



**SUÍNOS COMO MODELO DE ESTUDO PARA A DETERMINAÇÃO
POSTMORTEN DE FAMPROFAZONA E SEUS METABÓLITOS,
METANFETAMINA E ANFETAMINA, NA MEDULA ÓSSEA**

Antonio Assis VIEIRA^{*1}, Elisangela de Souza SANTOS², Silvana Vianna RODRIGUES³, Eliani SPINELLI³, Bruno da Silva de VASCONCELOS¹

*autor para correspondência: aassisv@gmail.com; aassisv@ufrj.br

¹ Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil

² Instituto Médico Legal Afrânio Peixoto, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

³ Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, Brasil

Resumo/Abstract: Os suínos apresentam similaridades estruturais e funcionais em vários aspectos com os seres humanos e têm sido usados como modelo animal para avaliação de exposição crônica e aguda a drogas lícitas e ilícitas. Este estudo desenvolveu e validou um método para a detecção e quantificação de famprofazona (FA) e seus principais metabólitos, metanfetamina (MA) e anfetamina (AM), em medula óssea suína, para posterior aplicação em análises forenses. O desenvolvimento e a validação do método utilizaram amostras coletadas na Fazenda da UFRRJ. Os resultados foram avaliados estatisticamente e apresentaram-se dentro dos parâmetros de aceitação. O método foi aplicado à determinação de FA, MA e AM em medula óssea de suínos que receberam doses de FA (200 mg) durante cinco dias. FA e MA foram quantificadas nas amostras de medula óssea (103 a 276 e 134 a 267 ng g⁻¹, respectivamente); AM não foi quantificada. Os resultados obtidos foram úteis para aplicação na rotina das perícias forenses.

Palavras-chave: análise forense, estimulantes, suinocultura, toxicologia

Realização:



1. Introdução

A detecção de drogas lícitas e/ou ilícitas na medula óssea representa uma importante alternativa para as análises toxicológicas forenses, principalmente nos casos em que as matrizes convencionais como sangue e órgãos estão indisponíveis ou inviáveis para análise (Stepensky et al., 2003). A análise da medula óssea pode fornecer informações sobre uma possível exposição, em vida, a determinada substância (Cartiser et al., 2011).

A realização de estudos utilizando a medula óssea, em condições controladas, geralmente requer o uso de modelos animais e, os suínos foram escolhidos para a realização desse estudo, pois apresentam inúmeras similaridades com os seres humanos, inclusive no contexto fisiológico e metabólico (Schaefer et al., 2016).

Em estudos dessa natureza, o método desenvolvido e validado deve estar em consonância com o recomendado pelo *Scientific Working Group of Forensic Toxicology* (SWGTOX, 2013).

A famprofazona (FA) é um fármaco anti-inflamatório, analgésico e antipirético não esteroide, e foi escolhida como composto modelo desse estudo devido ao seu perfil metabólico (é um precursor de drogas estimulantes de uso indiscriminado) e também por suas propriedades químicas (é uma droga lipofílica) (Chan et al., 2010).

Um dos grandes desafios para as análises toxicológicas forenses é a preparação da amostra, especialmente quando são empregadas técnicas analíticas de alta sensibilidade. Assim sendo, o presente estudo buscou atender a grande demanda por metodologias de preparo de amostras biológicas, aprimorando o processo de pré-tratamento da medula óssea para favorecer a detecção dos compostos estudados.

Os objetivos desse estudo foram desenvolver e validar um método para detecção e quantificação da FA e de seus principais metabólitos, a metanfetamina (MA) e a anfetamina (AM), em medula óssea de suínos, incluindo uma etapa de pré-tratamento simples e eficiente, visando à aplicação na perícia toxicológica forense.

Realização:



2. Material e Métodos

Os ensaios foram realizados nas instalações do Setor de Suinocultura da FAUR - Fazenda da Universidade Rural (Departamento de Produção Animal/ Instituto de Zootecnia). Os animais foram alojados em baias individuais de 2,45 x 5,45 m, contendo bebedouro do tipo chupeta e comedouro fixo tipo calha de concreto. Foram utilizados quatro suínos machos meio sangue provenientes do cruzamento entre as raças Large White e Landrace, com peso corporal compreendido entre 50 e 55 Kg (3,5 a 4 meses de idade).

