocaína corrobora a pertinência de sua aplicação uma vez que o uso deste xenobiótico acontece em larga escala no Brasil. Para as outras substâncias, por ser o coeficiente de variação máximo de 11%, aponta no sentido de ser o método bastante aceitável para análises forenses. Acresça-se a isto o custo relativamente baixo e sua exequibilidade em Laboratórios de pequeno e médio por, o que é a realidade de nosso país.

Agradecimentos

A toda equipe do Núcleo de Toxicologia Forense do Instituto Médico Legal onde o trabalho foi realizado.

Bibliografia

CETOFANTI, J.; HOUTS, T., Bulk Reagent Random-Access Analyzers: ETS® Plus System (Emit®). In: WILD, D. **The Immunoassay Handbook** 2. ed United Kingdom: Nature Publishing Group, 2001. 313-315p.

CHASIN, A. A. M. **Parâmetros de confiança analítica e a irrefutabilidade do laudo pericial em toxicologia forense.** Revista brasileira de toxicologia vol. 14 n. 1, julho. 2001 15-21p.

MOFFAT, A.C. **Clarke's isolation and identification of drugs.** 2.ed. London: Pharmaceutical Press, 2004.

VAZ, A., J. ; TAKEI, K. ; BUENO E., **Imunoensaios Fundamentos e Aplicações**. Ed. 1º. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 357p.

WIDDOP, B. Drugs of abuse. In: WILD, D. **The Immunoassay Handbook** 2. ed United Kingdom: Nature Publishing Group, 2001. 795-796 p.

YONAMINE, Mauricio. **Derivação de benzoilecgonina urinária com diazometano para verificação da exposição à cocaína por técnicas cromatográficas**. 2000. 67p.(Dissertação para obtenção do grau de mestre) Faculdade de ciências farmacêuticas - Universidade de São Paulo.