

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Avaliação toxicológica da exposição à *Cannabis* e cocaína na gravidez em cordão umbilical humano: validação de método analítico e prospecção de biomarcadores proteicos de toxicidade

Jefferson Pereira e Silva

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientador: Prof. Doutor Mauricio Yonamine

São Paulo

2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Avaliação toxicológica da exposição à *Cannabis* e cocaína na gravidez em cordão umbilical humano: validação de método analítico e prospecção de biomarcadores proteicos de toxicidade

Jefferson Pereira e Silva

Versão Original

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientador: Prof. Doutor Mauricio Yonamine

São Paulo

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

S581a Silva, Jefferson Pereira e Silva
Avaliação toxicológica da exposição à Cannabis e cocaína na gravidez em cordão umbilical humano: validação de método analítico e prospecção de biomarcadores proteicos de toxicidade / Jefferson Pereira e Silva Silva. - São Paulo, 2019.
181 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Yonamine, Mauricio Yonamine

1. avaliação toxicológica. 2. drogas de abuso. 3. cordão umbilical. 4. validação analítica. 5. espectrometria de massas. I. T. II. Yonamine, Mauricio Yonamine, orientador.

Jefferson Pereira e Silva

Avaliação toxicológica da exposição à *Cannabis* e cocaína na
gravidez em cordão umbilical humano: validação de método
analítico e prospecção de biomarcadores proteicos de toxicidade

Comissão Julgadora da Tese para obtenção do Título de
DOUTOR

Prof. Dr. Mauricio Yonamine
Orientador/Presidente

1o. examinador

2o. examinador

3o. examinador

4o. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2019.

Dedicatória

Dedico esse trabalho à minha mãe, Maria Ivoneide, que nunca mediu esforços para mostrar aos filhos que o maior bem humano é a educação.

Apoio Financeiro

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Processo CAPES AUXPE 3419/2014, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Edital CAPES 47/2017- PDSE - Programa De Doutorado Sanduíche No Exterior 2017/2018. Bolsista da CAPES/Processo nº 88881.187736/2018-01.

Processo nº 2015/15700-3, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Agradecimentos

Agradeço a todos os amigos e familiares que fizeram com que a realização desse projeto (científico e de vida) fosse possível, em especial à minha mãe, Maria Ivoneide Barbosa Pereira e à minha avó, Raimunda dos Santos Barbosa Pereira, pelo amor.

À equipe do laboratório de Análises Toxicológicas, com a qual convivi e absorvi o significado da palavra aprendido: Katia Cypriano, Gabys (minha femi-9), Flávia Roveri, Ana Miguel, Sarah, Maita, Flávia Pine, Iolana Campestrini, e Felipe Mendes.

À equipe do laboratório Mass Spectrometry Facility, da Florida International University, em especial ao Dr. Francisco Fernandez-Lima, Mario Gomes, Yari Cintrón, Jean Haler e Kevin Dit Fouque.

Aos amigos mais que especiais: Ana Luiza, Bruno Barbosa, Luciana Sartori, Iddy, Fernando Gatti, Elys Lima, Alissa Machina e Saeed Alkhaaldi.

Aos funcionários da USP, em especial a Samantha, Edna, Elaine Midori e a Bia, pela generosidade em ajudar sempre.

À toda equipe da obstetria do Hospital das Clínicas-FMUSP, em especial à Ana Maria, Silvana e Mirela, sem as quais este trabalho não teria sido possível. Vocês moram no meu coração.

À Dra Rossana Vieira e Dra Vera Krebs pela incrível colaboração e oportunidade.

À Ariel, por me manter em pleno movimento transformador, pelo poder da fala, pela dedicação e pelo cuidado através da escuta.

Às professoras Tânia Markourakis e Elizabeth Nascimento, pelas conversas aconchegantes nos corredores do 13B e apoio pessoal.

Ao meu orientador, o Prof. Dr. Mauricio Yonamine, pela oportunidade em realizar este projeto, pelo apoio profissional e pessoal sempre generoso. Agradeço por acreditar que a execução das minhas ideias era possível.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos.

Epígrafe

“Tolo é aquele que, tendo defendido tese sobre barcos e mapas, não sonha com horizontes, não planeja viagens, não imagina portos. Anda sempre em terra firme por medo de naufrágio”

*Rubem Alves
(Variações sobre o prazer)*

“A ciência pode classificar e nomear os órgãos de um sabiá mas não pode medir seus encantos.

Quem acumula muita informação perde o condão de adivinhar: divinare.

Os sabiás divinam. ”

*Manoel de Barros
(Livro sobre nada)*

Resumo

SILVA, J. P. **Avaliação toxicológica da exposição à *Cannabis* e cocaína na gravidez em cordão umbilical humano: validação de método analítico e prospecção de biomarcadores proteicos de toxicidade.** 2019. 181 f. Tese (Doutorado em Toxicologia e Análises Toxicológicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

O abuso de drogas atinge aproximadamente 35 milhões de pessoas em todo planeta, sendo um problema alarmante em decorrência de graves danos à saúde, como a dependência química e intoxicações fatais. No Brasil, o número de usuários tem crescido principalmente para o consumo de produtos da *Cannabis* e cocaína, drogas amplamente consumidas, inclusive entre mulheres em período gestacional, trazendo à tona um novo grupo de risco. A exposição gestacional a drogas de abuso está diretamente relacionada a malformações fetais e complicações de saúde para mãe e bebê nos períodos pré- e pós-natal. Tradicionalmente, a avaliação toxicológica da exposição é realizada pela detecção da droga parental e de seus produtos de biotransformação em matrizes materno-fetais por meio de métodos bioanalíticos. Entretanto, estes ensaios não fornecem informações acerca dos impactos fisiológicos ocasionados pela exposição, deixando uma lacuna no que tange às informações sobre os mecanismos e moléculas subjacentes envolvidos em processos de toxicidade. Desse modo, o desenvolvimento de análises toxicológicas mais robustas utilizando tecnologia de ponta, que possam comprovar o uso drogas e também elucidar aspectos de toxicidade é de suma importância, pois auxiliam na compreensão do impacto biológico relativo à exposição humana a xenobióticos. Neste trabalho foram desenvolvidos ensaios bioanalíticos, utilizando o tecido do cordão umbilical para a avaliação da exposição *in utero* à canabinoides. Foi desenvolvido e validado método *QuEChERS* adaptado como preparo de amostra, no qual etapas simultâneas de extração e hidrólise alcalina de canabinoides são alcançadas, utilizando cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas para detecção de delta-9-tetraidrocanabinol (THC), canabinol (CBN), 11-hidroxi-delta-9-tetraidrocanabinol (11-OH-THC) e 11-nor-9-carboxi-tetraidrocanabinol (THC-COOH). Também foram desenvolvidas metodologias utilizando LC-MS/MS e *Trapped Ion Mobility Mass Spectrometry* para análise de proteoma de cordão umbilical humano em diferentes regiões, no intuito de identificar biomarcadores proteicos relativos à fetotoxicidade do uso de drogas na gravidez. Até o presente momento, *QuEChERS* é utilizado pela primeira vez como abordagem bioanalítica para avaliação de drogas ilícitas em matrizes teciduais materno-fetais e mostrou-se satisfatório para detecção de produtos da *Cannabis*. Nos ensaios proteômicos, foram identificados potenciais biomarcadores de fetotoxicidade, como as moléculas *ACTA 2*, *Collagen alpha-1 (XVIII)*, *SMC1A*, *KNL1*, *KMT2A*, em tecidos expostos à *Cannabis* e/ou cocaína. Tais macromoléculas estão correlacionadas a malformações embriogênicas e complicações de saúde na vida intra-uterina. As metodologias desenvolvidas neste trabalho podem ser úteis para uma melhor avaliação da toxicidade do uso de drogas na gravidez, fornecendo novas pistas sobre a exposição e/ou efeitos tóxicos significativos considerados na avaliação de risco.

Palavras-chaves: Avaliação Toxicológica, abuso de drogas, cordão umbilical, validação analítica, espectrometria de massas

Abstract

SILVA, J. P. **Toxicological assessment of *Cannabis* and cocaine exposure during pregnancy in human umbilical cord tissue: analytical method validation and prospection of protein biomarkers related to fetotoxicity.** 2019. 181 f. Tese (Doutorado em Toxicologia e Análises Toxicológicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Drug abuse affects approximately 35 million people worldwide and can be considered a significant burden on society due to severe health problems, e.g. drug addiction and fatal poisonings. In Brazil, the number of users has been growing related to *Cannabis* and cocaine products, drugs widely used, including among women in gestational period, bringing up a new risk group. Gestational exposure to drugs of abuse is directly related to fetal malformations and health complications for mother and babies in the pre- and postnatal periods. Traditionally, toxicological assessment of exposure is performed by detecting the parent drug and its biotransformation products in maternal-fetal matrices using bioanalytical methods. However, these assays do not provide information about the physiological impacts caused by exposure, leaving a lack of information about the pathways and molecules involved in toxicity processes. Thus, the development of robust toxicological analyzes using cutting-edge technologies in order to prove drug use and also elucidate aspects of toxicity is very important, as they help in understanding the biological impact of human exposure to xenobiotics. Herein, bioanalytical methods using umbilical cord tissue to assess in utero exposure to cannabinoids were developed. A *QuEChERS* method was developed fully validated as a sample preparation technique for simultaneous extraction and alkaline hydrolysis of cannabinoids, using gas chromatography coupled to mass spectrometry to detect the analytes delta-9-tetrahydrocannabinol (THC), cannabinol (CBN), 11-hydroxy-delta-9-tetrahydrocannabinol (11-OH-THC) and 11-nor-9-carboxy-tetrahydrocannabinol (THC-COOH). LC-MS/MS based proteomics and Trapped Ion Mobility Mass Spectrometry were also developed in order to identify protein biomarkers related to fetotoxicity of drug use in pregnancy. Our works represents the first use of *QuEChERS* for evaluation of illicit drugs in maternal-fetal tissue and was suitable for detection of *Cannabis* products. In the proteomic assays, potential biomarkers of fetotoxicity were identified in the exposed tissues, such as *ACTA 2*, *Collagen alpha-1 (XVIII)*, *SMC1A*, *KNL1*, *KMT2A*. These proteins are related to embryogenic malformations and health complications in intrauterine life. The methodologies developed in this project may be useful for a better assessment of the toxicity of drug use in pregnancy, providing new clues about exposure and/or significant toxic effects that should be considered in the risk assessment.

Key-words: Toxicological Evaluation, Drug Abuse, umbilical cord Analytical Validation, Mass Spectrometry.

Lista de Figuras

| | |
|--|----|
| FIGURA 1. CORDÃO UMBILICAL LIGADO À PLACENTA..... | 35 |
| FIGURA 2. ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS PRINCIPAIS BIOMARCADORES CANABINOIDES CONJUGADOS COM GRUPAMENTO GLICURONÍDEO | 41 |
| FIGURA 3. CROMATOGRAMA OBTIDO COM A ANÁLISE DE AMOSTRA BRANCO DE TECIDO DE CORDÃO UMBILICAL..... | 59 |
| FIGURA 4. ESQUEMA DO PROCEDIMENTO DE PREPARO DE AMOSTRA <i>QUECHERS</i> ADAPTADO | 62 |
| FIGURA 5. ESQUEMA EM ILUSTRAÇÃO DO EQUIPAMENTO CUSTOMIZADO NANO-ESI-TIMS-MS-Q-TOF | 68 |
| FIGURA 6. APARATO NANO-ESI E CAPILAR DE VIDRO PARA INJEÇÃO DE AMOSTRA..... | 69 |
| FIGURA 7. DIAGRAMA ILUSTRATIVO DOS PARÂMETROS DE OPERAÇÃO UTILIZADOS NO EQUIPAMENTO TIMS | 69 |
| FIGURA 8. TESTE T REFERENTE À VARIÁVEL “PESO” ENTRE RN DE MÃES USUÁRIAS E GRUPO CONTROLE. | 72 |
| FIGURA 9. COMORBIDADES APRESENTADAS PELO GRUPO DE PARTICIPANTES DA PESQUISA. | 73 |
| FIGURA 10. GRÁFICO DE EFEITOS PRINCIPAIS PARA DELTA-9-THC. | 74 |
| FIGURA 11. GRÁFICO DE EFEITOS PRINCIPAIS PARA CANABINOL. | 74 |
| FIGURA 12. GRÁFICO DE EFEITOS PRINCIPAIS PARA 11-OH-THC..... | 75 |
| FIGURA 13. GRÁFICO DE EFEITOS PRINCIPAIS PARA THC-COOH-GLICURONÍDEO | 75 |
| FIGURA 14. GRÁFICO DE OTIMIZAÇÃO DE RESPOSTA PARA EXTRAÇÃO DE CANABINOIDES POR <i>QUECHERS</i> | 77 |
| FIGURA 15. CROMATOGRAMA REPRESENTATIVO DOS LIMITES DE QUANTIFICAÇÃO | 80 |
| FIGURA 16. CROMATOGRAMA REPRESENTATIVO PARA O ENSAIO DE <i>CARRYOVER</i> | 83 |
| FIGURA 17. CROMATOGRAMA REPRESENTATIVO DE AMOSTRA POSITIVA PARA CANABINOIDES EM TECIDO DO CORDÃO UMBILICAL..... | 84 |
| FIGURA 18. GRÁFICOS 2D-IMS-MS EXPRESSOS EM “ <i>HEAT MAP</i> ” MOSTRANDO A DISTRIBUIÇÃO DE PROTEÍNAS..... | 87 |
| FIGURA 19. ANÁLISE DE ESPECTROS DE MASSA DE EXTRATOS PROTEICOS, UTILIZANDO TIMS-TOF.. | 88 |

Lista de Tabelas

| | |
|--|----|
| TABELA 1. PRINCIPAIS MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRA PARA DETECÇÃO DE DERIVADOS DE <i>CANNABIS</i> E COCAÍNA EM MATRIZES MATERNO-FETAIS..... | 43 |
| TABELA 2. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS PADRONIZADAS PARA CANABINOIDES EM CG-MS..... | 58 |
| TABELA 3. PARÂMETROS DO ESPETRÔMETRO DE MASSAS <i>SINGLE QUADRUPOLE</i> | 58 |
| TABELA 4. COMBINAÇÃO DE ENSAIOS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL, UTILIZANDO <i>DESIGN OF EXPERIMENT</i> , MINITAB® <i>STATISTICAL SOFTWARE</i> PARA OTIMIZAÇÃO DE EXTRAÇÃO E HIDRÓLISE ALCALINA DE CANABINOIDES CONJUGADOS. | 61 |
| TABELA 5. SUMÁRIO DE CONCENTRAÇÕES DE CANABINOIDES ENCONTRADOS EM AMOSTRAS MATERNO-FETAIS | 65 |
| TABELA 6. ESTATÍSTICAS DE NASCIMENTO E CARACTERÍSTICAS MATERNAS ENTRE GRUPO CONTROLE E GESTANTES USUÁRIAS DE DROGAS DE ABUSO NA GESTAÇÃO..... | 71 |
| TABELA 7. LIMITES DE DETECÇÃO (LOD) E QUANTIFICAÇÃO (LOQ) PARA CANABINOIDES EM TECIDO DO CORDÃO UMBILICAL. .. | 80 |
| TABELA 8. EQUAÇÕES DA RETA AJUSTADA AO MELHOR MODELO DE REGRESSÃO LINEAR..... | 81 |
| TABELA 9. SUMÁRIO DE DADOS DE PRECISÃO INTRA E INTERDIA E EXATIDÃO DO MÉTODO VALIDADO PARA DETECÇÃO DE CANABINOIDES EM TECIDO DO CORDÃO UMBILICAL | 82 |
| TABELA 10. CONCENTRAÇÕES ENCONTRADAS DE THC, 11-OH-THC E THCCOOH EM AMOSTRAS REAIS DE TECIDO DO CORDÃO UMBILICAL | 85 |
| TABELA 11. LISTA DE PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS ENTRE GRUPOS E ENTRE REGIÕES | 93 |

Lista de Abreviaturas

| | |
|------------------|---|
| 11-OH-THC | 11-hidroxi-delta-9-tetraidrocanabinol |
| AEME | Anidroecgonina metil éster |
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| CBN | Canabinol |
| CCS | <i>Collision Cross Section</i> (sem tradução para o português. Unidade de medida em Espectrometria de Massas por Mobilidade Iônica) |
| CEBRID | Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas |
| COC | Cocaína |
| diOH-THC | 8,11-dihidroxi-delta-9-tetraidrocanabinol |
| D-SPE | Do inglês, <i>Dispersive- solid phase extraction</i> |
| EME | Ecgonina metil éster |
| GC-MS | Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, do inglês: <i>gas chromatography-mass spectrometry</i> |
| HPLC | Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês: <i>high performance liquid chromatography</i> |
| IMS | <i>Ion Mobility Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massas por Mobilidade de Íons) |
| LC-MS/MS | Do inglês, <i>Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry</i> |

| | |
|----------------------|--|
| LLE | Extração líquido-líquido, do inglês: <i>liquid-liquid extraction</i> |
| LOD | Limite de detecção, do inglês: <i>limit of detection</i> |
| LOQ | Limite de quantificação, do inglês: <i>limit of quantification</i> |
| m/z | <i>Mass to charge ratio</i> (relação massa sobre carga, utilizada como unidade de medida em espectrometria de massas) |
| MTBSTFA | <i>N-tert-butildimetilsilil-N-metiltrifluoroacetamida com tertbutildimetilclorosilano 1%</i> |
| NaOH | Hidróxido de sódio |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| PI | Padrão interno |
| PSA | do inglês, <i>Primary secondary amine</i> |
| QuEChERS | acrônimo, do inglês, Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe |
| R | Coefficiente de Correlação |
| R² | Coefficiente de determinação |
| Rpm | Rotações por minuto |
| SIM | Do inglês, <i>Selective ion monitoring</i> , Monitoramento seletivo de íons. |
| TCLE | Termo de consentimento livre e esclarecido |
| TCU | Tecido do cordão umbilical |
| THC | delta-9- tetraidrocanabinol |

THC-COOH 11-nor-9-carboxi-tetrahydrocannabinol

TIMS - MS Do inglês, *Trapped Ion Mobility Spectroscopy – Mass Spectrometry*

UNODC *United Nations Office on Drugs and Crime*

X Concentração obtida através da curva de calibração

Y Variável resposta

Sumário

| | |
|---|----|
| Dedicatória..... | 5 |
| Apoio Financeiro | 6 |
| Agradecimentos | 7 |
| Epígrafe..... | 8 |
| Resumo | 9 |
| Abstract..... | 10 |
| Lista de Figuras..... | 11 |
| Lista de Tabelas | 12 |
| Lista de Abreviaturas | 13 |
| 1. Introdução | 19 |
| 1.1. Drogas de Abuso e Gravidez | 21 |
| 1.2. <i>Cannabis</i> e gravidez..... | 24 |
| 1.3. Cocaína e gravidez..... | 27 |
| 1.4. Matrizes biológicas alternativas e análises toxicológicas na gravidez | 30 |
| 1.5. Tecido do cordão umbilical como matriz biológica alternativa..... | 35 |
| 1.6. Abordagens analíticas e preparo de amostras de origem materno-fetal | 39 |
| 1.7. <i>QuEChERS</i> como preparo de amostras | 45 |
| 1.8. Proteômica e Prospecção de Biomarcadores de Toxicidade na Gravidez .. | 48 |
| 1.9. Espectrometria de Massas Convencional e <i>Ion Mobility Mass Spectrometry</i> em Análises de Biomoléculas | 50 |
| 2. Justificativa | 52 |
| 3. Objetivo | 53 |
| 4. Material e Métodos | 54 |

| | |
|--|----|
| 4.1. Material | 54 |
| 4.1.1. Reagentes e outros insumos | 54 |
| 4.1.2. Padrões de referência..... | 54 |
| 4.1.3. Coleta de amostras biológicas e dados epidemiológicos..... | 54 |
| 4.2. Métodos..... | 56 |
| 4.2.1. População de estudo | 56 |
| 4.2.2. Triagem em urina para uso de Cannabis e cocaína | 56 |
| 4.2.3. Condições cromatográficas para detecção de canabinoides em GC-MS | 56 |
| 4.2.4. Otimização simultânea do preparo de amostra QuEChERS e hidrólise alcalina do THC-COOH-glicuronídeo | 59 |
| 4.2.5. Extração de canabinoides – QuEChERS adaptado | 62 |
| 4.2.6. Análises Estatísticas..... | 63 |
| 4.2.7. Validação de método analítico para determinação de canabinoides em tecido do cordão umbilical | 63 |
| 4.2.6.1. Seletividade..... | 64 |
| 4.2.6.2. Limites de detecção (LOD) e Limites de Quantificação (LOQ) | 64 |
| 4.2.6.3. Linearidade | 64 |
| 4.2.6.4. Precisão e Exatidão..... | 66 |
| 4.2.6.5. Carryover | 66 |
| 4.2.7. Protocolos de Proteômica e Espectrometria de Massas | 66 |
| 4.2.7.1. Extração de proteínas de tecido do cordão umbilical e digestão trípica | 66 |
| 4.2.7.2. Identificação de Proteínas e Análise de Dados..... | 67 |
| 4.2.8. Condições de operação de IMS | 68 |
| 5. Resultados e Discussão..... | 71 |
| 5.1. Dados de coleta, estatísticas de nascimento e estado de saúde materno-infantil. | 71 |

| | |
|---|-----|
| 5.2. Resultados de triagem em urina materna | 73 |
| 5.3. Resultados da otimização do preparo de amostra e hidrólise alcalina de analitos | 73 |
| 5.4. Validação do método analítico para canabinoides em Tecido do Cordão Umbilical | 79 |
| 5.4.1. Seletividade..... | 79 |
| 5.4.2. Limites de Detecção (LOD) e Quantificação (LOQ) | 79 |
| 5.4.3. Linearidade | 81 |
| 5.4.4. Precisão e Exatidão..... | 81 |
| 5.4.5. Carryover | 83 |
| 5.4.6. Análises Toxicológicas e Aplicação do Método QuEChERS Validado em Amostras Reais..... | 84 |
| 5.5. Proteínas detectadas por <i>Trapped Ion Mobility Mass Spectrometry</i> | 86 |
| 5.6. Análise de proteínas identificadas por proteômica convencional..... | 88 |
| 6. Conclusões..... | 96 |
| 7. Referências Bibliográficas..... | 98 |
| ANEXO 1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido..... | 124 |
| ANEXO 2. Instrumento de Coleta de Dados..... | 126 |
| ANEXO 3. Dados estatísticos complementares: Estados de Saúde | 128 |
| ANEXO 4. Dados estatísticos complementares para avaliação da Linearidade..... | 135 |
| ANEXO 5. Tabela de dados obtidos para identificação de proteínas usando IMS | 159 |
| ANEXO 6. Configurações de operação do equipamento <i>nano-ESI Trapped Ion Mobility Mass Spectrometer – Q-TOF-MS</i> | 163 |
| ANEXO 7. Lista de todas as proteínas identificadas em experimento de proteômica convencional..... | 168 |
| ANEXO 7. Ficha do Aluno | 170 |
| ANEXO 8. Currículo Lattes | 172 |

| | |
|--|-----|
| ANEXO 9. Aprovação do Comitê de Ética..... | 178 |
|--|-----|

1. Introdução

De acordo com último Relatório Mundial do Uso de Drogas (*The World Drug Report*) publicado em 2019 pela UNODC (*United Nations Office on Drugs and Crime*), estima-se que, globalmente, 35 milhões de pessoas sofrem com desordens relacionadas ao abuso de drogas e que mais de 585.000 pessoas morreram em decorrência deste problema (UNODC, 2019).

Este impacto representa uma perda contabilizada em pelo menos 42 milhões de anos saudáveis de vida humana, aumentando o impacto negativo mais intensamente entre as mulheres, incluindo aquelas em período gestacional (UNODC, 2019).

Nesse cenário, *Cannabis* (popularmente conhecida como maconha) e cocaína são as drogas mais comumente utilizadas no mundo todo, com 188 e 18 milhões de usuários, respectivamente (UNODC, 2019) afetando, a cada ano, aproximadamente 15% de infantes devido exposição pré-natal (NCSACW, 2018).

Estes dados mostram que, além do aspecto fisiológico negativo, o uso indiscriminado de substâncias ilícitas tem sido um dos principais problemas da sociedade moderna, pois tem atingido de maneira profunda todas as camadas sociais (VAN ZYL, 2014) e se expandido com o fenômeno do surgimento de novas substâncias psicoativas nos últimos 30 anos, em especial pela diversificação de consumo de produtos de *Cannabis* através da permissão para uso terapêutico (ELLIOTT; EVANS, 2014; UNODC, 2019).

Maconha e cocaína, apesar do surgimento de novas drogas, tem sido historicamente um problema crescente em muitos países (ORSON et al., 2014). A cocaína é a droga mais consumida na Europa atualmente junto à *Cannabis* e seus produtos ilícitos, com uso difundido principalmente pela população jovem (MACKUŁAK et al., 2014).

Segundo estudo realizado em 2012 pela de ESPAD (*European School Survey Project on Alcohol and Other Drugs*), o número de usuários dessas drogas tem crescido em ritmo preocupante nos países desenvolvidos, como os da União Europeia (MINIAUSKIENE; JURGAIKIENE; STRUKCINSKIENE, 2014).

De modo geral, nos países desenvolvidos e/ou em desenvolvimento, a maconha e cocaína ocupam os primeiros lugares no *ranking* do abuso de drogas, pois o aumento do poder de compra combina-se à criminalidade e à violência do tráfico de drogas (ORSON et al., 2014).

Na América do Sul, o tráfico e consumo de cocaína tem sido proeminente, particularmente no Brasil, devido a fatores como a localização geográfica e grande população urbana (UNODC, 2017). A taxa de consumo de crack/cocaína no país em 2014 foi de 2.2%; estes dados sugerem que o Brasil está entre as nações com um dos maiores índices de consumo de cocaína, tornando-se um dos seus maiores mercados consumidores no mundo (ABDALLA et al., 2014). Somente em São Paulo são estimados 115.000 usuários (BRASIL, 2013) com grande potencial para dependência e impacto na saúde (FUKUSHIMA et al., 2014).

Segundo o Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID), 22,8% da população pesquisada já fez uso de drogas ilícitas alguma vez na vida. No Brasil, as drogas mais consumidas em 2005 foram: maconha (8,8%), solventes (6,1%), benzodiazepínicos (5,6%), orexígenos (4,1%) e estimulantes (3,2%). Nesta população, a prevalência do uso de drogas mostra-se maior entre homens do que em mulheres, porém, essa perspectiva de gênero tem mudado, mostrando que o consumo de drogas entre mulheres tem aumentado (CEBRID, 2006).

Vale ressaltar que, deste público feminino, 90% estão em idade fértil (15 a 40 anos), introduzindo um grupo de risco emergente no cenário mundial do abuso de drogas e aumentando a probabilidade do uso dessas substâncias no período gestacional (MANTOVANI et al., 2014; MCHUGH; WIGDERSON; GREENFIELD, 2014).

1.1. Drogas de Abuso e Gravidez

O abuso de drogas é caracterizado pelo uso e desejo compulsivo de substâncias químicas que provoquem efeitos de prazer e satisfação. Tais substâncias podem ser de origem natural ou industrializadas, bem como serem utilizadas na terapêutica ou de modo ilícito, possuem efeitos psicotrópicos, capazes de afetar funções nervosas, produzir dependência química, sérios efeitos físicos e muitas vezes morte por *overdose* (JONES; COMER, 2013; NEGRUSZ; COOPER, 2013).

Múltiplos eventos adversos podem contribuir para a evolução de complicações no período gestacional e comprometimento do desenvolvimento da criança na vida uterina. Dentre eles, podem ser considerados uma gama de possibilidades, desde o uso indiscriminado de medicamentos, fatores genéticos até o estilo de vida materno, no qual pode estar inserido a exposição à vários agentes tóxicos, incluindo as drogas da abuso (GUPTA, 2011; HAYATBAKHS et al., 2012; HWA, 2010).

Historicamente, a Toxicologia Reprodutiva e do Desenvolvimento tem ganhado atenção desde o incidente da talidomida (1957-1961), fármaco antiemético e antinauseante, utilizado por milhares de gestantes no mundo todo, que resultou no nascimento de mais de 10.000 crianças com severos defeitos congênitos, dentre eles, a focomelia (VARGESSON, 2015).

Desde então, a exposição *in utero* tem sido foco de discussões científicas e uma eminente preocupação médica, uma vez que o organismo fetal em desenvolvimento é muito mais sensível e apresenta grande vulnerabilidade às substâncias químicas devido aos limitados mecanismos de defesa e detoxificação quando comparados ao organismo adulto (HUESTIS; CHOO, 2002).

O contato na vida intrauterina com esses agentes tóxicos acarreta sérias implicações teratogênicas, afetando principalmente o sistema nervoso em desenvolvimento, predispondo estes indivíduos a doenças na vida adulta, como diabetes, Alzheimer, Parkinson, déficits cognitivos e até distúrbios de comportamento (BAUER et al., 2005; DIAZ et al., 2014; JONES et al., 2016; JOYCE et al., 1995; LAMY S et al., 2014; STROUD et al., 2014; WAGNER et al., 1998).

O impacto do abuso de drogas sobre o feto depende de algumas variáveis como o tempo de uso, duração da exposição, quantidade, tipo de droga, mecanismo de ação e estágio da gravidez. Estas variáveis irão definir o grau de exposição ao qual o feto estará sujeito, bem

como quais tecidos e órgãos serão mais ou menos afetados. Essas substâncias químicas atravessam a placenta através de mecanismos diversos, ligando-se aos seus respectivos receptores, afetando frequentemente o sistema nervoso central (HUESTIS; CHOO, 2002; ZHAO; HEBERT; VENKATARAMANAN, 2014).

Alguns acometimentos neonatais e obstetrícios têm sido diretamente associados à exposição a drogas no período gestacional como o aborto espontâneo, parto prematuro, mudanças hemodinâmicas, malformações, diminuição de peso e crescimento fetal, síndrome de abstinência neonatal, déficits neurológicos e de comportamento, além do aumento de chance de transmissão vertical do vírus HIV (GRAY et al., 2010; MELO et al., 2014; SZUTORISZ; HURD, 2016; ZELNER et al., 2010).

O consumo de cocaína e crack entre as mulheres, por exemplo, tem sido associado à infecção pelo HIV e outras infecções sexualmente transmissíveis. Existe uma forte correlação entre o abuso de drogas por mulheres e comportamentos de risco, como grande número de parceiros sexuais e prática de sexo desprotegido. Não raramente, mulheres nestas situações de vulnerabilidade podem estar em idade fértil e engravidar (ALVES et al., 2012; PINTO et al., 2010).

O uso e dependência de drogas neste período da vida feminina aumentam a perspectiva de negligência infantil e desagregação familiar (PLOTKA et al., 2014). Consequentemente, essas gestantes são mais discriminadas, o que predispõe à negação e a não procura ou ao acesso tardio ao pré-natal (MELO et al., 2014).

Estudos norte-americanos apontam que cerca de 5 % de mulheres fazem uso de drogas na gravidez, no entanto e este ainda não é o valor representativo da realidade, uma vez que as mulheres geralmente omitem essa informação. Neste sentido, a subnotificação torna-se um agravante, pois em muitos casos não são realizados exames toxicológicos comprobatórios (WOOD et al., 2014a).

No Brasil, os dados também são escassos e subnotificados. Estudo realizado com 1.000 gestantes adolescentes (idade entre 11 e 19 anos) demonstrou, através de análises toxicológicas de cabelo, que 6% destas utilizaram cocaína e/ou maconha durante o último trimestre de gestação. Vale ressaltar que nenhuma delas admitiu o consumo de tais substâncias quando entrevistadas por profissionais da área da saúde (BESSA et al., 2010).

Mais recentemente, foi realizado no Brasil o Levantamento do Perfil de Usuários de Drogas na Região da Cracolândia, no sentido de buscar entender o perfil dos usuários desta

região bem como aprofundar o conhecimento de indicadores de vulnerabilidade social, mostrando que o número de mulheres duplicou de 2016 para 2017 e que 1 em cada 15 estavam grávidas, sem realizar pré-natal, apresentando complicações obstétricas como abortos (21%), infante natimorto (21%), baixo peso (100%) e prematuridade (67%) (BRASIL, 2017a).

1.2. *Cannabis* e gravidez

A *Cannabis sativa* L., contém mais de 60 substâncias químicas agrupadas sob o nome de canabinoides. Entre seus principais constituintes estão o delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) e o canabinol (CBN) (BRAND; ZHAO, 2017; BRIDGEMAN; ABAZIA, 2017).

O THC é o principal componente ativo da planta e suas características físico-químicas conferem à molécula uma grande capacidade de ser rapidamente distribuída para o cérebro, tecido adiposo e armazenada por longos períodos, além de ser transportado por entre muitas barreiras biológicas, como por exemplo, a hematoencefálica e transplacentária (GARRY et al., 2009; JAQUES et al., 2014).

O canabinol é o produto da oxidação do THC, o qual pode ser produzido durante o preparo do *hashish* ou mesmo devido ao armazenamento dos produtos da *Cannabis* por longo período, pode causar efeitos sedativos e modificar os efeitos e o metabolismo do THC (AIZPURUA-OLAIZOLA et al., 2016; NADULSKI et al., 2005a).

É importante salientar que o metabolismo dos produtos da *Cannabis* ocorre principalmente pelos mecanismos de hidroxilação do THC, gerando o composto psicoativo 11-hidroxi-tetrahydrocannabinol (11-OH-THC), que também pode ser oxidado formando o composto inativo 11-nor-9-carboxi-tetrahydrocannabinol (THC-COOH). O THC-COOH e o 11-OH-THC são os principais biomarcadores da exposição fetal aos produtos da *Cannabis*, sendo o THC-COOH o mais prevalente em amostras humanas (ELSOHLY; FENG, 1998; HUESTIS; SMITH, 2007).

Ademais, o THC, seus produtos hidroxilados e outros canabinoides também sofrem reações endógenas de conjugação com ácido glicurônico, fazendo com que grande parte dos produtos de biotransformação apresente-se em sua forma conjugada circulando no organismo humano. A taxa de glicuronidação varia de acordo com o analito e com as matrizes biológicas (AIZPURUA-OLAIZOLA et al., 2016).

Na gravidez, a distribuição desses produtos de biotransformação é desconhecida, uma vez que a própria farmacocinética de distribuição de substâncias é alterada neste período da vida feminina. Há aumento do volume de distribuição no corpo da gestante pela formação de novos compartimentos (como tecido da mama, placenta e próprio cordão umbilical) e um rearranjo de volume água e outros fluidos é estabelecido no organismo com a presença líquido amniótico, leite do peito, levando à hemodiluição de compostos químicos de um modo geral (ANGER; COSTANTINE; PIQUETTE-MILLER, 2011).

A maconha continua sendo a droga mais utilizada na gravidez, seguida de cocaína (HAYATBAKHSH et al., 2012). Os índices de uso entre grávidas estão entre 1 a 5% nesta população (DUMAS; SIMMAT-DURAND; LEJEUNE, 2014; LESTER et al., 2001; LOZANO et al., 2007b).

Acredita-se que a droga apresente alguns benefícios clínicos e indícios medicinais para gestantes como efeito antiemético, mas, em muitos países, ainda não pode ser recomendada por médicos (AMMERMAN, 2014), fazendo com que seu consumo ocorra de modo ilícito de acordo com políticas públicas de diferentes países (HILL; REED, 2013).

Os estudos clínicos sobre esta droga ainda são bastante controversos e alguns tem associado o uso de maconha a graves casos de náusea e vômito durante a gravidez, chegando a um quadro clínico de hospitalização, o que contradiz seu suposto uso medicinal (ROBERSON; PATRICK; HURWITZ, 2014).

O uso da *Cannabis* também está associado à diminuição do fluxo sanguíneo placentário, circunferência craniana reduzida em recém-nascidos e sérios problemas respiratórios para a gestante, como por exemplo, doença pulmonar obstrutiva crônica (GARRY et al., 2009).

Seus efeitos tóxicos, incluindo àqueles relativos à vida fetal também não estão totalmente elucidados. Isto se deve em parte pelo uso concomitante com o tabaco e de outras diferentes drogas ilícitas durante o período gestacional (HWA, 2010; MACTIER, 2013; MCHUGH; WIGDERSON; GREENFIELD, 2014).

O THC é agonista dos receptores canabinoides CB1, presentes em todo sistema nervoso e CB2, presentes no cérebro e em algumas partes do sistema imune, particularmente no baço. Todo este sistema de receptores funciona como peça-chave no desenvolvimento pré e pós-natal e, de fato, o receptor CB1 durante a vida fetal é responsável pelo desenvolvimento cerebral, regulando a proliferação neuronal e o direcionamento da migração axonal e sinaptogênese (CALVIGIONI et al., 2014; GARRY et al., 2009; RICHARDSON; HESTER; MCLEMORE, 2016).

Acredita-se que a exposição intrauterina a canabinoides pode alterar o metabolismo natural das células cerebrais, produzindo um estímulo supra-fisiológico do sistema endógeno de tais receptores, afetando a maturação neuronal e a construção dos sistemas neurotransmissores do feto (MORRIS et al., 2011).

Os neurônios dopaminérgicos, por exemplo, são expressos muito cedo no desenvolvimento do cérebro e exercem efeitos tróficos sobre células neuronais. A exposição à *Cannabis* durante a gravidez interrompe a atividade da tirosina hidroxilase, enzima catalisadora da síntese de dopamina, o que gera um impacto em potencial sobre a maturação de células-alvo dopaminérgicas (CALVIGIONI et al., 2014; BLOOMFIELD et al., 2016).

Além disso, estudos em humanos determinaram que o receptor CB1 está presente em todas as camadas da membrana placentária e que o seu estímulo inadequado pode prejudicar o crescimento fetal e inibir a proliferação citotrofoblástica (CALVIGIONI et al., 2014; HUIZINK, 2014).

O bloqueio desses receptores também induz fraqueza motora oral, deflagrando um estado crítico para recém-nascidos no início da amamentação. Outras pesquisas apontam a existência de um receptor canabinoide desconhecido, o qual atua no controle da ingestão do leite por recém-nascidos (FRIDE, 2008).

Yao et al. (2018) apontam que o THC pode inibir a migração das células epiteliais amnióticas humanas, o que pode alterar o desenvolvimento do âmnion durante a gestação e resultar em trabalho de parto prematuro e outros resultados adversos na gravidez.

Somado à exposição intrauterina a canabinoides, o aleitamento é a principal via de intoxicação e consumo passivo no período pós-natal, uma vez que o THC é excretado em quantidades significativas no leite humano, induzindo à sedação, atraso no crescimento, redução do tônus muscular e dificuldades de sucção (GARRY et al., 2009; LISTON, 1998).

Acredita-se ainda que usuárias de maconha tenham uma produção de leite comprometida. O THC inibe a gonadotrofina, prolactina, hormônio do crescimento e tireoide-estimulante e libera corticotrofina, reduzindo assim a quantidade e a qualidade do leite (JAQUES et al., 2014).

Para além dos efeitos fisiológicos, o uso de *Cannabis* na gravidez tem ganhado evidência em questões comportamentais na vida adulta de indivíduos expostos a canabinoides no período gestacional. Estudos tem apontado para o desenvolvimento de distúrbios de ansiedade, propensão à adição química e déficits cognitivos nestes indivíduos, deflagrados por mecanismos epigenéticos (MELIS et al., 2017; SZUTORISZ; HURD, 2016).

1.3. Cocaína e gravidez

A cocaína é um dos alcaloides das folhas de duas espécies do gênero *Erythroxylum* (*E. novogranatense* e *E. coca*), cultivadas principalmente na Colômbia, Bolívia e Peru. Dados históricos mostram que as propriedades estimulantes da cocaína são conhecidas há muitos anos pela humanidade (RICHARDS; LAURIN, 2017).

Dentre as drogas de abuso, é uma das principais substâncias estimulantes do sistema nervoso central com alto potencial para dependência (ALVEAR et al., 2014). Esta droga afeta muitos sistemas, mas em seu mecanismo de ação, age principalmente como agente simpatomimético no sistema nervoso central, bloqueando a recaptação de neurotransmissores, em especial, dopamina na fenda sináptica, a qual liga-se a receptores dopaminérgicos, principalmente, no *nucleus accumbens*, gerando sensações de prazer e recompensa, (NESTLER, 2005).

Quando administrada em seres humanos, a cocaína sofre rápida biotransformação através da hidrólise enzimática de seus dois grupamentos éster, formando uma série de produtos de biotransformação, tais como, benzoilecgonina (em maior proporção), ecgonina metil éster, subsequentemente biotransformada em ecgonina, e pequenas quantidades de norcocaína. Quando fumada, sofre pirólise originando anidroecgonina metil éster, um importante marcador da exposição ao *crack* e quando consumida junto ao álcool, origina o cocaetileno, formado por transesterificação hepática, apresentando efeitos semelhantes ao da cocaína, entretanto mais prolongados (ALVEAR et al., 2014; D'AVILA; LIMBERGER; FRÖEHLICH, 2016; DE JAGER; ANDREWS, 2001).

Como efeitos característicos, leva a arritmias cardíacas, vasoconstrição, hipertensão (MCHUGH; WIGDERSON; GREENFIELD, 2014; SORDO et al., 2014) e conseqüentemente a severos riscos cardiovasculares, como infarto do miocárdio, cujas taxas tem crescido gradualmente em grávidas, atribuídas fortemente ao abuso de cocaína (SORDO et al., 2014; WAGNER et al., 1998), além de problemas de desordem de locomoção, diminuição da atenção, pânico e psicose (MINNES et al., 2012).

Indiretamente, a ação vasoconstritora da cocaína durante a gestação é responsável pela redução do fluxo sanguíneo placentário, levando à deficiência no suprimento de oxigênio e nutrientes para o feto, podendo causar baixo peso ao nascimento e retardo no crescimento intrauterino (BAUER et al., 2005). O abuso de cocaína também oferece outros

grandes riscos teratogênicos, podendo causar malformações visuais, auditivas, cardiovasculares e no trato genitourinário (KEEGAN et al., 2010).

Além disso, o fenômeno de neuroadaptação, que ocorre em adultos, não se manifesta na vida fetal, deste modo, os efeitos sob o feto podem levar a má-formação do SNC em desenvolvimento, o que seria responsável por efeitos em longo prazo observados na infância, adolescência e vida adulta (LESTER; PADBURY, 2009).

Duas principais complicações obstétricas são extensivamente relatadas e associadas ao uso de cocaína na gravidez, são elas o descolamento placentário e ruptura prematura da membrana placentária (DE GIOVANNI; MARCHETTI, 2012).

Fatores de risco psicossociais são agregados ao longo da vida do indivíduo decorrentes dessa exposição intrauterina à cocaína, como déficit de atenção e aprendizado, baixo desenvolvimento da linguagem, complicações comportamentais e psicopatologias na adolescência e vida adulta, comprometimento de habilidades de audição, atenção e memória narrativa (BEEGHLY et al., 2014; LEVINE et al., 2012).

Mais recentemente, a exposição pré-natal à cocaína tem sido relacionada à vulnerabilidade para o início de uso e adição a drogas em adolescentes. O mecanismo envolvido neste processo considera que a exposição precoce à cocaína pode comprometer o desenvolvimento da neurocircuitaria da região córtico-striato-límbica, responsável principalmente pelos processos de recompensa, regulação emocional e controle motivacional (YIP et al., 2016).

Outro fator que agrava o problema da exposição fetal é o subdiagnóstico do uso de cocaína na gravidez. A sintomatologia não é específica e a ausência de programas públicos para o controle do uso de drogas não contribuem para um diagnóstico rápido e precoce, o que pode fazer com que a mãe e a criança não recebam cuidados iniciais adequados (JOYCE et al., 1995).

A avaliação à exposição a drogas no período gestacional torna-se dessa maneira uma prática de suma importância, pois garante o tratamento pré-natal adequado e assistência apropriada ao recém-nascido e sua mãe tão logo quanto possível (CONCHEIRO et al., 2016; DE CASTRO et al., 2013).

Devido a todas estas complicações, é notório que o abuso de drogas traz consigo uma miríade de agravos neonatais e obstétricos e que há uma urgente necessidade de

desenvolvimento de processos bioanalíticos seguros para o alcance, de redução de danos voltadas para o infante e para a mãe (GRAY; HUESTIS, 2007).

1.4. Matrizes biológicas alternativas e análises toxicológicas na gravidez

Apesar de algumas amostras biológicas materno-fetais como sangue e urina serem tradicionalmente utilizadas, estas ainda apresentam desvantagens analíticas frente a outras matrizes, como problemas de coleta, pequeno período de detecção e resultados falsos negativos (GRAY; HUESTIS, 2007).

A partir dessas limitações analíticas, foram desenvolvidas novas soluções em procedimentos bioanalíticos mais sensíveis e específicos para detecção de biomarcadores referentes à exposição a drogas em tecidos e fluidos de origem materno-fetal (BARR; BISHOP; NEEDHAM, 2007; GRAY et al., 2009).

O uso de novas matrizes biológicas para análises toxicológicas tem recebido grande atenção devido a sua funcionalidade, frente àquelas já utilizadas de maneira tradicional. Estas matrizes possuem a vantagem do procedimento de coleta ser, em grande parte, não invasivo, oferecer quantidade suficiente de material e permitir a detecção de compostos provenientes do metabolismo de drogas com um maior período de detecção (GALLARDO; QUEIROZ, 2008).

Cabelo materno ou do neonato, por exemplo, oferecem um amplo histórico de uso de drogas e tem sido bastante utilizado em análises toxicológicas. Xenobióticos podem depositar-se nesta matriz através do aporte de sangue para o cabelo em crescimento da mãe ou do bebê ou pelo contato direto com o líquido amniótico, no caso do feto. Para o recém-nascido, reflete uma exposição desde o terceiro trimestre, enquanto que para mãe pode representar uma exposição mais prolongada (SU et al., 2012).

Entretanto, dependendo do local de coleta e do comprimento do cabelo materno, a matriz pode refletir uma exposição prévia às drogas, sem correlação direta com a exposição fetal. Um dos desafios para o processamento desta amostra é a quantidade de cabelo insuficiente (principalmente para o neonato) para análise toxicológica ou mesmo a rejeição materna quanto à coleta deste material (FALCON et al., 2012; JOYA et al., 2016).

O líquido amniótico pode funcionar como um reservatório de xenobióticos, pelo qual o feto é exposto a uma gama de substâncias químicas diluídas no fluido, principalmente, drogas hidrossolúveis que chegam até o organismo fetal através de difusão transdérmica ou mesmo pela sua ingestão (HELLER; BURD, 2014; WINECKER et al., 1997).

A placenta, uma das principais interfaces da comunicação materno-fetal, de suma importância para circulação sanguínea, atua como transportador de todos os nutrientes,

excretas e compostos tóxicos. É o tecido pelo qual drogas e contaminantes podem alcançar diretamente o feto, sendo amplamente utilizada para detecção de biomarcadores de drogas na gravidez (LOZANO et al., 2007a; SAITO et al., 2011). O transporte de xenobióticos ocorre por vilosidades, que são formadas durante o período lacunar (8-13 dias após a fecundação). Até a décima semana de gestação o sincício tecidual, membrana basal e as vilosidades não estão completamente formadas, podendo, desta maneira, serem a porta de entrada para substâncias absorvidas pelo feto por difusão passiva (GIAGINIS; THEOCHARIS; TSANTILI-KAKOULIDOU, 2012).

O vênix caseoso é uma amostra biológica exclusiva do período gestacional que atua originalmente como uma barreira física composta de células e lipídios que recobre a pele fetal. Em estudos toxicológicos, podem fornecer informações sobre a exposição intrauterina à xenobióticos, pois drogas presentes no líquido amniótico podem depositar-se diretamente nesta camada protetora devido contato contíguo dessa matriz com o fluido contaminado (MOORE et al., 1996).

Em menor escala, amostras de unhas tem sido utilizadas para a avaliação da exposição *in utero*, pois a necessidade de pulverização do material torna o procedimento analítico complexo e demorado (BERGER et al., 2014; MORINI et al., 2013; SKOPP; PÖTSCH, 1997)

Da mesma maneira a saliva materna é pouco utilizada para o teste de drogas, pois é adequada somente para avaliação de um consumo agudo, ocorrido em um curto intervalo de tempo antes da coleta (CASTANETO et al., 2013; LOZANO et al., 2007a).

De modo geral, a utilização dessas amostras tem obtido baixo sucesso, devido a problemas práticos de coleta, processamento laboratorial complexo, quantidade inadequada de amostra, não autorização e resistência paterna para coleta de amostras dos recém-nascidos, além de questões culturais e estéticas (CORRION et al., 2005; JAUNIAUX et al., 1999; MOORE et al., 1996).

Neste contexto, duas matrizes têm fornecido resultados promissores: mecônio e mais recentemente o tecido do cordão umbilical (CHITTAMMA et al., 2013), para as quais alguns ensaios imunoenzimáticos já foram desenvolvidos com posterior confirmação por cromatografia gasosa ou líquida acoplada a espectrômetros de massa (PLOTKA et al., 2014; WOOD et al., 2014b).

Entretanto, dados ainda são escassos quanto à detecção de drogas nestas matrizes. Propriedades químicas das drogas podem afetar diretamente as concentrações dos analitos presentes no mecônio e no cordão umbilical, causando resultados divergentes entre as duas matrizes (PALMER; WOOD; KRASOWSKI, 2016).

O mecônio é uma matriz biológica de origem fetal que começa a ser formada e acumulada a partir da 12^a semana gestacional (HUESTIS, 1997). Acredita-se que o intervalo de detecção de substâncias nesta matriz também acompanhe seu período de aparecimento *in utero*; neste sentido, essa amostra pode refletir o padrão de uso de drogas na gravidez a longo prazo, apresentando uma ampla janela de detecção para o uso de drogas (WOOD et al., 2014b).

Esta matriz consiste nas primeiras fezes eliminadas pelo recém-nascido. Apresenta coloração verde-escura, é composto por água, mucopolissacarídeos, lipídeos, sais e ácidos biliares, células epiteliais e resíduos do líquido amniótico ingerido pelo feto (MADEJ, 2010). O acúmulo de substâncias químicas nesta matriz, como as drogas de abuso, ocorre através de deposição pela bile e/ou ingestão do líquido amniótico pelo feto (GRAY et al., 2009; KWONG; RYAN, 1997).

Durante as duas últimas décadas o mecônio tem sido bastante utilizado no intuito de determinar a exposição fetal a drogas, comprovar o abuso de drogas materno e conseqüentemente possibilitar tratamento médico adequado e reabilitação social aos indivíduos afetados (GARCÍA-ALGAR et al., 2009; JOYA et al., 2010).

Dentre as drogas de abuso mais frequentemente identificadas estão o tetraidrocanabinol (THC), comumente utilizado pelas mães; 6-monoacetilmorfina (6-MAM) derivado da heroína, anfetaminas, benzodiazepínicos e cocaína, além de uma variedade de drogas terapêuticas prescritas (LAUNIAINEN et al., 2013).

Por tratar-se de uma matriz semi-sólida complexa, as metodologias descritas apontam de mais de uma etapa de extração, com homogeneização da amostra em solvente orgânico para extração inicial dos analitos (extração sólido-líquido) e posterior purificação deste extrato através de extração líquido-líquido e extração em fase sólida, sendo os biomarcadores identificados por cromatografia gasosa ou líquida, ambas acopladas à espectrometria de massas (CHAN et al., 2003; GARERI; KLEIN; KOREN, 2006; GRAY; SHAKLEYA; HUESTIS, 2009; LÓPEZ et al., 2007; MARCHEI et al., 2006; PICHINI et al., 2005).

Le et al., (2005), através de GC-MS, utilizaram mecônio para avaliar o abuso de oxicodona por grávidas. O uso ilícito de opióides no período gestacional também foi abordado por Coles et al., (2007), por meio da detecção de, 6- mono-acetil morfina (6-MAM), metabólito da heroína. Neste estudo, comparou-se a eficiência do mecônio perante outras amostras biológicas (sangue, urina, plasma) na determinação do uso ilegal dessas substâncias.

Ostrea et al. (2006) e Zelner et al. (2010, 2013) avaliaram a aplicabilidade do mecônio para métodos de triagem e detecção de ácidos graxos etil ésteres como biomarcadores da exposição aguda ao etanol, o que auxiliaria no diagnóstico da síndrome fetal alcoólica, diminuindo os riscos à saúde neonatal.

Ristimaa et al. (2010) desenvolveram método baseado em LC-MS, com o qual 77 diferentes compostos químicos foram identificados, dentre eles: anestésicos locais, nicotina e seus produtos de biotransformação, opioides, estimulantes, hipnóticos e sedativos, antidepressivos, antipsicóticos e canabinoides.

Wang et al. (2010), em relato de caso, compararam o perfil de detecção de benzodiazepínicos, canabinoides e cocaína nas amostras de urina e mecônio oriundas de gêmeos bivitelinos. Os ensaios de confirmação em mecônio apresentaram diferentes concentrações para canabinoides e cocaína, demonstrando limitações analíticas da amostra, justificadas pelo diferente tempo de coleta entre os indivíduos e difusão heterogênea de drogas nesta matriz.

