

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Desenvolvimento e aplicação de método analítico para determinação
de substâncias psicoativas em amostras biológicas de motociclistas
empregando LC-MS/MS

Katia de Mello Cypriano

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Yonamine

São Paulo

2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Desenvolvimento e aplicação de método analítico para determinação
de substâncias psicoativas em amostras biológicas de motociclistas
empregando LC-MS/MS

Katia de Mello Cypriano

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 6018

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. 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

C994d CYPRIANO, KATIA DE MELLO
Desenvolvimento e aplicação de método analítico para determinação de substâncias psicoativas em amostras biológicas de motociclistas empregando LC-MS/MS / KATIA DE MELLO CYPRIANO. - São Paulo, 2019. 108 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Orientador: YONAMINE, MAURICIO
Coorientador: LEYTON, VILMA

1. Desenvolvimento de método analítico. 2. Drogas e trânsito. 3. Medicamentos e trânsito. 4. Toxicologia do desempenho. 5. Motociclistas. I. T. II. YONAMINE, MAURICIO , orientador. III. LEYTON, VILMA , coorientador.

Katia de Mello Cypriano

Desenvolvimento e aplicação de método analítico para determinação de substâncias psicoativas em amostras biológicas de motociclistas empregando LC-MS/MS

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Prof. Dr. Mauricio Yonamine

Orientador/ presidente

Prof. Dra. Alice Aparecida da Matta Chasin

1º examinador

Prof. Dr. André Valle de Bairros

2º examinador

Dra. Fabiane Dorr

3º examinador

São Paulo, 14 de novembro de 2019.

APOIO FINANCEIRO

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Processo n° 2016/20214-3, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

(FAPESP)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por permitir meu ingresso, realização e finalização desse projeto tão importante em minha vida.

À minha família que sempre esteve ao meu lado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mauricio Yonamine, pela orientação, oportunidade, paciência, confiança e pelo aprendizado que sempre me proporcionou com suas atitudes.

Às minhas colegas de laboratório Bia, Idylla, Flávia Roveri, Flávia Pine e Iolana pela parceria e pelos ensinamentos que me proporcionaram nesses anos.

Ao Anax, pela amizade e pelos ensinamentos sempre tão precisos.

À Ana Miguel, por me ouvir diversas vezes e principalmente pelas figuras e tabelas virginianamente formatadas.

À Gabi, agradeço pela parceria e por todo o auxílio nessa etapa final tão tensa.

Ao Jefferson, pela amizade, por estar sempre presente quando precisei, pelas risadas, parceria, apoio e baladas.

Ao Prof. Dr. José Luis da Costa, por me abrir as portas do seu laboratório na UNICAMP, por me orientar e acima de tudo pela amizade.

Às meninas da UNICAMP (Ana, Marília, Thaís e Isabela) pelas risadas, pelo auxílio e por me receberem tão bem.

À Paula Soubhia que me acolheu em sua casa todos os finais de semana que precisei sendo uma grande amiga e parceira em todos os aspectos.

À Kelly Francisco da Cunha, eu sinceramente não sei como agradecer, pois tudo o que eu escrever aqui será ínfimo e não corresponderá a minha eterna gratidão por tudo o que fez por mim. Por ter me acompanhado todos os dias em que estive na UNICAMP, pelos finais de semana que “desperdiçou” porque se comprometeu em me ajudar sem nunca ter tido uma mínima demonstração de mal humor. Por ter acordado de madrugada para checar se minhas corridas no HPLC não tinham parado, pelos almoços juntas, pela sua amizade, gentileza e solicitude sempre. Sem você eu não teria finalizado esse doutorado. Você foi um anjo em minha vida e já agradeço muito à Deus por ter colocado você no meu caminho!!

À Samantha, secretária da Pós Graduação, por ter sido sempre exemplar, me auxiliando em diversos aspectos.

À Profa. Vilma Leyton, pela parceria, pelos ensinamentos e por permitir que esse projeto se concretizasse.

Aos alunos da Profa. Vilma Leyton (Henrique, Ju Maga, Ju Takitane, Daniele, Giovana e todos que colaboraram de alguma maneira) pela parceria, coletas e compilação de dados.

Aos meus amigos que sempre estiveram por perto nos momentos de tensão e angústia vivenciados nesses anos me apoiando e me dando força.

À todos que de alguma forma contribuíram para a execução desse projeto.

Meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

CYPRIANO, K.M. **Desenvolvimento e aplicação de método analítico para determinação de substâncias psicoativas em amostras biológicas de motociclistas empregando LC-MS/MS.** 2019. 108 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Os acidentes de trânsito consistem em um grave problema de saúde pública, principalmente nos países em desenvolvimento. No Brasil, um dos recordistas mundiais nesse tipo de acidente, somente no ano de 2017 o número de mortos por essa causa foi de aproximadamente 35 mil, sendo que por volta de 12 mil eram motociclistas ou passageiros de moto. Dirigir sob efeito de substâncias psicoativas como drogas ilícitas e algumas classes de medicamentos pode aumentar significativamente o risco de ocorrências de acidentes automotivos. Pesquisas mostram que diversos fármacos psicoativos alteram a capacidade motora e cognitiva dos usuários, porém os únicos estudos brasileiros feitos com motociclistas avaliam a prevalência de uso de drogas ilícitas em usuários hospitalizados, não havendo assim trabalhos sobre o uso de outras substâncias psicoativas na população em geral de motociclistas. Visando a importância desse fato, o presente projeto avaliou a prevalência de drogas ilícitas (canabinoides, estimulantes e anfetaminas) e de fármacos psicoativos pertencentes às classes dos anti-histamínicos, relaxantes musculares, benzodiazepínicos e anorexígenos nas amostras de fluido oral de motociclistas na cidade de São Paulo. Para tal, foi desenvolvido um método analítico que utiliza a técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Além do desenvolvimento de um novo método analítico que poderá ser utilizado para o monitoramento de motoristas em geral, foram obtidos dados da prevalência do uso de drogas e medicamentos pelos motociclistas na cidade São Paulo, contribuindo assim para o desenvolvimento de medidas preventivas, políticas públicas e para o esclarecimento sobre os riscos de dirigir sob efeito de substâncias psicoativas.

Palavras-chave: substâncias psicoativas, motociclistas, drogas, medicamentos, validação de método analítico.

ABSTRACT

CYPRIANO, K.M. **Development and application of analytical method for psychoactive substances determination in biological samples of motorcyclists using LC-M/MS.** 2019. 108 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Traffic accidents are a serious public health problem, especially in developing countries. In Brazil, one of the world record holders in this kind of accident, in 2017 the number of death due to this cause was approximately 35 thousand, and nearly 12 thousand were motorcyclists or motorcycle passengers. Driving under the influence of psychoactive substances such as illicit drugs and some prescription drugs can significantly increase the risk of motor vehicle accidents. Researches shows that several psychoactive drugs alter the motor and cognitive capacity of users, but the few studies done in Brazil with motorcyclists evaluate the prevalence of illicit drug use in hospitalized users, thus there is no work on the use of other psychoactive substances in the general population of bikers. Considering the importance of this fact, the present project evaluated the prevalence of illicit drugs (cannabinoids, stimulants, and amphetamines) and psychoactive prescription drugs belonging to the classes of antihistamines, muscle relaxants, benzodiazepines and anorectics in motorcyclist's oral fluid samples in the city of São Paulo. Therefore, an analytical method has been developed using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. A new analytical method was developed and validated and may be used to monitor drivers in general. Data about drugs prevalence and drug use by motorcyclists in São Paulo city were obtained contributing to the development of preventive measures, public policies and for clarification on the risks of driving under the influence of psychoactive substances.

Keywords: psychoactive substances, motorcyclists, drug driving, analytical method validation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Comparação entre número de óbitos (em %) por categoria, nas regiões brasileiras nos anos de 2004 e 2015.....	6
Figura 2- Estrutura química da anfetamina e metanfetamina.....	11
Figura 3 - Estrutura química da mdma.	12
Figura 4 - Produtos de biotransformação, pirólise e transesterificação da cocaína.....	15
Figura 5 - Principais produtos do THC.	16
Figura 6 - Estrutura química dos fármacos ciclobenzaprina e amitriptilina.....	21
Figura 7 - ilustração de avisos utilizados em medicamentos psicoativos na Austrália, alertando os motoristas sobre três diferentes níveis de comprometimento psicomotor. psicomotor.	30
Figura 8 - Número de unidades de medicamentos classificados e suas respectivas classes. ...	30
Figura 9 - Período de detecção de diferentes matrizes biológicas.....	38
Figura 10 - Ilustração do dispositivo Quantisal®.....	51
Figura 11 - Fluxograma do preparo da amostra.	54
Figura 12 - Cromatograma dos analitos anfetamina (anf), metanfetamina (meta), mdma, cocaína (coc), benzoilecgonina (be), cocaetileno (ce), aeme, ciclobenzaprina (cbz), clonazepam (clo), clorfeniramina (cfe), dietilpropiona (dtp), meprobamato (mep), femproporex (fem) thc na concentração 50ng/ml e dos padrões internos deuterados anfetamina-d5(anf-d5), benzoilecgonina-d3 (be-d3), thc-d3 e clonazepam-d4 (clo-d4) na concentração de 20 ng/ml.	61
Figura 13 - Cromatogramas individuais da anfetamina-d5 e da aeme.	61
Figura 14 - Cromatogramas individuais da anfetamina, metanfetamina, mdma, benzoilecgonina, cocaína, clonazepam, thc e meprobamato.	62
Figura 15 - Cromatogramas individuais da benzoilecgonina-d3, clorfeniramina, ciclobenzaprina, dietilpropiona, femproporex, thc-d3, cocaetileno e clonazepam-d4.	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Custo total e médio por gravidade de acidente nas rodovias federais brasileiras no ano de 2014.....	3
Tabela 2 - Número de usuários no mundo e respectivas drogas no ano de 2017.....	8
Tabela 3 - Prevalência do consumo (pelo menos uma vez na vida) de substâncias psicoativas entre pessoas de 12 e 65 anos no brasil, no ano de 2015.....	9
Tabela 4 - Concentração máxima permitida de alguns fármacos em sangue para motoristas no reino unido.....	28
Tabela 7 - Valores de <i>cutoff</i> em fluido oral recomendados por sahmsa, druid e talloires.....	42
Tabela 6 - Analitos em estudo e seus respectivos padrões internos.....	57
Tabela 8 - Tempo de retenção, energia de colisão e relação massa carga (m/z) dos íons precursores, qualificadores e qualificadores dos analitos em estudo no método validado.....	60
Tabela 9 - Dados obtidos no ensaio de linearidade dos analitos presentes no método proposto.....	64
Tabela 10 - Valores de limite de detecção (lod), quantificação (loq) e valores de <i>cut-off</i> utilizados no presente método.....	66
Tabela 11 - Valores de precisão intra-ensaio obtidos com a análise de fluido oral dos controles baixo, médio e alto.....	67
Tabela 12 - Valores de precisão inter-ensaio obtidos com a análise de fluido oral dos controles baixo, médio e alto.....	68
Tabela 13 - Valores de exatidão obtidos com a análise de fluido oral dos controles baixo, médio e alto.....	69
tabela 14 - Valores de recuperação obtidos com a análise de fluido oral dos controles baixo (3ng/ml) e alto (40 ng/ml).....	70
Tabela 15 - Grau de escolaridade dos participantes da pesquisa.....	72
Tabela 16 - Número de motociclistas participantes do sexo feminino e masculino.....	72
Tabela 17- Número de motociclistas que já sofreram acidentes e gravidade dos mesmos.....	73
Tabela 18 - Número de motociclistas e respectiva frequência no uso de maconha, cocaína e anfetamínicos.....	75
Tabela 19- Amostras com resultado positivo para pelo menos uma das substâncias em estudo no método validado.....	79

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Ilustração das substâncias psicoativas que têm efeito (●) e que não têm efeito (-) sobre determinadas funções cerebrais.	10
Quadro 2 - Consumo de clonazepam em diferentes estados nos anos de 2009 a 2011.....	19
Quadro 3 - Consumo de anfepramona em diferentes estados nos anos de 2009 a 2011.	23
Quadro 4 - Exemplos de abordagens jurídicas utilizadas em diferentes países em casos de dirigir sob efeito de drogas.	29
Quadro 6 - Estrutura molecular, valor de pka e tempo de meia vida dos analitos em estudo..	34
Quadro 5 - Vantagens e desvantagens entre matrizes biológicas alternativas.	39
Quadro 7 - Solventes testados na extração dos analitos em estudo.....	53
Quadro 8 - Parâmetros cromatográficos utilizados no método validado.....	55
Quadro 9 - Parâmetros espectrométricos utilizados no método validado.	56

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Número de mortes em acidentes de trânsito e taxa de morte a cada 100.000.....	2
Gráfico 2 - Componentes de custo dos acidentes nas rodovias federais brasileiras no ano de 2014.	3
Gráfico 3 - Crescimento acumulado da frota de veículos automotores no brasil entre os anos de 2004 e 2015, representado em número bruto e porcentagem.	4
Gráfico 4 - Número de mortes em acidentes de trânsito no brasil, por categoria, no ano de 2016.	5
Gráfico 5 - Distribuição dos participantes por idade.	71
Gráfico 6 - Quantidade de horas em média, que os motociclistas guiam por dia.	73
Gráfico 7 - Número de motociclistas consumidores de bebida alcoólica e frequência do uso.	74
Gráfico 8 - Número de motociclistas e de doses de bebidas alcoólicas consumidas em um único dia.	74
Gráfico 9 - Classe de medicamentos consumidos no mínimo uma vez ao mês pelos motociclistas.	76

LISTA DE ABREVIATURAS

ABRAMET	Associação Brasileira de Medicina de Tráfego
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATS	Anfetaminas
BAC	Concentração de álcool no sangue, do inglês: <i>blood alcohol concentration</i>
BZD	Benzodiazepínicos
CG	Cromatografia gasosa, do inglês: <i>gas chromatography</i>
CTB	Código de trânsito brasileiro
%CV	Coefficiente de variação
DUI	Dirigir sob efeito, do inglês: <i>driving under the influence</i>
DUID	Dirigir sob efeito de drogas, do inglês: <i>driving under the influence of drugs</i>
GABA	Ácido gama-aminobutírico
Ipea	Instituto de pesquisas Econômicas Aplicadas
LC	Cromatografia líquida, do inglês: <i>liquid chromatography</i>
LOD	Limite de detecção, do inglês: <i>limit of detection</i>
LOQ	Limite de quantificação, do inglês: <i>limit of quantification</i>
MDMA	3,4-metilenodioximetanfetamina
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
SDLP	Desvio de posição lateral padrão, do inglês: <i>standard deviation of lateral position</i>
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema nervoso central
SNGPC	Sistema Nacional de Gerenciamento de Produtos Controlados
THC	Tetrahydrocannabinol
UNODC	<i>United Nations Office on Drugs and Crime</i>
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1	Introdução.....	1
1.1	Dados sobre acidentes de trânsito.....	1
1.2	Fatores de risco associados a acidentes de trânsito	6
1.3	Classes de substâncias psicoativas abordadas no presente trabalho.....	7
1.3.1	Drogas de Abuso	10
1.3.1.1	Anfetamina, Metanfetamina e Metilenodioximetanfetamina (MDMA).....	10
1.3.1.2	Cocaína	13
1.3.1.3	Tetrahydrocannabinol	15
1.3.2	Medicamentos	17
1.3.2.1	Clonazepam.....	17
1.3.2.2	Meprobamato	19
1.3.2.3	Clorfeniramina	20
1.3.2.4	Ciclobenzaprina	21
1.3.2.5	Femproporex e Dietilpropiona.....	22
1.4	Prevalência de acidentes de trânsito correlacionados com uso de substâncias psicoativas	24
1.5	Legislação	25
1.5.1	Mundo	26
1.5.2	Brasil	31
1.6	Identificação de substâncias psicoativas em fluido oral	32
1.7	Características físico-químicas do analitos em estudo	33
1.8	Análise toxicológica de fármacos e drogas em fluido oral.....	40
1.9	Valores de <i>cutoff</i>	40
1.10	Parâmetros validados no presente método.....	43
1.10.1	Linearidade.....	43
1.10.2	Limite de detecção	43
1.10.3	Limite de quantificação	44
1.10.4	Precisão intra e inter-ensaio	44
1.10.5	Exatidão.....	44
1.10.6	Recuperação	45

1.10.7 Carryover.....	45
2 Objetivo	47
3 Material e método	49
3.1 Material.....	49
3.1.2 Equipamentos	49
3.1.3 Padrões analíticos	49
3.1.4 Reagentes e outros materiais	49
3.1.5 Material biológico	50
3.1.5.1 Amostras de referência negativa.....	50
3.1.5.2 Amostras de referência positiva.....	50
3.2 Métodos	50
3.2.1 Casuística	50
3.2.2 Coleta das amostras.....	50
3.2.3 Aplicação de Questionário	51
3.2.4 Otimização do processo de extração	52
3.2.5 Preparo de amostras	53
3.2.6 Parâmetros cromatográficos e espectrométricos	55
3.2.7 Determinação de substâncias psicoativas em fluido oral por LC-MS/MS.	56
4. Resultados	59
4.1 Validação de método analítico para identificação de anfetamina, metanfetamina, MDMA, cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno, AEME, ciclobenzaprina, clonazepam, clorfeniramina, dietilpropiona, meprobamato, femproporex e THC em fluido oral.....	59
4.1.2 Infusão e injeção dos padrões analíticos	59
4.1.3 Cromatogramas da amostra de fluido oral adicionada dos analitos em estudo e dos analitos individualmente.....	60
4.1.4 Parâmetros validados	64
4.1.4.1 Linearidade	64
4.1.4.2 Limite de detecção e limite de quantificação	65
4.1.4.3 Precisão intra e inter-ensaio	66
4.1.4.4 Exatidão	68
4.1.4.5 Recuperação.....	69

4.1.4.6 Carryover.....	70
4.2 Dados epidemiológicos dos voluntários participantes.....	70
4.2.1 Idade dos participantes	71
4.2.2 Grau de escolaridade dos participantes.....	71
4.2.3 Sexo dos participantes.....	72
4.2.4 Horas diárias de trabalho.....	72
4.2.5 Acidentes anteriores	73
4.2.6 Consumo de álcool.....	74
4.2.7 Consumo de drogas ilícitas	75
4.2.8 Consumo de medicamentos.....	75
4.3 Resultado da análise toxicológica do fluido oral dos participantes.....	76
5 Discussões.....	80
6 Conclusões.....	87
7 Referências bibliográficas	89
ANEXO I.....	103
ANEXO II	105

Introdução



1 Introdução

Os acidentes de trânsito representam um grande problema de saúde pública, principalmente nos países em desenvolvimento. Além dos custos aos cofres públicos, oferecem grande trauma aos acidentados e familiares envolvidos. Ciente da importância desse tema, a Organização das Nações Unidas (ONU) lançou em 2011 a chamada Década de Ação pela Segurança no Trânsito 2011-2020, programa no qual mais de 100 países ao redor do mundo se comprometem em criar políticas públicas direcionadas à prevenção desse tipo de acidente com o objetivo de reduzir pela metade o número global de mortes e lesões relacionadas ao trânsito até 2020 (WHO, 2011).

Segundo dados do relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS) “*Global status report on road safety 2018*”, aproximadamente 1,35 milhão de pessoas morrem anualmente em todo o mundo em decorrência de acidentes de trânsito. Destas, mais de 50% são motociclistas, pedestres e ciclistas e, como consequência, 20 a 50 milhões de pessoas têm algum dano físico decorrente desse tipo de acidente (WHO, 2018).

Em países pouco desenvolvidos e em desenvolvimento, onde a infraestrutura e as políticas de trânsito não foram capazes de acompanhar o rápido crescimento do número de veículos automotivos, o quadro é ainda mais crítico. Nesse grupo, os acidentes dessa natureza vêm se tornando cada vez mais frequentes como resultado do aumento da frota de veículos, da falta de planejamento e do baixo investimento na segurança das vias públicas e alcança taxa de mortalidade três vezes maior que os países desenvolvidos (WHO, 2018).

Ainda de acordo com as estimativas da OMS, o número de vítimas de acidentes de trânsito pode dobrar até 2030, ou seja, muitos países terão de fortalecer a legislação sobre a segurança no trânsito e investir no setor. Desse modo, a adoção de metas para a redução deste tipo de acidente pelos diferentes países é de extrema importância e deixa clara a necessidade de evidências científicas como base para tomadas de decisão, assim como a criação de novas políticas públicas que forneçam visibilidade e gerem consciência sobre esse tema.

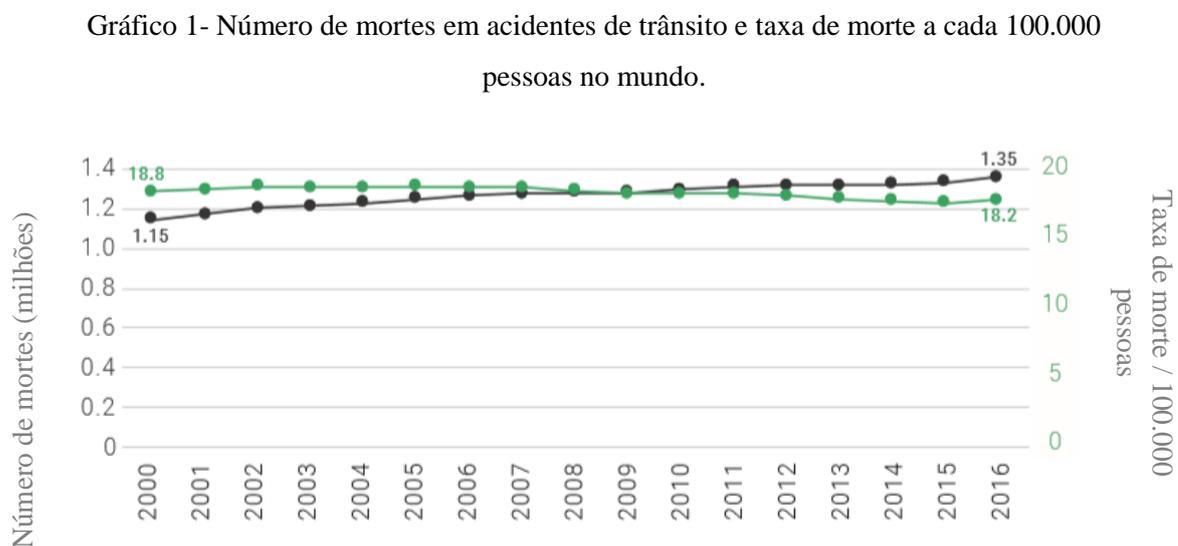
1.1 Dados sobre acidentes de trânsito

Os acidentes envolvendo veículos automotores são a principal causa de morte entre crianças e adultos de 5 a 29 anos em todo o mundo, superando causas de morte mundialmente

comum nessa faixa etária como diarreia e AIDS (WHO, 2018). Nos países em desenvolvimento e de menor renda *per capita*, o número de mortes por essa causa é ainda maior quando comparado com os países desenvolvidos. Na África por exemplo, em países de baixa renda, a taxa aproximada de mortes a cada 100.000 habitantes é de 29,3, enquanto nos países de alta renda da Europa esse número é de 5,1 mortes por 100.000 habitantes (WHO, 2018). Esses números deixam clara a importância que o investimento público, os programas educacionais e as legislações bem elaboradas, características mais presentes nos países de alta renda, podem ter nessa causa.

Apesar do número absoluto de mortes por essa causa continuar aumentando a cada ano, quando relacionado ao número da população mundial, ele tem se mantido constante em 18 mortes a cada 100.000 habitantes nos últimos 15 anos, uma vez que a população mundial permanece em contínuo crescimento (WHO, 2018).

Ainda que tenha havido certo progresso na constância e até redução da taxa de acidentes por 100 mil habitantes (Gráfico 1), esses números estão longe de alcançar as metas propostas pelo programa Década de Ação pela Segurança no Trânsito.

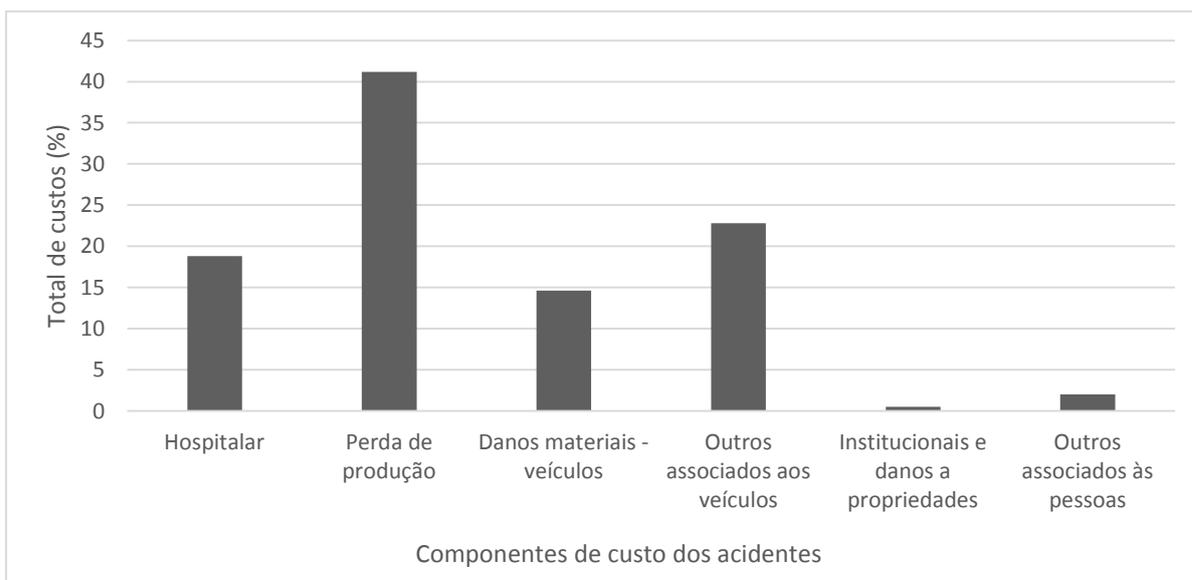


Fonte: WHO (2018).

Um dos problemas gerados pelos acidentes é o alto custo para as economias nacionais e para os sistemas de saúde, uma vez que afetam predominantemente a parcela ativa da população. Estima-se que as perdas econômicas relacionadas a mortes e lesões no trânsito chegam a R\$ 50 bilhões por ano (OPAS, 2018) contabilizando os custos para o patrimônio

público e privado, como reabilitação de vítimas, custos previdenciários, do setor policial e dos processos judiciais, desaceleração econômica causada por congestionamentos e principalmente pela perda de produção das vítimas (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Componentes de custo dos acidentes nas rodovias federais brasileiras no ano de 2014.



Fonte: IPEA (2015).

Os custos também diferem quanto à presença ou não de vítimas. Um único acidente de trânsito custa para o governo brasileiro, em média, R\$ 23 mil quando não há vítima, enquanto o acidente com feridos custa R\$ 261 mil (IPEA, 2015). Dados mais detalhados podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1- Custo total e médio por gravidade de acidente nas rodovias federais brasileiras no ano de 2014.

Gravidade do acidente	Quantidade de acidentes	Custo total (em Reais)	Custo médio (em Reais)
Com fatalidade	6.743	4.482.891.117	664.821,46
Com vítimas	62.346	6.031.838.004	96.747,79
Sem vítimas	98.158	2.306.592.728	23.498,77
Total	167.247	12.821.321.848	261.689

Fonte: IPEA (2015).