O fármaco (FA) foi encapsulado para facilitar a sua administração e garantir a ingestão completa da dose (100 ou 200 mg, conforme a demanda do experimento). Os animais foram submetidos a jejum prévio de três horas antes da administração da FA, após o quê foram alimentados com uma porção de ração abaixo da sua capacidade estomacal (cerca de 100 g de ração), na qual foi incorporada a cápsula contendo a FA. Após a ingestão do fármaco, o consumo da ração foi liberado para que o animal pudesse alcançar a plenitude gástrica (alimentação à vontade). O experimento foi realizado durante cinco dias consecutivos e o fármaco foi administrado diariamente, em dose única, por via oral, sempre pela manhã (às 09h00min). No quinto dia, os animais foram abatidos, sendo insensibilizados por eletrochoque, para coleta das amostras dos tecidos de interesse nas análises para detecção da FA.

Para o desenvolvimento e a validação do método, as amostras de medula óssea foram analisadas por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM). Foram realizados testes estatísticos Shapiro-Wilk (normalidade) e Cochran (homocedasticidade) em cada etapa do desenvolvimento. O método foi aplicado à determinação de FA, MA e AM em medula óssea de vértebras, costelas e escápulas dos suínos que receberam as doses de FA.

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética na Pesquisa da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (COMEP-UFRRJ), conforme o Parecer nº 066/2010, processo nº 23083.004716/2010-99.

Realização:





3. Resultados e Discussão

A execução desse estudo seguiu as recomendações do documento do *Scientific Working Group of Forensic Toxicology* (SWGTOX, 2013), o qual apresenta a padronização de procedimentos para a validação de métodos analíticos aplicados à toxicologia forense. O tratamento estatístico dos dados obtidos foi realizado com o auxílio dos programas PAST[®] e Microsoft Excel[®] (Tabela 1).

Tabela 1: Resumo dos ensaios de avaliação da exatidão e precisão (intra e inter-ensaio) para famprofazona (FA), metanfetamina (MA) e anfetamina (AM) em amostras de medula óssea suína

Composto	FA	MA	AM
Equação da reta	$y = 0,009x + 0,462$	$y = 0,024x - 0,511$	$y = 0,029x + 1,408$
r^2	0.996	0.998	0.998
LD (ng g⁻¹)	50	50	50
LQ (ng g⁻¹)	100	100	100
Nível baixo (300 ng g⁻¹)			
Exatidão (% erro)	-1,8	-4,3	2,0
Precisão intra-ensaio ^a	3,5	3,9	4,6
Precisão inter-ensaio ^a	2,3	3,4	3,7
Nível médio (900 ng g⁻¹)			
Exatidão (% erro)	2,0	1,6	-1,3
Precisão intra-ensaio ^a	3,1	3,0	2,5
Precisão inter-ensaio ^a	2,6	2,0	1,8
Nível alto (1800 ng g⁻¹)			
Exatidão (% erro)	1,2	1,7	-2,3
Precisão intra-ensaio ^a	2,4	2,5	3,3
Precisão inter-ensaio ^a	1,3	1,8	2,5

LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação; ^aPrecisão intra- e inter-ensaio calculadas em termos de desvio-padrão relativo. ^aPrecisão intra- e inter-ensaio calculadas em termos de desvio-padrão relativo.

As amostras de medula óssea foram submetidas a ensaios de estabilidade e apresentaram-se estáveis durante o período de tempo testado (tempo máximo 48 horas), em diferentes condições de temperatura (temperatura ambiente e sob congelamento).

Realização:



Após a validação do método, foram realizados testes *in vivo* com quatro suínos (números de identificação 602, 721, 596 e 597, pelo sistema australiano de marcação). As amostras de medula óssea foram coletadas das vértebras, costelas e escápulas, pois essas peças ósseas, em geral, apresentam-se como bons sítios para a detecção de drogas (Desrosiers et al., 2012). Os resultados obtidos comprovaram o acúmulo das substâncias estudadas na medula óssea (Tabela 2).