McMillin et al. (2015) realizaram um extenso trabalho de triagem imunoenzimática e confirmação cromatográfica para 11 diferentes tipos de drogas em amostras de mecônio. O estudo tentou estabelecer diferenças entre a exposição fetal ilícita do uso terapêutico de drogas. Segundo os autores, as diferentes concentrações dos biomarcadores quantificados fazem com que esta matriz não seja confiável para a inferência de tempo, extensão ou mesmo frequência de exposição a drogas no período gestacional.

Acredita-se que o mecônio possa funcionar como matriz de acúmulo para muitos compostos químicos aos quais o feto pode ser exposto, no entanto o monitoramento de drogas por meio desta amostra apresenta algumas desvantagens: o material pode ser expulso em até 72 horas ou mais, aumentando o tempo para análises laboratoriais ou mesmo expelido *in utero* em situações de estresse, tornando-o indisponível para realização de exames toxicológicos (CONCHEIRO et al., 2013).

Em alguns casos, a repetição do teste não é possível devido a pequenos volumes de amostras de mecônio disponíveis (COLES et al., 2007). Além disso, a distribuição heterogênea dos analitos pela matriz e administração médica de fármacos no período intraparto ou diretamente aos recém-nascidos antes da coleta do mecônio são fatores que dificultam a análise e a diferenciação entre o uso abusivo ou terapêutico de drogas no período gestacional (WOOD et al., 2014a).

Desta maneira, mesmo que o mecônio tenha sido amplamente utilizado como padrão ouro para triagem e detecção da exposição fetal a drogas nas últimas duas décadas (GRAY et al., 2009), os entraves de coleta e análise trazem a necessidade de novas matrizes biológicas para o teste de drogas, como por exemplo, o tecido do cordão umbilical (MARIN et al., 2011).

1.5. Tecido do cordão umbilical como matriz biológica alternativa

O cordão umbilical liga o feto à placenta (Figura 1), é uma estrutura gelatinosa, rica em ácido hialurônico (ROBERT, 2015). Possui aparência variável, entretanto compartilha características bioquímicas e histológicas semelhantes aos demais tecidos conjuntivos fetais (SLOPER; BROWN; BAUM, 1979). É formado principalmente durante o segundo e terceiro trimestres, alcançando dois terços do seu comprimento total ao final do segundo trimestre (FRANK, 2017). Possui em média 61 centímetros e as trocas de nutrientes e irrigação sanguínea provenientes da mãe ocorrem, geralmente, através de duas artérias e uma veia (FERGUSON; DODSON, 2009). É a via essencial do suprimento de irrigação sanguínea, oxigenação e de nutrição materno-fetal (SAKAMOTO et al., 2013).



Figura 1. Cordão umbilical ligado à placenta.

Fonte: Acervo Pessoal.

Apesar da atuação da placenta como barreira protetora do feto aos intoxicantes provenientes da mãe, é possível que drogas de abuso ultrapassem a barreira transplacentária, alcançando o feto pelo aporte sanguíneo, depositando-se no tecido do cordão umbilical, acarretando em anormalidades morfo-fisiológicas, comprometimento da circulação materno-placentar e sérios riscos clínicos para o feto e para a mãe (ORTIGOSA et al., 2012; VAVRINKOVÁ et al., 2001; WAGNER et al., 1998).

De acordo com Berveiller et al. (2015), quanto mais cedo a exposição à drogas ocorre, piores são as complicações para o feto, pois o mecanismo de transporte de drogas é alterado na gravidez, principalmente durante o primeiro trimestre, no qual alguns tecidos apresentam expressão diferencial de receptores e transportadores de drogas específicos em células placentárias, diretamente envolvidos na circulação sanguínea e distribuição de xenobióticos pelos compartimentos materno-fetais.

Alguns estudos têm utilizado o tecido do cordão umbilical como nova matriz para análises toxicológicas devido caracterizar-se como um das principais vias de aporte de xenobióticos para o feto e ser um importante órgão de ligação da mãe com o feto, apresentando praticidade de coleta imediata frente ao mecônio (PALMER; WOOD; KRASOWSKI, 2016; SAITO et al., 2011).

Esta matriz foi utilizada pela primeira vez por Montgomery et al. (2006), comparada ao mecônio, para avaliar exposição de recém-nascidos a opiáceos através de imunoensaios e confirmação por GC-MS, encontrando 95% de pares de amostras com resultado positivo.

Desde então, o cordão umbilical tem surgido como alternativa para o teste de drogas na gravidez, com vantagens sobre mecônio, principalmente pela sua facilidade de coleta imediata e quantidade abundante em todos recém-nascidos (JONES et al., 2015).

Montgomery et al. (2008), avaliaram também a eficiência do tecido do cordão umbilical para detecção de anfetaminas, opiáceos, cocaína, canabinoides e fenciclidina, considerando a matriz em questão adequada para a avaliação do uso de drogas na gravidez.

Jones et al. (2009) desenvolveram método analítico de determinação simultânea de anfetamina e metanfetamina em cordão umbilical através de LC-MS/MS, sugerindo uma maior seletividade e eficiência em detrimento do mecônio.

Castro et al., (2011) compararam o cordão umbilical com placenta, mecônio e urina para estabelecimento do período de detecção e monitoramento da distribuição de metadona e seus produtos de biotransformação em gestantes. Apesar de considerar melhor detecção de cocaína e opiáceos em mecônio, o estudo considerou a praticidade oferecida pelo cordão umbilical em termos de coleta e preparo de amostra.

Estudos semelhantes também avaliaram sua aplicabilidade junto a outras amostras como cabelo, mecônio e placenta para detecção de cocaína, opiáceos, metadona e anfetaminas (CONCHEIRO et al., 2013; DE CASTRO et al., 2013).

Foi comparado ao fluido amniótico (WINECKER et al., 1997) para detecção de cocaína, e ao mecônio (MARIN et al., 2011) para a identificação de nicotina e seus produtos de biotransformação.

A detecção de canabinoides também foi estudada em cordão umbilical, obtendo-se resultados consistentes na comprovação do uso de maconha por mulheres grávidas, entretanto, apenas o analito THC-COOH foi avaliado neste trabalho (CHITTAMMA et al., 2013).

Marin; Metcalf; Mcmillin (2014) sugerem que o tecido do cordão umbilical oferece melhor sensibilidade em comparação ao mecônio e urina quando utilizados para detecção de opioides, benzodiazepínicos, hipnóticos, barbitúricos e fenciclidina.

Recentemente, abuso de heroína foi avaliado pela identificação de 6-monoacetilmorfina e meconina, derivado do adulterante de drogas noscarpina. O estudo identificou 4,9% das amostras de cordão umbilical positivas para esta droga (JONES et al., 2015).

Detecção de metais pesados como chumbo, mercúrio, cobre e selênio, sugerem que esta amostra biológica pode acumular xenobióticos e ser utilizada como meio para comprovar exposição pré-natal a vários elementos potencialmente tóxicos (SAKAMOTO et al., 2013).

Alguns cuidados devem ser considerados para o preparo de amostra desta matriz a fim de garantir uma precisa mensuração das concentrações de drogas e seus metabólitos. Um desses fatores é a variação da quantidade de água, que pode aumentar ou diminuir durante a gestação. A água é retida por uma substância denominada geleia de Wharton, que circunda os vasos sanguíneos (DI NARO et al., 2001; KALISH et al., 2003; SLOPER; BROWN; BAUM, 1979). Outro fator é a quantidade de sangue, este por sua vez possui uma limitada janela de detecção similar ao plasma materno (HUESTIS; CHOO, 2002) e sua presença pode carrear interferentes circulantes na hora do parto. Tais fatores podem alterar ou mesmo inviabilizar a correlação estatística entre diferentes análises toxicológicas (GRANDJEAN et al., 2005).

Alguns autores também discutem a porção do cordão umbilical a ser coletada, a fim de determinar se a droga ou metabólito é distribuído de modo homogêneo, podendo serem coletadas as regiões: proximal ao feto, proximal à placenta e intermediária (CASTRO et al., 2011; SAKAMOTO et al., 2013).

As vantagens do tecido do cordão umbilical em contraste ao mecônio são claras devido sua quantidade abundante e fácil procedimento de coleta, sendo em muitos casos considerado um produto de descarte hospitalar, entretanto não é uma amostra exclusiva do compartimento fetal, como é o caso do mecônio. Esta amostra apresenta uma ampla janela de detecção do uso de drogas e exclui a presença de drogas administradas após o nascimento. Entretanto, a escassez de estudos referentes a essa matriz compromete a interpretação de resultados (GRAY; HUESTIS, 2007)

1.6. Abordagens analíticas e preparo de amostras de origem materno-fetal

O desenvolvimento de métodos analíticos toxicológicos tem sido parte dos esforços realizados para garantir o acesso à saúde neonatal, funcionam como meio para avaliar os acometimentos clínicos provenientes do abuso de drogas no período da gravidez e garantir um manejo clínico rápido e seguro para os indivíduos afetados (WOOD et al., 2014b).

Convencionalmente, o diagnóstico da exposição às drogas de abuso na gravidez depende, em grande parte, das informações fornecidas pela parturiente. Entretanto, muitas mães não admitem o consumo de drogas de abuso durante a gestação devido sentimento de culpa, negação e medo (BESSA et al., 2010; KEEGAN et al., 2010; LESTER et al., 2001). Desse modo, a detecção de biomarcadores em amostras biológicas possui caráter comprobatório mais preciso e fornece diagnóstico objetivo e confiável frente às informações fornecidas pela parturiente (URSITTI; KLEIN; KOREN, 2001).

O procedimento adotado na maioria dos casos é a triagem, com busca de biomarcadores em amostras de sangue e urina do recém-nascido e da mãe, no entanto, tais espécimes garantem um pequeno período de detecção a partir do último uso materno, cerca de algumas horas para sangue, e 3 a 7 dias para urina, dependendo também do tipo de droga e de seu tempo de meia vida no organismo (WANG et al., 2010).

Os processos de triagem são realizados com ensaios imunoenzimáticos, e podem apresentar como principal problema uma baixa especificidade e sensibilidade analítica para drogas comuns. Outro viés é a ausência de dispositivos de triagem para uma ampla gama de drogas, levando, em suma, à aplicação de métodos de confirmação (AGIUS; NADULSKI, 2014).

Devido a reações cruzadas entre drogas de mesma classe ou mesmo baixas concentrações de drogas e seus produtos de biotransformação, muitos compostos deixam de ser detectados na fase de triagem, originando resultados falsos negativos e não realização dos ensaios de confirmação (MARIN; METCALF; MCMILLIN, 2014). Outra possibilidade de falsos negativos ocorre em virtude da diluição do fluido biológico e do atraso na coleta (COTTEN, 2012).

Mesmo com a realização de análises mais sensíveis na fase de confirmação, alguns resultados são discrepantes quando comparados aos testes de triagem. Estas limitações podem invalidar a credibilidade legal dos testes como provas materiais em laudos forenses (AGIUS; NADULSKI, 2014).

De fato, a espectrometria de massas com possibilidade de hifenação às separações cromatográficas fornece inúmeras possibilidades de aplicação para metodologias forenses e são as ferramentas de escolha para confirmação da maioria dos testes para multidrogas (ALLEN et al., 2005; YUAN; CHEN; WANG, 2015).

Este tipo de instrumentação analítica permite a medição de massas precisas usando detectores de alta resolução e sensibilidade, além de facilitarem a identificação de moléculas por meio de bibliotecas espectrais de massa com amplo espectro de classe de substâncias (HOFFMANN; JACKSON, 2015; PASIN et al., 2017).

De acordo com Wu et al., (2012), a NACB (*National Academy of Clinical Biochemistry*) considera a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas como a melhor abordagem analítica toxicológica para identificação e quantificação de moléculas com vantagens sobre outras tecnologias.

Técnicas de cromatografia frequentemente permitem a quantificação de uma gama de diferentes compostos em uma única análise, o que se torna uma vantagem quando um grande número de drogas ou metabólitos estão presentes numa mesma amostra. A combinação de flexibilidade, especificidade e sensibilidade faz da cromatografia um dos métodos de escolha para muitas aplicações toxicológicas (AGIUS; NADULSKI, 2014; YUAN; CHEN; WANG, 2015).

Para detecção de drogas em matrizes materno-fetais não há um parâmetro ou correlação na literatura disponível que aponte uma única molécula ou produto de biotransformação que seja o padrão-ouro ou indispensável para a comprovação do uso de drogas na gravidez. A presença da droga parental (inalterada) ou de um único dos seus produtos de biotransformação na matriz analisada pode ser o suficiente para prever o uso pelo indivíduo (MOEIN; EL BEQQALI; ABDEL-REHIM, 2017).

No entanto, a fim de desenvolver um método mais abrangente, a condição ideal é a detecção do maior número de diferentes produtos de biotransformação nos exames de confirmação, pois o metabolismo, distribuição e presença de drogas em matrizes humanas ainda não é plenamente compreendido, principalmente em se tratando de matrizes alternativas para análises toxicológicas forenses, as quais apresentam muitas vezes diferenças consideráveis no padrão de distribuição e incorporação de compostos químicos (CHITTAMMA et al., 2013).

Em se tratando de *Cannabis*, de modo geral, os métodos propostos para fluidos e tecidos humanos consideram alguns biomarcadores como indicadores-chave para a diagnose do uso de canabinoides. Estes marcadores incluem o THC e seus dois principais produtos de biotransformação: 11-hidroxi-tetraidrocanabinol (11-OH-THC) e 11-nor-9-carboxi-tetraidrocanabinol (THCCOOH) (BATTISTA et al., 2014; STAUB, 1999; STEINMEYER et al., 2002).

Vale ressaltar que estas moléculas são extensivamente conjugadas com grupamento glicuronídeo pelo metabolismo humano. A conjugação ocorre através de ligações éter entre o grupo hidroxílico do anel fenólico e do ácido glucurônico (Figura 2). Tanto o THC como outros canabinóides sofrem essa biotransformação, no entanto, o THCCOOH é o mais abundante dentre todos os biomarcadores em amostras biológicas humanas. A taxa de glicuronidação difere de analito para analito e entre as diferentes matrizes biológicas. Assim, é recomendável que métodos analíticos de identificação de canabinoides contemplem o procedimento de hidrólise (SCHEIDWEILER et al., 2016).

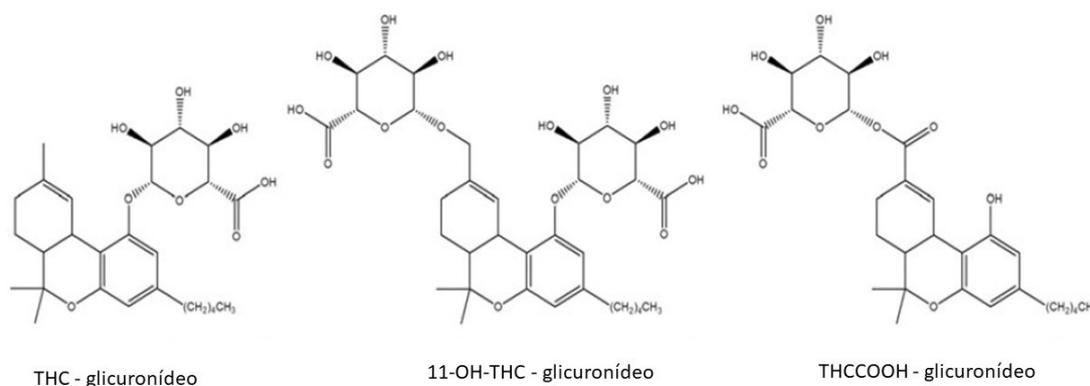


Figura 2. Estruturas químicas dos principais biomarcadores canabinoides conjugados com grupamento glicuronídeo. Adaptado de (AIZPURUA-OLAIZOLA et al., 2016)

Existem dois procedimentos diferentes para realização de hidrólise: alcalina e enzimática. A hidrólise enzimática ocorre por clivagem do grupamento glicuronídeo através da enzima β -glucuronidase proveniente vários microrganismos, enquanto a alcalina quebra esta ligação por meio de reação química em meio a soluções aquosas de caráter básico (HÄDENER et al., 2017; SCHWILKE et al., 2009; WEINMANN et al., 2000).

A hidrólise aumenta a sensibilidade para a detecção dos analitos em sua forma livre, no entanto, pode ser um procedimento laborioso e de alto custo, tomando um grande tempo ou até mesmo inviabilizando análises de rotina (FABRITIUS et al., 2012).

Para cocaína, predominantemente, benzoilecgonina, anidroecgonina metil éster, cocaetileno são produtos de biotransformação de escolha para desenvolvimento de métodos em diversas matrizes humanas (ALVEAR et al., 2014).

Especificamente para amostras teciduais materno-fetais, os dados na literatura ainda são escassos, e em sua maioria, preconizam o uso de LC-MS (CHITTAMMA et al., 2013; DE CASTRO et al., 2013; PALMER; WOOD; KRASOWSKI, 2016).

O preparo de amostras dessas matrizes ocorre por meio de múltiplos procedimentos, demandando grande tempo laboral, incluindo homogeneização manual e/ou mecânica em solventes orgânicos ou soluções aquosas, seguidas de etapa de *clean-up* utilizando cartuchos de extração em fase sólida (CONCHEIRO et al., 2016; HAGLOCK-ADLER; MCMILLIN; STRATHMANN, 2016; MONTGOMERY et al., 2006; WINECKER et al., 1997).

As abordagens analíticas concentram-se majoritariamente para identificação de cocaína e metabólitos. Para canabinóides, o número de trabalhos é ainda mais reduzido, muitas vezes com pouca descrição da metodologia (MONTGOMERY et al., 2006, 2008), número reduzido de analitos estudados, sem avaliação do procedimento de hidrólise (FALCON et al., 2012; JOYA et al., 2010; PALMER; WOOD; KRASOWSKI, 2016).

Na tabela 1 estão sumarizados os principais métodos analíticos e preparos de amostras sólidas para detecção de canabinóides, cocaína e derivados em matrizes materno-fetais.

Tabela 1. Principais métodos de preparo de amostra para detecção de derivados de *Cannabis* e cocaína em matrizes materno-fetais.

| Matriz biológica | Biomarcadores | Hidrólise | Preparo de amostra | Clean up | Detecção | Referência |
|---|------------------------------------|------------------|---|-----------------|-----------------|----------------------------------|
| TCU | BZE, COC, EME, CE, NorCOC, m-HBE | - | Trituração mecânica em tampão fosfato 0,025 M, pH 4 | SPE | GC-MS | (WINECKER et al., 1997) |
| TCU | Canabinoides (não específica), COC | - | Homogeneização em metanol | - | CG-MS | (MONTGOME RY et al., 2006, 2008) |
| Unhas | BZE, COC | - | Incubação <i>overnight</i> em HCl 0,1 M | SPE | CG-MS | (MARI et al, 2008) |
| Placenta, TCU | BZE, COC | - | Trituração mecânica com ácido perclórico 0,1% | SPE | LC-MS-MS | (DE CASTRO et al., 2009, 2013) |
| Placenta, restos fetais (não especificados) | COC, BZE, CE, THC, THCCOOH | - | Pequenos cortes manuais sonicados com ácido perclórico 0,1% | SPE | CG-MS | (JOYA et al., 2010) |
| TCU | THCCOOH | NaOH 0,5M | Pulverização em N ₂ líquido | SPE | LC-TOF-MS | (CHITTAMMA et al., 2013) |
| TCU | BZE | - | Homogeneização em Triton X-100 | LLE | LC-MS | (MARIN; 2014) |

Continua

(Tabela 1). Continuação

| | | | | | | |
|---------------|--------------------------|----|---------------------------------------|-----|-------|-----------------------------|
| TCU | BZE, COC, CE, m-HBE | - | Trituração com <i>beads</i> metálicas | SPE | LC-MS | (HAGLOCK-ADLER et al, 2016) |
| Placenta, TCU | COC, BZE, CE, EME, m-HBE | - | Trituração mecânica em água | SPE | LC-MS | (CONCHEIRO et al., 2016) |
| TCU | THC | -- | Ver Marin (2014) | | ELISA | (PALMER; 2016) |

11-OH-THC, 11-hidroxi- tetrahydrocannabinol. **BZE**, benzoilecgonina. **CBD**, canabidiol. **CBN**, canabinol. **CE**, cocaetileno. **COC**, cocaína. **diOHTHC**, 8-11-di- hidroxi- tetrahydrocannabinol. **EME**, ecgonina metil éster. **m-HBE**, m-hidroxibenzoilecgonina. **NorCOC**, norcocaína. **SPE**, do inglês, *solid phase extraction* – (extração em fase sólida). **TCU**, tecido do cordão umbilical. **THC**, Delta-9-tetrahydrocannabinol. **THCCOOH**, 11-nor-9-carboxi- tetrahydrocannabinol.

1.7. *QuEChERS* como preparo de amostras

Após a amostragem, manuseio e a estocagem é preciso manipular a amostra de forma que ela fique adequada para análise experimental. Nesta etapa é crucial que o procedimento escolhido para o preparo de amostra garanta a extração e concentração dos constituintes de interesse sem a presença de interferentes (SABIN, 2007).

Existem atualmente diversas técnicas de extração empregadas em análises de drogas de abuso, muitas delas apresentam limitações como diversas etapas no processo de extração, emprego de grandes volumes de solvente, o alto custo. As mais comuns são a extração em fase sólida, extração líquido-líquido, extração a líquido pressurizado, dentre outras (CHANG et al., 2007; NOVÁKOVÁ; VLČKOVÁ, 2009).

Neste sentido, *QuEChERS* (acrônimo, do inglês, *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*), desenvolvido por Anastassiades et al., em 2003, trata-se de um procedimento de preparo de amostra originalmente aplicado para amostras vegetais, mas que apresenta ampla utilização para extração de resíduos de pesticidas e outras substâncias em diversas matrizes. (HU et al., 2014; PERESTRELO et al., 2019).

Esse método apresenta como vantagens altos percentuais de recuperação para um grande número de compostos de diferentes polaridades, além de ser realizado de maneira simples e rápida, garantindo também exatidão e precisão de procedimentos experimentais (USUI et al., 2012).

Tem sido aplicado com resultados satisfatórios para análise de multiresíduos em diferentes matrizes de interesse agrícola, veterinário e humano, como na determinação de antibióticos em vegetais (HU et al., 2014), elementos-traço de medicamentos presentes em gastrópodes (BERLIOZ-BARBIER et al., 2015), quantificação de drogas de uso psiquiátrico em sedimentos de rios (SANTOS et al., 2016), detecção de hormônios em helmintos de vida livre (BERGÉ; VULLIET, 2015) e em tecidos conjuntivos (COSTAIN et al., 2008), resíduos de fármacos no meio ambiente (BOURDAT-DESCHAMPS et al., 2014) e resíduo de drogas veterinárias em matrizes biológicas de origem animal (KHALED; SINGH; PAWLISZYN, 2019).

QuEChERS permite o preparo de 10 a 20 amostras entre 30 e 40 minutos, utilizando-se de um pequeno volume de solventes, este preparo da amostra não requer a utilização de muitos materiais e equipamentos, bem como amplo espaço físico (PRESTES et al., 2009).

O método original, descrito a seguir, consiste basicamente de três etapas: extração do analito com solvente orgânico; partição promovida pela adição de sais; e limpeza (*clean-up*) através da adição direta de uma composição de aminas primárias-secundárias (*PSA*), denominada de fase sólida dispersível (D-SPE, do inglês, *Dispersive Solid Phase Extraction*).

- Extração - A utilização de acetonitrila como solvente, o que possibilita a extração de uma menor quantidade de interferentes provenientes da amostra. (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011).
- Partição - A adição de sais para promover o efeito *salting out* é utilizada em vários métodos multiresíduo. Dependendo da natureza do solvente utilizado na etapa de partição obtém-se melhores percentuais de recuperação para analitos polares, uma vez que a adição de sais diminui a solubilidade destes compostos na fase aquosa, bem como a quantidade de água na fase orgânica e vice-versa (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011).
- *Clean-up* - Etapa de limpeza essencial para promover robustez e confiabilidade aos resultados obtidos pelo sistema cromatográfico, uma vez que componentes não-voláteis da matriz podem ficar aderidos no sistema de injeção e também na coluna cromatográfica. A limpeza empregando o sorvente *PSA* retém impurezas da matriz por complexação química e garante a retirada de excesso de água nos sistemas de extração, de interferentes que possam ser co-eluídos, incluindo ácidos orgânicos, como ácidos graxos, açúcares e pigmentos (ANASTASSIADES et al., 2003; PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011).

Por lançar mão de solventes orgânicos voláteis no preparo de amostra, o extrato torna-se compatível para análises cromatográficas e espectrometria de massas (ZHAO et al., 2012).

De acordo com sua aplicação, o método pode ser modificado e otimizado a fim de obter melhores taxas de recuperação e estabilidade. Dentre as modificações já realizadas pode ser destacada a adição de uma etapa de tamponamento para que a recuperação de compostos dependentes de pH fosse melhorada (LEHOTAY; MASTOVSKÁ; LIGHTFIELD, 2005).

Seu uso em toxicologia forense é bastante restrito, resumindo-se até o presente momento ao desenvolvimento de métodos para detecção de anfetaminas, cocaína e fentanil em sangue total (ANZILLOTTI; ODOARDI; STRANO-ROSSI, 2014; DULAURENT et al., 2016; NARA et al., 2019), sulpirida e estazolam em músculo femoral (KASAI; TANAKA;

SATOU, 2019) e delta-9-tetrahydrocannabinol em sangue total (DYBOWSKI; DAWIDOWICZ, 2018).

1.8. Proteômica e Prospecção de Biomarcadores de Toxicidade na Gravidez

O proteoma é por definição, o conjunto de todas as proteínas expressas por um genoma em um determinado momento fisiológico. A análise proteômica, portanto, refere-se à avaliação sistemática dessas proteínas, de forma a comparar a sua expressão celular tecidual ou orgânica em condições diversas, podendo envolver uma análise simples ou em larga escala das proteínas de um organismo (CAGNEY et al., 2003; WILKINS et al., 1996)

A exposição a drogas de abuso tem sido associada a um risco aumentado de impactos negativos ao organismo humano, diretamente atribuídos a perturbações metabólicas, incluído níveis proteicos, persistentes que ocorrem após o início da exposição ao agente tóxico (GHANBARI; SUMNER, 2018).

Os avanços nas tecnologias analíticas podem permitir a detecção de milhares de sinais em fluidos corporais que podem ser usados para definir perfis bioquímicos de desordens associadas a tais exposições. Hoje, essas abordagens são promissoras para determinar como a exposição a drogas, na ausência ou na presença de outros fatores ambientalmente relevantes, pode afetar o metabolismo humano. Acredita-se que esses fatores podem levar a candidatos de biomarcadores de dependência, intervenções terapêuticas, abstinência ou mesmo auxiliar na elucidação de vias de toxicidade em decorrência do uso de drogas (GHANBARI; SUMNER, 2018; NAYLOR, 2003).

Volkow et al. (2015), por exemplo, mostra que é possível observar biomarcadores metabolômicos de acordo com diferentes fases da dependência química em humanos.

Neste sentido, a Toxicoproteômica emerge como uma área das ômicas com a função de explorar mudanças na expressão proteica e modificações em sistemas biológicos expostos a toxicantes, esta área de pesquisa científica move-se na direção de encontrar novos biomarcadores, que interajam com xenobióticos e produzam níveis exacerbados de toxicidade (GAO; HOLLAND; YU, 2009; MERKLEY et al., 2019; RABILLOUD; LESCUYER, 2015; SUMAN; MISHRA; SHUKLA, 2016).

Tradicionalmente, os métodos analíticos para avaliação de exposição às drogas de abuso na gestação são baseados no *clean-up* de amostras biológicas e separações cromatográficas acopladas à espectrometria de massa para detecção/identificação da substância parental e/ou de seus produtos de biotransformação em matrizes biológicas materno-fetais. No entanto, nenhum dado é fornecido para revelar o impacto específico da exposição a drogas durante a gravidez, deixando, portanto, uma lacuna na compreensão da

toxicidade molecular. (Delano and Koren 2012; Cíntia de Carvalho Mantovani 2014; Cinthia de Carvalho Mantovani et al. 2018; Silveira et al. 2016; Gray and Huestis 2007; Silva and Yonamine 2018).

Nesse sentido, novos modelos para avaliação da exposição a substâncias tóxicas estão sendo construídos. Pesquisas recentes concentraram esforços para encontrar, de maneira exploratória, outras moléculas ligadas à fisiologia dos tecidos materno-fetais e potenciais alvos para avaliação da toxicidade (AYE; KEELAN, 2013; BOUWLAND-BOTH et al., 2015).

Quando reportadas em órgãos e tecidos específicos, essas moléculas podem ser diretamente associadas a danos celulares e moleculares, que são particularmente úteis para avaliar aspectos de toxicidade reprodutiva e de desenvolvimento (GUPTA, 2011; MYLLYNEN; VÄHÄKANGAS, 2012).

O tecido do cordão umbilical humano é uma das matrizes mais úteis para esse fim. Este tecido é a principal via de circulação materno-fetal de oxigênio e nutrientes, mas também pode funcionar como uma ponte para xenobióticos que podem alcançar ao compartimento fetal ou mesmo como um repositório para essas moléculas. (Palmer, Wood, and Krasowski 2016; Castro et al. 2011; Chittamma et al. 2013; Marin, Metcalf, and McMillin 2014; Montgomery et al. 2006).

Os estudos proteômicos já são bem estabelecidos como uma ferramenta poderosa para revelar o tipo de expressão proteica e identificar descritores bioquímicos que respondem a uma variedade de estressores químicos (KHALILPOUR et al., 2017), no entanto, apenas dois estudos foram conduzidos combinando a toxicidade de produtos químicos e o tecido do cordão umbilical:

Zeng et al. (2014) avaliaram a expressão diferencial de proteínas como efeito da exposição à nicotina em células-tronco mesenquimais do cordão umbilical humano em cultivo celular e Li et al. (2018) exploraram o perfil proteico do tecido do cordão umbilical oriundo de mães expostas a éteres difenílicos polibromados.

Em relação aos aspectos toxicológicos do abuso de drogas na gravidez, especialmente para cocaína e *Cannabis*, não há dados disponíveis sobre a toxicidade molecular dessas drogas ilícitas combinada com o perfil de expressão de proteínas no tecido do cordão umbilical.

1.9. Espectrometria de Massas Convencional e *Ion Mobility Mass Spectrometry* em Análises de Biomoléculas

A espectrometria de massas tem sido uma ferramenta de versatilidade incomparável em química analítica e pode ser amplamente utilizada como uma poderosa estratégia de identificação de biomoléculas em diversas áreas do conhecimento, desempenhando o “papel principal” em estudos ômicos para investigações científicas em sistemas biológicos (FENG et al., 2008).

Caracteristicamente, a identificação e distinção de moléculas por espectrômetros de massas é baseada pela mensuração de sua relação massa-carga (m/z), com alta sensibilidade favorecendo análises em larga escala de vias bioquímicas (FENG et al., 2008; MILMAN, 2015).

A proteômica baseada em espectrometria de massa tem sido uma ferramenta útil para abordar inúmeras questões na pesquisa básica em biologia por muitos anos. Esse sucesso, combinado com a maturidade da instrumentação espectrométrica de massa, a disponibilidade cada vez maior de bancos de dados de sequências de proteínas derivadas do sequenciamento do genoma e a crescente sofisticação dos métodos de análise de dados, colocam a proteômica em uma posição de desempenhar um papel importante na prospecção de biomarcadores de toxicidade (MATTHIESEN; BUNKENBORG, 2013; MERKLEY et al., 2019).

Dentre as subdivisões e tecnologias baseadas em espectrometria de massas, outra poderosa tecnologia capaz de análise multidimensional e separação sensível de misturas complexas de moléculas é a espectrometria de massas caracterizada como *Ion Mobility Mass Spectrometry* (IMS) (Espectrometria de Massas por Mobilidade Iônica, (VESSECCHI et al., 2011). Em geral, a IMS exige um manuseio menor da amostra e menos tempo de análise quando comparado a outras técnicas (BOHRER et al., 2008; WINTER; WILKINS; DONALD, 2019).

A vantagem mais importante dessa ferramenta é a ortogonalidade obtida em termos de mensurações moleculares em torno das dimensões de tamanho e forma em comparação com a relação massa/carga, medida na espectrometria de massa convencional. Na IMS, os íons são separados na fase gasosa de acordo com os valores de *Collision Cross Section* (CCS, seção transversal da colisão, em tradução livre para o português) (GABELICA; MARKLUND, 2018; SANS; FEIDER; EBERLIN, 2018; SHVARTSBURG; SMITH, 2008).

Essa técnica permite a análise simultânea de massa, carga, tamanho e forma das espécies iônicas e, portanto, é torna-se particularmente útil para a análise de proteínas (GÖTH; PAGEL, 2017; JURNECZKO; BARRAN, 2011).

IMS tem sido utilizada para estudos de proteínas visando a detecção das moléculas em si bem como para o estudo de características estruturais de proteínas nativas/intactas ou denaturadas (BENIGNI et al., 2016a; GRIFFITHS; KOCUREK; COOPER, 2018; LASZLO; BUSH, 2017; LOPEZ-CLAVIJO et al., 2018; MARKLUND et al., 2015); interações de proteínas com outros ligantes químicos (EYERS et al., 2018; NIU; RABUCK; RUOTOLO, 2013), interação proteína-proteína e formação de complexos (BEN-NISSAN; SHARON, 2018; JEANNE DIT FOUQUE et al., 2019), avaliação metabolômica (LEVY et al., 2019; MAIRINGER; CAUSON; HANN, 2018) estudos em modelos animais expostos à cocaína (KAPLAN et al., 2013) e estudos de proteoma humano (LIU et al., 2007; WINTER; WILKINS; DONALD, 2019).

2. Justificativa

Uma completa avaliação toxicológica do uso de drogas no período gestacional, utilizando matrizes biológicas alternativas, tem sido um grande desafio para a Toxicologia. As dificuldades desde a coleta, processamento de amostras, compreensão sobre toxicocinética/toxicodinâmica e interpretação de dados representam importantes objetos de estudo para a esta área da ciência, especialmente para a Toxicologia Reprodutiva e do Desenvolvimento.

Em muitos casos, o período de detecção de muitas drogas ilícitas e seus produtos de biotransformação ainda permanece desconhecido e a complexidade da interação fisiológica materno-fetal contribui para que a distribuição de agentes tóxicos nos tecidos maternos não represente com precisão o grau da exposição e risco fetal.

Desse modo, o caminho entre a exposição a drogas pela mãe e os impactos sobre o feto permanece obscuro, com dados imprecisos que fomentam a insegurança terapêutica dos primeiros cuidados infantis, instalando um paradigma para a saúde pré- e pós-natal, tanto da mãe quanto do bebê.

Assim, o desenvolvimento de métodos de avaliação toxicológica mais robustos, utilizando tecnologia de ponta, que possam garantir a comprovação do uso de drogas por metodologias analíticas bem como abordar aspectos de toxicidade é de suma importância, pois garante um suporte mais oportuno de tratamento para complicações materno-fetais e auxiliam na compreensão do impacto biológico relativos à exposição humana a xenobióticos.

Explorar possíveis moléculas envolvidas em processos de toxicidade, como as proteínas em vias de sinalização e fetotoxicidade, pode ser de grande valia para um entendimento mais amplo sobre os efeitos do uso de xenobióticos na gravidez.

Neste contexto, a escolha do cordão umbilical como matriz biológica é bastante promissora para a avaliação do uso de drogas materno, pois esta matriz é a principal interface de comunicação entre a mãe e o bebê na vida intrauterina. Além disso, a utilização desta matriz para a validação de métodos bioanalíticos, que compreendam a detecção de drogas de abuso e forneçam dados de toxicocinética e toxicodinâmica, utilizando proteômica e Espectrometria de Massas, são abordagens inéditas para uma avaliação toxicológica mais completa.

3. Objetivo

O objetivo do projeto foi desenvolver e validar métodos bioanalíticos para detecção e prospecção de biomarcadores relativos à exposição no período gestacional à *Cannabis*, cocaína e seus produtos de biotransformação, utilizando como matriz biológica o tecido de cordão umbilical humano.

4. Material e Métodos

4.1. Material

4.1.1. Reagentes e outros insumos

- Solventes e sais, como, acetonitrila, hexano, acetato de etila, acetato de sódio, hidróxido de potássio, sulfato de Magnésio, sulfato de Magnésio anidro, cloreto de sódio, obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha);
- Testes-rápidos para THC e cocaína em urina Instant-View[®] (Poway, CA, EUA);
- Fase sólida dispersível *PSA (Primary secondary amine) Bonded Silica Supelclean[™] SPE Bulk Packing* obtidos da Sigma-Aldrich (Bellefonte, PA, EUA);
- Agente derivatizante N-tert-butil-dimetil-silil-N-metil-trifluoroacetamida com 1% tert-butil-dimetil-clorosilano (MTBSTFA:TBMCS 1%), obtidos da Sigma (St. Louis, EUA).

4.1.2 Padrões de referência

Soluções-padrão de delta-9-tetraidrocanabinol (THC), canabinol (CBN), 11-hidróxi-tetraidrocanabinol (11-OH-THC), 11-nor-9-carboxi-delta-9-tetraidrocanabinol (THCCOOH), 11-nor-9-carboxi-delta-9-tetraidrocanabinol conjugado com ácido glicurônico (THCCOOH-glic), benzoilecgonina (BE), e seus respectivos deuterados, foram obtidos da marca Cerilliant Corporation (Round Rock, Texas, EUA). A partir dessas soluções foram preparadas soluções de trabalho na concentração de 1,0 µg/mL.

4.1.3. Coleta de amostras biológicas e dados epidemiológicos

Amostras de urina foram coletadas durante o período de internação hospitalar, em frascos plásticos estéreis, sem conservantes e acondicionadas sob congelamento (- 20 ° C).

Segmentos de cordão umbilical, de aproximadamente 5 centímetros, foram coletados das regiões proximal ao feto, região intermediária e proximal à placenta, imediatamente após o parto, despojados de sangue, lavados com solução salina estéril (NaCl 0,9%), acondicionados em tubos plásticos e estocados a - 20° C até análise subsequente.

As amostras de mecônio foram obtidas dos recém-nascidos nas primeiras 72 horas após o parto, colhidas da fralda com auxílio de espátula, acondicionadas em frascos plásticos e estocadas (- 20 ° C) até análise subsequente.

Todas as amostras foram analisadas e armazenadas em Biorrepositório no Laboratório de Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP.

O material biológico foi agrupado em duas categorias, como a seguir.

- Grupo Controle, no qual foram inseridas amostras cujo teste de triagem em urina foi negativo e não houve relato materno e/ou indícios do uso de drogas no período gestacional. Amostras deste grupo foram utilizadas para o preparo de amostras de controle de qualidade nos ensaios de otimização e validação de métodos.

- Grupo de Risco, no qual foram agrupadas amostras com potencial para presença dos analitos de interesse. Foram considerados um ou mais critérios indicativos do uso de drogas na gestação, como proposto por Wood et al. (2014), sendo eles:

- Triagem de drogas positiva em urina materna;
- Relato materno de uso de drogas na gestação;
- Manifestação de sinais clínicos de síndrome de abstinência;
- Histórico prévio de uso de drogas pela mãe e/ou companheiro;
- Uso de álcool, tabaco e derivados durante a gestação;
- Histórico de violência doméstica;
- Indivíduos em situação de rua;
- Ausência de pré-natal;
- Ruptura placentária inesperado;
- Diagnóstico de Doenças Sexualmente Transmissíveis;
- Doenças psiquiátricas.

Todas as amostras foram coletadas somente de participantes da pesquisa que voluntariamente aceitaram participar do projeto mediante ciência, assentimento, consentimento e assinatura do Termo de Consentimento/Assentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO 1).

Após assinatura do TCLE, foi aplicado o Instrumento de Coleta de Dados (ANEXO 2) com o objetivo de obter informações tais como idade da mãe, tempo de gestação, sexo do bebê, peso, estatura, perímetro cefálico, ocorrência de complicação perinatal, malformações congênitas e padrão de uso de substâncias psicoativas antes e durante a gestação.

As amostras foram mantidas em Biorrepositório, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo, sob o parecer de número **1.744.736**.

4.2. Métodos

4.2.1. População de estudo

A população deste estudo compreende aproximadamente 55 mulheres em período gestacional, que realizaram parto no Hospital das Clínicas, da Universidade de São Paulo.

4.2.2. Triagem em urina para uso de Cannabis e cocaína

As amostras de urina foram processadas imediatamente após coleta, seguindo instruções do fabricante do teste rápido Instant-View® (Poway, CA, EUA). Foi realizado *screening* imunocromatográfico para diagnóstico visual qualitativo. O teste foi considerado positivo para o uso de drogas mediante a presença dos produtos de biotransformação benzoilecgonina (para cocaína) e 11-nor- Δ^9 -THC-9-COOH (para *Cannabis*), com *cut-offs* de 150 e 50 ng/mL, respectivamente.

Análises confirmatórias adicionais para *Cannabis* e cocaína foram realizadas por métodos analíticos previamente validados no Laboratório de Análises Toxicológicas da Universidade de São Paulo, publicados por De Souza Eller et al. (2014) e Oliveira et al. (2016) para determinação de 11-nor- Δ^9 -THC-9-COOH e benzoilecgonina em amostras de urina, empregando a técnica cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas.

4.2.3. Condições cromatográficas para detecção de canabinoides em GC-MS

Para a padronização da corrida de separação cromatográfica em GC-MS foram utilizados em cada teste 50 μ L de solução padrão na concentração de 1 μ g/mL contendo *pool* dos analitos de interesse, a saber, THC, CBN, 11-OH-THC, THC-COOH e seus respectivos deuterados. Realizou-se secagem da solução sob fluxo de N₂, com posterior derivatização utilizando 50 μ L de MTBSTFA:TBDMCS 1%, por 30 minutos a 70° C.

Foi injetado 1 μL no sistema de cromatografia em fase gasosa modelo 6850 acoplado a espectrômetro de massas quadrupolo modelo 5975, auto-amostrador G4513A, (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) e coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (Agilent Technologies), composta por (5%-fenil)-metilpolisiloxano, com dimensões 30 m x 0,25 mm x 0,1 μm .

Rampas de temperatura, fluxo de gás de arraste e íons para identificação dos analitos de interesse foram definidos a partir de literatura científica (FENG et al., 2000; MANTOVANI et al., 2014; NADULSKI et al., 2005b; UCT, [s.d.]; WIERGOWSKI et al., 2005), incluindo biblioteca de massa espectral (MAURER; PFLEGER; WEBER, 2007).

A identificação dos analitos seguiu diretrizes da UNODC (2009), a qual preconiza o uso de no mínimo três íons para cada analito, geralmente incluindo o íon mais abundante como quantificador.

A análise preliminar dos íons foi realizada em modo *Scan* de aquisição de dados, priorizando-se os valores de “massa/carga” (m/z) mais elevados. Após a análise, foi configurado o modo de monitoramento seletivo de íons (SIM - *Selective Ion Monitoring*) com os íons que apresentaram melhores resultados.

Os resultados da otimização da corrida cromatográfica e parâmetros do espectrômetro de massas estão apresentados de forma resumida nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Condições cromatográficas padronizadas para canabinoides em CG-MS

| Parâmetros do forno | |
|------------------------------|---|
| Temperatura inicial: | 150 °C |
| Temperatura máxima: | 325 °C |
| <i>Solvent delay</i> | 11,3 min |
| Rampa: | 10 ° C/min até 300° C, manter por 3 min |
| Tempo total: | 17,2 min |
| Parâmetros do injetor | |
| Modo: | <i>Pulsed Splitless</i> |
| Temperatura: | 250° C |
| Pulso de pressão: | 25 psi |
| Tempo de pulso: | 0,5 min |
| Parâmetros da coluna | |
| Coluna: | Capilar HP-5MS 30 m x 250 µm x 0,1 µm |
| Gás de arraste: | Hélio |
| Fluxo: | 0,6 mL/min. Fluxo constante. |

Tabela 3. Parâmetros do Espectrômetro de massas *single quadrupole*

| Parâmetros do Espectrômetro de Massas | | |
|--|---|--------------------------|
| Modo: | <i>Selective Ion Monitoring</i> – SIM, 70 eV. | |
| Temperatura da fonte: | 230 ° C | |
| Temperatura do quadrupolo: | 150 ° C | |
| Analitos | Íons (<i>m/z</i>) identificadores* | Tempo de Retenção |
| THC | 371 , 372, 428 | 12,50 |
| THC-d3 | 374 , 375, 431 | 12,50 |
| CBN | 367, 409 , 410 | 13,30 |
| CBN-d3 | 370, 412 , 413 | 13,30 |
| 11-OH-THC | 369, 413 , 414 | 15,60 |
| 11-OH-THC-d3 | 372, 416 , 417 | 15,60 |
| THC-COOH | 515 , 557, 572 | 16,50 |
| THC-COOH-d3 | 518 , 560, 575 | 16,50 |

* (*m/z*), *mass/charge*. Íons em negrito são utilizados como quantificadores

Na figura 3 é apresentado o cromatograma do grupo de canabinoides de interesse.

Quanto às condições cromatográficas, o método desenvolvido apresentou-se satisfatório para a separação dos analitos derivatizados com MTBSTFA:TBDMCS 1%, o qual é amplamente utilizado na cromatografia gasosa convencional (SEGURA; VENTURA; JURADO, 1998), uma vez que gera compostos com estabilidade adequada e aumenta a seletividade do método na presença de interferentes.

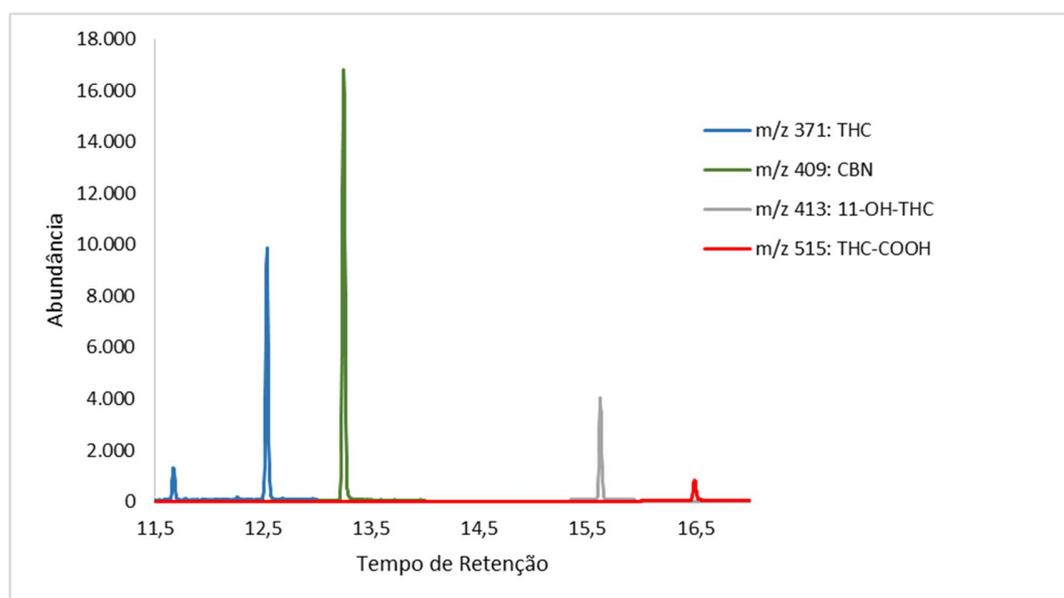


Figura 3. Cromatograma obtido com a análise de amostra branco de tecido de cordão umbilical adicionada dos canabinoides fortificados com 100 ng/g

4.2.4. Otimização simultânea do preparo de amostra *QuEChERS* e hidrólise alcalina do THC-COOH-glicuronídeo

Para otimização do preparo de amostra foi realizado delineamento de planejamento experimental por análise fatorial, utilizando a ferramenta estatística *DOE (Design of Experiment)*, e *Response Optimizer*, no *Minitab® Statistical Software* (versão 18). Foi construído um modelo experimental para avaliação de 3 fatores (efeitos), em 3 níveis categóricos, com influência crítica sobre o rendimento da extração de todos os analitos, incluindo canabinoides conjugados. O modelo avaliou os seguintes efeitos:

- Molaridade da solução de hidrólise alcalina KOH, nos níveis: 1M, 5M e 10 M;

- pH da solução tampão Acetato de Sódio 0,1 M, nos níveis: pH 5, pH 7 e pH 9;
- Solvente utilizado, nos níveis: Acetato de Etila, Hexano e Acetonitrila.

A otimização da hidrólise alcalina foi realizada concomitantemente à otimização do preparo de amostra, adicionando em todos os ensaios, junto aos demais analitos, o 11-nor-9-carboxi-delta-9-tetraidrocanabinol em sua forma conjugada com ácido glicurônico. Todos os analitos foram adicionados numa concentração de 200 ng/g.

Para a escolha do melhor modelo experimental, os valores das áreas absolutas de todos os analitos, incluindo 11-nor-9-carboxi-delta-9-tetraidrocanabinol em sua forma livre, foram tratados com a ferramenta *Response Optimizer*, assinalando como “ótimo” a combinação de fatores que obtivesse a maximização das áreas absolutas de todos os analitos como fator resposta.

O procedimento experimental consistiu em adição de 1mL de KOH à 0,5 g de TCU fortificado com analitos de interesse, seguido por incubação a 60° C por 1 hora. Ajuste de pH com adição de ácido acético glacial e 1 mL solução de Acetato de Sódio 0,1 M no pH desejado. Adição de 2 mL de solvente, adição de sal (0,240 g de Sulfato de Magnésio) com posterior agitação a 1200 rpm por 2 minutos e centrifugação a 4000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e transferido para um tubo plástico de 2 mL contendo 25 mg de fase sólida dispersível, PSA (do inglês, *Primary Secondary Amine*- Aminas Primárias e Secundárias), submetido à centrifugação a 4000 rpm por 5 minutos. O extrato foi transferido para tubos de vidro e seco sob fluxo de N₂ a 50 °C, derivatizados e injetado no sistema CG-MS como descrito no item 4.2.3.

A combinação de arranjos para cada ensaio está sumarizada na Tabela 4.

Tabela 4. Combinação de ensaios do planejamento experimental, utilizando *Design of Experiment*, Minitab® *Statistical Software* para otimização de extração e hidrólise alcalina de canabinoides conjugados.

| Ensaio | MolaridadeKOH (mol/L) | pH | Solvente |
|---------------|----------------------------------|-----------|------------------|
| 1 | 1 | 5 | Hexano |
| 2 | 1 | 5 | Acetonitrila |
| 3 | 1 | 5 | Acetato de etila |
| 4 | 1 | 7 | Hexano |
| 5 | 1 | 7 | Acetonitrila |
| 6 | 1 | 7 | Acetato de etila |
| 7 | 1 | 9 | Hexano |
| 8 | 1 | 9 | Acetonitrila |
| 9 | 1 | 9 | Acetato de etila |
| 10 | 5 | 5 | Hexano |
| 11 | 5 | 5 | Acetonitrila |
| 12 | 5 | 5 | Acetato de etila |
| 13 | 5 | 7 | Hexano |
| 14 | 5 | 7 | Acetonitrila |
| 15 | 5 | 7 | Acetato de etila |
| 16 | 5 | 9 | Hexano |
| 17 | 5 | 9 | Acetonitrila |
| 18 | 5 | 9 | Acetato de etila |
| 19 | 10 | 5 | Hexano |
| 20 | 10 | 5 | Acetonitrila |
| 21 | 10 | 5 | Acetato de etila |
| 22 | 10 | 7 | Hexano |
| 23 | 10 | 7 | Acetonitrila |
| 24 | 10 | 7 | Acetato de etila |
| 25 | 10 | 9 | Hexano |
| 26 | 10 | 9 | Acetonitrila |
| 27 | 10 | 9 | Ac. deEtila |

4.2.5 Extração de canabinoides – *QuEChERS* adaptado

Após a otimização do preparo de amostra, o seguinte procedimento foi estabelecido, como esquematizado na Figura 4.

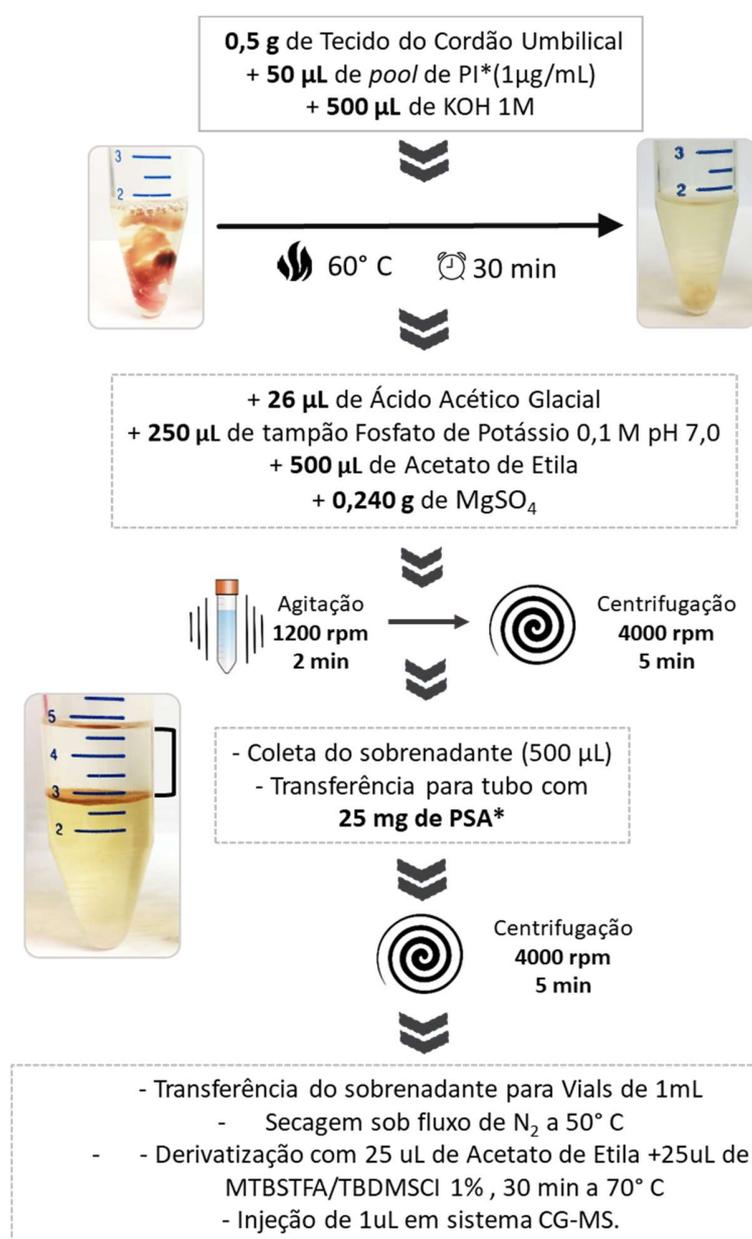


Figura 4. Esquema do procedimento de preparo de amostra *QuEChERS* adaptado

***PI**: padrões internos THC-*d*₃, CBN-*d*₃, 11-OH-THC-*d*₃, THCCOOH-glicuronídeo-*d*₃. **PSA**: *Primary Secondary Amine* (fase sólida dispersível).

4.2.6. *Análises Estatísticas*

As análises de dados foram realizadas no programa *Minitab® Statistical Software* (versão 18).

Os dados de cada grupo (exposto e não-exposto) foram analisados pelo teste *t Student* para amostras independentes com nível de significância de 0,05 e intervalo de confiança de 95%, a fim de obter informações sobre o estado de saúde materno fetal.

Todas as análises para avaliação de dados de validação de métodos, como regressão linear, heterocedasticidade, aplicação de pesos matemáticos e plotagem de gráficos foram realizadas no *software* mencionado.

4.2.7. *Validação de método analítico para determinação de canabinoides em tecido do cordão umbilical*

A fim de garantir a qualidade interna e boas práticas laboratoriais, o método analítico proposto para detecção e quantificação de canabinoides em tecido do cordão umbilical seguiu as diretrizes, os requisitos mínimos sistematizados e específicos, exigidos pelo guia internacional para validação bioanalítica em Toxicologia Forense, o *Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology (SWGTOX, 2013)*.

Devido à ausência de guias e protocolos estabelecidos para a etapa de fortificação de amostras teciduais, todos os controles de qualidade (CQ) usados para otimização de método e validação foram preparados como sugerido por SMITH & XU (2012), adicionando analitos de interesse junto à amostra, seguido de um ciclo de congelamento de 24 horas antes da realização do ensaio, permitindo amplo período de interação entre os analitos e proteínas teciduais.

4.2.6.1. Seletividade

A seletividade foi determinada pela análise de 12 amostras de tecido de cordão umbilical do grupo controle submetidas ao processo de extração descrito no item 4.2.5 para avaliar a presença de interferentes endógenos. Os resultados da extração foram comparados com os picos presentes no tempo de retenção dos analitos.

Foram também analisadas 12 amostras adicionadas de 1000 ng/mL de cafeína, morfina, codeína, cocaína, metanfetamina, anfetamina, bupivacaína, lidocaína, pseudoefedrina, ácido salicílico, diclofenaco, metformina, secobarbital e pentobarbital para avaliar a possível interferência destes compostos na análise. Os possíveis interferentes foram escolhidos de acordo com medicamentos utilizados durante a gestação e no momento do parto.

4.2.6.2. Limites de detecção (LOD) e Limites de Quantificação (LOQ)

Os limites de detecção e quantificação foram determinados pelo método empírico que consiste em analisar amostras adicionadas de analitos em série decrescente de concentração. Foram avaliados em quintuplicatas e o coeficiente de variação aceitável entre as replicatas não foi maior que 15% para LOQ e 20 % para LOD.

4.2.6.3 Linearidade

A linearidade foi determinada através de análises em sextuplicata de amostras negativas adicionadas dos analito de interesse em 7 diferentes concentrações, espaçadas igualmente dentro da faixa de trabalho (LOQ, 50, 100, 150, 200 e 250 ng/g). A área relativa entre os analitos e respectivo padrão interno deuterado foi utilizada para o cálculo da regressão linear, expressa através do coeficiente de determinação (r^2), superior a 0,99. O ajuste de reta, quando necessário, foi realizado com o *software* Minitab® *Statistical Software* (versão 18), pelo método dos mínimos quadrados, com α igual a 0,05.

A faixa de trabalho foi escolhida de acordo com faixa de concentrações de canabinoides encontradas em matrizes materno-fetais detectadas em diferentes metodologias publicadas, sumarizadas na tabela a seguir

Tabela 5. Sumário de concentrações de canabinoides encontrados em amostras materno-fetais

| Matriz | Analitos | Concentração encontrada | Linearidade | Referência |
|---------------|-----------------|--------------------------------|--------------------|-----------------------------|
| | THC | | | |
| TCU | 11-OH-THC | 1,6 - 19,1 ng/g | 10-200 ng/g | (KIM et al., 2018) |
| | THCCOOH-glic | | | |
| Placenta | THCCOOH | 123,2 ng/g | - | (JOYA et al., 2010) |
| | THCCOOH | 0,06 - 6,09 ng/g | - | (CHITTAMMA et al., 2013) |
| Meconio | THCCOOH | 40-3033 ng/g | - | (SHU et al., 2015) |
| TCU | THCCOOH | 0,05-75 ng/g | - | |
| Mecônio | 11-OH-THC | 5 - 15 ng/g | 5 – 150 ng/g | (TYNON; PORTO; LOGAN, 2015) |
| | THCCOOH | 5 - 265 ng/g | | |
| Mecônio | 11-OH-THC | 7 – 929 ng/g | | (ELSOHLY; FENG, 1998) |
| | THCCOOH | 2,3 – 26,3 ng/g | - | |
| | THC | 2,4 ng/g | | |
| Mecônio | THCCOOH | 176,4 ng/g | - | (LAMY et al., 2017) |
| Mecônio | 11-OH THC | 150 ng/g | 10 – 500ng/g | (MARIN et al., 2007) |
| | THCCOOH | - | 10 – 1000 ng/g | |
| Mecônio | 11-OH THC | 10 – 35 ng/g | 10 – 500 ng/g | (COLES et al., 2005) |
| | THCCOOH | 291 – 382 ng/g | | |
| | THC | 25,6 -81,2 ng/g | | |
| Mecônio | 11-OH-THC | 20,7 – 493,3 ng/g | 20 – 500 ng/g | (MARCHEI et al., 2006) |
| | THCCOOH | 33,1 - 182,1 ng/g | | |

4.2.6.4. *Precisão e Exatidão*

As precisões intra e inter-dia foram avaliadas por meio da determinação do coeficiente de variação (CV%) das áreas relativas (razão entre área absoluta do analito e a área absoluta do padrão interno) exibido entre as replicatas (n=3) preparadas em diferentes controles de qualidade baixo (QB), médio (QM) e alto (QA), em 3 corridas diferentes. Os resultados obtidos foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) usando “dia” como variável agrupadora. Foram considerados satisfatórios os valores de coeficiente de variação menor que 20% para todos os níveis de controles.

A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, sendo verificada a partir de no mínimo 9 determinações contemplando o intervalo linear, ou seja, 3 concentrações, baixa, média e alta, com 3 réplicas cada. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente.

4.2.6.5. *Carryover*

Este parâmetro foi avaliado com a análise de quatro replicatas “branco” injetadas no sistema GC-MS após amostras fortificadas na concentração de 500 ng/g.

4.2.7. *Protocolos de Proteômica e Espectrometria de Massas*

4.2.7.1. *Extração de proteínas de tecido do cordão umbilical e digestão triptica*

O desenho experimental do processo de extração baseou-se na extração de proteínas passíveis de solubilização em solvente orgânico polar (acetonitrila) sem rompimento tecidual. Foram utilizadas amostras dos grupos expostos e não-expostos, confirmados por análises de triagem em urina e análises confirmatórias para o uso de *Cannabis* e cocaína, bem como amostras de tecido do cordão umbilical positivas avaliadas pelo método validado, mencionado no item 4.2.7, confirmadas para o uso de *Cannabis*. As regiões proximal à placenta, intermediária e fetal foram utilizadas neste experimento em triplicata, para cada grupo.

100 mg de tecido do cordão umbilical foram pesados, adicionou-se 300 µL de solução de extração acetonitrila / água / ácido fórmico (40: 59: 1), seguiu-se então para o

procedimento de centrifugação a 14000 x rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado para diafiltração em filtros de membrana *cut-off 3K Amicon*[®].

O sobrenadante foi coletado e foi utilizado para a digestão triptica utilizando o kit de tripsinização *In-Solution Tryptic Digestion and Guanidination Kit*, da Thermo Scientific[®] e também utilizado nos ensaios realizados por IMS, descritos a seguir no item 4.2.8.

4.2.7.2. Identificação de Proteínas e Análise de Dados

O extrato proteico tripsinizado foi analisado por LC-MSMS (Bruker Tims-TOF) operado no modo de íon positivo (+). A separação cromatográfica foi realizada utilizando um método de 46 minutos com *Optima*[®] *Grade Water* (ácido fórmico a 0,1%) como fase aquosa e *Optima*[®] *Grade Acetonitrile* com (0,1% de ácido fórmico) como fase orgânica e coluna XBridge Peptide BEH C18.

Além disso, as amostras digeridas em solução foram diluídas 1:10 em 50:50 MeOH: Água (0,1% ácido fórmico) e armazenadas em *inserts* de vidro silanizados. A injeção de amostra foi realizada por amostrador automático *Prominence LC-20AD HPLC system* (Shimadzu, Japão).

Alíquotas de 20 µL foram injetadas no cromatógrafo líquido para separação antes da análise pelo espectrômetro de massas. O espectrômetro de massas foi calibrado com *Tune Mixture* (Agilent[®]), utilizando pelo menos 6 pontos de calibração entre 322 e 2121 com um desvio padrão relatado <1 ppm. A fragmentação peptídica foi conduzida com dissociação induzida por colisão dos 25 precursores mais abundantes. Após a aquisição dos dados, os dados obtidos da espectrometria de massa bruta foram processados com o *software* Peaks Studio 8.5 para identificação de proteínas e sequenciamento de peptídeos com as seguintes configurações de pesquisa no banco de dados.

Limiar de confiança protéica (-10lgP): > 20. Contagem peptídeos únicos prototípicos: 02 unidades, no mínimo. Modificações variáveis: Oxidação (Metionina). Enzima utilizada: tripsina. Banco de Dados: *Uniprot*. A pesquisa dos espectros de massa foi realizada por massa de precursores monoisotópica.

4.2.8. Condições de operação de IMS

Neste trabalho utilizamos o equipamento protótipo *nano-Electrospray Ionisation-Trapped Ion Mobility Mass Spectrometer custom-made* acoplado à *Bruker Maxis Impact II q-TOF MS* (nano-ESI-TIMS-MS-Q-TOF), Brukers Daltonics, mostrado na figura 5.

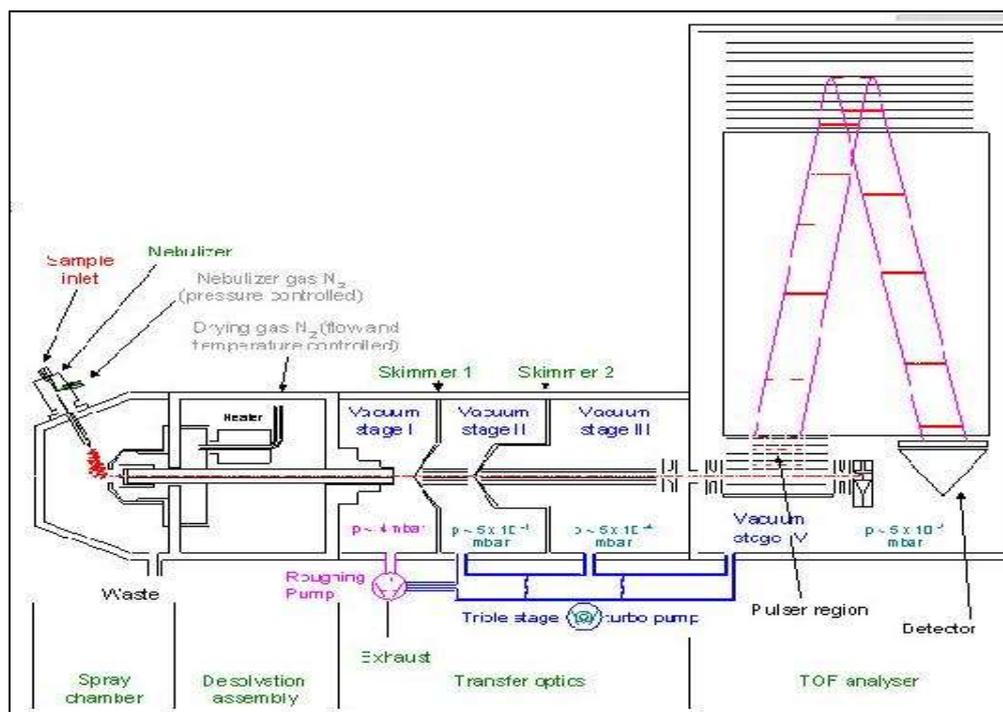


Figura 5. Esquema em ilustração do equipamento customizado nano-ESI-TIMS-MS-Q-TOF

A fonte de ionização nano-ESI ortogonal capilar personalizada foi utilizada para todos os ensaios. Capilares de vidro de quartzo (1,0 mm x 0,70 mm) foram puxados sob tração utilizando um extrator automático a laser de micropipeta P-2000 (Sutter Instruments, Novato, CA).

Utilizou-se 10 μL da solução da amostra para o preenchimento do capilar de vidro. As amostras em solução foram inseridas na célula de análise do equipamento TIMS-MS com alíquota das amostras. A fonte de ionização nano-ESI teve como voltagens configuradas em um intervalo de 600–1200 V, aplicada entre as pontas capilares e a entrada do instrumento TIMS-MS. Os íons foram introduzidos na célula TIMS através de capilar de aço inoxidável (1/16 x 0,020", IDEX Health Science, Oak Harbor, WA), o qual foi mantido à temperatura ambiente, como mostrado na figura 6.

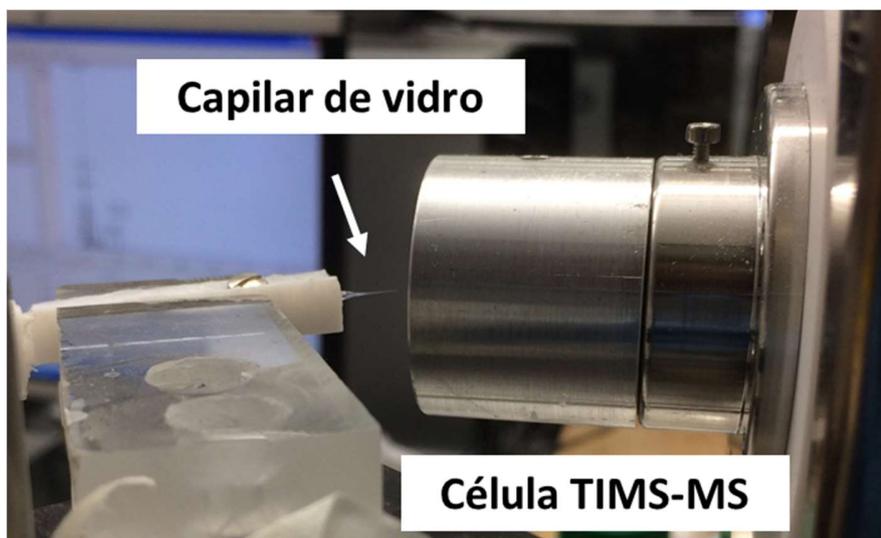


Figura 6. Aparato nano-ESI e capilar de vidro para injeção de amostra

A operação do equipamento TIMS-MS foi ajustada para análise de mobilidade iônica de ampla faixa, com uma rampa de tensão de -280V a 100 V, com os parâmetros configurados mostrados na figura 7.

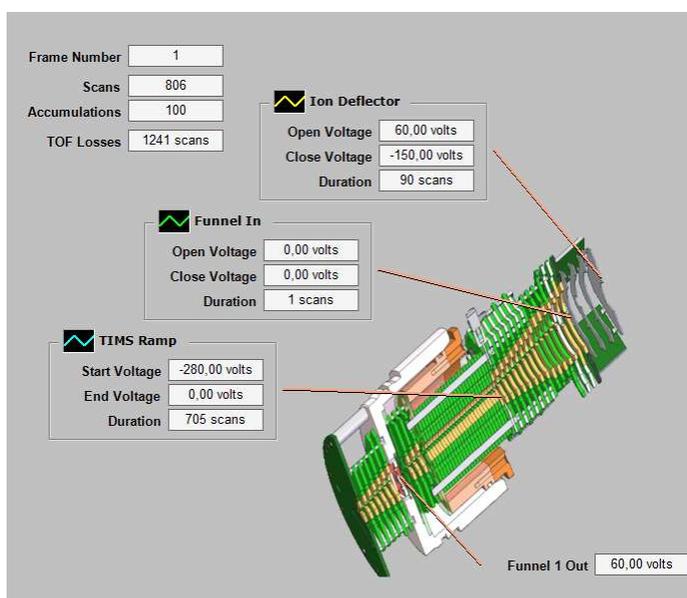


Figura 7. Diagrama ilustrativo dos parâmetros de operação utilizados no equipamento TIMS

Os tempos de rampa utilizados foram 100, 200, 300, 400 e 500 milissegundos. Radiofrequência constante (RF) (frequência de 1500 kHz), com número máximo de 20

acumulações. As análises dos dados foi realizada pelo software *DataAnalysis 5.0* (Bruker Daltonics).

Demais configurações do equipamento podem ser consultadas no ANEXO 6.

5. Resultados e Discussão

5.1. Dados de coleta, estatísticas de nascimento e estado de saúde materno-infantil.

Foram coletadas 55 amostras, compreendendo urina materna (15 mL), e tecido do cordão umbilical, sendo esta coleta realizada em de três diferentes regiões do tecido (proximal ao feto, intermediário e proximal à placenta).

A Tabela 6 apresenta dados estatísticos compilados sobre a saúde materna e dos recém-nascidos comparados entre os grupos “controle” e “usuárias”.

Tabela 6. Estatísticas de nascimento e características maternas entre Grupo Controle e gestantes usuárias de drogas de abuso na gestação.

| Características | Grupo Controle | Grupo Usuárias | <i>p-value</i> |
|------------------------------|------------------|------------------|----------------|
| <i>Gestantes</i> | (<i>n</i> = 40) | (<i>n</i> = 15) | |
| Idade | 32,1 ± 5,5 | 23,3 ± 6,5 | 0,002* |
| Tipo de parto (c/n) | 22 / 9 | 7 / 2 | - |
| Gestação (semanas) | 39 ± 0,9 | 34,6 ± 4,2 | 0,008* |
| <i>Recém-nascidos</i> | | | |
| Sexo (masc/fem) | 14 / 17 | 7 / 2 | - |
| Peso (g) | 3343 ± 442 | 2932,2 ± 1566 | 0,230 |
| Estatura (cm) | 48,6 ± 2,4 | 44,3 ± 5,3 | 0,028* |
| Perímetro cefálico (cm) | 35,2 ± 2,9 | 32,2 ± 3,2 | 0,009* |
| Perímetro torácico (cm) | 33,3 ± 1,7 | 30,3 ± 4,3 | 0,035* |
| Perímetro abdominal (cm) | 31,5 ± 2,0 | 28,5 ± 4,5 | 0,046* |

Dados numéricos são apresentados em Média ± Desvio Padrão (DP). (c/n) cesariana/normal. * *p-value* < 0,05 considerado estatisticamente significativo em relação ao grupo controle (t-Student independente).

Todos os valores para medidas morfométricas, exceto para a variável “Peso”, foram significativamente menores em recém-nascidos cujas mães relataram uso de drogas na

gravidez, estes dados são semelhantes ao relatado por Bauer et al. (2005) em grávidas usuárias de cocaína.

Foi observado ainda que apesar de não existir diferença estatística entre os grupos em relação ao peso de RNs, os RNs de mães usuárias apresentou (n = 6) peso abaixo da média de ambos os grupos (< 2500 g) (Figura 8), o que pode representar risco à saúde infantil.

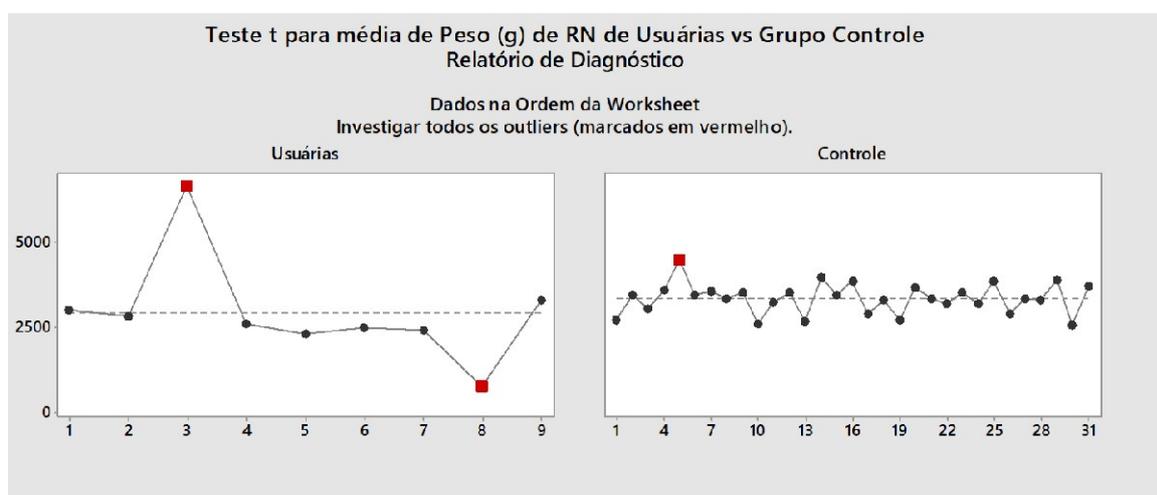


Figura 8. Teste t referente à variável “Peso” entre RN de mães usuárias e Grupo Controle.

Somado aos parâmetros morfométricos dos RNs, outro fator importante que concerne à condição de uso de drogas na gravidez é a prematuridade do RN relacionada a uma menor duração da gestação em mulheres usuárias. Esta é uma das principais complicações observadas e extensivamente mencionadas na literatura (EL MARROUN et al., 2009; GARCÍA-ALGAR et al., 2009; HUIZINK, 2014; ORTIGOSA et al., 2012). Em nossa população de estudo, este fenômeno corrobora com dados científicos, sendo o período gestacional em usuárias, em média, pelo menos 4 vezes menor que no grupo controle.

É importante ressaltar que 73% das participantes do estudo apresentaram uma ou mais comorbidades. A Figura 9 apresenta as principais doenças dos indivíduos observados.

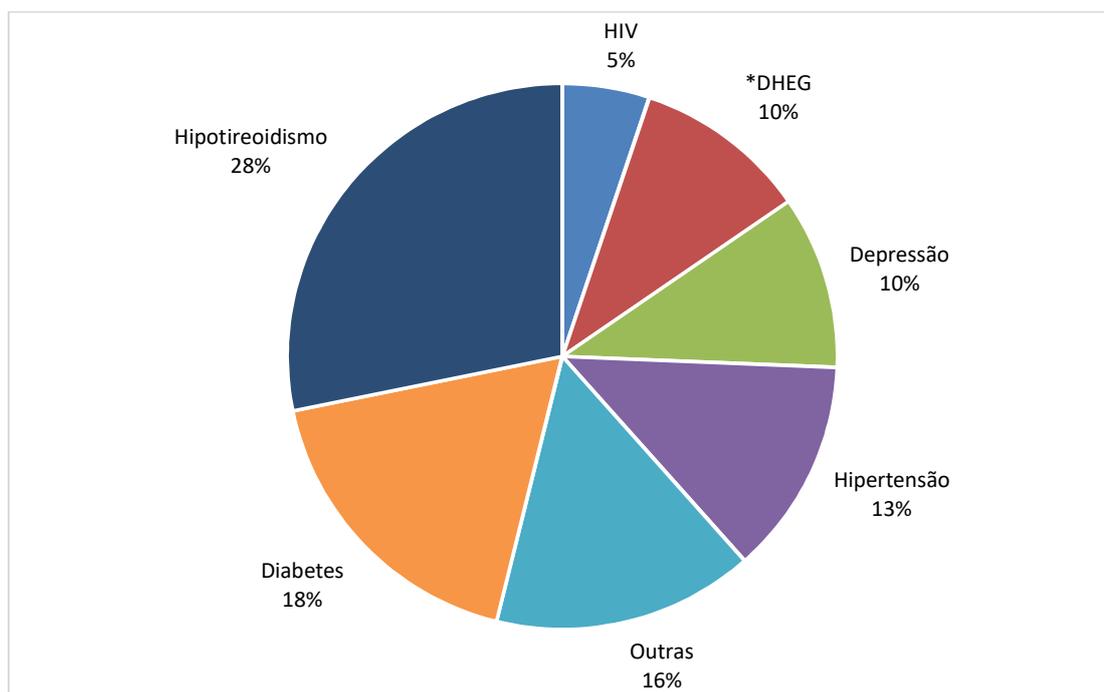


Figura 9. Comorbidades apresentadas pelo grupo de participantes da pesquisa.

*DHEG: Doença Hipertensiva Específica da Gravidez

Resultados detalhados dos testes estatísticos realizados para tratamento de dados podem ser consultados em **ANEXO 3**.

5.2. Resultados de triagem em urina materna

Nos testes de triagem em urina, 9% ($n = 5$) das amostras analisadas pelos métodos imunocromatográficos e/ou de confirmação por CG-MS foi positivo para o uso da *Cannabis* e 16% ($n = 9$), positivo para uso de cocaína. Estes resultados corroboram com o relato materno afirmativo para o uso dessas drogas durante a gravidez.

5.3. Resultados da otimização do preparo de amostra e hidrólise alcalina de analitos

O modelo estatístico utilizado para otimização estimou o efeito principal de cada fator, assim como as interações entre cada par de fatores. Os resultados obtidos nos ensaios do Planejamento Experimental são apresentados para cada analito nas Figuras 10-13.

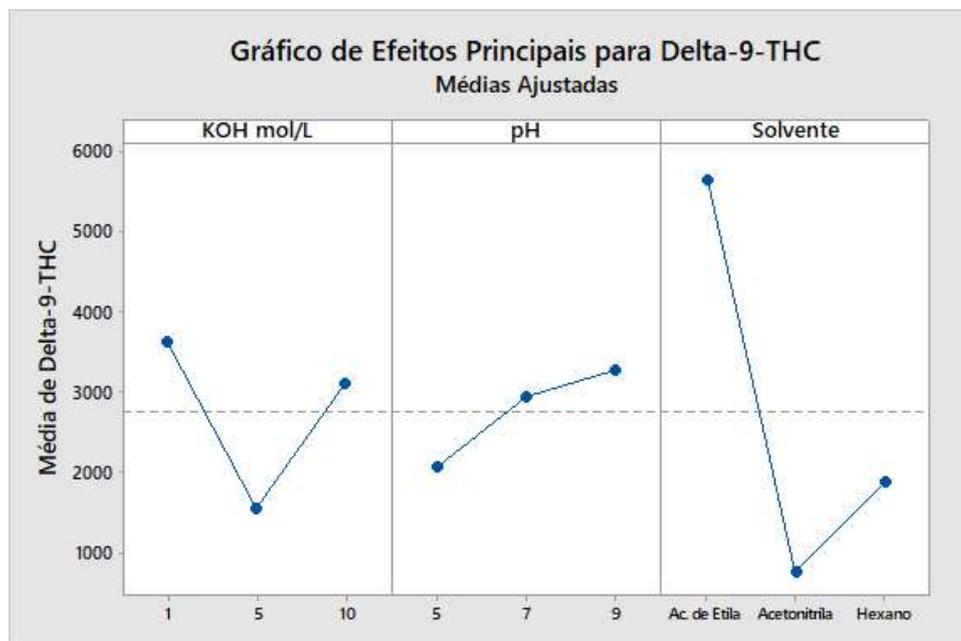


Figura 10. Gráfico de efeitos principais para Delta-9-THC.

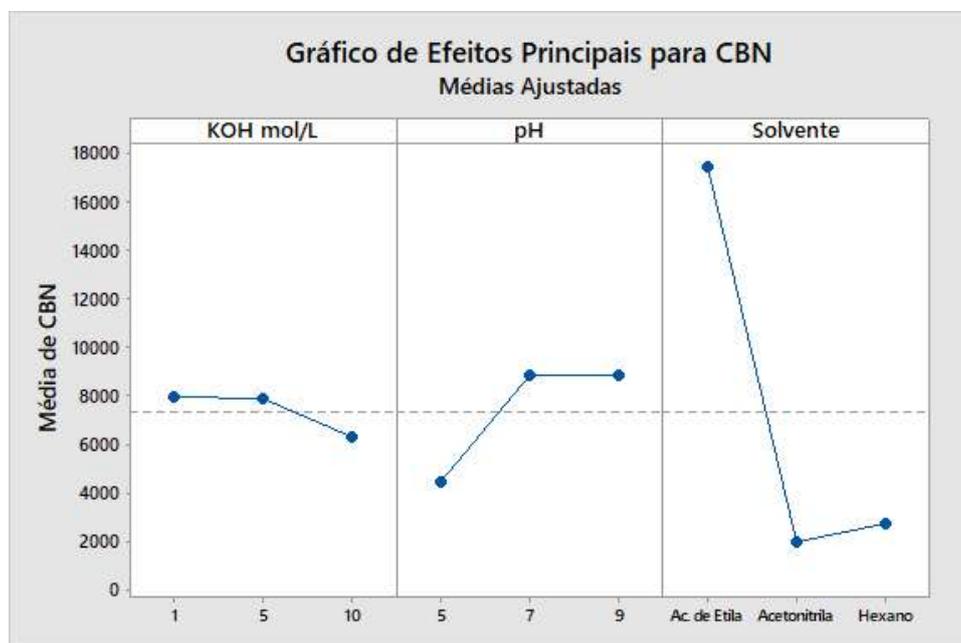


Figura 11. Gráfico de efeitos principais para Canabinol.

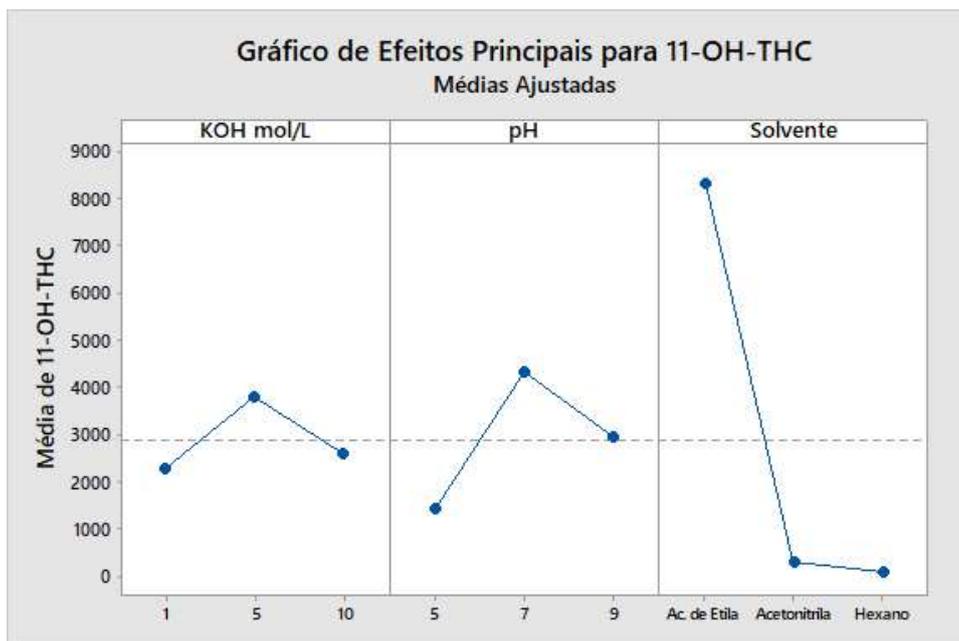


Figura 12. Gráfico de efeitos principais para 11-OH-THC

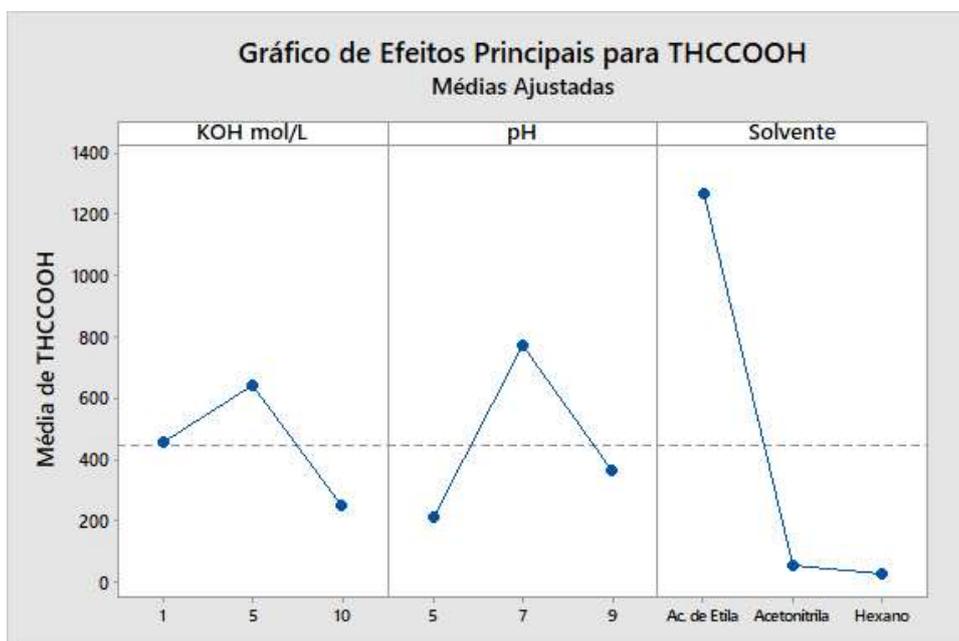


Figura 13. Gráfico de efeitos principais para THC-COOH-glicuronídeo

Um gráfico de efeitos principais representa a resposta média para cada nível de fator ligado por uma linha, é utilizado para examinar as diferenças entre as médias de nível para os fatores analisados.

O resultado de otimização de hidrólise do produto de biotransformação 11-nor-9-carboxi-delta-9-tetraidrocanabinol conjugado com ácido glicurônico (Figura 10) mostra que a concentração de 5 mol/L de KOH obteve melhor resposta isolada para o analito em questão, entretanto não houve diferença significativa para áreas absolutas observadas em 1 mol/L de KOH.

É importante observar que há uma determinada saturação do processo de hidrólise e queda para valores de áreas absolutas abaixo da média à medida que a molaridade da solução de KOH aumenta para 10 M. De acordo com Moon et al., (2008), este fator pode ser explicado pela oxidação de grupos fenólicos do THC-COOH e sua consequente degradação em pH acima de 9, conferido pela presença da base forte no sistema.

Ainda para avaliação de hidrólise, o pH que possibilitou o melhor desempenho de extração foi 7 para três dos analitos, exceto Delta-9-THC, o qual apresentou melhor extração em pH 9. Entretanto não houve diferença significativa entre as áreas absolutas obtidas em pH 7 e 9 para Delta-9-THC, desse modo, a escolha do processo de extração priorizou a melhor combinação de fatores que maximizasse a resposta para todos os analitos.

Tipicamente, os valores de pK_a são considerados para a escolha dos pHs de extração, sendo, via de regra, aproximadamente 2 unidades abaixo do valor de pK_a quando compostos são relativamente polares (FLANAGAN et al., 2008). Entretanto, para métodos multianalitos, como neste trabalho, outros fatores determinantes também devem ser considerados (NEGRUSZ; COOPER, 2013), tais como, cinética de transferência de massa e coeficientes de partição dos analitos e solvente utilizado.

No preparo de amostra por *QuEChERS* adaptado, para todos os analitos, o solvente acetato de etila apresentou-se como mais adequado, alcançando maiores rendimentos de extração. Segundo Prestes et al., (2009), este solvente possui características universais para solubilização de compostos de diferentes classes, diferentemente de acetonitrila, proposto como solvente no método original (ANASTASSIADES et al., 2003) e hexano, os quais podem co-extrair interferentes miscíveis em água ou altamente lipofílicos, respectivamente.

Para identificar a combinação de variáveis que otimizassem a extração dos analitos foi construído um gráfico de otimização (Figura 14). Tal combinação de fatores foram aceitas

como satisfatórias considerando maior rendimento de extração para todos os analitos, mas também por contemplar condições ótimas para extração e hidrólise do THC-COOH, o qual caracteriza-se como principal produto de biotransformação do THC e o mais abundante em amostras biológicas humanas (HUESTIS; SMITH, 2007; RACAMONDE et al., 2012; WEINMANN et al., 2000).

A análise dos dados do Planejamento Experimental direcionou a adaptação de *QuEChERS* para a combinação dos seguintes fatores:

- Molaridade do KOH a 1,0 mol/L;
- pH de Extração 7,0;
- Acetato de etila como solvente de extração.

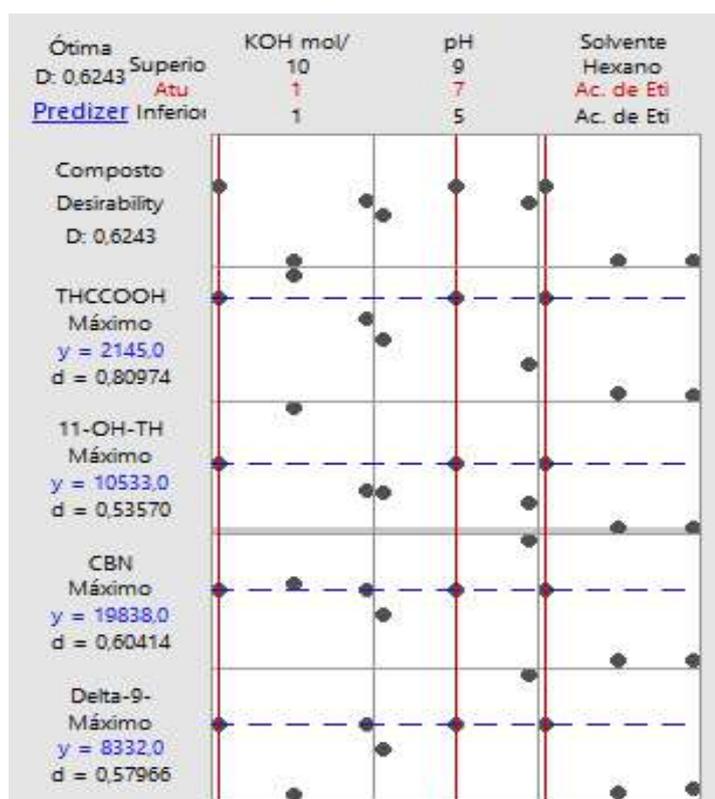


Figura 14. Gráfico de Otimização de Resposta para extração de canabinoides por *QuEChERS*. * *Desirability* (d), linhas azuis tracejadas, apontam para o efeito máximo desejado. Linhas vermelhas verticais: interceptam o valor máximo das respostas (pontos pretos)

Desse modo, o preparo de amostra proposto pode ser considerado eficaz, pois contempla homogeneização total da amostra tecidual e hidrólise de analitos conjugados, sem degradação dos demais analitos de interesse. Estes são requisitos importantes, oferecidos pelo método de *QuEChERS*, para extração de drogas de amostras teciduais.

Outros métodos disponíveis na literatura (CHITTAMMA et al., 2013; JOYA et al., 2010; PALMER; WOOD; KRASOWSKI, 2016) realizam a homogeneização do tecido por meio de maceração manual ou mecânica do tecido em soluções aquosas ou nitrogênio líquido para posterior extração de analitos em fase orgânica e subsequente *clean up* por extração em fase sólida. O procedimento proposto neste trabalho possui vantagens por reduzir as etapas de homogeneização e realizar uma etapa de *clean up* mais simples.

Além disso, até o presente momento, *QuEChERS* somente foi utilizado como preparo de amostra para extração dos canabinoides em sangue total, esta é a primeira abordagem analítica aplicada a matrizes de origem materno-fetal.

É importante salientar que o método utilizado para otimização da metodologia de extração de canabinoides pode ser utilizado para a predição e otimização de analitos agrupados ou separadamente, delineando, desta maneira, o melhor modelo estatístico para um analito-alvo específico.

Nas amostras reais positivas analisadas neste trabalho, os biomarcadores predominantes em amostras reais foram THC, 11-OH-THC e THCCOOH. De acordo com a predição do modelo, a melhor solução analítica continuaria sendo a combinação dos fatores KOH 1,0 mol/L; Tampão Fosfato de Potássio 0,1M pH 7,0 e acetato de etila

5.4. Validação do método analítico para canabinoides em Tecido do Cordão

Umbilical

5.4.1. Seletividade

Não foi observada presença de interferentes endógenos e exógenos nos ensaios realizados considerando os íons utilizados para identificação dos analitos de interesse em seus respectivos tempos de retenção.

De acordo com diretrizes internacionais, como as preconizadas pelos guias de validação analíticas e bioanalíticas como por exemplo, o FDA (FDA; CDER, 2018), UNODC (UNODC, 2009) e outros estudos científicos (TEUNISSEN et al., 2017), uma validação analítica deve garantir que os ensaios estejam, ao máximo possível, livres de interferentes ou potenciais substâncias endógenas ou exógenas à matriz em questão, devendo serem consideradas principalmente medicações de uso recorrente.

Esse estudo incluiu substâncias que podem ter sido administradas à gestante no período da gravidez, bem como medicamentos de uso contínuo pelas gestantes e demais substâncias ilícitas que podem ter sido consumidas pelas participantes da pesquisa.

O método mostrou-se ser específico e seletivo para o objetivo proposto, sendo capaz de detectar os analitos na presença dos interferentes e mantendo as concentrações dentro da faixa de trabalho propostas.

5.4.2. Limites de Detecção (LOD) e Quantificação (LOQ)

Os limites alcançados corroboram com os valores reportados na literatura para identificação de canabinoides em amostras materno-fetais (COLES et al., 2005; GRAY; BARNES; HUESTIS, 2010; JOYA et al., 2010; MARIN; METCALF; MCMILLIN, 2014) e outros tecidos (BRUNET et al., 2006; GRONEWOLD; SKOPP, 2011; JOHANSSON et al., 1989).

Os valores de LOD e LOQ são coincidente, pois foram as mínimas concentrações nas quais os analitos puderam ser respectivamente detectados e quantificados dentro dos coeficientes de variação aceitáveis (ARMBRUSTER; PRY, 2008; BRASIL, 2017b). O método empírico garante a “sensibilidade funcional” do equipamento (ARMBRUSTER;

PRY, 2008), nas quais as concentrações podem ser tomadas conclusivamente como ponto de decisão para sua presença ou ausência.

A Tabela 7 apresenta os valores alcançados de LOD e LOQ e a figura 15 mostra um cromatograma representativo de uma amostra fortificada com valores alcançados para determinação dos limites.

Tabela 7. Limites de Detecção (LOD) e Quantificação (LOQ) para canabinoides em Tecido do Cordão Umbilical.

| Analitos | LOD, LOQ (ng/g) | CV (%) |
|-----------|-----------------|--------|
| THC | 15 | 13,95 |
| CBN | 5 | 2,15 |
| 11-OH-THC | 10 | 3,97 |
| THC-COOH | 10 | 3,51 |

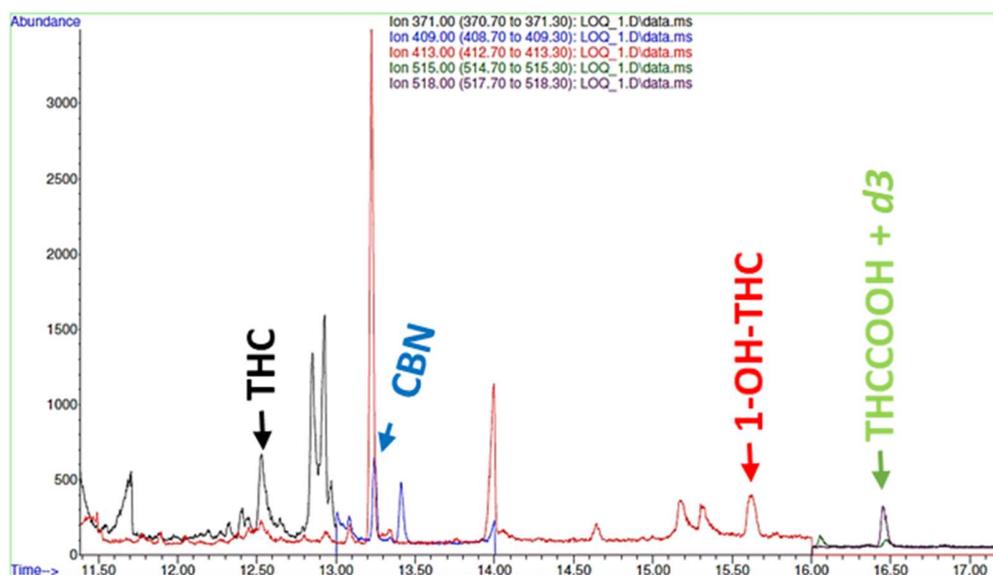


Figura 15. Cromatograma representativo dos limites de quantificação

5.4.3. Linearidade

O método mostrou-se linear na faixa de concentração estudada (LOQ - 250 ng/g), contemplando os valores normalmente aferidos em amostras materno-fetais (COLES et al., 2005; GRAY; BARNES; HUESTIS, 2010; JOYA et al., 2010; MARIN; METCALF; MCMILLIN, 2014). A linearidade foi avaliada empregando-se ajuste de reta pelo método dos mínimos quadrados, sendo selecionado o modelo de equação de reta com menor somatória de erros relativos.

As equações determinadas para linearidade podem ser observadas na Tabela 8.

Tabela 8. Equações da reta ajustada ao melhor modelo de regressão linear.

| Analitos | Equação da reta | r | Ponderação |
|-----------------|----------------------------|----------|-------------------|
| THC | $y = 0,751 + 0,00769x$ | 0,627 | $1/\sqrt{y}$ |
| CBN | $y = 0,08759 + 0,01344x$ | 1,00 | - |
| 11-OH-THC | $y = 0,3452 + 0,009038x$ | 0,99 | - |
| THC-COOH | $y = -0,02186 + 0,007631x$ | 0,99 | $1/y^2$ |

Para todos os analitos, o modelo de calibração ajustado foi utilizado para análises quantitativas, exceto para o THC, cujo o coeficiente de determinação foi 0,6203.

Avaliações estatísticas em detalhe de todos os analitos, gráficos de linha ajustada, *p*-values de significância e relatórios de modelos de escolha podem ser consultadas no **ANEXO 4**.

5.4.4. Precisão e Exatidão

Os resultados dos ensaios de precisão intra e interdia e exatidão apresentaram valores dentro dos limites aceitáveis, não excedendo 20% de coeficiente de variação para todos os controles.

A Tabela 9 mostra os valores da precisão inter e intradia e de exatidão do método validado para detecção de canabinoides em tecido do cordão umbilical.

Tabela 9. Sumário de dados de precisão intra e interdia e exatidão do método validado para detecção de canabinoides em tecido do cordão umbilical

| Analito | Controles de Qualidade | Concentrações (ng/g) | Precisão | | Exatidão (CV%) |
|-----------|------------------------|----------------------|-----------------|-----------------|----------------|
| | | | Intra-dia (CV%) | Inter-dia (CV%) | |
| THC | CB | 45 | 7,20 | 12,77 | 85.01 |
| | CM | 135 | 4,99 | 9,87 | 103.02 |
| | CA | 225 | 9,46 | 18,73 | 99.42 |
| CBN | CB | 15 | 7,76 | 8,71 | 79.04 |
| | CM | 120 | 3,08 | 7,65 | 78.86 |
| | CA | 225 | 3,68 | 6,97 | 104.13 |
| 11-OH-THC | CB | 30 | 11,72 | 12,66 | 92.08 |
| | CM | 127,5 | 4,05 | 7,85 | 92.09 |
| | CA | 225 | 4,63 | 11,88 | 104.83 |
| THCCOOH | CB | 30 | 5,23 | 3,42 | 83.56 |
| | CM | 127,5 | 6,89 | 12,70 | 101.34 |
| | CA | 225 | 5,57 | 18,43 | 104.14 |

5.4.5. Carryover

O método não apresentou, em nenhuma das replicatas, efeito *carryover* de nenhum analito e seu respectivo deuterado nos tempos de retenção, como mostrado na figura 16.

A contaminação cruzada em preparo de amostras para canabinóides é um fator predominante e pode gerar resultados falso positivos de acordo com (SCHEIDWEILER et al., 2016).

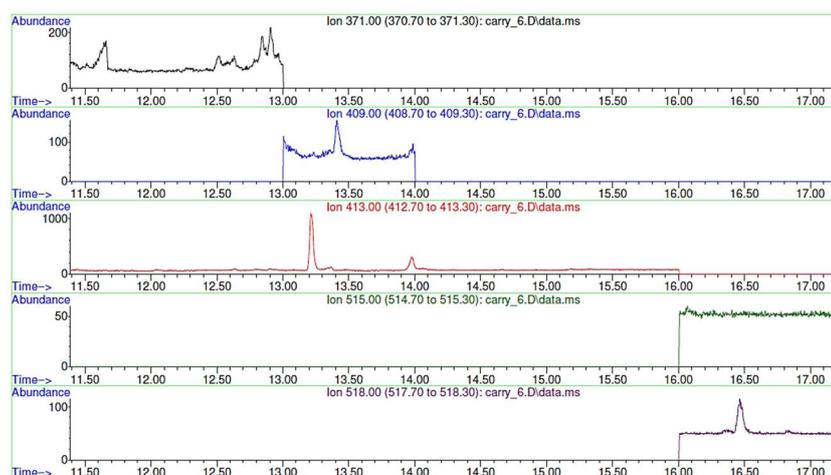


Figura 16. Cromatograma representativo para o ensaio de *Carryover*

5.4.6. Análises Toxicológicas e Aplicação do Método QuEChERS Validado em Amostras Reais

O método validado foi aplicado em 15 amostras reais de tecido do cordão umbilical humano. A Figura 17 mostra um cromatograma representativo de uma amostra real positiva. Na Tabela 10 são apresentados os resultados quantitativos da análise.

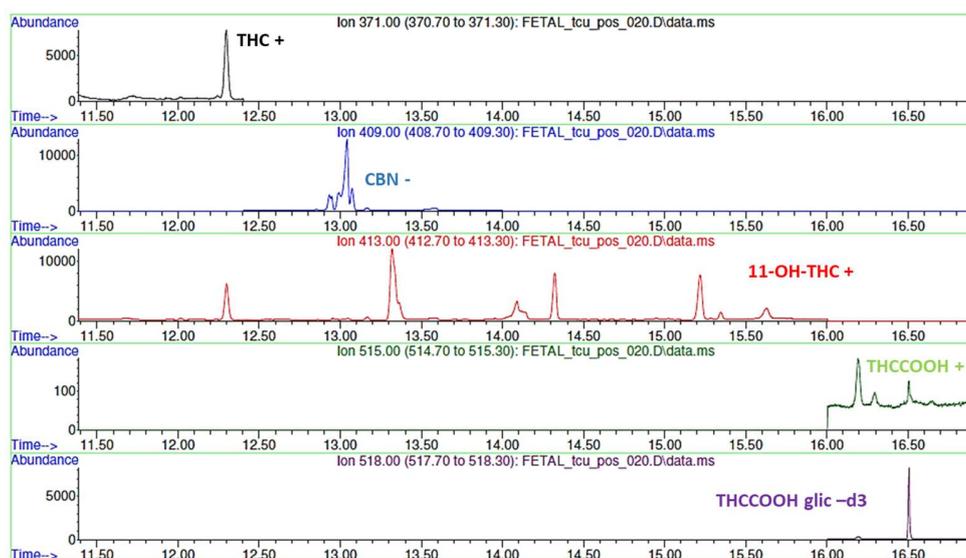


Figura 17. Cromatograma representativo de amostra positiva para canabinoides em tecido do cordão umbilical

As amostras não foram positivas para o analito canabinol.

As faixas de detecção para os analitos THC, 11-OH-THC e THCCOOH foram:

- THC: 211,79 – 4245,95 ng/g.
- 11-OH-THC: 8,11 – 55,38 ng/g.
- THCCOOH: 2,92 – 4,16

O método mostrou-se eficiente para extração dos analitos em questão e pode ser utilizado para a comprovação da exposição à *Cannabis* no período gestacional. Dessa forma, acreditamos que o método validado pode ser aplicado para avaliação da exposição fetal à canabinóides e melhoria do manejo clínico a partir da ciência do uso de drogas pela mãe.

Tais resultados mostram que o cordão umbilical pode ser considerado em avaliações toxicológicas por possuir uma aplicabilidade global da matriz, que vai desde a facilidade e abundância da amostra até a detecção de xenobióticos.

Tabela 10. Concentrações encontradas de THC, 11-OH-THC e THCCOOH em amostras reais de tecido do cordão umbilical

| Identificação da amostra | Concentrações (ng/g) | | |
|--------------------------|----------------------|-----------|---------|
| | THC | 11-OH-THC | THCCOOH |
| 017 | 2423.03 | ND | 3.23 |
| 018 | 2458.92 | 22.80 | 3.05 |
| 020 | 2915.77 | ND | 2.95 |
| 021 | 4245.95 | 37.07 | ND |
| 031 | 2969.61 | 13.04 | 2.92 |
| 032 | 2915.77 | 32.11 | ND |
| 034 | 211.79 | ND | ND |
| 037 | 2872.73 | ND | 3.03 |
| 039 | 2336.66 | 44.06 | ND |
| 040 | 2333.60 | 19.41 | 2.97 |
| 041 | 3119.53 | ND | 3.27 |
| 042 | 2744.99 | ND | 3.62 |
| 043 | 2626.27 | 8.11 | 4.16 |
| 048 | 2867.47 | 55.38 | 3.87 |
| 051 | 2711.53 | ND | ND |

*ND: não-detectado

5.5. Proteínas detectadas por *Trapped Ion Mobility Mass Spectrometry*

Os resultados obtidos a partir das análises realizadas em equipamento nano-ESI-TIMS-MS-Q-TOF foram capazes de detectar as proteínas mais abundantes na solução de extração em sua forma desnaturada (hemoglobina, subunidades alfa, beta e gama; e ubiquitina), com estados de carga variando de +7 a +20 em um intervalo de massa/z de 1000-2600 m / z.

Tais proteínas puderem ser assinaladas de acordo com sua correspondente massa neutra e dados obtidos por identificação de proteínas em protocolo de proteômica convencional, os quais podem ser consultados nos anexos 5 e 7.

Todos os espectros obtidos com a utilização do equipamento apresentaram a mesma composição de massas, estado de carga, mesmo entre diferentes grupos e diferentes regiões. As figuras 18 e 19 representam tais resultados em espectros típicos das moléculas identificadas.

De acordo com Benigni et al. (2016b); Garabedian et al., (2018) e Griffiths et al. (2018), técnicas bioanalíticas empregando *Ion Mobility Mass Spectrometry* (IMS) ainda estão em fase de estabelecimento de protocolos, e muitas vezes tem sido utilizadas para estudos de verificação de eficiência de extração de proteínas, estabelecimento de métodos espectroscópicos, em grande parte, apenas visando a detecção de moléculas em si em suas formas nativas/intactas ou denaturadas.

Nosso trabalho apresenta, desta maneira, a padronização eficiente de extração e definição de parâmetros de análises por IMS para detecção e identificação de macromoléculas.

Acreditamos que apenas proteínas abundantes puderam ser detectadas pelo fenômeno da competição por ionização, a qual pode ocorrer em análises espectroscópicas utilizando ionização por eletrospray, como apontado por Fenn et al. (1989). Desse modo, melhorias de protocolo de extração para o enriquecimento de proteínas de baixa abundância devem ser avaliadas para estudos futuros.

De acordo com Winter et al. (2019), um dos principais benefícios relativos ao uso de IMS é capacidade de análise de um número grande de moléculas em um curto intervalo de tempo devido ao aumento da capacidade de picos, sem a necessidade prévia de separação cromatográfica. Ademais, a geração de um alto número de espécies iônicas, incluído adutos

da mesma proteína gera maior confiabilidade nos resultados pelo aumento probabilístico de aparecimento da proteína no espectro.

Neste trabalho, mostramos que, apesar da detecção de um baixo número de proteínas, o método foi capaz de realizar a detecção acurada sem prévia separação cromatográfica de proteínas.

Todos os estados de carga das proteínas mencionadas podem ser conferidos em tabela suplementar no ANEXO 5, representadas graficamente na figura 19.

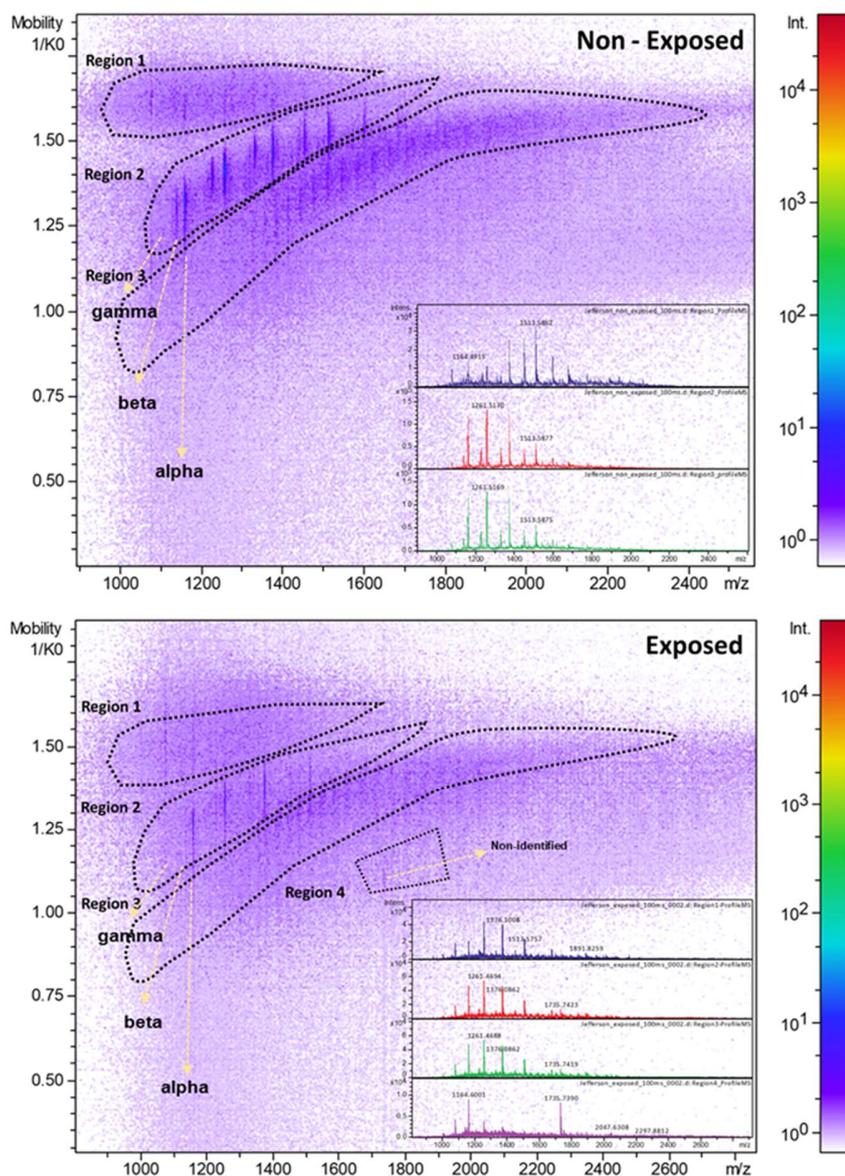


Figura 18. Gráficos 2D-IMS-MS expressos em “heat map” mostrando a distribuição de proteínas extraídas com (Acetonitrila: Água: Ácido Fórmico; 40: 59: 1) de amostras não expostas (no topo) e expostas (abaixo).

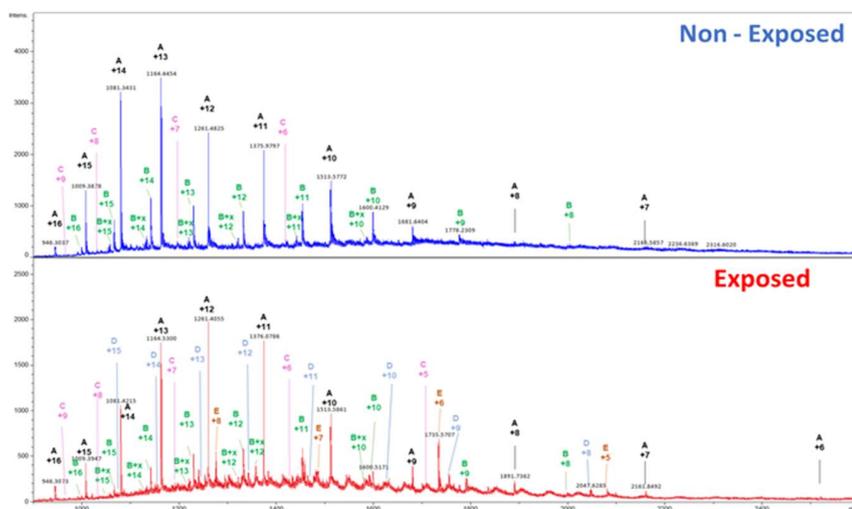


Figura 19. Análise de espectros de massa de extratos proteicos, utilizando TIMS-TOF. Não expostos (azul superior) e expostos (vermelho inferior) são representados na faixa de 900 a 2600 m/z. As proteínas são mostradas em letras maiúsculas (A, B, C, D, E) em diferentes estados de carga, sendo A: hemoglobina subunidade alfa (15121 Da.). B: hemoglobina subunidade beta (15992 Da.). C: Ubiquitina (8561 Da.). D: hemoglobina subunidade gama (16111 Da). E: proteína não-identificada (10400 Da.).

5.6. Análise de proteínas identificadas por proteômica convencional

Ao todo puderam ser identificadas 26 proteínas nos extratos obtidos com acetonitrila. Foi observada expressão proteica diferencial tanto entre os grupos comparados e também entre diferentes regiões do tecido do cordão umbilical.

Para a discussão dos resultados relativos à inclusão de proteínas como potenciais moléculas biomarcadores de toxicidade em tecido do cordão umbilical, foram consideradas apenas aquelas identificadas em pelo menos uma região de tecidos expostos ao uso de drogas e que fossem assinaladas como responsáveis potenciais em processos de adoecimento, resposta ao uso de drogas, malformação embriogênica e acometimentos em vias metabólicas associadas à reprodução e desenvolvimento morfofisiológico humano.

Vale ressaltar que a maioria das proteínas mencionadas, são pela primeira vez descritas em tecido do cordão umbilical humano bem como não haviam sido associadas ao consumo de drogas na gravidez, mesmo quando consultadas na plataforma *Open Targets Platform*, um dos principais bancos de dados mundiais para descoberta de novos alvos de drogas associado a doenças.

O sumário de informações sobre região-específica, identificação de proteínas, potenciais riscos à saúde materno-fetal e toxicidade são discutidos a seguir e também sumarizados na tabela 11.

Dentre as proteínas identificadas, a proteína *Desmin* foi assinalada em quase todas as regiões do cordão umbilical em diferentes grupos.

Esta molécula, em condições normais, é essencialmente relacionada à manutenção do citoesqueleto e vias metabólicas-chave para manutenção da contração do músculo cardíaco (PAULIN; LI, 2004), entretanto quando encontrada em quantidades aumentadas, especialmente em fibras musculares imaturas, tanto durante a vida fetal quanto na regeneração, é associada à distúrbios neuromusculares e à miopatias congênitas (GOEBEL, 1995; PRELLE et al., 1992), sendo considerada por Faksh et al. (2015) um marcador de distrofia miotônica neonatal, atrofia muscular espinhal infantil e cardiomiopatia restritiva.

De acordo com os autores, esta proteína é majoritariamente expressa e acumulada dentro das fibras musculares cardíacas e músculo esquelético, não sendo comum seu aparecimento em tecidos maternos-fetais, como o cordão umbilical.

ACTA 2 (Actin, aortic smooth muscle) também é associada ao elenco de moléculas responsáveis pela manutenção de contração e motilidade muscular e tem sido mencionada como uma proteína indicadora de processos de malformações congênitas, incluindo a doença de Moyamoya (COOPER; BROWN, 2017; YUAN, 2015), a qual é considerada uma complicação de saúde predominantemente da infância, caracterizada por convulsões epiléticas e malformação vascular no sistema nervoso central.

De acordo com Cooper (2017) e Regalado et al. (2015), o gene codificador desta proteína é crucial para contratilidade de músculo cardíaco do coração fetal em desenvolvimento, principalmente em estágio embrionário inicial, sendo associado à aneurisma torácico de aorta, hemorragia e disfunção muscular uterina quando encontrado em forma aberrante ou em níveis de superexpressão na gravidez, tornando-se um dos principais riscos obstétricos para o momento do parto.

Outra proteína da mesma família, *Actin gamma-enteric smooth muscle (ACTG 2)* também foi identificada no tecido do cordão umbilical, na região proximal à placenta, apenas em tecidos positivos para o uso de drogas.

Segundo estudos científicos (HOLLA et al., 2014; LEHTONEN et al., 2012; THORSON et al., 2014; WANGLER et al., 2014), esta proteína é claramente associada a

malformações específicas embrionárias como o alargamento pré-natal da bexiga e obstrução gastrointestinal neonatal, amplamente relatados em pesquisas acerca do uso de drogas na gravidez, como descrito por Keegan et al. (2010), o qual associa clinicamente o abuso de cocaína com riscos teratogênicos, tais como doenças cardiovasculares e do trato genitourinário.

A proteína *Calponin-1* também é considerada uma das principais proteínas responsáveis pela regulação contração da musculatura lisa (WINDER; WALSH, 1993) e foi encontrada em diferentes regiões dos tecidos analisados.

Em estudo recente, realizado por Taema e Hakim (2018), a molécula foi assinalada como marcador indicativo de predição de parto prematuro quando encontrado em plasma materno. Esta proteína é responsável pelos processos de contração uterina no momento do parto, estando presente em maiores concentrações no terceiro trimestre da gravidez, momento no qual o útero também apresenta maiores quantidades de musculatura lisa.

Já a proteína *Cysteine and glycine-rich protein 2*, foi observada apenas em tecidos expostos ao uso de drogas na gravidez. Tal proteína desempenha um papel específico de desenvolvimento do sistema vascular embriogênico e tem sido fortemente associada à leucemia na infância e injúria vascular (WANG et al., 2017; WEI et al., 2005), entretanto nenhum relato ou estudo foi realizado em torno de sua associação com possíveis mecanismos de toxicidade fetal a xenobióticos.

Collagen alpha-1 (XVIII) é uma importante proteína associada à percepção visual e morfogênese corpórea, desempenhando importante função na estruturação da retina bem como no fechamento do tubo neural (PASSOS-BUENO et al., 2006; SERTIÉ et al., 2000).

Esta proteína foi encontrada em nossas análises somente na região proximal ao feto no grupo de amostras expostas ao uso de drogas. De acordo com as base de dados consultadas (*Uniprot, Gene Ontology*), a mesma está intimamente ligada à regulação positiva em resposta ao uso drogas e exposição a xenobióticos, sendo expressa em resposta à cloroquina, ao DDT, a medicamentos antidepressivos e em resposta a altos níveis de dopamina.

De acordo com vários estudos em diferentes organismos (BALASUBRAMANI et al., 2010; CAGLAYAN et al., 2014; LIN et al., 2001; MUELLER et al., 2007a, 2007b; SERTIÉ et al., 2000), a expressão desta proteína pode ser um forte indicador de prejuízo na migração celular embrionária, malformações do sistema nervoso central, associada à injúria cerebral e espinal induzida por trauma, anormalidades angiogênicas no período de desenvolvimento

embrionário em modelos animais, lesões endometriais e bloqueio de desenvolvimento de ureteres na vida fetal.

Dentre todas as complicações relativas ao metabolismo de *Collagen alpha-1 (XVIII)*, o principal acometimento mencionado em estudos humanos (DUH et al., 2004; MAYHEW; CHARNOCK-JONES; KAUFMANN, 2004) é a síndrome de Knobloch, um distúrbio raro, exclusivo do período de desenvolvimento embrionário, caracterizado por anormalidades oculares com ou sem deformidades occipitais do crânio (encefalocele, defeitos ósseos e aplasia cutânea).

Structural maintenance of chromosomes protein-1 também foi identificada somente em região proximal ao feto, no grupo exposto ao uso de drogas na gravidez.

Sua função fisiológica envolve mecanismos de reparo de DNA e divisão celular (COPEL, 2018; YI et al., 2017), entretanto, quando expressa em sua forma mutada ou em condições de stress, pode ser responsável pela Síndrome de Cornelia de Lange (BOYLE et al., 2015), um distúrbio do desenvolvimento fetal, clinicamente heterogêneo, associado a malformações que afetam vários sistemas. Caracterizado por dismorfismos faciais, pés e mãos anormais, atraso no crescimento, retardo cognitivo, hirsutismo, disfunção gastroesofágica, anomalias cardíacas, oftalmológicas e geniturinárias.

Outra importante proteína associada a distúrbios na vida intrauterina e adversidades teratogênicas, também encontrada somente em grupo de amostras exposto a drogas de abuso, na região intermediária, foi a proteína *Kinetochore scaffold*, a qual desempenha função fundamental para montagem do cinetócoro e correta separação cromossomal durante a mitose (CALDAS; DELUCA, 2014; MATON et al., 2015).

Esta proteína, ao sofrer mutação a nível genético ou truncamento de codificação, é intimamente relacionada ao retardamento mental e à microcefalia primária (GENIN et al., 2012; SAADI et al., 2016), patologia exclusiva do neurodesenvolvimento fetal, definida por circunferência craniana congenitamente menor em pelo menos 2 vezes em desvio padrão quando comparadas à média apresentada em determinada idade e sexo, o que corrobora com nossos resultados, os quais apontam que a circunferência craniana de recém-nascidos de mães usuárias são pelo menos 3,62 (IC 90%) vezes menor em desvio padrão quando comparadas ao grupo controle.

Este fenótipo clínico observado em nossos resultados, somado à caracterização desta proteína em amostras cujas doadoras declararam uso de drogas, e/ou detecção de algum

produto de biotransformação em urina ou no tecido do cordão umbilical correspondente, fortalecem a hipótese de que a proteína *Kinetochore scaffold* pode ser uma molécula candidata como biomarcador à fetotoxicidade ao uso de drogas.

Histone-lysine N-methyltransferase 2A foi identificada no grupo exposto a drogas de abuso, em região proximal à placenta. Possui função essencial na hematopoese embrionária, diferenciação de células-tronco, além de mediar metilação e acetilação de resíduos de lisina de histonas (LI et al., 2016; NAKAMURA et al., 2002; PARK et al., 2010), os quais são marcações específicas para ativação de transcrição epigenética.

Estudos sobre mutações monogênicas responsáveis por disfunções do desenvolvimento cerebral embrionário (SHEN et al., 2014) apontam pelo menos 7 importantes genes codificadores de proteínas implicadas em metilações de resíduos de lisina de histona H3 que podem desencadear síndromes genéticas mediadas por desregulação de tal metilação, dentre estes genes, está o responsável pela codificação da proteína encontrada *Histone-lysine N-methyltransferase 2A*.

Shen et al. (2014) aponta dados sugestivos de que este perfil de modulação pode ser responsável por enfermidades como o autismo e esquizofrenia. Além disso, os autores sugerem que a exposição parental a drogas monoaminérgicas estão entre os fatores ambientais determinantes para este padrão de metilação.

Neste sentido, estudos apontam que o uso de drogas, como a *Cannabis* pode desencadear distúrbios epigenéticos, mediados por metilação de histonas, tecido-específicos causados por canabinóides (SZUTORISZ; HURD, 2016), incluindo esquizofrenia e prejuízo cognitivo (MELIS et al., 2017; RICHARDSON; HESTER; MCLEMORE, 2016) em adolescentes cujas mães se expuseram à *Cannabis* na gravidez.

Desse modo, a identificação desta proteína em tecidos expostos à *Cannabis* e cocaína em nossas amostras contribui para reforçar a hipótese de que tal droga pode atuar como um estressor preponderante para o aumento à vulnerabilidade relacionada à distúrbios neuropsiquiátricos em gerações filiais.

Esta proteína, em sua forma mutada, também pode estar relacionada à leucemia associada a dano de DNA (ADLER et al., 1999) bem como participar do aparecimento da síndrome infantil Wiedemann-Steiner (JONES et al., 2012), caracterizada por malformações corpóreas, baixa estatura, deficiência intelectual e aparência facial distinta, mediada também por metilação de histonas.

Tabela 11. Lista de proteínas diferencialmente expressas entre grupos e entre regiões

| *F-E | F-NE | I-E | I-NE | PL-E | PL-NE | Nome da proteína | Código de acesso no Uniprot | Potencial Efeito de Toxicidade Fetal |
|------|------|-----|------|------|-------|---|-----------------------------|---|
| x | x | x | X | x | | <i>Desmin</i> | P17661 DESM_HUMAN | Cardiomiopatia de dilatação muscular arritmogênica e morte prematura |
| | x | x | X | x | X | <i>Actin, aortic smooth muscle (ACTA 2)</i> | P62736 ACTA_HUMAN | Doença arterial coronariana prematura, acidente vascular cerebral prematuro, doença de Moyamoya |
| | | | | x | | <i>Actin gamma-enteric smooth muscle (ACTG 2)</i> | P63267 ACTH_HUMAN | Alargamento pré-natal da bexiga e obstrução gastrointestinal neonatal |
| x | x | | | x | | <i>Calponin-1</i> | P51911 CNN1_HUMAN | Cardiopatas vasculares, malformação urogenital masculina e feminina. Parto prematuro |
| | x | | | x | | <i>Cysteine and glycine-rich protein 2</i> | Q16527 CSRP2_HUMAN | Leucemia infantil e injúria vascular |
| x | | | | | | <i>Collagen alpha-1 (XVIII) Chain Structural maintenance of chromosomes (SMC1A)</i> | P39060 COIA1_HUMAN | Resposta ao abuso de drogas, Síndrome de Knobloch 1 |
| x | | | | | | <i>Kinetochores scaffold 1 (KNL1)</i> | Q14683 SMC1A_HUMAN | Síndrome de Cornelia de Lange, retardo mental |
| | | x | | | | <i>Histone-lysine N-methyltransferase (KMT2A)</i> | Q8NG31 KNL1_HUMAN | Microcefalia primária e retardo mental |
| | | | | x | | | Q03164 KMT2A_HUMAN | Síndrome de Wiedemann-Steiner, leucemia neutrofílica, esquizofrenia |

*F, I, PL: respectivamente regiões fetal, intermediária e placentária do tecido do cordão umbilical; E: grupo exposto ao uso de drogas no período gestacional, NE: não-exposto.

Como postulado por Gorini et al (2014) os perfis proteicos são derivados da interação entre fatores ambientais e o genoma do indivíduo e em determinadas alterações na expressão de proteínas podem levar a modificações funcionais, que oferecem oportunidades para descobrir mais de perto os mecanismos subjacentes ao fenótipo clínico da fetotoxicidade.

Nossos resultados contribuem para uma associação entre o uso de drogas na gravidez e possíveis efeitos tóxicos associados a alterações de expressão proteica, dando suporte à hipótese de que tais moléculas podem ser consideradas candidatas a potenciais biomarcadores para avaliação de risco e toxicidade.

Além disso, é de extrema importância que estudos toxicológicos levem em consideração a toxicidade a nível celular e órgão-específicos (MERRICK; WITZMANN, 2009). Neste contexto, a abordagem realizada neste trabalho permitiu um delineamento de estudo toxicoproteômico órgão-específico e região-específica, evitando possíveis interpretações errôneas em análises de proteoma global. As proteínas encontradas podem ter importância significativa na comunicação materno-fetal por serem oriundas de um tecido específico da gravidez, caracterizado por ser a principal ligação física entre a mãe e o bebê.

De acordo com Wang et al. (2016), centenas de proteínas podem ser expressas devido condições de estresse, como por exemplo, exposição a drogas de abuso. O estabelecimento de uma relação concisa entre o fenótipo e o uso específico de drogas é confundido por muitos tipos de exposição que um indivíduo pode experimentar simultaneamente (por exemplo, drogas, produtos químicos, nutrição ou estresse), e pelo impacto dessas exposições ao longo da vida. Assim, estudos em modelos animais e sistemas celulares são críticos para controlar condições experimentais e demonstrar links para validação em coortes humanas.

Assim, o desafio existente em pesquisas toxicoproteômicas é a relevância da escolha acurada de biomarcadores que reflitam diretamente em candidatos contundentes para uma validação clínica, os quais devem considerar a condição de estresse em questão e racional que fundamente a escolha baseado no risco oferecido pelos efeitos tóxicos.

As proteínas mencionadas neste trabalho compreendem um quadro metabólico condizente com as principais complicações de saúde maternas e fetais descritas para o uso de drogas.

Até o presente momento, apenas Zeng et al. (2014) e Li et al. (2018) realizaram estudos proteômicos em células de cordão umbilical considerando exposição a xenobióticos, entretanto, os trabalhos levam em consideração outros agentes como nicotina e a éteres

difenílicos polibromados. Este é o primeiro trabalho que leva em consideração amostras reais de tecido do cordão umbilical humano expostas às drogas de abuso *Cannabis* e cocaína.

Segundo George et al. (2010), um dos maiores desafios da toxicoproteômica é a análise de dados massivos devido à grande plasticidade proteômica. Neste sentido acreditamos que o procedimento metodológico utilizado neste trabalho para a extração de proteínas pôde minimizar este fator, identificando um repertório menor de moléculas que podem fornecer uma avaliação crítica sobre a composição de biomarcadores no tecido exposto.

6. Conclusões

Este trabalho propõe uma nova aplicação analítica para o método *QuEChERS*, como técnica de preparo de amostra humana para extração para canabinoides e avaliação do uso de drogas no período gestacional.

A adaptação da técnica reuniu vantagens como homogeneização do tecido por meio de ensaio laboratorial rápido e simples, hidrólise canabinoides conjugados e realização de *clean up* com grande praticidade e foi capaz de identificar analitos de interesses em amostras reais, comprovando o uso de drogas na gravidez.

O método apresentou limites de detecção e quantificação adequados para canabinoides, linearidade para faixa de trabalho em questão, sem efeito *carryover*, além disso foi seletivo para interferentes endógenos e exógenos.

Acreditamos que utilização de tecnologias avançadas como LC-MS/MS e análises por *Ion Mobility Mass Spectrometry* oferece grandes vantagens para estudos toxicoproteômicos, pois desempenham alto rendimento de análise, permitindo investigação simultânea de um grande número de proteínas de modo exploratório.

O uso da instrumentação analítica TIMS-MS foi útil para caracterização de biomoléculas sem necessidade prévia de separação cromatográfica.

Este é o primeiro estudo a examinar a toxicidade do abuso de drogas na gravidez utilizando tecido do cordão umbilical humano e as análises de proteômica convencional mostraram potenciais biomarcadores proteicos relacionados à toxicidade fetal e comprometimento do desenvolvimento / morfogênese nos tecidos expostos, auxiliando na compreensão de dados consistentes na literatura científica quanto à possíveis vias metabólicas disparadas ainda no ambiente intrauterino quando da exposição a xenobióticos no período gestacional.

As moléculas identificadas podem ser úteis na medicina clínica como potenciais biomarcadores na avaliação da toxicidade de medicamentos no cordão umbilical, fornecendo novas pistas sobre a exposição e / ou efeitos tóxicos significativos considerados na avaliação de risco.

Para mais amplo estudo e definição de especificidade das proteínas encontradas como biomarcadores de toxicidade, experimentos de validação toxicoproteômicos devem ser

realizados para garantir que tais biomarcadores representem especificidade à exposição a drogas de abuso.

7. Referências Bibliográficas

ABDALLA, R. R. et al. Prevalence of Cocaine Use in Brazil: Data from the II Brazilian National Alcohol and Drugs Survey (BNADS). **Addictive Behaviors**, v. 39, n. 1, p. 297–301, 2014.

ADLER, H. T. et al. Leukemic HRX Fusion Proteins Inhibit GADD34-Induced Apoptosis and Associate with the GADD34 and hSNF5/INI1 Proteins. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, n. 10, p. 7050–7060, 1 out. 1999.

AGIUS, R.; NADULSKI, T. Utility of ELISA screening for the monitoring of abstinence from illegal and legal drugs in hair and urine. **Drug Testing and Analysis**, v. 6, n. S1, p. 101–109, jun. 2014.

AIZPURUA-OLAIZOLA, O. et al. Simultaneous quantification of major cannabinoids and metabolites in human urine and plasma by HPLC-MS/MS and enzyme-alkaline hydrolysis. **Drug Testing and Analysis**, 2016.

ALLEN, K. et al. Replacement of immunoassay by LC tandem mass spectrometry for the routine measurement of drugs of abuse in oral fluid. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 42, n. 4, p. 277–284, 1 jul. 2005.

ALVEAR, E. et al. Determination of cocaine and its major metabolite benzoylecgonine in several matrices obtained from deceased individuals with presumed drug consumption prior to death. **Journal of Forensic and Legal Medicine**, v. 23, p. 37–43, 2014.

ALVES, M. N. R. et al. Validation of a solid phase extraction procedure for identification and quantification of cocaine and metabolites in meconium using GC/MS. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 8, n. 4, p. 317–323, 2012.

AMMERMAN, S. Marijuana. **Adolescent medicine: state of the art reviews**, v. 25, n. 1, p. 70–88, abr. 2014.

ANASTASSIADES, M. et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 2, p. 412–31, 2003.

ANGER, G. J.; COSTANTINE, M. M.; PIQUETTE-MILLER, M. Chapter 4 – Pharmacokinetics in pregnancy. In: **Reproductive and Developmental Toxicology**. [s.l.: s.n.]. p. 39–45.

ANZILLOTTI, L.; ODOARDI, S.; STRANO-ROSSI, S. Cleaning up blood samples using a modified “QuEChERS” procedure for the determination of drugs of abuse and benzodiazepines by UPLC-MSMS(☆). **Forensic science international**, v. 243C, p. 99–106, 2014.

ARMBRUSTER, D. A.; PRY, T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. **The Clinical biochemist. Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists**, v. 29 Suppl 1, n. August, p. S49-52, 2008.

AYE, I. L. M. H.; KEELAN, J. A. Placental ABC transporters, cellular toxicity and stress in pregnancy. **Chemico-Biological Interactions**, v. 203, n. 2, p. 456–466, 2013.

BALASUBRAMANI, M. et al. Molecular interactions in the retinal basement membrane system: A proteomic approach. **Matrix Biology**, v. 29, n. 6, p. 471–483, jul. 2010.

BARR, D. B.; BISHOP, A.; NEEDHAM, L. L. Concentrations of xenobiotic chemicals in the maternal-fetal unit. **Reproductive Toxicology**, v. 23, n. 3, p. 260–266, 2007.

BATTISTA, N. et al. Analytical approaches for the determination of phytocannabinoids and endocannabinoids in human matrices. **Drug Testing and Analysis**, v. 6, n. 1–2, p. 7–16, jan. 2014.

BAUER, C. R. et al. Acute neonatal effects of cocaine exposure during pregnancy. **Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine**, v. 159, n. 9, p. 824–834, 2005.

BEEGLY, M. et al. Level of intrauterine cocaine exposure and neuropsychological test scores in preadolescence: subtle effects on auditory attention and narrative memory. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 45, p. 1–17, set. 2014.

BEN-NISSAN, G.; SHARON, M. The application of ion-mobility mass spectrometry for structure/function investigation of protein complexes. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 42, p. 25–33, fev. 2018.

BENIGNI, P. et al. Towards the analysis of high molecular weight proteins and protein complexes using TIMS-MS. **International Journal for Ion Mobility Spectrometry**, v. 19, n. 2–3, p. 95–104, 7 set. 2016a.

BENIGNI, P. et al. Towards the analysis of high molecular weight proteins and protein complexes using TIMS-MS. **International Journal for Ion Mobility Spectrometry**, v. 19, n. 2–3, p. 95–104, 7 set. 2016b.

BERGÉ, A.; VULLIET, E. Development of a method for the analysis of hormones and pharmaceuticals in earthworms by quick, easy, cheap, effective, rugged and safe

(QuEChERS) extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 26, p. 7995–8008, 25 out. 2015.

BERGER, L. et al. Ethyl glucuronide in hair and fingernails as a long-term alcohol biomarker. **Addiction**, v. 109, n. 3, p. 425–431, 2014.

BERLIOZ-BARBIER, A. et al. MicroQuEChERS–nanoliquid chromatography–nanospray–tandem mass spectrometry for the detection and quantification of trace pharmaceuticals in benthic invertebrates. **Talanta**, v. 132, p. 796–802, jan. 2015.

BERVEILLER, P. et al. Drug transporter expression during in vitro differentiation of first-trimester and term human villous trophoblasts. **Placenta**, v. 36, n. 1, p. 93–96, 2015.

BESSA, M. A. et al. Underreporting of use of cocaine and marijuana during the third trimester of gestation among pregnant adolescents. **Addictive Behaviors**, v. 35, n. 3, p. 266–269, 2010.

BLOOMFIELD, M. A. P. et al. The effects of delta 9-tetrahydrocannabinol on the dopamine system. **Nature**, v. 539, p. 369–377, 2016.

BOHRER, B. C. et al. Biomolecule Analysis by Ion Mobility Spectrometry. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 293–327, jul. 2008.

BOURDAT-DESCHAMPS, M. et al. Multi-residue analysis of pharmaceuticals in aqueous environmental samples by online solid-phase extraction–ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Optimisation and matrix effects reduction by quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1349, p. 11–23, 4 jul. 2014.

BOUWLAND-BOTH, M. I. et al. Prenatal parental tobacco smoking, gene specific DNA methylation, and newborns size: the Generation R study. **Clinical Epigenetics**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2015.

BOYLE, M. I. et al. Cornelia de Lange syndrome. **Clinical genetics**, v. 88, p. 1–12, 2015.

BRAND, E. J.; ZHAO, Z. Cannabis in Chinese Medicine: Are Some Traditional Indications Referenced in Ancient Literature Related to Cannabinoids? **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, p. 108, 10 mar. 2017.

BRASIL. **Estimativa do número de usuários de crack e/ou similares nas capitais do país, 2013**. Casa Civil. [s.l: s.n.].

BRASIL. **Levantamento do Perfil de Usuários de Drogas na Região da Cracolândia**. São Paulo: [s.n.].

BRASIL. **RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências.**, 2017b.

BRIDGEMAN, M. B.; ABAZIA, D. T. Medicinal Cannabis: History, Pharmacology, And Implications for the Acute Care Setting. **P & T: a peer-reviewed journal for formulary management**, v. 42, n. 3, p. 180–188, mar. 2017.

BRUNET, B. et al. Validation of Large White Pig as an animal model for the study of cannabinoids metabolism: Application to the study of THC distribution in tissues. **Forensic Science International**, v. 161, n. 2–3, p. 169–174, set. 2006.

CAGLAYAN, A. O. et al. Brain malformations associated with Knobloch syndrome - Review of literature, expanding clinical spectrum, and identification of novel mutations. **Pediatric Neurology**, v. 51, n. 6, p. 806- 813.e8, 1 dez. 2014.

CAGNEY, G. et al. In silico proteome analysis to facilitate proteomics experiments using mass spectrometry. **Proteome science**, v. 1, n. 1, p. 5, 13 ago. 2003.

CALDAS, G. V.; DELUCA, J. G. **KNL1: Bringing order to the kinetochore** *Chromosoma* Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, , 2014.

CALVIGIONI, D. et al. Neuronal substrates and functional consequences of prenatal cannabis exposure. **European child & adolescent psychiatry**, v. 23, n. 10, p. 931–941, 2014.

CASTANETO, M. S. et al. Identifying Methamphetamine Exposure in Children. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 35, n. 6, p. 823–830, dez. 2013.

CASTRO, A. DE et al. Methadone, Cocaine, Opiates and Metabolite Disposition in Umbilical Cord and Correlations to Maternal Methadone Dose and Neonatal Outcomes. **Therapeutic drug monitoring**, v. 33, n. 4, p. 443–452, ago. 2011.

CEBRID. **II Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país: 2005**. São Paulo: CEBRID/ UNIFESP. 2006.

CHAN, D. et al. Population Baseline of Meconium Fatty Acid Ethyl Esters Among Infants of Nondrinking Women in Jerusalem and Toronto. **Therapeutic Drug Monitoring**,

v. 25, n. 3, p. 271–278, jun. 2003.

CHANG, M. S. et al. Historical review of sample preparation for chromatographic bioanalysis: pros and cons. **Drug Development Research**, v. 68, n. 3, p. 107–133, maio 2007.

CHITTAMMA, A. et al. Detection of in utero marijuana exposure by GC-MS, ultra-sensitive ELISA and LC-TOF-MS using umbilical cord tissue. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 37, n. 7, p. 391–394, 2013.

COLES, R. et al. Simultaneous analysis of the Delta9-THC metabolites 11-nor-9-carboxy-Delta9-THC and 11-hydroxy-Delta9-THC in meconium by GC-MS. **Journal of analytical toxicology**, v. 29, n. 6, p. 522–7, set. 2005.

COLES, R. et al. Simultaneous determination of codeine, morphine, hydrocodone, hydromorphone, oxycodone, and 6-acetylmorphine in urine, serum, plasma, whole blood, and meconium by LC-MS-MS. **Journal of analytical toxicology**, v. 31, n. 1, p. 1–14, 2007.

CONCHEIRO, M. et al. Alternative matrices for cocaine, heroin, and methadone in utero drug exposure detection. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 35, n. 4, p. 502–509, 2013.

CONCHEIRO, M. et al. Bioanalysis for cocaine, opiates, methadone, and amphetamines exposure detection during pregnancy. **Drug Testing and Analysis**, 5 set. 2016.

COOPER, K.; BROWN, S. ACTA2 mutation and postpartum hemorrhage: A case report. **BMC Medical Genetics**, v. 18, n. 1, 4 dez. 2017.

COPEL, J. A. **Obstetric Imaging: Fetal Diagnosis and Care**. [s.l.] Elsevier, 2018.

CORRION, M. L. L. et al. Detection of prenatal exposure to several classes of environmental toxicants and their metabolites by gas chromatography-mass spectrometry in maternal and umbilical cord blood. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 822, n. 1–2, p. 221–229, 2005.

COSTAIN, R. M. et al. Identification of hormone esters in injection site in muscle tissues by LC/MS/MS. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 25, n. 12, p. 1520–1529, dez. 2008.

COTTEN, S. W. Drug testing in the neonate. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 32, n. 3, p. 449–466, 2012.

D'AVILA, F. B.; LIMBERGER, R. P.; FRÖEHLICH, P. E. Cocaine and crack cocaine abuse by pregnant or lactating mothers and analysis of its biomarkers in meconium

and breast milk by LC–MS—A review. **Clinical Biochemistry**, v. 49, n. 13, p. 1096–1103, 2016.

DE CASTRO, A. et al. Simultaneous quantification of methadone, cocaine, opiates, and metabolites in human placenta by liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of analytical toxicology**, v. 33, n. 5, p. 243–52, jun. 2009.

DE CASTRO, A. et al. Simultaneous determination of opiates, methadone, amphetamines, cocaine, and metabolites in human placenta and umbilical cord by LC-MS/MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 12, p. 4295–4305, 2013.

DE GIOVANNI, N.; MARCHETTI, D. Cocaine and its metabolites in the placenta: A systematic review of the literature. **Reproductive Toxicology**, v. 33, n. 1, p. 1–14, jan. 2012.

DE JAGER, L. S.; ANDREWS, A. R. . Development of a screening method for cocaine and cocaine metabolites in urine using solvent microextraction in conjunction with gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 911, n. 1, p. 97–105, 2001.

DE SOUZA ELLER, S. C. W. et al. Analysis of 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol in urine samples by hollow fiber-liquid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry in consideration of measurement uncertainty. **Forensic Toxicology**, v. 32, n. 2, p. 282–291, 2014.

DELANO, K.; KOREN, G. Emerging Biomarkers of Intrauterine Neonatal and Pediatric Exposures to Xenobiotics. v. 59, p. 1059–1070, 2012.

DI NARO, E. et al. Umbilical cord morphology and pregnancy outcome. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 96, n. 2, p. 150–157, jun. 2001.

DIAZ, S. D. et al. Effects of prenatal methamphetamine exposure on behavioral and cognitive findings at 7.5 years of age. **Journal of Pediatrics**, v. 164, n. 6, p. 1333–1338, 2014.

DUH, E. J. et al. Persistence of fetal vasculature in a patient with Knobloch syndrome: Potential role for endostatin in fetal vascular remodeling of the eye. **Ophthalmology**, v. 111, n. 10, p. 1885–1888, out. 2004.

DULAURENT, S. et al. QuEChERS sample preparation prior to LC-MS/MS determination of opiates, amphetamines, and cocaine metabolites in whole blood. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 5, p. 1467–1474, 11 fev. 2016.

DUMAS, A.; SIMMAT-DURAND, L.; LEJEUNE, C. Grossesse et usage de substances psychoactives en France. Synthèse de la littérature. **Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction**, v. 43, n. 9, p. 649–656, nov. 2014.

DYBOWSKI, M. P.; DAWIDOWICZ, A. L. Application of the QuEChERS procedure for analysis of Δ 9 tetrahydrocannabinol and its metabolites in authentic whole blood samples by GC – MS / MS. **Forensic Toxicology**, n. 0123456789, 2018.

EL MARROUN, H. et al. Intrauterine cannabis exposure affects fetal growth trajectories: the Generation R Study. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 48, n. 12, p. 1173–81, dez. 2009.

ELLIOTT, S.; EVANS, J. A 3-year review of new psychoactive substances in casework. **Forensic Science International**, v. 243, p. 55–60, out. 2014.

ELSOHLY, M. A.; FENG, S. delta 9-THC metabolites in meconium: identification of 11-OH-delta 9-THC, 8 beta,11-diOH-delta 9-THC, and 11-nor-delta 9-THC-9-COOH as major metabolites of delta 9-THC. **Journal of analytical toxicology**, v. 22, n. 4, p. 329–335, 1998.

EYERS, C. E. et al. Understanding protein–drug interactions using ion mobility–mass spectrometry. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 42, p. 167–176, 2018.

FABRITIUS, M. et al. Distribution of free and conjugated cannabinoids in human bile samples. **Forensic Science International**, v. 223, n. 1–3, p. 114–118, 30 nov. 2012.

FAKSH, A. et al. Pregnancy in Desmin-Related Cardiomyopathy. **American Journal of Perinatology Reports**, v. 05, n. 02, p. e165–e167, 12 jun. 2015.

FALCON, M. et al. Maternal hair testing for the assessment of fetal exposure to drug of abuse during early pregnancy: Comparison with testing in placental and fetal remains. **Forensic science international**, v. 218, n. 1–3, p. 92–6, 10 maio 2012.

FDA; CDER. **Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry Biopharmaceutics Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry Biopharmaceutics Contains Nonbinding Recommendations**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm> and/or <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/default.htm>>. Acesso em: 24 ago. 2018.

FENG, S. et al. Simultaneous analysis of delta9-THC and its major metabolites in urine, plasma, and meconium by GC-MS using an immunoaffinity extraction procedure.

Journal of analytical toxicology, v. 24, n. 6, p. 395–402, 2000.

FENG, X. et al. Mass spectrometry in systems biology: an overview. **Mass spectrometry reviews**, v. 27, n. 6, p. 635–60, 2008.

FENN, J. B. et al. **Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules** Science, 1989.

FERGUSON, V. L.; DODSON, R. B. Bioengineering aspects of the umbilical cord. **European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology**, v. 144 Suppl, p. S108-13, maio 2009.

FLANAGAN, R. J. et al. **Fundamentals of Analytical Toxicology**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2008.

FRANK, H.-G. 10 – Placental Development. In: **Fetal and Neonatal Physiology**. [s.l: s.n.]. p. 101–113.

FRIDE, E. Multiple Roles for the Endocannabinoid System During the Earliest Stages of Life: Pre- and Postnatal Development. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 20, n. s1, p. 75–81, maio 2008.

FUKUSHIMA, A. R. et al. Purity and adulterant analysis of crack seizures in Brazil. **Forensic Science International**, v. 243, p. 95–98, 2014.

GABELICA, V.; MARKLUND, E. Fundamentals of ion mobility spectrometry. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 42, p. 51–59, 2018.

GALLARDO, E.; QUEIROZ, J. A. The role of alternative specimens in toxicological analysis. **BIOMEDICAL CHROMATOGRAPHY**, v. 22, p. 795–821, 2008.

GAO, Y.; HOLLAND, R. D.; YU, L.-R. Quantitative proteomics for drug toxicity. **Briefings in functional genomics & proteomics**, v. 8, n. 2, p. 158–66, mar. 2009.

GARABEDIAN, A. et al. Towards Discovery and Targeted Peptide Biomarker Detection Using nanoESI-TIMS-TOF MS. **Journal of The American Society for Mass Spectrometry**, v. 29, n. 5, p. 817–826, 9 maio 2018.

GARCÍA-ALGAR, O. et al. Exposición prenatal a drogas de abuso a través del análisis de meconio en una población de bajo nivel socioeconómico en Barcelona. **Anales de Pediatría**, v. 70, n. 2, p. 151–158, 2009.

GARERI, J.; KLEIN, J.; KOREN, G. Drugs of abuse testing in meconium. **Clinica Chimica Acta**, v. 366, n. 1–2, p. 101–111, abr. 2006.

GARRY, A. et al. Cannabis and breastfeeding. **Journal of toxicology**, v. 2009, p.

596149, 2009.

GENIN, A. et al. Kinetochore KMN network gene CASC5 mutated in primary microcephaly. **Human molecular genetics**, v. 21, n. 24, p. 5306–17, 15 dez. 2012.

GEORGE, J. et al. Toxicoproteomics: new paradigms in toxicology research. **Toxicology mechanisms and methods**, v. 20, n. 7, p. 415–23, set. 2010.

GHANBARI, R.; SUMNER, S. Using Metabolomics to Investigate Biomarkers of Drug Addiction. **Trends in molecular medicine**, v. 24, n. 2, p. 197–205, 2018.

GIAGINIS, C.; THEOCHARIS, S.; TSANTILI-KAKOULIDOU, A. Current toxicological aspects on drug and chemical transport and metabolism across the human placental barrier. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 8, n. 10, p. 1263–1275, 11 out. 2012.

GOEBEL, H. H. Desmin-related neuromuscular disorders. **Muscle & nerve**, v. 18, n. 11, p. 1306–20, nov. 1995.

GORINI, G.; HARRIS, R. A.; MAYFIELD, R. D. Proteomic approaches and identification of novel therapeutic targets for alcoholism. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 39, n. 1, p. 104–30, jan. 2014.

GÖTH, M.; PAGEL, K. Ion mobility–mass spectrometry as a tool to investigate protein–ligand interactions. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 409, n. 18, p. 4305–4310, 13 jul. 2017.

GRANDJEAN, P. et al. Umbilical cord mercury concentration as biomarker of prenatal exposure to methylmercury. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 7, p. 905–908, 2005.

GRAY, T.; HUESTIS, M. Bioanalytical procedures for monitoring in utero drug exposure. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 388, n. 7, p. 1455–1465, 2007.

GRAY, T. R. et al. Novel Biomarkers of Prenatal Methamphetamine Exposure in Human Meconium. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 31, n. 1, p. 70–75, fev. 2009.

GRAY, T. R. et al. Identifying prenatal cannabis exposure and effects of concurrent tobacco exposure on neonatal growth. **Clinical chemistry**, v. 56, n. 9, p. 1442–50, set. 2010.

GRAY, T. R.; BARNES, A. J.; HUESTIS, M. A. Effect of hydrolysis on identifying prenatal cannabis exposure. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, n. 6, p. 2335–2347, 2010.

GRAY, T. R.; SHAKLEYA, D. M.; HUESTIS, M. A. A liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification of 20 drugs of abuse and metabolites in human meconium. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, n. 8, p. 1977–1990, 2009.

GRIFFITHS, R. L.; KOCUREK, K. I.; COOPER, H. J. Ambient surface mass spectrometry–ion mobility spectrometry of intact proteins. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 42, p. 67–75, fev. 2018.

GRONEWOLD, A.; SKOPP, G. A preliminary investigation on the distribution of cannabinoids in man. **Forensic Science International**, v. 210, n. 1–3, p. e7–e11, jul. 2011.

GUPTA, R. C. Chapter 1 – Introduction. In: GUPTA, R. C. (Ed.). **Reproductive and Developmental Toxicology**. 1st. ed. [s.l.] Elsevier, 2011. p. 3–5.

HÄDENER, M. et al. Rapid quantification of free and glucuronidated THCCOOH in urine using coated well plates and LC–MS/MS analysis. **Bioanalysis**, v. 9, n. 5, p. 485–496, mar. 2017.

HAGLOCK-ADLER, C. J.; MCMILLIN, G. A.; STRATHMANN, F. G. Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method to address the increased utilization of umbilical cord in the assessment of in utero drug exposure. **Clinical biochemistry**, v. 49, n. 13, p. 1092–1095, 27 abr. 2016.

HAYATBAKHSI, M. R. et al. Birth Outcomes Associated With Cannabis Use Before and During Pregnancy. **Pediatric Research**, v. 71, n. 2, p. 215–219, 2012.

HELLER, M.; BURD, L. Review of ethanol dispersion, distribution, and elimination from the fetal compartment. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology**, v. 100, n. 4, p. 277–283, abr. 2014.

HILL, M.; REED, K. Pregnancy, Breast-feeding, and Marijuana. **Obstetrical & Gynecological Survey**, v. 68, n. 10, p. 710–718, out. 2013.

HOFFMANN, W. D.; JACKSON, G. P. Forensic Mass Spectrometry. **Annual review of analytical chemistry (Palo Alto, Calif.)**, v. 8, p. 419–440, 2015.

HOLLA, O. L. et al. Familial visceral myopathy diagnosed by exome sequencing of a patient with chronic intestinal pseudo-obstruction. **Endoscopy**, v. 46, n. 6, p. 533–536, 2014.

HU, F. et al. Development of a modified QUick, Easy, CHEap, Effective, Rugged and Safe method for the determination of multi-class antimicrobials in vegetables by liquid

chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1368, p. 52–63, 14 nov. 2014.

HUESTIS, M. Alternative Testing Matrices. In: **Drug Abuse Handbook**. [s.l.] CRC Press, 1997.

HUESTIS, M. A.; CHOO, R. E. Drug abuse 's smallest victims: in utero drug exposure. **Forensic Science International**, v. 128, p. 6–8, 2002.

HUESTIS, M.; SMITH, M. Human Cannabinoid Pharmacokinetics and Interpretation of Cannabinoid Concentrations in Biological Fluids and Tissues. In: ELSOHL, M. A. (Ed.). **. Marijuana and the cannabinoids**. 1st. ed. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2007. p. 205–236.

HUIZINK, A. C. Prenatal cannabis exposure and infant outcomes: Overview of studies. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 52, p. 45–52, 3 jul. 2014.

HWA, H.-L. L. Intrauterine illicit substance exposure. **Pediatrics and Neonatology**, v. 51, n. 5, p. 253–254, 2010.

JAQUES, S. C. et al. Cannabis, the pregnant woman and her child: weeding out the myths. **Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association**, v. 34, n. 6, p. 417–24, 2014.

JAUNIAUX, E. et al. Maternal tobacco exposure and cotinine levels in fetal fluids in the first half of pregnancy. **Obstetrics and gynecology**, v. 93, n. 1, p. 25–9, jan. 1999.

JEANNE DIT FOUQUE, K. et al. Structural signatures of the class III lasso peptide BI-32169 and the branched-cyclic topoisomers using trapped ion mobility spectrometry–mass spectrometry and tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 1 fev. 2019.

JOHANSSON, E. et al. Determination of Δ 1-tetrahydrocannabinol in human fat biopsies from marijuana users by gas chromatography-mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**, v. 3, n. 1, p. 35–38, jan. 1989.

JONES, H. E. et al. Problem drug use prevalence estimation revisited: Heterogeneity in capture-recapture and the role of external evidence. **Addiction**, p. 438–447, 2016.

JONES, J. et al. Determination of amphetamine and methamphetamine in umbilical cord using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 877, n. 29, p. 3701–

3706, 2009.

JONES, J. D.; COMER, S. D. A review of human drug self-administration procedures. **Behavioural Pharmacology**, v. 24, n. 5 and 6, p. 384–395, set. 2013.

JONES, J. T. et al. Detection of Codeine , Morphine , 6-Monoacetylmorphine , and Meconin in Human Umbilical Cord Tissue : Method Validation and Evidence of In Utero Heroin Exposure. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 37, n. 1, p. 45–52, 2015.

JONES, W. D. et al. De novo mutations in MLL cause Wiedemann-Steiner syndrome. **American journal of human genetics**, v. 91, n. 2, p. 358–64, 10 ago. 2012.

JOYA, X. et al. Gas chromatography–mass spectrometry assay for the simultaneous quantification of drugs of abuse in human placenta at 12th week of gestation. **Forensic Science International**, v. 196, n. 1–3, p. 38–42, mar. 2010.

JOYA, X. et al. Drugs of abuse in maternal hair and paired neonatal meconium: an objective assessment of foetal exposure to gestational consumption. **Drug Testing and Analysis**, v. 8, n. 8, p. 864–868, ago. 2016.

JOYCE, T. et al. The impact of prenatal exposure to cocaine on newborn costs and length of stay. **Health Serv Res**, v. 30, n. 2, p. 341–358, 1995.

JURNECZKO, E.; BARRAN, P. E. How useful is ion mobility mass spectrometry for structural biology? the relationship between protein crystal structures and their collision cross sections in the gas phase. **Analyst**, v. 136, n. 1, p. 20–28, 2011.

KALISH, R. B. et al. Clinical significance of the umbilical cord twist. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 189, n. 3, p. 736–739, set. 2003.

KAPLAN, K. A. et al. Neuronal metabolomics by ion mobility mass spectrometry: Cocaine effects on glucose and selected biogenic amine metabolites in the frontal cortex, striatum, and thalamus of the rat. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 6, p. 1959–1968, 2013.

KASAI, K.; TANAKA, T.; SATOU, H. [A Forensic Autopsy Case in which Sulpiride and Estazolam Were Detected in an Adipoceratous Cadaver by LC-MS/MS]. **Journal of UOEH**, v. 41, n. 2, p. 231–237, 2019.

KEEGAN, J. et al. Addiction in Pregnancy. **Journal of Addictive Diseases**, v. 29, n. 2, p. 175–191, 16 abr. 2010.

KHALED, A.; SINGH, V.; PAWLISZYN, J. Comparison of Solid-Phase Microextraction to Solvent Extraction and QuEChERS for Quantitative Analysis of

Veterinary Drug Residues in Chicken and Beef Matrices. **Journal of agricultural and food chemistry**, 21 ago. 2019.

KHALILPOUR, A. et al. Proteomic-based biomarker discovery for development of next generation diagnostics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 2, p. 475–491, 24 jan. 2017.

KIM, J. et al. Detection of in utero cannabis exposure by umbilical cord analysis. **Drug testing and analysis**, v. 10, n. 4, p. 636–643, abr. 2018.

KWONG, T. C.; RYAN, R. M. Detection of intrauterine illicit drug exposure by newborn drug testing. **Clinical Chemistry**, v. 43, n. 1, p. 235–242, 1997.

LAMY, S. et al. Assessment of tobacco, alcohol and cannabinoid metabolites in 645 meconium samples of newborns compared to maternal self-reports. **Journal of Psychiatric Research**, v. 90, p. 86–93, jul. 2017.

LAMY S et al. Conséquences potentielles de la consommation de tabac, de cannabis et de cocaïne par la femme enceinte sur la grossesse, le nouveau-né et l'enfant : revue de littérature. **L'Encéphale**, v. 41, p. S13–S20, 2014.

LASZLO, K. J.; BUSH, M. F. Interpreting the Collision Cross Sections of Native-like Protein Ions: Insights from Cation-to-Anion Proton-Transfer Reactions. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 14, p. 7607–7614, 2017.

LAUNIAINEN, T. et al. Meconium drug testing reveals maternal misuse of medicinal opioids among addicted mothers. **Drug Testing and Analysis**, v. 5, n. 7, p. 529–533, jul. 2013.

LE, N. L. et al. The detection of oxycodone in meconium specimens. **Journal of analytical toxicology**, v. 29, n. 1, p. 54–7, 2005.

LEHOTAY, S. J. .; MASTOVSKÁ, K.; LIGHTFIELD, A. R. Use of Buffering and Other Means to Improve Results of Problematic Pesticides in a Fast and Easy Method for Residue Analysis of Fruits and Vegetables. **JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL**, v. 88, n. 2, p. 615–629, 2005.

LEHTONEN, H. J. et al. Segregation of a missense variant in enteric smooth muscle actin γ -2 with autosomal dominant familial visceral myopathy. **Gastroenterology**, v. 143, n. 6, p. 1482- 1491.e3, dez. 2012.

LESTER, B. M. et al. The Maternal Lifestyle Study: drug use by meconium toxicology and maternal self-report. **Pediatrics**, v. 107, n. 2, p. 309–17, fev. 2001.

LESTER, B. M.; PADBURY, J. F. Third Pathophysiology of Prenatal Cocaine Exposure. **Developmental Neuroscience**, v. 31, n. 1–2, p. 23–35, 17 abr. 2009.

LEVINE, T. P. et al. Psychopathology and Special Education Enrollment in Children With Prenatal Cocaine Exposure. **Journal of Developmental & Behavioral Pediatrics**, v. 33, n. 5, p. 377–386, jun. 2012.

LEVY, A. J. et al. **Recent progress in metabolomics using ion mobility-mass spectrometryTrAC - Trends in Analytical Chemistry**, 2019.

LI, M. et al. Proteomic evaluation of human umbilical cord tissue exposed to polybrominated diphenyl ethers in an e-waste recycling area. **Environment International**, v. 111, p. 362–371, 1 fev. 2018.

LI, Y. et al. Structural basis for activity regulation of MLL family methyltransferases. **Nature**, v. 530, n. 7591, p. 447–452, 25 fev. 2016.

LIN, Y. et al. Induced repatterning of type XVIII collagen expression in ureter bud from kidney to lung type: association with sonic hedgehog and ectopic surfactant protein C. **Development (Cambridge, England)**, v. 128, n. 9, p. 1573–85, maio 2001.

LISTON, J. Breastfeeding and the use of recreational drugs--alcohol, caffeine, nicotine and marijuana. **Breastfeeding review : professional publication of the Nursing Mothers' Association of Australia**, v. 6, n. 2, p. 27–30, ago. 1998.

LIU, X. et al. Mapping the Human Plasma Proteome by SCX-LC-IMS-MS. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 18, n. 7, p. 1249–1264, 2007.

LOPEZ-CLAVIJO, A. F. et al. Liquid Extraction Surface Analysis (LESA) Electron-Induced Dissociation and Collision-Induced Dissociation Mass Spectrometry of Small Molecule Drug Compounds. **Journal of The American Society for Mass Spectrometry**, v. 29, n. 11, p. 2218–2226, 2018.

LÓPEZ, P. et al. Determination of cocaine and heroin with their respective metabolites in meconium by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Applied Toxicology**, v. 27, n. 5, p. 464–471, set. 2007.

LOZANO, J. et al. Biological Matrices for the Evaluation of In Utero Exposure to Drugs of Abuse. v. 29, n. 6, p. 711–734, 2007a.

LOZANO, J. et al. Prevalence of gestational exposure to cannabis in a Mediterranean city by meconium analysis. **Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics**, v. 96, n. 12, p. 1734–1737, dez. 2007b.

MACKULAK, T. et al. National study of illicit drug use in Slovakia based on wastewater analysis. **Science of the Total Environment**, v. 494–495, p. 158–165, 2014.

MACTIER, H. Neonatal and longer term management following substance misuse in pregnancy. **Early Human Development**, v. 89, n. 11, p. 887–892, 2013.

MADEJ, K. A. Analysis of meconium, nails and tears for determination of medicines and drugs of abuse. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 3, p. 246–259, mar. 2010.

MAIRINGER, T.; CAUSON, T. J.; HANN, S. The potential of ion mobility–mass spectrometry for non-targeted metabolomics. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 42, p. 9–15, 2018.

MANTOVANI, C. DE C. et al. Development and practical application of accelerated solvent extraction for the isolation of cocaine/crack biomarkers in meconium samples. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 957, p. 14–23, 2014.

MANTOVANI, C. DE C. **Uso da extração acelerada por solvente (ASE) para determinação cromatográfica de analitos de cocaína e tetraidrocanabinol em amostras de mecônio. 2014. Dissertação (Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas).** [s.l.] Universidade de São Paulo, 2014.

MANTOVANI, C. DE C. et al. Simultaneous accelerated solvent extraction and hydrolysis of 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid glucuronide in meconium samples for gas chromatography–mass spectrometry analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 1074–1075, p. 1–7, 1 fev. 2018.

MARCHEI, E. et al. Quantification of Delta9-tetrahydrocannabinol and its major metabolites in meconium by gas chromatographic-mass spectrometric assay: assay validation and preliminary results of the meconium project. **Therapeutic drug monitoring**, v. 28, n. 5, p. 700–6, out. 2006.

MARI, F.; POLITI, L.; BERTOL, E. Nails of newborns in monitoring drug exposure during pregnancy. **Forensic Science International**, v. 179, n. 2–3, p. 176–180, ago. 2008.

MARIN, S. J. et al. Confirmation of cannabinoids in meconium using two-dimensional gas chromatography with mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 858, n. 1–2, p. 59–64, 2007.

MARIN, S. J. et al. Nicotine and metabolites in paired umbilical cord tissue and meconium specimens. **Therapeutic drug monitoring**, v. 33, n. 1, p. 80–85, 2011.

MARIN, S. J.; METCALF, A.; MCMILLIN, G. A. Detection of In Utero Drug Exposure Using Umbilical Cord Tissue and Liquid Chromatography Time-of-Flight Mass Spectrometry (TOF). **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 35, n. 5, p. 701–702, 2014.

MARKLUND, E. G. et al. Collision cross sections for structural proteomics. **Structure**, v. 23, n. 4, p. 791–799, 2015.

MATON, G. et al. Kinetochore components are required for central spindle assembly. **Nature Cell Biology**, v. 17, n. 5, p. 697–705, 5 maio 2015.

MATTHIESEN, R.; BUNKENBORG, J. Introduction to Mass Spectrometry-Based Proteomics. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 2051, p. 1–58, 2013.

MAURER, H. H.; PFLEGER, K.; WEBER, A. **Mass spectral and GC data of drugs, poisons, pesticides, pollutants and their metabolites**. 3rd. ed. [s.l.] Wiley-VCH-Verl, 2007.

MAYHEW, T. M.; CHARNOCK-JONES, D. S.; KAUFMANN, P. **Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. III. Changes in complicated pregnancies** Placenta W.B. Saunders Ltd, , 2004.

MCHUGH, R. K.; WIGDERSON, S.; GREENFIELD, S. F. Epidemiology of substance use in reproductive-age women. **Obstetrics and Gynecology Clinics of North America**, v. 41, n. 2, p. 177–189, 2014.

MCMILLIN, G. A. et al. **Patterns of Drugs and Drug Metabolites Observed in Meconium; What Do They Mean?** [s.l: s.n.]. v. 37

MELIS, M. et al. New vistas on cannabis use disorder. **Neuropharmacology**, p. 1–11, 2017.

MELO, V. H. et al. Uso de drogas ilícitas por gestantes infectadas pelo HIV. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 36, n. 12, p. 555–561, 2014.

MERKLEY, E. D. et al. Applications and challenges of forensic proteomics. **Forensic science international**, v. 297, p. 350–363, abr. 2019.

MERRICK, B. A.; WITZMANN, F. A. The role of toxicoproteomics in assessing organ specific toxicity. **EXS**, v. 99, p. 367–400, 2009.

MILMAN, B. L. General principles of identification by mass spectrometry. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 69, p. 24–33, 2015.

MINIAUSKIENE, D.; JURGAITIENE, D.; STRUKCINSKIENE, B. Self-reported cannabis products and other illicit drugs consumption in older school-age children in Northern Lithuania: A comparison between 2006 and 2012. **Medicina (Lithuania)**, v. 50, n. 3, p. 162–168, 2014.

MINNES, S. et al. Cocaine use during pregnancy and health outcome after 10 years. **Drug and alcohol dependence**, v. 126, n. 1–2, p. 71–9, 1 nov. 2012.

MOEIN, M. M.; EL BEQQALI, A.; ABDEL-REHIM, M. Bioanalytical method development and validation: Critical concepts and strategies. **Journal of Chromatography B**, v. 1043, p. 3–11, 1 fev. 2017.

MONTGOMERY, D. et al. Testing for fetal exposure to illicit drugs using umbilical cord tissue vs meconium. **Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association**, v. 26, n. 1, p. 11–14, 2006.

MONTGOMERY, D. P. et al. Using umbilical cord tissue to detect fetal exposure to illicit drugs: a multicentered study in Utah and New Jersey. **Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association**, v. 28, n. 11, p. 750–753, 2008.

MOON, J. Y. et al. Validated gas chromatographic-mass spectrometric analysis of urinary cannabinoids purified with a calcium-hardened β -cyclodextrin polymer. **Journal of Chromatography A**, v. 1204, n. 1, p. 87–92, 2008.

MOORE, C. et al. Fetal cocaine exposure: analysis of vernix caseosa. **Journal of analytical toxicology**, v. 20, n. 6, p. 509–11, out. 1996.

MORINI, L. et al. Testing Ethylglucuronide in Maternal Hair and Nails for the Assessment of Fetal Exposure to Alcohol. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 35, n. 3, p. 402–407, jun. 2013.

MORRIS, C. V. et al. Molecular mechanisms of maternal cannabis and cigarette use on human neurodevelopment. **European Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 10, p. 1574–1583, 2011.

MUELLER, C. A. et al. Spinal cord injury-induced expression of the antiangiogenic endostatin/collagen XVIII in areas of vascular remodelling. **Journal of Neurosurgery: Spine**, v. 7, n. 2, p. 205–214, ago. 2007a.

MUELLER, C. A. et al. Lesional expression of the endogenous angiogenesis inhibitor endostatin/collagen XVIII following traumatic brain injury (TBI). **Experimental Neurology**, v. 208, n. 2, p. 228–237, dez. 2007b.

MYLLYNEN, P.; VÄHÄKANGAS, K. Placental transfer and metabolism: An overview of the experimental models utilizing human placental tissue. **Toxicology in Vitro**, v. 27, p. 507–512, 2012.

NADULSKI, T. et al. Simultaneous and Sensitive Analysis of THC , ! 1-OH-THC , THC-COOH , CBD , and CBN by GC-MS in Plasma after Oral Application of Small Doses of THC and Cannabis Extract. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 29, n. December, 2005a.

NADULSKI, T. et al. Simultaneous and sensitive analysis of THC, 11-OH-THC, THC-COOH, CBD, and CBN by GC-MS in plasma after oral application of small doses of THC and Cannabis extract. **J. Anal. Toxicol.**, v. 29, n. 8, p. 782–789, 2005b.

NAKAMURA, T. et al. ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation. **Molecular Cell**, v. 10, n. 5, p. 1119–1128, 1 nov. 2002.

NARA, A. et al. A Fatal Case of Poisoning with Fentanyl Transdermal Patches in Japan. **Journal of forensic sciences**, 24 jul. 2019.

NAYLOR, S. Biomarkers: Current perspectives and future prospects. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 3, n. 5, p. 525–529, set. 2003.

NCSACW. **Infants with Prenatal Substance Exposure**. Disponível em: <<https://ncsacw.samhsa.gov/resources/substance-exposed-infants.aspx>>.

NEGRUSZ, A.; COOPER, G. A. A. **Clarke's analytical forensic toxicology**. [s.l.] Pharmaceutical Press, 2013.

NESTLER, E. J. The neurobiology of cocaine addiction. **Science & practice perspectives**, v. 3, n. 1, p. 4–10, dez. 2005.

NIU, S.; RABUCK, J. N.; RUOTOLO, B. T. Ion mobility-mass spectrometry of intact protein-ligand complexes for pharmaceutical drug discovery and development. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 17, n. 5, p. 809–817, 2013.

NOVÁKOVÁ, L.; VLČKOVÁ, H. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. **Analytica Chimica Acta**, v. 656, n. 1–2, p. 8–35, 10 dez. 2009.

OLIVEIRA, S. C. W. S. E. F. et al. Estimativa da Incerteza de Medição em Análises de Benzoilecgonina em Urina por GC-MS. **Brazilian Journal of Forensic Sciences, Medical Law and Bioethics**, v. 5, n. 2, p. 215–231, 2016.

ORSON, F. M. et al. The future potential for cocaine vaccines. **Expert opinion on biological therapy**, v. 14, n. 9, p. 1271–83, 2014.

ORTIGOSA, S. et al. Feto-placental morphological effects of prenatal exposure to drugs of abuse. **Reproductive Toxicology**, v. 34, n. 1, p. 73–79, 2012.

OSTREA, E. M. et al. Fatty acid ethyl esters in meconium: Are they biomarkers of fetal alcohol exposure and effect? **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 30, n. 7, p. 1152–1159, 2006.

PALMER, K. L.; WOOD, K. E.; KRASOWSKI, M. D. Evaluating a switch from meconium to umbilical cord tissue for newborn drug testing: A retrospective study at an academic medical center. **Clinical Biochemistry**, 24 nov. 2016.

PARK, S. et al. The PHD3 domain of MLL Acts as a CYP33-regulated switch between MLL-mediated activation and repression. **Biochemistry**, v. 49, n. 31, p. 6576–6586, 10 ago. 2010.

PASIN, D. et al. Current applications of high-resolution mass spectrometry for the analysis of new psychoactive substances: a critical review. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 409, n. 25, p. 5821–5836, out. 2017.

PASSOS-BUENO, M. R. et al. Mutations in collagen 18A1 (COL18A1) and their relevance to the human phenotype. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 78, n. 1, p. 123–131, 2006.

PAULIN, D.; LI, Z. Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. **Experimental cell research**, v. 301, n. 1, p. 1–7, 15 nov. 2004.

PERESTRELO, R. et al. QuEChERS - Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends. **Analytica chimica acta**, v. 1070, p. 1–28, 6 set. 2019.

PICHINI, S. et al. Assessment of exposure to opiates and cocaine during pregnancy in a Mediterranean city: Preliminary results of the “Meconium Project”. **Forensic Science International**, v. 153, n. 1, p. 59–65, 4 out. 2005.

PINTO, S. M. et al. Substance abuse during pregnancy: effect on pregnancy outcomes. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, v. 150, n. 2, p. 137–141, 2010.

PLOTKA, J. et al. Effects of Addictive Substances During Pregnancy and Infancy and Their Analysis in Biological Materials. **Reviews of environmental contamination and**

toxicology, v. 227, p. 55–77, 2014.

PRELLE, A. et al. Congenital myopathy associated with abnormal accumulation of desmin and dystrophin. **Neuromuscular Disorders**, v. 2, n. 3, p. 169–175, 1992.

PRESTES, O. D. et al. QuEChERS: um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1620–1634, 2009.

PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 3, n. 1, p. 51–64, 2011.

RABILLOUD, T.; LESCUYER, P. Proteomics in mechanistic toxicology: history, concepts, achievements, caveats, and potential. **Proteomics**, v. 15, n. 5–6, p. 1051–74, mar. 2015.

RACAMONDE, I. et al. Determination of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol in water samples by solid-phase microextraction with on-fiber derivatization and gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1245, p. 167–174, 2012.

REGALADO, E. S. et al. Aortic Disease Presentation and Outcome Associated with ACTA2 Mutations. **Circulation: Cardiovascular Genetics**, v. 8, n. 3, p. 457–464, 11 jun. 2015.

RICHARDS, J.; LAURIN, E. **Cocaine**. Treasure I ed. [s.l.] StatPearls Publishing, 2017.

RICHARDSON, K. A.; HESTER, A. K.; MCLEMORE, G. L. Prenatal cannabis exposure - The first hit to the endocannabinoid system. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 58, p. 5–14, 2016.

RISTIMAA, J. et al. Broad-spectrum drug screening of meconium by liquid chromatography with tandem mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, n. 2, p. 925–935, 2010.

ROBERSON, E. K.; PATRICK, W. K.; HURWITZ, E. L. Marijuana use and maternal experiences of severe nausea during pregnancy in Hawai'i. **Hawai'i journal of medicine & public health : a journal of Asia Pacific Medicine & Public Health**, v. 73, n. 9, p. 283–7, set. 2014.

ROBERT, L. Hyaluronan, a truly “youthful” polysaccharide. Its medical applications.

Pathologie Biologie, v. 63, n. 1, p. 32–34, fev. 2015.

SAADI, A. et al. Refining the phenotype associated with CASC5 mutation. **Neurogenetics**, v. 17, n. 1, p. 71–78, 1 jan. 2016.

SABIN, G. P. Desenvolvimento e Validação de Método utilizando SPE e GC-MS para determinação multiresíduo de pesticidas em água potável. **Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Santa Maria**, 2007.

SAITO, K. et al. Analysis of drugs of abuse in biological specimens. **Journal of Health Science**, v. 57, n. 6, p. 472–487, 2011.

SAKAMOTO, M. et al. Relationships between trace element concentrations in chorionic tissue of placenta and umbilical cord tissue: Potential use as indicators for prenatal exposure. **Environment International**, v. 60, p. 106–111, 2013.

SANS, M.; FEIDER, C. L.; EBERLIN, L. S. Advances in mass spectrometry imaging coupled to ion mobility spectrometry for enhanced imaging of biological tissues. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 42, p. 138–146, 2018.

SANTOS, L. H. M. L. M. et al. Development of a modified acetonitrile-based extraction procedure followed by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of psychiatric drugs in sediments. **Journal of Chromatography A**, v. 1437, p. 37–48, 11 mar. 2016.

SCHEIDWEILER, K. B. et al. In vitro stability of free and glucuronidated cannabinoids in blood and plasma collected in plastic gray-top sodium fluoride tubes following controlled smoked cannabis. **Forensic Toxicology**, v. 34, n. 1, 2016.

SCHWILKE, E. W. et al. Delta9-tetrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxy-THC, and 11-nor-9-carboxy-THC plasma pharmacokinetics during and after continuous high-dose oral THC. **Clinical chemistry**, v. 55, n. 12, p. 2180–9, dez. 2009.

SEGURA, J.; VENTURA, R.; JURADO, C. Derivatization procedures for gas chromatographic-mass spectrometric determination of xenobiotics in biological samples, with special attention to drugs of abuse and doping agents. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v. 713, n. 1, p. 61–90, 1998.

SERTIÉ, A. L. et al. Collagen XVIII, containing an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth, plays a critical role in the maintenance of retinal structure and in neural tube closure (Knobloch syndrome). **Human molecular genetics**, v. 9, n. 13, p. 2051–8, 12 ago. 2000.

SHEN, E. et al. **Regulation of histone H3K4 methylation in brain development and disease** *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* Royal Society of London, , 2014.

SHU, I. et al. six-month survey of meconium and umbilical cord drug testing results between July and December of 2014. **CLINICAL CHEMISTRY**, v. 61, n. 10, p. S185, 2015.

SHVARTSBURG, A. A.; SMITH, R. D. Fundamentals of traveling wave ion mobility spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 24, p. 9689–9699, 2008.

SILVA, J. P.; YONAMINE, M. Bioanalytical and methodological challenges in the evaluation of fetal Cannabis exposure. **Bioanalysis**, v. 10, n. 10, p. 713–716, 1 maio 2018.

SILVEIRA, G. DE O. et al. Development of a method for the determination of cocaine, cocaethylene and norcocaine in human breast milk using liquid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Forensic Science International**, v. 265, p. 22–28, ago. 2016.

SKOPP, G.; PÖTSCH, L. A case report on drug screening of nail clippings to detect prenatal drug exposure. **Therapeutic drug monitoring**, v. 19, n. 4, p. 386–9, ago. 1997.

SLOPER, K. S.; BROWN, R. S.; BAUM, J. D. The water content of the human umbilical cord. **Early human development**, v. 3, n. 2, p. 205–10, jul. 1979.

SMITH, K. M.; XU, Y. Tissue sample preparation in bioanalytical assays. **Bioanalysis**, v. 4, n. 6, p. 741–749, mar. 2012.

SORDO, L. et al. Cocaine use and risk of stroke: A systematic review. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 142, p. 1–13, set. 2014.

STAUB, C. Chromatographic procedures for determination of cannabinoids in biological samples, with special attention to blood and alternative matrices like hair, saliva, sweat and meconium. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 733, n. 1–2, p. 119–126, 1999.

STEINMEYER, S. et al. Improved and validated method for the determination of Delta(9)-tetrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxy-THC and 11-nor-9-carboxy-THC in serum, and in human liver microsomal preparations using gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of chromatography B: Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 772, n. 2, p. 239–248, jun. 2002.

STROUD, L. R. et al. Maternal smoking during pregnancy and infant stress response:

Test of a prenatal programming hypothesis. **Psychoneuroendocrinology**, v. 48, p. 29–40, 2014.

SU, P.-H. et al. Perinatal Effects of Combined Use of Heroin, Methadone, and Amphetamine during Pregnancy and Quantitative Measurement of Metabolites in Hair. **Pediatrics & Neonatology**, v. 53, n. 2, p. 112–117, abr. 2012.

SUMAN, S.; MISHRA, S.; SHUKLA, Y. Toxicoproteomics in human health and disease: an update. **Expert review of proteomics**, v. 13, n. 12, p. 1073–1089, 2016.

SWGTOX. Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 37, n. 7, p. 452–474, 1 set. 2013.

SZUTORISZ, H.; HURD, Y. L. Epigenetic Effects of Cannabis Exposure. **Biological Psychiatry**, v. 79, n. 7, p. 586–594, abr. 2016.

TAEMA, M. I.; HAKIM, R. A. A. EL. Calponin 1 Serum Level A Biological Marker for Preterm Labor Predictability. **Interventions in Gynecology and Women's Healthcare**, v. 2, n. 4, 2018.

TEUNISSEN, S. F. et al. Novel Selectivity-Based Forensic Toxicological Validation of a Paper Spray Mass Spectrometry Method for the Quantitative Determination of Eight Amphetamines in Whole Blood. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 28, n. 12, p. 2665–2676, 2017.

THORSON, W. et al. De novo ACTG2 mutations cause congenital distended bladder, microcolon, and intestinal hypoperistalsis. **Human genetics**, v. 133, n. 6, p. 737–42, jun. 2014.

TYNON, M.; PORTO, M.; LOGAN, B. K. Simplified analysis of 11-hydroxy-delta-9-tetrahydrocannabinol and 11-carboxy-delta-9-tetrahydrocannabinol in human meconium: method development and validation. **Journal of analytical toxicology**, v. 39, n. 1, p. 35–40, 2015.

UCT, U. C. T. THC , THC-OH , and THC-COOH CONFIRMATIONS IN WHOLE BLOOD BY LC-MS / MS or GC-MS USING 100 mg STYRESCREEN SSTHC. In: **Clinical and Forensic Applications Manual**. [s.l: s.n.]. p. 192–195.

UNODC. **Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens**. New York: United Nations publication, 2009.

UNODC. **United Nations Office on Drugs and Crime. World Drug Report**. E.16 ed. [s.l.] United Nations publication, 2017.

UNODC. **World Drug Report 2019**. [s.l.] United Nations publication, 2019.

URSITTI, F.; KLEIN, J.; KOREN, G. Confirmation of cocaine use during pregnancy: a critical review. **Therapeutic drug monitoring**, v. 23, n. 4, p. 347–53, ago. 2001.

USUI, K. et al. Rapid drug extraction from human whole blood using a modified QuEChERS extraction method. **Legal Medicine**, v. 14, n. 6, p. 286–296, nov. 2012.

VAN ZYL, A. W. Substance abuse and oral health: an overview. **SADJ : journal of the South African Dental Association = tydskrif van die Suid-Afrikaanse Tandheelkundige Vereniging**, v. 69, n. 1, p. 8, 10–4, fev. 2014.

VARGESSON, N. Thalidomide-induced teratogenesis: History and mechanisms. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews**, v. 105, n. 2, p. 140–156, jun. 2015.

VAVRINKOVÁ, B. et al. [Placental and umbilical cord changes in drug-addicted women]. **Ceska gynekologie**, v. 66, n. 5, p. 345–9, set. 2001.

VESSECCHI, R. et al. Nomenclaturas de espectrometria de massas em língua portuguesa. **Quimica Nova**, v. 34, n. 10, p. 1875–1887, 2011.

VOLKOW, N. D.; KOOB, G.; BALER, R. Biomarkers in substance use disorders. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 6, n. 4, p. 522–525, 2015.

WAGNER, C. L. et al. The impact of prenatal drug exposure on the neonate. **Obstetrics and Gynecology Clinics of North America**, v. 25, n. 1, p. 169–194, 1998.

WANG, L. et al. The potential biomarkers of drug addiction: proteomic and metabolomics challenges. **Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals**, v. 21, n. 8, p. 678–685, dez. 2016.

WANG, P. et al. In utero drugs of abuse exposure testing for newborn twins. **Journal of Clinical Pathology**, v. 63, n. 3, p. 259–261, 2010.

WANG, S.-J. et al. Cysteine and glycine-rich protein 2 (*CSRP2*) transcript levels correlate with leukemia relapse and leukemia-free survival in adults with B-cell acute lymphoblastic leukemia and normal cytogenetics. **Oncotarget**, v. 8, n. 22, 30 maio 2017.

WANGLER, M. F. et al. Heterozygous de novo and inherited mutations in the smooth muscle actin (*ACTG2*) gene underlie megacystis-microcolon-intestinal hypoperistalsis syndrome. **PLoS genetics**, v. 10, n. 3, p. e1004258, mar. 2014.

WEI, J. et al. Increased Neointima Formation in Cysteine-Rich Protein 2-Deficient Mice in Response to Vascular Injury. 2005.

WEINMANN, W. et al. Simultaneous determination of THC-COOH and THC-COOH-glucuronide in urine samples by LC / MS / MS. **Forensic Science International**, v. 113, n. 1, p. 381–387, 2000.

WIERGOWSKI, M. et al. Determination of T, Thc-Coo H, Cbn and Cbd in Hair With Application of Derivatisatio N and Chromatographic Techniques. **Problems of Forensic Sciences**, v. LXII, p. 188–203, 2005.

WILKINS, M. R. et al. Progress with proteome projects: Why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 13, n. 1, p. 19–50, 1 dez. 1996.

WINDER, S. J.; WALSH, M. P. Calponin: thin filament-linked regulation of smooth muscle contraction. **Cellular signalling**, v. 5, n. 6, p. 677–86, nov. 1993.

WINECKER, R. E. et al. Detection of cocaine and its metabolites in human amniotic fluid. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 16, n. 5, p. 328–331, 1997.

WINTER, D. L.; WILKINS, M. R.; DONALD, W. A. Differential Ion Mobility–Mass Spectrometry for Detailed Analysis of the Proteome. **Trends in Biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 198–213, fev. 2019.

WOOD, K. E. et al. Meconium drug testing in multiple births in the USA. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 38, n. 7, p. 397–403, 2014a.

WOOD, K. E. et al. Retrospective analysis of the diagnostic yield of newborn drug testing. **BMC pregnancy and childbirth**, v. 14, n. 1, p. 250, 2014b.

WU, A. H. et al. Role of liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry (LC-HR/MS) in clinical toxicology. **Clinical Toxicology**, v. 50, n. 8, p. 733–742, 13 set. 2012.

YAO, J. L. et al. Effects of $\Delta(9)$ -tetrahydrocannabinol (THC) on human amniotic epithelial cell proliferation and migration. **Toxicology**, v. 394, n. November 2017, p. 19–26, 2018.

YI, F. et al. Structural Maintenance of Chromosomes protein 1: Role in Genome Stability and Tumorigenesis. **International journal of biological sciences**, v. 13, n. 8, p. 1092–1099, 2017.

YIP, S. W. et al. Prenatal cocaine exposure, illicit-substance use and stress and

craving processes during adolescence. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 158, p. 76–85, 2016.

YUAN, C.; CHEN, D.; WANG, S. Drug confirmation by mass spectrometry: Identification criteria and complicating factors. **Clinica Chimica Acta**, v. 438, p. 119–125, 2015.

YUAN, S. M. **α -Smooth muscle actin and ACTA2 gene expressions in vasculopathies** **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery** Sociedade Brasileira de Cirurgia Cardiovascular, , 1 nov. 2015.

ZELNER, I. et al. Universal screening for prenatal alcohol exposure: a progress report of a pilot study in the region of Grey Bruce, Ontario. **Therapeutic drug monitoring**, v. 32, n. 3, p. 305–310, 2010.

ZELNER, I. et al. Meconium Fatty Acid Ethyl Esters as Biomarkers of Late Gestational Ethanol Exposure and Indicator of Ethanol-Induced Multi-Organ Injury in Fetal Sheep. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, 2013.

ZENG, H.-L. et al. Effects of Nicotine on Proliferation and Survival in Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 28, n. 4, p. 181–189, 1 abr. 2014.

ZHAO, P. et al. Multi-walled carbon nanotubes as alternative reversed-dispersive solid phase extraction materials in pesticide multi-residue analysis with QuEChERS method. **Journal of Chromatography A**, v. 1225, p. 17–25, 17 fev. 2012.

ZHAO, Y.; HEBERT, M. F.; VENKATARAMANAN, R. Basic obstetric pharmacology. **Seminars in Perinatology**, v. 38, n. 8, p. 475–486, 2014.

ANEXO 1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO/ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

| | | | |
|--|--|---------|---------|
| 1. Informações do Participante da Pesquisa / Responsável Legal | | | |
| Nome: | | | |
| Documento de Identidade nº: | | | |
| Data de Nascimento: / / | | | Idade: |
| Endereço: | | | Nº: |
| Bairro: | | Cidade: | Estado: |
| CEP: | Telefones: | | |
| 2. Título da Pesquisa | | | |
| Tecido do cordão umbilical como nova matriz para o diagnóstico da exposição fetal ao tetraidrocannabinol e à cocaína: comparação com mecônio | | | |
| 3. Duração da Pesquisa: Quatro anos | | | |
| 4. Pesquisador Responsável | | | |
| Professor Doutor Mauricio Yonamine | | | |
| Farmacêutico | Nº do Registro do Conselho Regional (SP): 21.507 | | |
| Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo-USP | | | |
| 5. Instituições | | | |
| - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP | | | |
| - Hospital Universitário – USP / Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina – USP | | | |

Prezada senhora,

Meu nome é Mauricio Yonamine, sou professor da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP) e junto com o aluno de doutorado Jefferson Pereira e Silva, convido você a participar do projeto de pesquisa intitulado “Tecido do cordão umbilical como nova matriz para o diagnóstico da exposição fetal ao tetraidrocannabinol e à cocaína: comparação com mecônio”.

O objetivo do nosso estudo é desenvolver um teste de diagnóstico para verificar o uso de substâncias durante a gravidez, pois este é um dado importante para a saúde do bebê e da mãe. Por isso pedimos sua participação, mesmo que não tenha usado nenhuma substância ao longo da gravidez.

Você responderá um questionário com perguntas sobre o uso de substâncias durante a gravidez, dados do bebê e da gestação. Serão coletadas amostras de urina materna, colhidas pela própria paciente; amostras do cordão umbilical no momento do parto e também as primeiras fezes do recém-nascido (chamadas de mecônio) coletadas pela equipe de enfermagem. Essas amostras serão encaminhadas para análise no Laboratório de Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP para a busca de substâncias derivadas do uso de maconha e cocaína.

Os procedimentos de coleta não causam desconforto e nem riscos ao recém-nascido ou à mãe. Esta pesquisa não trará nenhum benefício direto para os pacientes, mas poderá

Participante da pesquisa/Responsável

T.e.oral (rubrica)

Pesquisador

(rubrica)

futuramente contribuir para o diagnóstico, tratamento e acompanhamento adequado das mães e dos bebês durante o período neonatal.

Também possuímos intenção de utilizar o material biológico em pesquisas futuras. Para isso, as amostras cedidas serão armazenadas em Biorrepositório durante o período do vigente projeto e entraremos em contato com você para novo consentimento caso realizemos novos protocolos de pesquisa. Após o término da pesquisa, as amostras serão descartadas de maneira apropriada, mantendo sempre a confidencialidade de sua identidade.

Você não receberá qualquer pagamento, portanto, a sua participação neste estudo é voluntária. Entretanto, diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa, você será ressarcida. Caso você não queira participar da pesquisa, você receberá a mesma atenção dada a qualquer outro paciente do hospital. A qualquer momento você poderá solicitar informações sobre todos os procedimentos relacionados à pesquisa e esclarecer qualquer dúvida. Você pode se negar a participar do estudo ou deixar de participar dele a qualquer momento sem sofrer qualquer prejuízo por parte da equipe ou do hospital. De mesmo modo, pode retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado em Biorrepositório. Os resultados serão somente utilizados para fins de pesquisa, assim, seu nome e identidade não serão divulgados, ou seja, as amostras e os respectivos questionários respondidos serão identificados por códigos de letras e números.

Duas vias deste documento serão assinadas pelo pesquisador responsável e por você, permanecendo uma via com cada pessoa.

As dúvidas podem ser esclarecidas pelo prof. Dr. Mauricio Yonamine ou pelo aluno Jefferson Pereira e Silva no telefone (11) 30912194.

Declaro que, após o projeto ter sido esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, aceito participar do presente protocolo de pesquisa e autorizo a coleta, o depósito, o armazenamento e a utilização do material biológico em Biorrepositório para pesquisas futuras.

São Paulo, ____ de _____ de _____.

Assinatura do participante da
pesquisa/Responsável Legal

Assinatura do pesquisador responsável
(carimbo ou nome legível)

Para qualquer questão, dúvida, esclarecimento ou reclamação sobre aspectos éticos dessa pesquisa, favor entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo - Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 13A - Butantã – São Paulo – CEP 05508-900. Fone: (11) 3091-3622, fone-fax: 3091-3677 – e-mail: cepfcf@usp.br. Comissão Interna para Análise de Projetos de Pesquisa Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – Av. Dr. Eneas de Carvalho Aguiar, 255 – 10 andar – sala 10.093 – São Paulo – CEP 05403-000. Fone (11) 2661 3190 – e-mail: ciapp.ichc@hc.fm.usp.br. Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da USP - Av. Prof. Lineu Prestes, 2565 - Cidade Universitária – São Paulo - CEP 05508-000 – Fone: (11) 3091-9457- e-mail: cep@hu.usp.br

ANEXO 2. Instrumento de Coleta de Dados

INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS

| |
|---|
| Identificação no.: _____ |
| Peso fetal (Kg): _____ |
| Comprimento fetal (cm): _____ |
| Perímetro cefálico: _____. Perímetro Torácico: _____. Perímetro abdominal: _____ |
| Sexo: () Masculino () Feminino () Indefinido |
| Etnia: () Asiático () Branco () Negro () Indígena () Outra: _____ |
| Duração da gestação (em semanas): _____ |
| Tipo de parto: () Cesárea () Normal |
| Data das coletas de: Cordão umbilical: ___/___/___ Urina materna: ___/___/___ Mecônio: ___/___/___ |

1. Mãe apresentou pré-eclâmpsia ou eclâmpsia?

() Não () Sim

2. Mãe apresentou alguma comorbidade?

() Não () Sim. Especificar: _____

3. Utilizou medicamentos na Gestação.

() Não () Sim. Especificar: _____

4. Alguma anomalia ou malformação observadas no RN?

() Não () Sim. Qual (is)?

() Cardíaca

() Sistema Nervoso Central

() Óssea

() Respiratória

() Outras. Especificar: _____

5. RN e/ ou mãe apresentaram algum problema pós-parto?

() Não () Sim. Especificar: _____

6. RN e/ ou mãe apresentaram sintomas de síndrome de abstinência?

() Não () Sim. Especificar: _____

7. RN e/ou mãe apresentaram DST?

() Não () Sim. Especificar: _____

Identificação no.: _____

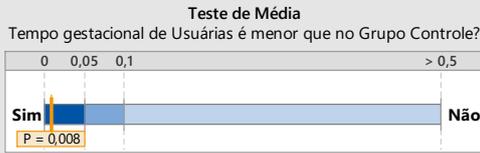
Idade: _____

| 1- Na sua vida, qual (is) dessas substâncias você já usou? (SOMENTE USO NÃO-MÉDICO) | Não | Sim |
|--|------------|------------|
| a. Derivados do tabaco (cigarros, charuto, cachimbo, fumo) | 0 | 1 |
| b. Bebidas alcoólicas (cerveja, vinho, pinga, uísque, vodka) | 0 | 1 |
| c. Maconha (baseado, erva, haxixe) | 0 | 1 |
| d. Cocaína, crack (pó, pedra, branquinha, nuvem) | 0 | 1 |
| e. Estimulantes como anfetaminas ou ecstasy (bolinhas, rebites) | 0 | 1 |
| f. Outras, Especificar: | 0 | 1 |

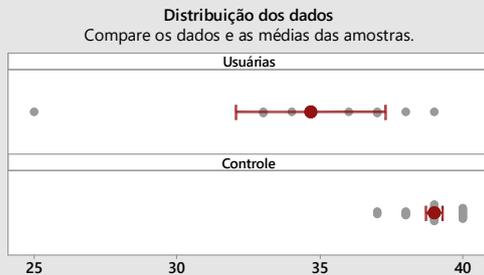
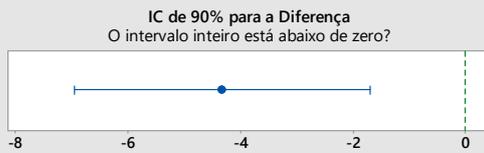
| 2- Durante a gravidez, com que frequência você utilizou essas(s) substâncias? (Primeira droga, depois a segunda droga, etc) | Nunca | 1 ou 2 vezes | 1º trimestre | 2º trimestre | 3º trimestre |
|--|--------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| a. Derivados do tabaco (cigarros, charuto, cachimbo, fumo) | | | | | |
| b. Bebidas alcoólicas (cerveja, vinho, pinga, uísque, vodka) | | | | | |
| c. Maconha (baseado, erva, haxixe) | | | | | |
| d. Cocaína, crack (pó, pedra, branquinha, nuvem) | | | | | |
| e. Estimulantes como anfetaminas ou ecstasy (bolinhas, rebites) | | | | | |
| f. Outras, Especificar: | | | | | |

ANEXO 3. Dados estatísticos complementares: Estados de Saúde

Teste t para média de tempo de gestação entre Usuárias e Grupo Controle Relatório Resumo



A média de Usuárias é significativamente menor do que a média de Controle ($p < 0,05$).



| Estatísticas | Amostras Individuais | |
|------------------|----------------------|------------------|
| | Usuárias | Controle |
| Tamanho amostral | 9 | 31 |
| Média | 34,667 | 39 |
| IC de 90% | (32,06; 37,28) | (38,716; 39,284) |
| Desvio padrão | 4,2131 | 0,93095 |

| Estatísticas | *Diferença |
|--------------|--------------------|
| | Diferença |
| IC de 90% | (-6,9632; -1,7034) |

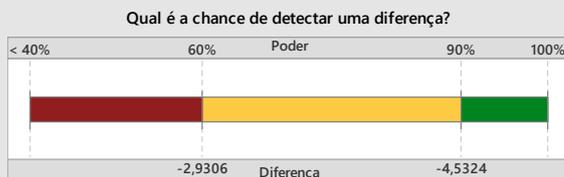
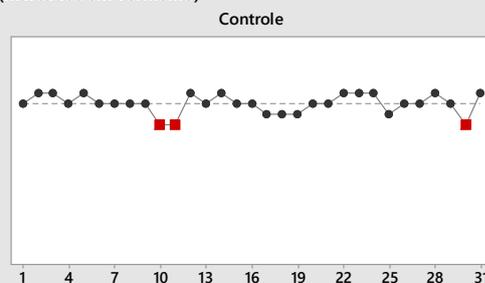
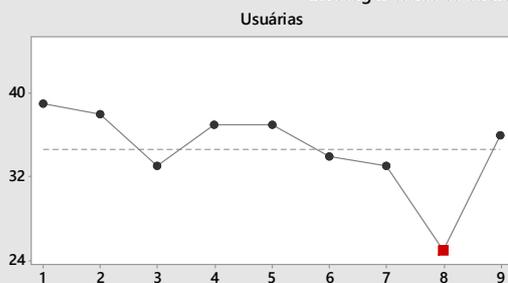
*Diferença = Usuárias - Controle

Comentários

- Teste: você pode concluir que a média de Usuárias é menor do que Controle no nível de significância de 0,05.
- IC: quantifica a incerteza associada à estimativa da diferença nas médias dos dados amostrais. Você pode ter 90% de confiança de que a verdadeira diferença está entre -6,9632 e -1,7034, e ter 95% de confiança de que ela é menor que -1,7034.
- Distribuição dos Dados: compare a localização e as médias das amostras. Procure dados atípicos antes de interpretar os resultados do teste.

Teste t para 2 amostras para a Média de Usuárias e Controle Relatório de Diagnóstico

Dados na Ordem da Worksheet
Investigar todos os outliers (marcados em vermelho).



Para $\alpha = 0,05$ e tamanhos amostrais = 9; 31:
Se a média verdadeira de Usuárias fosse 2,9306 menor do que Controle, você teria uma chance de 60% de detectar a diferença. Se Usuárias fosse 4,5324 menor do que Controle, você teria uma chance de 90%.

Que diferença você pode detectar com os tamanhos amostrais de 9 e 31?

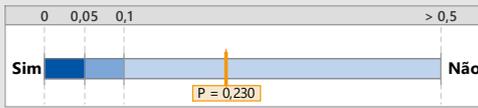
| Diferença | Poder |
|-----------|-------|
| -2,9306 | 60% |
| -3,3519 | 70% |
| -3,8458 | 80% |
| -4,5324 | 90% |

Diferença observada = -4,3333

O poder é uma função dos tamanhos amostrais e dos desvios padrão. Para detectar diferenças menores, considere aumentar os tamanhos amostrais.

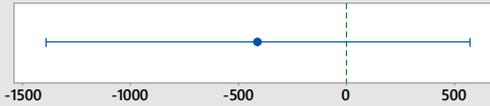
Teste t para média de Peso (g) de RN de Usuárias vs Grupo Controle Relatório Resumo

Teste de Média
Usuárias é menos do que Controle?

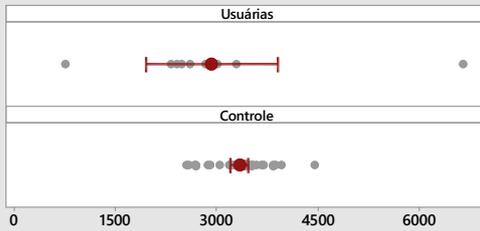


A média de Usuárias não é significativamente menor do que a média de Controle ($p > 0,05$).

IC de 90% para a Diferença
O intervalo inteiro está abaixo de zero?



Distribuição dos dados
Compare os dados e as médias das amostras.



| Estatísticas | Amostras Individuais | |
|------------------|----------------------|------------------|
| | Usuárias | Controle |
| Tamanho amostral | 9 | 31 |
| Média | 2932,2 | 3343,0 |
| IC de 90% | (1961; 3903) | (3208,2; 3477,9) |
| Desvio padrão | 1566,7 | 442,27 |

Diferença Entre Amostras

| Estatísticas | *Diferença |
|--------------|-------------------|
| Diferença | -410,81 |
| IC de 90% | (-1393,1; 571,49) |

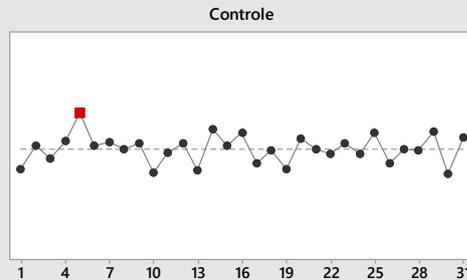
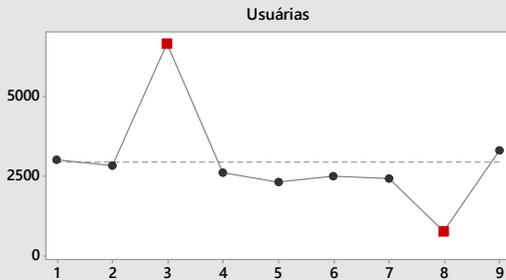
*Diferença = Usuárias - Controle

Comentários

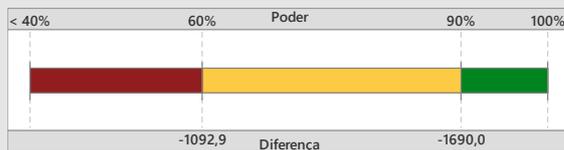
- Teste: não há evidências suficientes para concluir que a média de Usuárias é menor do que Controle no nível de significância de 0,05.
- IC: quantifica a incerteza associada à estimativa da diferença nas médias dos dados amostrais. Você pode ter 90% de confiança de que a verdadeira diferença está entre -1393,1 e 571,49, e ter 95% de confiança de que ela é menor que 571,49.
- Distribuição dos Dados: compare a localização e as médias das amostras. Procure dados atípicos antes de interpretar os resultados do teste.

Teste t para média de Peso (g) de RN de Usuárias vs Grupo Controle Relatório de Diagnóstico

Dados na Ordem da Worksheet
Investigar todos os outliers (marcados em vermelho).



Qual é a chance de detectar uma diferença?



Para $\alpha = 0,05$ e tamanhos amostrais = 9; 31:
Se a média verdadeira de Usuárias fosse 1092,9 menor do que Controle, você teria uma chance de 60% de detectar a diferença. Se Usuárias fosse 1690,0 menor do que Controle, você teria uma chance de 90%.

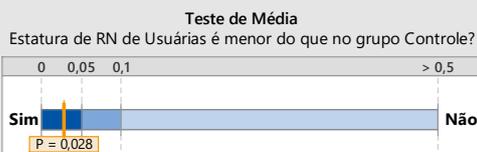
Que diferença você pode detectar com os tamanhos amostrais de 9 e 31?

| Diferença | Poder |
|-----------|-------|
| -1092,9 | 60% |
| -1249,9 | 70% |
| -1434,0 | 80% |
| -1690,0 | 90% |

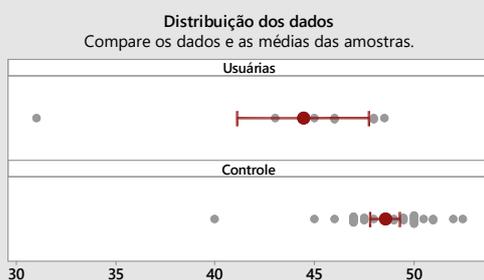
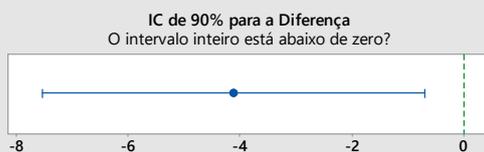
Diferença observada = -410,81

O poder é uma função dos tamanhos amostrais e dos desvios padrão. Para detectar diferenças menores, considere aumentar os tamanhos amostrais.

Teste t para média de Estatura (cm) de RN de Usuárias vs Controle Relatório Resumo



A média de Usuárias é significativamente menor do que a média de Controle ($p < 0,05$).



| Estatísticas | Amostras Individuais | |
|------------------|----------------------|------------------|
| | Usuárias | Controle |
| Tamanho amostral | 9 | 31 |
| Média | 44,444 | 48,565 |
| IC de 90% | (41,12; 47,77) | (47,836; 49,293) |
| Desvio padrão | 5,3587 | 2,3901 |

| Estatísticas | Diferença Entre Amostras |
|--------------|--------------------------|
| | *Diferença |
| Diferença | -4,1201 |
| IC de 90% | (-7,5362; -0,70394) |

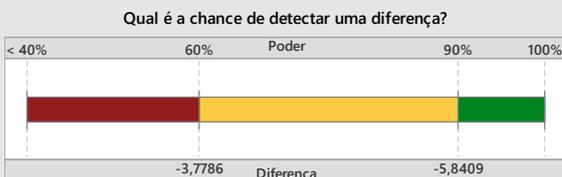
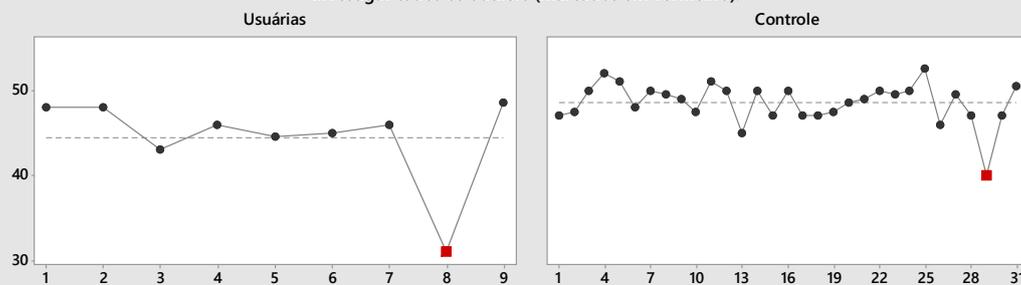
*Diferença = Usuárias - Controle

Comentários

- Teste: você pode concluir que a média de Usuárias é menor do que Controle no nível de significância de 0,05.
- IC: quantifica a incerteza associada à estimativa da diferença nas médias dos dados amostrais. Você pode ter 90% de confiança de que a verdadeira diferença está entre -7,5362 e -0,70394, e ter 95% de confiança de que ela é menor que -0,70394.
- Distribuição dos Dados: compare a localização e as médias das amostras. Procure dados atípicos antes de interpretar os resultados do teste.

Teste t para média de Estatura (cm) de RN de Usuárias vs Controle Relatório de Diagnóstico

Dados na Ordem da Worksheet
Investigar todos os outliers (marcados em vermelho).



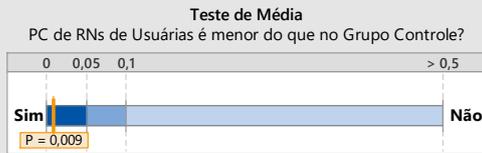
Para $\alpha = 0,05$ e tamanhos amostrais = 9; 31:
Se a média verdadeira de Usuárias fosse 3,7786 menor do que Controle, você teria uma chance de 60% de detectar a diferença. Se Usuárias fosse 5,8409 menor do que Controle, você teria uma chance de 90%.

| Que diferença você pode detectar com os tamanhos amostrais de 9 e 31 | Poder |
|--|-------|
| -3,7786 | 60% |
| -4,3212 | 70% |
| -4,9572 | 80% |
| -5,8409 | 90% |

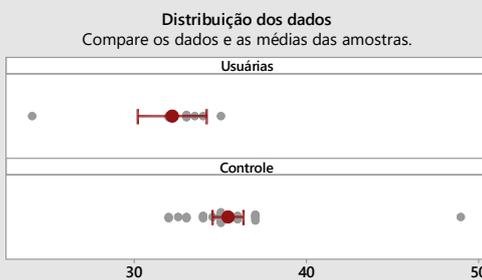
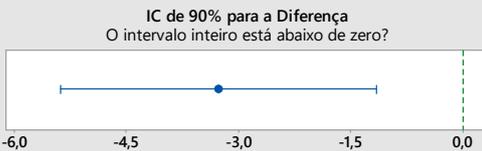
Diferença observada = -4,1201

O poder é uma função dos tamanhos amostrais e dos desvios padrão. Para detectar diferenças menores, considere aumentar os tamanhos amostrais.

Teste t para média de Perímetro Cefálico (cm) em RN de Usuárias vs Controle Relatório Resumo



A média de Usuárias é significativamente menor do que a média de Controle ($p < 0,05$).



| Estatísticas | Amostras Individuais | |
|------------------|----------------------|------------------|
| | Usuárias | Controle |
| Tamanho amostral | 9 | 31 |
| Média | 32,167 | 35,435 |
| IC de 90% | (30,18; 34,15) | (34,555; 36,316) |
| Desvio padrão | 3,2016 | 2,8889 |

| Estatísticas | Diferença Entre Amostras |
|--------------|--------------------------|
| | *Diferença |
| Diferença | -3,2688 |
| IC de 90% | (-5,3837; -1,1539) |

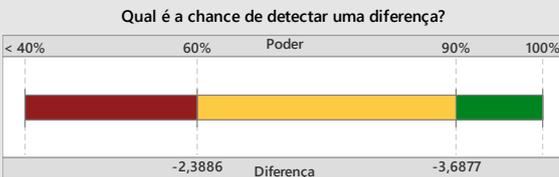
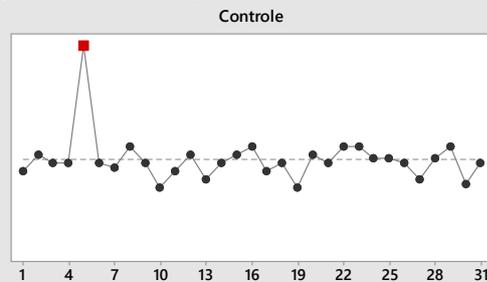
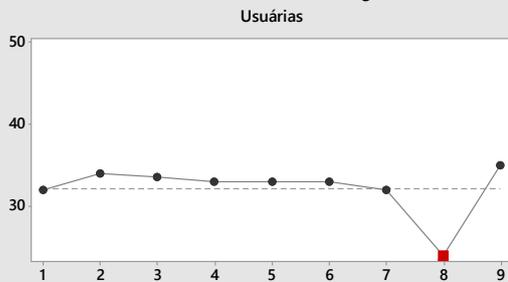
*Diferença = Usuárias - Controle

Comentários

- Teste: você pode concluir que a média de Usuárias é menor do que Controle no nível de significância de 0,05.
- IC: quantifica a incerteza associada à estimativa da diferença nas médias dos dados amostrais. Você pode ter 90% de confiança de que a verdadeira diferença está entre -5,3837 e -1,1539, e ter 95% de confiança de que ela é menor que -1,1539.
- Distribuição dos Dados: compare a localização e as médias das amostras. Procure dados atípicos antes de interpretar os resultados do teste.

Teste t para média de Perímetro Cefálico (cm) em RN de Usuárias vs Controle Relatório de Diagnóstico

Dados na Ordem da Worksheet
Investigar todos os outliers (marcados em vermelho).



Para $\alpha = 0,05$ e tamanhos amostrais = 9; 31:
Se a média verdadeira de Usuárias fosse 2,3886 menor do que Controle, você teria uma chance de 60% de detectar a diferença. Se Usuárias fosse 3,6877 menor do que Controle, você teria uma chance de 90%.

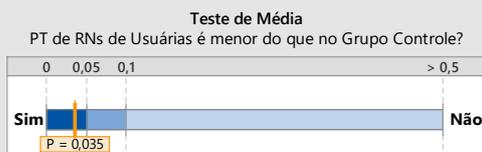
Que diferença você pode detectar com os tamanhos amostrais de 9 e 31?

| Diferença | Poder |
|-----------|-------|
| -2,3886 | 60% |
| -2,7307 | 70% |
| -3,1314 | 80% |
| -3,6877 | 90% |

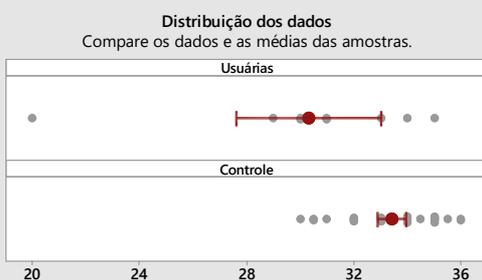
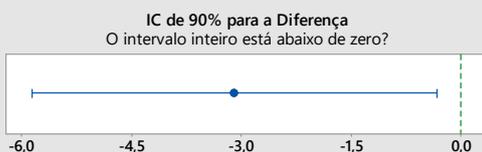
Diferença observada = -3,2688

O poder é uma função dos tamanhos amostrais e dos desvios padrão. Para detectar diferenças menores, considere aumentar os tamanhos amostrais.

Teste t para média de Perímetro Torácico de RNs de Usuárias vs Controle Relatório Resumo



A média de Usuárias é significativamente menor do que a média de Controle ($p < 0,05$).



| Estatísticas | Amostras Individuais | |
|------------------|----------------------|------------------|
| | Usuárias | Controle |
| Tamanho amostral | 9 | 28 |
| Média | 30,333 | 33,429 |
| IC de 90% | (27,63; 33,04) | (32,887; 33,970) |
| Desvio padrão | 4,3589 | 1,6817 |

| Estatísticas | Diferença Entre Amostras |
|--------------|--------------------------|
| | *Diferença |
| Diferença | -3,0952 |
| IC de 90% | (-5,8610; -0,32950) |

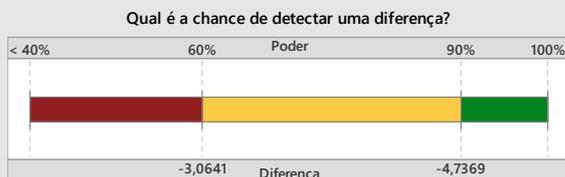
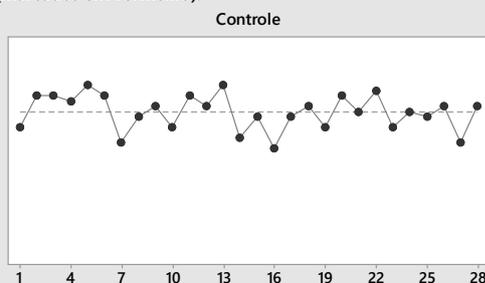
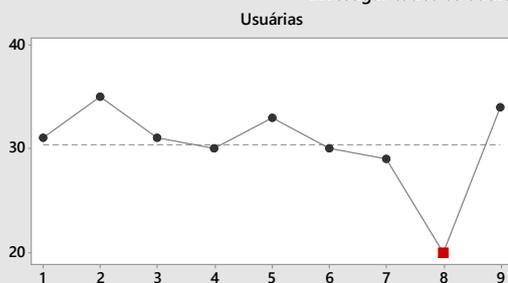
*Diferença = Usuárias - Controle

Comentários

- Teste: você pode concluir que a média de Usuárias é menor do que Controle no nível de significância de 0,05.
- IC: quantifica a incerteza associada à estimativa da diferença nas médias dos dados amostrais. Você pode ter 90% de confiança de que a verdadeira diferença está entre -5,8610 e -0,32950, e ter 95% de confiança de que ela é menor que -0,32950.
- Distribuição dos Dados: compare a localização e as médias das amostras. Procure dados atípicos antes de interpretar os resultados do teste.

Teste t para média de Perímetro Torácico de RNs de Usuárias vs Controle Relatório de Diagnóstico

Dados na Ordem da Worksheet
Investigar todos os outliers (marcados em vermelho).



Para $\alpha = 0,05$ e tamanhos amostrais = 9; 28:
Se a média verdadeira de Usuárias fosse 3,0641 menor do que Controle, você teria uma chance de 60% de detectar a diferença. Se Usuárias fosse 4,7369 menor do que Controle, você teria uma chance de 90%.

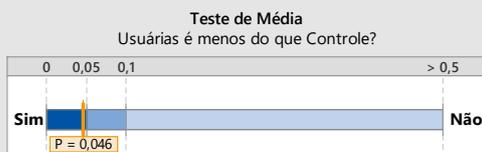
Que diferença você pode detectar com os tamanhos amostrais de 9 e 28?

| Diferença | Poder |
|-----------|-------|
| -3,0641 | 60% |
| -3,5042 | 70% |
| -4,0201 | 80% |
| -4,7369 | 90% |

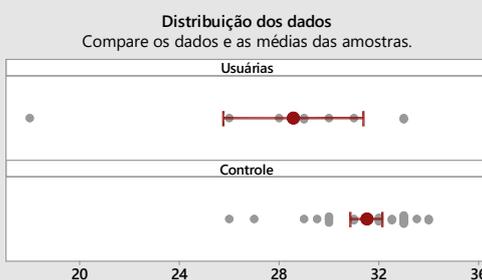
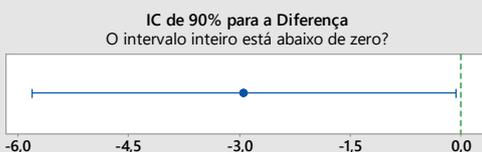
Diferença observada = -3,0952

O poder é uma função dos tamanhos amostrais e dos desvios padrão. Para detectar diferenças menores, considere aumentar os tamanhos amostrais.

Teste t para média de Perímetro Abdominal de RN de Usuárias vs Controle Relatório Resumo



A média de Usuárias é significativamente menor do que a média de Controle ($p < 0,05$).



| Estatísticas | Amostras Individuais | |
|------------------|----------------------|------------------|
| | Usuárias | Controle |
| Tamanho amostral | 9 | 28 |
| Média | 28,556 | 31,5 |
| IC de 90% | (25,73; 31,38) | (30,850; 32,150) |
| Desvio padrão | 4,5583 | 2,0184 |

| Estatísticas | Diferença Entre Amostras |
|--------------|--------------------------|
| | *Diferença |
| Diferença | -2,9444 |
| IC de 90% | (-5,8161; -0,072743) |

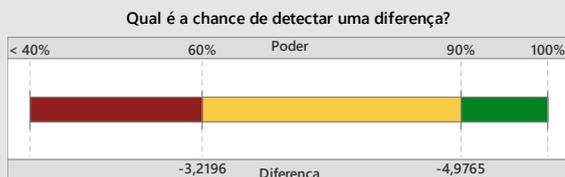
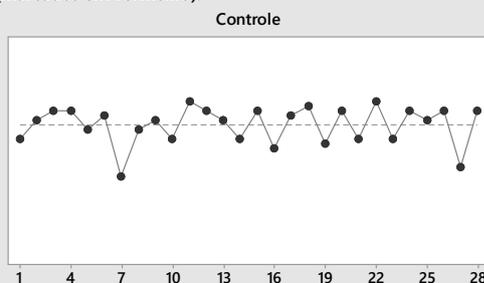
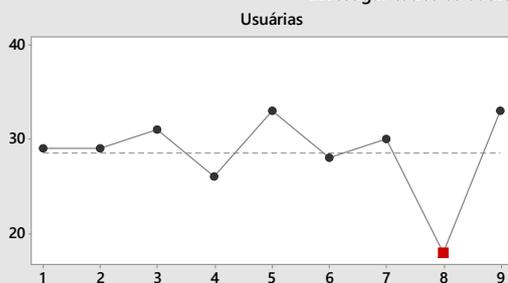
*Diferença = Usuárias - Controle

Comentários

- Teste: você pode concluir que a média de Usuárias é menor do que Controle no nível de significância de 0,05.
- IC: quantifica a incerteza associada à estimativa da diferença nas médias dos dados amostrais. Você pode ter 90% de confiança de que a verdadeira diferença está entre -5,8161 e -0,072743, e ter 95% de confiança de que ela é menor que -0,072743.
- Distribuição dos Dados: compare a localização e as médias das amostras. Procure dados atípicos antes de interpretar os resultados do teste.

Teste t para média de Perímetro Abdominal de RN de Usuárias vs Controle Relatório de Diagnóstico

Dados na Ordem da Worksheet
Investigar todos os outliers (marcados em vermelho).



Para $\alpha = 0,05$ e tamanhos amostrais = 9; 28:
Se a média verdadeira de Usuárias fosse 3,2196 menor do que Controle, você teria uma chance de 60% de detectar a diferença. Se Usuárias fosse 4,9765 menor do que Controle, você teria uma chance de 90%.

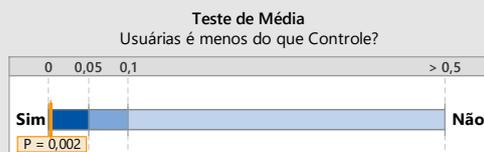
Que diferença você pode detectar com os tamanhos amostrais de 9 e 28?

| Diferença | Poder |
|-----------|-------|
| -3,2196 | 60% |
| -3,6819 | 70% |
| -4,2237 | 80% |
| -4,9765 | 90% |

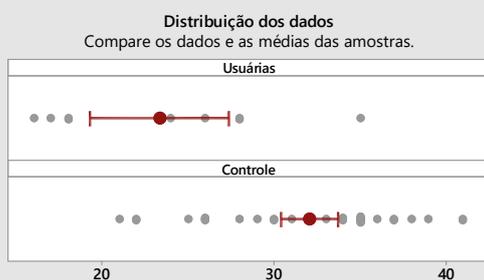
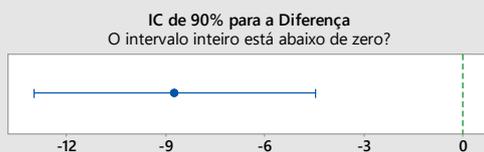
Diferença observada = -2,9444

O poder é uma função dos tamanhos amostrais e dos desvios padrão. Para detectar diferenças menores, considere aumentar os tamanhos amostrais.

Teste t para 2 amostras para a Média de idade de Usuárias e Controle Relatório Resumo



A média de Usuárias é significativamente menor do que a média de Controle ($p < 0,05$).



| Estatísticas | Amostras Individuais | |
|------------------|----------------------|------------------|
| | Usuárias | Controle |
| Tamanho amostral | 9 | 31 |
| Média | 23,333 | 32,065 |
| IC de 90% | (19,30; 27,36) | (30,402; 33,727) |
| Desvio padrão | 6,5 | 5,4524 |

| Estatísticas | Diferença Entre Amostras |
|--------------|--------------------------|
| | *Diferença |
| Diferença | -8,7312 |
| IC de 90% | (-13,001; -4,4611) |

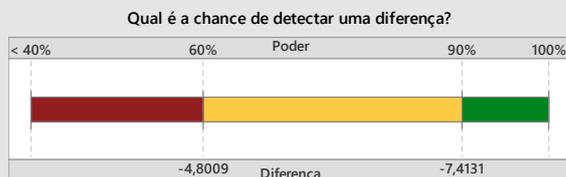
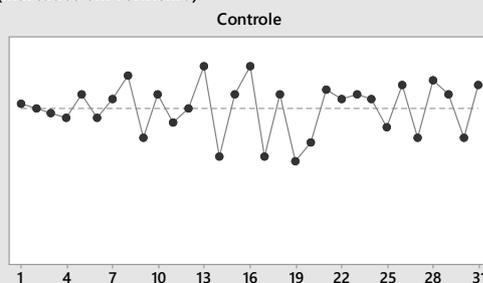
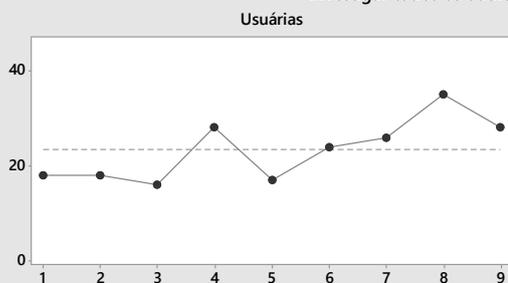
*Diferença = Usuárias - Controle

Comentários

- Teste: você pode concluir que a média de Usuárias é menor do que Controle no nível de significância de 0,05.
- IC: quantifica a incerteza associada à estimativa da diferença nas médias dos dados amostrais. Você pode ter 90% de confiança de que a verdadeira diferença está entre -13,001 e -4,4611, e ter 95% de confiança de que ela é menor que -4,4611.
- Distribuição dos Dados: compare a localização e as médias das amostras. Procure dados atípicos antes de interpretar os resultados do teste.

Teste t para 2 amostras para a Média de Usuárias e Controle Relatório de Diagnóstico

Dados na Ordem da Worksheet
Investigar todos os outliers (marcados em vermelho).



Para $\alpha = 0,05$ e tamanhos amostrais = 9; 31:
Se a média verdadeira de Usuárias fosse 4,8009 menor do que Controle, você teria uma chance de 60% de detectar a diferença. Se Usuárias fosse 7,4131 menor do que Controle, você teria uma chance de 90%.

Que diferença você pode detectar com os
tamanhos amostrais de 9 e 31?

| Diferença | Poder |
|-----------|-------|
| -4,8009 | 60% |
| -5,4887 | 70% |
| -6,2944 | 80% |
| -7,4131 | 90% |

Diferença observada = -8,7312

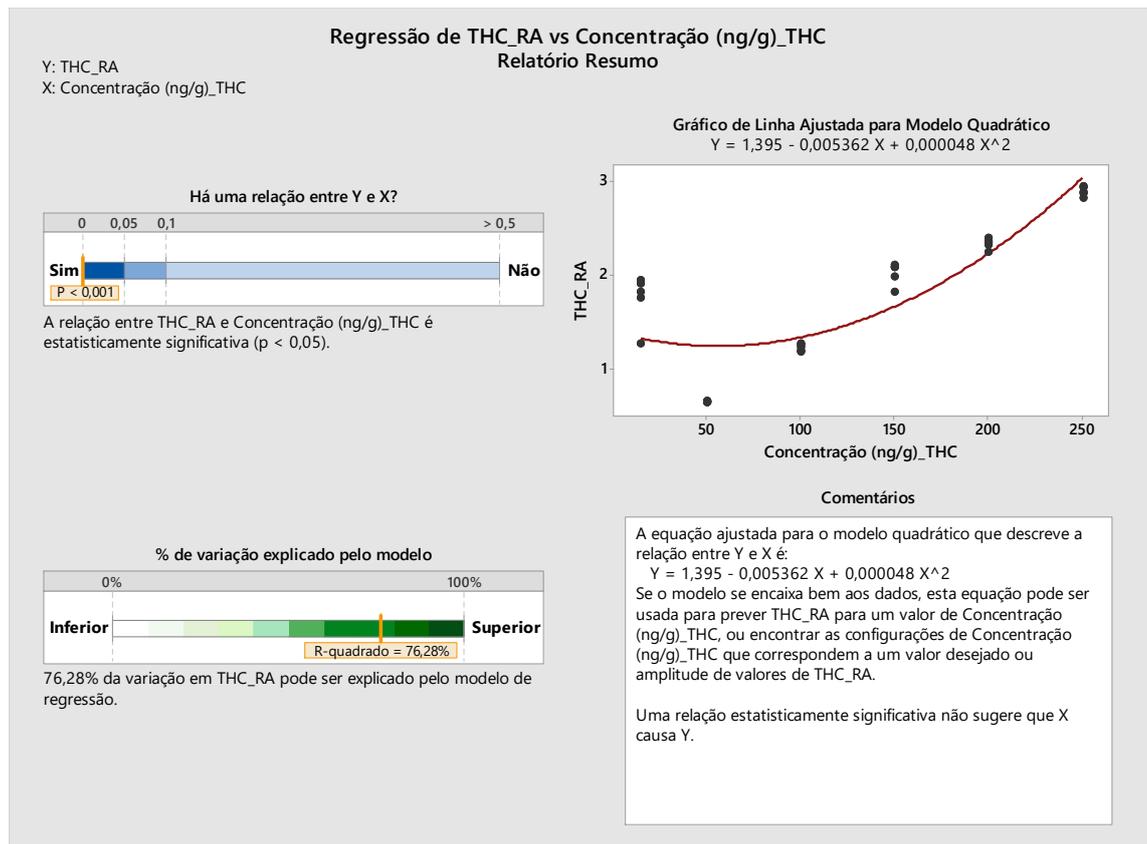
O poder é uma função dos tamanhos amostrais e dos desvios padrão. Para detectar diferenças menores, considere aumentar os tamanhos amostrais.

ANEXO 4. Dados estatísticos complementares para avaliação da

Linearidade

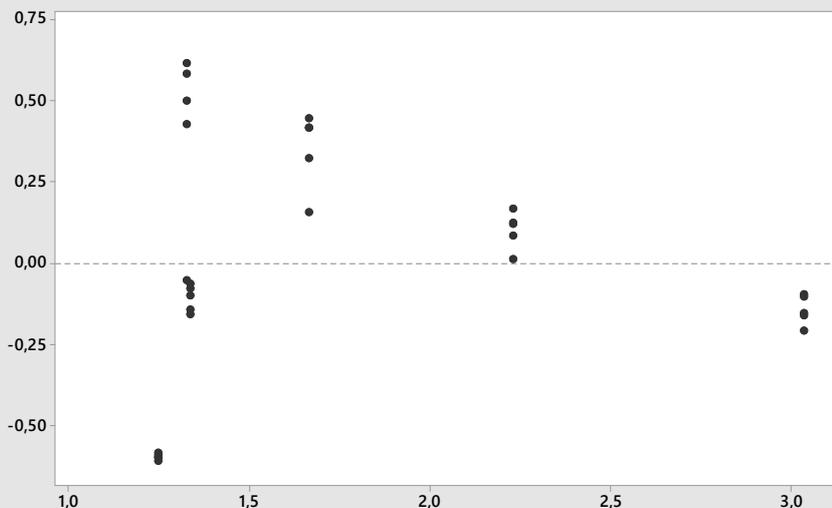
Análise de regressão linear para definição do modelo de calibração do analito

Delta-9- tetraidrocanabinol (THC)



Regressão de THC_RA vs Concentração (ng/g)_THC Relatório de Diagnóstico

Valores Ajustados vs Resíduos



Procure padrões, como uma curvatura forte ou agrupamentos, que possam indicar problemas com o modelo de regressão. O ideal seria que os pontos estivessem aleatoriamente em ambos os lados de zero. Identifique todos os resíduos grandes que possam ter uma forte influência na linha ajustada.

Procure por esses padrões:

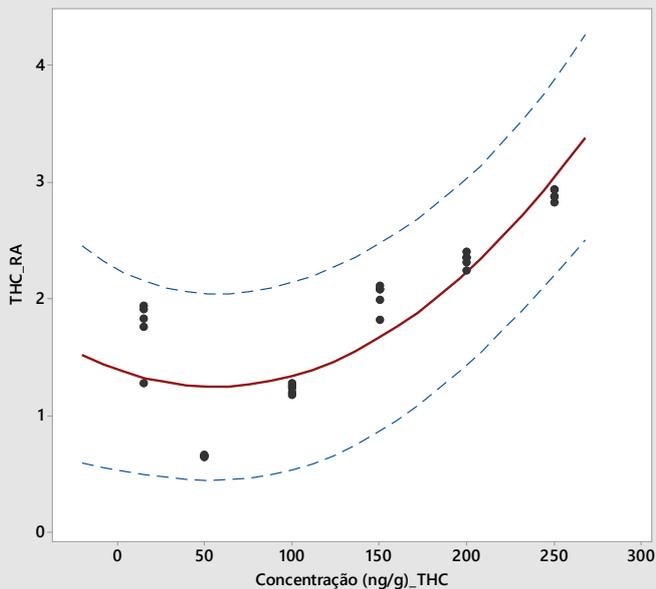


Regressão de THC_RA vs Concentração (ng/g)_THC Relatório de Predição

Y: THC_RA
X: Concentração (ng/g)_THC

Gráfico de Predição

A linha ajustada vermelha mostra o Y predito para qualquer valor de X.
As linhas tracejadas azuis mostram o intervalo de predição de 95%.



| X | Y Predito | IP de 95% |
|-----|-----------|-------------------|
| -20 | 1,5210 | (0,59245; 2,4495) |
| -8 | 1,4406 | (0,55523; 2,3260) |
| 4 | 1,3740 | (0,52160; 2,2264) |
| 16 | 1,3211 | (0,49258; 2,1496) |
| 28 | 1,2819 | (0,46946; 2,0944) |
| 40 | 1,2565 | (0,45368; 2,0593) |
| 52 | 1,2448 | (0,44671; 2,0428) |
| 64 | 1,2468 | (0,44995; 2,0436) |
| 76 | 1,2625 | (0,46468; 2,0604) |
| 88 | 1,2920 | (0,49197; 2,0921) |
| 100 | 1,3352 | (0,53270; 2,1378) |
| 112 | 1,3922 | (0,58751; 2,1969) |
| 124 | 1,4629 | (0,65685; 2,2689) |
| 136 | 1,5473 | (0,74095; 2,3536) |
| 148 | 1,6454 | (0,83983; 2,4510) |
| 160 | 1,7573 | (0,95331; 2,5612) |
| 172 | 1,8829 | (1,0810; 2,6847) |
| 184 | 2,0222 | (1,2223; 2,8221) |
| 196 | 2,1753 | (1,3764; 2,9741) |
| 208 | 2,3421 | (1,5423; 3,1418) |
| 220 | 2,5226 | (1,7188; 3,3264) |
| 232 | 2,7168 | (1,9044; 3,5293) |
| 244 | 2,9248 | (2,0977; 3,7519) |
| 256 | 3,1465 | (2,2974; 3,9957) |
| 268 | 3,3820 | (2,5020; 4,2620) |

Para obter valores preditos adicionais, clique com o botão direito no gráfico e use a ferramenta Crosshairs.

Regressão de THC_RA vs Concentração (ng/g)_THC Cartão de Relatório

| Verificar | Status | Descrição |
|---------------------|---|--|
| Quantidade de Dados |  | O tamanho de sua amostra (n = 30) não é grande o suficiente para fornecer uma estimativa precisa da força da relação. As medições da força da relação, como um R-Quadrado e R-Quadrado (ajustado), podem variar muito. Para obter uma estimativa mais precisa, devem ser usadas grandes quantidades de amostras (normalmente 40 ou mais). |
| Dados Atípicos |  | Não há pontos de dados atípicos. Os pontos de dados atípicos podem ter uma forte influência nos resultados. |
| Normalidade |  | Como você tem no mínimo 15 pontos de dados, a normalidade não é um problema. Se o número de pontos de dados for pequeno e os resíduos não forem normalmente distribuídos, o valor-p usado para determinar se há uma relação significativa entre X e Y pode não ser exato. |
| Ajuste do Modelo |  | Você deve avaliar os dados e o ajuste do modelo em termos de suas metas. Veja o gráfico de linha ajustada para ter certeza de que: <ul style="list-style-type: none"> • A amostra cobre adequadamente a amplitude de valores X. • O modelo se ajusta bem a todas as curvaturas dos dados (evita o superajuste). • A reta se ajusta bem nas áreas de interesse especial. |

Teste de Intervalo de Confiança para duas variâncias referente ao analito **Delta-9- tetraidrocanabinol (THC)**

Estatísticas Descritivas

| Amostra | N | DesvPad | Variância | IC de 95% para σ |
|-----------|---|---------|-----------|----------------------------|
| Amostra 1 | 5 | 0,009 | 0,000074 | (0,005; 0,025) |
| Amostra 2 | 5 | 0,271 | 0,073314 | (0,162; 0,778) |

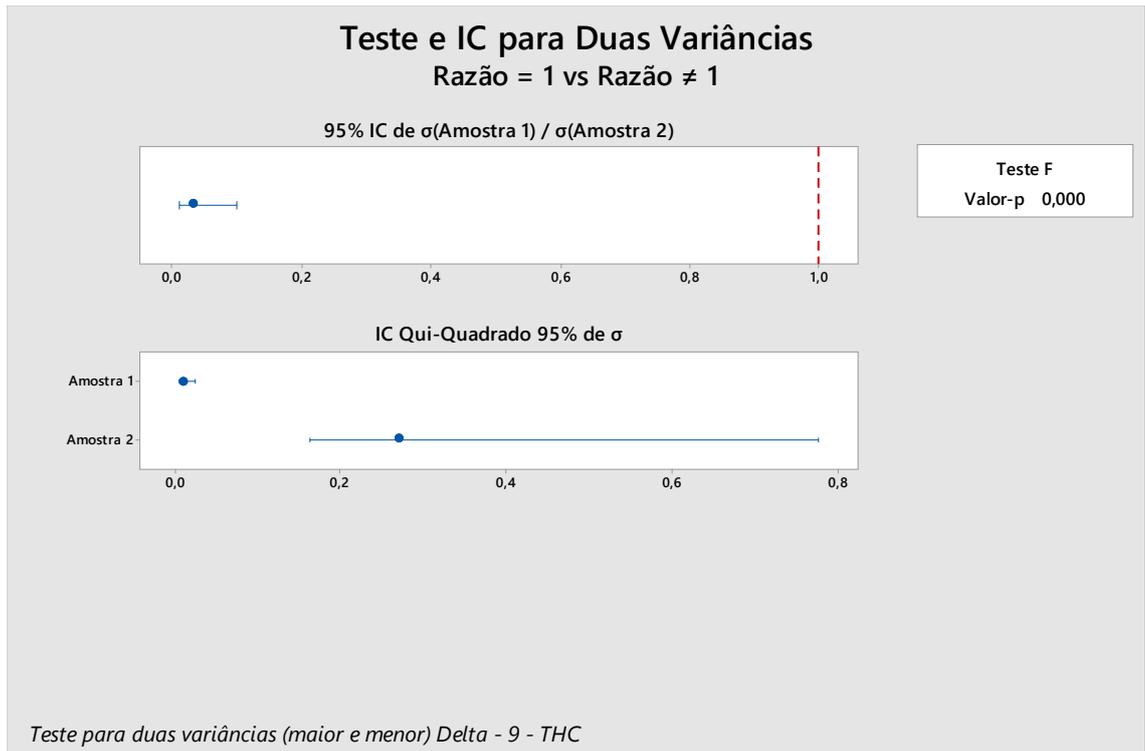
Teste

Hipótese nula $H_0: \sigma_1 / \sigma_2 = 1$

Hipótese alternativa $H_1: \sigma_1 / \sigma_2 \neq 1$

Nível de significância $\alpha = 0,05$

| Método | Estatística de teste | | | |
|--------|----------------------|-----|---------|-------|
| | GL1 | GL2 | Valor-p | |
| F | 0,00 | 4 | 4 | 0,000 |



Aplicação de pesos matemáticos para análise de regressão do analito THC:

Método

Pesos 1/x

Análise de Variância

| Fonte | GL | SQ (Aj.) | QM (Aj.) | Valor F | Valor-P |
|-------------------------|----|----------|----------|---------|---------|
| Regressão | 1 | 0,02048 | 0,020476 | 3,69 | 0,065 |
| Concentração (ng/g)_THC | 1 | 0,02048 | 0,020476 | 3,69 | 0,065 |
| Erro | 28 | 0,15553 | 0,005555 | | |
| Falta de ajuste | 4 | 0,13544 | 0,033859 | 40,44 | 0,000 |
| Erro puro | 24 | 0,02010 | 0,000837 | * | * |
| Total | 29 | 0,17601 | | | |

Sumário do Modelo

| S | R2 | R2(aj) | R2(pred) |
|-----------|--------|--------|----------|
| 0,0745297 | 11,63% | 8,48% | 0,00% |

Coeficientes

| Termo | Coef | EP de Coef | Valor-T | Valor-P | VIF |
|-------------------------|---------|------------|---------|---------|------|
| Constante | 1,418 | 0,130 | 10,87 | 0,000 | |
| Concentração (ng/g)_THC | 0,00304 | 0,00158 | 1,92 | 0,065 | 1,00 |

Equação de Regressão

$$\text{THC_RA} = 1,418 + 0,00304 \text{ Concentração (ng/g)_THC}$$

Método

Pesos 1/x²

Análise de Variância

| Fonte | GL | SQ (Aj.) | QM (Aj.) | Valor F | Valor-P |
|-------------------------|----|----------|----------|---------|---------|
| Regressão | 1 | 0,000084 | 0,000084 | 0,64 | 0,431 |
| Concentração (ng/g)_THC | 1 | 0,000084 | 0,000084 | 0,64 | 0,431 |
| Erro | 28 | 0,003702 | 0,000132 | | |
| Falta de ajuste | 4 | 0,002395 | 0,000599 | 10,99 | 0,000 |
| Erro puro | 24 | 0,001307 | 0,000054 | * | * |
| Total | 29 | 0,003787 | | | |

Sumário do Modelo

| S | R2 | R2(aj) | R2(pred) |
|-----------|-------|--------|----------|
| 0,0114987 | 2,23% | 0,00% | 0,00% |

Coeficientes

| Termo | Coef | EP de Coef | Valor-T | Valor-P | VIF |
|-------------------------|----------|------------|---------|---------|------|
| Constante | 1,6980 | 0,0951 | 17,86 | 0,000 | |
| Concentração (ng/g)_THC | -0,00220 | 0,00275 | -0,80 | 0,431 | 1,00 |

Equação de Regressão

$$\text{THC_RA} = 1,6980 - 0,00220 \text{ Concentração (ng/g)_THC}$$

Ajustados e Diagnósticos para Observações Atípicas

| Obs. | THC_RA | Ajuste | Resíd | Resíd Pad |
|------|--------|--------|-------|-----------|
|------|--------|--------|-------|-----------|

5 1,270 1,665 -0,395 -2,54 R

Método

Pesos 1/raizX

Análise de Variância

| Fonte | GL | SQ (Aj.) | QM (Aj.) | Valor F | Valor-P |
|-------------------------|----|----------|----------|---------|---------|
| Regressão | 1 | 0,59926 | 0,599262 | 16,88 | 0,000 |
| Concentração (ng/g)_THC | 1 | 0,59926 | 0,599262 | 16,88 | 0,000 |
| Erro | 28 | 0,99387 | 0,035495 | | |
| Falta de ajuste | 4 | 0,91141 | 0,227851 | 66,31 | 0,000 |
| Erro puro | 24 | 0,08247 | 0,003436 | * | * |
| Total | 29 | 1,59313 | | | |

Sumário do Modelo

| S | R2 | R2(aj) | R2(pred) |
|----------|--------|--------|----------|
| 0,188402 | 37,62% | 35,39% | 25,72% |

Coeficientes

| Termo | Coef | EP de Coef | Valor-T | Valor-P | VIF |
|-------------------------|---------|------------|---------|---------|------|
| Constante | 1,183 | 0,149 | 7,91 | 0,000 | |
| Concentração (ng/g)_THC | 0,00519 | 0,00126 | 4,11 | 0,000 | 1,00 |

Equação de Regressão

THC_RA = 1,183 + 0,00519 Concentração (ng/g)_THC

Método

Pesos 1/y

Análise de Variância

| Fonte | GL | SQ (Aj.) | QM (Aj.) | Valor F | Valor-P |
|-------------------------|----|----------|----------|---------|---------|
| Regressão | 1 | 7,1948 | 7,19479 | 45,75 | 0,000 |
| Concentração (ng/g)_THC | 1 | 7,1948 | 7,19479 | 45,75 | 0,000 |
| Erro | 28 | 4,4036 | 0,15727 | | |
| Falta de ajuste | 4 | 4,1539 | 1,03847 | 99,78 | 0,000 |

| | | | | | |
|-----------|----|---------|---------|---|---|
| Erro puro | 24 | 0,2498 | 0,01041 | * | * |
| Total | 29 | 11,5984 | | | |

Sumário do Modelo

| S | R2 | R2(aj) | R2(pred) |
|----------|--------|--------|----------|
| 0,396577 | 62,03% | 60,68% | 55,80% |

Coeficientes

| Termo | Coef | EP de Coef | Valor-T | Valor-P | VIF |
|-------------------------|---------|------------|---------|---------|------|
| Constante | 0,614 | 0,147 | 4,18 | 0,000 | |
| Concentração (ng/g)_THC | 0,00819 | 0,00121 | 6,76 | 0,000 | 1,00 |

Equação de Regressão

$$\text{THC_RA} = 0,614 + 0,00819 \text{ Concentração (ng/g)_THC}$$

Ajustados e Diagnósticos para Observações Atípicas

| Obs. | THC_RA | Ajuste | Resíd | Resíd | Pad |
|------|--------|--------|-------|-------|-----|
| 1 | 1,906 | 0,737 | 1,168 | 2,20 | R |
| 2 | 1,936 | 0,737 | 1,199 | 2,24 | R |
| 4 | 1,821 | 0,737 | 1,084 | 2,09 | R |

Método

Pesos 1/y2

Análise de Variância

| Fonte | GL | SQ (Aj.) | QM (Aj.) | Valor F | Valor-P |
|-------------------------|----|----------|----------|---------|---------|
| Regressão | 1 | 4,4741 | 4,47406 | 41,48 | 0,000 |
| Concentração (ng/g)_THC | 1 | 4,4741 | 4,47406 | 41,48 | 0,000 |
| Erro | 28 | 3,0203 | 0,10787 | | |
| Falta de ajuste | 4 | 2,8550 | 0,71375 | 103,63 | 0,000 |
| Erro puro | 24 | 0,1653 | 0,00689 | * | * |
| Total | 29 | 7,4944 | | | |

Sumário do Modelo

| S | R2 | R2(aj) | R2(pred) |
|----------|--------|--------|----------|
| 0,328433 | 59,70% | 58,26% | 54,51% |

Coeficientes

| Termo | Coef | EP de Coef | Valor-T | Valor-P | VIF |
|-------------------------|---------|------------|---------|---------|------|
| Constante | 0,397 | 0,127 | 3,12 | 0,004 | |
| Concentração (ng/g)_THC | 0,00895 | 0,00139 | 6,44 | 0,000 | 1,00 |

Equação de Regressão

$$\text{THC_RA} = 0,397 + 0,00895 \text{ Concentração (ng/g)_THC}$$

Ajustados e Diagnósticos para Observações Atípicas

| Obs. | THC_RA | Ajuste | Resíd | Resid | Pad |
|------|--------|--------|-------|-------|-----|
| 1 | 1,906 | 0,531 | 1,375 | 2,23 | R |
| 2 | 1,936 | 0,531 | 1,405 | 2,24 | R |
| 3 | 1,750 | 0,531 | 1,218 | 2,16 | R |
| 4 | 1,821 | 0,531 | 1,290 | 2,19 | R |

Método

Pesos 1/raizY

Análise de Variância

| Fonte | GL | SQ (Aj.) | QM (Aj.) | Valor F | Valor-P |
|-------------------------|----|----------|----------|---------|---------|
| Regressão | 1 | 8,6955 | 8,69553 | 47,41 | 0,000 |
| Concentração (ng/g)_THC | 1 | 8,6955 | 8,69553 | 47,41 | 0,000 |
| Erro | 28 | 5,1353 | 0,18340 | | |
| Falta de ajuste | 4 | 4,8283 | 1,20707 | 94,38 | 0,000 |
| Erro puro | 24 | 0,3070 | 0,01279 | * | * |
| Total | 29 | 13,8308 | | | |

Sumário do Modelo

| S | R2 | R2(aj) | R2(pred) |
|----------|--------|--------|----------|
| 0,428254 | 62,87% | 61,54% | 56,40% |

Coeficientes

| Termo | Coef | EP de Coef | Valor-T | Valor-P | VIF |
|-------------------------|---------|------------|---------|---------|------|
| Constante | 0,751 | 0,153 | 4,91 | 0,000 | |
| Concentração (ng/g)_THC | 0,00769 | 0,00112 | 6,89 | 0,000 | 1,00 |

Equação de Regressão

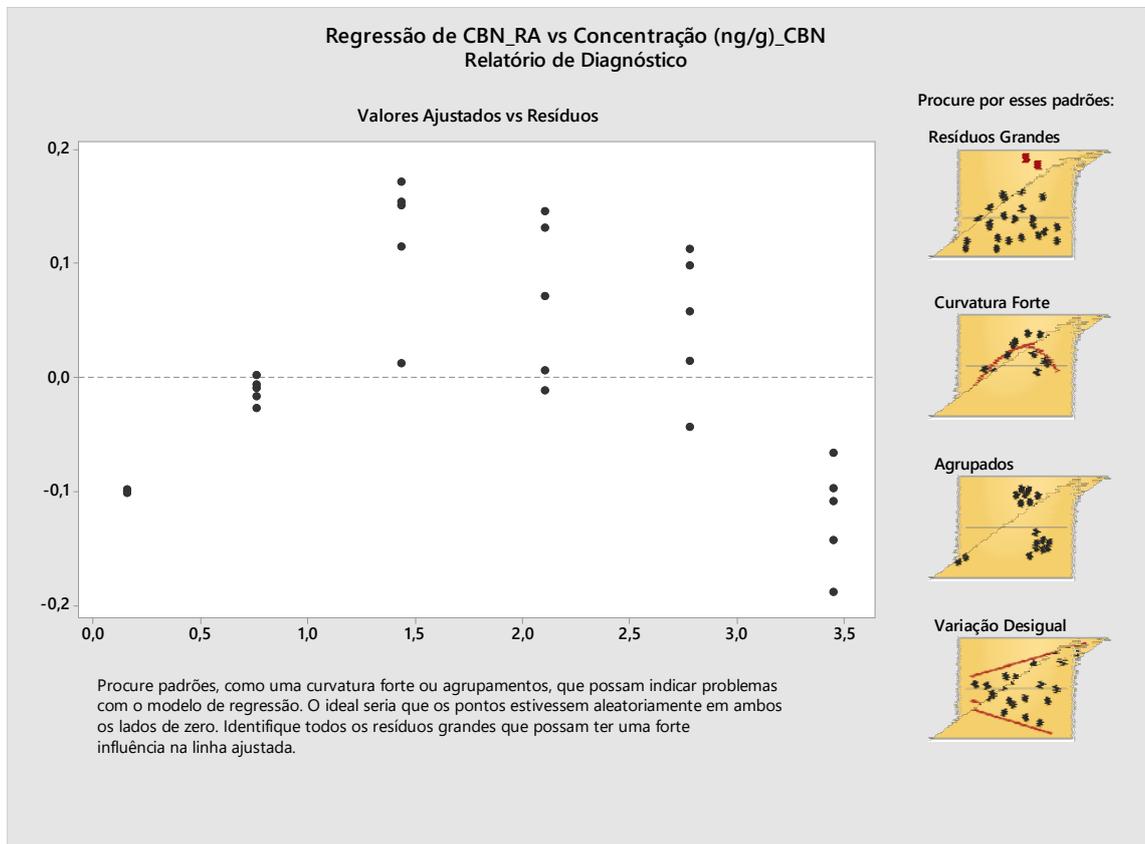
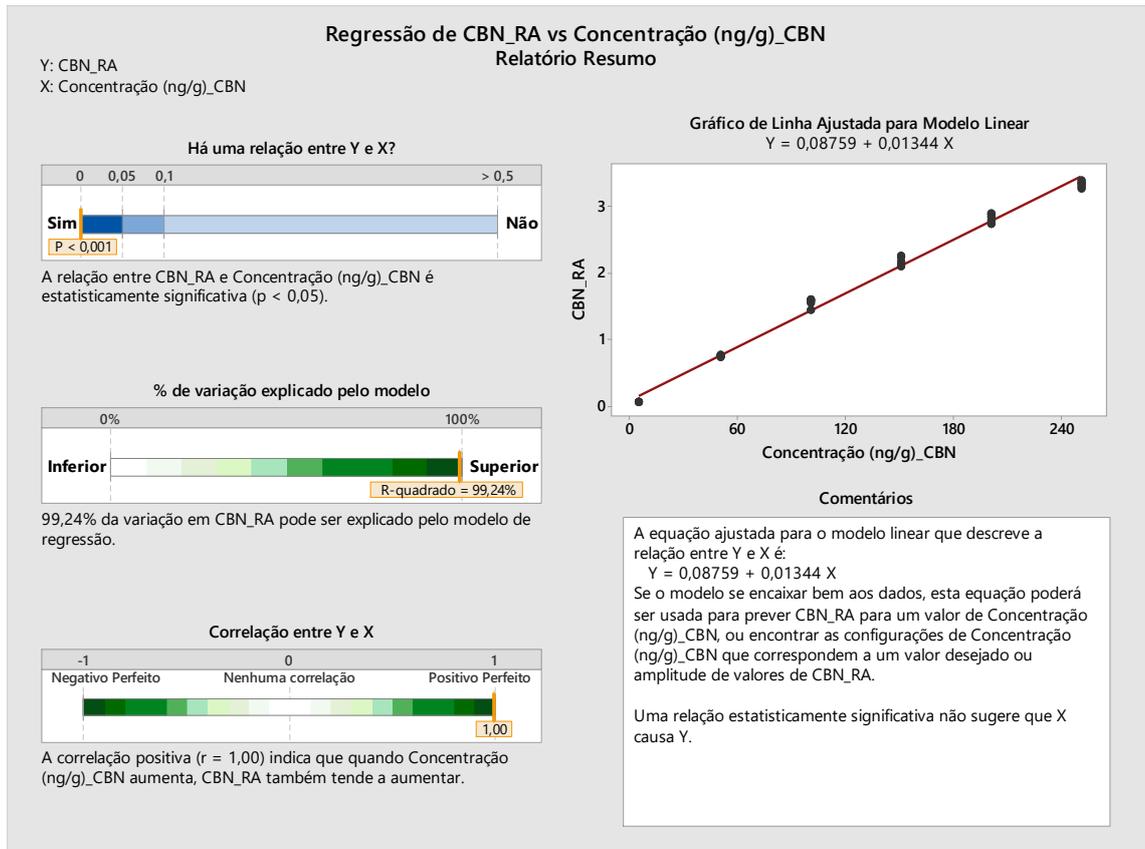
$$\text{THC_RA} = 0,751 + 0,00769 \text{ Concentração (ng/g)_THC}$$

Ajustados e Diagnósticos para Observações Atípicas

| Obs. | THC_RA | Ajuste | Resíd | Resíd | Pad |
|------|--------|--------|-------|-------|-----|
| 1 | 1,906 | 0,866 | 1,040 | 2,15 | R |
| 2 | 1,936 | 0,866 | 1,070 | 2,20 | R |
| 4 | 1,821 | 0,866 | 0,955 | 2,00 | R |

Análise de regressão linear para definição do modelo de calibração do analito

Canabinoil (CBN)

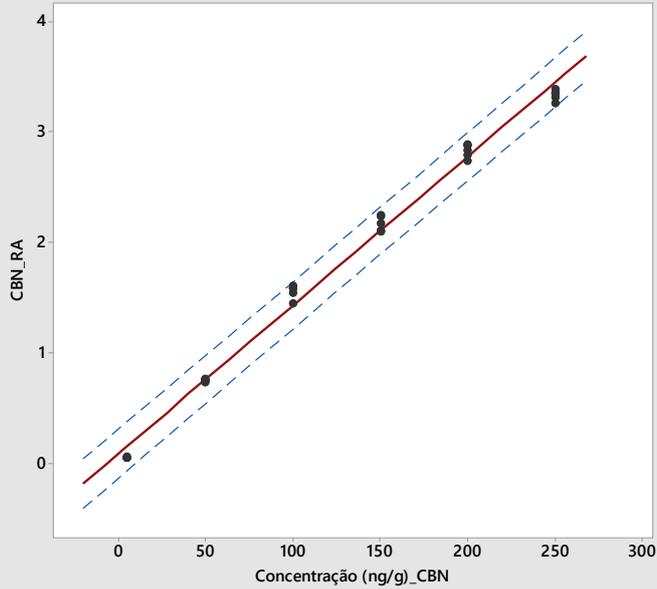


Regressão de CBN_RA vs Concentração (ng/g)_CBN Relatório de Predição

Y: CBN_RA
X: Concentração (ng/g)_CBN

Gráfico de Predição

A linha ajustada vermelha mostra o Y predito para qualquer valor de X.
As linhas tracejadas azuis mostram o intervalo de predição de 95%.



| X | Y Predito | IP de 95% |
|-----|-----------|----------------------|
| -20 | -0,18116 | (-0,40440; 0,042088) |
| -8 | -0,01991 | (-0,24159; 0,20178) |
| 4 | 0,14134 | (-0,07891; 0,36159) |
| 16 | 0,30258 | (0,083645; 0,52152) |
| 28 | 0,46383 | (0,24607; 0,68159) |
| 40 | 0,62508 | (0,40837; 0,84179) |
| 52 | 0,78633 | (0,57053; 1,0021) |
| 64 | 0,94757 | (0,73256; 1,1626) |
| 76 | 1,1088 | (0,89445; 1,3232) |
| 88 | 1,2701 | (1,0562; 1,4839) |
| 100 | 1,4313 | (1,2178; 1,6448) |
| 112 | 1,5926 | (1,3793; 1,8058) |
| 124 | 1,7538 | (1,5406; 1,9670) |
| 136 | 1,9151 | (1,7018; 2,1283) |
| 148 | 2,0763 | (1,8629; 2,2897) |
| 160 | 2,2376 | (2,0238; 2,4513) |
| 172 | 2,3988 | (2,1846; 2,6130) |
| 184 | 2,5600 | (2,3452; 2,7748) |
| 196 | 2,7213 | (2,5058; 2,9368) |
| 208 | 2,8825 | (2,6661; 3,0990) |
| 220 | 3,0438 | (2,8264; 3,2612) |
| 232 | 3,2050 | (2,9865; 3,4236) |
| 244 | 3,3663 | (3,1464; 3,5861) |
| 256 | 3,5275 | (3,3063; 3,7488) |
| 268 | 3,6888 | (3,4660; 3,9115) |

Para obter valores preditos adicionais, clique com o botão direito no gráfico e use a ferramenta Crosshairs.

Regressão de CBN_RA vs Concentração (ng/g)_CBN Cartão de Relatório

| Verificar | Status | Descrição |
|---------------------|--------|--|
| Quantidade de Dados | | O tamanho de sua amostra (n = 30) não é grande o suficiente para fornecer uma estimativa precisa da força da relação. As medições da força da relação, como um R-Quadrado e R-Quadrado (ajustado), podem variar muito. Para obter uma estimativa mais precisa, devem ser usadas grandes quantidades de amostras (normalmente 40 ou mais). |
| Dados Atípicos | | Não há pontos de dados atípicos. Os pontos de dados atípicos podem ter uma forte influência nos resultados. |
| Normalidade | | Como você tem no mínimo 15 pontos de dados, a normalidade não é um problema. Se o número de pontos de dados for pequeno e os resíduos não forem normalmente distribuídos, o valor-p usado para determinar se há uma relação significativa entre X e Y pode não ser exato. |
| Ajuste do Modelo | | O Relatório de Seleção de Modelo exibe um modelo alternativo que pode ser uma escolha melhor. Você deve avaliar os dados e o ajuste do modelo em termos de suas metas. Veja os gráficos de linha ajustada para ter certeza de que: <ul style="list-style-type: none"> A amostra cobre adequadamente a amplitude de valores X. O modelo se ajusta bem a todas as curvaturas dos dados (evita o superajuste). A reta se ajusta bem nas áreas de interesse especial. |

Análise de regressão linear para definição do modelo de calibração do analito

11-hidroxi-delta-9-tetraidrocanabinol (11-OH-THC)

Regressão de 11-OH-THC_RA vs Concentração (ng/g)_11-OH-THC Relatório Resumo

Y: 11-OH-THC_RA
X: Concentração (ng/g)_11-OH-THC

Há uma relação entre Y e X?



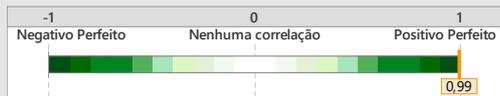
A relação entre 11-OH-THC_RA e Concentração (ng/g)_11-OH-THC é estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

% de variação explicado pelo modelo



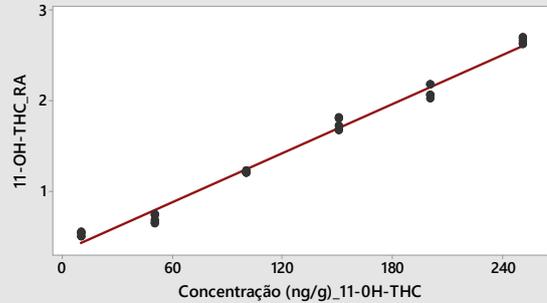
98,88% da variação em 11-OH-THC_RA pode ser explicado pelo modelo de regressão.

Correlação entre Y e X



A correlação positiva ($r = 0,99$) indica que quando Concentração (ng/g)_11-OH-THC aumenta, 11-OH-THC_RA também tende a aumentar.

Gráfico de Linha Ajustada para Modelo Linear
 $Y = 0,3452 + 0,009038 X$



Comentários

A equação ajustada para o modelo linear que descreve a relação entre Y e X é:

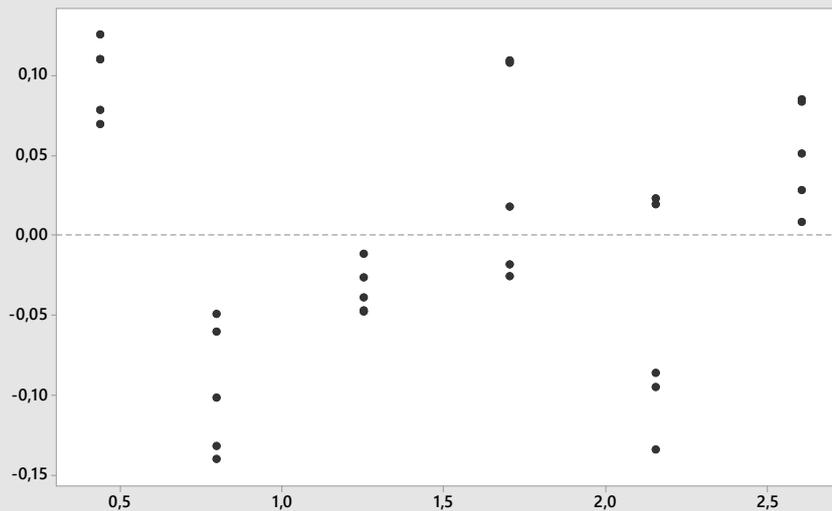
$$Y = 0,3452 + 0,009038 X$$

Se o modelo se encaixar bem aos dados, esta equação poderá ser usada para prever 11-OH-THC_RA para um valor de Concentração (ng/g)_11-OH-THC, ou encontrar as configurações de Concentração (ng/g)_11-OH-THC que correspondem a um valor desejado ou amplitude de valores de 11-OH-THC_RA.

Uma relação estatisticamente significativa não sugere que X causa Y.

Regressão de 11-OH-THC_RA vs Concentração (ng/g)_11-OH-THC Relatório de Diagnóstico

Valores Ajustados vs Resíduos

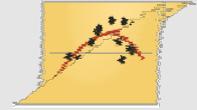


Procure por esses padrões:

Resíduos Grandes



Curvatura Forte



Agrupados



Variação Desigual



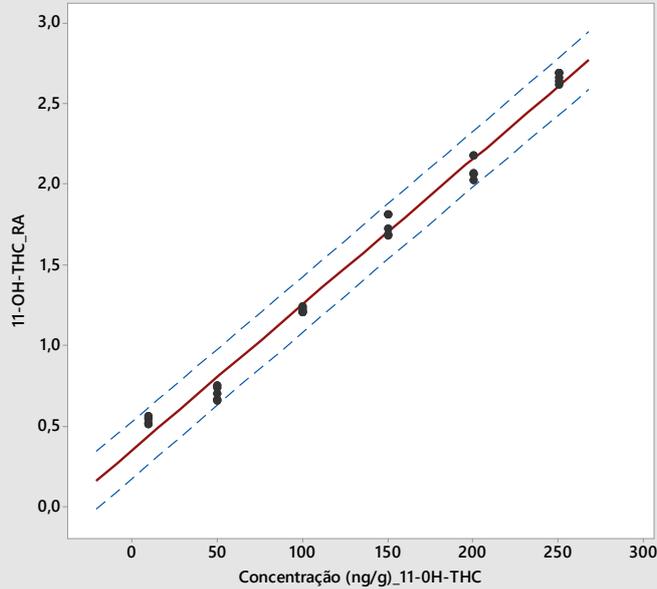
Procure padrões, como uma curvatura forte ou agrupamentos, que possam indicar problemas com o modelo de regressão. O ideal seria que os pontos estivessem aleatoriamente em ambos os lados de zero. Identifique todos os resíduos grandes que possam ter uma forte influência na linha ajustada.

Regressão de 11-OH-THC_RA vs Concentração (ng/g)_11-OH-THC Relatório de Predição

Y: 11-OH-THC_RA
X: Concentração (ng/g)_11-OH-THC

Gráfico de Predição

A linha ajustada vermelha mostra o Y predito para qualquer valor de X.
As linhas tracejadas azuis mostram o intervalo de predição de 95%.



| X | Y Predito | IP de 95% |
|-----|-----------|---------------------|
| -20 | 0,16444 | (-0,01570; 0,34458) |
| -8 | 0,27289 | (0,094052; 0,45173) |
| 4 | 0,38135 | (0,20370; 0,55899) |
| 16 | 0,48980 | (0,31324; 0,66635) |
| 28 | 0,59825 | (0,42268; 0,77382) |
| 40 | 0,70670 | (0,53201; 0,88140) |
| 52 | 0,81516 | (0,64123; 0,98908) |
| 64 | 0,92361 | (0,75034; 1,0969) |
| 76 | 1,0321 | (0,85933; 1,2048) |
| 88 | 1,1405 | (0,96822; 1,3128) |
| 100 | 1,2490 | (1,0770; 1,4210) |
| 112 | 1,3574 | (1,1856; 1,5292) |
| 124 | 1,4659 | (1,2942; 1,6376) |
| 136 | 1,5743 | (1,4026; 1,7461) |
| 148 | 1,6828 | (1,5109; 1,8547) |
| 160 | 1,7912 | (1,6191; 1,9634) |
| 172 | 1,8997 | (1,7272; 2,0722) |
| 184 | 2,0081 | (1,8351; 2,1812) |
| 196 | 2,1166 | (1,9430; 2,2902) |
| 208 | 2,2250 | (2,0507; 2,3994) |
| 220 | 2,3335 | (2,1583; 2,5087) |
| 232 | 2,4419 | (2,2658; 2,6181) |
| 244 | 2,5504 | (2,3733; 2,7275) |
| 256 | 2,6589 | (2,4806; 2,8372) |
| 268 | 2,7673 | (2,5878; 2,9469) |

Para obter valores preditos adicionais, clique com o botão direito no gráfico e use a ferramenta Crosshairs.

Regressão de 11-OH-THC_RA vs Concentração (ng/g)_11-OH-THC Cartão de Relatório

| Verificar | Status | Descrição |
|---------------------|--------|--|
| Quantidade de Dados | | O tamanho de sua amostra (n = 30) não é grande o suficiente para fornecer uma estimativa precisa da força da relação. As medições da força da relação, como um R-Quadrado e R-Quadrado (ajustado), podem variar muito. Para obter uma estimativa mais precisa, devem ser usadas grandes quantidades de amostras (normalmente 40 ou mais). |
| Dados Atípicos | | Não há pontos de dados atípicos. Os pontos de dados atípicos podem ter uma forte influência nos resultados. |
| Normalidade | | Como você tem no mínimo 15 pontos de dados, a normalidade não é um problema. Se o número de pontos de dados for pequeno e os resíduos não forem normalmente distribuídos, o valor-p usado para determinar se há uma relação significativa entre X e Y pode não ser exato. |
| Ajuste do Modelo | | O Relatório de Seleção de Modelo exibe um modelo alternativo que pode ser uma escolha melhor. Você deve avaliar os dados e o ajuste do modelo em termos de suas metas. Veja os gráficos de linha ajustada para ter certeza de que: <ul style="list-style-type: none"> A amostra cobre adequadamente a amplitude de valores X. O modelo se ajusta bem a todas as curvaturas dos dados (evita o superajuste). A reta se ajusta bem nas áreas de interesse especial. |

Teste de Intervalo de Confiança para duas variâncias referente ao analito

11-hidroxi-delta-9-tetraidrocanabinol (11-OH-THC)

Teste e IC para Duas Variâncias

Método

σ_1^2 : variância de Amostra 1

σ_2^2 : variância de Amostra 2

Razão: σ_1^2/σ_2^2

O método F foi usado. Esse método é preciso apenas para dados normais.

Estatísticas Descritivas

| Amostra | N | DesvPad | Variância | IC de 95% para σ |
|-----------|---|---------|-----------|----------------------------|
| Amostra 1 | 5 | 0,015 | 0,000235 | (0,009; 0,044) |
| Amostra 2 | 5 | 0,072 | 0,005172 | (0,043; 0,207) |

Razão de desvios padrão

| Razão Estimada | 95% IC da Razão usando F |
|-------------------|--------------------------------|
| 0,212941 | (0,069; 0,660) |

Teste

Hipótese nula $H_0: \sigma_1 / \sigma_2 = 1$

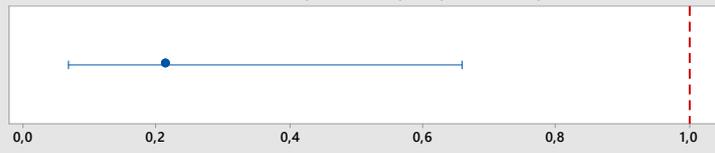
Hipótese alternativa $H_1: \sigma_1 / \sigma_2 \neq 1$

Nível de significância $\alpha = 0,05$

| Método | Estatística de teste | GL1 | GL2 | Valor-p |
|--------|-------------------------|-----|-----|---------|
| F | 0,05 | 4 | 4 | 0,011 |

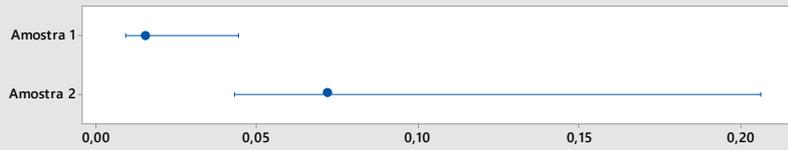
Teste e IC para Duas Variâncias Razão = 1 vs Razão \neq 1

95% IC de $\sigma(\text{Amostra 1}) / \sigma(\text{Amostra 2})$



Teste F
Valor-p 0,011

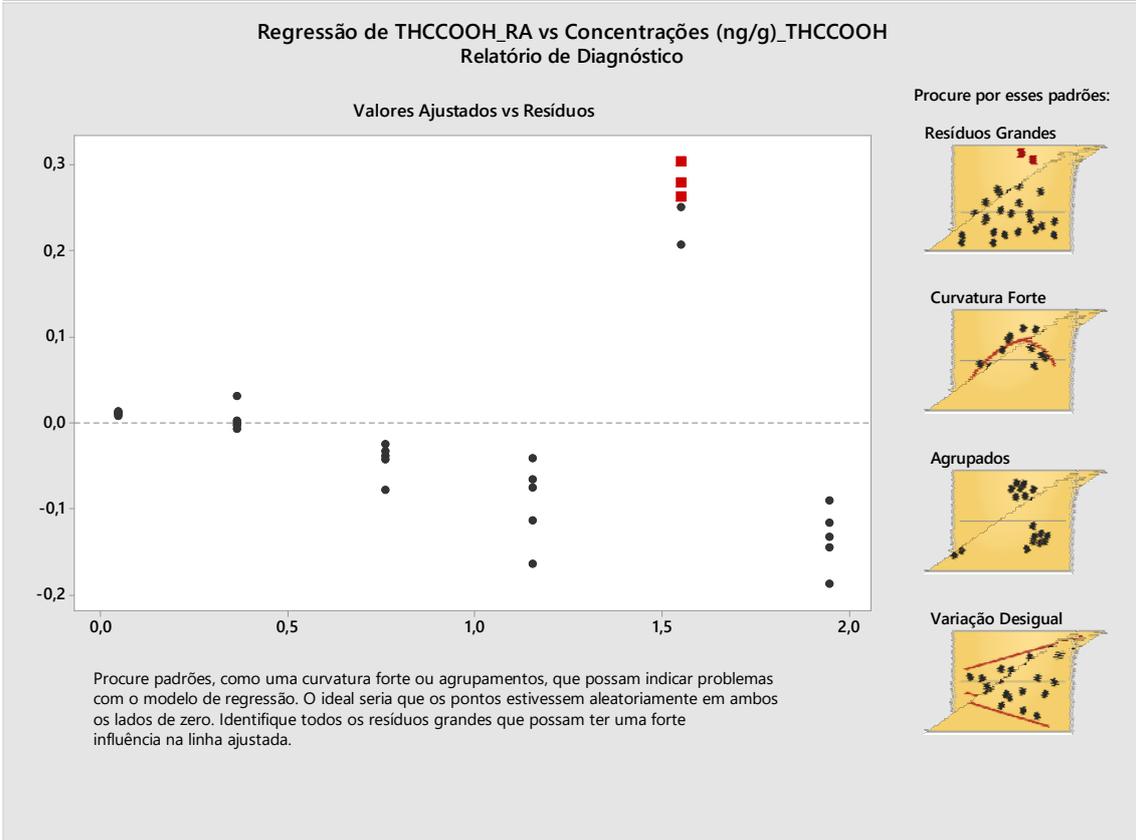
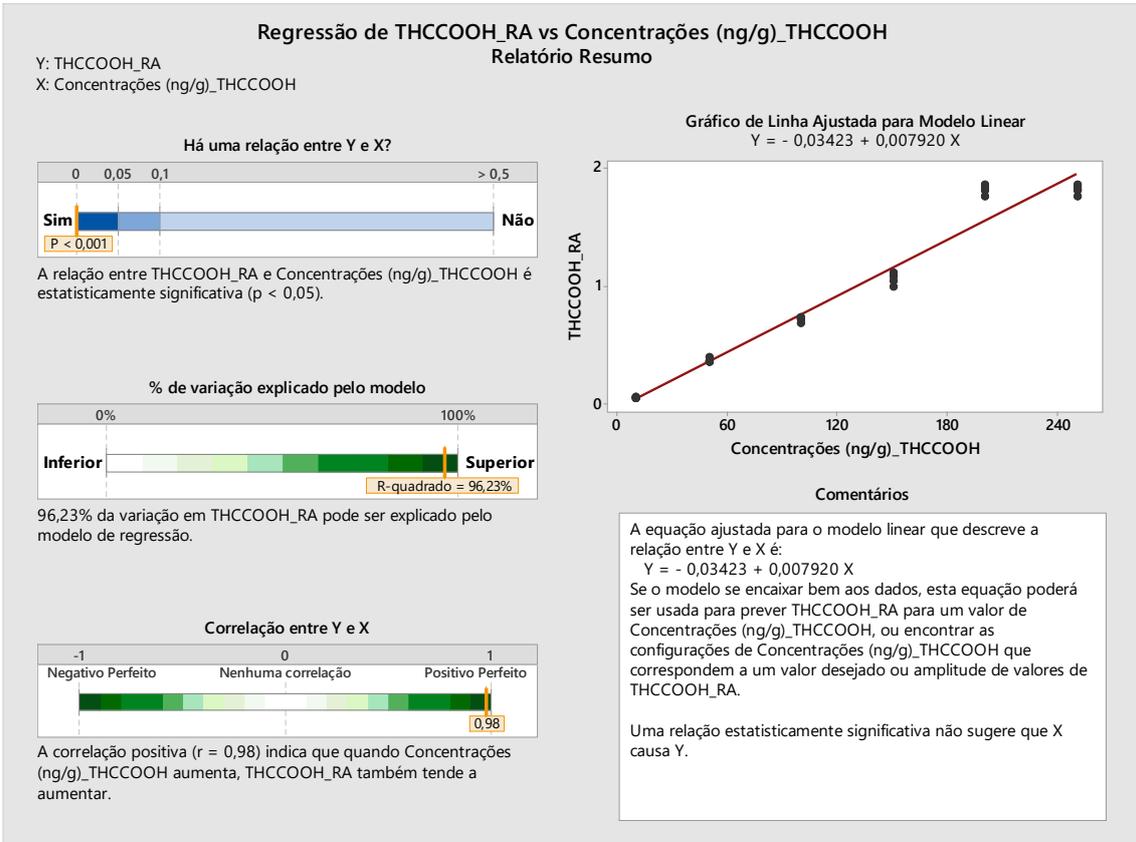
IC Qui-Quadrado 95% de σ



Teste para duas variâncias (maior e menor) 11-OH-THC

Análise de regressão linear para definição do modelo de calibração do analito

11-nor-9-carboxi- tetrahydrocannabinol (THCCOOH)



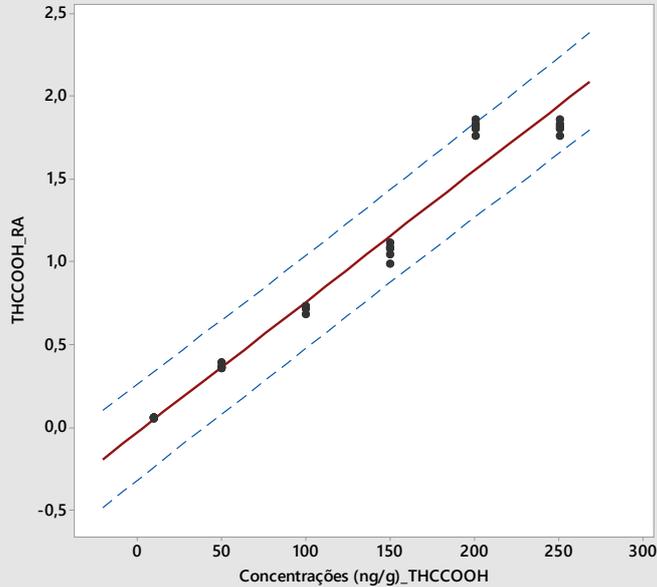
Regressão de THCCOOH_RA vs Concentrações (ng/g)_THCCOOH Relatório de Predição

Y: THCCOOH_RA

X: Concentrações (ng/g)_THCCOOH

Gráfico de Predição

A linha ajustada vermelha mostra o Y predito para qualquer valor de X.
As linhas tracejadas azuis mostram o intervalo de predição de 95%.



| X | Y Predito | IP de 95% |
|-----|-----------|---------------------|
| -20 | -0,19262 | (-0,48664; 0,10140) |
| -8 | -0,09759 | (-0,38949; 0,19431) |
| 4 | -0,00255 | (-0,29250; 0,28740) |
| 16 | 0,092483 | (-0,19569; 0,38065) |
| 28 | 0,18752 | (-0,09904; 0,47408) |
| 40 | 0,28255 | (-0,00258; 0,56768) |
| 52 | 0,37759 | (0,093707; 0,66147) |
| 64 | 0,47262 | (0,18981; 0,75543) |
| 76 | 0,56766 | (0,28573; 0,84958) |
| 88 | 0,66269 | (0,38147; 0,94392) |
| 100 | 0,75773 | (0,47701; 1,0384) |
| 112 | 0,85276 | (0,57237; 1,1331) |
| 124 | 0,94780 | (0,66755; 1,2280) |
| 136 | 1,0428 | (0,76253; 1,3231) |
| 148 | 1,1379 | (0,85732; 1,4184) |
| 160 | 1,2329 | (0,95193; 1,5139) |
| 172 | 1,3279 | (1,0463; 1,6095) |
| 184 | 1,4230 | (1,1406; 1,7054) |
| 196 | 1,5180 | (1,2346; 1,8014) |
| 208 | 1,6130 | (1,3285; 1,8976) |
| 220 | 1,7081 | (1,4222; 1,9940) |
| 232 | 1,8031 | (1,5157; 2,0905) |
| 244 | 1,8981 | (1,6090; 2,1873) |
| 256 | 1,9932 | (1,7022; 2,2842) |
| 268 | 2,0882 | (1,7952; 2,3813) |

Para obter valores preditos adicionais, clique com o botão direito no gráfico e use a ferramenta Crosshairs.

Regressão de THCCOOH_RA vs Concentrações (ng/g)_THCCOOH Cartão de Relatório

| Verificar | Status | Descrição |
|---------------------|--------|--|
| Quantidade de Dados | | O tamanho de sua amostra (n = 30) não é grande o suficiente para fornecer uma estimativa precisa da força da relação. As medições da força da relação, como um R-Quadrado e R-Quadrado (ajustado), podem variar muito. Para obter uma estimativa mais precisa, devem ser usadas grandes quantidades de amostras (normalmente 40 ou mais). |
| Dados Atípicos | | 3 pontos de dados têm grandes resíduos e não estão bem ajustados pela equação. Esses pontos estão marcados em vermelho nos gráficos. Você pode passar o cursor sobre um ponto ou usar o recurso da Função Brush do Minitab para identificar as linhas da worksheet. Como dados atípicos podem ter uma forte influência nos resultados, tente identificar a causa de sua natureza atípica. Corrija quaisquer erros de entrada de dados ou medições. Considere remover os dados que estão associados a causas especiais e refazer a análise. |
| Normalidade | | Como você tem no mínimo 15 pontos de dados, a normalidade não é um problema. Se o número de pontos de dados for pequeno e os resíduos não forem normalmente distribuídos, o valor-p usado para determinar se há uma relação significativa entre X e Y pode não ser exato. |
| Ajuste do Modelo | | Você deve avaliar os dados e o ajuste do modelo em termos de suas metas. Veja o gráfico de linha ajustada para ter certeza de que: <ul style="list-style-type: none"> A amostra cobre adequadamente a amplitude de valores X. O modelo se ajusta bem a todas as curvaturas dos dados (evita o superajuste). A reta se ajusta bem nas áreas de interesse especial. |

Teste de Intervalo de Confiança para duas variâncias referente ao analito
11-nor-9-carboxi- tetrahydrocannabinol (THCCOOH)

Teste e IC para Duas Variâncias

Método

σ_1^2 : variância de Amostra 1

σ_2^2 : variância de Amostra 2

Razão: σ_1^2/σ_2^2

O método F foi usado. Esse método é preciso apenas para dados normais.

Estatísticas Descritivas

| Amostra | N | DesvPad | Variância | IC de 95% para σ |
|-----------|---|---------|-----------|----------------------------|
| Amostra 1 | 5 | 0,002 | 0,000005 | (0,001; 0,006) |
| Amostra 2 | 5 | 0,048 | 0,002317 | (0,029; 0,138) |

Razão de desvios padrão

| Razão Estimada | 95% IC da Razão usando F |
|-------------------|--------------------------------|
| 0,0445599 | (0,014; 0,138) |

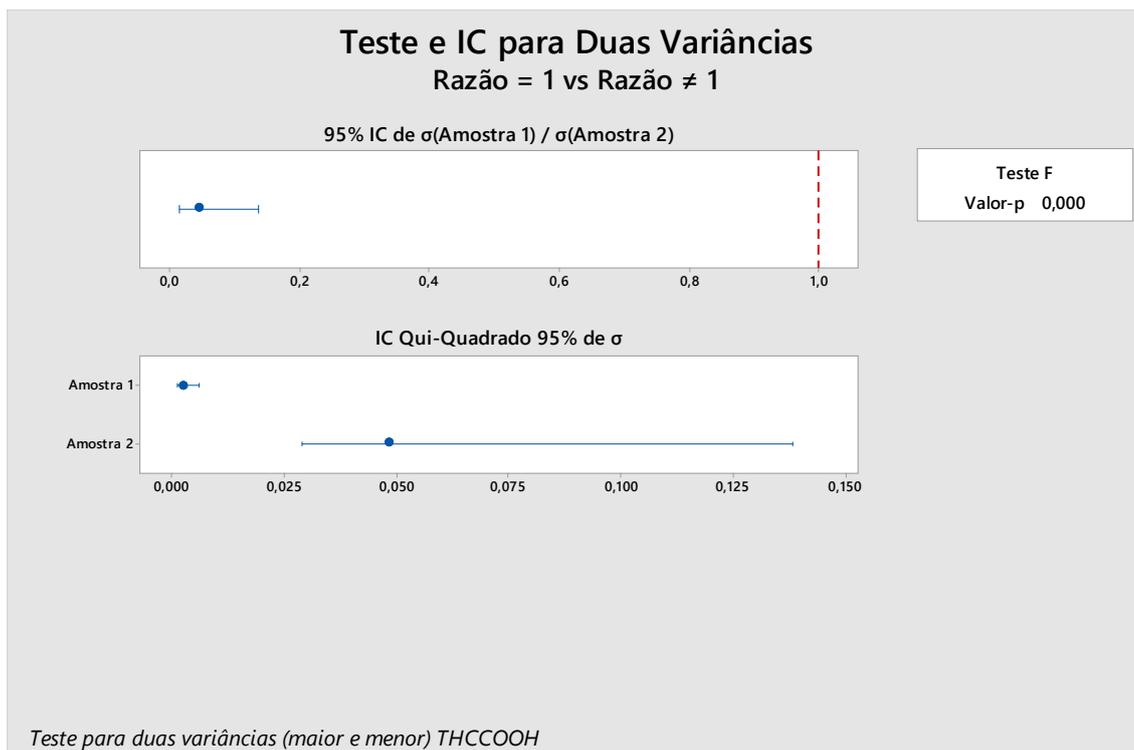
Teste

Hipótese nula $H_0: \sigma_1 / \sigma_2 = 1$

Hipótese alternativa $H_1: \sigma_1 / \sigma_2 \neq 1$

Nível de significância $\alpha = 0,05$

| Método | Estatística de teste | GL1 | GL2 | Valor-p |
|--------|-------------------------|-----|-----|---------|
| F | 0,00 | 4 | 4 | 0,000 |



Análise de Regressão: THCCOOH_RA versus Concentrações (ng/g)_THCCOOH

Método

Pesos 1/x

Análise de Variância

| Fonte | GL | SQ (Aj.) | QM (Aj.) | Valor F | Valor-P |
|------------------------------|----|----------|----------|---------|---------|
| Regressão | 1 | 0,158474 | 0,158474 | 1694,31 | 0,000 |
| Concentrações (ng/g)_THCCOOH | 1 | 0,158474 | 0,158474 | 1694,31 | 0,000 |
| Erro | 28 | 0,002619 | 0,000094 | | |
| Falta de ajuste | 4 | 0,002473 | 0,000618 | 101,96 | 0,000 |
| Erro puro | 24 | 0,000146 | 0,000006 | * | * |
| Total | 29 | 0,161093 | | | |

Sumário do Modelo

| S | R2 | R2(aj) | R2(pred) |
|-----------|--------|--------|----------|
| 0,0096713 | 98,37% | 98,32% | 98,18% |

Coeficientes

| Termo | Coef | EP de Coef | Valor-T | Valor-P | VIF |
|-----------|---------|------------|---------|---------|-----|
| Constante | -0,0269 | 0,0138 | -1,95 | 0,062 | |

Concentrações (ng/g)_THCCOOH 0,007861 0,000191 41,16 0,000 1,00

Equação de Regressão

THCCOOH_RA = -0,0269 + 0,007861 Concentrações (ng/g)_THCCOOH

Ajustados e Diagnósticos para Observações Atípicas

| Obs. | THCCOOH_RA | Ajuste | Resíd | Resíd | |
|------|------------|--------|--------|-------|-----|
| | | | | Resíd | Pad |
| 22 | 1,8535 | 1,5454 | 0,3081 | 2,32 | R |
| 24 | 1,8122 | 1,5454 | 0,2668 | 2,01 | R |
| 25 | 1,8283 | 1,5454 | 0,2829 | 2,13 | R |

Método

Pesos 1/x²

Análise de Variância

| Fonte | GL | SQ (Aj.) | QM (Aj.) | Valor F | Valor-P |
|------------------------------|----|----------|----------|---------|---------|
| Regressão | 1 | 0,001209 | 0,001209 | 2355,26 | 0,000 |
| Concentrações (ng/g)_THCCOOH | 1 | 0,001209 | 0,001209 | 2355,26 | 0,000 |
| Erro | 28 | 0,000014 | 0,000001 | | |
| Falta de ajuste | 4 | 0,000013 | 0,000003 | 57,81 | 0,000 |
| Erro puro | 24 | 0,000001 | 0,000000 | * | * |
| Total | 29 | 0,001223 | | | |

Sumário do Modelo

| S | R2 | R2(aj) | R2(pred) |
|-----------|--------|--------|----------|
| 0,0007164 | 98,83% | 98,78% | 98,71% |

Coeficientes

| Termo | Coef | EP de Coef | Valor-T | Valor-P | VIF |
|------------------------------|----------|------------|---------|---------|------|
| Constante | -0,02344 | 0,00382 | -6,14 | 0,000 | |
| Concentrações (ng/g)_THCCOOH | 0,007779 | 0,000160 | 48,53 | 0,000 | 1,00 |

Equação de Regressão

THCCOOH_RA = -0,02344 + 0,007779 Concentrações (ng/g)_THCCOOH

Ajustados e Diagnósticos para Observações Atípicas

| Obs. | THCCOOH_RA | Ajuste | Resíd | Resíd | Pad |
|------|------------|--------|--------|-------|-----|
| 22 | 1,8535 | 1,5323 | 0,3212 | 2,29 | R |
| 25 | 1,8283 | 1,5323 | 0,2961 | 2,11 | R |

Método

Pesos 1/raizX

Análise de Variância

| Fonte | GL | SQ (Aj.) | QM (Aj.) | Valor F | Valor-P |
|------------------------------|----|----------|----------|---------|---------|
| Regressão | 1 | 1,54835 | 1,54835 | 1196,84 | 0,000 |
| Concentrações (ng/g)_THCCOOH | 1 | 1,54835 | 1,54835 | 1196,84 | 0,000 |
| Erro | 28 | 0,03622 | 0,00129 | | |
| Falta de ajuste | 4 | 0,03447 | 0,00862 | 117,91 | 0,000 |
| Erro puro | 24 | 0,00175 | 0,00007 | * | * |
| Total | 29 | 1,58457 | | | |

Sumário do Modelo

| S | R2 | R2(aj) | R2(pred) |
|-----------|--------|--------|----------|
| 0,0359680 | 97,71% | 97,63% | 97,41% |

Coeficientes

| Termo | Coef | EP de Coef | Valor-T | Valor-P | VIF |
|------------------------------|----------|------------|---------|---------|------|
| Constante | -0,0309 | 0,0260 | -1,19 | 0,244 | |
| Concentrações (ng/g)_THCCOOH | 0,007900 | 0,000228 | 34,60 | 0,000 | 1,00 |

Equação de Regressão

THCCOOH_RA = -0,0309 + 0,007900 Concentrações (ng/g)_THCCOOH

Ajustados e Diagnósticos para Observações Atípicas

| Obs. | THCCOOH_RA | Ajuste | Resíd | Resíd | Pad |
|------|------------|--------|--------|-------|-----|
| 22 | 1,8535 | 1,5490 | 0,3045 | 2,32 | R |
| 24 | 1,8122 | 1,5490 | 0,2632 | 2,01 | R |
| 25 | 1,8283 | 1,5490 | 0,2794 | 2,13 | R |

Método

Pesos 1/y

Análise de Variância

| Fonte | GL | SQ (Aj.) | QM (Aj.) | Valor F | Valor-P |
|------------------------------|----|----------|----------|---------|---------|
| Regressão | 1 | 21,4161 | 21,4161 | 1919,57 | 0,000 |
| Concentrações (ng/g)_THCCOOH | 1 | 21,4161 | 21,4161 | 1919,57 | 0,000 |
| Erro | 28 | 0,3124 | 0,0112 | | |
| Falta de ajuste | 4 | 0,2925 | 0,0731 | 88,15 | 0,000 |
| Erro puro | 24 | 0,0199 | 0,0008 | * | * |
| Total | 29 | 21,7285 | | | |

Sumário do Modelo

| S | R2 | R2(aj) | R2(pred) |
|----------|--------|--------|----------|
| 0,105625 | 98,56% | 98,51% | 98,41% |

Coeficientes

| Termo | Coef | EP de Coef | Valor-T | Valor-P | VIF |
|------------------------------|----------|------------|---------|---------|------|
| Constante | -0,0247 | 0,0113 | -2,18 | 0,038 | |
| Concentrações (ng/g)_THCCOOH | 0,007762 | 0,000177 | 43,81 | 0,000 | 1,00 |

Equação de Regressão

$$\text{THCCOOH_RA} = -0,0247 + 0,007762 \text{ Concentrações (ng/g)_THCCOOH}$$

Ajustados e Diagnósticos para Observações Atípicas

| Obs. | THCCOOH_RA | Ajuste | Resíd | Resíd | Pad |
|------|------------|--------|--------|-------|-----|
| 22 | 1,8535 | 1,5277 | 0,3258 | 2,32 | R |
| 24 | 1,8122 | 1,5277 | 0,2844 | 2,05 | R |
| 25 | 1,8283 | 1,5277 | 0,3006 | 2,16 | R |

Método

Pesos 1/y2

Análise de Variância

| Fonte | GL | SQ (Aj.) | QM (Aj.) | Valor F | Valor-P |
|------------------------------|----|----------|----------|---------|---------|
| Regressão | 1 | 21,1363 | 21,1363 | 2851,94 | 0,000 |
| Concentrações (ng/g)_THCCOOH | 1 | 21,1363 | 21,1363 | 2851,94 | 0,000 |
| Erro | 28 | 0,2075 | 0,0074 | | |
| Falta de ajuste | 4 | 0,1793 | 0,0448 | 38,13 | 0,000 |

| | | | | | |
|-----------|----|---------|--------|---|---|
| Erro puro | 24 | 0,0282 | 0,0012 | * | * |
| Total | 29 | 21,3438 | | | |

Sumário do Modelo

| S | R2 | R2(aj) | R2(pred) |
|-----------|--------|--------|----------|
| 0,0860883 | 99,03% | 98,99% | 98,94% |

Coeficientes

| Termo | Coef | EP de Coef | Valor-T | Valor-P | VIF |
|------------------------------|----------|------------|---------|---------|------|
| Constante | -0,02186 | 0,00269 | -8,11 | 0,000 | |
| Concentrações (ng/g)_THCCOOH | 0,007631 | 0,000143 | 53,40 | 0,000 | 1,00 |

Equação de Regressão

$$\text{THCCOOH_RA} = -0,02186 + 0,007631 \text{ Concentrações (ng/g)_THCCOOH}$$

Ajustados e Diagnósticos para Observações Atípicas

| Obs. | THCCOOH_RA | Ajuste | Resíd | Resíd Pad | |
|------|------------|--------|---------|-----------|---|
| 4 | 0,0513 | 0,0544 | -0,0031 | -0,81 | X |
| 22 | 1,8535 | 1,5043 | 0,3492 | 2,22 | R |
| 24 | 1,8122 | 1,5043 | 0,3079 | 2,00 | R |
| 25 | 1,8283 | 1,5043 | 0,3240 | 2,09 | R |

Método

Pesos 1/raizY

Análise de Variância

| Fonte | GL | SQ (Aj.) | QM (Aj.) | Valor F | Valor-P |
|------------------------------|----|----------|----------|---------|---------|
| Regressão | 1 | 18,3686 | 18,3686 | 1299,24 | 0,000 |
| Concentrações (ng/g)_THCCOOH | 1 | 18,3686 | 18,3686 | 1299,24 | 0,000 |
| Erro | 28 | 0,3959 | 0,0141 | | |
| Falta de ajuste | 4 | 0,3754 | 0,0939 | 110,32 | 0,000 |
| Erro puro | 24 | 0,0204 | 0,0009 | * | * |
| Total | 29 | 18,7644 | | | |

Sumário do Modelo

| S | R2 | R2(aj) | R2(pred) |
|----------|--------|--------|----------|
| 0,118903 | 97,89% | 97,82% | 97,62% |

Coeficientes

| Termo | Coef | EP de Coef | Valor-T | Valor-P | VIF |
|------------------------------|----------|------------|---------|---------|------|
| Constante | -0,0291 | 0,0238 | -1,23 | 0,231 | |
| Concentrações (ng/g)_THCCOOH | 0,007844 | 0,000218 | 36,04 | 0,000 | 1,00 |

Equação de Regressão

$$\text{THCCOOH_RA} = -0,0291 + 0,007844 \text{ Concentrações (ng/g)_THCCOOH}$$

Ajustados e Diagnósticos para Observações Atípicas

| Obs. | THCCOOH_RA | Ajuste | Resíd | | |
|------|------------|--------|--------|------|---|
| | | | Resíd | Pad | |
| 22 | 1,8535 | 1,5397 | 0,3138 | 2,32 | R |
| 24 | 1,8122 | 1,5397 | 0,2725 | 2,03 | R |
| 25 | 1,8283 | 1,5397 | 0,2886 | 2,15 | R |

ANEXO 5. Tabela de dados obtidos para identificação de proteínas usando IMS

| m/z | Estado de carga | Massa neutra | adutos | sub-unidade de hemoglobina humana |
|-----------------|------------------------|---------------------|---------------|--|
| 1009.125 | 15 | 15121.7609 | - | Hemoglobina |
| 1081.171 | 14 | 15121.2949 | - | Hemoglobina |
| 1164.332 | 13 | 15123.2185 | - | Hemoglobina |
| 1261.275 | 12 | 15123.2166 | - | Hemoglobina |
| 1375.819 | 11 | 15122.9366 | - | Hemoglobina |
| 1513.296 | 10 | 15122.885 | - | Hemoglobina |
| 1681.315 | 9 | 15122.7662 | - | Hemoglobina |
| 1891.306 | 8 | 15122.3863 | - | Hemoglobina |
| 2161.338 | 7 | 15122.3176 | - | Hemoglobina |
| 1010.669 | 15 | 15144.927 | M+Na | Hemoglobina |
| 1082.826 | 14 | 15145.4669 | M+Na | Hemoglobina |
| 1166.024 | 13 | 15145.2173 | M+Na | Hemoglobina |
| 1263.124 | 12 | 15145.3961 | M+Na | Hemoglobina |
| 1377.921 | 11 | 15146.0465 | M+Na | Hemoglobina |
| 1515.587 | 10 | 15145.8002 | M+Na | Hemoglobina |
| 1683.849 | 9 | 15145.5756 | M+Na | Hemoglobina |

| | | | | |
|-----------------|----|------------|------|-------------|
| 1894.189 | 8 | 15145.4525 | M+Na | Hemoglobina |
| 1212.055 | 15 | 15165.7113 | M+K | Hemoglobina |
| 1084.341 | 14 | 15166.676 | M+K | Hemoglobina |
| 1167.676 | 13 | 15166.6884 | M+K | Hemoglobina |
| 1264.981 | 12 | 15167.6782 | M+K | Hemoglobina |
| 1379.723 | 11 | 15165.8669 | M+K | Hemoglobina |
| 1517.589 | 10 | 15165.818 | M+K | Hemoglobina |
| 1686.062 | 9 | 15165.4941 | M+K | Hemoglobina |
| 1896.686 | 8 | 15165.4304 | M+K | Hemoglobina |
| 992.5018 | 16 | 15863.9124 | | Hemoglobina |
| 1058.686 | 15 | 15865.1003 | | Hemoglobina |
| 1134.227 | 14 | 15865.0723 | | Hemoglobina |
| 1221.398 | 13 | 15865.0813 | | Hemoglobina |
| 1323.096 | 12 | 15865.06 | | Hemoglobina |
| 1443.286 | 11 | 15865.0667 | | Hemoglobina |
| 1587.514 | 10 | 15865.064 | | Hemoglobina |
| 1000.454 | 16 | 15991.1489 | | Hemoglobina |
| 1067.08 | 15 | 15991.09 | | Hemoglobina |
| 1143.227 | 14 | 15991.0736 | | Hemoglobina |
| 1231.167 | 13 | 15992.0704 | | Hemoglobina |

| | | | |
|-----------------|----|------------|-------------|
| 1333.681 | 12 | 15992.0863 | Hemoglobina |
| 1454.83 | 11 | 15992.0514 | Hemoglobina |
| 1600.211 | 10 | 15992.0304 | Hemoglobina |
| 1777.901 | 9 | 15992.0424 | Hemoglobina |
| 2000.018 | 8 | 15992.0835 | Hemoglobina |
| 2285.606 | 7 | 15992.1909 | Hemoglobina |
| 1001.322 | 16 | 16005.0387 | Hemoglobina |
| 1068.015 | 15 | 16005.1205 | Hemoglobina |
| 1144.228 | 14 | 16005.0853 | Hemoglobina |
| 1232.17 | 13 | 16005.1169 | Hemoglobina |
| 1334.764 | 12 | 16005.0843 | Hemoglobina |
| 1456.013 | 11 | 16005.0621 | Hemoglobina |
| 1601.514 | 10 | 16005.0652 | Hemoglobina |
| 1779.562 | 9 | 16006.9914 | Hemoglobina |
| 990.6329 | 16 | 15834.0101 | Hemoglobina |
| 1056.553 | 15 | 15833.179 | Hemoglobina |
| 1131.941 | 14 | 15833.0745 | Hemoglobina |
| 1218.937 | 13 | 15833.1794 | Hemoglobina |
| 1320.44 | 12 | 15833.1938 | Hemoglobina |
| 1440.56 | 11 | 15835.0843 | Hemoglobina |

| | | | | |
|-----------------|----|------------|---|------------------|
| 1584.506 | 10 | 15834.9543 | | Hemoglobina |
| 952.2896 | 9 | 8561.2896 | C | ubiquitina |
| 1224.083 | 7 | 8561.5295 | C | Ubiquitina |
| 1427.951 | 6 | 8561.6055 | C | Ubiquitina |
| 1071.201 | 8 | 8561.5673 | C | ubiquitina |
| 1075.157 | 15 | 16112.2484 | | Hemoglobina |
| 1151.883 | 14 | 16112.2615 | | Hemoglobina |
| 1240.332 | 13 | 16111.2145 | | Hemoglobina |
| 1343.603 | 12 | 16111.1477 | | Hemoglobina |
| 1465.653 | 11 | 16111.1044 | | Hemoglobina |
| 1791.161 | 10 | 16111.3838 | | Hemoglobina |
| 1155.819 | 9 | 10393.305 | E | Não-identificada |
| 1300.178 | 8 | 10393.3674 | E | Não-identificada |
| 1485.761 | 7 | 10393.277 | E | Não-identificada |
| 1733.226 | 6 | 10393.3094 | E | Não-identificada |
| 1487.19 | 7 | 10406.2771 | - | Não-identificada |
| 1734.736 | 6 | 10402.3703 | - | Não-identificada |
| 2081.865 | 5 | 10404.2861 | - | Não-identificada |

ANEXO 6. Configurações de operação do equipamento *nano-ESI*

Trapped Ion Mobility Mass Spectrometer – Q-TOF-MS

| | |
|--|-------------------------|
| Capillary | 4 nA |
| End Plate | 79 nA |
| Corona | 0 nA |
| Nebulizer | 1.0 Bar |
| APCI Heater | 0 °C |
| Dry Gas | 5.0 l/min |
| Dry Heater | 29 °C |
| Source Type | Nano Flow ESI |
| Set Multi Mode Active Ionization Mode | ESI |
| High Voltage Switch | On |
| Set Capillary | 500 V |
| Set End Plate Offset | -500 V |
| Set Corona | 4000 nA |
| Set Charging Voltage | 2000 V |
| Set OnVolt | 4000 V |
| Dry Gas Switch | On |
| Nebulizer Switch | On |
| Set Divert Valve | Source |
| Set Target Mass Start | 50 m/z |
| Set Target Mass End | 5000 m/z |
| Set Dry Gas | 5.0 l/min |
| Set Dry Heater | 25 °C |
| Set Nebulizer | 1.0 Bar |
| Set APCI Heater | 200 °C |
| TOF Calibration Mode Version | Version 2 |
| TOF1 Calibration Mode | Quadratic |
| TOF2 Calibration Mode | Quadratic |
| Mark TOF Calibration Segment | No |
| TOF1 C0 | 269.169097900390620 |
| TOF1 C1 | 156774.0000000000000000 |
| TOF1 C2 | 0.000134999994771 |
| TOF1 Calibration Standard Deviation | 0.0 |
| TOF1 Calibration Standard Deviation i... | 0.0 |

| | |
|--|-------------------------------|
| TOF1 Calibration Score | -1.00 |
| TOF2 C0 | 258.652618408203120 |
| TOF2 C1 | 156211.3437500000000000 |
| TOF2 C2 | 0.002012386452407 |
| TOF2 C3 | 0.0000000000000000 |
| TOF2 C4 | 0.0000000000000000 |
| TOF2 Calibration Standard Deviation | 0.0 |
| TOF2 Calibration Standard Deviation i... | 0.7 |
| TOF2 Calibration Score | 1.00 |
| TOF1 HPC | |
| Used Reference MassList | Tuning Mix ES-TOF (ESI) (pos) |
| Last Calibration Date | 2019-04-16T18:09:56-04:00 |

| | |
|---------------------------------|----------|
| Collision Energy | 6.0 eV |
| Collision Gas Supply Flowrate | 9.3 % |
| Set Collision Cell Entrance Fix | On |
| Set Collision Stepping Active | Off |
| Set Collision Stepping Mode | Advanced |
| Set Collision Gas Supply Switch | On |
| Set Quench Enable | Off |
| Set Quench Time | 1 ms |
| Set Quench Always Enable | Off |
| Set Collision Extraction | 24.0 V |
| Set Collision Storage | 24.0 V |
| Set Focus 3 - Lens 2 | 0.0 V |

| | |
|-----------------------------------|--------------|
| Set Focus 3 - Lens 3 | -100.9 V |
| Set Focus 3 - Lens 4 | 0.0 V |
| Set Focus 3 - Lens 5 | 0.0 V |
| Set Transfer Time | 80.0 μ s |
| Set PrePulseStorage Time | 15.0 μ s |
| Set Collision Cell RF | 2100.0 Vpp |
| Set Collision Cell Bias | 26.0 V |
| Set Collision Gas Supply Flowrate | 8.0 % |
| Set Collision Energy Offset | 6.0 eV |
| Set Collision Energy (MS only) | 5.5 eV |
| Set Focus 2 - Lens 1 | 31.9 V |
| Set Focus 2 - Lens 2 | -48.4 V |

| | |
|---|--------------------------------|
| Set Collision Cell RF | 2100.0 Vpp |
| Set Collision Cell Bias | 26.0 V |
| Set Collision Gas Supply Flowrate | 8.0 % |
| Set Collision Energy Offset | 6.0 eV |
| Set Collision Energy (MS only) | 5.5 eV |
| Set Focus 2 - Lens 1 | 31.9 V |
| Set Focus 2 - Lens 2 | -48.4 V |
| Set Focus 2 - Lens 3 | 26.2 V |
| Set Collision Stepping Switch Time(s) | 0; 25; 50; 75 % |
| Set Collision Stepping RF Factor(s) | 0.0000; 0.0000; 0.0000; 0.0000 |
| Set Collision Stepping Energy Factor(s) | 1.000; 1.000; 1.000; 1.000 |
| Set Collision Stepping Transfer Time F... | 1.031; 1.031; 1.031; 1.031 |

| | |
|----------------------------|-------------------|
| Digitizer Temperature | 29.0 °C |
| Digitizer Acquisition Time | 500 ms |
| Serial Number | 61682 |
| Configuration Mode | Advanced Averager |
| Input Channel | 1 |
| Sample Points | 324096 pts. |
| Bandwidth | Off |
| Trigger Slope | positive |
| Trigger Coupling | DC 50 Ohm |
| Trigger Resync | no resync |
| Trigger Always | On |
| Enable Noise Suppression | On |

| | |
|------------------------------|--------------|
| Noise Base Enable | Off |
| Regulate Spectra Rate | Spectra Rate |
| Summation | 2747 x |
| Sample Rate | 0.50 ns |
| Start Delay | 17216 ns |
| Vert. Offset | 0.04894 V |
| Full Scale | 0.10 V |
| Trigger Level | 1400 mV |
| Trigger Offset | 1.7 V |
| Noise Suppression Threshold | -0.0024 V |
| Noise Base | -0.0011 V |
| Noise Suppression Peak Width | 3 pts. |

| | |
|-------------------------|--------------|
| Excursion Start | 4 LSB |
| Excursion Valid | 1 LSB |
| Spectra Rate | 2.0 Spec/sec |
| Spectra Sample Time | 0.50 sec |
| Extraction Trigger Time | 182 µs |
| Extraction Puls Width | 5.0 µs |
| Type | U1084A_TDC |
| Manufacturer | Acqiris |

| | |
|--------------|----------|
| Ion Polarity | Positive |
| Scan Mode | MS |
| Scan Begin | 50 m/z |
| Scan End | 5000 m/z |

| | |
|---|------------|
| Isolation Resolution FWHM | 0.00 m/z |
| Set Ion Energy Offset | 6.0 eV |
| Set Ion Energy (MS only) | 6.0 eV |
| Set Isolation Mass (MS only) | 400.00 m/z |
| Set Isolation Resolution FWHM (MS o... | 0.00 m/z |
| Set Post Filter Ramp DC | 31.5 V |
| Set Quadrupole Bias | 31.5 V |
| Set RF Only | 351.2 Vpp |

| | |
|--|--------------------------|
| Profile Spectrum Spike Filter Active | Off |
| Profile Spectrum Replaced Spike Num... | 0 |
| Profile Spectrum Multiplier | 4 |
| Spectra Compression Filter Rate | 1.000 |
| Spectra Compressed | On |
| Save Spectra | Line and Profile Spectra |
| Spectra Compression Filter Active | Off |
| Spectra Compression Filter Level | Low |

| | |
|-------------------------|-----------|
| Pulser Push | 1639.9 V |
| Pulser Pull | 0.0 V |
| Corrector Lens | 6338.9 V |
| Corrector Fill | 47.3 V |
| Corrector Extract | 555.3 V |
| Flight Tube | 9903.4 V |
| Decelerator | 794.8 V |
| Reflector | 2658.5 V |
| Voltage Detector Source | 1197.5 V |
| Detector Source | 715 nA |
| Detector TOF | 1903.4 V |
| Device Temperature 1 | 26.741 °C |

| | |
|-------------------------------------|------------|
| Device Temperature 2 | 27.885 °C |
| HVC Configuration | 0x000021FF |
| Focus | Active |
| High Voltage Switch | On |
| TOF Ion Polarity | Positive |
| Temperature Compensation | On |
| Device Temperature Average Number 1 | 100 |
| Device Temperature Average Number 2 | 100 |
| Set Pulser Push | 1640.5 V |
| Set Pulser Pull | 30.0 V |
| Set Corrector Lens | 6337.7 V |
| Set Corrector Fill | 47.6 V |

| | |
|--|-------------------|
| Set Corrector Extract | 555.1 V |
| Set Flight Tube | 9900.0 V |
| Set Decelerator | 791.2 V |
| Set Reflector | 2650.8 V |
| Set Detector Source | 1200.0 V |
| Set Detector TOF | 1900.0 V |
| Device Temperature Gradient 1 | 37.0 ppm/°C |
| Device Temperature Gradient 2 | 11.4 ppm/°C |
| Device Reference Temperature 1 | 26.623 °C |
| Device Reference Temperature 2 | 27.650 °C |
| Firmware | 5.0.17.2 |
| Device Temperature Gradient(s) for En... | 53.5; -8.7 ppm/°C |

| | |
|------------------------------|----------------|
| isCID Energy | 0.0 eV |
| Set Capillary Exit | 60.0 V |
| Set Deflector Plate | 212.0 V |
| Set Hexapole Bias | 37.5 V |
| Set Hexapole RF | 300.0 Vpp |
| Set isCID Energy (MS only) | 25.0 eV |
| Set Funnel 1 In | 65.0 V |
| Set Funnel 1 Base | 238.0 V |
| Set Funnel 1 RF | 280.0 Vpp |
| Set Funnel 1 Out | 38.5 V |
| Set Funnel 2 In | 48.0 V |
| Set Funnel 2 Base | 2.0 V |
| Set Funnel 2 RF | 100.0 Vpp |
| Set Funnel 2 Out | 40.0 V |
| Set Hexapole Extraction | 33.5 V |
| Set Hexapole Storage | 33.5 V |
| Set Focus 1 - Lens 2 | 34.6 V |
| Set Focus 1 - Lens 3 | -8.7 V |
| Fore Vacuum | 1.40e+000 mBar |
| High Vacuum | 1.97e-007 mBar |

**ANEXO 7. Lista de todas as proteínas identificadas em
experimento de proteômica convencional**

| Proteína ID | Acceso UNIPROT | Massa média | Nome |
|-------------|--------------------|-------------|--|
| 1 | P69905 HBA_HUMAN | 15258 | Hemoglobin subunit alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HBA1 PE=1 SV=2 |
| 2 | P02768 ALBU_HUMAN | 69367 | Serum albumin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALB PE=1 SV=2 |
| 3 | P69892 HBG2_HUMAN | 16126 | Hemoglobin subunit gamma-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HBG2 PE=1 SV=2 |
| 4 | P68871 HBB_HUMAN | 15998 | Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HBB PE=1 SV=2 |
| 5 | P17661 DESM_HUMAN | 53536 | Desmin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DES PE=1 SV=3 |
| 6 | P69891 HBG1_HUMAN | 16140 | Hemoglobin subunit gamma-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HBG1 PE=1 SV=2 |
| 7 | P21291 CSRP1_HUMAN | 20567 | Cysteine and glycine-rich protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CSRP1 PE=1 SV=3 |
| 8 | P62736 ACTA_HUMAN | 42009 | Actin aortic smooth muscle OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTA2 PE=1 SV=1 |
| 9 | P63267 ACTH_HUMAN | 41877 | Actin gamma-enteric smooth muscle OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTG2 PE=1 SV=1 |
| 10 | P51911 CNN1_HUMAN | 33170 | Calponin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CNN1 PE=1 SV=2 |
| 11 | Q16527 CSRP2_HUMAN | 20954 | Cysteine and glycine-rich protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CSRP2 PE=1 SV=3 |
| 12 | Q75N90 FBN3_HUMAN | 300355 | Fibrillin-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FBN3 PE=2 SV=3 |
| 13 | P39060 COIA1_HUMAN | 178187 | Collagen alpha-1(XVIII) chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COL18A1 PE=1 SV=5 |
| 14 | Q14683 SMC1A_HUMAN | 143233 | Structural maintenance of chromosomes protein 1A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SMC1A PE=1 SV=2 |
| 15 | Q7Z591 AKNA_HUMAN | 155139 | AT-hook-containing transcription factor OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AKNA PE=1 SV=2 |
| 16 | Q8NG31 KNL1_HUMAN | 265389 | Kinetochore scaffold 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KNL1 PE=1 SV=3 |
| 17 | Q7L014 DDX46_HUMAN | 117362 | Probable ATP-dependent RNA helicase DDX46 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX46 PE=1 SV=2 |
| 18 | P17936 IBP3_HUMAN | 31674 | Insulin-like growth factor-binding protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IGFBP3 PE=1 SV=2 |
| 19 | Q03164 KMT2A_HUMAN | 431768 | Histone-lysine N-methyltransferase 2A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KMT2A PE=1 SV=5 |
| 20 | O95201 ZN205_HUMAN | 60630 | Zinc finger protein 205 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ZNF205 PE=1 SV=2 |
| 21 | Q9Y211 NISCH_HUMAN | 166628 | Nischarin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NISCH PE=1 SV=3 |
| 22 | P19338 NUCL_HUMAN | 76615 | Nucleolin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NCL PE=1 SV=3 |
| 23 | Q96T60 PNKP_HUMAN | 57076 | Bifunctional polynucleotide phosphatase/kinase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PNKP PE=1 SV=1 |
| 24 | Q02388 CO7A1_HUMAN | 295216 | Collagen alpha-1(VII) chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COL7A1 PE=1 SV=2 |
| 25 | Q9P1Q0 VPS54_HUMAN | 110589 | Vacuolar protein sorting-associated protein 54 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VPS54 PE=1 SV=2 |
| 26 | Q8IVF5 TIAM2_HUMAN | 190102 | T-lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TIAM2 PE=2 SV=4 |

ANEXO 7. Ficha do Aluno

NUSP: 9444008 Nome: Jefferson Pereira e Silva

Ficha do Aluno

| Curso | Área | Nº Sequencial | Situação | Visualizar |
|---|------|---------------|-----------------------------|---|
| → Doutorado Toxicologia e Análises Toxicológicas (9141) | | 1 | Matrícula de Acompanhamento |  |

 [Preparar para imprimir](#)

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9141 - 9444008/1 - Jefferson Pereira e Silva

Email: silvajp@usp.br
Data de Nascimento: 13/10/1989
Cédula de Identidade: RG - 5658906 - PA
Local de Nascimento: Estado do Pará
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Farmacêutico - Universidade Federal do Pará - Pará - Brasil - 2011
Mestrado: Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários (1) - Universidade Federal do Pará - Pará - Brasil - 2013

Curso: Doutorado
Programa: Toxicologia e Análises Toxicológicas
Data de Matrícula: 01/07/2015
Início da Contagem de Prazo: 01/07/2015
Data Limite para o Depósito: 29/10/2019
Orientador: Prof(a). Dr(a). Mauricio Yonamine - 01/07/2015 até o presente. Email: yonamine@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 01/07/2015
Prorrogação(ões): 120 dias
Período de 01/07/2019 até 29/10/2019
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 28/08/2017
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 01/07/2015
Prorrogação em 29/05/2018

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 15/07/2019

Impresso em: 23/10/2019 22:31:40



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
 Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9141 - 9444008/1 - Jefferson Pereira e Silva

| Sigla | Nome da Disciplina | Início | Término | Carga Horária | Cred. | Freq. | Conc. | Exc. | Situação |
|-------------|--|------------|------------|---------------|-------|-------|-------|------|--------------------------|
| FBC5802-3/7 | Tópicos Avançados em Toxicologia I | 04/08/2015 | 16/11/2015 | 15 | 1 | 100 | A | N | Concluída |
| SCS5702-2/1 | Genero e Saúde Materna (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo) | 07/08/2015 | 30/10/2015 | 60 | 0 | - | - | N | Turma cancelada |
| EHA5731-1/2 | Psicanálise e Crítica de Arte (Curso Interunidades: Estética e História da Arte - Universidade de São Paulo) | 07/08/2015 | 19/11/2015 | 105 | 7 | 91 | A | N | Concluída |
| FBC5712-2/2 | Métodos Modernos de Proteômica na Pesquisa em Análises Clínicas e Toxicológicas | 10/08/2015 | 25/09/2015 | 60 | 4 | 90 | A | N | Concluída |
| FBC5803-3/6 | Sistemas de Garantia da Qualidade em Laboratórios de Ensaio | 18/08/2015 | 31/08/2015 | 30 | 2 | 100 | A | N | Concluída |
| ICB5709-6/3 | Ensaio Pedagógicos (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo) | 04/11/2015 | 08/12/2015 | 45 | 3 | 100 | A | N | Concluída |
| TNM5801-3/1 | Princípios e Aplicações da Espectrometria de Massas (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - Universidade de São Paulo) | 25/02/2016 | 18/05/2016 | 120 | 0 | - | - | N | Matrícula cancelada |
| FBC5784-3/8 | Tópicos Avançados em Toxicologia II | 08/03/2016 | 20/06/2016 | 15 | 1 | 100 | A | N | Concluída |
| FBF5805-2/2 | Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas | 10/03/2016 | 19/05/2016 | 90 | 6 | 90 | B | N | Concluída |
| FBC5741-6/4 | Análise Toxicológica de Fármacos e Drogas que Causam Dependência | 02/05/2016 | 05/06/2016 | 60 | 4 | 90 | A | N | Concluída |
| | Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBC0425 Toxicologia, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia e Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (2) | 02/07/2016 | 30/11/2016 | - | 3 | - | - | - | - |
| | Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBC0426 Toxicologia Social, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia e Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (3) | 01/02/2017 | 30/06/2017 | - | 1 | - | - | - | - |
| FBA5905-1/1 | Planejamento Experimental e Análise Multivariada | 13/02/2017 | 26/02/2017 | 60 | 0 | - | - | N | Pré-matrícula indeferida |
| ESP5101-1/2 | Bioestatística Básica (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo) | 02/03/2017 | 20/04/2017 | 60 | 0 | - | - | N | Turma cancelada |
| FBC5813-6/1 | Aplicações de Cromatografia e Espectrometria de Massas em Análises Toxicológicas | 06/03/2017 | 27/03/2017 | 60 | 0 | - | - | N | Turma cancelada |
| ESP5101-1/3 | Bioestatística Básica (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo) | 07/03/2017 | 01/05/2017 | 60 | 4 | 100 | C | N | Concluída |

| | Créditos mínimos exigidos | | Créditos obtidos |
|---------------|----------------------------|-----------------------|------------------|
| | Para exame de qualificação | Para depósito de tese | |
| Disciplinas: | 0 | 20 | 36 |
| Estágios: | | | |
| Total: | 0 | 20 | 36 |

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

- 1) Curso com validade nacional, de acordo com o disposto na Portaria nº 524, de 29.04.2008..
- 2) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR-3588 e GR-4391 - PAE, de 31.08.09 e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 08/03/2017.
- 3) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR 3588, de 11.05.2005 e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 13/12/2017.

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
 Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 15/07/2019

Impresso em: 23/10/2019 22:31:40

ANEXO 8. Currículo Lattes



Jefferson Pereira e Silva

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/1468723880192319>

ID Lattes: 1468723880192319

Última atualização do currículo em 21/10/2019

Farmacêutico com habilitação em Bioquímica Clínica. Mestre pela Universidade Federal do Pará nas áreas de Proteômica e Espectrometria de Massas. Realiza Doutorado na área de Toxicologia pela Universidade de São Paulo com período no exterior na Florida International University (EUA), com ênfase nas expertises de preparo de amostra, validação de métodos, separações cromatográficas, espectrometria de massas de alta resolução, detecção de drogas de abuso em matrizes humanas e avaliação de biomarcadores de toxicidade. É Membro da The International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT), European Society of Toxicology In Vitro (ESTIV) e Sociedade Brasileira e Espectrometria de Massas (BrMass). (Texto informado pelo autor)

Identificação

| | |
|---------------------------------|--|
| Nome | Jefferson Pereira e Silva |
| Nome em citações bibliográficas | SILVA, J. P.; SILVA, JEFFERSON PEREIRA E; SILVA, JEFFERSON PEREIRA; PEREIRA E SILVA, JEFFERSON |
| Lattes ID | http://lattes.cnpq.br/1468723880192319 |

Endereço

| | |
|-----------------------|---|
| Endereço Profissional | Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Avenida Professor Lineu Prestes, 580 Butantã 05508000 - São Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 30912194 |
|-----------------------|---|

Formação acadêmica/titulação

| | |
|-------------|---|
| 2015 | Doutorado em andamento em Toxicologia e Análises Toxicológicas (Conceito CAPES 5). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. com período sanduíche em Florida International University (Orientador: Francisco A. Fernandez-Lima). Título: Avaliação toxicológica da exposição à Cannabis e cocaína na gravidez em cordão umbilical humano: validação de método analítico e prospecção de biomarcadores proteicos de toxicidade. Orientador: Maurício Yonamine. Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil. Palavras-chave: Drogas de abuso; Matrizes biológicas alternativas; cordão umbilical; Avaliação Toxicológica; Fetotoxicidade; Validação Bioanalítica. Grande área: Ciências da Saúde Grande Área: Ciências Exatas e da Terra / Área: Física / Subárea: Espectrometria de Massas. Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Toxicologia Reprodutiva e do Desenvolvimento. Mestrado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários (Conceito CAPES 6). Universidade Federal do Pará, UFPA, Brasil. Título: ANÁLISE MORFOLÓGICA, MOLECULAR, HISTOPATOLÓGICA E PROTEÔMICA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO <i>Orleppascaris</i> sp. - <i>Rhinella</i> marina. Ano de Obtenção: 2013. |
| 2011 - 2013 | Orientador: Jeannie Nascimento dos Santos. Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil. Grande área: Ciências Biológicas Grande Área: Ciências Exatas e da Terra / Área: Física / Subárea: Espectrometria de Massas. Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Zoologia / Subárea: Taxonomia dos Grupos Recentes / Especialidade: Taxonomia de Helminths. |
| 2011 - 2014 | Especialização em Habilitação em Bioquímica. (Carga Horária: 1425h). Universidade Federal do Pará, UFPA, Brasil. Título: Não se aplica. Orientador: Jeannie Nascimento dos Santos. |
| 2007 - 2010 | Graduação em Farmácia. Universidade Federal do Pará, UFPA, Brasil. Título: Alterações Histopatológicas em Fígado de <i>Rhinella</i> marina (Linnaeus, 1758), em Belém-PA, Induzidas por Nematoda da Família Ascaridae Baird, 1853. Orientador: Jeannie Nascimento dos Santos. Bolsista do(a): Ministério da Educação_ Secretária de Ensino Superior, MEC/SESU, Brasil. |

Formação Complementar

| | |
|-------------|---|
| 2019 - 2019 | 13th Summer School of Mass Spectrometry in Biotechnology and Medicine. (Carga horária: 45h). Mass Spectrometry in Biotechnology and Medicine, MSBM, Croácia. |
| 2018 - 2018 | Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of drugs of abuse - Marilyn Huestis. (Carga horária: 32h). Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Brasil. |
| 2018 - 2018 | II Curso de Toxicidade Genética: Curso de Verão. (Carga horária: 24h). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSA, Brasil. |
| 2017 - 2017 | Separações Cromatográficas. (Carga horária: 9h). Agilent Technologies Brasil, AGILENT, Brasil. |
| 2017 - 2017 | Sao Paulo School of Advanced Science on Mass Spectrometry-based Proteomics. (Carga horária: 90h). Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, CNPEM, Brasil. |
| 2017 - 2017 | Análise de Drogas de Abuso em Matrizes Biológicas. (Carga horária: 9h). Agilent Technologies Brasil, AGILENT, Brasil. |
| 2012 - 2012 | Espectrometria de Massas e Proteômica. (Carga horária: 64h). Instituto Carlos Chagas/FIOCRUZ-PR, FIOCRUZ-PR, Brasil. |
| 2009 - 2009 | Técnicas Extração de DNA e Marcadores Moleculares. (Carga horária: 20h). EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL, EMBRAPA, Brasil. |

Atuação Profissional

Florida International University, FIU, Estados Unidos.

Vínculo institucional

| | |
|-------------|---|
| 2018 - 2019 | Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Scholar Visitor, Regime: Dedicatória exclusiva. |
|-------------|---|

Universidade Federal do Pará, UFPA, Brasil.

| | |
|---|--|
| <p>Vínculo institucional 2011 - 2012 Outras informações Vínculo institucional 2007 - 2010 Outras informações</p> | <p>Vínculo: Aluno, Enquadramento Funcional: Aluno de Pós-Graduação (Mestrado), Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva. Aluno do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários (UFPA)</p> <p>Vínculo: Aluno, Enquadramento Funcional: bolsista, Carga horária: 20, Regime: Dedicção exclusiva. Bolsista do Programa de Educação Tutorial do Curso de Farmácia (PET-FARMÁCIA/UFPA)</p> |
| Universidade de São Paulo, USP, Brasil. | |
| <p>Vínculo institucional 2015 - Atual Outras informações Vínculo institucional 2017 - 2017 Outras informações</p> | <p>Vínculo: Aluno, Enquadramento Funcional: Aluno de Pós-Graduação (Doutorado), Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva. Aluno do Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas - FCF/USP</p> <p>Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Monitor, Carga horária: 6 Monitor do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE), Estágio Supervisionado em Docência, Farmácia e Bioquímica, Nível: Graduação. Disciplina: Toxicologia Social II - FBC 0426 (Integrado Fisiopatologia e Farmacologia II)</p> |
| <p>Vínculo institucional 2017 - 2017 Outras informações</p> | <p>Vínculo: Monitor, Enquadramento Funcional: Monitor, Carga horária: 6 Monitor do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE), Estágio Supervisionado em Docência, Farmácia e Bioquímica, Nível: Graduação. Disciplina: Toxicologia Forense- FBC0230-7</p> |
| <p>Vínculo institucional 2016 - 2016 Outras informações</p> | <p>Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Monitor, Carga horária: 6 Monitor do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE), Estágio Supervisionado em Docência, Farmácia e Bioquímica, Nível: Graduação. Disciplina: Toxicologia - FBC 0425</p> |
| <p>Atividades 04/2017 - Atual</p> | <p>Conselhos, Comissões e Consultoria, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Cargo ou função Representante Discente da Comissão Coordenadora de Programa - PPG em Toxicologia e Análises Toxicológicas.</p> |
| <p>05/2016 - 06/2017</p> | <p>Conselhos, Comissões e Consultoria, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Cargo ou função Representante Discente do Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos.</p> |
| Centro Universitário São Camilo, USC, Brasil. | |
| <p>Vínculo institucional 2019 - Atual</p> | <p>Vínculo: Professor Visitante, Enquadramento Funcional: Professor de Toxicologia, Carga horária: 4</p> |
| <p>Vínculo institucional 2018 - 2018</p> | <p>Vínculo: Professor Visitante, Enquadramento Funcional: Professor de Química Analítica Instrumental, Carga horária: 4</p> |
| Projetos de pesquisa | |
| <p>2018 - Atual</p> | <p>Utilização de Espectrometria de Massas de Alta Resolução e Proteômica para prospecção de biomarcadores relativos ao abuso de drogas na gravidez em tecido de cordão umbilical - Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior - PDSE - 88881.187736/2018-01 Descrição: A presença da droga inalada ou de um único dos seus produtos de biotransformação em uma determinada matriz biológica pode ser o suficiente para comprovar o uso pelo indivíduo, mas não a severidade e o impacto da exposição química. Neste sentido, novos modelos de avaliação da exposição fetal a fatores de risco tem sido pensados. Para tal, estudos recentes tem reunido esforços no intuito de encontrar, de modo exploratório, algumas moléculas ligadas à fisiologia de tecidos materno-fetais que funcionem como biomarcadores para avaliação da toxicidade. Neste projeto, ferramentas proteômicas e técnicas espectroscópicas de alta tecnologia em Espectrometria de Massas, como a "Trapped Ion Mobility Mass Spectrometry" são utilizadas para identificação, detecção e mapeamento de proteínas em tecido do cordão umbilical humano, oriundos de mulheres usuárias de cannabis e cocaína durante o período gestacional. Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa. Alunos envolvidos: Doutorado: (1) .</p> |
| <p>2015 - Atual</p> | <p>Integrantes: Jefferson Pereira e Silva - Coordenador / Mauricio Yonamine - Integrante / Francisco Fernandez-Lima - Integrante. Financiador(es): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Auxílio financeiro. CAPES PRÓ-FORENSES - Auxílio 3419/2014 Novas estratégias bioanalíticas aplicadas a estudos em Toxicologia Forense Descrição: As análises toxicológicas envolvem a aplicação de ferramentas e conhecimentos de Química Analítica para a identificação e quantificação de substâncias que podem exercer efeitos nocivos nos seres vivos. Em Toxicologia Forense, as análises toxicológicas são aplicadas em diferentes contextos, como na investigação médico-legal para se determinar a causa da morte, no monitoramento do uso de álcool e drogas por motoristas, na avaliação da exposição fetal a drogas ilícitas e no controle antidoping no esporte. Diferentes grupos de compostos químicos são de interesse, como etanol, drogas de abuso (cocaína, canabinoides, anfetaminas, opiáceos) e medicamentos. Frequentemente, as análises são realizadas em espécimes biológicos, que consistem de fluidos ou tecidos coletados da vítima ou do indivíduo a ser avaliado. As diferentes propriedades físico-químicas das substâncias envolvidas e a natureza das matrizes biológicas constituem um desafio analítico constante para o toxicologista forense. Desta forma, nosso grupo de pesquisa propõe o desenvolvimento de novos métodos analíticos para detecção de diversos agentes tóxicos de interesse forense em matrizes biológicas convencionais (como urina e sangue total) e alternativas (como cabelo, humor vítreo, saliva, suor e vísceras). Nestes métodos, privilegiaremos a utilização de técnicas recentes de preparação de amostras como a microextração em fase sólida (SPME, do inglês, solid phase microextraction), a microextração em fase líquida (LPME, do inglês, liquid phase microextraction), a extração acelerada por solvente (ASE, do inglês, accelerated solvent extraction) e a extração em fase sólida modificada com ponteiros descartáveis (DPX, do inglês, disposable pipette extraction) para posterior análise cromatográfica (cromatografia em fase gasosa ou cromatografia líquida, acoplada ou não à espectrometria de massa). Estas técnicas têm como característica maior praticidade, rapidez e menor utilização de solventes orgânicos do que as técnicas convencionais de extração, sendo consideradas como pouco destrutíveis. Para o desenvolvimento dos métodos também utilizaremos ferramentas estatísticas de tratamento dos dados gerados, como a metodologia de superfície de resposta (RSM) para otimização de diversos parâmetros analíticos. A validação e análise de incerteza também serão aplicadas nos métodos desenvolvidos, de acordo com guias internacionais. Após o desenvolvimento dos métodos, estes são aplicados em amostras provenientes de casos reais do Instituto Médico Legal de São Paulo. Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa. Alunos envolvidos: Graduação: (2) / Mestrado acadêmico: (3) / Doutorado: (4) .</p> |
| <p>2015 - Atual</p> | <p>Integrantes: Jefferson Pereira e Silva - Integrante / Katia Cypriano de Melo - Integrante / Gabriela de Oliveira Silveira - Integrante / Mauricio Yonamine - Coordenador / Vilma Leyton - Integrante / Bruno Spinosa de Maritinis - Integrante / Ivan Dieb Mizziara - Integrante. FAPESP 2015/15700-3 - Avaliação da exposição fetal e infantil à cocaína e canabinoides por meio de análise toxicológica em leite materno, meconio e tecido do cordão umbilical Descrição: O aumento no número de usuárias de drogas em idade fértil leva a preocupação crescente com relação à exposição da criança a drogas durante os períodos gestacional e lactacional devido aos acometimentos obstétricos, neonatais e na infância que podem ser decorrentes do uso agudo ou crônico por parte da mãe. O abuso de drogas como cocaína e maconha por gestantes e lactantes pode causar danos em curto e longo prazos no neonato, além de favorecer a negligência materna e aumentar as taxas de mortalidade fetal. Os dados epidemiológicos no Brasil a esse respeito são escassos e a avaliação deste tipo de exposição depende em grande parte do relato da própria mãe, que muitas vezes omite ou nega o consumo de drogas. Nesse contexto, a determinação de substâncias em matrizes biológicas que identifiquem a exposição da criança pode representar a melhor forma de caracterizar o problema e guiar as decisões da equipe de saúde de modo mais seguro. Alguns estudos com matrizes alternativas materno-fetais têm utilizado meconio e, mais recentemente, cordão umbilical para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico da exposição do feto. No que diz respeito à exposição durante o aleitamento, a determinação direta de compostos ativos no leite humano seria a melhor forma para se estimar o grau em que a criança está sendo exposta por esta via. Assim, um dos objetivos do projeto é investigar a aplicabilidade do tecido do cordão umbilical em comparação ao meconio como alternativa de diagnóstico e comprovação da exposição in utero à cocaína e canabinoides. Um segundo objetivo é determinar as concentrações de substâncias ativas (cocaína, cocainileno, norcocaína, tetraidrocanabinol, canabinol e canabidiol) que podem ser secretadas em leite materno humano. Para atingir os objetivos, métodos serão desenvolvidos visando à detecção dos analitos de interesse nas matrizes meconio, tecido do cordão umbilical e leite materno, privilegiando-se o uso de técnicas recentes de preparação de amostras, como a extração acelerada por solvente (ASE) e a microextração em fase líquida (LPME). A identificação e quantificação das substâncias psicoativas serão realizadas através de cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). Os métodos desenvolvidos e</p> |

validados serão aplicados em amostras de leite coletadas no Hospital Municipal Dr. Arthur Ribeiro de Saboya e amostras de mecônio e cordão umbilical coletadas no Hospital Universitário-USP.

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação: (1) / Mestrado acadêmico: (2) / Doutorado: (1) .

| | |
|-------------|---|
| 2010 - 2012 | <p>Integrantes: Jefferson Pereira e Silva - Integrante / Gabriela de Oliveira Silveira - Integrante / Mauricio Yonamine - Coordenador / Edna Maria de Albuquerque Diniz - Integrante / Alexandre Dias Zucoloto - Integrante.</p> <p>Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Auxílio financeiro.</p> <p>Consolidação e expansão da linha de Helminologia do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários da UFPA - Implantação de Rede de Cooperação Acadêmica UFPA/UFV/FIOCRUZ</p> <p>Descrição: Esta proposta visa o fortalecimento do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários (PPG BAIP) da Universidade Federal do Pará (UFPA), por meio da consolidação de sua linha de pesquisa em Helminologia com foco na particularidade da diversidade de fauna da Floresta Amazônica e, por conseguinte, enorme variedade de modelos na relação parasitos hospedeiros na região Norte do Brasil. Assim, constituiu-se a base do que a seguir será apresentado. Como IES</p> <p>Proponente, a Universidade Federal do Pará, por meio do PPG BAIP, associou-se a dois outros programas de pós-graduação, sendo estes tradicionais e de excelência em Bioquímica e Biologia Molecular e em Parasitologia, de maneira a preencher lacuna existente na linha de pesquisa em Helminologia do PPG BAIP, bem como permitir a mobilidade acadêmica docente e discente, melhorando sua qualificação e fixação na região. Assim, respectivamente, com a Universidade Federal de Viçosa, por meio de seu Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola (conceito CAPES 5) e o Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, com o Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária (conceito CAPES 6), propõe-se a implantação de uma Rede de Cooperação Acadêmica entre os diferentes laboratórios envolvidos e suas equipes constituintes, considerando as particularidades e facilidades quanto infra-estrutura, qualificação e áreas de atuação.</p> <p>Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.</p> |
| 2006 - 2010 | <p>Integrantes: Jefferson Pereira e Silva - Integrante / Jeannie Nascimento dos Santos - Coordenador / Arnaldo Maldonado Júnior - Integrante / Cláudia Portes Santos Silva - Integrante.</p> <p>Financiador(es): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Auxílio financeiro.</p> <p>Biodiversidade da Helmintofauna de Aqueios ucayalensis Castelnau, 1855 (Siluriforme Pisces) da foz do Rio Guamá e Baía do Guajará, Belém, Pará</p> <p>Descrição: Identificação da helmintofauna do A. ucayalensis (Mandubé), realizando a descrição de possíveis espécies novas e re-descrição das já existentes, em hospedeiros da mesma família, por meio das técnicas de microscopia de luz, eletrônica de varredura e de transmissão, bem como biologia molecular, com finalidade de adicionar dados sobre a biodiversidade de helmintos, agentes etiológicos em potencial de zoonoses emergentes. Este projeto também se caracteriza como projeto de Tese de Doutorado desenvolvido dentro dos objetivos do Projeto intitulado "COOPERAÇÃO ACADÊMICA ENTRE A UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO E A UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ PARA A PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO EM HELMINTOLOGIA" (PROCAD-CAPIES Edital 2005), para a formação de recursos humanos com características de parasitologista na área de Helminto.</p> <p>Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.</p> |
| | <p>Integrantes: Jefferson Pereira e Silva - Integrante / Jeannie Nascimento dos Santos - Coordenador / ELANE - Integrante / THIAGOW - Integrante.</p> <p>Financiador(es): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Auxílio financeiro.</p> |

Projetos de extensão

| | |
|-------------|---|
| 2007 - 2008 | <p>Avaliação da incidência de filariose canina em Municípios da Ilha do Marajó.</p> <p>Descrição: Projeto de Extensão, em desenvolvimento no Laboratório de Biologia Celular do Departamento de Biologia do Centro de Ciências Biológicas, desta UFPA; que está sendo realizado em continuidade a Projeto de Extensão anteriores que fez um censo hemoscópico de amostragem da população canina e felina de Belém e sua região metropolitana e tem sido observada ausência de animais microfilariêmicos, num total de 1200 cães até o presente momento. A convite da Secretaria de Saúde do Estado do Pará (SESPA) através da Sétima Regional de Proteção Social da Ilha do Marajó, o projeto atual visa avaliar a real prevalência da filariose canina na região do Marajó, investigando ainda a possibilidade da incidência de dirofilariose pulmonar humana em municípios marajoaras.</p> <p>Situação: Concluído; Natureza: Extensão.</p> <p>Alunos envolvidos: Graduação: (5) .</p> |
| | <p>Integrantes: Jefferson Pereira e Silva - Integrante / Jeannie Nascimento dos Santos - Coordenador.</p> <p>Financiador(es): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Auxílio financeiro.</p> |

Revisor de periódico

| | |
|--------------|---|
| 2014 - 2015 | Periódico: Journal of Cell and Animal Biology |
| 2014 - 2015 | Periódico: Journal of Entomology, Ornithology and Herpetology: Current Research |
| 2015 - 2015 | Periódico: Fungal Genomics and Biology |
| 2016 - Atual | Periódico: Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (Impresso) |

Áreas de atuação

| | |
|----|--|
| 1. | Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Toxicologia Analítica. |
| 2. | Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Toxicologia Forense. |
| 3. | Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Helminologia/Especialidade: Proteômica. |

Idiomas

| | |
|----------|---|
| Inglês | Comprende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem. |
| Espanhol | Comprende Bem, Fala Pouco, Lê Bem, Escreve Razoavelmente. |

Prêmios e títulos

| | |
|------|---|
| 2019 | Top 10 Scored Poster Presentation, 13th Summer School of Mass Spectrometry in Biotechnology and Medicine - Croatia. |
| 2018 | Programa de Doutorado Sanduíche - Processo: PDSE - 88881.187736/2018-01, CAPES. |
| 2017 | Sao Paulo School of Advanced Science on Mass Spectrometry-based Proteomics (SPSAS-MS), UNBio-CNPq. |

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

Ordem Cronológica

1. ★ SILVEIRA, GABRIELA DE OLIVEIRA ; PEGO, ANA MIGUEL FONSECA ; PEREIRA E SILVA, JEFFERSON ; YONAMINE, MAURICIO . Green sample preparations for the bioanalysis of drugs of abuse in complex matrices. *Bioanalysis*, v. 11, p. 10-4155/bio-201, 2019.
- 2.

- ★ MANTOVANI, CINTHIA DE CARVALHO ; SILVA, JEFFERSON PEREIRA E ; FORSTER, GUILHERME ; ALMEIDA, RAFAEL MENCK DE ; DINIZ, EDNA MARIA DE ALBUQUERQUE ; YONAMINE, MAURICIO . Simultaneous accelerated solvent extraction and hydrolysis of 11-nor-9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid glucuronide in meconium samples for gas chromatography-mass spectrometry analysis. JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B-ANALYTICAL TECHNOLOGIES IN THE BIOMEDICAL AND LIFE SCIENCES **JCR**, v. 1074-1075, p. 1-7, 2018.
3. ★ SILVA, JEFFERSON PEREIRA; YONAMINE, MAURICIO . Bioanalytical and methodological challenges in the evaluation of fetal exposure. *Bioanalysis* **JCR**, v. 10, p. 713-716, 2018.
4. SILVA, J. P.; FURTADO, A.P.; SANTOS, J. N. . *Ortleppascaris* sp. and your host *Rhinella marina*: A proteomic view into a nematode-amphibian relationship. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* **JCR**, v. 3, p. 118-123, 2014.
Citações: **SCOPUS 1**
5. ★ SILVA, J. P.; FURTADO, A.P.; SANTOS, J. N. . Proteomic profile of *Ortleppascaris* sp.: A helminth parasite of *Rhinella marina* in the Amazonian region. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* **JCR**, v. 3, p. 67-74, 2014.
Citações: **SCOPUS 4**
6. SILVA, J. P.; MELO, F.T.V.; NASCIMENTO, L.C.S.; Gonçalves, E. C.; GIESE, E.G.; FURTADO, A.P.; SANTOS, J. N. . Morphological and Molecular Characterization of *Ortleppascaris* Sp. Larvae, Parasites of the Cane Toad *Rhinella marina* from Eastern Amazonia. *JOURNAL OF PARASITOLOGY* **JCR**, v. 99, p. 118-123, 2013.
Citações: WEB OF SCIENCE™ 6 | **SCOPUS 9**
7. SILVA, J. P.; SILVA, D. C.; MELO, F.T.V.; GIESE, E.G.; FURTADO, A.P.; SANTOS, J. N. . Liver Histopathology in the Cane Toad, *Rhinella marina* (Amphibia: Bufonidae), Induced by *Ortleppascaris* sp. Larvae (Nematoda: Ascarididae). *Journal of Parasitology* **JCR**, v. 99, p. 250-256, 2013.
Citações: WEB OF SCIENCE™ 5 | **SCOPUS 8**
8. ★ SILVA, J. P.; MELO, F.T.V.; Gonçalves, E. C.; FURTADO, A.P.; GIESE, E.G.; SILVA, C.P.; SANTOS, J. N. . Taxonomic status and redescription of the genus *Brascystis* Thatcher, 1979 (Digenea: Didymozoidae). *Parasitology International (Print)* **JCR**, p. 208-214, 2013.
Citações: WEB OF SCIENCE™ 1 | **SCOPUS 1**

Resumos publicados em anais de congressos

1. PEREIRA E SILVA, JEFFERSON; YONAMINE, M.; LINHARES, A. L. F. A.; FRANCISCO, R. V.; HALER, J.; FERNANDEZ-LIMA, F. . Trapped Ion Mobility Mass Spectrometry and LC-MS/MS-Based Proteomics for Prospection of Drug Exposure and Toxicity Biomarkers in Human Umbilical Cord Tissue. In: 13th Summer School of Mass Spectrometry in Biotechnology and Medicine, 2019, Dubrovnik. Book of Abstracts, 2019.
2. LINHARES, A. L. F. A.; SOUZA, F. R.; ALVES, M. J. N. N.; MACHADO, Y.; LORDEIRO, R. A.; PEREIRA E SILVA, JEFFERSON; YONAMINE, M. . Paper spray-mass spectrometry ionization of anabolic androgenic steroids in dried urine spots. In: XXI Brazilian Congress of Toxicology XV TIAFT LATIN-AMERICAN REGIONAL MEETING, 2019, Águas de Lindóia. Book of Abstracts, 2019.
3. SILVA, JEFFERSON PEREIRA E; YONAMINE, M.; LINHARES, A. L. F. A.; FRANCISCO, R. V.; KREBS, V.; HALER, J.; FERNANDEZ-LIMA, F. . Fetotoxicity and Drug Abuse: New Clues on Molecular Pathways Unveiled by Trapped Ion Mobility Mass Spectrometry and LC-MS/MS-Based Proteomics. In: XXI Brazilian Congress of Toxicology - XV TIAFT LATIN-AMERICAN REGIONAL MEETING, 2019, Águas de Lindóia. Abstract Book, 2019.
4. PEREIRA E SILVA, JEFFERSON; TAVARES, I. S.; FRANCISCO, R. V.; KREBS, V.; OLIVEIRA, A. M.; YONAMINE, MAURICIO . Optimization of QuEChERS Extraction For GC-MS Determination of Cannabinoids In Human Umbilical Cord Tissue.. In: 6º Encontro Nacional de Química Forense, 2018, Ribeirão Preto. Livro de Resumos - 6 Enqfor, 2018.
5. SILVA, J. P.; YONAMINE, M. . UMBILICAL CORD TISSUE AS A NEW MATRIX FOR THE TOXICOLOGICAL ASSESSMENT OF FETAL EXPOSURE TO CANNABINOIDS AND COCAINE. In: Sao Paulo School of Advanced Science (SPSAS), 2017, Campinas. Book of Abstracts, 2017.

Apresentações de Trabalho

1. PEREIRA E SILVA, JEFFERSON. Avanços Científicos na Toxicologia: do colorimétrico à predição in silico. 2019. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
2. SILVA, J. P. Drogas de Abuso: Estado da Arte e Aspectos Toxicológicos. 2018. (Apresentação de Trabalho/Outra).
3. SILVA, J. P. Toxicologia: da ciência experimental à aplicabilidade prática. 2018. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
4. SILVA, J. P.; FURTADO, A.P.; SALVADOR, A. C. R.; RAMOS, H. J. O.; SANTOS, J. N. . Caracterização proteômica de extrato somático de *Ortleppascaris* sp. (Nematoda), parasita de anfíbio *Rhinella marina*. 2012. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

Demas tipos de produção técnica

1. SILVA, J. P.; Ana Carolina dos Santos Durão ; André Luis Fabris ; Lidia Emmanuela Wiazowski Spelta ; Vitor Bruno ; Gustavo Henrique Oliveira da Rocha ; Marina de Paula Silva . Detecção de Drogas em Matrizes Biológicas. 2018. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).
2. SILVA, J. P. Determinação de etanol em amostra de saliva por Headspace em GC-FID. 2017. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).
3. SILVA, J. P. DETECÇÃO DE ESTIMULANTES EM URINA POR EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO E GC-NPD. 2016. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).
4. SILVA, J. P.; SANTOS, J. N. ; FURTADO, A.P. . Proteomic profile of *Ortleppascaris*. 2014. (Desenvolvimento de material didático ou instrucional - vídeo educacional).
5. SILVA, J. P. Educação em Saúde Pública para Prevenção e Controle de Parasitose. 2008. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).

Produção artística/cultural

Artes Cênicas

1. SANTOS, J. N. ; SILVA, J. P. ; BASTOS, M.L. ; CAMPOS, D.J.M. ; CARDOSO, E.T.C ; D'ENCARNAÇÃO, F.S. ; FURTADO, A.P. ; LOBO, D.S. ; MAIA, A. A. C. ; MARTINS, M.B. ; PENHA, N.S. ; QUARESMA, L.C.F. ; SARMENTO, R.M. . Uma noite no imaginário de Alex. 2009. Teatral.

Artes Visuais

1. PEREIRA E SILVA, JEFFERSON; YONAMINE, M. . Avaliação Toxicológica do Uso de Drogas na Gravidez. 2019. Vídeo.

Bancas

Participação em bancas de trabalhos de conclusão

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1. PINTO JUNIOR, E.; TROSSINI, G. H. G.; SILVA, J. P. Participação em banca de Lúgia Yuki Takai. Cannabinoides sintéticos: uma revisão dos aspectos toxicológicos. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade de São Paulo.
2. SILVA, J. P.; YONAMINE, M.; MARCOURAKIS, T.; GIROLA, J. Participação em banca de Marcela Bitar Araújo Lima. Adulteração de medicamentos: incidência, legislação e riscos à saúde. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia e Bioquímica) - Universidade de São Paulo.
3. SILVA, JEFFERSON PEREIRA. Participação em banca de Amanda Rodrigues Mendes. O Café como fonte de exposição humana a cafeína: Implicações para à Saúde. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Centro Universitário São Camilo.

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. 13th Summer School of Mass Spectrometry in Biotechnology and Medicine. Trapped Ion Mobility Mass Spectrometry and LC-MS/MS-Based Proteomics for Prospection of Drug Exposure and Toxicity Biomarkers in Human Umbilical Cord Tissue. 2019. (Outra).
2. XXI Brazilian Congress of Toxicology - XV TIAFT LATIN-AMERICAN REGIONAL MEETING. Fetotoxicity and Drug Abuse: New Clues on Molecular Pathways Unveiled by Trapped Ion Mobility Mass Spectrometry and LC-MS/MS-Based Proteomics. 2019. (Congresso).
3. XXI Brazilian Congress of Toxicology - XV TIAFT LATIN-AMERICAN REGIONAL MEETING. Paper spray-mass spectrometry ionization of anabolic androgenic steroids in dried urine spots. 2019. (Congresso).
4. 6º Encontro Nacional de Química Forense. OPTIMIZATION OF QUECHERS EXTRACTION FOR GC-MS DETERMINATION OF CANNABINOIDS IN HUMAN UMBILICAL CORD TISSUE. 2018. (Encontro).
5. Análises de drogas de abuso em matrizes biológicas. 2017. (Outra).

6. FEBRACE - Feira Brasileira de Ciências e Engenharia. 15ª Feira Brasileira de Ciências e Engenharia. 2017. (Feira).
7. São Paulo School of Advanced Science on Mass Spectrometry-based Proteomics SPSAS-MS. UMBILICAL CORD TISSUE AS A NEW MATRIX FOR THE TOXICOLOGICAL ASSESSMENT OF FETAL EXPOSURE TO CANNABINOIDS AND COCAINE. 2017. (Encontro).
8. Separações Cromatográficas. 2017. (Outra).
9. 43º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas. 2016. (Congresso).
10. I International Symposium on Pathophysiology and Toxicology. 2015. (Simpósio).
11. VI Simpósio de Pós-Graduação em Análises Clínicas - SIMPAC. 2015. (Simpósio).
12. I Curso do Instituto Carlos Chagas/Fiocruz-PR em biociências e biotecnologia. 2012. (Oficina).
13. Patógenos desafiadores e tópicos e técnicas experimentais avançadas. 2012. (Simpósio).
14. XVII congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária/XXIII Jornada Maranhense de Parasitologia e Medicina Tropical. Análise comparativa de procedimentos de extração de proteínas em larvas de *Nematoda Orlheppascaris* sp.. 2012. (Congresso).
15. XXVIII Congresso Brasileiro de Zoologia. OCORRÊNCIA DE DIGENEIA DA FAMÍLIA Didymozoidae EM Plagioscion squamosissimus Heckel, 1840 (PERCIFORMES, SCIAENIDAE) NO RIO GUAMÁ E BAÍA DO GUAJARÁ, BELÉM-PARÁ. 2010. (Congresso).
16. 61ª Reunião Anual da SBPC. Atividades de ensino, pesquisa e extensão na creche "Iar criança esperança" - Marituba - PA - Realização de um censo parasitológico. 2009. (Congresso).
17. III Jornada de Iniciação Científica dos grupos PET do Pará. Atividade de Extensão em Saúde do PET Farmácia UFPA na ILHA GRANDE, BELÉM -PA. 2008. (Encontro).
18. VII JORNADA DE URGÊNCIA EM TOXICOLOGIA DE BELÉM. 2008. (Outra).

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1. YONAMINE, M.; Gustavo Henrique Oliveira da Rocha; Lidia Emmanuela Wiazowski Spelta; Marina de Paula Silva; André Luis Fabris; Vitor Bruno; Ana Carolina dos Santos Durão; SILVA, J. P.. VII Escola de Inverno em Toxicologia? USP. 2018. (Outro).
2. SILVA, J. P.; MELO, K. C.; ROVERI, F.; HENAO, M. M. M.; SILVEIRA, G. O.; TAVARES, I. S.; ELLER, S. C. W. S.; PEGO, A. M. F.. I CURSO DE EXTENSÃO EM TOXICOLOGIA FORENSE. 2015. (Outro).
3. SANTOS, J. N.; GIESE, E.G.; SILVA, J. P.; Fabrisia Silva d'Encarnação; Luciana de Cássia S. do Nascimento; Luciana Santana Silva; MAIA, A. A. C.; PENHA, N.S.; CAMPOS, D.M.; MARTINS, M.B.; MELO, F.T.V.; NASCIMENTO, L.C.S.; FURTADO, A.P.; CARDOSO, E.T.C; LOBO, D.S.; QUARESMA, L.C.F.; BASTOS, M.L.; SARMENTO, R.M.. I Simpósio de Toxicologia Humana e Ambiental. 2009. (Outro).
4. SANTOS, J. N.; SILVA, J. P.; Fabrisia Silva d'Encarnação; MAIA, A. A. C.; NASCIMENTO, L.C.S.; MARTINS, M.B.; PENHA, N.S.; CAMPOS, D.M.. Ciências Farmacêuticas: Uma evolução contínua. 2009. (Outro).
5. SANTOS, J. N.; SILVA, J. P.; MAIA, A. A. C.; Luciana Santana Silva; Luciana de Cássia S. do Nascimento; Fabrisia Silva d'Encarnação. 1º Simpósio Paraense de Helminthologia. 2008. (Outro).
6. SANTOS, J. N.; SILVA, J. P.; MAIA, A. A. C.; Luciana Santana Silva; Fabrisia Silva d'Encarnação; Luciana de Cássia S. do Nascimento. Quintas do Farmacêutico. 2008. (Outro).

Inovação

Projetos de pesquisa

2018 - Atual

Utilização de Espectrometria de Massas de Alta Resolução e Proteômica para prospecção de biomarcadores relativos ao abuso de drogas na gravidez em tecido de cordão umbilical - Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior - POSE - 88881.187736/2018-01
 Descrição: A presença da droga inalterada ou de um único dos seus produtos de biotransformação em uma determinada matriz biológica pode ser o suficiente para comprovar o uso pelo indivíduo, mas não a severidade e o impacto da exposição química. Neste sentido, novos modelos de avaliação da exposição fetal a fatores de risco tem sido pensados. Para tal, estudos recentes tem reunido esforços no intuito de encontrar, de modo exploratório, algumas moléculas ligadas à fisiologia de tecidos materno-fetais que funcionem como biomarcadores para avaliação da toxicidade. Neste projeto, ferramentas proteômicas e técnicas espectroscópicas de alta tecnologia em Espectrometria de Massas, como a "Trapped Ion Mobility Mass Spectrometry" são utilizadas para identificação, detecção e mapeamento de proteínas em tecido do cordão umbilical humano, oriundos de mulheres usuárias de cannabis e cocaína durante o período gestacional.
 Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.
 Alunos envolvidos: Doutorado: (1).

Integrantes: Jefferson Pereira e Silva - Coordenador / Maurício Yonamine - Integrante / Francisco Fernandez-Lima - Integrante. Financiador(es): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Auxílio financeiro.

Educação e Popularização de C & T

Apresentações de Trabalho

1. PEREIRA E SILVA, JEFFERSON. Avanços Científicos na Toxicologia: do colorimétrico à predição in silico. 2019. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

Cursos de curta duração ministrados

1. SILVA, J. P.. Determinação de etanol em amostra de saliva por Headspace em GC-FID. 2017. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).
2. SILVA, J. P.; Ana Carolina dos Santos Durão; André Luis Fabris; Lidia Emmanuela Wiazowski Spelta; Vitor Bruno; Gustavo Henrique Oliveira da Rocha; Marina de Paula Silva. Detecção de Drogas em Matrizes Biológicas. 2018. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).

Desenvolvimento de material didático ou instrucional

1. SILVA, J. P.; SANTOS, J. N.; FURTADO, A.P.. Proteomic profile of *Ortleppascaris*. 2014. (Desenvolvimento de material didático ou instrucional - vídeo educacional).

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1. SILVA, J. P.; MELO, K. C.; ROVERI, F.; HENAO, M. M. M.; SILVEIRA, G. O.; TAVARES, I. S.; ELLER, S. C. W. S.; PEGO, A. M. F.. I CURSO DE EXTENSÃO EM TOXICOLOGIA FORENSE. 2015. (Outro).

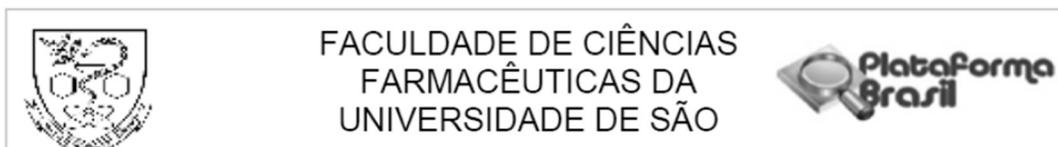
Artes Visuais

1. PEREIRA E SILVA, JEFFERSON; YONAMINE, M.. Avaliação Toxicológica do Uso de Drogas na Gravidez. 2019. Vídeo.

Outras informações relevantes

Membro das associações: The International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT), European Society of Toxicology In Vitro e Sociedade Brasileira de Espectrometria de Massas.

ANEXO 9. Aprovação do Comitê de Ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Tecido do cordão umbilical como nova matriz para o diagnóstico da exposição fetal ao tetraidrocannabinol e à cocaína: comparação com mecônio

Pesquisador: Mauricio Yonamine

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 53929216.8.0000.0067

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: FUND COORD DE APERFEICOAMENTO DE PESSOAL DE NIVEL SUP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.744.736

Apresentação do Projeto:

Projeto para validação de uma nova matriz para diagnóstico da utilização de substâncias psicoativas durante a gestação. Projeto para doutoramento do aluno Jeferson Pereira e Silva. Aprovado previamente nos CEPs competentes e atualmente apresenta emenda para inclusão de adolescentes e coleta de dados nos recém-nascidos. Os pesquisadores fizeram as devidas mudanças no TCLE e na ficha de coleta de dados.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar perfil epidemiológico do uso de substâncias ilícitas em gestantes e as consequências para os recém-nascidos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos mínimos

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto de pesquisa já aprovado pelo CEP.

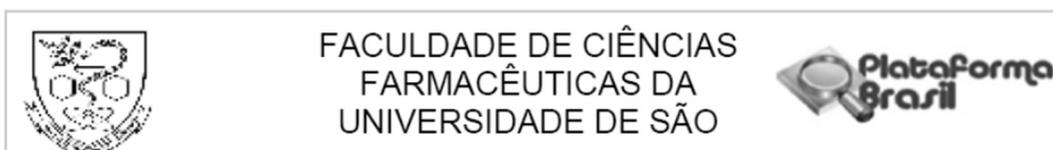
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE obedece Resolução 466/12 do CNS

Recomendações:

Sem recomendações.

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfct@usp.br



Continuação do Parecer: 1.744.736

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem inadequações/pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este CEP entende que a emenda ao projeto de pesquisa pode ser considerada aprovada.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|--|------------------------|-------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_761371E1.pdf | 18/07/2016 16:34:22 | | Aceito |
| Outros | instrumento_coleta_de_dados.pdf | 18/07/2016 16:29:37 | Mauricio Yonamine | Aceito |
| Outros | Justificativa_para_Emenda.pdf | 18/07/2016 16:28:40 | Mauricio Yonamine | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | novo_TCLE_emenda.pdf | 18/07/2016 16:27:17 | Mauricio Yonamine | Aceito |
| Outros | Carta_resposta_CEP.pdf | 12/04/2016 17:36:08 | Mauricio Yonamine | Aceito |
| Outros | Justificativa_Biorrepositorio.pdf | 12/04/2016 17:34:51 | Mauricio Yonamine | Aceito |
| Outros | Declaracao_Infraestrutura_E_Compromisso.pdf | 12/04/2016 17:34:20 | Mauricio Yonamine | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | Novo_TCLE_abril_2016.pdf | 12/04/2016 17:33:23 | Mauricio Yonamine | Aceito |
| Folha de Rosto | Folha_de_rosto_jefferson.pdf | 04/03/2016 11:08:54 | Mauricio Yonamine | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | declaracao_participacao_Jefferson.pdf | 02/03/2016 12:56:27 | Mauricio Yonamine | Aceito |
| Outros | HU_Declaracao_sobre_beneficios_resultantes.pdf | 02/03/2016 11:50:15 | Mauricio Yonamine | Aceito |
| Outros | HU_declaracao_de_compromisso_pesquisador.pdf | 02/03/2016 11:46:15 | Mauricio Yonamine | Aceito |
| Outros | HU_Cronograma_de_execucao.pdf | 02/03/2016 11:43:52 | Mauricio Yonamine | Aceito |
| Outros | Orcamento_HU.pdf | 02/03/2016 11:42:17 | Mauricio Yonamine | Aceito |
| Outros | Instrumento_de_coleta_de_dados_jefferson.pdf | 02/03/2016 11:37:02 | Mauricio Yonamine | Aceito |
| Outros | HU_cadastro_de_protocolo_de_pesquisa.pdf | 02/03/2016 | Mauricio Yonamine | Aceito |

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112

Bairro: Butantã

CEP: 05.508-000

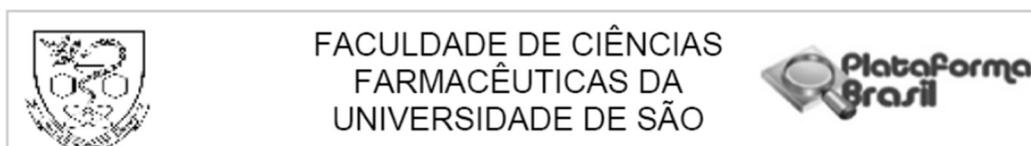
UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-3622

Fax: (11)3031-8986

E-mail: cepfcf@usp.br



Continuação do Parecer: 1.744.736

| | | | | |
|---|--|------------------------|-------------------|--------|
| Outros | isa.pdf | 11:34:03 | Mauricio Yonamine | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | Projeto_detalhado.pdf | 01/03/2016 18:31:36 | Mauricio Yonamine | Aceito |
| Outros | Anuencia_Departamento_SANDRAFAR SKY.pdf | 01/03/2016 18:27:49 | Mauricio Yonamine | Aceito |
| Outros | Descricao_da_equipe_jefferson.pdf | 01/03/2016 18:26:10 | Mauricio Yonamine | Aceito |
| Outros | APROVA_CIAPP.pdf | 01/03/2016 18:22:56 | Mauricio Yonamine | Aceito |
| Outros | APROVA_CEP_DOG.pdf | 01/03/2016 18:22:14 | Mauricio Yonamine | Aceito |
| Outros | CAR_ANUENCIA_HU_DR_ROSSANA.pdf | 01/03/2016 18:19:26 | Mauricio Yonamine | Aceito |
| Outros | Anuencia_CPesq_Mauricio_Yonamine.pdf | 01/03/2016 18:18:22 | Mauricio Yonamine | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE_Jefferson_Pereira.pdf | 01/03/2016 18:13:14 | Mauricio Yonamine | Aceito |
| Recurso Anexado pelo Pesquisador | Recurso_APROVADO_capes_forense_DOU.pdf | 01/03/2016 18:12:01 | Mauricio Yonamine | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | declaracao_participacao_Edna_Diniz.pdf | 01/03/2016 18:09:22 | Mauricio Yonamine | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | Declaracao_participacao_Rossana_vieira.pdf | 01/03/2016 18:08:03 | Mauricio Yonamine | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | declaracao_de_participacao_vera_krebs.pdf | 01/03/2016 18:07:08 | Mauricio Yonamine | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | Infraestrutura_Pesq_Mauricio_Yonamine.pdf | 01/03/2016 18:00:53 | Mauricio Yonamine | Aceito |
| Cronograma | Cronograma.pdf | 01/03/2016 17:55:05 | Mauricio Yonamine | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

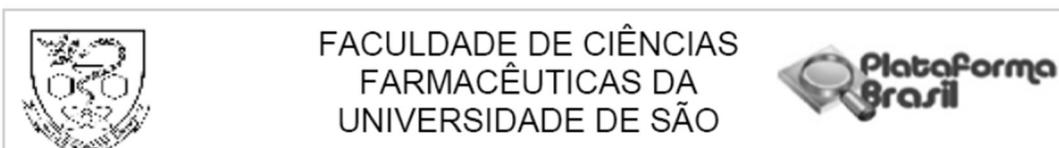
Necessita apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 26 de Setembro de 2016

Assinado por:
Cristina Northfleet de Albuquerque
(Coordenador)

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfct@usp.br



Continuação do Parecer: 1.744.736

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfcf@usp.br