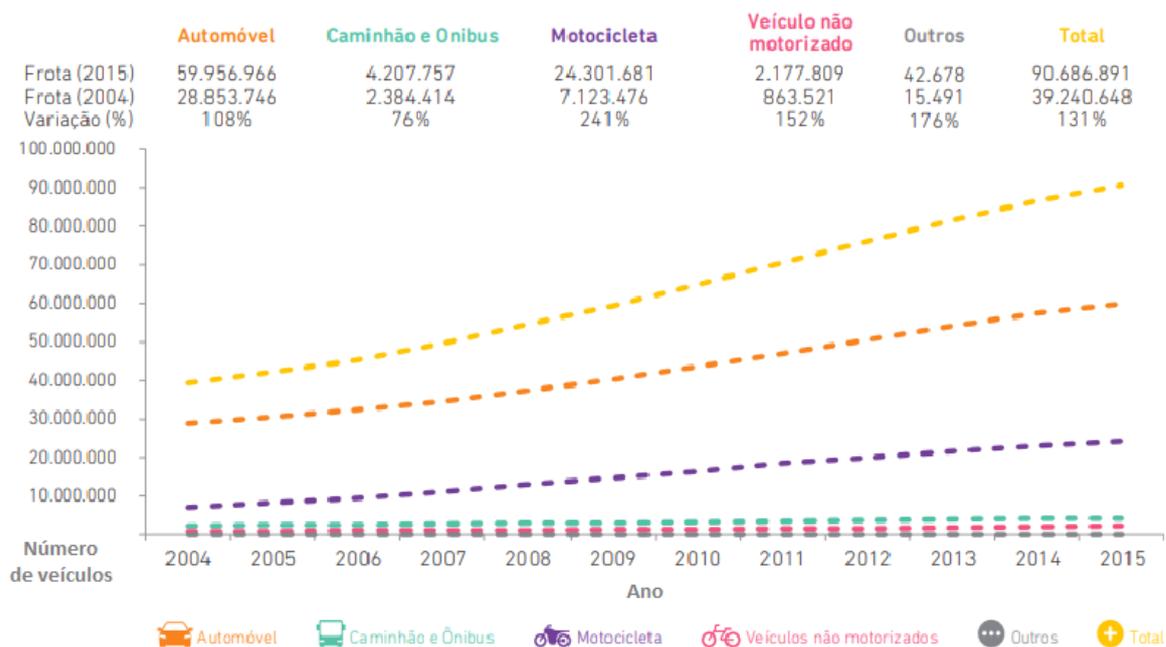
No ano de 2014, o Ministério da Saúde registrou 176.007 internações hospitalares, que acarretaram R\$244 milhões de custos para o Sistema Único de Saúde (SUS), sendo que os motociclistas foram responsáveis por mais de 50% da composição desses custos (OPAS, 2018).

O Brasil, além de ser reconhecidamente um dos recordistas mundiais em acidentes de trânsito, assim como os demais países de média e baixa renda, passa atualmente por uma grande expansão da frota de veículos automotores, como mencionado acima, o que gera naturalmente uma maior probabilidade de acidentes dessa natureza (ABRACICLO, 2019).

Segundo informações do Departamento Nacional de Trânsito (DENATRAN), o Brasil, até junho de 2019, detinha uma frota de 102,6 milhões de veículos, entre automóveis comerciais leves, caminhões, ônibus, carretas e motocicletas, um número muito superior à frota que circulava pelo país em 2001 (32 milhões de veículos), mostrando o crescimento agressivo do setor de veículos automotores nos últimos anos (DENATRAN, 2019).

Analisando todo esse quadro, uma situação que vem chamando a atenção dos especialistas brasileiros é o número de motocicletas, que teve sua frota aumentada em 241% desde 2004 como mostra o Gráfico 3.

Gráfico 3 - Crescimento acumulado da frota de veículos automotores no Brasil entre os anos de 2004 e 2015, representado em número bruto e porcentagem.

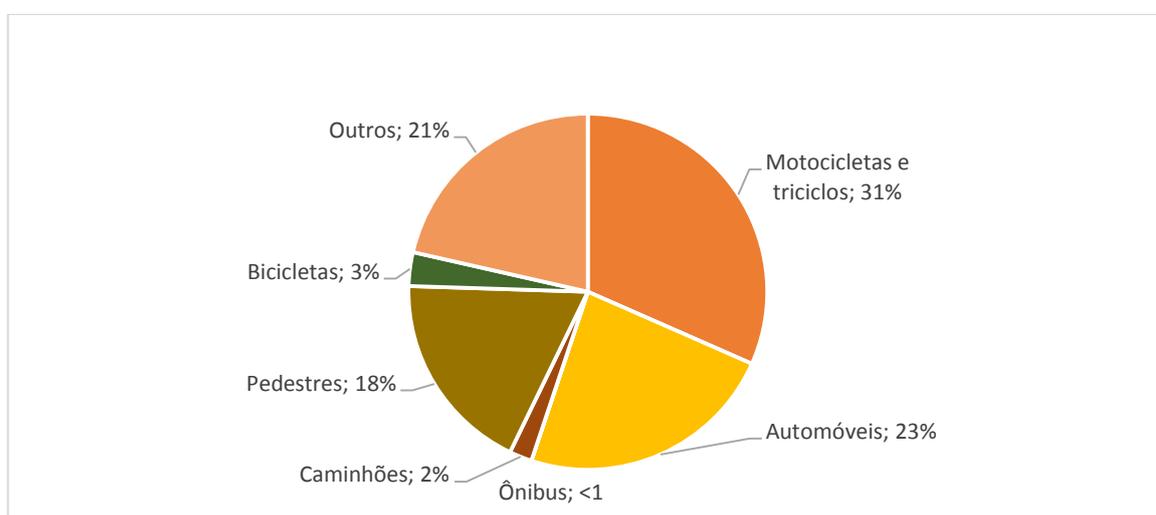


Fonte: WHO (2015).

A motocicleta é um tipo de veículo que por suas características intrínsecas apresenta baixa condição de proteção aos usuários em caso de colisões e quedas, proporcionando assim, alto grau de severidade em caso de acidentes. Como consequência, a quantidade de mortos e feridos graves com esse tipo de veículo gera números estatísticos alarmantes.

Os acidentes que envolvem esse tipo de veículo no Brasil são a maioria e representam 31% do total de acidentes de trânsito, resultando em aproximadamente 12,7 mil mortes por ano (Gráfico 4) (WHO, 2018).

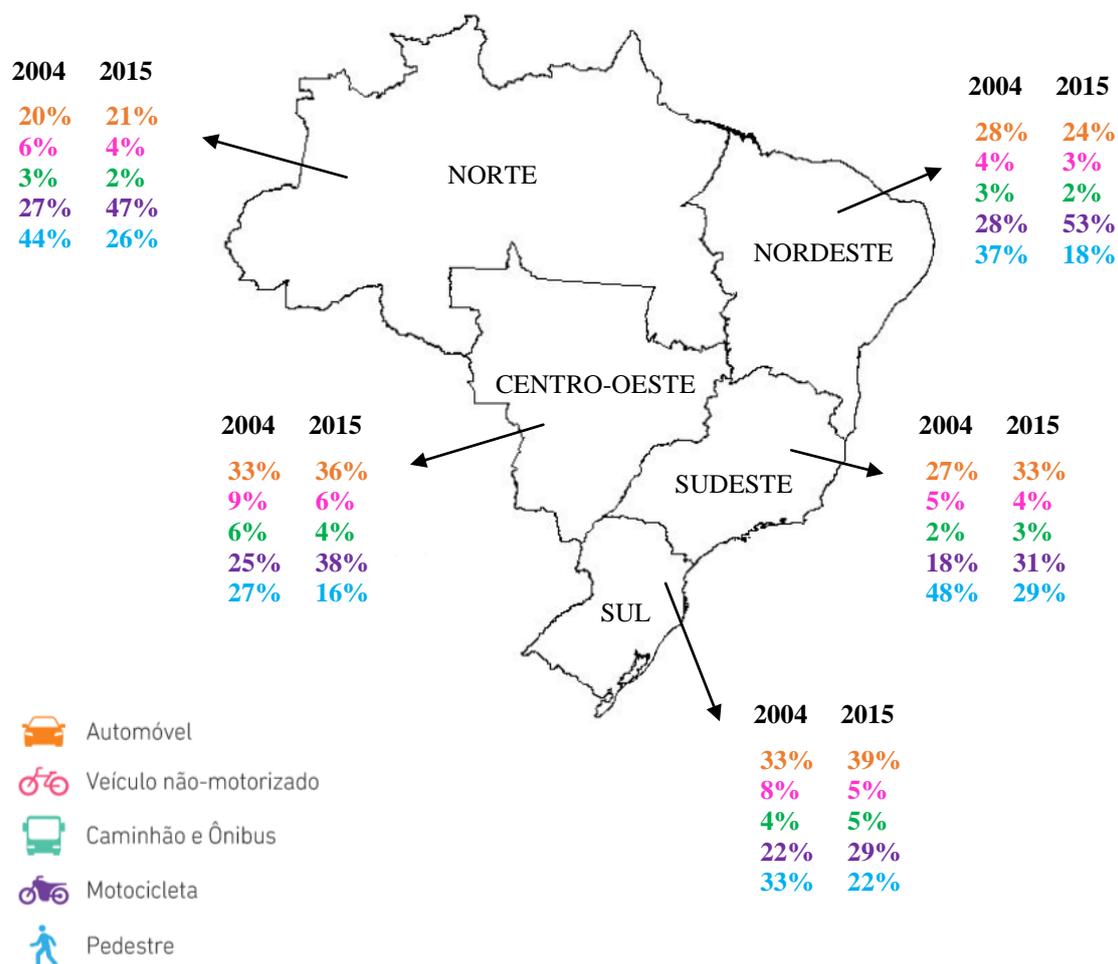
Gráfico 4 - Número de mortes em acidentes de trânsito no Brasil, por categoria, no ano de 2016.



Fonte: WHO (2018).

Nas regiões norte e nordeste do Brasil o quadro é ainda mais crítico. A falta de investimentos com infraestrutura de trânsito somada com o fato de ser a região com o menor PIB do país geram resultados catastróficos. O número de óbito de motociclistas acidentados é o maior em todo o país, como pode ser observado na Figura 1, representando 53% dos acidentes na região.

Figura 1 - Comparação entre número de óbitos (em %) por categoria, nas regiões brasileiras nos anos de 2004 e 2015.



Fonte: WHO (2015).

1.2 Fatores de risco associados a acidentes de trânsito

Segundo estudos, os principais fatores de risco para acidentes de trânsito podem estar associados a diferentes causas como: condutor, veículo, condições ambientais, infraestrutura das estradas e clima. Autores sugerem que a maior parte está relacionada com condições do condutor (LARDELLI-CLARET et al., 2003).

Dentre essas principais causas relacionadas ao condutor, destacam-se cinco pontos principais que devem ser considerados: velocidade, dirigir sob o efeito de substância psicoativa, não utilização de capacetes por motociclistas, cinto de segurança e equipamentos

de segurança infantis. Acredita-se que, controlando esses fatores, seja possível diminuir drasticamente as taxas de mortes em acidentes de trânsito (WHO, 2018).

Dirigir um veículo automotor envolve processos de interação entre as funções motora e cognitiva, tais como: memória, reflexo, atenção e tomada de decisões em um ambiente repleto de informações além de outros veículos. Todas essas funções psicomotoras podem ser alteradas pelo consumo de substâncias (lícitas ou ilícitas) que apresentam ação no sistema nervoso central (SNC) (GJERDE, 2011a).

Entre as principais substâncias psicoativas capazes de alterar significativamente o desempenho na direção, destacam-se algumas drogas ilícitas como as anfetaminas, a maconha e a cocaína que são as drogas mais comumente identificadas em estudos nacionais e internacionais com motoristas e também algumas classes de medicamentos como benzodiazepínicos, antidepressivos, anti-histamínicos, opioides e relaxantes musculares (SIMONSEN et al., 2012; RICCI et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2013). Estas drogas podem causar como efeitos secundários letargia, sonolência e dificuldade de coordenação, atrapalhando uma direção segura (SCHULZE et al., 2012; LACEY, 2009). Apesar da ciência desses efeitos colaterais, pouco se sabe sobre a relação do uso desses com a falta de atenção dos motoristas no trânsito ou com o envolvimento de motoristas em acidentes.

Um estudo de meta-análise concluído na Europa mostrou que somente no ano de 2013, 1.252.071 mortes ocorreram devido a acidentes de trânsito, sendo que 51% foram relacionadas ao uso de anfetaminas, 22% ao uso de *cannabis*, 14% ao uso de cocaína e 13% ao uso de opioides (OPAS, 2018).

No Brasil, os estudos publicados até então focam na determinação do uso de álcool e drogas de abuso por motoristas de carro e caminhão, negligenciando de certo modo, o uso de fármacos psicoativos e a classe de motociclistas, o que deixa explícita a necessidade de estudos de prevalência do uso de medicamentos e drogas nessa população.

1.3 Classes de substâncias psicoativas abordadas no presente trabalho

Segundo relatório da *United Nations Office on Drugs and Crime* (UNODC), 271 milhões de pessoas com idade entre 15 e 64 anos fizeram uso de algum tipo de droga ao menos uma vez durante o ano de 2017. Desse total, 35 milhões de pessoas são consideradas

usuárias e sofrem de distúrbios por essa causa, além de 585 mil mortes terem ocorrido como consequência do uso de drogas durante o mencionado ano (UNODC, 2019).

As drogas de maior consumo mundial são a *cannabis*, os opioides, as anfetaminas, os opiáceos, o *ecstasy*, e a cocaína (UNODC, 2019). Na Tabela 2 é apresentado o número de usuários e as respectivas drogas mais consumidas no ano de 2017.

Tabela 2 - Número de usuários no mundo e respectivas drogas no ano de 2017.

Substância	Número de usuários no mundo (em milhões)
<i>cannabis</i>	188
opioides	53
anfetaminas e estimulantes de prescrição médica	29
opiáceos	29
<i>ecstasy</i>	21
cocaína	18

Fonte: UNODC (2019).

No Brasil, esse consumo é um pouco distinto. Segundo o III Levantamento Nacional Sobre o Uso de Drogas pela População Brasileira – 2019, do qual 16.273 pessoas entre 12 e 65 anos de idade, pertencentes a 1640 municípios das 5 regiões brasileiras, participaram da pesquisa que estimou o uso de substâncias psicoativas no país, foi possível observar que as substâncias mais consumidas no Brasil por essa população são: *cannabis*, benzodiazepínicos, cocaína, opiáceos, solventes, anfetamínicos, crack e *ecstasy* (FIOCRUZ, 2019). As substâncias e o número de pessoas que relataram uso ao menos uma vez na vida são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Prevalência do consumo (pelo menos uma vez na vida) de substâncias psicoativas entre pessoas de 12 e 65 anos no Brasil, no ano de 2015.

Substância	Número de usuários (%)
<i>cannabis</i>	7,7
benzodiazepínicos	3,9
cocaína	3,1
opiáceos	2,9
solventes	2,8
anfetamínicos	1,4
crack	0,9
<i>ecstasy</i>	0,7

Fonte: FIOCRUZ (2019).

Como já mencionado, grande parte das drogas ilícitas e dos fármacos psicoativos possuem ação no SNC prejudicando de alguma maneira as funções cognitivas. No Quadro 1, são mostrados alguns exemplos de substâncias e suas respectivas ações psicomotoras relacionadas ao ato de dirigir.

Quadro 1- Ilustração das substâncias psicoativas que têm efeito (●) e que não têm efeito (-) sobre determinadas funções cerebrais.

Classe de drogas	Droga	Prejuízo						
		Tontura	Funções cognitivas	Funções motoras	Humor	Controle lateral de veículo	Estimativa do tempo	Equilíbrio
Drogas ilícitas	<i>Cannabis</i>	●	●	●	●	●	●	●
	Cocaína	—	●	●	●	—	—	—
	Anfetamina	—	●	●	●	—	●	●
	MDMA	—	●	—	●	—	—	●
	Alucinógenos	—	●	●	●	—	●	●
Drogas prescritas	Benzodiazepínicos	●	●	●	—	●	—	●
	Opioides	●	●	●	●	●	—	●
	Outros depressores	●	●	●	●	●	—	●
Novas substâncias psicoativas	Canabinoides sintéticos	●	●	●	●	●	●	●
	Catinonas sintéticas	—	●	●	●	—	—	—

Fonte: WHO (2016).

A seguir são apresentadas as principais características das substâncias em estudo no presente projeto, como mecanismo de ação, vias de biotransformação e classe às quais pertencem.

1.3.1 Drogas de Abuso

1.3.1.1 Anfetamina, Metanfetamina e Metilenedioximetanfetamina (MDMA)

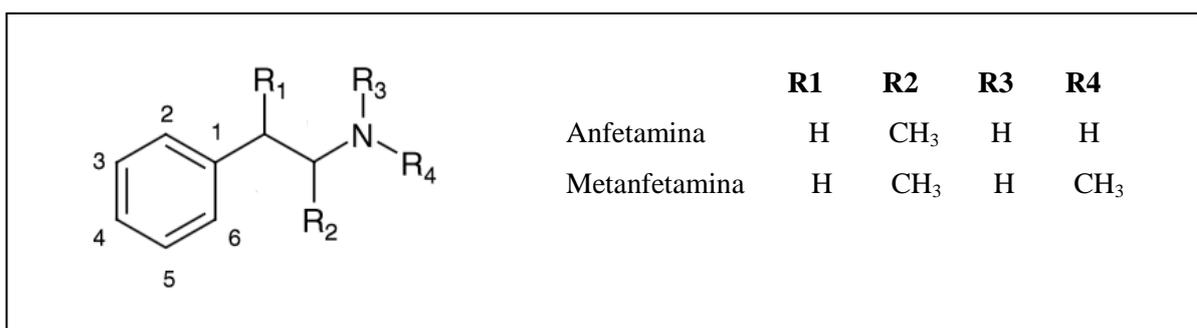
As anfetaminas (ATS) são uma classe de substâncias estimulantes do sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP) que compreende uma série de moléculas com diferentes estruturas químicas. Essa classe foi utilizada pela primeira vez há mais de 100 anos, época em que seu consumo era livre e destinado a tratamento terapêutico de doenças como hiperatividade e narcolepsia e também na II Guerra Mundial, com o intuito de manter os

soldados alertas e menos fadigados (HEAL, 2013; DE LA TORRE et al., 2004). Foi na década de 60 que a classe passou a ser reconhecida como substâncias com alto potencial de causar dependência e em 1970 já integravam a lista de substâncias proibidas nos Estados Unidos (DE LA TORRE et al., 2004).

Alguns exemplos dessa classe, que é composta por moléculas análogas e que geram sintomas semelhantes, são a própria anfetamina, a metanfetamina e a 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), analitos presentes no método validados neste estudo.

A estrutura molecular da anfetamina e metanfetamina são muito similares, já que a diferença entre elas se faz por meio de um dos radicais, como pode ser observado na Figura 2.

Figura 2- Estrutura química da anfetamina e metanfetamina.



Atualmente, as anfetaminas são a terceira classe de substâncias ilícitas mais utilizadas no mundo, sendo que somente no ano de 2017, aproximadamente 29 milhões de pessoas consumiram alguma das substâncias dessa classe (UNODC, 2019).

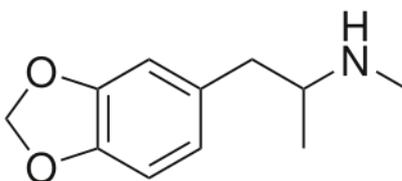
Os efeitos clínicos das ATS ocorrem por meio do aumento dos níveis dos neurotransmissores dopamina, norepinefrina e serotonina nas fendas sinápticas por meio da inibição da degradação dos mesmos pela enzima monoamina oxidase e inibição da recaptura desses neurotransmissores (BERMAN et al., 2009).

Pelo fato de serem moléculas relativamente lipofílicas, atravessam facilmente a barreira hematoencefálica alcançando os seus principais locais de ação no cérebro. A intoxicação aguda por anfetamina produz alterações comportamentais como aumento da estimulação e do estado de vigília, anorexia, paranoia, psicose e hiperatividade. Os efeitos adversos incluem principalmente perturbações do humor e do comportamento, que cessam logo após a interrupção da exposição ao estimulante, além de perda de apetite, insônia, nervosismo e febre (CHIANG, 2011; DE LA TORRE et al., 2004).

Dentre as substâncias pertencentes a essa classe, a anfetamina é a que possui maior potencial de abuso, propiciando assim o desenvolvimento de dependência da substância. Segundo estudos, os mecanismos envolvidos nas propriedades de reforço da droga, aparentemente estão relacionados com o aumento extracelular de dopamina no núcleo *accumbens* e núcleo caudado, porém, o mecanismo de ação exato ainda não está elucidado (DE LA TORRE et al., 2004; HUTSON et al., 2014).

A metilenedioximetanfetamina (MDMA) possui uma estrutura molecular um pouco diferente das anfetaminas mencionadas anteriormente, uma vez que possui um grupo metilenedioxi (CH_2O_2) ligado nas posições 3 e 4 do anel aromático (Figura 3).

Figura 3 - Estrutura química da MDMA.



A MDMA, também conhecida como *ecstasy* é uma base sintética com semelhanças estruturais às anfetaminas. Seu mecanismo de ação, apesar de não totalmente elucidado, ocorre inicialmente promovendo um aumento na liberação de serotonina (5-HT) na fenda sináptica e concomitantemente diminuindo a recaptura da mesma pela membrana pré-sináptica, responsável pela sensação de bem-estar (COLE; SUMNALL, 2003). Quanto aos seus efeitos a curto-prazo podem ser observados sintomas como taquicardia, boca seca, perda de apetite, ranger dos dentes e dilatação das pupilas, enquanto que os efeitos a longo-prazo geralmente são depressão, insônia, rigidez muscular, hipersudorese e hipertermia (temperatura corporal acima de 43°C) sendo que estes dois últimos efeitos podem levar à morte devido à desidratação e hemorragia intracraniana (FREEDMAN et al., 2005; XAVIER et al., 2008).

O processo de biotransformação das ATS é majoritariamente hepático e sua eliminação se dá por via renal. A meia vida dessa classe varia muito para cada tipo de molécula, para a anfetamina é de 8 a 30 horas e para o MDMA, 5 a 10 horas (DRUGBANK, 2019; DE LA TORRE et al., 2004).

1.3.1.2 Cocaína

A cocaína é um dos estimulantes naturais mais antigos da história. Proveniente das folhas de duas espécies do gênero *Erythroxylum* (*E. novogranatense* e *E. coca*), cultivadas principalmente na América do Sul, era consumida pelos indígenas da região dos Andes há mais de três milênios com o intuito de aumentar a tolerância à fome e reduzir a fadiga nas elevadas altitudes (PROSSER et al., 2011).

Essa substância passou a ser utilizada com fins terapêuticos somente no final do século XIX, após ter sido isolada quimicamente em 1860 por Niemann (BORTOLOTTI et al., 2012) como agente no tratamento da asma, depressão, como anestésico local e princípio ativo de diversos medicamentos (WILLS, 2005). O uso indiscriminado, devido à ausência de leis ou regulamentação específica, resultou em episódios de toxicidade, tolerância, dependência e até mesmo morte (SILVA et al., 2010). Somente a partir do século XX, medidas de controle foram implementadas por diversas nacionalidades, visando minimizar os efeitos negativos associados ao uso desse alcaloide (WILLS, 2005).

O consumo recreacional da cocaína foi disseminado no Brasil a partir de 1980, inicialmente na forma de pó cristalino solúvel em água podendo ser utilizado pela via intranasal, oral ou intravenosa (BOGHADADI et al., 1997).

A partir da década de 90, o *crack* começa a ser utilizado no Brasil. Essa nomenclatura é dada para a cocaína na forma de base livre, obtida através do aquecimento da solução aquosa de cloridrato de cocaína com substâncias básicas (geralmente bicarbonato ou hidróxido de sódio) gerando cristais irregulares que geralmente são fumados devido ao baixo ponto de fusão (98°C) (DRUGBANK, 2019a). Atualmente, segundo o Levantamento Nacional de Álcool e Drogas, cerca de seis milhões de brasileiros (4% da população adulta) já utilizaram cocaína pelo menos uma vez na vida (UNODC, 2015).

A cocaína é um estimulante psicomotor que promove a inibição da recaptação pré-sináptica de serotonina, dopamina e noradrenalina (BORTOLOTTI et al., 2012). O aumento destes neurotransmissores nas fendas sinápticas produz uma sensação de euforia e prazer no usuário, assim como melhora das atividades motoras, intelectuais, e perda da sensação de cansaço e fadiga (SILVA et al., 2010), além de efeitos indesejáveis como paranoia, alucinações e disforia que também podem acontecer (ISENSCHMID, 2010).

Os efeitos adrenérgicos como midríase, vasoconstrição, hipertensão, taquicardia e taquipneia estão correlacionados com o aumento na disponibilidade de noradrenalina nas

fendas sinápticas (ISENSCHMID, 2010). Por sua vez, o acúmulo de dopamina nos receptores pós-sinápticos D1 e D2 está relacionado com o mecanismo fisiopatológico pela qual ocorre a euforia e prazer. Por essas características, a dopamina apresenta importante papel na dependência, porém estudos mostram que a ação serotoninérgica também está correlacionada a muitos aspectos da síndrome de abstinência e dependência (PROSSER et al., 2011; SILVA et al., 2010; FILIP et al., 2010).

Os sintomas clínicos mais comuns da intoxicação aguda por cocaína incluem estimulação do sistema nervoso central com psicose e convulsões, acidente vascular cerebral, taquicardia e disfunção respiratória que pode evoluir para parada respiratória, assim como midríase, hipertensão, hipertermia, infarto do miocárdio e coma (ISENSCHMID, 2010).

A absorção da cocaína depende de sua via de administração. No caso da via intranasal, 80% da dose atinge a circulação sistêmica. Devido às suas propriedades vasoconstritoras, este valor é inferior àquele obtido com as vias intravenosa e pulmonar (90%) (GOLDSTEIN et al., 2009; SILVA et al., 2010). A via oral, normalmente não é utilizada, pois grande parte da droga sofre hidrólise no trato gastrointestinal diminuindo assim o efeito da droga (ISENSCHMID, 2010).

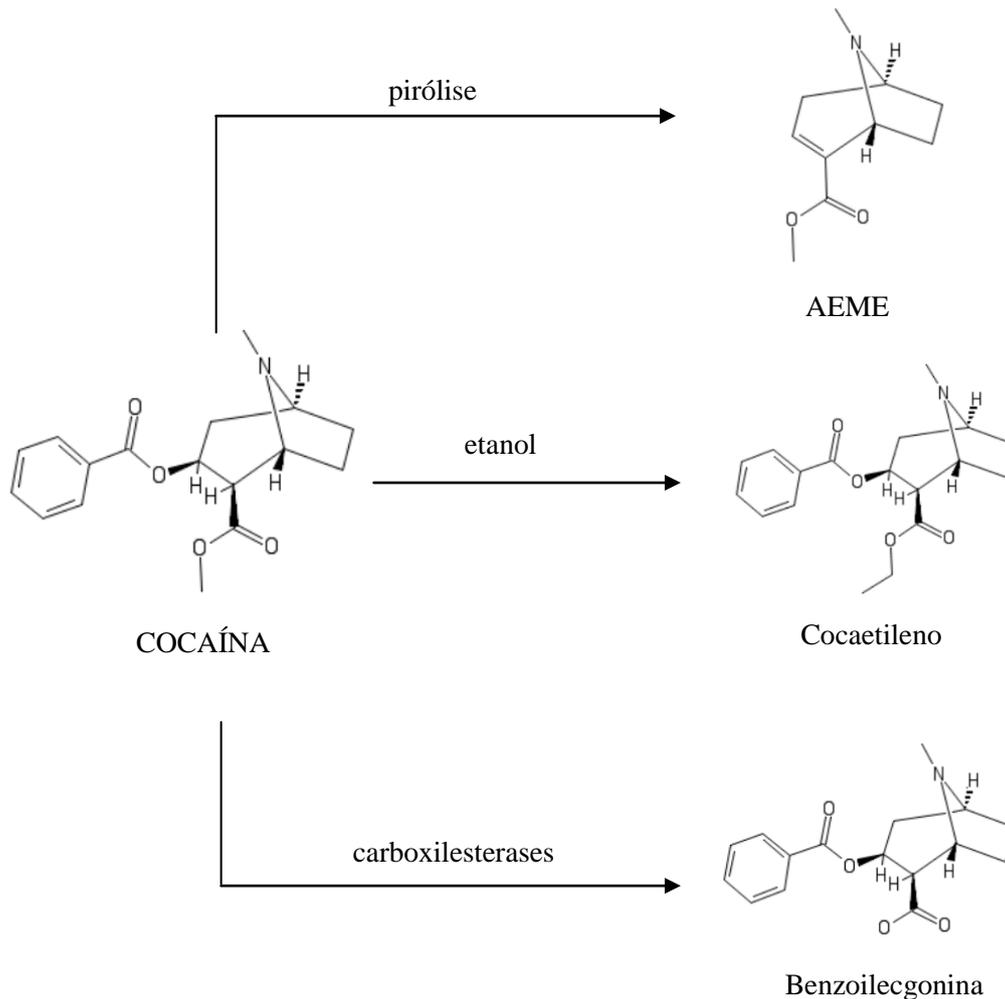
A concentração máxima no sangue ocorre após 20 a 30 minutos da administração pela via intranasal, 3 a 5 minutos após a administração por via pulmonar e intravenosa, e 60 a 90 minutos no caso da via oral. A distribuição do fármaco é consideravelmente rápida e seu tempo de meia vida varia de 4 a 5 horas, dependendo da via administração (CONE, 1995).

A biotransformação da cocaína gera produtos como a benzoilecgonina e a éster metil ecgonina, que são muito utilizados como biomarcadores do uso da droga (BORTOLOTTI et al., 2012). Quando a cocaína é consumida concomitantemente com bebidas alcoólicas, ocorre via transesterificação hepática, a formação de cocaetileno, produto ativo que apresenta efeitos semelhantes ao da cocaína, entretanto mais prolongados (PROSSER et al., 2011). Assim, a substância cocaetileno atua como um biomarcador que mostra se o indivíduo fez o uso de cocaína com álcool.

A anidroecgonina metil éster (AEME), também atua como biomarcador do uso da cocaína, porém na forma fumada. Quando a droga é fumada na forma de *crack*, ocorre a pirólise da cocaína, gerando o AEME cujo mecanismo de ação, apesar de não totalmente elucidado, demonstra ter atividade agonista colinérgica (GARCIA et al., 2012).

Na Figura 4, são apresentados os principais produtos da cocaína mencionados anteriormente.

Figura 4 - Produtos de biotransformação, pirólise e transesterificação da cocaína.



1.3.1.3 Tetrahydrocannabinol

O tetrahydrocannabinol (THC) é o princípio ativo encontrado na planta *Cannabis sativa* responsável pelos seus efeitos psicoativos. Essa planta é utilizada há milhares de anos em diversos contextos e em diferentes continentes, no entanto, acredita-se que os chineses foram os primeiros a relatar o seu uso para fins medicinais, há mais de 4000 A.C (MCGUIGAN, 2011).

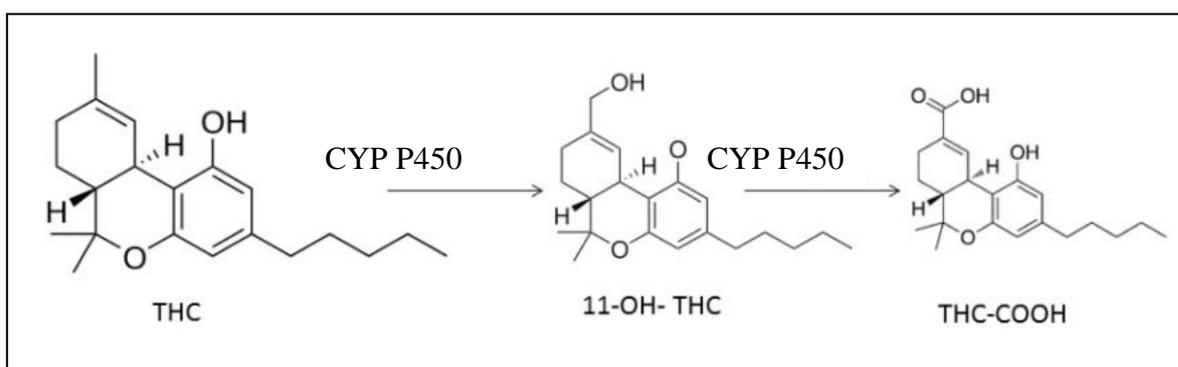
O seu caráter recreativo surgiu tanto na Europa Ocidental como nos Estados Unidos, mais especificamente a partir do século 19 e se dissipou mundialmente, fazendo assim com que vários países começassem a adotar leis de proibição face ao seu potencial de abuso por parte dos usuários.

Os efeitos a curto-prazo produzidos pela droga são de taquicardia inicial seguida de sensações de relaxamento, autoconfiança, euforia, desinibição, percepção do tempo retardada, aumento do apetite, campo sensorial aumentado, boca seca e eventualmente podem ser experienciadas sonolência e depressão, de acordo com o usuário (NIDA, 2012).

No que diz respeito a efeitos a longo-prazo, vários estudos apontam para uma reduzida capacidade de aprendizagem assim como comprometimento do desempenho motor e cognitivo, bem como o prejuízo da memória. As sensações de ansiedade e pânico, eventualmente experienciadas pelo usuário, podem evoluir para alucinações e episódios de psicose. Existem também evidências que atestam que em indivíduos propensos a desenvolver esquizofrenia, o consumo desta droga pode antecipar esse quadro (HALL et al., 2009). Usuários regulares podem vir a desencadear problemas respiratórios e câncer de pulmão, no entanto, casos de óbito por consumo exacerbado da droga nunca foram relatados (HUESTIS, 2007).

Embora o THC seja o principal composto psicoativo da *Cannabis sativa*, existem mais de 400 compostos na planta e cerca de 60 deles são canabinoides, como o canabinol e o canabidiol. Estes compostos estão presentes nas folhas, caule, flores e resina provenientes da planta feminina (HUESTIS, 2007). Na Figura 5, são apresentados os principais produtos de biotransformação do THC.

Figura 5 - Principais produtos do THC.



A principal via de administração desta droga é a pulmonar através dos cigarros de maconha que são compostos por folhas e flores secas da planta, onde geralmente se encontra uma porcentagem de THC entre 0,5 e 5%, podendo eventualmente atingir valores significativamente maiores. Utilizando esta forma é possível obter um efeito bastante rápido, visto que as substâncias psicoativas chegam rapidamente ao SNC depois de atravessar

rapidamente a barreira hematoencefálica, resultando assim em um pico plasmático entre 3 a 10 min (GROTENHERMEN, 2003; HUESTIS, 2007).

Já o mesmo não se observa quando a via de administração escolhida é a oral. É possível ingerir altos teores de THC por meio de chás e/ou alimentos preparados à base da planta, o que gera não só um pico plasmático máximo mais tardio, cerca de 1h a 1h30min, mas também um efeito bastante mais prolongado e intenso (GROTENHERMEN, 2003).

A distribuição do THC para tecidos altamente vascularizados é rápida, no entanto, visto se tratar de uma substância extremamente lipofílica, o THC fica acumulado em tecidos menos vascularizados, como o tecido adiposo, e a sua biotransformação se dá majoritariamente no fígado por ação das enzimas do citocromo P450. Finalmente, a sua excreção acontece por meio das fezes e da urina com taxas de 65 e 20%, respectivamente (GROTENHERMEN, 2003).

Quanto à sua farmacodinâmica, o THC age no SNC através dos receptores canabinoides, CB₁ e CB₂. Naturalmente, esses receptores, principalmente o CB₁, se ligam a uma substância endógena conhecida como anandamida, que possui efeitos similares, mas reduzidos, aos do THC (HALL et al., 2009).

1.3.2 Medicamentos

1.3.2.1 Clonazepam

O clonazepam é um fármaco ansiolítico pertencente à classe dos benzodiazepínicos (BZD), que são depressores do SNC. Tais características atribuídas aos BZD fazem deles os medicamentos mais prescritos no mundo nos últimos anos para quadros como ansiedade, insônia, agitação, epilepsia, entre outros (HOOD, 2014; NOZAWA et al., 2015).

Desde a década de 1980, essa classe já ocupava o topo no ranking das substâncias mais prescritas no mundo e ainda nos dias de hoje, no Brasil, os BZD ocupam os três primeiros lugares na lista de medicamentos controlados mais vendidos nos anos de 2009 a 2011 segundo o Sistema Nacional de Gerenciamento de Produtos Controlados (SNGPC) (ANVISA, 2011a).

O mecanismo de ação dessa classe se dá pela alta afinidade e seletividade a um único sítio dos receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA), contendo as subunidades α_1 , α_2 ,

$\alpha 3$ ou $\alpha 5$ e uma subunidade γ . Desse modo, atuam como moduladores alostéricos positivos sobre $GABA_A$, potencializando a regulação dos canais na presença de GABA.

Essa classe de fármacos é composta por diversos exemplares que se diferenciam segundo a meia vida de cada um, que varia entre curta (triazolam e midazolam), intermediária (oxazepam, alprazolam, bromazepam) e longa (diazepam e clonazepam), sendo os de ação curta preferíveis para tratamento da insônia e os de ação intermediária ou longa utilizados para o tratamento dos transtornos de ansiedade (RANG et al., 2007; REYNOLDS et al., 2012).

Por serem sedativos, os fármacos dessa classe apresentam alguns efeitos adversos como sonolência, fraqueza muscular, vertigem, letargia, tontura, confusão e apatia. Esses efeitos dependem muito da susceptibilidade individual e com as características fisiológicas de cada paciente (HOWARD et al., 2014), e podem ser um agravante se usados por motoristas de veículos automotores.

A excreção do clonazepam ocorre majoritariamente via urina (50-70%) e aproximadamente 10 a 30% é excretado pelas fezes na forma biotransformada. Menos de 2% do fármaco é eliminado na sua forma inalterada (DRUGBANK, 2019b).

No Quadro 2, são apresentados alguns dados de consumo dessa classe durante os anos de 2009 a 2011 em diferentes estados pertencentes às 5 regiões brasileiras. Os dados são referentes ao universo de aproximadamente 4 mil farmácias cadastradas no sistema eletrônico da ANVISA. Não foram consideradas as fórmulas magistrais contendo clonazepam, somente os produtos industrializados.

Infelizmente, não foram encontrados dados mais recentes para observar a progressão do consumo de BZD no país.

Quadro 2 - Consumo de clonazepam em diferentes estados nos anos de 2009 a 2011.

Estado	2009		2010		2011	
	UCD	UCD / 100 habitantes	UCD	UCD / 100 habitantes	UCD	UCD / 100 habitantes
PA	59.124	0,80	95.169	1,26	120.146	1,56
BA	56.151	0,38	281.433	2,01	509.087	3,61
GO	299.658	5,06	358.401	5,97	444.501	7,31
SP	1.132.781	2,74	1.691.331	4,10	2.746.784	6,60
RS	740.047	0,84	1.063.542	9,95	1.293.378	12,05

UCD: unidades de caixas dispensadas
 Fonte: ANVISA (2011).

1.3.2.2 Meprobamato

O meprobamato é um carbamato com ação hipnótica, sedativa e ansiolítica, amplamente utilizado como tranquilizante na década de 1960 e que após o surgimento dos benzodiazepínicos alguns anos depois, deixou de ser a primeira opção na terapia com sedativos (GREENBLAT; SHADER, 1971).

Atualmente o meprobamato é encontrado como principal produto de biotransformação do carisoprodol, relaxante muscular de venda livre utilizado mundialmente (KUMAR, 2016). No Brasil, o carisoprodol está presente em diversas formulações de relaxantes musculares.

Seu mecanismo de ação não é completamente elucidado, porém estudos mostram que o fármaco atua como agonista dos receptores GABA_A, gerando assim sua ação inibitória.

Devido a sua potente ação depressora, somente no ano de 2005, o meprobamato foi responsável por 7% dos casos de suicídio na França além de gerar um índice de mortalidade de 1,7 a 5% entre os usuários do fármaco (CESCHI, 2013).

Estudos mostraram que o consumo de 350 mg de carisoprodol (dose terapêutica) já é suficiente para gerar prejuízo psicomotor no usuário, fato que gera o questionamento se o amplo consumo de algumas classes de relaxantes musculares não é também devido à ação do meprobamato que possui tempo de meia vida de 6 a 17 horas, enquanto que o carisoprodol somente 1 a 3 horas (ZACNY, 2011; WANG et al., 2011).

Os sintomas clínicos que podem ocorrer após administração de dose terapêutica de meprobamato são letargia, sonolência, fraqueza muscular e depressão respiratória (CESCHI, 2013).

Após ingestão oral, o pico plasmático ocorre entre 1 e 3 horas. A porcentagem de meprobamato que se liga às proteínas plasmáticas é de 14% a 24% e o volume de distribuição é de 0,7 L/kg. Sua biotransformação é majoritariamente hepática e sua excreção renal, apresentando meia vida de 7 a 17 horas (CESCHI, 2013).

1.3.2.3 Clorfeniramina

A clorfeniramina é um fármaco pertencente à classe dos anti-histamínicos que está presente nas formulações de medicamentos amplamente utilizados com o intuito de aliviar os sintomas de alergias generalizadas, gripe e febre.

A histamina é uma substância mediadora de diversos processos fisiológicos como vasoconstrição, resposta alérgica, contração brônquica e intestinal, aumento de muco, entre outras. Sua ação ocorre pela ligação a quatro receptores diferentes de histamina H₁, H₂, H₃ e H₄, sendo que os subtipos H₁ e H₂ são os principais responsáveis por atuar nos processos de resposta alérgica e vigília (KOVACOVA-HANUSKOVA, 2015).

Os fármacos anti-histamínicos, caso da clorfeniramina, atuam como antagonistas dos receptores H₁ e são conhecidos por gerarem sintomas de sonolência e prejuízo cognitivo. Esses sintomas são devidos à sua ação sobre os receptores H₁ do SNC, podendo ocasionar também sintomas como boca seca, arritmia e problemas urinários devido ao mecanismo não elucidado sobre os receptores muscarínicos do trato urinário (HISHINUMA, 2014). Apesar dos sintomas prejudiciais serem bem conhecidos, essa classe de fármacos possui venda livre na maioria dos países.

A clorfeniramina faz parte da composição de diversos medicamentos anti-gripais por sua ação vasoconstritora, levando ao descongestionamento e à redução de coriza comuns dentre os sintomas da gripe. Outro efeito gerado é a redução da secreção das glândulas mucosas do trato respiratório, melhorando assim a rinorreia devido a sua ação anticolinérgica fraca (KIM, 2012).

Quando administrado via oral, esse fármaco apresenta pico plasmático de 3 horas e sua meia vida é de aproximadamente 24 horas. Sua biotransformação é majoritariamente hepática e sua eliminação é via renal (YASUDA, 2002).

1.3.2.4 Ciclobenzaprina

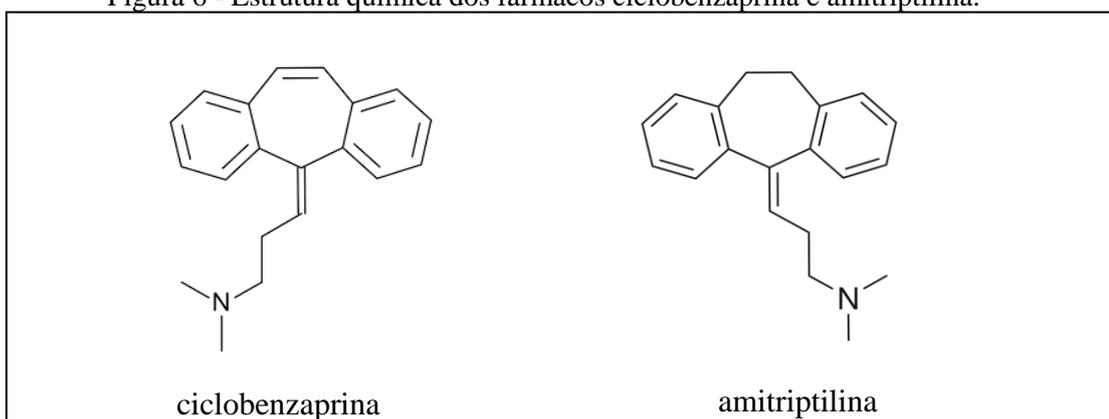
A ciclobenzaprina é um fármaco que pertence ao grupo dos relaxantes musculares de ação central, amplamente prescrito no tratamento de espasmos musculares, dores miofasciais e musculoesqueléticas agudas (BRIOSCHI et al., 2013).

O fármaco foi sintetizado pela primeira vez em 1961 na concentração de 10 mg, porém após constatações do seu forte efeito sedativo, foi estabelecida que a dosagem de 5 mg era a mais adequada para o tratamento da sintomatologia de dores musculares. Em alguns casos de fibromialgia, são prescritas doses que variam de 10 mg à 30 mg por dia (WINCHELL et al., 2002; BRIOSCHI et al., 2013). No Brasil, podem ser encontrados no varejo comprimidos com 5mg e 10 mg de ciclobenzaprina.

A ciclobenzaprina possui ação anticolinérgica central e periférica, além de inibir a recaptura de norepinefrina e apresentar atividade anti-histamínica e propriedades serotoninérgicas que são responsáveis pelos efeitos colaterais típicos como boca seca, sonolência e retenção urinária, além de prolongar o intervalo QT (parâmetro eletrocardiográfico) (SEE; GINZBURG, 2008; COHEN; GUILBAULT, 2018).

A explicação pela sua atividade anticolinérgica pode ser corroborada pela sua semelhança estrutural com os antidepressivos tricíclicos, mais especificamente com a amitriptilina, uma vez que se diferem apenas pela presença de uma dupla ligação (Figura 6) (COHEN; GUILBAULT, 2018).

Figura 6 - Estrutura química dos fármacos ciclobenzaprina e amitriptilina.



Com uma biodisponibilidade via oral de aproximadamente 55%, e meia vida longa de 18 a 33 horas, fato que gera ainda mais preocupação na sua administração, o fármaco sofre biotransformação majoritariamente no fígado onde são gerados produtos inativos (BURRA et al., 2019; CIMOLAI, 2014).

Além da sua ação depressora, alguns relatos na literatura mostram que o fármaco também pode induzir indivíduos mais suscetíveis à quadros de psicose (COHEN; GUILBAULT, 2018).

Segundo a bula do medicamento elaborada por um dos fabricantes desse fármaco “as atividades que exijam atenção, como a operação de máquinas ou veículos, devem ser evitadas, pois podem ocorrer sintomas como sonolência e tontura durante o tratamento com cloridrato de ciclobenzaprina” (EUROFARMA, 2016).

1.3.2.5 Femproporex e Dietilpropiona

Esses dois fármacos fazem parte da classe dos anorexígenos, atuando como inibidores de apetite e sendo muito utilizados no tratamento de obesidade. Ambos são vendidos no Brasil há mais de 30 anos e fazem parte dos medicamentos sujeitos a controle especial, integrando assim a Portaria n.º 344/98 – SVS/MS, de 12 de maio de 1998.

No ano de 2017 no Brasil, a câmara dos deputados aprovou a Lei 13.454/17 que libera a venda e o consumo sob prescrição médica de substâncias anorexígenas, o que gerou bastante controvérsia e discussão por parte da comunidade científica e da ANVISA sobre a eficácia no tratamento de pacientes obesos e a segurança desses fármacos, uma vez que possuem muitos efeitos adversos e podem gerar dependência.

O femproporex, desenvolvido e muito utilizado na década de 1960, após ser administrado via oral, tem aproximadamente 50% sua molécula convertida rapidamente em anfetamina (PAUMGARTTEN, 2016).

Seu mecanismo de ação ocorre pela sua ação direta nas vesículas pré-sinápticas, aumentando a liberação de neurotransmissores e inibindo a recaptção de dopamina no centro responsável pela fome, no hipotálamo. Além disso, ele promove a inibição da recaptção de serotonina por desacoplamento deste neurotransmissor do seu transportador pré-sináptico e inibição da enzima monoamina oxidase, podendo gerar síndrome adrenérgica, principalmente, com estimulação circulatória e respiratória (ANVISA, 2011b).

A dietilpropiona, popularmente conhecida como anfepramona, começou a ser comercializada mundialmente em 1958 com o intuito de ser um fármaco supressor de apetite sem ter ação no SNC, porém, após comercialização, estudos notaram que mesmo em doses terapêuticas ocorrem reações adversas como inquietação, delírio e paranoia (ANVISA, 2011b).

Seu efeito se dá pela ação nos neurônios dopaminérgicos, promovendo aumento da liberação de dopamina nos terminais pré-sinápticos (SAMARIN, 1993). Esses efeitos estimulantes do SNC fazem com que esses fármacos sejam muito procurados e utilizados para fins recreacionais (ANVISA, 2011b).

Sua ação ocorre pelo mesmo mecanismo das anfetaminas, ou seja, atuam inibindo a recaptura de norepinefrina e dopamina (TEODORAK et al., 2015) e gerando assim todos os efeitos como já mencionado no mecanismo das anfetaminas.

Os dados apresentados no Quadro 3 abaixo, correspondem ao universo de aproximadamente 600 farmácias cadastradas no sistema eletrônico da ANVISA.

Quadro 3 - Consumo de anfepramona em diferentes estados nos anos de 2009 a 2011.

Estado	2009	2010	2011
	Miligramas vendidos	Miligramas vendidos	Miligramas vendidos
PA	30.942.813,50	38.020.010,04	40.694.123,20
BA	37.413.677,99	44.307.060,35	52.713.821,52
GO	206.424.116,23	250.946.308,99	288.985.971,96
SP	1.471.202.742,52	1.835.677.669,85	2.019.139.876,08
RS	182.803.869,51	237.892.196,06	211.281.876,69

Fonte: ANVISA (2011).

Os dados relacionados à quantidade de miligramas vendidos nos anos de 2009, 2010 e 2011 sobre o fármaco femproporex não estão disponíveis no relatório supracitado.

1.4 Prevalência de acidentes de trânsito correlacionados com uso de substâncias psicoativas

Os estudos de prevalência citados a seguir são, na maior parte, relacionados a motoristas de carro, pois os estudos com motociclistas são muito escassos tanto mundialmente quanto no Brasil, deixando mais uma vez evidente a necessidade e a importância de dados científicos embasados nessa população.

Na Europa, a preocupação com o número de acidentes envolvendo motoristas sob efeito de substâncias psicoativas fez com que fosse criado o projeto chamado DRUID, do inglês *Driving Under the Influence of Drugs, Alcohol, and Medicines*, promovendo assim diversos estudos que avaliam a prevalência de motoristas dirigindo sob a ação de substâncias psicoativas tanto vítimas de acidentes, quanto na beira da estrada, os chamados *roadside studies*.

Atualmente, os países europeus vêm observando que o número de acidentes com motoristas sob efeito de substâncias psicoativas está superior àqueles onde os motoristas estão sob efeito de álcool (SIMONSEN, 2012).

Um estudo de meta-análise publicado em 2013 na Europa revisou artigos que correlacionavam acidentes de trânsito e uso de substâncias psicoativas e chegou à conclusão de que o uso de benzodiazepínicos pelo condutor chega a dobrar o risco de envolvimento em acidente de trânsito fatal. Essa é a classe de medicamentos mais encontrada em análises de amostras biológicas de condutores de veículos automotores (SCHULZE et al., 2012; GÓMEZ-TALEGÓN et al., 2012; INSTITÓRIS et al., 2013; LACEY, 2009).

Em motoristas vítimas de acidentes em seis países europeus (Bélgica, Dinamarca, Finlândia, Itália, Lituânia e Holanda), amostras de sangue foram coletadas e determinou-se a presença de mais 23 substâncias psicoativas. Os pesquisadores apontaram que, além de álcool e drogas de abuso, os motoristas também haviam ingerido medicamentos, sendo que os benzodiazepínicos e os opioides foram as classes de maior prevalência (10,2 e 7,8%, respectivamente) (LEGRAND et al., 2013).

Na Bélgica e na Holanda, em estudo conduzido com 535 motoristas, vítimas de acidentes que deram entrada em centros de emergências hospitalares, 52% apresentaram resultados positivos para álcool, drogas de abuso (cocaína, anfetaminas e *cannabis*) e medicamentos (benzodiazepínicos e ciclopironas). Os motoristas mais gravemente feridos tiveram resultados positivos para zolpidem e zolpiclona (Bélgica: 1,8%; Holanda: 0,5%) e

também para medicamentos derivados de ópio (Bélgica: 3,3%; Holanda: 0,5%) (LEGRAND, et al., 2012).

Pesquisadores suíços, no ano de 2010, apresentaram estudos de prevalência onde motoristas apresentaram resultados positivos para medicamentos como: benzodiazepínicos, morfina, zolpidem, antidepressivos e difenidramina (SENNA et al., 2010).

No Brasil, os estudos publicados até então focam na determinação do uso de álcool e drogas de abuso por motoristas de caminhão.

Atualmente existem apenas dois estudos com motociclistas no Brasil. O primeiro, realizado com usuários acidentados que deram entrada em dois hospitais da cidade de Porto Alegre, identificou a presença de maconha em 13,5%, cocaína em 9,2% e benzodiazepínicos em 3,2% das vítimas (BREITENBACH et al., 2012). Já o segundo trabalho, avaliou 232 motociclistas acidentados internados na cidade de São Paulo e mostrou que 20,3% apresentam resultado positivo para álcool e outras drogas (Carvalho et al., 2016).

Não foram encontrados trabalhos sobre o uso de outras classes de medicamentos psicoativos por motociclistas não acidentados em território nacional.

1.5 Legislação

As leis que regulamentam o uso de substâncias psicoativas por motoristas são uma das práticas que compõem um grupo de fatores importantes na prevenção de acidentes. Garantir que a população cumpra as leis é um desafio em muitos países, pois se faz necessário que agentes policiais executem um papel direcionado a isso além de investimentos governamentais nesse setor.

Com a disseminação dos estudos que elucidam o ato de dirigir sob efeito de drogas, conhecido mundialmente pela sigla DUID (*Driving Under the Influence of Drugs*), novas abordagens legislativas vêm sendo adotadas com o intuito não só de educar os motoristas, como impedir que esses dirijam com a capacidade psicomotora alterada.

Nos últimos anos, a comunidade científica vem contribuindo de forma significativa para o entendimento do uso de substâncias psicoativas no trânsito por meio do desenvolvimento de experimentos capazes de elucidar o efeito de substâncias sobre as funções motoras e cognitivas de motoristas, implementando assim novas estratégias analíticas indicativas de ingestão recente de substâncias. Tais estudos fornecem informações e dados de

extrema importância aos órgãos competentes, que as utilizam para o aprofundamento de legislações, planejamento consistente de novas políticas públicas e de novas campanhas de prevenção à condução de veículos sob o efeito de substâncias psicoativas (ANDREUCETTI et al., 2019; GJERDE et al., 2011a)

Segundo o Relatório das Nações Unidas, somente no ano de 2017, aproximadamente 271 milhões de pessoas com idade entre 15 e 64 anos fizeram uso de alguma substância psicoativa ao menos uma vez (UNODC, 2019). Devido ao fato dessas substâncias apresentarem ação no SNC e estarem associadas a diversas formas de prejuízo do desempenho no ato de dirigir, a prevalência de medicamentos psicoativos em vítimas envolvidas em acidentes de veículos automotivos vem sendo estudada em diversos países (HETLAND, 2014).

1.5.1 Mundo

Os países europeus já estudam há alguns anos a consequência do uso de substâncias psicoativas por motoristas, demonstrando assim uma preocupação e um cuidado que ainda são ausentes em muitos países, porém as legislações diferem muito entre si nos diversos países, já que dependem muito dos aspectos sociais, econômicos e contexto histórico da região. Cada local tem sua particularidade com relação ao tipo de substância, concentrações permitidas e abordagens jurídicas nas suas constituições, variando desde a proibição total do consumo até um valor limite permitido do fármaco no sangue (*cut-off*). O termo *cut-off* é designado à um valor numérico, utilizado em análises toxicológicas e análises clínicas em que os resultados das amostras que estão abaixo deste valor são considerados negativos e os resultados acima desse valor são considerados positivos (DRUID, 2012).

No ano de 2006, a Europa lançou o projeto DRUID (*Driving under the Influence of Drugs, Alcohol and Medicines*) com a colaboração de 19 países, cujo objetivo era obter dados sobre o impacto das substâncias psicoativas na segurança do trânsito e conseqüentemente, gerar novos projetos de política pública voltados para esse fim. O projeto forneceu uma base sólida para toda a regulamentação harmonizada existente atualmente na Europa sobre o tema dirigir sob influência de álcool, drogas e medicamentos (DRUID, 2012).

A Austrália é um dos países pioneiros na investigação do uso de substâncias psicoativas no trânsito. Em 2004, enquanto os estudos estavam acontecendo na Europa e

Estados Unidos, a Austrália implementou uma lei para monitorar motoristas de forma randômica e coletar fluido oral para analisar a presença de drogas (DAVEY et al., 2014).

Nos Estados Unidos, em 2007, foi feito um estudo em rodovias (do inglês *roadside survey*) com 5000 indivíduos que forneciam amostras de sangue e fluido oral. Em 2012 o órgão nacional de administração em segurança de trânsito (*National Highway Traffic Safety Administration* – NHTSA) propôs guias de padronização e avaliação para o uso de drogas e fármacos no trânsito com valores de *cut-off* para sangue, urina e fluido oral (LOGAN et al., 2013). Atualmente os Estados Unidos dispõem de diversos órgãos que atuam nessa frente, como *National Governors Highway Safety Association* - NGHSA, *Office of National Drug Control Police* - ONDPC, *Substance Abuse and Mental Health Services Administration* – SAHMSA, etc (NHTSA, 2019).

Muitos países utilizam em sua legislação medidas e autuações baseadas na equivalência entre a concentração do fármaco e a concentração de etanol no sangue, conhecida como *Blood Alcohol Concentration* (BAC). Isso se deve ao fato de já existir na maioria desses países muitas pesquisas que correlacionam a dose de etanol ingerida com a respectiva alteração psicomotora no usuário. Um exemplo desse uso é o Reino Unido, cuja legislação apresenta não apenas os fármacos de uso controlado, mas também as respectivas concentrações máximas permitidas no sangue (Tabela 4).

Tabela 4 - Concentração máxima permitida de alguns fármacos em sangue para motoristas no Reino Unido.

Medicamentos	Concentração máxima permitida no sangue
Anfetamina	250 µg/L
Clonazepam	50 µg/L
Diazepam	550 µg/L
Flunitrazepam	300 µg/L
Lorazepam	100 µg/L
Metadona	500 µg/L
Morfina	80 µg/L
Oxazepam	300 µg/L
Temazepam	1000 µg/L

Fonte: TRANSPORT (2014).

Essa correlação fármaco *versus* álcool é muito elucidativa e auxilia tanto os juristas quanto a população consumidora, pois gera um parâmetro na aplicação de uma sentença com base nos resultados analíticos da amostra coletada do motorista em caso de acidentes e fiscalização. Já para as pessoas que fazem uso dessas substâncias, facilita o entendimento de como e qual dose o medicamento pode ser prejudicial ao motorista.

Em 1959, a Noruega ampliou um programa já existente em sua legislação chamado *The Norwegian Road Traffic Act*, com o propósito de englobar os danos causados pelo uso de drogas ilícitas e medicamentos por motoristas. O processo jurídico exige uma declaração de um farmacologista especializado que valide a alteração psicomotora do motorista e compare esta alteração com a correspondente dose de etanol, para assim decidir a respeito da penalização (VINDENES, 2014). Em 2011, o país estabeleceu concentrações sanguíneas legais para alguns fármacos usualmente vendidos no mercado varejista.

Na Suécia, o tema é tratado de forma mais rigorosa, pois não é admitida a presença de determinados fármacos em nenhuma concentração em amostras biológicas de condutores de veículos (JONES, 2005; VINDENES et al., 2012).

Nos Estados Unidos, a legislação é específica para cada estado. Alguns deles como Havaí e Nova Iorque separam a legislação em dois estatutos: dirigir sob influência de drogas

(*DUI-drugs*), que engloba os medicamentos, e dirigir sob influência de álcool (*DUI- alcohol*). Nos estados de Arizona, Delaware, Georgia, Indiana, Minnesota, Pennsylvania e Utah, a legislação é baseada nos valores de limites *per se*, sendo chamados de estados *per se* (Quadro 2).

Quadro 4 - Exemplos de abordagens jurídicas utilizadas em diferentes países em casos de dirigir sob efeito de drogas.

<i>Impairment approach</i>	Se o motorista mostra claros sintomas de deficiência em seu comportamento ou no modo de dirigir, ele é autuado
<i>Limites Per se</i>	Se uma droga é constatada no fluido corporal do motorista (sangue ou em alguns países fluido oral) acima da concentração definida como <i>cutoff</i> , o motorista é autuado
<i>Sistema Two-tier</i>	Permite combinar as vantagens de duas regulamentações, ex: combina uma sanção mais branda quando a droga está presente numa concentração acima do limite <i>per se</i> e uma sanção mais rigorosa se o motorista estiver “incapacitado”

Fonte: DRUID (2011).

Enquanto alguns países são mais rigorosos em sua legislação, outros preferem investir em campanhas de conscientização e políticas públicas voltadas à prevenção para reduzir o número de acidentes por essa causa. A Austrália, por exemplo, iniciou uma campanha em 2005 envolvendo pacientes e profissionais da saúde com o objetivo de alertar a população sobre os possíveis efeitos perigosos de alguns medicamentos durante a condução de veículos. Para isso, foram criados criptogramas que foram inseridos nos cartuchos de medicamentos que possuem ação no sistema psicomotor, alertando os usuários. Um deles, em amarelo, indica "tenha cuidado"; um segundo, em laranja, indica “tenha muito cuidado” e um terceiro, em vermelho, indica “não dirija” (Figura 7).

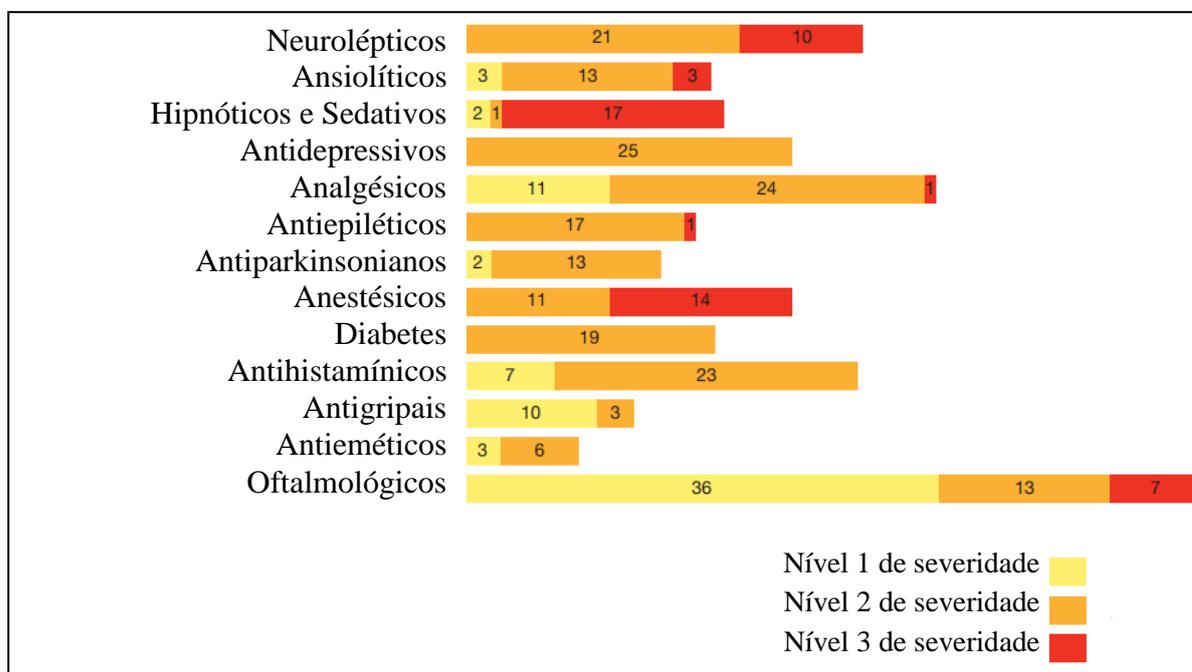
Figura 7 - Ilustração de avisos utilizados em medicamentos psicoativos na Austrália, alertando os motoristas sobre três diferentes níveis de comprometimento psicomotor. psicomotor.



Fonte: SMYTH; SHEEHAN; SISKIND (2011).

Na Figura 8 é apresentado como exemplo, as classes e a quantidade de fármacos classificados dentro desses 3 níveis de alerta em 2005 na França.

Figura 8 - Número de unidades de medicamentos classificados e suas respectivas classes.



Fonte: AFSSAPS (2005).

Essa medida de alerta também está sendo adotada na Espanha e Holanda com o intuito de conscientizar os motoristas sobre o perigo do consumo de medicamentos e o ato de dirigir (FIERRO, GOMEZ-TALEGON, ALVAREZ, 2013; MONTEIRO et al., 2013; SMYTH et al., 2013).

1.5.2 Brasil

No contexto de substâncias psicoativas e motoristas, a legislação brasileira ainda se encontra em desenvolvimento, uma vez que essa não é clara sobre quais medicamentos e em qual concentração estão proibidos na condução de veículos automotores.

A primeira abordagem sobre substâncias psicoativas no Código de Trânsito Brasileiro (CTB) ocorreu na Lei nº 9.503/97, que traz a proibição do uso de substâncias psicoativas no artigo 165: “...*dirigir sob a influência de álcool, em nível superior a seis decigramas por litro de sangue, ou de qualquer substância que determine dependência física ou psíquica*”. Essa lei foi atualizada em 2008 (Lei 11.705) e posteriormente em 2012, para a atual Lei nº 12.760, conhecida popularmente como “Lei Seca” (BRASIL, 2012).

Mesmo passando por atualizações, a atual lei não deixa explícito o que se entende pelo termo “*substância psicoativa que determina dependência*”, além de não correlacionar esse termo com a única portaria existente sobre substâncias entorpecentes, que é a Portaria 344.

Desse modo, a falta dessa menção clara no código de trânsito brasileiro (CTB) gera margem para muitas discussões judiciais. Ademais, a legislação vigente não estabelece como deverá ser realizada a fiscalização e a constatação do uso de fármacos psicoativos pelo motorista, ficando sem esclarecimento questões como: A escolha dos motoristas a serem abordados deve ser feita de modo aleatório como nas *blitz* de álcool? Qual técnica deve ser utilizada para a triagem *in loco*? Como será coletada a amostra do motorista para fazer o teste confirmatório (que garante que o motorista está sob efeito da substância psicoativa)?

No ano de 2015, a Lei 13.103 entrou em vigor no Brasil acrescentando no CTB o artigo 148 onde é exigido dos motoristas das classes C, D e E o exame toxicológico de larga janela de detecção (90 dias) para renovação da carteira nacional de habilitação (BRASIL, 2015). Essa lei está em vigor atualmente, mas também gera muita controvérsia, pois o CTB deixa explícito que o motorista não pode dirigir sob efeito de substâncias psicoativas e o

exame de ‘larga janela de detecção’ exigido utiliza como matriz biológica o cabelo, que não prova que o motorista estava dirigindo sob efeito de substâncias psicoativas, o que mostra certa incoerência (LEYTON et al., 2015; LEYTON et al., 2018).

1.6 Identificação de substâncias psicoativas em fluido oral

Quando se trata de análise de substâncias psicoativas em motoristas, um fator muito importante a ser considerado é o tipo de matriz biológica a ser utilizada, o local da coleta, o profissional responsável pela coleta e os aparatos necessários.

Na maior parte das vezes, o motorista é abordado em *blitz* organizadas em ruas e rodovias ou após um agente treinado perceber alguma alteração visível na execução do ato de dirigir. Esse contexto dificulta a coleta de alguns tipos de matrizes biológicas, como por exemplo, o sangue e a urina, uma vez que se faz necessário toda uma estrutura para tal coleta.

Por essas razões, o fluido oral vem sendo muito utilizado atualmente nesse tipo de monitoramento e tem ganhado destaque em estudos de prevalência, pois a coleta pode ser feita em qualquer local, não é invasiva e conseqüentemente é menos rejeitada por voluntários (GJERDE et al., 2011; DRUMMER, 2006). Além disso, se comparado à urina, matriz biológica muito utilizada para fins de detecção do uso de substâncias psicoativas, o fluido oral possui também vantagens em relação à dificuldade de adulteração e facilidade de vigilância durante o ato da coleta (MACCALL et al., 2013; FENDRICH et al., 2004).

Outro benefício sobre a urina é a capacidade do fluido oral de refletir de modo mais preciso o uso recente de substâncias. A droga na sua forma inalterada é, na maior parte dos casos, mais presente no fluido oral e reflete a concentração da droga livre no plasma, o que permite uma melhor correlação com os efeitos farmacodinâmicos da droga (BOSKER, 2009). Desse modo, o fluido oral é atualmente a matriz de escolha para diversos projetos internacionais que atuam com a temática: dirigir sob a influência de substâncias psicoativas (LACEY et al., 2009; SCHULZE et al., 2012).

Os dispositivos coletores de fluido oral disponíveis no mercado, na sua maioria, são adequados para as coletas no trânsito oferecendo praticidade e simplicidade no seu manuseio. Segundo estudos de avaliação de sensibilidade e especificidade destes dispositivos coletores, a grande maioria apresentou em média 80% de sensibilidade, especificidade e eficiência analítica após avaliação (DRUID, 2012; BOSKER; HUESTYS, 2009).

O fluido oral é composto por saliva (secreção das glândulas parótida, submandibular e sublingual), glicoproteínas (mucina), enzimas, além de bactérias e resíduos de alimentos ingeridos.

O uso dessa matriz biológica é extremamente interessante, pois a detecção de uma substância no fluido oral, como já mencionado, está diretamente relacionada com sua presença no sangue e, portanto, com o fato de o indivíduo estar sob sua influência da substância no ato da coleta. Isso ocorre porque as glândulas salivares são altamente perfundidas por capilares sanguíneos, permitindo assim uma rápida transferência de moléculas do sangue para a saliva (CONE; A HUESTIS, 2007).

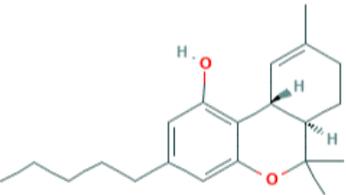
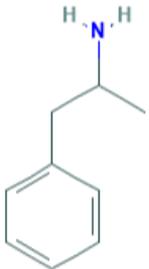
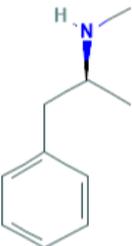
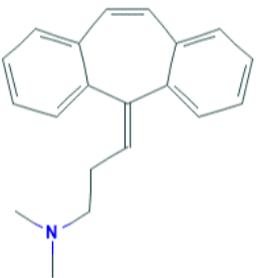
1.7 Características físico-químicas do analitos em estudo

O conhecimento da farmacocinética dos analitos em estudo é um fator determinante para entender a presença dos mesmos nas matrizes biológicas, pois a maior parte das substâncias que entram no organismo passam pelos processos de absorção, distribuição, biotransformação e excreção e dependendo das características físico-químicas da substância e do tempo de uso da mesma, ela estará mais presente nem determinadas matrizes e em determinadas concentrações.

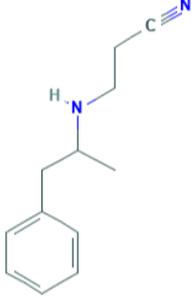
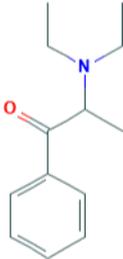
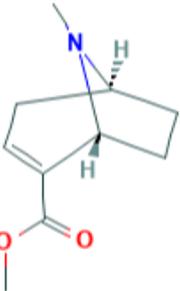
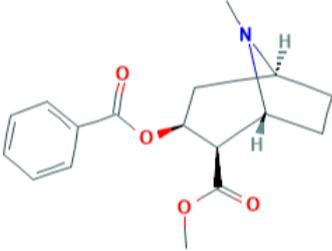
A maior parte das substâncias que estão presentes no sangue chega ao fluido oral por difusão passiva. Para que esse fenômeno ocorra, o analito deve ser lipossolúvel, estar na forma não ionizada, não ter forte ligação às proteínas plasmáticas e ter tamanho menor que 500 Da (ANIZAN, 2013).

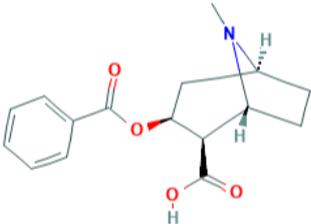
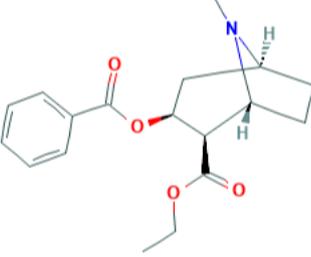
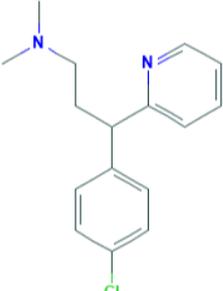
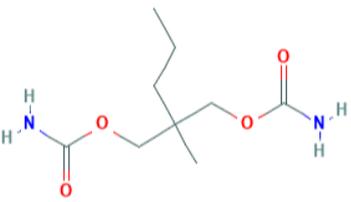
No Quadro 6 são apresentadas as moléculas em estudo e suas principais características físico-químicas como massa molecular (MM), número de identificação internacional da substância (CAS), valores de pKa, tempo de meia vida e percentual de ligação às proteínas plasmáticas.

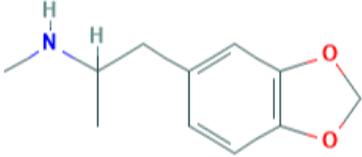
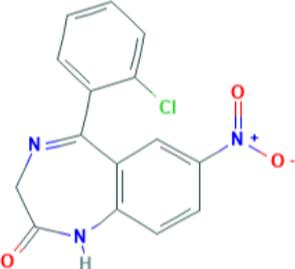
Quadro 5 - Estrutura molecular, valor de pKa e tempo de meia vida dos analitos em estudo.

Nome	Estrutura molecular	pKa	Tempo de meia vida (plasma)	Ligação às proteínas plasmáticas (%)
Delta-9-THC CAS: 1972-08-3 MM: 314.5 g/mol		9.34	4 a 30 horas	97%
ANFETAMINA CAS: 300-62-9 MM: 135.21 g/mol		10.01	11 horas	20%
METANFETAMINA CAS: 537-46-2 MM: 149.23 g/mol		10.21	4,5 horas	ND
CICLOBENZAPRINA CAS: 303-53-7 MM: 275.4 g/mol		9.76	18 horas	93%

continua

Nome	Estrutura molecular	pKa	Tempo de meia vida (plasma)	Ligação às proteínas plasmáticas (%)
<p>FEMPROPOREX</p> <p>CAS: 16397-28-7 MM: 188.27 g/mol</p>		7.88	ND	ND
<p>DIETILPROPIONA</p> <p>CAS: 90-84-6 MM: 205.3 g/mol</p>		7.44	5 horas	ND
<p>AEME</p> <p>CAS: 43021-26-7 MM: 181.23 g/mol</p>		-	ND	ND
<p>COCAÍNA</p> <p>CAS: 50-36-2 MM: 303.35 g/mol</p>		8.85	1h	ND

Nome	Estrutura molecular	pKa	Tempo de meia vida (plasma)	Ligação às proteínas plasmáticas (%)
BENZOILECGONINA CAS: 519-09-5 MM: 289.33 g/mol		9.54	ND	ND
COCAETILENO CAS: 529-38-4 MM: 317.4 g/mol		-	ND	ND
CLORFENIRAMINA CAS: 132-22-9 MM: 274.79 g/mol		9.47	24 horas	72%
MEPROBAMATO CAS: 57-53-4 MM: 218.25 g/mol		15.17	10 horas	ND

Nome	Estrutura molecular	pKa	Tempo de meia vida (plasma)	Ligação às proteínas plasmáticas (%)
<p>MDMA</p> <p>CAS: 42542-10-9 MM: 193.24 g/mol</p>		10.14	6 horas	ND
<p>CLONAZEPAM</p> <p>CAS: 1622-61-3 MM: 315.71 g/mol</p>		11.89	35 horas	84%

Fonte: PUBCHEM, DRUGBANK (2019).

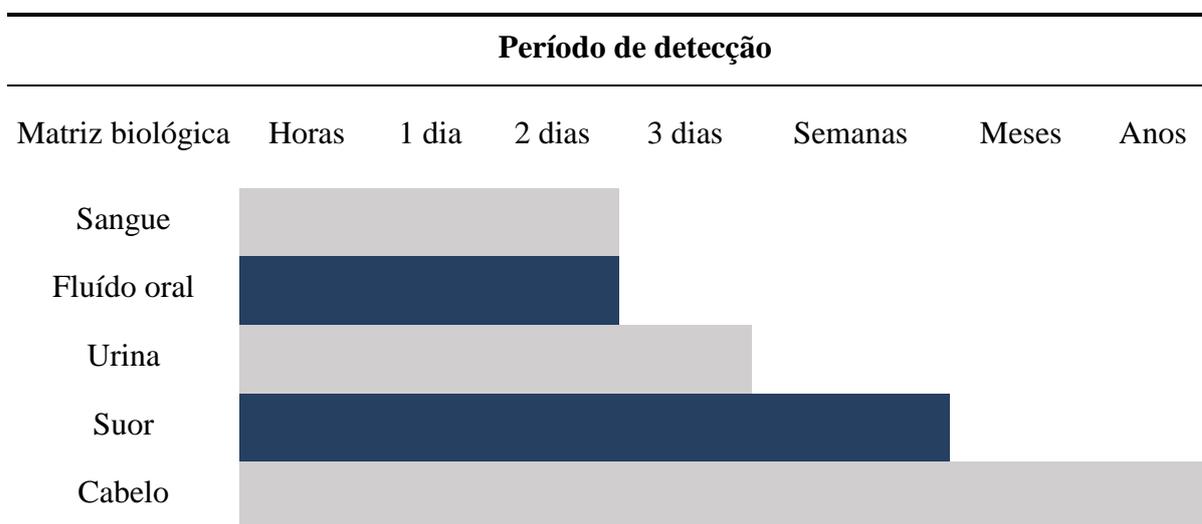
Estudos comprovam que existe uma correlação entre sangue e fluido oral quando se trata de cinética. A cocaína, um dos analitos em estudo no presente projeto, é um exemplo de substância onde essa correlação entre as duas matrizes pode ser claramente observada (SCHEIDWEILER, 2010), porém essa correlação não ocorre para todas as substâncias. O THC, por exemplo, é uma das substâncias em que a correlação entre as duas matrizes não é exata.

O fato do THC e de seus produtos de biotransformação serem muito lipossolúveis e ligarem-se fortemente às proteínas plasmáticas dificulta muito a transferência dessas substâncias quando presentes no sangue para o fluido oral. Desse modo, a identificação de THC no fluido oral é por meio da presença residual da substância na cavidade bucal do usuário que fumou.

Assim, quando a análise de THC é feita no fluido oral, a molécula a ser identificada é a delta 9-THC, ou seja, molécula ativa da *cannabis* que ainda não foi biotransformada (MOFFAT et al., 2011).

O fato do período de detecção do fluido oral ser semelhante ao plasma, pois enquanto a substância está presente no plasma está sendo perfundida para o fluido oral, respeitando as características cinéticas de cada uma, confere a essa matriz uma ótima opção quando é necessário saber se o indivíduo está sob efeito ou fez uso recente de alguma substância psicoativa, uma vez que ao passar algumas horas, a substância será biotransformada e estará presente em menores concentrações no fluido oral (Figura 9).

Figura 9 - Período de detecção de diferentes matrizes biológicas



Fonte: UNODC (2015).

No Quadro 5 são apresentadas as vantagens e desvantagens do uso do fluido oral como matriz para identificação de substâncias psicoativas.

Quadro 6 - Vantagens e desvantagens entre matrizes biológicas alternativas.

Matriz biológica	Período de detecção	Vantagens	Desvantagens
Cabelo	Meses - dependendo do tipo de droga	<p>Pode ser utilizada para identificar o uso crônico</p> <p>Coleta relativamente não-invasiva</p> <p>Passível de obter uma segunda amostra para contraprova (se necessário)</p> <p>Difícilmente adulterável</p>	<p>Não adequado para detectar uso recente de drogas</p> <p>Pode ser considerada uma coleta invasiva se a quantidade de cabelo for insuficiente</p> <p>Requer técnicas sensíveis de triagem e confirmação por espectrometria de massa</p> <p>A deposição da droga e/ou do seu produto de biotransformação depende da pigmentação do cabelo</p> <p>Passível de contaminação externa</p>
Fluído oral	Horas ou dias - dependendo do tipo de droga	<p>Coleta relativamente não-invasiva</p> <p>Coleta passível de observação, portanto dificilmente adulterada ou substituída</p> <p>Para algumas drogas, a concentração pode ser correlacionada com aquela encontrada no plasma</p>	<p>Janela de detecção curta</p> <p>Requer técnicas sensíveis de triagem e confirmação por espectrometria de massa</p> <p>Os dispositivos coletores podem diluir a amostra o que torna a detecção de drogas mais difícil</p> <p>Depois de fazer uso de <i>Cannabis</i>, o Δ-9-THC é a substância detectada na cavidade bucal</p>
Suor	Semanas - dependendo do tipo de droga	<p>Mensura o uso cumulativo de droga</p> <p>Pode monitorar o uso de drogas por um período de semanas utilizando um adesivo apropriado</p>	<p>Requer técnicas sensíveis de triagem e confirmação por espectrometria de massa</p> <p>Grande variabilidade entre os indivíduos</p> <p>Para monitorar o uso de drogas no ambiente de trabalho, o uso de um adesivo por vários dias é impraticável</p>

Fonte: OSSELTON; WATTS (2011).

1.8 Análise toxicológica de fármacos e drogas em fluido oral

Atualmente, as pesquisas voltadas para a área de trânsito focam na utilização do fluido oral como matriz biológica de escolha, pois devido às facilidades e as vantagens que essa matriz oferece, claramente há uma tendência em utilizá-la com mais frequência em detrimento das matrizes mais complexas (BOSKER, et al., 2009).

Para extrair os analitos de interesse do fluido oral, algumas metodologias são mais utilizadas como a extração em fase sólida, do inglês *solid phase extraction* (SPE) que constitui em uma fase estacionária com características específicas para determinadas moléculas garantindo assim maior seletividade e *clean up* da amostra. Por ser específica, ela restringe o tipo de substâncias a serem analisadas, exigindo que seja feita mais de uma extração da mesma amostra nas análises onde há o intuito de identificar diversas classes de substâncias num mesmo método (BARRIONUEVO; LANÇAS, 2001).

Já a extração líquido-líquido, do inglês *liquid-liquid extraction* (LLE) onde se faz o uso de um solvente, permite que uma gama maior de substâncias seja extraída e analisada num mesmo método, uma vez que o solvente consegue extrair da matriz diversas substâncias (LAW; TODD, 2008). Além disso, o método é mais barato e mais simples quando comparado à extração em fase sólida.

Atualmente, alguns dispositivos coletores de fluido oral já possuem um tampão que garante a estabilidade da amostra, além de promover uma diminuição da viscosidade da matriz, fato que facilita bastante a análise do fluido oral (BOSKER, et al., 2009).

1.9 Valores de *cutoff*

Valor de *cutoff* é o termo que se refere ao número utilizado como “limite” numa análise, ou seja, um valor adotado como fator de decisão onde acima dele a amostra é considerada positiva e conseqüentemente abaixo, é considerada negativa para a presença de determinada substância. A determinação do valor de *cutoff* é bastante discutido na área científica, pois para determiná-lo deve-se levar em consideração contaminações externas e a dose na qual a substância causa algum efeito no indivíduo (BIEDERMANN et al., 2018).

Instituições presentes em diferentes países, elaboram os próprios valores de *cutoff* que acham adequados para uso no país, baseados em pesquisas que acreditam mais adequadas ao perfil do local.

Na Tabela 7, são apresentados os valores de *cutoff* utilizados por algumas dessas instituições conhecidas na área de monitoramento de substâncias psicoativas. As organizações são a americana *Substance Abuse and Mental Health Services Administration* (SAMHSA), o projeto europeu *Driving Under the Influence of Drugs Alcohol and Medicines* (DRUID) e do *International Meeting in Talloires- France* (TALLOIRES).

Tabela 5 - Valores de *cutoff* em fluido oral recomendados por SAHMSA, DRUID e Talloires.

Substâncias	SAMHSA triagem (µg/L)	SAMHSA confirmação (µg/L)	DRUID confirmação (µg/L)	Talloires confirmação (µg/L)
Canabinoides	4	2 ^a	1 ^a	2
Opiáceos	40	-	-	-
Morfina	0	40	20	20
Codeína	-	40	20	20
6AM	4	4	5	5
Metadona	-	-	20	20
Fenciclidina	10	10	-	-
Anfetaminas	50	-	-	-
Anfetamina	-	50	25	20
Metanfetamina	-	50 ^b	25	20
MDMA	50	50	25	20
MDA	-	50	25	20
MDEA	-	50	25	20
Cocaína ou BE	20	8	10	10
Benzodiazepínicos				
Flunitrazepam	-	-	1	-
Diazepam	-	-	5	-
Alprazolam	-	-	1	-
Oxazepam	-	-	5	-
Nordiazepam	-	-	1	-
Lorazepam	-	-	1	-
Clonazepam	-	-	1	-

^a THC^b Espécime deve conter anfetamina \geq LOD do método

Fonte: BOSKER (2009).

Na validação de método apresentada no presente projeto, foram utilizados os valores de *cutoff* do DRUID, pelo motivo de ser o único que aborda os benzodiazepínicos, fato esse

que serviu de referência para a avaliação de um dos analitos pertencentes à essa classe, o clonazepam.

1.10 Parâmetros validados no presente método

A validação de um método analítico é o processo que garante por meio dos estudos experimentais que a metodologia desenvolvida possui confiabilidade analítica garantindo assim, a aplicabilidade dos resultados. Para garantir tal confiabilidade, alguns parâmetros devem ser seguidos segundo guias de validação nacional e internacional.

A seguir, são apresentados os parâmetros validados no presente projeto.

1.10.1 Linearidade

Linearidade é o parâmetro que determina se existe uma relação diretamente proporcional entre a resposta do método e a concentração do analito na matriz sobre a faixa de concentrações do analito de interesse (faixa de trabalho). A faixa de trabalho, ou seja, intervalo de concentração da curva no método, é determinada baseada na finalidade do mesmo. Um dos critérios que garantem o propósito desse parâmetro é o coeficiente de correlação (r), que idealmente deve ser $\geq 0,99$, mas muitas vezes e um valor inferior a 0,99 ainda pode ser adequado (SWGTOX, 2013).

1.10.2 Limite de detecção

O limite de detecção é a menor quantidade de analito que pode ser detectada com um determinado grau de certeza na amostra, porém não necessariamente quantificada (SWGTOX, 2013).

Existem vários métodos de estimar o LOD, os quais dependem da análise de amostras em branco e do exame da relação sinal-ruído.

1.10.3 Limite de quantificação

O limite de quantificação (LOQ) é a menor concentração do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições da metodologia proposta. A determinação desse valor é feita por meio da análise de concentrações decrescentes dos analitos em estudo na matriz. O menor valor alcançado com precisão e exatidão será o valor de LOQ (SWGTOX, 2013).

1.10.4 Precisão intra e inter-ensaio

A precisão é o parâmetro que avalia a proximidade entre os resultados obtidos com as diversas replicatas de uma mesma amostra analisadas em um mesmo método e nas mesmas condições. Desse modo são avaliadas a reprodutibilidade e a repetibilidade do método (SWGTOX, 2013).

O valor da precisão é calculado pela por meio do coeficiente de variação (CV) e é concentração dependente, ou seja, a precisão deve ser mensurada em diferentes concentrações de uma mesma curva analítica que será utilizada no método, geralmente nos pontos correspondentes às concentrações baixa, média e alta. O valor de precisão ideal deve estar compreendido entre 0 e 20%, mostrando assim que a variação entre as análises não deve ser grande (SWGTOX, 2013).

1.10.5 Exatidão

Exatidão é o parâmetro que mede a diferença entre o valor real da concentração presente na amostra e o valor obtido na análise. Geralmente é expressa em porcentagem e é avaliada por meio da inexatidão, ou seja, quanto os valores obtidos nas análises se afastam dos valores ideais (SWGTOX, 2013).

1.10.6 Recuperação

A recuperação avalia a eficiência do método de tratamento da amostra. Toda amostra que recebe tratamento de análise indireta (extração, concentração, derivação) deve ter calculado experimentalmente a perda do analito decorrente desse tratamento.

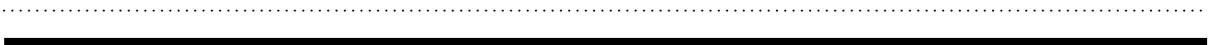
A recuperação expressa a variação de resposta obtida entre a quantidade de analito adicionada antes da extração e aquela decorrente da adição da mesma quantidade do analito após o processo de extração.

1.10.7 Carryover

A palavra *carryover*, que em português significa transferir ou carregar, é o termo utilizado exemplificar a transferência do analito para uma amostra subsequente e que pode levar a um resultado qualitativo ou quantitativo errôneo (SWGTOX, 2013).

Para garantir que nenhum analito da amostra seja transferido para as amostras subsequentes, esse parâmetro deve ser avaliado geralmente analisando 3 amostras brancas logo após o ponto de maior concentração da curva analítica.

Objetivo



2 Objetivo

O objetivo do presente trabalho é o desenvolvimento e a validação de método analítico para identificação de anfetamina, metanfetamina, metilenedioximetanfetamina (MDMA), cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno, metilecgonidina (AEME), ciclobenzaprina, clonazepam, clorfeniramina, dietilpropiona, meprobamato, femproporex e tetrahydrocannabinol (THC) em fluido oral e aplicação da metodologia validada em amostras de motociclistas da cidade de São Paulo.

Material e método

3 Material e método

3.1 Material

3.1.2 Equipamentos

- O equipamento utilizado para a identificação dos analitos e validação do método foi o cromatógrafo líquido modelo Nexera X2, acoplado a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo, modelo LC8060 – Shimadzu (Japão);

- Centrífuga, modelo Sorvall ST 8R – Thermo Scientific (EUA);
- Vórtex, modelo Genie2 – Scientific Industries (EUA);
- Turbovap Biotage LV - concentration workstation

3.1.3 Padrões analíticos

As soluções-padrão de anfetamina, metanfetamina, metilendioximetanfetamina (MDMA), cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno, anidroecgonina metil éster (AEME), ciclobenzaprina, clonazepam, clorfeniramina, dietilpropiona, meprobamato, femproporex, tetrahydrocannabinol (THC) e as soluções-padrão deuteradas, como anfetamina-d5, benzoilecgonina-d3, clonazepam-d4 e delta-9-tetrahydrocannabinol-d3 foram obtidas da Cerilliant Corporation (Round Rock, Texas, EUA).

A partir dessas soluções foram preparadas soluções de trabalho na concentração de 10 µg/mL e 1,0 µg/mL utilizando o mesmo solvente de origem (metanol ou acetonitrila). As soluções foram armazenadas em freezer a – 20 °C.

3.1.4 Reagentes e outros materiais

Os reagentes metanol e ácido fórmico utilizados na fase móvel, foram obtidos da empresa Merck (Darmstadt, Alemanha). Os sais bicarbonato de sódio e formiato de amônio foram obtidos da empresa Sigma Aldrich (Missouri, EUA).

Os dispositivos para coleta de fluido oral (Quantisal[®]), foram adquiridos da empresa Immunalysys (Pomona, Canadá).

3.1.5 Material biológico

3.1.5.1 Amostras de referência negativa

As amostras de fluido oral utilizadas como referência negativa durante os testes e etapas de validação do método, foram adquiridas de voluntários que alegaram não ter feito uso de nenhuma das substâncias em estudo (anfetamina, metanfetamina, MDMA, cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno, AEME, ciclobenzaprina, clonazepam, clorfeniramina, dietilpropiona, meprobamato, femproporex e THC).

3.1.5.2 Amostras de referência positiva

Para a validação de todos os parâmetros do método, foram utilizadas como referência positiva, amostras de fluido oral de referência negativa adicionadas de soluções padrão de anfetamina, metanfetamina, MDMA, cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno, AEME, ciclobenzaprina, clonazepam, clorfeniramina, dietilpropiona, meprobamato, femproporex, THC e das soluções-padrão deuteradas, utilizadas como padrão interno, anfetamina-d5, benzoilecgonina-d3, clonazepam-d4 e delta-9-tetrahidrocanabinol-d3.

3.2 Métodos

3.2.1 Casuística

Foram convidados a participar voluntariamente do projeto, pessoas maiores de 18 anos que fossem portadoras da carteira Nacional de Habilitação (CNH) categoria A e estavam guiando motocicleta minutos antes da pesquisa.

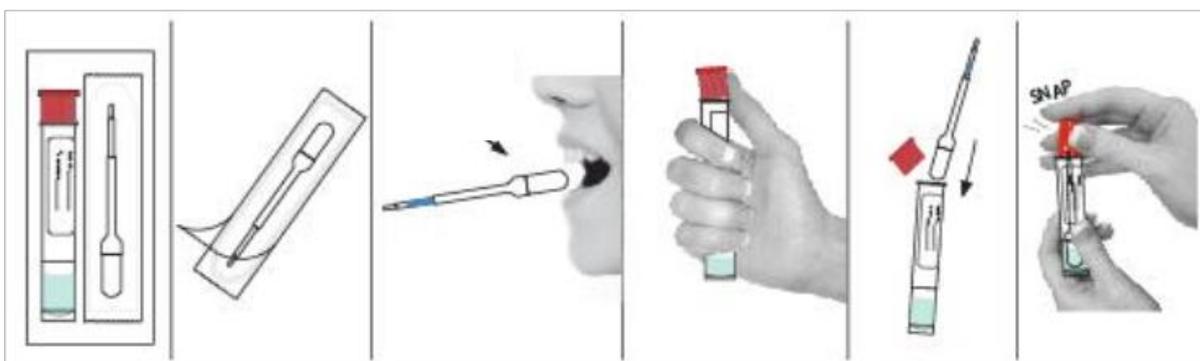
3.2.2 Coleta das amostras

As amostras de fluido oral de motociclistas foram coletadas no Sindicato de Motofrete do estado de São Paulo, local onde os motociclistas passam diariamente para

resolver questões burocráticas e buscar auxílio jurídico quando necessário. No total, foram coletadas 202 amostras.

A coleta das amostras de fluido oral dos voluntários foi feita utilizando o dispositivo Quantisal[®] onde 1mL de fluido oral é coletado utilizando um swab (que indica com a cor azul quando esse volume foi atingido) e misturado com 3mL de tampão de composição patenteada e não fornecida pelo fabricante, presente originalmente no coletor (Figura 10). Em seguida os dispositivos são levados ao laboratório onde são mantidos em freezer, numa temperatura de - 20 ° C até o momento da análise.

Figura 10 - Ilustração do dispositivo Quantisal[®].



Fonte: IMMUNALYSIS (2019).

Os motociclistas foram abordados, o intuito do projeto foi explicado e aqueles que aceitaram participar, doaram uma amostra de fluido oral.

As coletadas foram feitas de acordo com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP (CAAE: 66090517.6.0000.0067) e do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina – USP (CAAE: 66090517.6.3001.0065), uma vez que o presente projeto é feito por meio de colaboração entre essas faculdades.

3.2.3 Aplicação de Questionário

Os voluntários que aceitaram participar do projeto também responderam a um questionário (Anexo I) que continha perguntas que visionavam identificar o perfil social e do

consumo de álcool e drogas dos motociclistas. Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

3.2.4 Otimização do processo de extração

A extração dos analitos contidos na amostra para análise foi feita por extração líquido-líquido, do inglês *liquid-liquid extraction* (LLE) uma vez que é uma metodologia prática, viável e que permite a concentração de um número de analitos maior do que metodologias como a extração em fase sólida (SPE).

Com o intuito de inovar a técnica tão tradicional de LLE, decidiu-se adicionar ao método a técnica de QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*) onde se faz o uso de alguns sais sólidos, como o sulfato de magnésio ($MgSO_4$), e de um sorvente, no caso uma amina primária-secundária, do inglês *primary secondary amine* (PSA) com o objetivo de promover a limpeza da amostra (Anastassiades et al., 2003), ou seja, retirar da amostra moléculas que possam atuar como interferentes (proteínas, lipídeos, etc.).

O procedimento original de QuEChERS descrito na literatura e proposto por Anastassiades et al., (2003) faz o uso de acetonitrila, porém a mesma não demonstrou grande eficácia na extração dos analitos quando testada, por essa razão, foi feito um novo teste para identificarmos qual o melhor solvente para extrair os 14 analitos com diferentes características físico-químicas entre si. Como houve a alteração do solvente originalmente proposto, a técnica foi denominada *modified* QuEChERS.

Foram testados solventes de diferentes polaridades e também mistura de solventes na tentativa de obter a melhor extração possível dos 14 analitos em estudo. Os solventes testados são apresentados no Quadro 7.

Quadro 7 - Solventes testados na extração dos analitos em estudo.

Tentativa	Solvente (s)
1	acetonitrila
2	metanol
3	acetato de etila
4	clorofórmio + etanol
5	hexano + acetato de etila
6	diclorobutano + clorofórmio + etanol
7	MTBE + clorofórmio + etanol
8	acetato de etila + clorofórmio + etanol
9	MTBE + hexano + acetato de etila

Após todos os testes foi identificado que a mistura clorofórmio com etanol era a mais vantajosa.

A etapa seguinte foi a identificação do pH ideal para a extração dos 14 analitos propostos. Para isso, respeitou-se o valor de pKa de cada substância e foram testadas duas substâncias com o intuito de manter a amostra em pH= 9, pois assim todas as substâncias estariam em sua forma molecular. A cautela nessa etapa foi em não ultrapassar o pH para valores maiores que 9, uma vez que a cocaína sofre hidrólise em pH= 10.

Diferentes molaridades de hidróxido de sódio foram testadas, porém como uma mínima mudança de concentração alterava o pH bruscamente, decidiu-se fazer o uso de bicarbonato de sódio, pois com esse sal a alteração de pH de modo brusco não ocorre e o pH foi mantido em 9 como desejado.

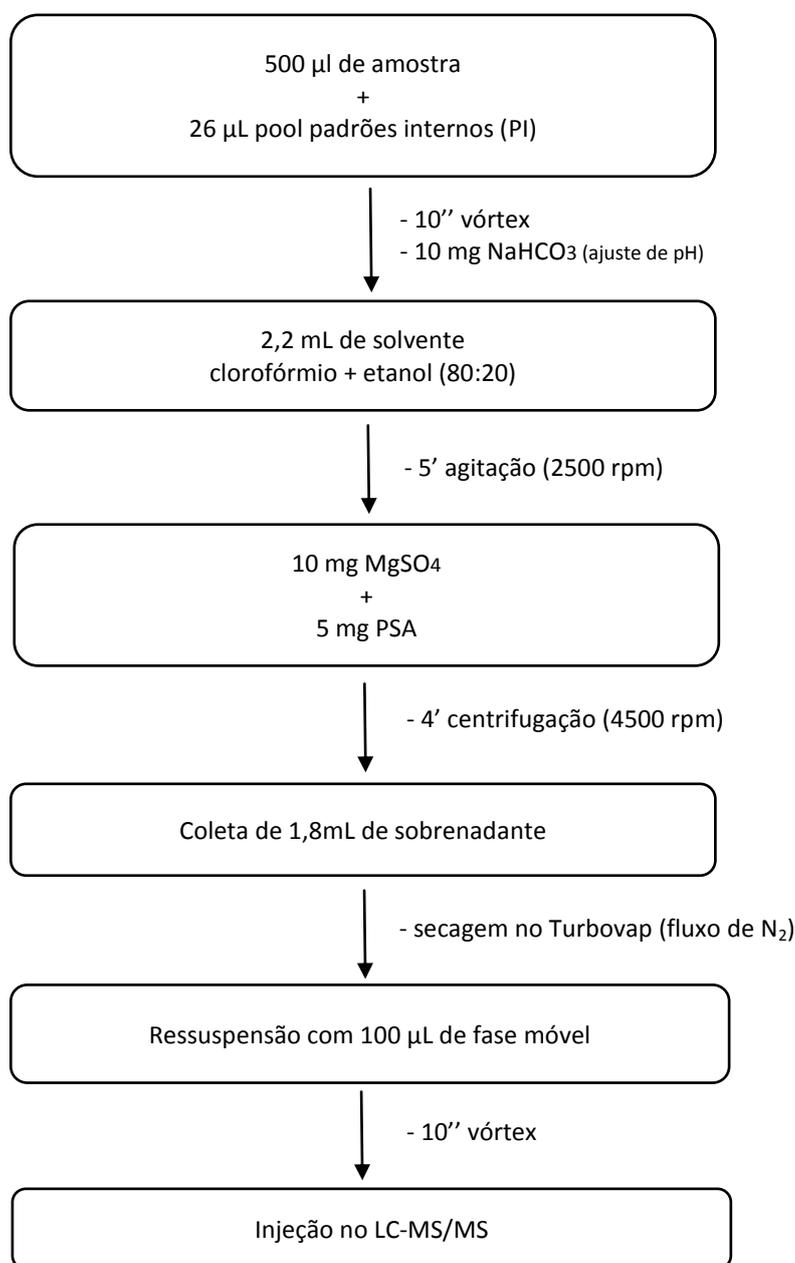
3.2.5 Preparo de amostras

A análise cromatográfica de substâncias psicoativas em fluido oral, de modo geral, utiliza tratamento prévio da amostra. Essa etapa tem como intuito a eliminação de substâncias indesejadas (como as glicoproteínas e outros resíduos), além da concentração dos analitos de interesse. Geralmente é a fase mais longa de um processo analítico e a principal fonte de erros e discrepâncias (RAMOS, 2012).

Com o intuito de transformar o preparo da amostra em uma etapa mais curta, mais simples e que tenha menor custo, o atual projeto utilizou o QuEChERS de forma miniaturizada, ou seja, pequenas quantidades de sais foram utilizadas.

Na Figura 11 é apresentado todo o processo de preparo da amostra até o momento de injeção no cromatógrafo líquido acoplado ao espectrômetro de massas, do inglês *liquid chromatograph mass spectrometer (LC-MS/MS)*.

Figura 11 - Fluxograma do preparo da amostra.



3.2.6 Parâmetros cromatográficos e espectrométricos

Nos Quadros 8 e 9 são apresentados os parâmetros cromatográficos e espectrométricos utilizados na validação do método proposto.

Quadro 8 - Parâmetros cromatográficos utilizados no método validado.

Parâmetros cromatográficos	
Coluna	Coluna de fase-reversa - C18 (2.1 x 100 mm id, 1.7 μ m)
Volume de injeção	3 μ L
Temperatura da coluna	50°C
Fluxo da fase móvel	0,4 mL/min
Composição da fase móvel A	Formiato de amônio (2mM) em água + Ácido fórmico 0,1%
Composição da fase móvel B	Formiato de amônio (2 mM) em metanol + Ácido fórmico 0,1%
Gradiente da fase móvel	0 – 4min: 10 -100% B 4 – 6 min: 100% B 6 – 6,2 min: 100 – 10% B 6,2 – 7 min: 10% B

Quadro 9 - Parâmetros espectrométricos utilizados no método validado.

Parâmetros espectrométricos	
Modo de ionização	Eletrospray (+)
Modo de operação	MRM
Temperatura da interface	400° C
Fluxo do gás nebulizador	3 L / min
Fluxo do gás de aquecimento	15 L / min
Temperatura da fonte	120°C

3.2.7 Determinação de substâncias psicoativas em fluido oral por LC-MS/MS.

O método de separação cromatográfica foi validado para a determinação das seguintes substâncias: anfetamina, metanfetamina, MDMA, benzoilecgonina, cocaína, cocaetileno, AEME, THC, ciclobenzaprina, clonazepam, clorfeniramina, dietilpropiona, femproporex e meprobamato em fluido oral. Para tal, amostras de referência negativas de fluido oral foram obtidas de voluntários que declararam não ter usado qualquer uma das substâncias em estudo e em seguida adicionados os analitos nas concentrações de interesse.

As substâncias em estudo foram agrupadas com os relativos padrões internos mostrados na Tabela 6. Para isso, os grupos foram formados utilizando o critério de proximidade entre os picos cromatográficos dos analitos e os picos dos padrões internos, fato que demonstra que as substâncias atuam de uma mesma maneira perante a coluna escolhida.

Tabela 6 - Analitos em estudo e seus respectivos padrões internos.

Analitos	Padrões internos
Anfetamina	
Metanfetamina	
Ciclobenzaprina	Anfetamina-d5
Femproporex	
Dietilpropiona	
AEME	
Cocaína	
Benzoilecgonina	
Cocaetileno	Cocaína-d3
Clorfeniramina	
Meprobamato	
MDMA	
THC	THC-d3
Clonazepam	Clonazepam-d4

Resultados

4. Resultados

São apresentados a seguir, os resultados do método desenvolvido e validado para determinação de substâncias psicoativas em fluido oral.

Todos os parâmetros validados foram baseados no guia de validação internacional destinado à área de toxicologia forense intitulado como *Scientific Working Group for Forensic Toxicology* (SWGTOX, 2013).

4.1 Validação de método analítico para identificação de anfetamina, metanfetamina, MDMA, cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno, AEME, ciclobenzaprina, clonazepam, clorfeniramina, dietilpropiona, meprobamato, femproporex e THC em fluido oral.

4.1.2 Infusão e injeção dos padrões analíticos

Os padrões analíticos das substâncias em estudo foram primeiramente infundidos no espectrômetro de massas, seus respectivos íons quantificadores e qualificadores foram identificados, assim como a energia de colisão ideal para cada substância. Em seguida, os padrões analíticos foram injetados no LC-MS/MS e os respectivos tempos de retenção foram obtidos.

Esses dados são apresentados na Tabela 8.

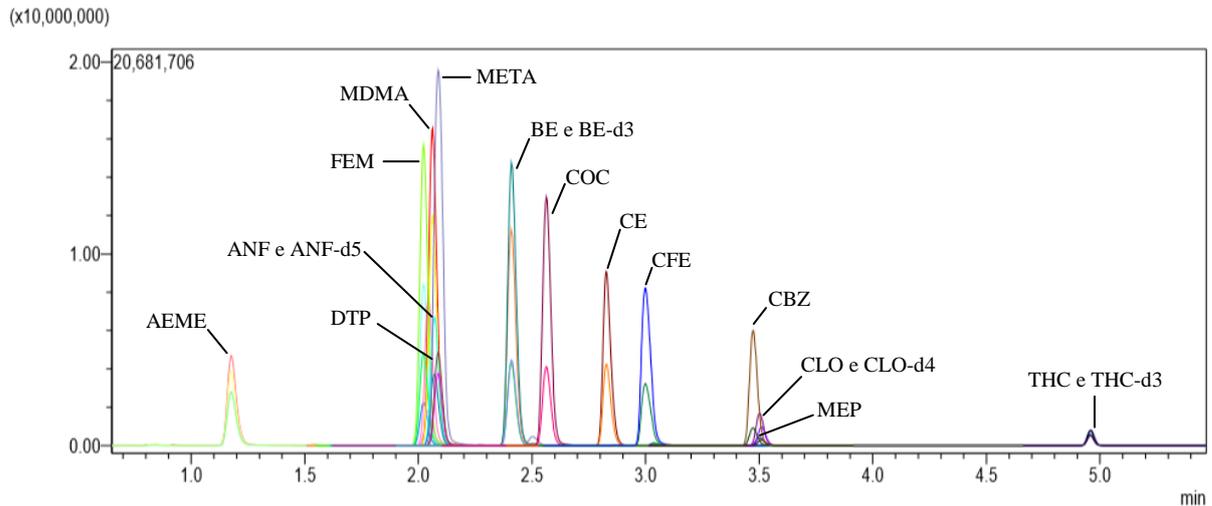
Tabela 7 - Tempo de retenção, energia de colisão e relação massa carga (m/z) dos íons precursores, qualificadores e qualificadores dos analitos em estudo no método validado.

Analitos	Íon precursor (m/z)	Íon quantificador (m/z)	Íons qualificadores (m/z)	Energias de colisão* (V)	Tempo de retenção (min)
THC	315	193,0	123,0	23, 33	4,96
Anfetamina	136,1	91,0	65,1	17, 37	2,04
Metanfetamina	150,1	91,0	119,0	20, 12	2,08
Ciclobenzaprina	276,1	215,0	191,0	45, 21	3,47
Femproporex	189,1	91,0	119,0	23, 12	2,02
Dietilpropiona	206,1	105,0	100,0	23, 23	2,07
AEME	182	91,0	118,1	27, 22	1,17
Cocaína	304	182,1	82,0	20, 31	2,56
Benzoilecgonina	290,1	168,0	105,0	20, 31	2,41
Cocaetileno	318	196,1	82,0	21, 33	2,82
Clorfeniramina	275,1	230,0	167,0	41, 18	2,99
Meprobamato	219,1	158,0	97,0	14, 09	3,03
MDMA	194,1	163,0	105,0	14, 25	2,06
Clonazepam	316	270,0	214,1	26, 40	3,51

4.1.3 Cromatogramas da amostra de fluido oral adicionada dos analitos em estudo e dos analitos individualmente

Na Figura 12 abaixo, é apresentado o cromatograma resultante da análise de uma amostra de fluido oral negativa adicionada dos analitos em estudo e dos padrões internos deuterados após preparo de amostra validado.

Figura 12 - Cromatograma dos analitos anfetamina (ANF), metanfetamina (META), MDMA, cocaína (COC), benzoilecgonina (BE), cocaetileno (CE), AEME, ciclobenzaprina (CBZ), clonazepam (CLO), clorfeniramina (CFE), dietilpropiona (DTP), meprobamato (MEP), femproporex (FEM) THC na concentração 50ng/mL e dos padrões internos deuterados anfetamina-d5(ANF-d5), benzoilecgonina-d3 (BE-d3), THC-d3 e clonazepam-d4(CLO-d4) na concentração de 20ng/mL.



A seguir, são apresentados os cromatogramas individuais dos analitos em estudo na concentração de 50 ng/mL e dos padrões internos, na concentração de 20 ng/mL (Figura 13).

Figura 13 - Cromatogramas individuais da anfetamina-d5 e da AEME.

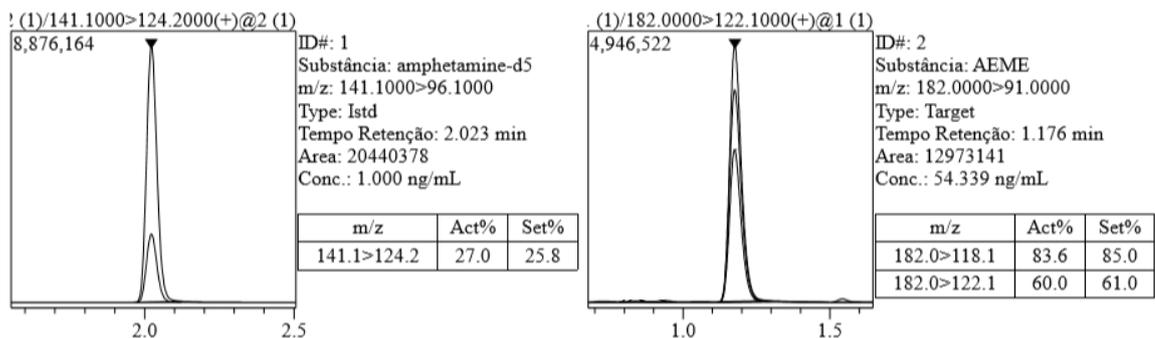
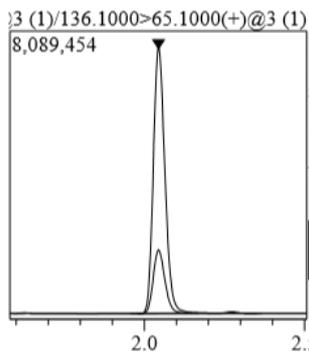
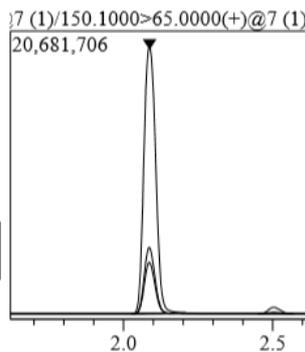


Figura 14 - Cromatogramas individuais da anfetamina, metanfetamina, MDMA, benzoilecgonina, cocaína, clonazepam, THC e meprobamato.



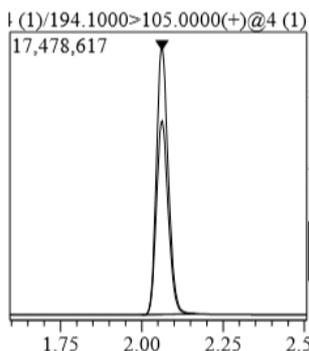
ID#: 3
Substância: amphetamine
m/z: 136.1000>91.0000
Type: Target
Tempo Retenção: 2.044 min
Area: 19339710
Conc.: 53.126 ng/mL

m/z	Act%	Set%
136.1>65.1	24.0	23.0



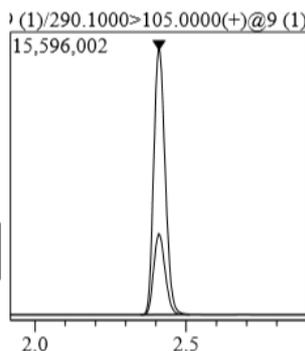
ID#: 4
Substância: methamphetamine
m/z: 150.1000>91.0000
Type: Target
Tempo Retenção: 2.087 min
Area: 53119307
Conc.: 49.201 ng/mL

m/z	Act%	Set%
150.1>119.0	17.5	16.0
150.1>65.0	22.7	20.0



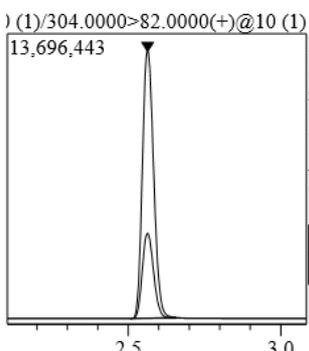
ID#: 5
Substância: MDMA
m/z: 194.1000>163.0000
Type: Target
Tempo Retenção: 2.062 min
Area: 41681327
Conc.: 48.948 ng/mL

m/z	Act%	Set%
194.1>105.0	72.8	74.0



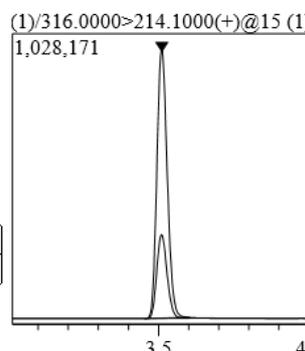
ID#: 6
Substância: benzoilecgonine
m/z: 290.1000>168.0000
Type: Target
Tempo Retenção: 2.410 min
Area: 38579972
Conc.: 52.696 ng/mL

m/z	Act%	Set%
290.1>105.0	30.4	31.0



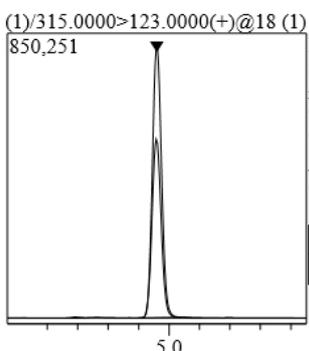
ID#: 7
Substância: cocaine
m/z: 304.0000>182.1000
Type: Target
Tempo Retenção: 2.563 min
Area: 32976628
Conc.: 49.452 ng/mL

m/z	Act%	Set%
304.0>82.0	31.9	33.0



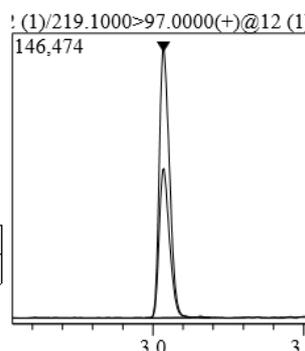
ID#: 8
Substância: clonazepam
m/z: 316.0000>270.0000
Type: Target
Tempo Retenção: 3.511 min
Area: 2311423
Conc.: 51.228 ng/mL

m/z	Act%	Set%
316.0>214.1	31.0	30.0



ID#: 9
Substância: THC
m/z: 315.0000>193.0000
Type: Target
Tempo Retenção: 4.960 min
Area: 1681874
Conc.: 48.970 ng/mL

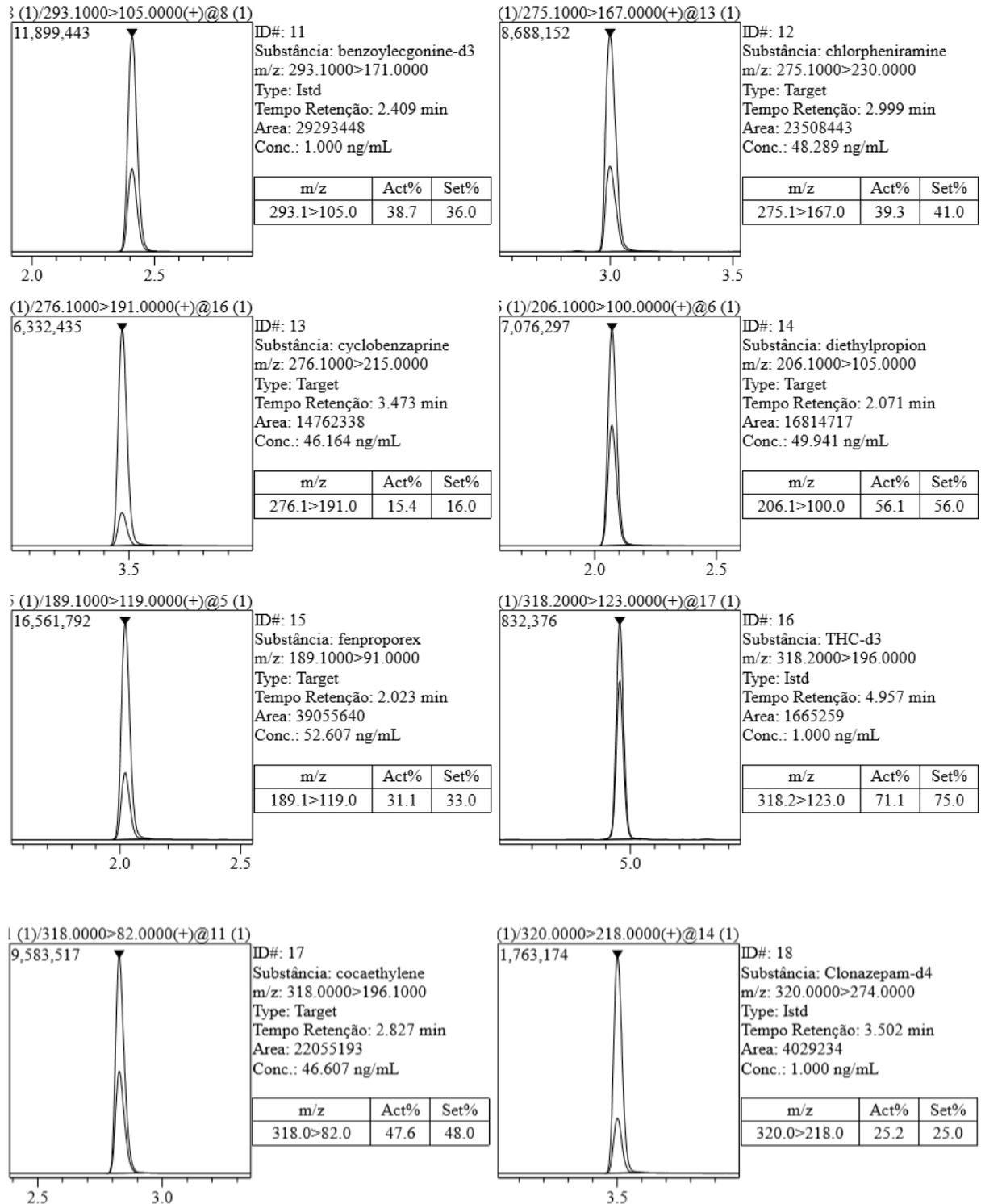
m/z	Act%	Set%
315.0>123.0	66.7	64.0



ID#: 10
Substância: meprobamate
m/z: 219.1000>158.0000
Type: Target
Tempo Retenção: 3.035 min
Area: 327254
Conc.: 52.032 ng/mL

m/z	Act%	Set%
219.1>97.0	55.9	60.0

Figura 15 - Cromatogramas individuais da benzoilecgonina-d3, clorfeniramina, ciclobenzaprina, dietilpropiona, femproporex, THC-d3, cocaetileno e clonazepam-d4.



4.1.4 Parâmetros validados

4.1.4.1 Linearidade

No presente trabalho, o estudo de linearidade foi realizado pela análise de amostras de fluido oral com 8 pontos, em sextuplicata, nas concentrações: 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0 e 50,0 ng/mL (para os analitos metanfetamina, MDMA, cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno, AEME, ciclobenzaprina, clonazepam, clorfeniramina, dietilpropiona, femproporex e THC) e com 7 pontos, em sextuplicata, nas concentrações: 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0 e 50,0 ng/mL (para os analitos anfetamina e meprobamato).

As equações de regressão linear, coeficientes de correlação obtidos e fatores de ponderação são apresentados na Tabela 9.

Tabela 8 - Dados obtidos no ensaio de linearidade dos analitos presentes no método proposto.

Analitos	Equação de regressão linear	Coefficiente de correlação (R²)	Fator de ponderação
THC	$y = 0,0127 x + 0,0020$	0,9987	1
Anfetamina	$y = 0,0374 x - 0,0060$	0,9891	1/X ²
Metanfetamina	$y = 0,0887 x - 0,0082$	0,9987	1/Y ²
Ciclobenzaprina	$y = 0,0609 x - 0,0472$	0,9913	1/Y ²
Femproporex	$y = 0,0552 x + 0,0221$	0,9999	1/Y ²
Dietilpropiona	$y = 0,0559 x + 0,0200$	0,9989	1/Y ²
AEME	$y = 0,0685 x - 0,0005$	0,9986	1/Y
Cocaína	$y = 0,003 x - 0,00006$	0,9992	1/X ²
Benzoilecgonina	$y = 0,0365 x - 0,0125$	0,9975	1/X ²
Cocaetileno	$y = 0,0019 x + 0,0003$	0,9989	1/X ²
Clorfeniramina	$y = 0,0367 x - 0,0295$	0,9919	1/X ²
Meprobamato	$y = 0,0003 x + 0,0001$	0,9965	1/X ²
MDMA	$y = 0,0545 x - 0,0370$	0,9952	1/Y ²
Clonazepam	$y = 0,0336 x - 0,0104$	0,9977	1/X ²

4.1.4.2 Limite de detecção e limite de quantificação

Para determinação dos limites de detecção (LOD), foram feitos testes de acordo com o item 7.6.4.2 *Estimating LOD Using Reference Materials*, presente no guia de validação SWGTOX, que sugere a utilização de amostras negativas fortificadas com concentrações decrescentes dos analitos de interesse em pelo menos três replicatas. Utilizando essa abordagem, é possível identificar as menores concentrações detectáveis que são capazes de produzir um resultado positivo, constituindo assim os valores de LOD adequados.

Para determinação dos limites de quantificação (LOQ), estão sendo realizados testes de acordo o item 7.7.3. *Estimating LOQ Using Rreference Materials*, presente no guia de validação SWGTOX, que sugere a utilização de três fontes diferentes de amostras negativas fortificadas com concentrações decrescentes dos analitos preparadas em duplicatas. Cada amostra será analisada em no mínimo três corridas diferentes (SWGTOX, 2013).

As concentrações utilizadas para essa abordagem devem permanecer dentro dos critérios de precisão e exatidão previamente estabelecidos pelo mesmo guia.

Os valores estipulados para LOD e LOQ na metodologia proposta, são mostrados na Tabela 10 e estão de acordo com as concentrações preconizadas no guia DRUID seguido como parâmetro de *cut-off* para os analitos (BOSKER; HUESTIS, 2009).

Tabela 9 - Valores de limite de detecção (LOD), quantificação (LOQ) e valores de *cut-off* utilizados no presente método.

Analitos	LOD	LOQ	DRUID <i>cut-off</i> confirmação (ng/mL)
THC	0,5 ng/mL	1 ng/mL	1
Anfetamina	1 ng/mL	2 ng/mL	25
Metanfetamina	0,5 ng/mL	1 ng/mL	25
Ciclobenzaprina	0,5 ng/mL	1 ng/mL	-
Femproporex	0,5 ng/mL	1 ng/mL	-
Dietilpropiona	0,5 ng/mL	1 ng/mL	-
AEME	0,5 ng/mL	1 ng/mL	-
Cocaína	0,5 ng/mL	1 ng/mL	10
Benzoilecgonina	0,5 ng/mL	1 ng/mL	10
Cocaetileno	0,5 ng/mL	1 ng/mL	-
Clorfeniramina	0,5 ng/mL	1 ng/mL	-
Meprobamato	1 ng/mL	2 ng/mL	-
MDMA	0,5 ng/mL	1 ng/mL	25
Clonazepam	0,5 ng/mL	1 ng/mL	1

4.1.4.3 Precisão intra e inter-ensaio

Os testes de precisão intra e inter-ensaio foram conduzidos com amostras de fluido oral em cinco dias diferentes, utilizando quatro replicatas para cada concentração de controle de qualidade (CQ). As concentrações empregadas para os controles de qualidade baixo, médio e alto foram de 3 ng/mL, 15 ng/mL e 40 ng/mL respectivamente.

Os resultados foram definidos pelo coeficiente de variação (CV) da análise das 4 replicatas nas diferentes concentrações e são apresentados nas Tabelas 11 e 12.

Tabela 10 - Valores de precisão intra-ensaio obtidos com a análise de fluido oral dos controles baixo, médio e alto.

Analitos	Precisão intra-ensaio (CV%)		
	3 ng/mL	15 ng/mL	40 ng/mL
THC	3,08	2,45	2,65
Anfetamina	1,68	4,34	5,12
Metanfetamina	2,51	1,84	5,30
Ciclobenzaprina	5,09	7,06	8,25
Femproporex	5,00	3,36	3,93
Dietilpropiona	6,22	5,14	3,52
AEME	4,33	5,05	5,45
Cocaína	4,90	5,37	5,73
Benzoilecgonina	3,64	3,37	5,24
Cocaetileno	4,45	3,44	4,88
Clorfeniramina	4,31	6,75	9,04
Meprobamato	4,59	6,07	6,56
MDMA	2,46	3,00	4,03
Clonazepam	2,54	1,93	2,18

Tabela 11 - Valores de precisão inter-ensaio obtidos com a análise de fluido oral dos controles baixo, médio e alto.

Analitos	Precisão inter-ensaio (CV%)		
	3 ng/mL	15 ng/mL	40 ng/mL
THC	17,39	13,31	9,32
Anfetamina	5,36	5,94	14,60
Metanfetamina	18,39	12,54	9,35
Ciclobenzaprina	15,68	9,24	12,04
Femproporex	15,54	8,97	12,77
Dietilpropiona	17,05	7,11	8,26
AEME	9,26	12,47	10,78
Cocaína	16,88	10,47	7,68
Benzoilecgonina	9,32	14,12	11,65
Cocaetileno	7,14	14,56	14,26
Clorfeniramina	10,54	7,98	11,47
Meprobamato	17,12	12,66	14,05
MDMA	12,56	14,96	10,77
Clonazepam	9,87	10,50	9,35

4.1.4.4 Exatidão

O cálculo de exatidão foi feito utilizando-se as concentrações baixa, média e alta (3, 15 e 40 ng/mL). A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, sendo que o desvio não deve exceder 15%, exceto para o ponto baixo da curva, para o qual se admite desvios menores ou iguais a 20%. Na Tabela 13, são apresentados os resultados de exatidão obtidos nas respectivas concentrações.

Tabela 12 - Valores de exatidão obtidos com a análise de fluido oral dos controles baixo, médio e alto.

Analitos	Exatidão %		
	3 ng/mL	15 ng/mL	40 ng/mL
THC	109,94	99,14	100,94
Anfetamina	101,12	93,19	93,14
Metanfetamina	98,07	84,77	95,24
Ciclobenzaprina	111,62	84,26	85,52
Femproporex	92,89	101,70	105,30
Dietilpropiona	112,65	108,41	119,22
AEME	82,30	81,11	91,33
Cocaína	119,94	116,39	107,22
Benzoilecgonina	105,55	92,24	92,67
Cocaetileno	101,47	89,55	94,62
Clorfeniramina	88,29	107,55	129,09
Meprobamato	107,16	105,41	83,14
MDMA	99,56	109,61	111,12
Clonazepam	105,75	109,46	97,77

4.1.4.5 Recuperação

Para o estudo de recuperação do método, dois grupos de amostras foram analisados. No primeiro grupo, os padrões de anfetamina, metanfetamina, MDMA, cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno, AEME, ciclobenzaprina, clonazepam, clorfeniramina, dietilpropiona, meprobamato, femproporex e THC foram adicionados às amostras, em duas concentrações 3 e 40 ng/mL, as quais foram submetidas à extração conforme procedimento para cada concentração. No segundo grupo, consistindo também de sextuplicatas para cada concentração, os mesmos padrões foram adicionados somente após a extração, sendo apenas o padrão interno adicionado antes. A recuperação foi avaliada pela área absoluta obtida no segundo grupo em relação à área relativa absoluta obtida no primeiro e os resultados são apresentados na Tabela 14.

Tabela 13 - Valores de recuperação obtidos com a análise de fluido oral dos controles baixo (3ng/mL) e alto (40 ng/mL).

Analitos	Recuperação %	
	3 ng/mL	40 ng/mL
THC	99,19	86,90
Anfetamina	80,71	81,09
Metanfetamina	85,27	86,55
Ciclobenzaprina	97,89	91,32
Femproporex	97,33	95,28
Dietilpropiona	93,47	95,44
AEME	78,93	86,00
Cocaína	85,21	89,88
Benzoilecgonina	70,32	72,54
Cocaetileno	84,63	94,07
Clorfeniramina	88,65	88,66
Meprobamato	100,70	94,47
MDMA	88,55	88,35
Clonazepam	94,22	90,29

4.1.4.6 Carryover

Foram analisadas três amostras negativas seguidas da corrida do maior ponto da curva (50ng/mL) como preconizado pelo guia SWGTOX.

Não foi identificado *carryover* para nenhum dos analitos .

4.2 Dados epidemiológicos dos voluntários participantes

Os dados apresentados abaixo mostram o perfil dos motociclistas abordados na cidade de São Paulo e que aceitaram participar do projeto. No total, foram 202 motociclistas participantes que responderam ao questionário socioeconômico (Anexo I) onde foram feitas

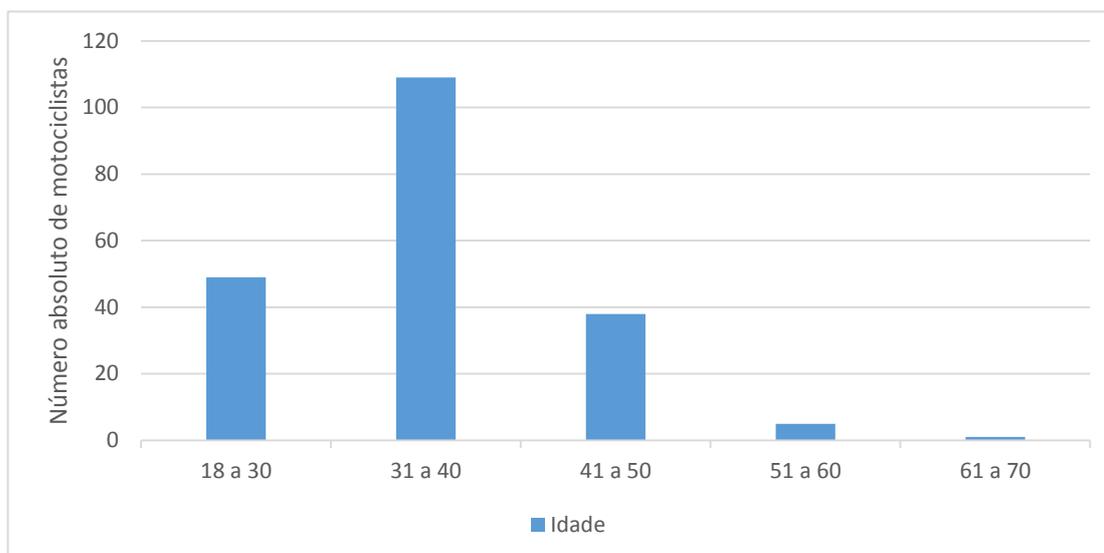
perguntas específicas sobre o condutor (idade, escolaridade, sexo, cor da pele, etc), itens de segurança da motocicleta, dados de saúde, dados de acidentes e consumo de álcool, drogas ilícitas e medicamentos.

A seguir, são apresentados na forma de gráficos, alguns dados abordados no questionário. Todos os dados apresentados nessa seção, foram relatados pelos próprios motociclistas nos questionários.

4.2.1 Idade dos participantes

No Gráfico 5, é apresentada a distribuição dos participantes da pesquisa por idade. Todos os motociclistas que participaram da pesquisa responderam a essa questão.

Gráfico 5 - Distribuição dos participantes por idade.



4.2.2 Grau de escolaridade dos participantes

Na Tabela 15, é apresentado o nível de instrução dos motociclistas participantes da pesquisa. Todos os motociclistas que participaram da pesquisa responderam a essa questão.

Tabela 14 - Grau de escolaridade dos participantes da pesquisa.

Nível de ensino	Número de motociclistas
Técnico	2
Fundamental incompleto	18
Fundamental completo	17
Médio incompleto	22
Médio completo	109
Superior incompleto	7
Superior completo	27

4.2.3 Sexo dos participantes

Na Tabela 16 é mostrado o número total de motociclistas participantes da pesquisa separados por sexo. Todos os motociclistas que participaram da pesquisa responderam a essa questão.

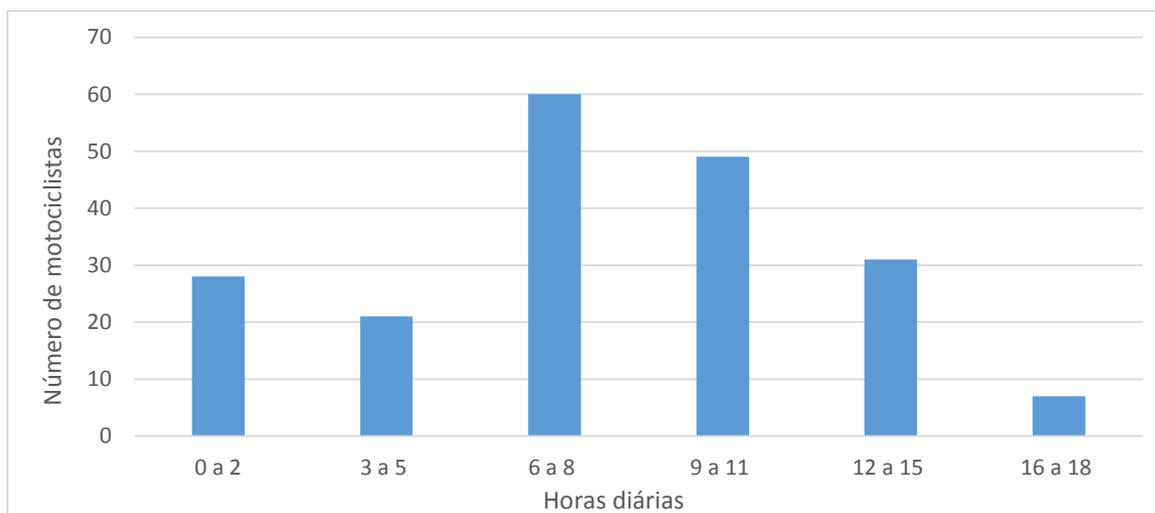
Tabela 15 - Número de motociclistas participantes do sexo feminino e masculino.

Sexo	Número de participantes
Feminino	5
Masculino	196

4.2.4 Horas diárias de trabalho

No Gráfico 6, são mostradas quantas horas diárias, em média, os voluntários abordados utilizam a motocicleta.

Gráfico 6 - Quantidade de horas em média, que os motociclistas guiam por dia.



4.2.5 Acidentes anteriores

A maior parte dos motociclistas participantes relata ter sofrido ao menos 1 acidente na vida. Na Tabela 17, são mostrados os números de acidentes e a gravidade dos mesmos. Todos os motociclistas que participaram da pesquisa responderam a essa questão.

Tabela 16- Número de motociclistas que já sofreram acidentes e gravidade dos mesmos.

Tipo de acidente	Número de motociclistas
Nunca sofreu acidente	40
Acidente leve (sem hospitalização)	43
Acidente com hospitalização	64
Acidente grave com internação	55

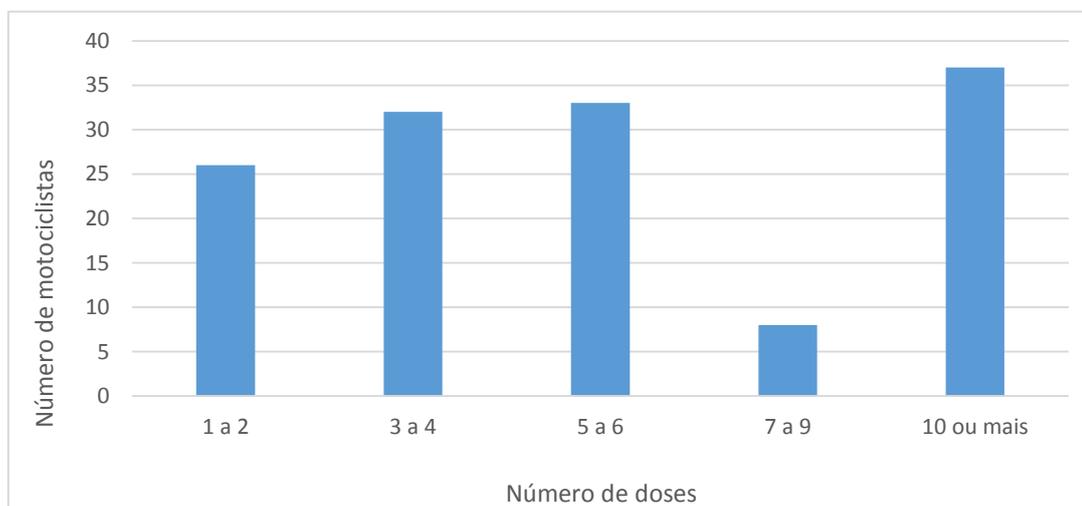
4.2.6 Consumo de álcool

No Gráfico 7 é apresentado o número de motociclistas que consomem bebida alcoólica e a frequência de consumo. Já no Gráfico 8, pode ser observada a quantidade de doses habitualmente administradas por aqueles motociclistas que relataram ser consumidores de bebida alcoólica. Todos os motociclistas que participaram da pesquisa responderam a essa questão.

Gráfico 7 - Número de motociclistas consumidores de bebida alcoólica e frequência do uso.



Gráfico 8 - Número de motociclistas e de doses de bebidas alcoólicas consumidas em um único dia.



4.2.7 Consumo de drogas ilícitas

O consumo de algumas classes de drogas ilícitas pelos motociclistas e a frequência são apresentados na Tabela 18. Nela é possível observar que a maconha é a droga mais consumida dentre as classes abordadas.

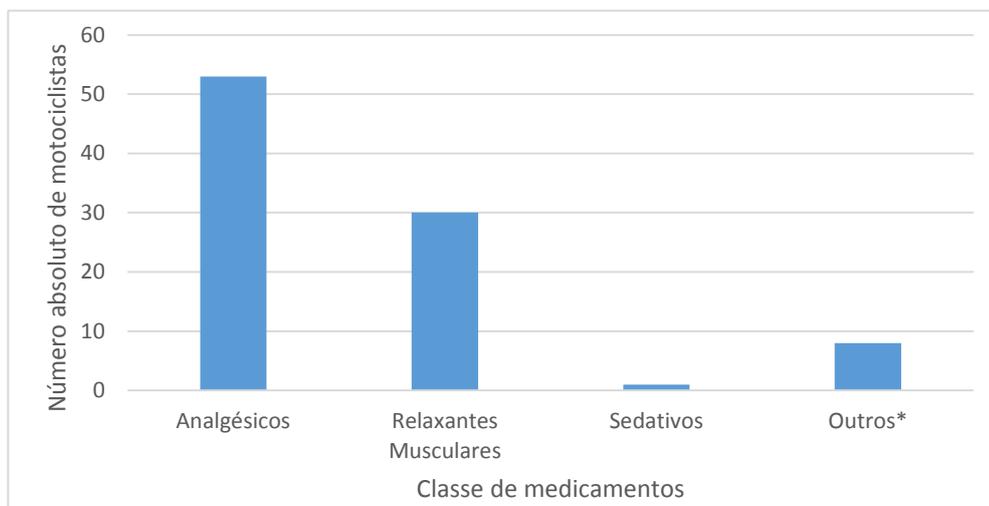
Tabela 17 - Número de motociclistas e respectiva frequência no uso de maconha, cocaína e anfetamínicos.

Tipo de droga	Maconha	Cocaína	Anfetamínicos
Nunca usou	133	169	199
Já fez uso ao menos 1 vez na vida	10	4	1
Já usou algumas vezes, mas não atualmente	37	22	0
Usa diariamente	10	1	0
Usa 1 vez por semana	6	4	0
Usa uma vez ao mês	1	0	1
Faz uso, mas não sabe a frequência	5	2	1

4.2.8 Consumo de medicamentos

No Gráfico 9 é apresentado o consumo de algumas classes de medicamentos pelos motociclistas, no mínimo uma vez ao mês. Nela é possível observar que o consumo de analgésicos é feito pela maioria dos voluntários.

Gráfico 9 - Classe de medicamentos consumidos no mínimo uma vez ao mês pelos motociclistas.



4.3 Resultado da análise toxicológica do fluido oral dos participantes

No presente trabalho, foram coletadas ao todo 202 amostras de fluido oral de motociclistas. Todas foram analisadas utilizando a metodologia validada, onde 14 substâncias psicoativas são passíveis de identificação.

Na Tabela 19, são apresentadas apenas as amostras que tiveram resultado positivo para pelo menos uma das substâncias analisadas no método proposto.

Tabela 19 - Amostras com resultado positivo para pelo menos uma das substâncias em estudo no método validado.

AMOSTRA	THC cutoff = 1 ng/mL	ANF cutoff = 25 ng/mL	META cutoff = 25 ng/mL	CBZ cutoff = 1 ng/mL*	FEMP cutoff = 1 ng/mL*	DTP cutoff = 1 ng/mL*	AEME cutoff = 1 ng/mL*	COC cutoff = 10 ng/mL	BE cutoff = 10 ng/mL	CE cutoff = 1 ng/mL*	CLF cutoff = 1 ng/mL*	MEP cutoff = 2 ng/mL*	MDMA cutoff = 25 ng/mL	CLO cutoff = 1 ng/mL
6177	+	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪
6181	+	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪
6195	+	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪
6200	+	▪	▪	▪	▪	▪	▪	+	▪	▪	▪	▪	▪	▪
6220	+	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪
6226	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	+	+	+	▪	▪	▪	▪
6235	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	+	▪	▪	▪	+	▪	▪
6251	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	+	▪	▪
6263	+	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪
6272	▪	▪	▪	▪	▪	▪	+	+	+	+	▪	▪	▪	▪
6283	+	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪
6289	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	+	▪	+	▪	▪
6290	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	+	▪	▪	▪
6294	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	+	▪	▪
6306	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	+	▪	▪	▪
6316	+	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪
6320	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	+	▪	▪	▪	▪	▪	▪
6324	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	+	▪	▪	▪
6327	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	▪	+	▪	▪	▪

continua

Tabela 19 - Amostras com resultado positivo para pelo menos uma das substâncias em estudo no método validado.

AMOSTRA	THC cutoff = 1 ng/mL	ANF cutoff = 25 ng/mL	META cutoff = 25 ng/mL	CBZ cutoff = 1 ng/mL*	FEMP cutoff = 1 ng/mL*	DTP cutoff = 1 ng/mL*	AEME cutoff = 1 ng/mL*	COC cutoff = 10 ng/mL	BE cutoff = 10 ng/mL	CE cutoff = 1 ng/mL*	CLF cutoff = 1 ng/mL*	MEP cutoff = 2 ng/mL*	MDMA cutoff = 25 ng/mL	CLO cutoff = 1 ng/mL
6332	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	+	■	■	■
6333	+	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
6334	+	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	+	■	■
6340	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	+	■	■	■
6344	+	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
6345	+	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
990	+	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
1008	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	+	■	■	■
1010	+	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
1044	+	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
1046	■	■	■	■	■	■	■	+	■	■	■	■	■	■
1048	+	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
1049	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	+	■	■	■
1052	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	+	■	■	■
1054	■	■	■	■	■	■	■	+	+	+	■	+	■	■
1057	+	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
1060	+	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
1066	+	■	■	■	■	■	■	+	+	+	■	■	■	■

Discussões

5. Discussões

Os acidentes de trânsito representam um grande problema de saúde pública, que além de gerarem custos enormes aos cofres públicos, oferecem grande trauma aos acidentados e familiares envolvidos. A Década de Ação pela Segurança no Trânsito 2011-2020, projeto lançado pela Organização das Nações Unidas (ONU) em 2011, visa diminuir pela metade o número de acidentes de trânsito em todo o mundo até 2020 (WHO, 2011), uma vez que atualmente 1,35 milhão de pessoas morrem anualmente em todo o mundo em decorrência dessa causa (WHO, 2018).

A motocicleta é um tipo de veículo que oferece maior risco aos usuários devido às suas características intrínsecas e o número de acidentes de trânsito envolvendo essa classe de veículos é algo preocupante no Brasil, pois além do fato de estarem expostos a maior risco, eles estão ainda mais suscetíveis pelo fato do Brasil ser um país em desenvolvimento e com pouca infraestrutura na área de trânsito.

Na cidade de São Paulo, onde foram feitas as coletas, a população é de 12,1 bilhões de pessoas (IBGE, 2018) e o trânsito é muito intenso. Desse modo, o uso da motocicleta não só é uma ótima opção como a maioria das entregas de documentos, alimentos e outros serviços, são feitas por motociclistas que além de enfrentarem um número de carros de 5,7 milhões (DENATRAN, 2019), vivenciam uma jornada de trabalho longa, sendo incentivados a executar os diversos serviços em menor tempo possível em troca de bonificações, o que os estimula a andarem sempre em alta velocidade e muitas vezes até serem imprudentes.

O estudo sobre o consumo de substâncias psicoativas por essa população é de grande importância. No Brasil, esse é o primeiro trabalho que avalia a prevalência de drogas lícitas e ilícitas em motociclistas durante a jornada de trabalho dos mesmos, traçando desse modo, um perfil do consumo dessas substâncias durante as atividades diárias.

A identificação e quantificação de substâncias psicoativas em matrizes biológicas são do interesse de diversas áreas científicas uma vez que permitem a elucidação de problemáticas, muitas vezes em contextos socioeconômicos, a fim de auxiliar a saúde pública como um todo.

O método de escolha para a análise de substâncias no presente projeto foi a cromatografia líquida, pois essa técnica além de atual, propicia detecção, identificação e quantificação de substâncias em análises toxicológicas se mostrando assim uma técnica bem

adequada, especialmente devido à alta sensibilidade, reprodutibilidade, capacidade de separação, além de permitir a quantificação simultânea de vários compostos, (ALABDALLA, 2005; FLORIANI et al., 2014; MORENO et al., 2013).

O uso de detector de massas acoplado à cromatografia líquida (LC-MS) é uma técnica que otimiza muito a qualidade da análise, pois agrega a elevada seletividade da detecção por espectrometria de massas com a possibilidade de analisar diretamente amostras aquosas, hidrofílicas, termo instáveis e não voláteis (MAURER, 2007).

Pelos motivos supracitados, o método foi validado utilizando cromatografia acoplada à espectrometria de massas e a matriz biológica de escolha foi o fluido oral por oferecer coleta simples, não requerer um profissional especializado e não exigir um local apropriado, sendo por essas razões, a matriz mais indicada para as pesquisas em trânsito (LACEY et al., 2009; SCHULZE et al., 2012).

No desenvolvimento do método algumas etapas foram bem desafiadoras. A primeira delas foi tentar injetar diretamente no HPLC o tampão contendo a amostra de fluido oral sem nenhum preparo de amostra, método chamado *dilute-and-shoot*. Essa tentativa foi feita pelo fato de existir na literatura alguns estudos feitos dessa maneira, onde a amostra (matriz biológica) é diluída e injetada diretamente no cromatógrafo líquido ((ENDERS; MCINTIRE, 2015) SHIHABI, 2006; MARTINAVARRO-DOMÍNGUEZ et al., 2002), proporcionando assim uma análise rápida, de baixo custo e muito interessante, uma vez que elimina a etapa de preparo de amostras que é a mais trabalhosa e onde há maior probabilidade de ocorrer erros.

Após algumas tentativas de injeção direta, pôde-se observar nos cromatogramas obtidos que não era possível identificar com clareza os picos referentes aos analitos e muito ruído era presente, provavelmente referente aos sais do tampão contido no dispositivo coletor, além de proteínas e outras sujidades presentes no fluido oral. A tentativa seguinte foi filtrar a amostra com intuito de limpá-la para em seguida fazer a injeção direta.

Foram testados os filtros de seringa de 22 µm de diferentes materiais como fluoreto de polivinilideno (PVDF), polietersulfona (PES) e nylon. Durante os testes, somente um pequeno volume de amostra passava pelo filtro, pois pelo fato de ser uma matriz de alta viscosidade a passagem pela membrana filtrante é muito difícil. Além da dificuldade do manuseio, nenhum dos filtros gerou resultado satisfatório, uma vez que resultou em cromatogramas tão ruidosos quanto anteriormente.

Ao observar claramente que o método *dilute-and-shoot* não era uma opção viável, optou-se por aplicar um método para extração dos analitos no preparo da amostra.

Os métodos mais utilizados para extração de drogas e fármacos de fluido oral são a extração em fase sólida, do inglês *solid phase extraction* (SPE), que são cartuchos que contém com uma fase estacionária no seu interior. Ao passar a amostra pela fase estacionária, as substâncias que tiverem afinidade química pela mesma, ficam retidas e em seguidas são eluídas com solvente.

As desvantagens da SPE são, principalmente, o alto custo e a limitação da fase estacionária para determinadas substâncias. Como mostrado anteriormente na Tabela 5 do item 1.7 do presente projeto, os métodos que utilizam SPE para extração, geralmente analisam somente uma classe de substâncias devido à especificidade da fase estacionária. Os métodos que analisam diferentes classes de substâncias e fazem uso de SPE, utilizam mais de um cartucho por amostra, o que além de tornar o método ainda mais custoso, exige que um maior volume de fluido oral seja coletado.

Após concluirmos que o uso de SPE no método proposto era inviável, decidiu-se fazer uma extração líquido-líquido, do inglês *liquid-liquid extraction* (LLE) uma vez que seria uma técnica prática, viável e com capacidade de extrair da matriz diferentes classes de substâncias em uma única etapa.

De qualquer modo a etapa de extração seria um desafio, pois mesmo com as vantagens da LLE, identificar um solvente que extraísse 14 analitos de diferentes características físico-químicas exigiu muitos testes. Por essa razão foram feitas as diversas tentativas mostradas no Quadro 9, do item 3.2.4 do presente projeto onde identificou-se que o melhor solvente foi a mistura clorofórmio / etanol (80:20).

Ainda assim, com o intuito de inovar a tradicional técnica de LLE e otimizar a extração dos analitos, decidiu-se adicionar ao método a técnica de QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*) que faz o uso de alguns sais sólidos, como o sulfato de magnésio ($MgSO_4$), e de um sorvente, no caso uma amina primária-secundária, do inglês *primary secondary amine* (PSA) com o intuito de promover a limpeza da amostra (Anastassiades et al., 2003). Por utilizar um solvente diferente do originalmente proposto originalmente, a técnica foi denominada QuEChERS modificado, do inglês *modified QuEChERS*.

A técnica aplicada (*modified QuEChERS*) mostrou otimizar significativamente o processo de extração, pois foi possível estimar que a recuperação de alguns analitos nas amostras que utilizamos LLE sem QuEChERS era inferior a 50%. Essa baixa recuperação de algumas substâncias pela LLE, como a benzoilecgonina, por exemplo, é reportada em alguns

estudos (ZANCANARO et al., 2012 & OIESTAD; JOHANSEN; CHRISTOPHERSEN, 2006).

No estudo de ZANCANARO et al., (2012), que também foi feito LLE em fluido oral, foi obtida uma recuperação < 1% para benzoilecgonina, 6% para dietilpropiona, 40.4% para anfetamina e 44,8% para o THC. Na metodologia validada no presente projeto, a recuperação para as mesmas substâncias foi de 70.3%, 93.4%, 80.7% e 99.1% respectivamente.

A validação do método proposto foi feita seguindo os parâmetros do guia internacional destinado à área de toxicologia forense intitulado como *Scientific Working Group for Forensic Toxicology* (SWGTOX, 2013) e se mostrou bastante eficaz. Os valores de *cutoff* usados na validação foram baseados na organização europeia DRUID pelo fato de ser a organização que menciona a maior parte dos analitos presentes no método proposto.

A escolha da cromatografia líquida foi muito adequada para identificação de 14 substâncias, uma vez que a cromatografia gasosa exige muitas vezes uma etapa de derivatização para as moléculas não voláteis. Desse modo, o uso cromatografia líquida colaborou para a otimização da etapa de preparo da amostra.

As condições cromatográficas empregadas mostraram bons resultados, pois foi possível identificar todos os analitos numa corrida cromatográfica de apenas 7 minutos.

No estudo de linearidade, a faixa de trabalho escolhida foi de 1 a 50ng/mL. A concentração do ponto mais baixo e do ponto mais alto da curva foram escolhidas baseando-se nos valores de *cut-off* exigidos pela organização europeia DRUID, uma vez que decidimos segui-la no presente trabalho, além de trabalhos na literatura científica que mostram os valores mais prevalentes de amostras positivas para drogas e fármacos (GJERDE et al., 2011& LOGAN et al., 2014).

Dentre os 14 analitos validados, 13 apresentaram coeficiente de correlação (R^2) $\geq 0,99$ no estudo de linearidade. A anfetamina foi o único analito que apresentou $R^2 = 0,9891$, porém o valor foi considerado adequado para o estudo uma vez que essa foi uma das substâncias que apresentou mais oscilação nos parâmetros de validação.

Nas precisões intra e inter-ensaio os testes foram feitos com 3 concentrações (baixa, média e alta) da curva analítica. Na precisão intra-ensaio os coeficientes de variação foram abaixo de 10% para todos os analitos. Já na precisão inter-ensaio os valores foram todos abaixo de 20%.

Os valores de exatidão alcançaram os resultados esperados e o método não apresentou *carryover*.

A recuperação do método apresentou resultados muito satisfatórios, pois a porcentagem recuperada foi acima de 70 % para todos os analitos. Como já mencionado, os resultados foram muito satisfatórios principalmente quando comparados aos métodos existentes na literatura que tiveram uma recuperação muito baixa para analitos comuns ao método presente.

Desse modo os valores obtidos nos parâmetros estudados foram adequados e cumpriram com as determinações preconizadas pelo guia seguido.

A coleta de fluido oral de motociclistas foi fácil e rápida, como esperado para essa matriz. Os motociclistas abordados foram muito participativos e após explicados o propósito do projeto a maioria aceitou doar a amostra e responder ao questionário.

Os questionários aplicados aos 202 motociclistas voluntários possibilitaram entendermos um pouco sobre o perfil do motociclista na cidade de São Paulo como nível de escolaridade, quantidade de horas que eles trabalhadas diariamente.

O dado obtido como idade, escolaridade e horas trabalhadas dos 202 motoristas participantes do projeto mostrou que mais de 50% possui idade entre 30 e 40 anos, ensino médio completo e guiam entre 6 e 8 horas por dia.

Dentre as 19 amostras positivas para THC, 14 voluntários relataram o uso da droga, ou seja, 73% deram relato fiel. Já dentre as amostras positivas para cocaína, somente 25% dos voluntários relataram o uso da droga. Isso pode ser explicado pelo fato da maconha ser encarada pela sociedade como uma droga mais comum e não tão maléfica, fazendo com que os indivíduos tenham menos receio de relatar o uso, diferentemente da cocaína.

Para os medicamentos, dentre as amostras positivas considerando clorfeniramina e meprobamato juntos, 60% relataram ser consumidores dessas classes de medicamentos.

O que pode ser observado de comum entre as amostras positivas para pelo menos uma substância, foi o consumo de álcool, uma vez que 82,5% dos voluntários faz uso de álcool pelo menos 2 vezes ao mês.

Alguns resultados geraram questionamentos como no caso das 8 amostras que tiveram resultado positivo para cocaína, das quais somente 4 deram positivo para benzoilecgonina. Será que coletamos a amostra num período de uso tão recente que não houve tempo para biotransformação?

Com os dados obtidos por meio do questionário foi possível traçar um perfil dos motociclistas da cidade de São Paulo e constatar que as drogas mais consumidas por essa população são a maconha e em seguida a cocaína. Já quanto aos medicamentos, a clorfeniramina presente nos antigripais foi a mais prevalente seguida do meprobamato.

Conclusões

6 Conclusões

A metodologia desenvolvida para identificação de anfetamina, metanfetamina, metilenodioximetanfetamina (MDMA), cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno, metilecgonidina (AEME), ciclobenzaprina, clonazepam, clorfeniramina, dietilpropiona, meprobamato, femproporex e tetrahydrocannabinol (THC) utilizando a técnica LLe com QuEChERS modificado mostrou-se eficaz e de baixo custo. Os parâmetros validados tiveram resultados muito bons e todos dentro dos valores preconizados pelo guia seguido.

A escolha do fluido oral como matriz biológica, além de cumprir o requisito de praticidade de coleta nas ruas e estradas, permite que diversas substâncias de diferentes características físico-químicas sejam pesquisadas. O fato de possuir correlação com o plasma para a maioria das substâncias nos permite afirmar se o indivíduo está sob efeito de substâncias psicoativas no ato da coleta, o que é uma exigência para o monitoramento de substâncias psicoativas no trânsito uma vez que o código de trânsito brasileiro menciona como crime o “ato de dirigir sob efeito de substâncias psicoativas”.

O presente estudo pode colaborar não só com o desenvolvimento de uma metodologia eficaz, mas também com a aquisição de dados socioeconômicos importantes para que a população em estudo (motociclistas) seja compreendida e desse modo, políticas públicas e programas diversos sejam elaborados para essa população que nunca havia sido estudada.

Nessa análise de dados obtidos, observou-se que entre os motociclistas da cidade de São Paulo, as substâncias psicoativas em estudo mais consumidas são: *cannabis* seguida de medicamentos antigripais, cocaína e por fim, em menor quantidade, relaxantes musculares.

Referências

7. Referências bibliográficas

ABRACICLO. **Anuário da indústria brasileira de duas rodas**. 2019. Disponível em: <<http://www.abraciclo.com.br/anuario-de-2019>>. Acesso em: 07 jun. 2019.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **RESOLUÇÃO N 899: GUIA PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E BIOANALÍTICOS MÉTODOS ANALÍTICOS**. 2003. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RE_899_2003_COMP.pdf/ff6fdc6b-3ad1-4d0f-9af2-3625422e6f4b>. Acesso em: 10 ago. 2017.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Panorama dos dados do sistema nacional de gerenciamento de produtos controlados: um sistema para o monitoramento de medicamentos no brasil. Brasília, 2011a.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Avaliação de Eficácia e Segurança dos medicamentos Inibidores do Apetite, 2011b.

ALABDALLA, Mahmoud A. HPLC-DAD for analysis of different classes of drugs in plasma. **Journal of clinical forensic medicine**, v. 12, n. 6, p. 310-315, 2005.

ANASTASSIADES, Michelangelo 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. 412-431, 2003.

BARRIONUEVO, Wilma Regina; LANÇAS, Fernando Mauro. Solid-phase extraction (SPE) and solid-phase microextraction of pyrethroids in water. **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 172-175, 2001.

BELLO-LÓPEZ, Miguel Ángel et al. Analytical applications of hollow fiber liquid phase microextraction (HF-LPME): a review. **Analytical Letters**, v. 45, n. 8, p. 804-830, 2012.

BERMAN, Steven M. et al. Potential adverse effects of amphetamine treatment on brain and behavior: a review. **Molecular psychiatry**, v. 14, n. 2, p. 123, 2009.

BOGHDADI, Mona Saleh; HENNING, Robert J. Cocaine: pathophysiology and clinical toxicology. **Heart & Lung: The Journal of Acute and Critical Care**, v. 26, n. 6, p. 466-483, 1997.

DE BONI, Raquel et al. Factors associated with alcohol and drug use among traffic crash victims in southern Brazil. **Accident Analysis & Prevention**, v. 43, n. 4, p. 1408-1413, 2011.

BORTOLOTTI, F. et al. Toxicokinetics of cocaine and metabolites: the forensic toxicological approach. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 33, p. 5658-5663, 2012.

BOSKER, W. M.; HUESTIS, M. A.. Oral Fluid Testing for Drugs of Abuse. **Clinical Chemistry**, [s.l.], v. 55, n. 11, p.1910-1931, 10 set. 2009. American Association for Clinical Chemistry (AACC).

BRASIL. Lei 12.760 de 20 de dezembro de 2012. Institui o Código de Trânsito Brasileiro. Diário Oficial da União. 20 de Dez 2012.

BRASIL. Lei nº 9.503, de 23 de setembro de 1997. Código de Trânsito Brasileiro. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/L9503.htm

BRASIL. Lei nº 13.103, de 02 de março de 2015. Código de Trânsito Brasileiro. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2015-2018/2015/Lei/L13103.htm#art8

BREITENBACH, Tiago Cataldo et al. High rates of injured motorcycle drivers in emergency rooms and the association with substance use in Porto Alegre, Brazil. **Emerg Med J**, v. 29, n. 3, p. 205-207, 2012.

BURRA, Bhaskari et al. Transfer of Cyclobenzaprine into Human Milk and Subsequent Infant Exposure. **Journal of Human Lactation**, [s.l.], v. 35, n. 3, p.559-562, 24 abr. 2019. SAGE Publications.

CARVALHO, Márcia et al. Toxicity of amphetamines: an update. **Archives of toxicology**, v. 86, n. 8, p. 1167-1231, 2012.

DE CARVALHO, Heraclito Barbosa et al. Alcohol and drug involvement in motorcycle driver injuries in the city of Sao Paulo, Brazil: Analysis of crash culpability and other associated factors. **Drug and alcohol dependence**, v. 162, p. 199-205, 2016.

CENTRO BRASILEIRO DE INFORMAÇÕES SOBRE DROGAS PSICOTRÓPICAS (CEBRID). II Levantamento Domiciliar Sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil – 2005. Universidade Federal de São Paulo, 2005.

CESCHI, Alessandro et al. Pharmacokinetics of meprobamate in overdose treated with continuous venovenous hemodiafiltration (CVVHDF). **Hemodialysis International**, v. 17, n. 4, p. 656-659, 2013.

CHIANG, W. K. Amphetamines. In: NELSON, L.; GOLDFRANK, L. R.; LEWIN, N.; HOWLAND, M.; HOFFMAN, R.; GOLDFRANK, L.; FLOMENBAUM, N. **Goldfrank's toxicologic emergencies**, 9 ed., p. 1109 –1114. Maidenhead: McGraw-Hill Medical, 2011.

CIMOLAI, Nevio. Cyclobenzaprine: a new look at an old pharmacological agent. **Expert review of clinical pharmacology**, v. 2, n. 3, p. 255-263, 2009.

CONCHEIRO, M. et al. Development and validation of a method for the quantitation of Δ^9 tetrahydrocannabinol in oral fluid by liquid chromatography electrospray–mass-spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 810, n. 2, p. 319-324, 2004.

CONE, E. J; A HUESTIS, M.. Interpretation of Oral Fluid Tests for Drugs of Abuse. **Annals Of The New York Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 1098, n. 1, p.51-103, 1 mar. 2007. Wiley.

COSTA, José Luiz da et al. Simple method for determination of cocaine and main metabolites in urine by CE coupled to MS. **Electrophoresis**, [s.l.], v. 30, n. 12, p.2238-2244, jun. 2009. Wiley.

COLE, J.c.; SUMNALL, H.r.. Altered states: the clinical effects of Ecstasy. **Pharmacology & Therapeutics**, [s.l.], v. 98, n. 1, p.35-58, abr. 2003. Elsevier BV.

DAVEY, Jeremy; ARMSTRONG, Kerry; MARTIN, Peter. Results of the Queensland 2007–2012 roadside drug testing program: The prevalence of three illicit drugs. **Accident Analysis & Prevention**, [s.l.], v. 65, p.11-17, abr. 2014. Elsevier BV.

LATORRE, Rafael de et al. Clinical Pharmacokinetics of Amfetamine and Related Substances. **Clinical Pharmacokinetics**, [s.l.], v. 43, n. 3, p.157-185, 2004. Springer Nature.

DEPARTAMENTO NACIONAL DE TRÂNSITO. Dados da frota nacional de veículos. Disponível em: <https://infraestrutura.gov.br/component/content/article/115-portal-denatran/8559-frota-de-veiculos-2019.html>. Acesso em: 15 de junho de 2019.

DRUGBANK. **Cocaine**. 2019a. Disponível em: <<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00907>>. Acesso em: 04 dez. 2019.

DRUGBANK. **Clonazepam**. 2019b. Disponível em: <<https://www.drugbank.ca/drugs/DB01068>>. Acesso em: 04 dez. 2019.

DRUMMER, Olaf H. et al. The involvement of drugs in drivers of motor vehicles killed in Australian road traffic crashes. **Accident Analysis & Prevention**, v. 36, n. 2, p. 239-248, 2004.

DRUMMER, Olaf H. Drug testing in oral fluid. **Clinical Biochemist Reviews**, v. 27, n. 3, p. 147, 2006.

DRUID. How to define per se limits: a general approach, 2011.

DRUID. Summaru of main DRUID results, 2012.

DUPONT, Robert L. et al. The need for drugged driving per se laws: a commentary. **Traffic injury prevention**, v. 13, n. 1, p. 31-42, 2012.

ENDERS, Jeffrey R.; MCINTIRE, Gregory L.. A Dilute-and-Shoot LC–MS Method for Quantitating Opioids in Oral Fluid. **Journal Of Analytical Toxicology**, [s.l.], v. 39, n. 8, p.662-667, 16 set. 2015. Oxford University Press (OUP).

EUROFARMA LABORATÓRIOS S.A (Brasil). Bula - Cloridrato de Ciclobenzaprina. São Paulo: Eurofarma Laboratórios S.a, 2016. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp>. Acesso em: 04 dez. 2019.

FENDRICH, Michael et al. Drug test feasibility in a general population household survey. **Drug and alcohol dependence**, v. 73, n. 3, p. 237-250, 2004.

FIERRO, Inmaculada; GÓMEZ-TALEGÓN, Trinidad; ALVAREZ, F. Javier. The Spanish pictogram on medicines and driving: The population's comprehension of and attitudes towards its use on medication packaging. **Accident Analysis & Prevention**, v. 50, p. 1056-1061, 2013.

FILIP, Małgorzata et al. Behavioral evidence for the significance of serotonergic (5- HT) receptors in cocaine addiction. **Addiction biology**, v. 15, n. 3, p. 227-249, 2010.

FIOCRUZ. **III Levantamento Nacional Sobre o Uso de Drogas pela População Brasileira**. Rio de Janeiro: Arca, 2019. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/34614>>. Acesso em: 10 set. 2019.

FLORIANI, Gisele et al. Development and validation of an HPLC-DAD method for simultaneous determination of cocaine, benzoic acid, benzoylecgonine and the main adulterants found in products based on cocaine. **Forensic science international**, v. 235, p. 32-39, 2014.

FREEDMAN, Robert R.; JOHANSON, Chris-Ellyn; TANCER, Manuel E. Thermoregulatory effects of 3, 4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in humans. **Psychopharmacology**, v. 183, n. 2, p. 248-256, 2005.

GARCIA, Raphael Caio Tamborelli et al. Neurotoxicity of anhydroecgonine methyl ester, a crack cocaine pyrolysis product. **Toxicological sciences**, v. 128, n. 1, p. 223-234, 2012.

GJERDE, Hallvard et al. Toxicological investigations of drivers killed in road traffic accidents in Norway during 2006–2008. **Forensic science international**, v. 212, n. 1-3, p. 102-109, 2011.A

GJERDE, Hallvard et al. Prevalence of driving with blood drug concentrations above proposed new legal limits in Norway: estimations based on drug concentrations in oral fluid. **Forensic science international**, v. 210, n. 1-3, p. 221-227, 2011.b

GJERDE, Hallvard; ØIESTAD, Elisabeth Leere; CHRISTOPHERSEN, Asbjørg S. Using biological samples in epidemiological research on drugs of abuse. **Norsk epidemiologi**, v. 21, n. 1, 2011. c

GOODMAN, L. S. G.; HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **As bases farmacológicas da terapêutica**. ed. 11, p – 1821, Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2010.

GOULLÉ, Jean-Pierre et al. Illicit drugs, medications and traffic accidents. In: **Annales pharmaceutiques francaises**. 2008. p. 196-205.

GREENBLATT, David J.; SHADER, Richard I. Meprobamate: A Study of Irrational Drug Use. **American Journal Of Psychiatry**, [s.l.], v. 127, n. 10, p.1297-1303, abr. 1971. American Psychiatric Association Publishing.

GRIFFIN, Charles E. et al. Benzodiazepine pharmacology and central nervous system-mediated effects. **Ochsner Journal**, v. 13, n. 2, p. 214-223, 2013.

GROTENHERMEN, Franjo. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. **Clinical pharmacokinetics**, v. 42, n. 4, p. 327-360, 2003.

HALL, Wayne; DEGENHARDT, Louisa. Adverse health effects of non-medical cannabis use. **The Lancet**, v. 374, n. 9698, p. 1383-1391, 2009.

HEAL, David J. et al. Amphetamine, past and present—a pharmacological and clinical perspective. **Journal of Psychopharmacology**, v. 27, n. 6, p. 479-496, 2013.

HETLAND, Amanda; CARR, David B. Medications and impaired driving. **Annals of pharmacotherapy**, v. 48, n. 4, p. 494-506, 2014.

HOFFMAN, R.; NRELSON, L.; HOWLAND, M. Benzodiazepines. In: NELSON, L.; GOLDFRANK, L. R.; LEWIN, N.; HOWLAND, M.; HOFFMAN, R.; GOLDFRANK, L.; FLOMENBAUM, N. **Goldfrank's toxicologic emergencies**, 9 ed., p. 1109 – 1114. Maidenhead: McGraw-Hill Medical, 2011.

HØISETH, Gudrun et al. Impairment due to amphetamines and benzodiazepines, alone and in combination. **Drug and alcohol dependence**, v. 145, p. 174-179, 2014.

HOOD, Sean David et al. Benzodiazepine dependence and its treatment with low dose flumazenil. **British journal of clinical pharmacology**, v. 77, n. 2, p. 285-294, 2014.

HOWARD, Paul et al. Benzodiazepines. **Journal of pain and symptom management**, v. 47, n. 5, p. 955-964, 2014.