Tabela 2: Análises das amostras de medula óssea (n = 2) dos animais tratados com FA

Experimento (dose)	Animal	Concentração do composto (ng g ⁻¹) ± DP		
		Famprofazona	Metanfetamina	Anfetamina
1 (100 mg/ dia)	602			
	Costela	152 ± 1,046	<LQ	ND
	Escápula	105 ± 5,187	<LQ	ND
	Vértebra	103 ± 0,652	<LQ	ND
2 (200 mg/ dia)	596			
	Costela	204 ± 0,678	259 ± 1,058	<LQ
	Escápula	148 ± 1,217	172 ± 0,275	<LQ
	Vértebra	235 ± 2,144	138 ± 0,321	ND
	597			
	Costela	276 ± 13,546	134 ± 5,156	ND
	Escápula	142 ± 0,269	172 ± 1,626	ND
	Vértebra	158 ± 2,358	<LD	ND
	721			
	Costela	232 ± 3,409	267 ± 2,018	<LQ
	Escápula	134 ± 3,432	192 ± 3,632	<LQ
	Vértebra	139 ± 3,665	174 ± 0,769	<LQ

ND: Não detectado; LQ: limite de quantificação; DP: desvio-padrão.

O método desenvolvido impactou positivamente a rotina das perícias toxicológicas forenses realizadas no Instituto Médico Legal Afrânio Peixoto (Rio Janeiro/ RJ), uma vez que proporcionou a elaboração de um protocolo para análise de medula óssea e viabilizando a implementação desse protocolo na rotina pericial.

Realização:



4. Conclusão

A medula óssea de suínos funcionou satisfatoriamente como substituta à de seres humanos, tornando o uso desses animais numa ferramenta prática para estudos dessa natureza, sem a preocupação com a pouca disponibilidade de material, além dos aspectos legais associados com o uso de materiais oriundos de seres humanos.

A medula óssea mostrou-se capaz de acumular as substâncias analisadas durante esse estudo, corroborando estudos anteriores, sendo uma amostra alternativa para as análises pós-morte. O presente estudo foi de fundamental importância para reduzir as limitações atualmente existentes nas análises toxicológicas com finalidade forense.

Agradecimentos

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela oportunidade de realização da pesquisa de campo, à Universidade Federal Fluminense, ao Instituto Médico Legal Afrânio Peixoto e às instituições de fomento FAPERJ e CAPES.

Referências

- CARTISER, N.; BÉVALOT, F.; FANTON, L.; GAILLARD, Y.; GUITTON, J. State-of-the-art of bone marrow analysis in forensic. *International Journal of Legal Medicine*, v. 125, p. 181–198, 2011.
- CHAN, K-H.; HSU, M-C.; TSENG, C-Y.; CHU, W-L. Famprofazone Use Can Be Misinterpreted as Methamphetamine Abuse. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 34, p. 347-353, 2010.
- DESROSIERS, N. A.; WATTERSON, J. H.; DEAN, D.; WYMAN, J. F. Detection of Amitriptyline, Citalopram, and Metabolites in Porcine Bones Following Extended Outdoor Decomposition. *Journal of Forensic Sciences*, v. 57, p. 544-549, 2012.
- SCHAEFER, N.; WOJTYNIAK, J.; KETTNER, M.; SCHLOTE, J.; LASCHKE, M. W.; EWALD, A. H.; LEHR, T.; MENDER, M. D.; MAURER, H. H.; SCHMIDT, P. H. Pharmacokinetics of (synthetic) cannabinoids in pigs and their relevance for clinical and forensic toxicology. *Toxicology Letters*, v. 253, p. 7-16, 2016.

Realização:





29º CONGRESSO
BRASILEIRO DE
ZOOTECNIA



STEPENSKY, D; KLEINBERG, L; HOFFMAN, A. Bone as an effect compartment: Models for uptake and release of drugs. *Clinical Pharmacokinetic*, v. 42, p. 863-881, 2003.

SWGTOX - Scientific Working Group for Forensic Toxicology - Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. *Journal of Analytical Toxicology*, v.37, p.452-474, 2013.

Realização:

