DESENVOLVIMENTO DUM MÉTODO POR HPLC-DAD PARA ANÁLISE DE SUBSTÂNCIAS TÓXICAS EM ANIMAIS

Guilherme Lopes Graça[1;2], Alexandre Quintas[1;2], Suzana Fonseca[3]

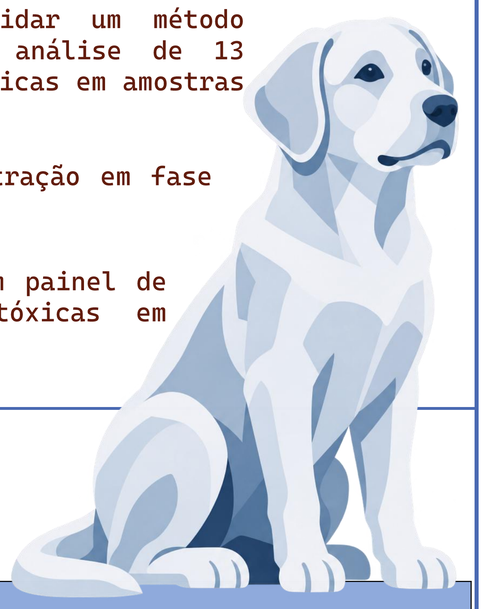
[1]Egas Moniz School of Health and Science, Campus Universitário Egas Moniz, Quinta da Granja, 2829-511 Caparica, Portugal
[2] Laboratório de Ciências Forenses e Psicológicas Egas Moniz, Egas Moniz Center for Interdisciplinary Research, Egas Moniz School of Health & Science, Quinta da Granja, 2829-511 Caparica, Portugal
[3] Serviço de Química e Toxicologia Forenses, Delegação Sul do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, 1169-201 Lisboa, Portugal

INTRODUÇÃO

- As intoxicações de animais domésticos, sobretudo cães, são frequentes na clínica veterinária e na toxicologia forense.
- No contexto dos crimes contra animais, que têm enquadramento legal do ponto de vista penal desde 2014, ao abrigo da lei nº69/2014, de 29 de agosto.
- Em Portugal, os dados epidemiológicos disponíveis foram obtidos por cromatografia em camada fina (TLC). Esta técnica é apenas qualitativa e com limites de deteção elevados.

OBJETIVO

- Desenvolver, otimizar e validar um método único por HPLC-DAD para a análise de 13 substâncias potencialmente tóxicas em amostras de sangue de cão.
- Preparação de amostra por extração em fase sólida (SPE).
- Deteção e quantificação de um painel de substâncias potencialmente tóxicas em amostras biológicas animais.



METODOLOGIA

Painel e condições de partida

- Selecionar os analitos compatíveis com a **SPE** e a **deteção no UV**; condições de Sochor *et al.* (1994) adaptadas ao painel e à matriz animal.

Padrões internos

- Testar **3-Acetamidofenol** para os polares e **cumacloro** para os restantes e decider tendo como critério o menor coeficiente de variação da razão do sinal entre o analito e o PI.

Metodologia e Validação

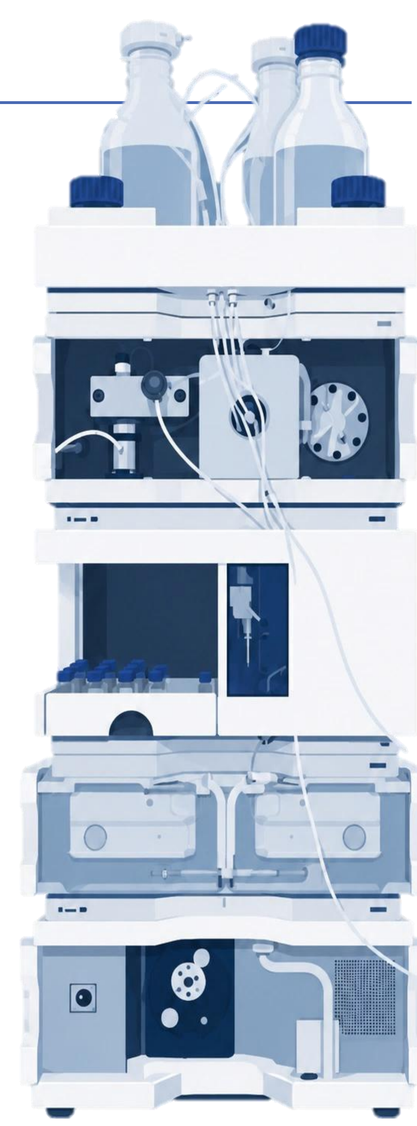
- **SPE** em Oasis HLB (3 cc, 60 mg); pH de aplicação otimizado a partir de **pH 7**.
- Recuperação e efeito de matriz, em brancas fortificadas.
- **Coluna C18**, gradiente de acetonitrilo e fase aquosa a pH 3,0 (ácido fosfórico), 1,3 mL/min, injeção de 10 µL.
- Aquisição espectral; λ de quantificação definido pelo espectro UV.
- Validação **ANSI/ASB 036**: norma usada pelo instituto de medicina legal para métodos de análise de sangue

PAINEL DE ANALITOS

Substâncias potencialmente tóxicas em estudo

Analito	Classe	Carácter ácido-base	Relevância em toxicologia veterinária
Paracetamol Ibuprofeno	Fármacos	Neutro / ácido fraco	Exposição acidental ou administração indevida; hepatotoxicidade e lesão renal no cão
Teobromina	Metilxantina (alimentar)	Base muito fraca	Ingestão de chocolate e derivados de cacau; cardiotoxicidade e neurotoxicidade
Varfarina Bromadiolona	Rodenticidas anticoagulantes	Ácidos fracos	Coagulopatia; classe frequentemente detetada em animais e iscos em Portugal
Estricnina	Alcaloide	Base	Composto proibido na União Europeia, mantendo-se a sua deteção em casos de envenenamento
Metiocarbe	Carbamato (moluscicida)	Neutro	Os moluscicidas e carbamatos são as classes mais detetadas em animais e iscos
Paratião Clorpirifos	Organofosforados	Neutros	Inibição das colinesterases; síndrome colinérgico agudo
Acetamiprida Imidaclopride	Neonicotinoides	Base muito fraca	Uso agrícola e doméstico disseminado; exposição ambiental frequente
3-Acetamidofenol Cumacloro	Padrões internos (PI)	Neutro / ácido fraco	Forte absorção no UV e ausência esperada em amostras biológicas animais, confirmada nas brancas

CONDIÇÕES DE PARTIDA E ADAPTAÇÕES PREVISTAS



	Analitos(s)	Padrão Interno	Preparação da amostra	Coluna	Fase móvel	Deteção
Sochor et al. (1994) método de partida	Ibuprofeno em sangue total	Indometacina	SPE em cartuchos C18 acidificação a pH 2	Fase reversa C18	Isocrática MeOH/H_2O 220:100 pH aparente 3,0	UV a 222nm
Método proposto	Painel de 11 substâncias potencialmente tóxicas	3-Acetamidofenol e cumacloro	SPE em Oasis HLB 3cc, 60mg – pH7	Fase reversa C18	Gradiente de ACN e fase aquosa pH 3,0	DAD – aquisição Espectral multi-λ

RESULTADOS ESPERADOS

Método único, quantitativo e validado

- Deteção e quantificação de múltiplos analitos numa só corrida
- Técnica acessível e amplamente disponível em laboratório
- Substituição de dados meramente qualitativos (TLC)

Impacto na prática clínica e forense

- Reforço da capacidade de diagnóstico toxicológico
- Apoio à decisão clínica e à investigação de suspeitas
- Prova analítica para as autoridades competentes

Objetivos de Desenvolvimento Sustentável

- ODS 3 · Saúde de Qualidade
- ODS 9 · Indústria, Inovação e Infraestruturas
- ODS 15 · Proteger a Vida Terrestre
- ODS 16 · Paz, Justiça e Instituições Eficazes

O HPLC-DAD responde a uma lacuna do contexto nacional, substituindo dados qualitativos por resultados quantitativos e validados.

REFERÊNCIAS

- AAFS Standards Board. (2019). *ANSI/ASB Standard 036: Standard practices for method validation in forensic toxicology* (1.ª ed.). American Academy of Forensic Sciences.
- Fukushima, A. R., et al. (2022). Development, optimization, and validation of a forensic analytical method for quantification of anticholinesterase pesticides in biological matrices from suspected cases of animal poisoning. *Toxics,*
- Herzler, M., et al. (2003). Selectivity of substance identification by HPLC-DAD in toxicological analysis using a UV spectra library of 2682 compounds. *Journal of Analytical Toxicology, 27*(4), 233–242.
- Raposo, R., et al. (2010). Determination of eight selected organophosphorus insecticides in postmortem blood samples using solid-phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 24, 3187–3194.
- Matos, F., et al. (2024). Development and validation of a multi-substance method for routine analysis of pesticides in post-mortem samples by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 245, 116176.
- Pragst, F., et al. (2004). Systematic toxicological analysis by high-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD). *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 42*(11), 1325–1340.
- Sochor, J., et al. (1994). High-performance liquid chromatographic assay for ibuprofen in whole blood using solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 654*(2), 303–306.
- Grilo, A., et al. (2021). Epidemiological study of pesticide poisoning in domestic animals and wildlife in Portugal: 2014–2020. *Frontiers in Veterinary Science, 7*, 616293.