

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Toxicologia e Análises Toxicológicas

Avaliação da presença de anfetamina, cocaína e tetraidrocanabinol
em amostras de sangue *post mortem* e de indivíduos vivos,
utilizando a técnica de microextração em fase líquida com uso de
fibra oca de polipropileno (HF-LPME)

Clovis Sanchez

Tese para obtenção do Título de Doutor

Orientador: Profa. Dra. Elizabeth de Souza Nascimento

São Paulo

2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Toxicologia e Análises Toxicológicas

Avaliação da presença de anfetamina, cocaína e tetraidrocanabinol
em amostras de sangue *post mortem* e de indivíduos vivos,
utilizando a técnica de microextração em fase líquida com uso de
fibra oca de polipropileno (HF-LPME)

Clovis Sanchez

Versão original da Tese

Tese para obtenção do Título de Doutor

Orientador: Profa. Dra. Elizabeth de Souza Nascimento

São Paulo

2017

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 pela 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

S211a Sanchez , Clovis
Avaliação da presença de anfetamina, cocaína e tetraidrocannabinol em amostras de sangue *post mortem* e de indivíduos vivos, utilizando a técnica de microextração em fase líquida com uso de fibra oca de polipropileno (HF-LPME) / Clovis Sanchez. -- São Paulo, 2018.
107p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.

Orientador: Nascimento, Elizabeth de Souza

1. Toxicologia 2. Toxicologia forense 3. Toxicologia social
I. T. II. Nascimento, Elizabeth de Souza.

615.9 CDD

Clovis Sanchez

Avaliação da presença de anfetamina, cocaína e tetraidrocanabinol
em amostras de sangue *post mortem* e de indivíduos vivos,
utilizando a técnica de microextração em fase líquida com uso de
fibra oca de polipropileno (HF-LPME)

Comissão Julgadora
Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Prof. Dr.
Orientador

1o. examinador

2o. examinador

3o. examinador

4o. examinador

São Paulo, 18 de abril de 2018

Ao Diego, à Naiene, à Luciana e à Áurea que foram, cada um ao seu modo, o motivo e a força necessária para o início e a conclusão desse trabalho.

Aos meu saudosos pais Antonio Sanchez (in memorian) e Helia Passarella Sanchez (in memorian) que sempre caminharam comigo, enquanto possível ao meu lado, sempre no meu coração.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Antonio Sanchez e Helia Passarella Sanchez cujos cuidados, apoio, orientação e amor, baseados em um sublime senso de ética, formaram a determinação e a esperança que reside em mim para a concretização de meus sonhos.

Ao meu filho Diego que nunca me cobrou pelas faltas decorrentes de minhas escolhas.

A minha esposa Luciana que sempre me deu incentivo e apoio incondicional a todos os meus projetos pessoais.

Ao José Guilherme Chaui Berlinck pelas sugestões e correções feitas no texto dessa tese.

À Marilena Chauí pelo apoio e ajuda que suavizou o meu caminhar durante toda a jornada.

À Dra. Elizabeth de Souza Nascimento que me acolheu quando precisei e me orientou de forma sempre paciente e amistosa.

Ao Dr. Maurício Yonamine que me recebeu em seu laboratório.

À Dra. Silvia Regina Cavani Jorge Santos e toda a sua equipe pela receptividade e pelas horas agradáveis de aprendizado.

À Dra. Maria de Fatima Menezes Pedrozo, cujas observações precisas e sensatas agregaram valor a essa tese e cuja intervenção foi fundamental para a sucesso da parceria estabelecida com a Seperintendência da Polícia Técnico-Científica de São Paulo.

À Dra. Kátia Regina Rosin Delphino Salles, ao Dr. Victor Alexandre Precinio Gianvecchio e ao comitê de ética da Polícia técnico-científica de São Paulo pela inestimável cooperação e pela confiança que depositaram em mim e em meu trabalho.

Aos colegas do LAT e dos demais laboratórios que me receberam e me auxiliaram durante os trabalhos que realizei. Obrigado especial à Beatriz Paranhos, Éric Barioni e Rafael Menck que me estenderam as mãos da amizade nos momentos mais difíceis.

À CAPES pela bolsa concedida, auxiliando no financiamento dessa tese.

APOIO FINANCEIRO

CAPES – Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior.

RESUMO

SANCHEZ, C. Avaliação da presença de anfetamina, cocaína e tetraidrocanabinol em amostras de sangue post mortem e de indivíduos vivos, a técnica de microextração em fase líquida com uso de fibra oca de polipropileno (HF-LPME). 2017. 104 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2017.

Estima-se atualmente que mais de 5% da população mundial vem fazendo uso recreativo de algum tipo de substância psicoativa, sendo que o direito a esse uso é tema recorrente da sociedade contemporânea. Por apresentar riscos associados à saúde e a segurança das populações, o uso abusivo dessas substâncias tem instigado a toxicologia social na busca de respostas, com as quais se possa caracterizar, analisar e gerenciar esses riscos. Drogas de grande consumo no Brasil são a anfetamina, cocaína e Cannabis sativa. Esta tese desenvolveu uma nova metodologia para detectar e quantificar anfetamina, cocaína e tetraidrocanabinol em sangue total, com uso de microextração em fase líquida via fibra de polipropileno (HF-LPME), seguida de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS). Trata-se de uma técnica que apresenta vantagens sobre as tradicionais, uma vez que demanda quantidades menores de solvente orgânico, diminuindo riscos e custos de processo. Também propôs um estudo com a aplicação dos métodos em 69 amostras de sangue de vivos e de *post mortem*, as quais foram obtidas por convênio com a superintendência da polícia técnica científica de São Paulo (SPTC/SP). Os métodos desenvolvidos foram validados de acordo com diretrizes internacionais de interesse forense. Como resultado da validação, os métodos desenvolvidos se mostraram precisos e exatos para anfetamina e cocaína. O limite de detecção da cocaína foi de 5 ng . mL⁻¹ e o limite de quantificação de 10 ng . mL⁻¹. Quanto a anfetamina, os limites de detecção e de quantificação foram de 5 ng . mL⁻¹. A técnica de HF-LPME não foi aplicável ao tetraidrocanabinol (Δ^9 -THC). Como resultado da análise das amostras, 40% delas apresentaram resultados positivos para cocaína. Desses positivos, 35% foram oriundos das matrizes de sangue de vivos e 64% oriundos de sangue *post mortem*. Nenhuma delas apresentou resultado quantificável para anfetamina.

Palavras-chave: Análise toxicológica, Anfetamina, Cocaína, GC-MS. HF-LPME, Cannabis, substância psicoativa, sangue *post mortem*, sangue total, THC.

ABSTRACT

SANCHEZ, C. Amphetamine, cocaine and tetrahydrocannabinol evaluation in blood samples of living people and post mortem blood samples using microextraction technique in liquid phase (HF-LPME). 2017. 104 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2017.

It is currently estimated that more than 5% of the world's population has been doing recreational use of some kind of psychoactive substances and the legal right to such use is a recurring theme debated by contemporary society. Due to the risks associated with populations health and safety, the abusive use of these substances has been instigating by social toxicology to search for answers to characterize, analyze and manage these risks. Drugs of great consumption in Brazil are, amphetamine cocaine and marijuana. This thesis proposes to develop a new methodology to detect and quantify psychoactive drugs in whole blood with the use of liquid phase microextraction by polypropylene fiber (HF-LPME), followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). It is a technique that presents advantages compared with traditional ones, because of the smaller amounts demands of organic solvent, reducing risks and process costs. It also proposes a study with 69 blood samples taken from living persons and post mortem blood samples, which were obtained by agreement with the Superintendency of São Paulo Scientific Technical Police (SPTC / SP). The methods developed were validated according to international guidelines of forensic interest. As a result of the validation, the methods developed were precise and accurate for amphetamine and cocaine. The limit of cocaine detection was $5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ and the limit of quantification was $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$. As for amphetamine, the limits of detection and quantification were $5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$. The HF-LPME technique was not applicable to tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC). As a result of the sample analysis, 40% of them presented positive results for cocaine. Of these, 35% were from blood samples taken from living persons and 64% from the post mortem blood samples. None of the samples presented quantifiable results for amphetamine.

Keywords: Amphetamine, Cocaine, GC-MS, HF-LPME, Marijuana, post mortem blood, psychoactive substance, toxicological analysis, whole blood, THC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Biotransformação de anfetaminas	25
Figura 2 - Biotransformação de metanfetamina e femproporex	26
Figura 3 - Biotransformação da cocaína, com a porcentagem provável de formação de cada produto	32
Figura 4 - Biotransformação da cocaína em cocaetileno	32
Figura 5 - Biotransformação do THC	35
Figura 6 - Sistema trifásico usado na extração de anfetaminas (HF-LPME)	38
Figura 7 - Etapas da HF-LPME – Procedimento geral	50
Figura 8 - Preenchimento da fibra de polipropileno com solução receptora	51
Figura 9 - Montagem e fechamento do sistema trifásico	51
Figura 10 - Reação genérica esperada entre anfetamina e anidrido trifluoracético (ATFA)	52
Figura 11 - Cromatograma de uma solução de THC na concentração de 20 µg . ml ⁻¹ de metanol. Método SIM	64
Figura 12 - Cromatograma de uma solução de THC, na concentração de 20 µg . ml ⁻¹ de metanol. Três íons característicos, sendo o íon 299 <i>m/z</i> o quantificador. Método SIM	64
Figura 13 - Cromatograma da análise de uma solução de THC com 3 deutérios, na concentração de 20 µg . mL ⁻¹ de metanol. Três íons característicos. Método SIM. Tempo de saída do analito de aproximadamente 9.6 min	65
Figura 14 - Cromatograma da análise de extração relativo a matriz sangue, sem adição de THC e de seu deuterados. Método SIM	65
Figura 15 - Cromatograma representativo das tentativas de extração da matriz de sangue, com adição de Δ ⁹ – THC 20 µg . mL ⁻¹ . Método SIM. Sem detecção no tempo de saída próximo de 9.6 min.	66

Figura 16 - Cromatograma da anfetamina e de seu padrão interno com 5 deutérios na cadeia, medidos pelos seus íons quantificadores, 140 <i>m/z</i> e 144 <i>m/z</i> , respectivamente	68
Figura 17 - Espectro de massa da anfetamina derivatizada com anidrido trifluoracético (ATFA)	68
Figura 18 - Cromatograma e espectro de massa da cocaína e de seu padrão interno com 3 deutérios, medidos nos seus íons quantificadores, 182 <i>m/z</i> e 185 <i>m/z</i> , respectivamente.....	69
Figura 19 - Espectro de massa da cocaína	69
Figura 20 – Curva de calibração para anfetamina, já considerado o modelo de regressão linear ponderada de menor somatória de erros modelo	71
Figura 21 – Curva de calibração para cocaína, já considerado o modelo de regressão linear ponderada de menor somatória de erros.....	75
Figura 22 – Número de amostras negativas e positivas para cocaína, segundo o tipo da matriz utilizada	81
Figura 23 – Número total de amostras, segundo sua possibilidade de detecção ou quantificação de cocaína	82
Figura 24 – Número de mostras positivas e negativas para cocaína, segundo ano de realização da coleta	83
Figura 25 – Número de amostras positivas para cocaína, segundo divisão de sexo	84
Figura 26 – Número de casos positivos, comparados com o número de casos apresentados por sexo	84
Figura 27 – Porcentagem do número de casos positivos para cocaína, segundo o tipo de ocorrência, conforme classificação dada pela SPTC/SP	85
Figura 28 – Casos positivos para cocaína, segundo faixa etária do doador da amostra	86