HUESTIS, M. A. Human cannabinoid pharmacokinetics. **Chemistry&Biodiversity**, v.4, p.1770-1804, 2007.

HUTSON, Peter H. et al. Preclinical pharmacology of amphetamine: implications for the treatment of neuropsychiatric disorders. **Pharmacology & therapeutics**, v. 143, n. 3, p. 253-264, 2014.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Estimativa de população dos municípios brasileiros**. 2018. Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/22374-ibge-divulga-as-estimativas-de-populacao-dos-municipios-para-2018>>. Acesso em: 16 jul. 2019.

INSTITUTE TRAFFIC SAFETY DATA AND ANALYSIS GROUP - IRTAD. Road Safety Annual Report 2016.

INSTITÓRIS, László et al. The frequency of alcohol, illicit and licit drug consumption in the general driving population in South-East Hungary. **Forensic science international**, v. 224, n. 1-3, p. 37-43, 2013.

IPEA/DENATRAN/ANTP. Impactos sociais e econômicos dos acidentes de trânsito nas rodovias brasileiras [Social and economic impact of traffic accidents on Brazilian roads]. Brasília: Institute for Applied Economic Research; 2006.

INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA (Ipea). Acidentes de trânsito nas rodovias federais brasileiras: caracterização, tendências e custos para a sociedade. Relatório de Pesquisa 2015.

ISENSCHMID, D.S. Cocaine. In: LEVINE, B., ed. **Principles of forensic toxicology**. 3.ed. Washington: AACC Press, 2010. p.245-268.

JONES, Alan Wayne. Driving under the influence of drugs in Sweden with zero concentration limits in blood for controlled substances. **Traffic injury prevention**, v. 6, n. 4, p. 317-322, 2005.

JOSEFSSON, Martin; RYDBERG, Irene. Determination of methylphenidate and ritalinic acid in blood, plasma and oral fluid from adolescents and adults using protein precipitation and liquid chromatography tandem mass spectrometry—a method applied on clinical and forensic investigations. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 55, n. 5, p. 1050-1059, 2011.

KALA, Subbarao V. et al. Validation of analysis of amphetamines, opiates, phencyclidine, cocaine, and benzoylecgonine in oral fluids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of analytical toxicology**, v. 32, n. 8, p. 605-611, 2008.

KIM, Sung-Wan et al. Caffeine counteracts impairments in task-oriented psychomotor performance induced by chlorpheniramine: a double-blind placebo-controlled crossover study. **Journal of psychopharmacology**, v. 27, n. 1, p. 62-70, 2013.

KOVACOVA-HANUSKOVA, E. et al. Histamine, histamine intoxication and intolerance. **Allergologia et immunopathologia**, v. 43, n. 5, p. 498-506, 2015.

KUBAN, P.; BOCEK, P. Simultaneous micro-electromembrane extractions of anions and cations using multiple free liquid membranes and acceptor solutions. *Analytica Chimica Acta*, v. 908, p. 113–120, 2016.

KUMAR, Manish; DILLON, Glenn H. Assessment of direct gating and allosteric modulatory effects of meprobamate in recombinant GABAA receptors. **European journal of pharmacology**, v. 775, p. 149-158, 2016.

LACEY, J. H. 2007 National Roadside Survey of Alcohol and Drug Use by Drivers: Drug Results. NHTSA, 2009.

LARDELLI-CLARET, Pablo et al. Association of main driver-dependent risk factors with the risk of causing a vehicle collision in Spain, 1990–1999. **Annals of epidemiology**, v. 13, n. 7, p. 509-517, 2003.

LAW, Jack D.; TODD, Terry A. Liquid-liquid extraction equipment. Idaho National Laboratory (INL), 2008.

LEGRAND, Sara-Ann et al. Medicines and driving: evaluation of training and software support for patient counselling by pharmacists. **International journal of clinical pharmacy**, v. 34, n. 4, p. 633-643, 2012.

LEGRAND, S. A.; HOUWING, S.; HAGENZIEKER, M.; VERSTRAETE, A. G. Prevalence of alcohol and other psychoactive substances in injured drivers: comparison between Belgium and The Netherlands. *Forensic Sci Int*, v. 220, n. 1-3, p. 224-31, Jul 10 2012.

LEGRAND, Sara- Ann et al. Alcohol and drugs in seriously injured drivers in six European countries. **Drug testing and analysis**, v. 5, n. 3, p. 156-165, 2013.

LEYTON, Vilma et al. Hair drug testing in the new Brazilian regulation to obtain professional driver's licence: no parallel to any other law enforcement in the world. **Addiction (Abingdon, England)**, v. 110, n. 7, p. 1207, 2015.

LOGAN, B. K. et al. Recommendations for Toxicological Investigation of Drug-Impaired Driving and Motor Vehicle Fatalities. **Journal Of Analytical Toxicology**, [s.l.], v. 37, n. 8, p.552-558, 13 ago. 2013. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jat/bkt059>.

LOGAN, Barry K.; MOHR, Amanda LA; TALPINS, Stephen K. Detection and prevalence of drug use in arrested drivers using the Dräger Drug Test 5000 and Affiniton DrugWipe oral fluid drug screening devices. **Journal of analytical toxicology**, v. 38, n. 7, p. 444-450, 2014.

LWANGA, Stephen Kaggwa et al. Sample size determination in health studies: a practical manual. 1991.

MACCALL, C. A.; RITCHIE, G.; SOOD, M. Oral fluid testing as an alternative to urine testing for drugs of abuse in inpatient forensic settings: giving patients choice. **Scottish medical journal**, v. 58, n. 2, p. 99-103, 2013.

MARTINAVARRO-DOMÍNGUEZ, Adrián et al. Therapeutic drug monitoring of anticonvulsant drugs by micellar HPLC with direct injection of serum samples. **Clinical chemistry**, v. 48, n. 10, p. 1696-1702, 2002.

MAURER, Hans H. Current role of liquid chromatography–mass spectrometry in clinical and forensic toxicology. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 388, n. 7, p. 1315-1325, 2007.

NELSON, Lewis S. et al. **Goldfrank's toxicologic emergencies**. McGraw Hill Professional, 2018.

OSSELTON, M. David; WATTS, Jo. **Clarke's analysis of drugs and poisons**. London: Pharmaceutical press, 2011.

MONTEIRO, Susana P. et al. How effective are pictograms in communicating risk about driving-impairing medicines?. **Traffic injury prevention**, v. 14, n. 3, p. 299-308, 2013.

MONTESANO, Camilla et al. Determination of illicit drugs and metabolites in oral fluid by microextraction on packed sorbent coupled with LC-MS/MS. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 407, n. 13, p. 3647-3658, 2015.

MORENO, Ana María Jiménez; NAVAS, María José; ASUERO, Agustín G. HPLC-DAD determination of CNS-acting drugs in human blood, plasma, and serum. **Critical reviews in analytical chemistry**, v. 44, n. 1, p. 68-106, 2014.

MOORE, Christine; RANA, Sumandeep; COULTER, Cynthia. Determination of meperidine, tramadol and oxycodone in human oral fluid using solid phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 850, n. 1-2, p. 370-375, 2007.

NATIONAL INSTITUTE ON DRUG ABUSE (NIDA). Drugs of abuse. Marijuana. Research report series, 2012. Disponível em: http://www.drugabuse.gov/sites/default/files/mjrrs_2.pdf. Acesso em: 05 fev. 2014.

NHTSA - National Highway Traffic Safety Administration. U.S. Department Of Transportation. **National Highway Traffic Safety Administration**. 2019. Disponível em: <<https://www.nhtsa.gov/about-nhtsa>>. Acesso em: 04 ago. 2019.

NEWMeyer, Matthew N. et al. Cannabis edibles: Blood and oral fluid cannabinoid pharmacokinetics and evaluation of oral fluid screening devices for predicting Δ^9 -tetrahydrocannabinol in blood and oral fluid following cannabis brownie administration. **Clinical chemistry**, v. 63, n. 3, p. 647-662, 2017.

NIEDBALA, Sam et al. Passive cannabis smoke exposure and oral fluid testing. **Journal of analytical toxicology**, v. 28, n. 7, p. 546-552, 2004.

NOZAWA, Hideki et al. MALDI-TOF mass spectrometric determination of eight benzodiazepines with two of their metabolites in blood. **Legal Medicine**, v. 17, n. 3, p. 150-156, 2015.

OCAÑA-GONZÁLEZ, Juan Antonio et al. New developments in microextraction techniques in bioanalysis. A review. **Analytica chimica acta**, v. 905, p. 8-23, 2016.

OIESTAD, E. L.; JOHANSEN, U.; CHRISTOPHERSEN, A. S.. Drug Screening of Preserved Oral Fluid by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Clinical Chemistry**, [s.l.], v. 53, n. 2, p.300-309, 7 dez. 2006. American Association for Clinical Chemistry (AACC).

OLIVEIRA, Lúcio Garcia de et al . A continuidade do uso de anfetaminas por motoristas de caminhão no Estado de São Paulo, Brasil, a despeito da proibição de sua produção, prescrição e uso. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro , v. 29, n. 9, p. 1903-1909, Sept. 2013 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2013000900028&lng=en&nrm=iso>. access on 09 Aug. 2019.

OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde (Org.). **Trânsito: Saúde Um olhar da saúde para o tema**. Brasília: Oms, 2018. Disponível em: <http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/49709/9789275720387_por.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 07 ago. 2019.

OSSELTON, M. David; WATTS, Jo. **Clarke's analysis of drugs and poisons**. London: Pharmaceutical press, 2011.

PAUMGARTTEN, Francisco José Roma; PEREIRA, Sabrina Schaaf Teixeira Costa; OLIVEIRA, Ana Cecilia Amado Xavier de. Safety and efficacy of fenproporex for obesity treatment: a systematic review. **Revista de saude publica**, v. 50, p. 25, 2016.

PROSSER, J. M.; HOFFMAN, R. S. Cocaine. In: NELSON, L. S.; LEWIN, N. A.; HOWLAND, M. A.; HOFFMAN, R. S.; GOLDFRANK, L. R.; FLOMENBAUM, N. E. Goldfrank's toxicologic emergencies. 9.ed. Maidenhead: McGraw Hill Medical, cap.76, p.1091-1102, 2011.

PUJADAS, Mitona et al. A simple and reliable procedure for the determination of psychoactive drugs in oral fluid by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 44, n. 2, p. 594-601, 2007.

QUEIROZ, Sonia CN et al. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, 2001.

RANG, H. P.; DALE, M.M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Pharmacology**. ed. 6, p. 535 – 544, London: Churchill Livingstone, 2007.

RAMOS, Lourdes. Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1221, p. 84-98, 2012.

REYNOLDS, Lauren M. et al. Differential roles of GABA A receptor subtypes in benzodiazepine-induced enhancement of brain-stimulation reward. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 11, p. 2531, 2012.

RICCI, G. et al. Prevalence of alcohol and drugs in urine of patients involved in road accidents. **Journal of preventive medicine and hygiene**, v. 49, n. 2, 2008.

SAARI, Teijo I. et al. Enhancement of GABAergic activity: neuropharmacological effects of benzodiazepines and therapeutic use in anesthesiology. **Pharmacological reviews**, v. 63, n. 1, p. 243-267, 2011.

SAMANIN, Rosario; GARATTINI, Silvio. Neurochemical mechanism of action of anorectic drugs. **Pharmacology & toxicology**, v. 73, n. 2, p. 63-68, 1993.

SEE, Sharon; GINZBURG, Regina. Skeletal Muscle Relaxants. **Pharmacotherapy**, [s.l.], v. 28, n. 2, p.207-213, fev. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1592/phco.28.2.207>.

SCHEIDWEILER, Karl B. et al. Pharmacokinetics of cocaine and metabolites in human oral fluid and correlation with plasma concentrations following controlled administration. **Therapeutic drug monitoring**, v. 32, n. 5, p. 628, 2010.

SHIHABI, Z. K.. Review of Drug Analysis with Direct Serum Injection on the HPLC Column. **Journal Of Liquid Chromatography**, [s.l.], v. 11, n. 8, p.1579-1593, jun. 2006. Informa UK Limited.

SILVA, M. I. et al. Cocaine: historical background, neurobiology of the addiction and relapse and therapeutic perspectives. **Acta medica portuguesa**, v. 23, n. 2, p. 247-58, 2010.

SCHULZE, H. et al. DRUID final report: work performed, main results and recommendations. **Bergisch Gladbach (Germany): Federal Highway Research Institute**, 2012.

SENNA, Maria-Cristina et al. First nationwide study on driving under the influence of drugs in Switzerland. **Forensic science international**, v. 198, n. 1-3, p. 11-16, 2010.

SIMONSEN, K. Wiese et al. Presence of psychoactive substances in oral fluid from randomly selected drivers in Denmark. **Forensic science international**, v. 221, n. 1-3, p. 33-38, 2012.

SMYTH, Tanya; SHEEHAN, Mary; SISKIND, Victor. A study of the effectiveness of driving medication warnings. 2011.

SWGTOX. Scientific Working Group for Forensic Toxicology. Standard practices for method validation in forensic toxicology. 2013. Disponível em: <http://www.swgtox.org/documents/Validation3.pdf>

SMYTH, T. et al. Consumer perceptions of medication warnings about driving: a comparison of French and Australian labels. **Traffic injury prevention**, v. 14, n. 6, p. 557-564, 2013.

TEODORAK, Brena P. et al. Acute administration of fenproporex increased acetylcholinesterase activity in brain of young rats. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, n. 2, p. 1389-1395, 2015.

TRANSPORT, D.F. Drug Driving, 2014.

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME (UNODC). **World Drug Report**. 2019. Disponível em: <<https://wdr.unodc.org/wdr2019/>>. Acesso em: 14 ago. 2019.

UNITED NATION OFFICE ON DRUGS AND CRIME. **Guidance for the validation of analytical methodology and calibration of equipment used for testing of illicit drugs in seized materials and biological specimens**. Vienna: Laboratory And Scientific Section, 2009. Disponível em: <https://www.unodc.org/documents/scientific/validation_E.pdf>. Acesso em: 08 mar. 2017.

VEISTEN, Knut et al. Is law enforcement of drug-impaired driving cost-efficient? An explorative study of a methodology for cost-benefit analysis. **International Journal of Drug Policy**, v. 24, n. 2, p. 122-134, 2013.

VERSTER, Joris C.; VELDHUIJZEN, Dieuwke S.; VOLKERTS, Edmund R. Residual effects of sleep medication on driving ability. **Sleep medicine reviews**, v. 8, n. 4, p. 309-325, 2004.

VINDENES, V.; JORDBRU, D.; KNAPSKOG, A. B.; KVAN, E.; MATHISRUD, G.; SLORDAL, L.; MORLAND, J. Impairment based legislative limits for driving under the influence of non-alcohol drugs in Norway. *Forensic Sci Int*, v. 219, n. 1-3, p. 1-11, Jun 2012.

VINDENES, Vigdis et al. Drugged driving arrests in Norway before and after the implementation of per se law. **Forensic science international**, v. 245, p. 171-177, 2014.

WANG, Guohong et al. Validation of a new homogeneous immunoassay for the detection of carisoprodol in urine. **Journal of analytical toxicology**, v. 35, n. 2, p. 108-112, 2011.

WILLS, S. Cocaine. In: **Drugs of abuse**. 2.ed. London: Pharmaceutical Press, 2005. cap.5, p.93-114.

WINCHELL, Gregory A. et al. Cyclobenzaprime pharmacokinetics, including the effects of age, gender, and hepatic insufficiency. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 42, n. 1, p. 61-69, 2002.

WOOD, Michelle et al. Quantitative analysis of multiple illicit drugs in preserved oral fluid by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Forensic science international**, v. 150, n. 2-3, p. 227-238, 2005.

WHO - World Health Organization. Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks. Geneva: Department of Health Statistics and Informatics in the Information, Evidence and Research Cluster of the World Health Organization 2009. Disponível em: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GlobalHealthRisks_report_full.pdf.

WHO - World Health Organization. Decade of Action for Road Safety 2011-2020. Global Launch, 2011.

WHO - World Health Organization. Drug use and road safety, 2016.

WHO - World Health Organization. Global status report on road safety, 2018. https://www.who.int/violence_injury_prevention/road_safety_status/2018/en/

WHO - World Health Organization. Management of Substance of Abuse, 2018. Available from: http://www.who.int/substance_abuse/facts/psychoactives/en/

WYLIE, F. M. et al. Drugs in oral fluid: Part I. Validation of an analytical procedure for licit and illicit drugs in oral fluid. **Forensic science international**, v. 150, n. 2-3, p. 191-198, 2005.

XAVIER, Caroline Addison Carvalho et al. Êxtase (MDMA): efeitos farmacológicos e tóxicos, mecanismo de ação e abordagem clínica. **Archives of Clinical Psychiatry**, v. 35, n. 3, p. 96-103, 2008.

YASUDA, Sally Usdin et al. The roles of CYP2D6 and stereoselectivity in the clinical pharmacokinetics of chlorpheniramine. **British journal of clinical pharmacology**, v. 53, n. 5, p. 519-525, 2002.

ZACNY, James P.; PAICE, Judith A.; COALSON, Dennis W. Characterizing the subjective and psychomotor effects of carisoprodol in healthy volunteers. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 100, n. 1, p. 138-143, 2011.

ZANCANARO, Ivomar et al. Prescription and illicit psychoactive drugs in oral fluid—LC–MS/MS method development and analysis of samples from Brazilian drivers. **Forensic Science International**, [s.l.], v. 223, n. 1-3, p.208-216, nov. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2012.08.048>.

Anexos



ANEXO I

Questionário aplicado aos motociclistas voluntários

IDENTIFICAÇÃO	
Número de Controle Laboratorial: _____ Entrevistador: _____	
Participante: () Aceitou participar () Recusou participar, motivo: _____	
Idade: _____ Sexo: Feminino () Masculino ()	
Estado civil: Solteiro () Casado () Viúvo () Divorciado () Amasiado ()	
Cor da pele: Branca () Negro () Amarelo () Pardo ()	
Escolaridade: Analfabeto () Fundamental incompleto () Fundamental completo () Médio incompleto () Médio completo () Superior incompleto () Superior completo () Técnico () Outro _____	
Habilitação: Sim () Não () Tempo: _____ anos	
Usa a moto todo dia? Sim () Não () Usa a moto para ir trabalhar? Sim () Não ()	
Profissão: Motofretista () Mototaxista () Outro: _____	
Motoescola: Sim () Não () Direção defensiva: Sim () Não ()	
Quantas horas dirige por dia? _____	
EQUIPAMENTOS DE SEGURANÇA MOTOCICLISTA	EQUIPAMENTOS SEGURANÇA MOTOCICLETA
Capacete: Sempre () Às vezes () Nunca () Aberto () Fechado ()	Antena: Sim () Não ()
Bota: Sempre () Às vezes () Nunca ()	Mata-cachorro: Sim () Não ()
Jaqueta: Sempre () Às vezes () Nunca ()	
Luvas: Sempre () Às vezes () Nunca ()	
MOTOCICLETA	
Cilindradas _____	
Própria: Sim () Não () Tem há quanto tempo? _____	
Comprou nova? Sim () Não () Já teve outras motos? Sim () Qts? _____ Não ()	
Possui outro veículo? Sim () Não ()	
Faz revisões periódicas? Sim () Não () Última _____	
INFORMAÇÕES SOBRE A SAÚDE	
Pressão alta () Diabete () Estresse () Outro () Nenhum ()	
Medicamento todo dia: Sim () Não () Qual? _____ Motivo: _____	
Já sofreu acidentes com a moto? Sim () Qts? _____ Não ()	
Deu entrada no hospital? Sim () Não () Quanto tempo internado? _____	
RELATO DE USO DE SUBSTÂNCIAS PSICOATIVAS	

NOS ÚLTIMOS 12 MESES, COM QUE FREQUÊNCIA VOCÊ CONSUMIU BEBIDAS QUE CONTÉM ÁLCOOL?

- () Nunca () Uma vez por mês ou menos () 2-4 vezes por mês
 () 2-3 vezes por semana () 4 ou mais vezes por semana

QUANDO BEBE, QUANTAS BEBIDAS CONTENDO ÁLCOOL CONSOME EM UM DIA NORMAL?

- () 1-2 () 3-4 () 5-6 () 7-9 () 10 ou mais

COM QUE FREQUÊNCIA CONSOME 4 (MULHERES) / 5 (HOMENS) OU MAIS BEBIDAS NUMA ÚNICA OCASIÃO?

- () Nunca () Menos de uma vez por mês () Pelo menos uma vez por mês
 () Pelo menos uma vez por semana () Diariamente ou quase diariamente

Usa algum tipo de droga ou medicamento?

- Maconha () Crack ()
 Cocaína () Ecstasy ()
 Analgésico () Relaxante muscular ()
 Para dormir () Outro _____

Uso () Nunca () Já usei ()

Frequência (vezes por semana):

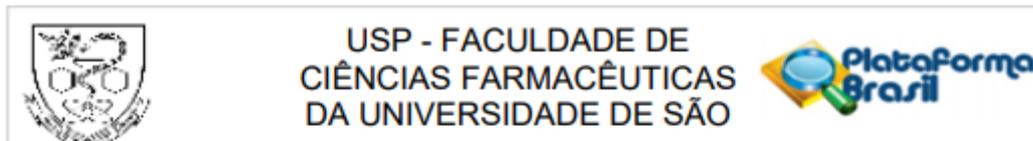
- () diariamente () 1 vez por semana
 () 2-3 vezes por semana () 4-5 vezes por semana

Quando foi a última vez? _____

Outras informações relevantes: _____

ANEXO II

Aprovação do comitê de ética em pesquisa com humanos



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Titulo da Pesquisa: Desenvolvimento e aplicação de método analítico para determinação de substâncias psicoativas em amostras biológicas de motociclistas empregando LC-MS/MS

Pesquisador: Mauricio Yonamine

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 66090517.6.0000.0067

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: FUND COORD DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NIVEL SUP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.528.294

Apresentação do Projeto:

O Código de Trânsito Brasileiro é abrangente quando trata de outras substâncias psicoativas que não o álcool. De acordo com a Lei nº 12.760, de 20 de dezembro de 2012, conhecida como "nova lei seca", como infração gravíssima "dirigir sob a influência de álcool ou de qualquer outra substância psicoativa que determine dependência". A mesma lei estipula como crime, punível com pena de detenção, a condução de "veículo automotor com capacidade psicomotora alterada em razão da influência de álcool ou de outra substância psicoativa que determine dependência". Apesar de a legislação brasileira incluir o termo "outras substâncias psicoativas"

nos mesmos artigos que tratam do consumo de álcool, ela não determina especificamente as substâncias que devem ser consideradas. Além disso, não são estabelecidos limites de concentração que devem ser constatados e nem modos de detecção dessas substâncias para que se cumpra os dispostos nos artigos de crime e infração de trânsito. Sendo assim, na prática, o uso

de outras substâncias psicoativas durante a condução de veículos passa a não ser punível, apesar de também apresentar riscos para a segurança no trânsito (BRASIL, 2015). Ao mesmo tempo que aproximadamente 1,24 milhão de pessoas morrem anualmente em todo o mundo em decorrência de acidentes de trânsito, sendo 23% desse total motociclistas (OMS, 2015), acredita-se que controlando os fatores de risco associados ao condutor, como a velocidade, dirigir sob o efeito de substância psicoativa, não utilizar capacetes em motocicletas, cinto de segurança e equipamentos de segurança infantis, seria possível diminuir drasticamente as taxas de mortes em acidentes de trânsito (WHO, 2015). O presente projeto almeja primeiramente o desenvolvimento metodológico para determinação de drogas psicoativas ilícitas e lícitas, pertencentes às classes dos estimulantes (cocaína, anfetamina, metanfetamina e metilenedioximetanfetamina-MDMA), canabinoides (THC), antihistamínicos (dexclorfeniramina), relaxantes musculares (ciclobenzaprina), anorexígenos (femproporex e dietilpropiona) e benzodiazepínicos (clonazepam) em amostras de fluido oral e avaliar a prevalência de uso dessas substâncias em motociclistas (n=200). Para tanto, será utilizada a técnica de cromatografia líquida acoplada

à espectrometria de massas, utilizando equipamento disponível no Laboratório de Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (LAT-FCF-USP). Além do desenvolvimento de novos métodos analíticos que poderão ser utilizados para futuro monitoramento de motoristas e motociclistas, serão obtidos resultados objetivos da prevalência do uso de drogas e medicamentos por esta população, contribuindo para o desenvolvimento de medidas preventivas e de políticas públicas.

Todos os dados obtidos durante o estudo serão analisados com o programa Epi-Info 6.0 e Stata 8.0 para Windows. Após análise descritiva dos

dados, os participantes serão agrupados de acordo com as substâncias identificadas nas amostras. Serão realizadas comparações entre os grupos

por teste de Qui-quadrado de Pearson, ou por Teste Exato de Fisher para variáveis nominais, e pelo teste t de Student para variáveis de

mensuração do tipo intervalar com distribuição normal e variância homogênea. Se a distribuição dos dados não se comportar de forma normal, serão

utilizados testes não paramétricos de Mann - Withney ou Kruskal – Wallis. Como medida de associação será utilizada a OR (odds ratio), calculado

por regressão logística e a hipótese nula será refutada quando $p < 0.05$.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral

O objetivo desse projeto é avaliar a prevalência de substâncias psicoativas lícitas e ilícitas em motociclistas na cidade de São Paulo, além de desenvolver um método analítico rápido baseado em extração por eletromembrana e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas.

Objetivos específicos

- a) Desenvolver e aplicar um método analítico para a quantificação de fármacos e drogas ilícitas em amostras de fluido oral utilizando uma técnica de extração mais inovadora como a eletromembrana, que é mais rápida, utiliza menos amostra e gera menos resíduo orgânico.
- b) No presente projeto, pretende-se substituir totalmente o solvente orgânico na extração por eletromembrana, por uma camada de gel de eletroforese, técnica inovadora nunca antes estudada que torna o método ainda mais fácil de ser executado e mais sustentável.
- c) Avaliar a possível utilização de uma amostra biológica alternativa que possui coleta fácil e não invasiva em casos de acidentes ou fiscalização de trânsito.
- d) Fornecer dados sobre o uso de substâncias psicoativas por motociclistas que possam auxiliar na implantação de políticas públicas de prevenção de acidentes de trânsito relacionados ao consumo dessas substâncias.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos são mínimos, pois esta pesquisa não terá nenhum impacto sobre o voluntário uma vez que a coleta é realizada de modo não invasivo, evitando qualquer desconforto.

Benefícios:

Não haverá benefícios diretos aos voluntários doadores de amostra. O estudo de prevalência de substâncias psicoativas em motociclistas pode

auxiliar em novas políticas públicas que auxiliam na diminuição do número de acidentes de trânsito.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

As pendências foram atendidas e devidamente corrigidas no TCLE e nos demais documentos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

considera-se dentro das solicitações da Resolução 466/12

Recomendações:

Sem recomendações ou pendências

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Este CEP entende que o projeto de pesquisa pode ser aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_876545.pdf	13/10/2017 14:51:12		Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Carta_CEP_F.pdf	13/10/2017 14:48:42	Mauricio Yonamine	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_versao_2.pdf	13/10/2017 14:47:38	Mauricio Yonamine	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Colaboracao_Sindimoto_versao_2.pdf	13/10/2017 14:46:38	Mauricio Yonamine	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_versao_2.pdf	13/10/2017 14:43:50	Mauricio Yonamine	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_versao_2.pdf	13/10/2017 14:43:13	Mauricio Yonamine	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	21/03/2017 14:19:10	Mauricio Yonamine	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_motociclistas.pdf	21/03/2017 14:18:55	Mauricio Yonamine	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	21/03/2017 14:18:18	Mauricio Yonamine	Aceito
Orçamento	Recurso_APROVADO_capes_forense_DOU.pdf	20/03/2017 14:57:04	Mauricio Yonamine	Aceito
Declaração de Pesquisadores	participacao_sindimotosp.pdf	20/03/2017 13:15:12	Mauricio Yonamine	Aceito
Declaração de Pesquisadores	participacao_Katia.pdf	20/03/2017 13:14:41	Mauricio Yonamine	Aceito
Declaração de Pesquisadores	coparticipacao_Vilma.pdf	10/03/2017 17:35:06	Mauricio Yonamine	Aceito
Declaração de Pesquisadores	anuencia_FMUSP.pdf	10/03/2017 17:34:37	Mauricio Yonamine	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Anuencia_FCF.pdf	10/03/2017 16:19:27	Mauricio Yonamine	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 06 de Março de 2018

Assinado por:
Cristina Northfleet de Albuquerque
(Coordenador)