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 – Variantes utilizadas nos ensaios destinados a extração do THC por HF-LPME	55
Quadro 2 – Íons relativos a cada analito e seu respectivo padrão interno deuterado	57
Quadro 3 – Observações empíricas sobre o uso de diferentes solventes para a extração de anfetamina e cocaína via HF-LPME pelo sistema trifásico	67
Tabela 1 - Dados recebidos da SPTC/SP, relativos as 69 amostras de sangue de estudo forense investigados nesse trabalho	48
Tabela 2 – Critérios de ponderação estudados para anfetamina	71
Tabela 3 - Limite de detecção (LOD), limite baixo de quantificação (LLOQ) e coeficiente de correlação linear para anfetamina, resultantes da aplicação da técnica de HF-LPME em sangue total	72
Tabela 4 - Valores do ensaio de precisão do método HF-LPME em sangue total, para anfetamina, expresso em coeficiente de variação	72
Tabela 5 - Valores do ensaio de exatidão para anfetamina, resultantes da aplicação da técnica de HF-LPME	73
Tabela 6 - Valores médios do ensaio de Recuperação do método HF-LPME para a determinação de anfetamina em sangue total	73
Tabela 7 – Critérios de ponderação dos estudados para cocaína.....	75
Tabela 8 - Limite de detecção (LOD), limite baixo de quantificação (LLOQ) e coeficiente de correlação linear para cocaína, resultantes da aplicação da técnica de HF-LPME em sangue total	76
Tabela 9 - Valores do ensaio de precisão do método HF-LPME em sangue total, para cocaína, expresso em coeficiente de variação	76
Tabela 10 - Valores do ensaio de exatidão para cocaína, resultantes da aplicação da técnica de HF-LPME	77

Tabela 11 - Valores médios do ensaio de recuperação do método HF-LPME para a determinação de cocaína em sangue total	77
Tabela 12 - Resultado dos ensaios realizados com as amostras da SPTC/SP, considerando apenas os 28 casos positivos de detecção ou quantificação de cocaína	80

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO	16
2.	REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1	Substâncias psicoativas como precursoras de acidentes e de atos violentos	18
2.2	Drogas de abuso relevantes para estudo no Brasil	19
2.3	Matriz biológica	20
2.4	Toxicocinética, toxicodinâmica e efeitos tóxicos	23
2.4.1	Anfetamina.....	23
2.4.2	Cocaína	28
2.4.3	Tetraidrocanabinol (Δ^9 – THC).....	33
2.5	Técnica de microextração em fase líquida, usando fibra oca de polipropileno (HF-LPME).....	36
2.5.1	Otimização do processo de microextração	38
2.6	Validação de metodologias	39
3.	JUSTIFICATIVA.....	43
4.	OBJETIVOS.....	45
4.1	Objetivos específicos.....	45
5.	MATERIAIS E MÉTODOS	46
5.1	Materiais	46
5.1.1	Equipamentos.....	46
5.1.2	Reagentes, soluções e padrões	46
5.1.3	Amostras das matrizes de sangue.....	47
5.2	Métodos	50
5.2.1	Método HF-LPME para anfetamina e posterior medição via GC-MS.....	52
5.2.2	Método HF-LPME para cocaína e posterior medição via GC-MS	53
5.2.3	Método HF-LPME para THC e posterior medição via GC-MS	55
5.2.4	Íons pesquisados.....	57
5.2.5	Ensaio de validação	58
5.2.5.1	Limite baixo de quantificação (LLOQ).....	58

5.2.5.2	Linearidade	58
5.2.5.3	Limite de Detecção (LOD)	59
5.2.5.4	Precisão intradia e interdía.....	59
5.2.5.5	Exatidão	60
5.2.5.6	Recuperação.....	60
5.2.5.7	Seletividade.....	61
5.2.5.8	Carryover	61
5.2.6	Determinação de anfetamina e cocaína em sangue de casos forenses	61
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
6.1	Pré-validação de metodologias	63
6.1.1	Ensaio para THC	63
6.1.2	Solventes utilizados nas HF-LPME	66
6.1.3	Cromatogramas e espectros de massa para anfetamina e cocaína	67
6.2	Resultados da validação do método para anfetamina.....	70
6.3	Resultados da validação do método para cocaína	74
6.4	Resultados das amostras de sangue recebidas da SPTC/SP	78
6.4.1	Anfetamina.....	78
6.4.2	Cocaína	79
7.	CONCLUSÕES	87
8.	REFERÊNCIAS	88
9.	ANEXOS.....	99

1. INTRODUÇÃO

O Escritório das Nações Unidas para Drogas e Crimes (UNODC) publicou em seu relatório de 2017 que aproximadamente 1 bilhão de pessoas - 13% da população global - fez uso de algum tipo de droga ilícita em 2015. Dessas, 29,5 milhões tiveram problemas diversos associados ao uso. Para a UNODC, o consumo de drogas de abuso tem sido um dos responsáveis pelo enfraquecimento do desenvolvimento social e econômico de diversos países, levando milhares de pessoas a condição de miséria, favorecendo um ambiente propício para a ocorrência de crimes e a disseminação de doenças contagiosas como as provocadas pelo vírus HIV e a Hepatite C (UNODC, 2017).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), droga de abuso pode ser definida como toda substância psicoativa de uso recorrente, exacerbado e não medicinal, com o objetivo único de promover prazer para os seus usuários (WHO, 2017). Faz parte do conjunto dessas substâncias algumas ilícitas, ou seja, cuja produção, comercialização e uso são proibidos, e outras lícitas como o álcool, o tabaco e medicamentos. Também para a OMS, qualquer droga de abuso tem grande potencial para gerar problemas significativos, não apenas aos usuários, mas também a seus familiares e aos demais integrantes da comunidade onde vivem ou trabalham (WHO, 2008).

No que se refere ao impacto na força produtiva, a Organização Internacional do Trabalho (OIT) há mais de vinte anos decidiu reunir grupos de especialistas para elaborarem guias com códigos de práticas, com o objetivo de fornecer orientações às empresas e instituições governamentais, visando incentivar a prevenção e a redução dos problemas associados ao álcool e a outras drogas de abuso no ambiente de trabalho (ILO, 1996). E desde então continua acompanhando e publicando material relevante sobre o tema, seja para uso global, seja para o uso específico de uma região ou de país (ILO, 2017). Ainda sobre trabalho, mas abordando apenas a condução de veículos automotores cuja atividade é uma das mais desempenhadas no mundo, a Comissão Econômica das Nações Unidas para a Europa UNECE (2010) incluiu em sua resolução consolidada sobre tráfego uma recomendação para que governos desenvolvessem políticas públicas, visando o controle e a orientação sobre os perigos das substâncias que poderiam afetar a capacidade de dirigir. Quanto a essas ações de controle no Brasil, o Código de Trânsito de 1997, bem como a legislação que o complementa já prevê punições a motoristas que

são surpreendidos quando na condução de veículos sob a influência de álcool e outras substâncias psicoativas que provoquem dependência (BRASIL,1997; BRASIL, 2008; BRASIL, 2012; BRASIL, 2016). Contudo, porque possui apenas função punitiva, essa ação governamental não é suficiente para que se crie no país a base necessária para o estabelecimento de programas de orientação de condutores, no que concerne aos riscos de se conduzir veículos, estando sob a influência de uma ou mais drogas de abuso.

Além de acidentes no trânsito, drogas de abuso tem protagonizado diversos casos de agravos à saúde e casos de violência. Isso pode ser observado nos resultados do relatório de 2009 publicado pela Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas (Senad) de 2009. Trata-se de um relatório oficial do governo brasileiro que apresenta informações sobre o consumo e as consequências do uso de psicoativos para uma população de brasileiros com idades entre 12 e 65 anos, residentes nas cidades com mais de 200 mil habitantes, somando-se a essas a cidade de Palmas no estado de Tocantins (108 cidades no total) (IBGE, 2012). Sobre ao número de internações em decorrência de transtorno mental e comportamental causado pelas drogas, o relatório apurou quase 140.000 casos, número maior que o de residentes em muitos municípios brasileiros como os de Paulínia (86.800 residentes); Santana do Parnaíba (113.945 residentes); Cubatão (120.293 residentes); e São Caetano do Sul, (150.000 residentes) (BRASIL, 2009; IBGE, 2012). Quanto aos afastamentos de trabalho em decorrência do uso de drogas de abuso, o relatório apontou um total de 6512 casos – quase 2% das posições de trabalho existentes no mercado formal no ano em que foi realizada a pesquisa (MTBE, 2006). O relatório também apontou que o número de óbitos decorrentes de superdosagens, violência ou acidentes comprovados por uso de drogas de abuso foi de 4 óbitos por cada 100.000 habitantes no país (BRASIL, 2009).

Dada a problemática social envolvida no uso e abuso de drogas ilícitas acima exposta, essa tese propôs criar metodologias validadas com base na técnica de microextração em fase líquida visando a detecção de três substâncias: cocaína, anfetamina e Δ^9 – THC. Além dessa validação, propôs fazer a aplicação das metodologias em amostras de sangue total, oriundas de casos reais de investigação forense que estão sob a responsabilidade da Superintendência da Polícia Técnica-Científica de São Paulo (SPTC/SP).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Substâncias psicoativas como precursoras de acidentes e de atos violentos

Substâncias psicoativas podem causar efeitos seletivos no sistema nervoso central, alterações no funcionamento do sistema dopaminérgico, serotonérgico e adrenérgico, atuar diretamente em neurônios específicos, além de interferir com as funções normais excitatórias do glutamato ou inibitória do ácido aminobutírico - GABA (WANG; MCGINTY, 1999; HOFFMAN; LUPICA, 2000). Como consequência dessas alterações, várias manifestações de ordem psíquicas ocorrem, as quais podem ser observadas tanto em usuários crônicos quanto àqueles de fazem uso esporádico (VALERO et al., 2017). Para os usuários de estimulantes, por exemplo, destacam-se euforia, aumento de autoconfiança e aumento da tendência de assumir comportamentos de risco, podendo chegar ao desenvolvimento de psicoses, as quais são vivenciadas por intermédio de alucinações visuais e auditivas, pensamentos obsessivos, persecutórios, suicidas e delírios (EMCDDA, 2007; BRAMNESS et al, 2012). Quanto aos usuários de cigarros de Cannabis sativa, doravante descrito apenas como cannabis destacam-se as alterações no equilíbrio, na vigília, no estado de alerta e no tempo de resposta motora, com diminuição da destreza (FRAVAT et al, 2005; ELPHICK, 2001). Considerando a ampla gama de alterações centrais e periféricas possíveis, ainda que eles possam variar em tipo e intensidade, é factível concluir que usuários de substâncias psicoativas, ainda que não crônicos, formam um grupo de risco no que concerne ao envolvimento com acidentes ou à capacidade de protagonizar atos de violência (PONCE; LEYTON, 2008).

Corroborando essa conclusão, diversos trabalhos científicos podem ser citados. Drummer et al. (2004), por exemplo, afirma que foi observada, na Austrália, uma forte associação entre acidentes e o consumo de estimulantes, cannabis e álcool, fato que não se comprovou com o consumo de opiáceos. Sobre a violência, Tavares e Almeida (2010) afirmam que o consumo de drogas de abuso é um importante facilitador para crimes como homicídios, suicídios, violência doméstica, crimes sexuais, atropelamentos ou acidentes de trânsito. Ainda a respeito da violência, Guareschi et al. (2004) constata em seu trabalho

de pesquisa que “os significados sobre violência indicam que os pesquisados por ele a situam no espaço das relações familiares e estão implicados com outros acontecimentos como uso de drogas e formas diversas de agressão”. E esse potencial de causar dano parece não se limitar ao período que a substância está presente no organismo. Isso pode ser observado no trabalho de Benavides et al. (2013) que afirma que o período de abstinência de drogas de abuso pode aumentar o risco de acidentes. Em 2010, um relatório brasileiro sobre a incidência de drogas de abuso em motoristas de Porto Alegre identificou que algumas drogas estavam envolvidas em casos de acidentes naquela região do país (BRASIL, 2010a).

2.2 Drogas de abuso relevantes para estudo no Brasil

De acordo com a UNODC (2017) a droga de abuso mais consumida no mundo além do álcool é a cannabis. Seguem-se os anfetamínicos e a cocaína, com alta prevalência dessa última na América do Sul e no Caribe, uma vez que essas regiões passaram a absorver parte da produção antes destinada à América do Norte.

No Brasil, o levantamento reportado no relatório sobre drogas de abuso de 2009 indicou que as substâncias ilícitas de maior uso no país apresentaram o seguinte perfil em ordem decrescente: cannabis, solventes, benzodiazepínicos, orexígenos, cocaína, xarope a base de codeína, estimulantes, barbitúricos, esteroides, opiáceo, anticolinérgicos, alucinógenos, crack, merla e heroína. Importante salientar que muitos usuários têm, por hábito, o consumo concomitante de duas ou mais dessas drogas, seja para experimentarem efeitos acumulativos ou complementares, seja para compensarem efeitos adversos de uma droga de preferência (BRASIL, 2009).

Em 2010, foi publicado um relatório brasileiro abordando o hábito de estudantes, abrangendo casos desde o ensino médio até o ensino universitário. Entre os universitários, a prevalência de uso das drogas indicou, em ordem crescente, o consumo preferencial de: cannabis, haxixe e skank; inalantes e solventes, alucinógenos, cocaína, chá de ayahuasca, cetamina, crack e merla. Entre os alunos do ensino fundamental e médio, esse consumo preferencial foi de: cannabis, haxixe e skank; anfetamínicos; tranquilizantes e ansiolíticos; inalantes e solventes; alucinógenos; analgésicos opiáceos; ecstasy; cocaína;

sedativos; xaropes à base de codeína; chá de ayahuasca; esteroides anabolizantes; cetamina; anticolinérgicos; crack; merla e heroína (BRASIL, 2010b; BRASIL, 2014).

Dessas listas, a cannabis se destaca em importância para estudos, não apenas pela prevalência no consumo já detectada, mas também pela facilidade de sua produção e a possibilidade de ser consumida *in natura*. Além disso, alguns países como Espanha e Estados Unidos tem permitido o consumo de Cannabis para fins recreativos, o que pode influenciar a liberação desse tipo de uso em outros países, incluindo o Brasil. Também há de se considerar que o Uruguai, país fronteiro com o Brasil legalizou, em 2013, a produção, a distribuição e a venda cannabis sob controle do estado, candidatando-se a ser um grande exportador de fármacos e outros produtos da Cannabis para o mundo.

Anfetaminas nas suas mais diversas formas também podem ser destacadas, uma vez que anorexígenos à base de anfetaminas tem disso periodicamente liberadas para uso terapêutico no país, aumentando a sua disponibilidade, apesar de ser um medicamento de uso controlado (BRASIL, 2017). Por fim, destaque deve ser dado à cocaína, já que ela tem sido responsável por inúmeros casos de internações, afastamentos de trabalho e óbitos ocorridos no país e poderia, também, estar envolvida em casos de acidentes e atos violentos.

2.3 Matriz biológica

Em consulta à literatura científica é possível observar a utilização de diferentes matrizes para a determinação de substâncias psicoativas e de seus produtos de biotransformação. (HENSLEY; CODY, 1999; FELGATE; DINAN, 2000; CAMPORA et al., 2003; HE; KANG, 2006; CHIANG; HUANG, 2008; POPA et al., 2009; FAVRETTO et al., 2011; ØIESTAD et al., 2011; BÉVALOT et al., 2016).

O sangue total humano é uma matriz biológica com alto teor de água na sua composição, um solvente polar no qual estão imersos sais minerais, proteínas, fatores de coagulação e hormônios, entre outras substâncias (SILVA; SASSON, 1998; USP, 2017). Especialmente para os casos que se pretende detectar e ou quantificar substâncias psicoativas durante o tempo em que ela esteja agindo na cognição de um indivíduo, independentemente da intensidade dessa ação, a matriz sangue tem destacada relevância, uma vez que ela está associada em maior ou menor grau ao transporte de substâncias pelo

organismo, desde a absorção até sua excreção, seja na forma inalterada ou na sua forma biotransformada pelo organismo. Sendo assim, ainda que consideradas as diferenças cinéticas associadas às diferentes substâncias, cada uma delas possui janelas de detecção e quantificação na matriz de sangue. A partir de tais janelas é possível realizar estudos em psicoativos para posteriores inferências a respeito de concentrações sistêmicas e suas relações dose resposta frente um efeito cognitivo.

Considerando as dificuldades operacionais para se coletar amostras consentidas de matrizes de indivíduos vivos, envolvidas em acidentes ou atos violentos, o uso da matriz de sangue *post mortem* torna-se uma opção de interesse científico no Brasil. Isso, porque, elas são rotineiramente coletadas e enviadas às polícias técnica-científicas de todo o País para avaliações forenses, com possibilidade de uso em experimentos científicos, desde que aprovado pelos órgãos oficiais competentes (BRASIL, 1988). Apesar da disponibilidade, esse tipo de matriz guarda algumas particularidades que a faz diferente do sangue de vivos, sobretudo no tocante a redistribuição de suas substâncias, que resulta no aumento ou diminuição de suas concentrações, dependendo do tecido no qual o sangue se encontra armazenado. Como consequência, erros aparecem ao se tentar comparar concentrações de drogas de sangue de vivos por intermédio dessa mesma matriz de *post mortem* (COOK. et al., 2000; ALICOT et al., 2003; YAREMA; BECKER, 2005).

No que se refere especificamente as substâncias objeto desse estudo, vários pesquisadores já concluíram que elas também estão sujeitas ao efeito de redistribuição *post mortem*. Para cocaína, por exemplo, Logan et al. (1997), considerando as diferenças de concentração obtidas em coletas a partir de sangue ventricular e de sangue femoral, dizem que não se pôde estabelecer um melhor local para a detecção dessa droga de abuso. Quanto as anfetaminas, Barnhart et al. (1999) afirma em seus estudos que a concentração de anfetamina e metanfetamina no sangue periférico foi menor que a concentração encontrada no sangue central. Também que em cinco casos de seu estudo, amostras de sangue coletadas de tecidos do miocárdio apresentaram concentrações ainda maiores que as apresentadas pelo sangue central e periférico. Já McIntyre et al. (2013) também relataram que, dependendo do tecido pesquisado, anfetaminas podem ser encontradas em concentrações mais altas no sangue *post mortem* que as concentrações observadas no sangue *antemortem* dos mesmos indivíduos e dos mesmos locais pesquisados. No caso dos canabinóides, Lemos e Ingle (2011) afirmam que a cannabis não faz parte dos protocolos de rotina da toxicologia *post mortem*, principalmente, por dificuldades

interpretativas dos resultados por incertezas científicas que ainda existem sobre a redistribuição de suas substâncias constituintes. Contudo, existem trabalhos científicos como o de Andrews e Paterson (2012) que reportando sucesso na quantificação de canabinóides em amostras sangue *post mortem*. Em suma, os trabalhos de diversos pesquisadores coincidem com a ideia que a distribuição de diversas substâncias em tecidos humanos no *post mortem* pode variar em maior ou menor concentração, dependendo do local escolhido para a amostragem. Também que as concentrações encontradas para essas substâncias nos diversos sítios após a morte não são necessariamente proporcionais àquelas esperadas no sangue *antemortem*, fato que prejudica uma correlação dose/efeito psíquico. Contudo, apesar da atual dificuldade de correlação, esses mesmos trabalhos científicos são documentos comprobatórios que é possível, sim, a detecção de substâncias psicoativas em sangue *post mortem* e que com essa detecção é provável que se possa inferir se uma pessoa vitimada estava sujeita a algum tipo de efeito psicoativo na hora da morte. Collins et al. (1997) por exemplo, obtiveram sucesso na detecção de Δ^9 – THC em sangue de cadáveres vítimas de afogamento, ainda que a amostragem tenha sido realizada após oito dias da fatalidade. Lemos e Ingle (2011), defendem a ideia da utilização do sangue *post mortem*, tendo publicado trabalhos com a determinação quantitativa de Δ^9 – THC nessa matriz, em amostras com mais de 72 horas, provenientes de homens e mulheres com idade entre 19 e 65 anos.

Além do efeito de redistribuição, também há de se considerar em ensaios que se utiliza a matriz de sangue que a exposição dessa matriz fora do ambiente fisiológico de pessoas vivos pode resultar em uma rápida destruição de parte de suas hemácias, produzindo o efeito conhecido como hemólise (VIEIRA JUNIOR et al., 2012). A hemólise poderia dificultar a aplicação de metodologias de extração da substância da matriz. Contudo, para minimizar a interferência dessa hemólise nos processos analíticos, técnicas podem ser empregadas, sendo a de HF-LPME muito indicada, sobretudo, para amostras complexas, uma vez que resulta em extratos limpos e adequados para medições via cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa - GC-MS. (BJERGAARD; RASMUSSEN, 2007; VIEIRA JUNIOR et al., 2012).

Especificamente sobre cocaína, existe uma suposta perda de sua concentração no sangue *post mortem*. Essa perda poderia estar relacionada a vários fatores. Por exemplo, após o óbito, a colinesterase sérica presente no indivíduo poderia continuar

causando a biodegradação da molécula a benzoilecgonina, sendo que a presença de inibidores enzimáticos como o fluoreto de sódio para a preservação da amostra poderia não inibir totalmente a ação dessa enzima. Outro fator de degradação da cocaína, o qual é citado na literatura é a presença de bactérias que por possuírem esterases poderiam causar a biotransformação da cocaína. Por fim, a possibilidade de hidrólise química também é citada em artigos científicos como responsável pela perda da concentração de cocaína no sangue. Porém, há de se considerar que no sangue *post mortem*, o metabolismo anaeróbico remanescente pode levar à acidose, inibindo esse tipo de degradação espontânea da cocaína (LIU, Y. et al., 1982; BASELT et al., 1993; CLAUWAERT et al., 1997; LOGAN et al., 1997).

2.4 Toxicocinética, toxicodinâmica e efeitos tóxicos

2.4.1 Anfetamina

Anfetamina (1-Phenylpropan-2-amine), fórmula molecular $C_9H_{13}N$ é uma monoamina primária sólida a temperatura ambiente. Possui: peso molecular de 135,21 ; ponto de ebulição de 200 a 203 °C em 760 mmHg; pressão de vapor de 0,24 mmHg a 20 °C; coeficiente de partição (logP) de 1,76; constante de dissociação (pKa) de 10,13, ponto de fusão de 25 °C, com lenta volatilização a temperatura ambiente. É moderadamente solúvel em água e tem rápida solubilização em meio ácido (TOXNET, 2017b). Seu átomo de nitrogênio com um par eletrônico disponível a caracteriza como base de Lewis (MORRISON; BOYD, 2002).

Existem 3 fármacos com registro na Food Drug Agency – FDA tendo a anfetamina como princípio ativo. São indicados para o tratamento de hiperatividade, narcolepsia e podem ser consumidos como anorexígeno. No Brasil, a Anvisa possui um medicamento registrado, com princípio ativo de dimesilato de lisdexanfetamina para déficit de atenção. Também são registrados anorexígenos como sibutramina, anfepramona e mazindol.

Sobra anfetamina, a dose terapêutica para tratamento de narcolepsia em adultos é de 20 a 100 mg por dia (MOFFAT et al., 2011a). Jenkis e Cone (1998) reportam que

doses terapêuticas resultam picos plasmáticos de $110 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$. Porém, no abuso, um usuário chega ao consumo de 2000 mg por dia. Casos de morte já foram reportados com concentrações no sangue de $41 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ (ADJUTANTES et al., 1975 apud MOFFAT et al., 2011a).

Anfetamina pode ser administrada por diversas vias. Via oral, anfetamina é rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal e mucosa bucal. Os níveis plasmáticos atingem a concentração máxima em tempos que vão de 1 a 3 horas, dependendo de fatores como a atividade física, a quantidade de alimento presente no estômago e o pH da urina. A absorção completa da-se de 4 a 6 horas após a exposição (DOLLER, 1991 apud IPCS, 2017b). Por suas características químicas, essa substância também pode ser consumida via inalação (BRUST, 1993 apud IPCS, 2017b).

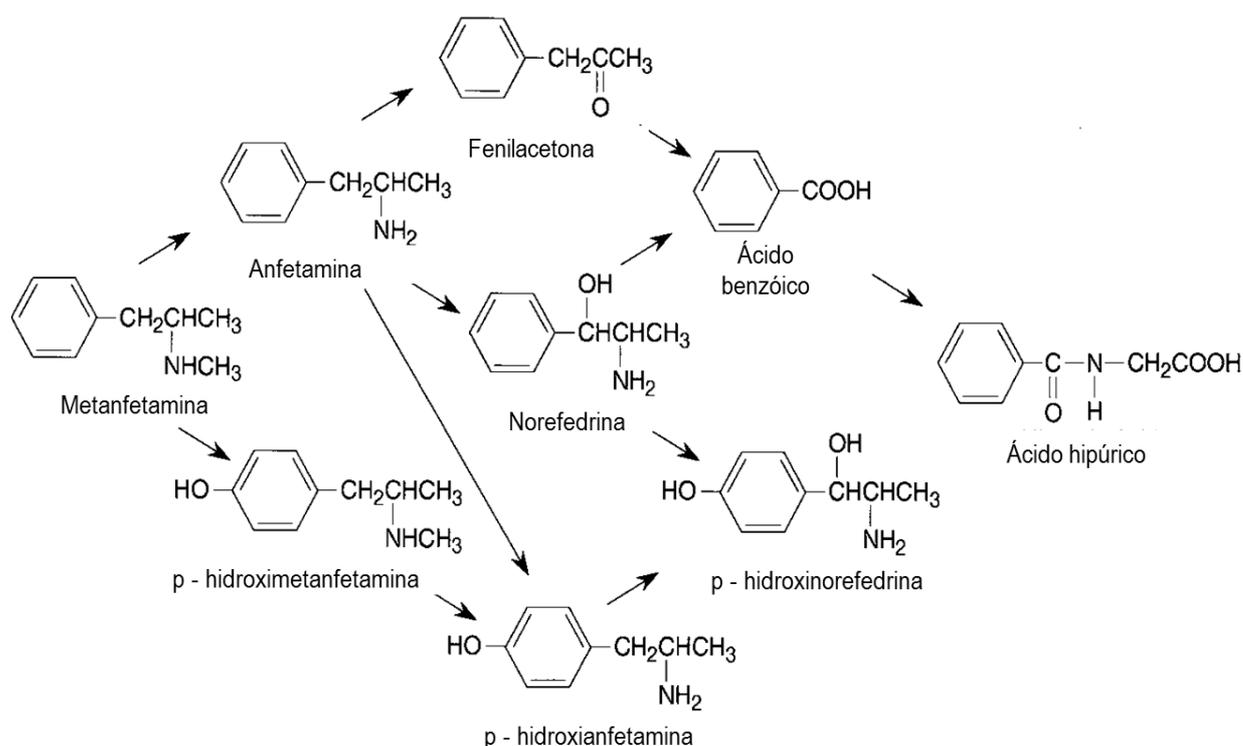
Na distribuição, a anfetamina é concentrada nos rins, nos pulmões, no líquido cefalorraquidiano (LCR) e no cérebro, atravessando a barreira hematoencefálica graças às suas características lipofílicas. Faz ligação com proteínas plasmáticas, porém em quantidades muito variadas (DOLLER, 1991 apud IPCS, 2017b). De acordo com Jenkins e Cone (1998) essas ligações variam de 16 a 20% para usuários crônicos ou casuais. Moffat et al., (2011a) se referem a quantidades de até 40% ligadas a proteínas plasmáticas. As maiores concentrações se dão no cérebro e no LCR. Na urina, ela é detectada cerca de 3 horas após a administração oral (ASHP, 2015 apud TOXNET 2017b).

A meia-vida depende, sobretudo, do pH urinário, podendo variar em tempos que vão de 11 a 13 horas, segundo apurado por Jenkins e Cone (1998) ou tempos maiores como 16 a 31 horas, segundo Ellenhorn (1997 apud IPCS, 2017b) e TOXNET (2017b). Em geral, crianças podem apresentar meia-vida biológica de anfetamina com tempos menores que os apresentados em adultos (TOXNET, 2017b).

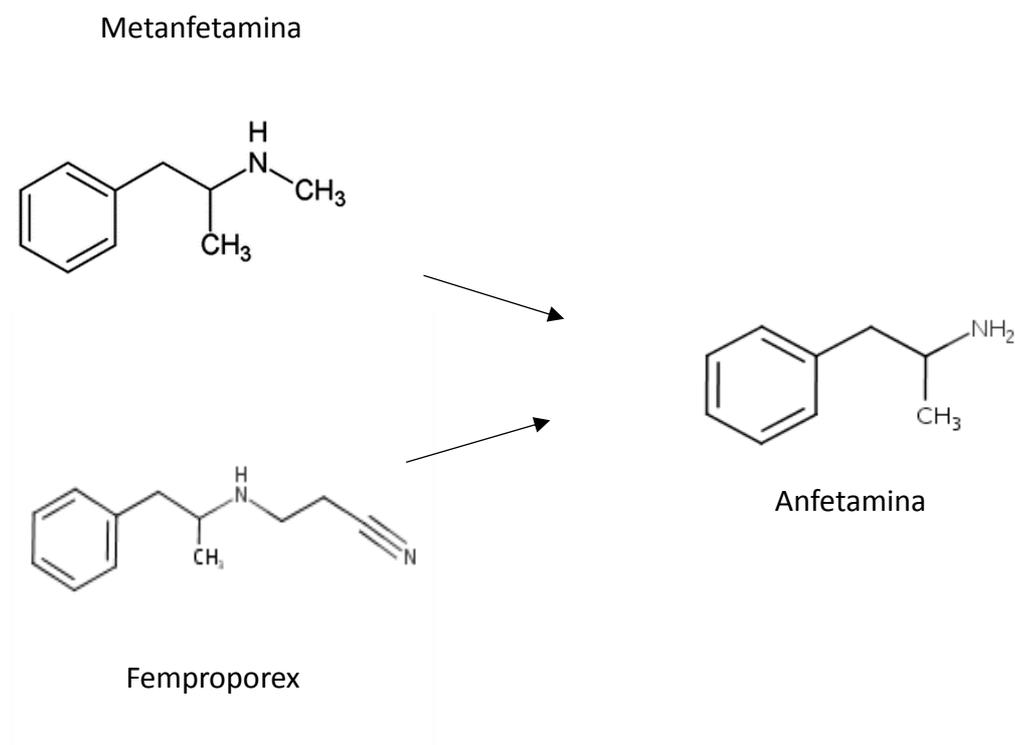
A anfetamina é metabolizada no fígado por hidroxilação, N-desalquilação e desaminação (**Figura 1**) (JENKINS; COLE, 1998; TOXNET, 2017b). Metanfetaminas e femproporex são biotransformados em anfetamina (**Figura 2**) (TANIGUCHI; GUENGERICH, 2009, PANTALEÃO, 2012). Podem ocorrer produtos de biotransformação psicoativos, tais como o estimulante hidroxianfetamina por intermédio do CYP2D6. Como CYP2D6 é geneticamente polimórfico, pode haver variação na metabolização das anfetaminas. (DOLLER, 1991 apud IPCS, 2017b; TANIGUCHI;

GUENGERICH, 2009; TOXNET, 2017b). Outras vias metabólicas, incluindo desaminação e posterior oxidação da cadeia lateral, produzem derivados de anfetamina inativos como a fenilacetona (JENKINS; COLE, 1998; HADDAD, 1998 apud TOXNET 2017b). Fenilacetona é transformada em ácido benzóico o qual conjugado com glicina forma ácido hipúrico. Norepinefrina é formada à partir da β – oxidação estereoseletiva para isômeros (+). Produtos da hidroxilação de aromáticos e de N-oxidação pode ser conjugado com sulfato ou ácido glucurônico (MOFFAT at al., 2011a).

Figura 1 - Biotransformação de anfetaminas



Fonte: Extraído de Jenkins & Cole (1998).

Figura 2 - Biotransformação de metanfetamina e femproporex

Fonte: Adaptado de Taniguchi e Guengerich (2009) e Pantaleão (2012).

A quantidade de excreção inalterada de anfetamina depende do pH da urina (DOLLER, 1991 apud IPCS, 2017b). Segundo Moffat et al., (2011a), 30% da anfetamina absorvida é excretada em 24 horas. Em urinas de pH ácido essa excreção passa a ser de aproximadamente 75% e de 1% a 4% em pHs alcalinos. Já para Ellenhorn (1997 apud IPCS, 2017b), com um pH urinário de 5,5 a 6,0, aproximadamente 60% da dose de anfetamina é excretada pelos rins dentro em 48 horas. Contudo, quando o pH urinário é alcalino (pH 7,5 a 8,0), a eliminação é predominantemente por desaminação, sendo que menos que 7% da anfetamina é excretada inalterada na urina. Considerando um pH próximo de 7, segundo Jenkins e Cone (1998), 90% da anfetamina absorvida é excretada em períodos de 3 a 4 dias, sendo que 70% da dose é eliminada nas primeiras 24 horas, via urina, sendo 30% dela inalterada. Também, observaram variações de quantidade excretada entre urinas de pH ácido e alcalino. Quanto a proporção de excreção, em urinas de pH mais neutras, entre 16% a 28% são excretados como ácido hipúrico, 4% como

benzoilglucoronídeo e de 2% a 4% como 4-hidroxinorefedrina e fenilacetona (MOFFAT et al., 2011a).

No que se refere a metanfetamina, 7% dela é excretada na forma de anfetamina em um período de 24 horas.

Anfetamina age, principalmente, no sistema nervoso central - SNC, causando a liberação de norepinefrina -NE e dopamina - DA e retardando o metabolismo das catecolaminas pela inibição da monoamina oxidase -MAO (HARDMAN et al., 1997 apud TOXNET, 2017b; ASHP, 2005 apud TOXNET, 2017b). Anfetaminas também atuam nos transportadores de dopamina - DAT, os quais são responsáveis pela retirada das catecolaminas das fendas sinápticas, implicando também em alterações na função da V-MAT 2 que regula a concentração citosólica de DA (RIDDLE et al., 2005). De acordo com Yamamoto et al. (2010), anfetaminas estão associadas a alteração no transporte de NE e serotonina (5-HT), além da DA, estimulando o transporte das monoaminas do citoplasma para a fenda sináptica. Além disso, provoca a liberação de DA e 5-HT das vesículas de armazenamento e prejudica a reabsorção nessas vesículas, aumentando a concentração citoplasmática dos neurotransmissores, deixando-os mais biodisponíveis. Por fim, afirmam que anfetaminas estão relacionadas com a inibição dos sistemas de recaptção das monoaminas.

Enantiômeros S (+) da anfetamina são 5 vezes mais potentes que os enantiômeros R (-) (KRAEMER; MAURER, 1998). Por via oral, os efeitos da anfetamina podem durar de 4 a 24 horas (TOXNET, 2017b). Por via intravenosa, ela produz mais euforia e aparecimento mais rápido do efeito de Flash, o qual é comparado ao prazer de um orgasmo sexual (BRUST, 1993 apud IPCS, 2017b). Modo geral, dos efeitos observados relacionados ao SNC para todas as vias de absorção são, entre outros, inquietação, agitação, insônia, confusão, aumento da atividade motora, elevação do humor, aumento da vigília, sensibilidade, irritabilidade e ataques de pânico. Também são típicos na exposição crônica os quadros com delírios e paranóia. Uma síndrome de abstinência com depressão, ansiedade e letargia ocorre após a cessação abrupta após um período variável de uso crônico. Estima-se que os efeitos da abstinência tem pico entre 2 a 3 dias (DOLLERY, 1991 apud IPCS 2017b; REYNOLDS, 1996 apud IPCS, 2017b).

2.4.2 Cocaína

Cocaína (Methyl-(1S,3S,4R,5R)-benzoyloxy-8methethyl-8azobicyclo-[3.2.1] octane -4carboxilate), fórmula molecular $C_{17}H_{21}NO_4$ é um alcalóide, uma mono amina terciária sólida a temperatura ambiente, pouco solúvel em água. Apresenta peso molecular de $303.358 \text{ g.mol}^{-1}$, ponto de fusão de $98 \text{ }^\circ\text{C}$, pressão de vapor de $1,91.10^{-7} \text{ mmHg}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, coeficiente de partição (logP) de 2,3 e constante de dissociação (pKa) de 8,61 a $15 \text{ }^\circ\text{C}$ (TOXNET, 2017a). Seu átomo de nitrogênio a caracteriza como uma base de Lewis (MORRISON; BOYD, 2002; TOXNET, 2017a). Além do grupamento amina, ela possui mais de um éster passível de ser hidrolisado para a formação de um ácido carboxílico (TANIGUCHI; GUENGERICH, 2009). Isso é o que ocorre, por exemplo, quando, pela ação da carboxil esterase, ela é biotransformada em benzoilecgonina..

A cocaína apresenta efeito anestésico local e de vasoconstricção. Apesar disso, cocaína não tem hoje aplicação terapêutica em função das reações adversas que produz. Portanto, não existe dose relatada para seu uso como fármaco (MOFFAT et al., 2011b).

Cocaína pode ser administrada por injeção intravenosa, pela mucosa, inalação ou ingestão (GOLDSTEIN et al., 2009; DART, 2004 apud TOXNET 2017a; ASHP, 2011 apud TOXNET 2017a).

Segundo as publicações científicas, as concentrações plasmáticas máximas podem variar. Para as vias inalatória e intravenosa, o pico pode ocorrer entre 1 a 5 minutos, enquanto a via intranasal esse tempo tem sido reportado entre 15 a 50 minutos. O uso tópico de cocaína pode atrasar o pico plasmático, uma vez que a cocaína tem efeito de vasoconstricção (GOLDSTEIN et al., 2009; SCHEIDWEILER, K. B. et al., 2010; CONE, 1995 apud BORTOLOTTI et al., 2012).

Pela via oral, a absorção de cocaína deve ocorrer mais lentamente que a administração de mesma dose via intranasal, uma vez que a cocaína tem seu grau de ionização afetado pela acidez do meio estomacal. (ELLENHORN e BARCELLOUX, 1988 apud TOXNET, 2017a).

A cocaína é distribuída no organismo atingindo o cérebro, baço, rim, pulmões, coração e músculos esqueléticos (BORTOLOTTI et al., 2012). Em baixa concentração, mais de 90% da cocaína se liga a proteínas plasmáticas como albumina e alfa1-ácido glicoproteico (KARCH, 2006).

A meia-vida da cocaína também depende da via de administração. De acordo com a literatura, ela pode variar entre 40 minutos até 5 horas (GOLDSTEIN et al., 2009; SCHEIDWEILER, K. B. et al., 2010; MOFFAT et al., 2011b; BORTOLOTTI et al., 2012).

Em testes comparativos, o cocaeteno gerado pelo uso concomitante de cocaína e álcool apresentou meia-vida de aproximadamente 150 minutos, enquanto a cocaína nesse mesmo ensaio apresentou meia-vida de aproximadamente 90 minutos (GOLDSTEIN et al., 2009).

A janela de detecção no sangue varia de acordo com a via de absorção e a dose administrada. A detecção se dá entre 4 a 6 horas, quando administrado em doses de 20 mg, podendo chegar a 12 horas, quando administrado em doses de 100 mg (GOLDSTEIN et al., 2009).

A cocaína é principalmente biotransformada pelo fígado a dois principais produtos de biotransformação inativos, benzoilecgonina - BE e éster metílico de ecgonina - EME (SCHEIDWEILER, K. B. et al., 2010). O processo inclui a hidrólise de seus ésteres. O EME é obtido pela ação das colinesterases plasmáticas e hepáticas. Já a BE é formada espontaneamente ao pH fisiológico. A biotransformação destes compostos em ecgonina é pH dependente e ocorre espontaneamente. A cocaína também sofre N metilação pelo sistema do CYP-450 e, nesse caso produz um metabolito psicoativo, a norcocaína, que tem poder anestésico maior que a cocaína (**Figura 3**) (BORTOLOTTI et al., 2012).

De acordo com Goldstein et al. (2009), metade da dose absorvida é biotransformada pela carboxilesterase no fígado para formar BE. A N-desmetilação hepática de cocaína leva a formação de aproximadamente 5% de norcocaina. Em relação ao EME, pouco mais de 30% da cocaína absorvida é transformada nesse composto pela ação das colinesterases plasmáticas, butirilcolinesterase.

A pirólise da cocaína leva a formação de éster metílico de anidroecgonina - AEME, cuja biotransformação por esterases leva a formação de ecgonidina (BORTOLOTTI et al., 2012).

Quando na presença de álcool, de 5% a 10% da cocaína são biotransformados por transesterificação hepática em cocaeteno que é um psicoativo de menor efeito de rush, comparado a cocaína, mas que apresenta aproximadamente o dobro da meia-vida

de sua precursora (**Figura 4**) (HOROWITZ; TORRES, 1999; BAKER et al., 2007). Os efeitos tóxicos da cocaetileno para o sistema cardiovascular é maior que o da cocaína (NAHAS et al., 1992 apud IPCS, 2017a; BORTOLOTTI et al., 2012).

Após 4 horas, a cocaína é quase toda eliminada do plasma, apesar de seus produtos de biotransformação, inativos, poderem ser identificados até 144 horas após a exposição. Após 24 horas, 90% da cocaína absorvida é eliminada na urina em quantidades de 1 a 9% inalterada, 35 a 54 % na forma de BE e 32-49% na forma de EME e uma parcela também variável na forma de ecgonina, sendo essas quantidades dependentes do pH da própria urina (KARCH, 2006, BORTOLOTTI et al., 2012). Em geral, de 9,5% a 20% da cocaína absorvida é excretada na sua forma inalterada em um período de 24 a 36 horas (GOLDSTEIN et al., 2009). Essa cocaína inalterada é eliminada em alta porcentagem pela via urinária. Contudo, ela também é encontrada inalterada nas fezes e saliva (MOFFAT et al., 2011).

No SNC, a cocaína atua inibindo a recaptção dos neurotransmissores norepinefrina, serotonina e dopamina liberados na fenda pré-sináptica. (RIDDLE et al., 2005; GOLDSTEIN et al., 2009; BORTOLOTTI et al., 2012). Assim como as anfetaminas, a cocaína atua nos transportadores de dopamina - DAT associados as membranas, os quais são responsáveis pela retirada dessa catecolamina da fenda sináptica, implicando também em alterações na função da V-MAT 2 que regula a concentração citosólica de DA (RIDDLE et al., 2005).

Os efeitos clínicos relacionados a administração por via intranasal aparecem após 3 minutos. Na forma de base livre, após absorvida, os efeitos conhecidos como flash podem ocorrer muito rapidamente, após 8 a 12 segundo, e permanecem por 5 a 10 minutos (BURNAT e PAYEN, 1992 apud IPCS, 2017a).

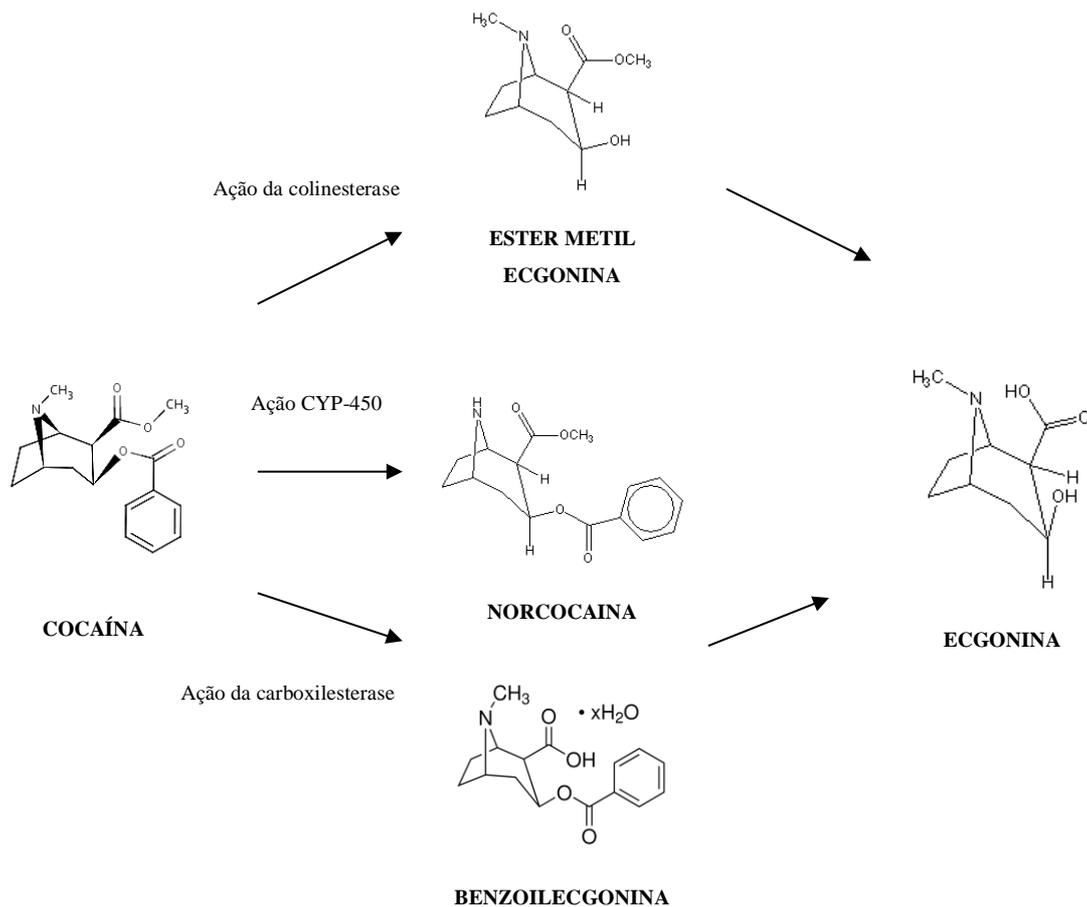
A duração do efeito depende da via de absorção, sendo de 60 a 90 minutos na administração intranasal, 20 a 60 minutos por via intravenosa e 5 a 15 minutos por via inalatória (GOLDSTEIN et al., 2009).

A cocaína provoca sensação de prazer, euforia, melhora a atividade motora, aumenta a autoconfiança, evita o cansaço, acentua o estado de alerta e tira a sensação de fome e sono. Também gera tendencia a agressividade e quadro de desorientação. Altas doses podem provocar paranoia, pânico agitação e alucinações. (GOLDSTEIN et al.,

2009; SCHEIDWEILER, K. B. et al., 2010; SILVA et al., 2010). O uso concomitante de álcool minimiza a disforia associada a abstinência da cocaína (GOLDSTEIN et al., 2009).

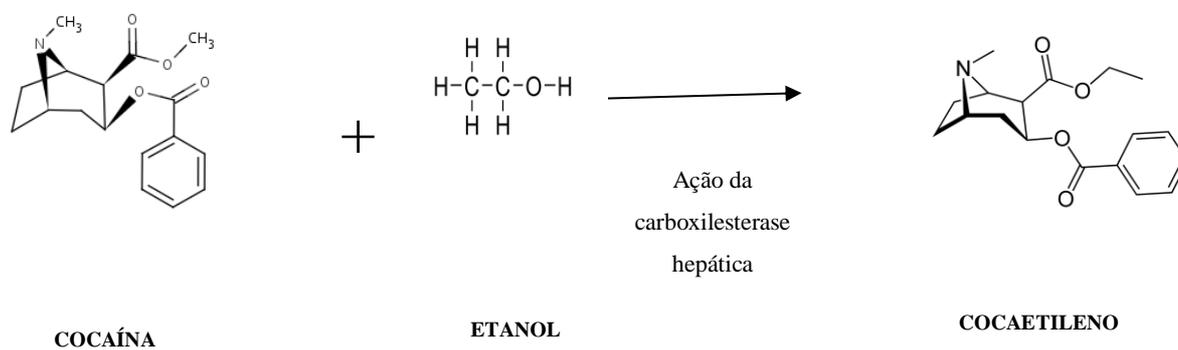
O uso crônico de cocaína consiste em aumento da repetição e do prolongamento do bloqueio da recaptação das monoaminas leva a depleção da DA, NA E 5-HT, gerando desordens psíquicas. Esses efeitos clínicos podem ser observado na abstinência e são, principalmente, ansiedade, depressão, irritabilidade, fadiga e insônia (SILVA et al., 2010).

Figura 3 - Biotransformação da cocaína com a porcentagem provável de formação de cada produto



Fonte: Adaptado de (YONAMINE, 2000).

Figura 4 - Biotransformação da cocaína em cocaetileno



Fonte: Adaptado de (HOROWITZ e TORRES, 1999).

2.4.3 Tetraidrocanabinol (Δ^9 – THC)

Existem mais de 421 substâncias presentes na cannabis, sendo que destas mais de 60 são canabinóides. Entre elas, o tetraidrocanabinol ((6aR)-6,6,9-trimethyl-3-pentyl-6a,7,8,10a-tetrahydrobenzo[c]chromen-1-ol), fórmula molecular $C_{21}H_{30}O_2$ é o mais abundante alcaloide psicoativo desta planta (HUESTIS, 2007). Trata-se de um óleo resinoso amarelo brilhante que possui: peso molecular de 314.4695 g . mol⁻¹; ponto de ebulição de 200 em 0,02 mmHg; pressão de vapor de 1,63.10⁻⁸ mmHg a 25 °C; coeficiente de partição (logP) de 6,97; e constante de dissociação (pKa) de 10,6. É praticamente insolúvel em água (TOXNET, 2017c). Possui um grupamento fenol que é dissociável em meio aquoso, com a formação do fenóxido (R-O⁻) e do íon hidroxônio (H₃O⁺), o que dá a essa substância um caráter ácido (SOLOMONS; FRYHLE, 2011; TOXNET, 2017c).

Existem dois fármacos de THC com o nome genérico de Dronabinol com registro na FDA, ambos indicados como analgésicos, antieméticos, e estimulantes do apetite (MOFFAT et al., 2011c).

De acordo com Chiang e Rapaka (1987 apud NIDA, 2017), a cannabis pode ser inalada, fumada, ingerida ou soluções dela injetadas pela via intravenosa. Quando injetada, observa-se que o nível plasmático do principal psicoativo da cannabis, (Δ^9 – THC), daqui em diante também denominada apenas como THC, cai rapidamente a partir da fase inicial da exposição. Isso ocorre como consequência de sua característica extremamente lipofílica (logP = 6,97) fato que permite com que boa parte da quantidade absorvida dessa substância circule inalterada entre os diversos tecidos. Após 6 horas, em média, as concentrações nos diversos tecidos atingem um pseudo equilíbrio e se inicia a migração do THC de volta para o sangue (CHU; DRUMMER, 2002; KARCHENER et al., 2009). Em termos de proporção, segundo observações em estudos de experimentação animal, a quantidade de THC no tecido adiposo pode chegar a ser 1000 vezes maior que a do plasma. No cérebro, essa quantidade pode chegar a 10 vezes a concentração encontrada no plasma (NIDA, 2017). Para Huestis (2007), administrações de THC resultaram, após 7 dias da exposição, em concentrações proporcionais de 21:1 entre as células adiposas e o tecido cerebral. Após 21 dias, essa proporção entre os tecidos foi de 64:1.

O THC presente no sangue se liga as células plasmáticas em uma proporção de 95 a 99% de THC (GIROUD et al., 2001; HUESTIS, 2007).

Fumada, o pico plasmático é de 3 a 10 minutos após a administração (HUESTIS, 2007).

Por via oral, a concentração máxima do THC pode levar 120 minutos para ser alcançada. Isso, porque, sofre efeito de primeira passagem, sendo biotransformada no fígado (ASHTON, 2001; GROTENHERMEN, 2003).

Karch (2006) afirma que, a cannabis quando fumada, o pico plasmático do THC é alcançado após um tempo inferior a 10 minutos. Ingerida, o tempo desse pico pode aumentar para aproximadamente 30 minutos, dependendo, entre outros, de fatores inerentes ao trato gastrointestinal e da quantidade utilizada. Para Huestis (2007), porém, quando fumada esse pico pode ser alcançado após 15 e até 30 minutos do início da exposição.

A meia-vida do THC tem sido estimada desde 1 hora na fase inicial, ou seja, na fase em que grande parte da quantidade de THC presente no sangue migra para os tecidos adiposos, até 57 horas na fase após o pseudo equilíbrio, ou seja, quando o THC migra de volta para o sangue. Há trabalhos científicos indicando, inclusive, tempos mais longos de meia-vida, chegando a ser até 7 dias. Parte dessa diferença pode ser explicada pela diferença de resultados encontrados em testes empíricos feitos em humanos, considerando dois grupos distintos, quais sejam os de usuários crônicos e não crônicos (CHIANG; RAPAKA, 1987 apud NIDA, 2017; ASHTON, 2001; HUESTIS, 2007).

Na biotransformação, após aproximadamente 13 minutos, uma quantidade estimada em 10% de THC absorvido é biotransformado por intermédio do CYP-450, envolvendo as isoenzimas 2C9, 2C19 e 3A4, transformando THC em 11-hidroxi-THC (11-OH-THC) que é psicoativo. Parte dessa substância produzida passa por segunda biotransformação, em um período de 2 a 4 horas, gerando o composto não psicoativo 11-nor-9-carboxi THC (THCCOOH) (**Figura 5**). O 11-OH-THC é conjugado por intermédio do sistema UDP-glucuronosiltransferase (UGT) 1A9 e 1A10. Por sua vez, THCCOOH é conjugado pelo sistema UGT 1A3, bem como pelo 1A1, 1A4, 1A6 e 1A7 (JANCOVA et al., 2003; DESROSIERS et al., 2014). Esse último produto de biotransformação pode ser encontrado em um período de até 60 dias após uma única exposição (KRAMER; ANDREWS, 2001).

Calcula-se que 80% a 90% do THC são excretados em 5 dias, sendo 65% nas fezes e 20% na urina e que a excreção de uma única dose pode chegar a até 30 dias após essa exposição única (CHIANG; RAPAKA, 1987 apud NIDA, 2017; ASHTON, 2001; HUESTIS et al., 2007).

O THC atua em receptores específicos do sistema nervoso central, denominados CB1 e CB2. CB1 está amplamente presente em regiões do cérebro as quais tem atuação na cognição, memória, sistema de recompensa, percepção da dor e controle de coordenação motora (ASHTON, 2001; HALL; DEGENHARDT, 2009).

Como efeitos psíquicos são destacados euforia, estado de relaxamento e bem-estar, com alterações sensoriais e percepção espacial (NIDA, 2017).

Após administração oral de dronabinol, um medicamento à base de THC sintetizado, foram observados efeitos após 30 minutos a 1 hora, com pico de duração de 2 a 4 horas. A duração do efeito psicoativo foi de 4 a 6 horas, mas o efeito de alteração do apetite continuou até 24 após a administração da dose (DAILYMED, 2017).

2.5 Técnica de microextração em fase líquida, usando fibra oca de polipropileno (HF-LPME)

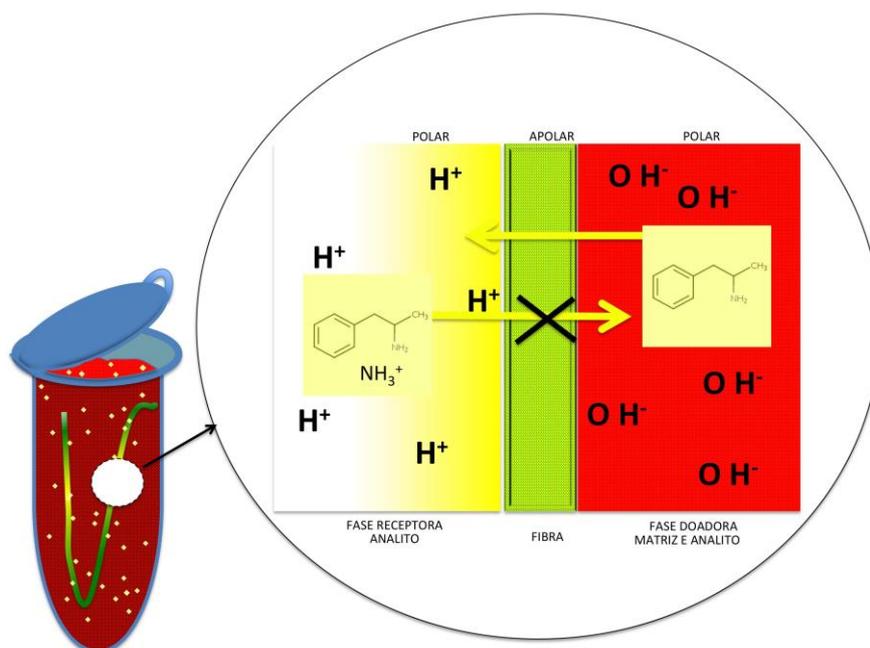
As técnicas de microextração em fase líquida foram desenvolvidas com base nos princípios da técnica de extração líquido-líquido (LLE), ou seja, elas também obedecem à lei de partição - ou lei de distribuição - que prevê o comportamento de solutos frente a solventes polares e apolares. De acordo com essa lei, quando colocado um soluto em uma mistura que contenha apenas solventes polar e apolar, esse soluto se distribui entre os solventes presentes de forma que, quanto mais apolar esse soluto, maior a tendência de ele ficar distribuído na fração do solvente apolar. Por sua vez, quanto mais polar, maior a tendência de ele ficar distribuído na fração do solvente polar (VOGEL, 1981; FLANAGAN et al., 2007). Sendo assim, e considerando que é possível alterar o equilíbrio das concentrações das formas ionizada e não ionizada de uma substância por intermédio da modificação do pH do meio, é possível manipular as condições de ensaio para favorecer o deslocamento de um analito do meio polar de uma matriz biológica como o sangue para um solvente apolar, o qual seria colocado propositalmente no sistema para

receber o analito pouco ionizado, retirando-o da matriz (NELSON; COX, 2005; MAHAN; MYERS, 2003; MARZZOCO; TORRES, 2007).

Das variantes hoje existentes da técnica de microextração, uma das mais relevante pela praticidade e eficiência da extração de analitos de uma matriz tem sido a HF-LPME - *Hollow-fiber liquid-phase microextraction* em sistema trifásico. Esse sistema consiste na extração de analitos não anfóteros, quando uma matriz de característica polar como urina ou sangue tem suas condições manipuladas de forma a tornar o analito desejado pouco ionizado em solução (solução doadora). Em seguida, essa solução recebe uma fina fibra porosa, oca, de polipropileno com 600 μ m de diâmetro interno e 200 μ m de espessura de parede, com poros de 0,2 μ m de diâmetro (Membrana®), a qual foi previamente mergulhada em um solvente apolar para o preenchimento de seus poros. Depois de ter o excesso de solvente retirado, o lume da fibra é preenchido com uma solução aquosa (solução receptora), manipulada de forma a tornarem ionizados os analitos que estiverem em seu meio. Após algum tempo de contato sob agitação é esperado que o analito desejado (pouco ionizado) migre para o solvente orgânico apolar e deste passe para a solução receptora onde, ionizado, ficará retido, preso nesse meio polar, não fazendo o caminho inverso. Colhido e secado o solvente polar, obtém-se o analito separado da matriz (RASMUSSEN; BJERGAARD, 2004; BJERGAARD; RASMUSSEN, 2007; OLIVEIRA et al., 2008; XIONG et al., 2010). A figura 6 ilustra o processo gráfico desse sistema aplicado para anfetaminas.

Importante lembrar que, para analitos pouco ionizáveis, existe a possibilidade de aplicar a técnicas de HF-LPME pelo sistema bifásico. Esse sistema tem a mesma concepção do sistema trifásico, porém a solução receptora é composta apenas pelo solvente da fase apolar, o qual é utilizado para preenche totalmente o lume da fibra. (BJERGAARD; RASMUSSEN, 2007; VIEIRA JUNIOR et al., 2012).

Figura 6 - Sistema trifásico usado na extração de anfetaminas (HF-LPME)



Fonte: Adaptado de Gjelstad (2011).

2.5.1 Otimização do processo de microextração

Para se obter um resultado satisfatório de extração quando da aplicação da técnica de HF – LPME, ou seja, para se alcançar a maior quantidade possível extraída de um analito por intermédio dessa técnica, é necessário que as variáveis sensíveis ao processo sejam estudadas e testadas empiricamente para cada matriz e seu respectivo analito de interesse. Ao final, a metodologia de extração resultante é tida como otimizada. De acordo com Oliveira et al. (2008), as variáveis que mais comumente afetam um ensaio de HF-LPME trifásico são: propriedades química e físico química do solvente orgânico utilizado; pH da fase doadora; pH da fase receptora; tempo de agitação; temperatura de agitação; velocidade de agitação e efeito *salting-out*.

2.6 Validação de metodologias

Ao se estabelecer uma metodologia de ensaio é necessário testá-la por intermédio de um conjunto de procedimentos investigativos, dentro de uma faixa de concentração de interesse, a fim de aprova-la sob a luz de critérios padronizados, estabelecidos pela comunidade científica. A aplicação sistemática de protocolos de ensaio preestabelecidos, associada a aprovação de resultados por intermédio de critérios também preestabelecidos é conhecida como validação de metodologia. Diversas entidades importantes para o meio científico possuem seus próprios protocolos, os quais guardam muitas semelhanças entre si. As diferenças básicas entre eles estão no tipo e conteúdo metodológico, os quais foram adequados pelas entidades para atender as necessidades específicas dos nichos nos quais são aplicados (ALMEIDA et al., 2002; ANVISA, 2008; PETERS et al., 2007; UNODC, 2009; WADA, 2012; SWGTOX, 2013).

Para o UNODC (2009), o limite de detecção (LOD) de analitos em amostras biológicas é a menor concentração que pode ser detectada e identificada com um certo grau de certeza, sendo esse valor dado como estimativa a partir do triplo da razão entre o desvio-padrão do limite baixo de quantificação do estudo da linearidade, e a inclinação da regressão linear observada nesse estudo. Quanto ao limite baixo de quantificação (LLOQ), a entidade se limita a dizer que ele é desejável, mas não obrigatório.

Um processo L dependente de uma dada variável x_i é dito linear se obedece à aditividade e homogeneidade: $L(x_i + x_j) = L(x_i) + L(x_j)$ e $L(\lambda \cdot x_i) = \lambda \cdot L(x_i)$, sendo λ uma constante. Assim, uma metodologia é dita linear se os resultados das análises são proporcionais à quantidade do analito na matriz, dentro de um intervalo de concentração especificado. Para o UNODC (2009), a linearidade é verificada por intermédio de 6 replicatas em 5 concentrações diferentes, sendo que a mais baixa seria o limite de quantificação. Ela considera linear quando há uma relação direta entre a resposta e a concentração do analito, dentro de uma faixa de interesse. Valores inconsistentes devem ser retirados, após cada valor ser testado pelo teste de valor extremo - Grubbs. Apesar de aceito como linear um coeficiente de determinação - $R^2 \geq (0,99)$, declaram que esse critério não é suficiente para explicar sozinho a existência da linearidade. Por isso, recomendam ensaios adicionais. Dentre os adicionais possíveis, um método de larga aplicação científica é o teste de homocedasticidade. Nele, a razão das variâncias dos grupos de concentrações mais baixas e mais altas do estudo de linearidade é comparado

com um valor de F teórico para saber se esses grupos diferem, no que diz respeito a similaridade de dispersão de seus dados em relação a suas médias. Caso a hipótese de similaridade seja rejeitada, várias equações de regressão linear dos mínimos quadrados ponderados podem ser propostas e comparadas, escolhendo-se um de menor erro para ajuste da função de primeiro grau que melhor representa o comportamento de um composto testado pela metodologia proposta (ALMEIDA, 2002).

A precisão de um método é a medida da proximidade dos resultados de múltiplos ensaios de uma mesma amostra homogênea. Para o UNODC (2009), a precisão é tida por ensaios de:

- Repetibilidade que pode ser descrita sucintamente como a proximidade dos resultados dos ensaios realizados por um mesmo analista, mesmo laboratório, mesmo instrumento, os quais foram conduzidos em um curto período de tempo entre eles;
- Reprodutibilidade que pode ser descrita sucintamente como a proximidade dos ensaios realizados por diferentes analistas, diferentes laboratórios, outros instrumentos, podendo haver um período grande de tempo entre cada ensaio.

O nível de aceitação é de um coeficiente de variação (CV) máximo de 20%, para concentrações baixas e 15% para concentrações mais altas. Também são previstos valores de CV ainda maiores para análises de tecidos oriundos de autópsia, quando o efeito matriz pode interferir muito com os resultados. Porque esses ensaios de repetibilidade e reprodutibilidade indicados pelo UNODC estão sujeitos a existência de outros equipamentos e de outros laboratórios e pessoas disponíveis para realiza-los, algumas opções viáveis, de forte fundamento científico foram desenvolvidas. Uma dessas opção é o ensaio de precisão do grupo de trabalho científico para toxicologia forense (SWGTOX) que prevê a condução dos ensaios de repetibilidade intradia (mesmo dia) e interdía (em dias diferentes) para três concentrações definidas como baixa, média e alta, sendo a baixa (dada como 3 vezes a concentração estipulada para o limite de quantificação), a alta (dada como 75% da concentração mais alta, utilizada para a curva do ensaio de linearidade) e a média (dada como a média aritmética entre o ponto baixo e alto). O resultado é dado em CV para um mínimo de 3 replicatas de cada concentração, realizados em 5 corridas distintas, dando um total de 45 corridas. O CV aceitável para a SWGTOX é idêntico ao

da UNODC, ou seja, até 20%, para concentrações baixas e 15% para concentrações mais altas de imprecisão (SWGTOX, 2013).

A exatidão (acurácia) de um método é tida como a medida do afastamento dos resultados de ensaios em relação a concentração nominal, tida como verdadeira. A UNODC (2009) considera importante o ensaio da exatidão por intermédio de materiais de referência certificados. Porém, leva em consideração a falta desses materiais para drogas de abuso. Estabelece, então, que o ensaio deva ser realizado por 3 dias utilizando 3 replicatas de matrizes adicionadas com três diferentes concentrações, chamadas de baixa, média e alta, as quais se baseiam nos resultados do ensaio de linearidade, mas que são diferentes dos pontos usados, tanto para o estudo de linearidade quanto para o de precisão. Eles definem um coeficiente de variação máximo de $\pm 20\%$, para concentrações baixas e $\pm 15\%$ para concentrações mais altas.

Uma alternativa aos protocolos da UNODC seria os da SWGTOX (2013) que prevê a condução dos ensaios em três concentrações diferentes, definidas como baixa, média e alta (CBe, CMe e CAe). O resultado é dado em coeficiente de variação para um mínimo de 3 replicatas de cada concentração, realizados em 5 corridas distintas, resultando um total de 45 corridas. Eles definem um CV máximo de $\pm 20\%$ calculado a partir do valor nominal. Portanto, é necessário construir, simultaneamente ao ensaio, uma curva de calibração, cuja equação ajustada pelo modelo de regressão linear ponderada estabelecido no estudo da linearidade permitirá definir a concentração de cada triplicada, obtida em cada uma das 5 corridas, para depois compará-las aos valores nominais dessas concentrações.

Recuperação é a medida da eficiência dos procedimentos de extração. De acordo com o guia UNODC (2009), ela é feita em 5 replicatas, em três concentrações, quais sejam baixa, média e alta (CBr, CMr e CAr), respectivamente. A diferença deve ser reprodutível em $\pm 15\%$.

Seletividade é a capacidade de um método detectar ou quantificar um analito ou grupo deles presentes em uma mistura complexa, sem que haja interferência de outro analito diferente, presente nessa mistura. A possibilidade de um método detectar ou quantificar um analito específico frente a uma mistura complexa é chamado de especificidade do método sendo, portanto como o máximo de sua capacidade de ser seletivo. O ensaio é realizado por intermédio de 10 amostras, cada uma coletada da matriz

de sangue total de distintos doadores, utilizando comparativo de amostras sem adição de analito, mas com adição de padrão interno na concentração do LLOQ). Também é necessária a comparação de amostras sem adição de analito, mas com adicionados de outras substâncias que poderiam atuar como interferentes no processo de detecção do analito, utilizando concentrações próximas ao limite superior da curva de calibração. O critério de aceitação é a ausência de sinal (igual ou acima do LOD) no tempo de retenção do analito durante a corrida cromatográfica, medido por intermédio de seu íon quantificador no modo monitoramento de íons selecionado - SIM (UNODC, 2009).

Carryover é a observação de sinal em amostras sem analito ou padrão interno – PI, no tempo de saída do analito, as quais foram medidas imediatamente após a passagem de uma amostra com adicionado do analito em alta concentração, geralmente igual ao limite superior da curva de calibração. O critério de aceitação é que o sinal das medições, utilizando o seu íon quantificador no modo monitoramento de íons selecionado – SIM, não ultrapasse 10% do valor do LLOQ (SWGTOX, 2013).

3. JUSTIFICATIVA

Assim como ocorre em outras partes do mundo, o Brasil possui uma parcela de sua sociedade consumidora de algum tipo de droga de abuso, algumas delas proibidas para comercialização e uso no território brasileiro. Porém há algum tempo já se debate, de forma multidisciplinar no país, a descriminalização e até a legalização do uso social de algumas dessas drogas, debate esse que foi se intensificando à medida em que ele também crescia em diversos outros países da comunidade europeia e americana. Entre os resultados já alcançados, os quais poderiam incentivar a aprovação do uso recreacional de novas drogas de abuso no Brasil, há de se destacar a decisão da França por ter criado de forma inédita em Paris um espaço voltado para o uso das mais diversas substâncias psicoativas, onde profissionais de saúde trabalham permanentemente com o intuito de proporcionar condições seguras das pessoas durante o consumo de substância psicoativas. Também destaque pode ser dado a decisão de alguns estados norte-americanos que liberaram o uso social *indoor* da cannabis, uma vez que aquele país sempre exerceu um papel de destaque no combate mundial às drogas de abuso. Não menos importante foi a decisão do Uruguai pela legalização da produção e comercialização da cannabis, tornando-se ele um potencial exportador de derivados desse tipo de produto para o mundo. Sobre fármacos, considerando o risco de serem comercializadas de forma ilícita para o uso abusivo, não medicinal, a de se destacar a comercialização no Brasil de anorexígenos com princípio ativo à base de anfetaminas e a existência de produção de derivados da cannabis em laboratórios americanos, como alguns produzidos nos Estados Unidos, os quais já possuem registros provadas no *US Food and Drug Administration* - FDA. Em suma, parece haver uma tendência mundial de se reduzir as restrições de acesso as drogas de abuso, deixando-as mais disponíveis às populações, permitindo maior liberdade para as decisões relativas ao consumo. E o Brasil pode avançar ao encontro dessa tendência. Contudo, esse consumo, legal ou não, implica em riscos, os quais não se restringem à saúde dos usuários. De fato, estudos epidemiológicos oriundos de entidades internacionais apontam que drogas de abuso estão associadas a diversos problemas de cunho social como acidentes e atos violentos. Estudos realizados por entidades governamentais e não governamentais no Brasil também concluem que drogas de abuso se constituem em fontes de risco para a sociedade, fato que implica na necessidade de um

mapeamento desses riscos para que se possa analisa-los e gerenciá-los de maneira adequada, visando a proteção da população brasileira usuária ou não de drogas de abuso.

Dentre os estudos necessários para esse fim, a presente tese se torna essencial, uma vez que a proposta permitirá não apenas mapear, mas, também, averiguar com critérios científicos algumas particularidades regionais sobre o envolvimento das drogas de abuso em acidentes e atos violentos no estado de São Paulo. Além disso, propôs a validação de novas metodologias de extração de analitos, as quais respeitam o conjunto de valores da sociedade contemporânea que anseia, constantemente, por atividades laborais mais sustentáveis, sobretudo no que tange à proteção de pessoa e do meio ambiente. Por fim, as metodologias propostas nessa tese poderão ser úteis para fins forenses, bem como para ampliação de estudos similares a serem elaborados em outras regiões brasileiras, até que se alcance um mapeamento nacional.

4. OBJETIVOS

Desenvolver, validar e aplicar métodos de microextração em fase líquida que utiliza fibras ocas de polipropileno para a detecção e quantificação de anfetamina, cocaína e THC em matriz de sangue total de vivos e, também, de *post mortem* oriundas de amostragem aleatória de casos de investigação forense sob responsabilidade da Superintendência da Polícia Técnica-Científica de São Paulo (SPTC/SP).

4.1 Objetivos específicos

- Desenvolver métodos de microextração em fase líquida que utiliza fibra oca de polipropileno que possam separar anfetamina, cocaína e THC de sangue;
- Desenvolver métodos de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa com os quais se possam identificar e quantificar as substâncias extraídas;
- Validar os métodos propostos por intermédio de protocolos desenvolvidos e utilizados pela comunidade científica internacional;
- Aplicar os métodos desenvolvidos e validados em amostras de sangue oriundas de pessoas vivas e de *post mortem*. Todas com permissão de conselho oficial de ética.
- Fazer inferências sobre a detecção e quantificação das drogas de abuso que foram identificadas no sangue de vivos e de *post mortem*, associando os achados com as características da amostragem como idade, sexo e tipo de acidente.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Materiais

5.1.1 Equipamentos

Para os estudos de anfetamina e cocaína foi utilizado um cromatógrafo em fase gasosa modelo 6850 acoplado a espectrômetro de massas do tipo quadrupolo 5975, série MSD, ambos da Agilent Technologies, equipado com coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (Hewlett Packard) com as seguintes dimensões: 30m x 0,25mm x 0,10 μ m.

Para os estudos de THC foi utilizado um cromatógrafo em fase gasosa modelo 6850, acoplado a espectrômetro de massas do tipo quadrupolo 5975C, ambos da Agilent Technologies, equipado com coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (Hewlett Packard) com as seguintes dimensões: 30m x 0,25mm x 0,25 μ m.

As pipetas utilizadas foram calibradas por empresas acreditadas pela RBC (Rede Brasileira de Calibração).

Fibra oca de polipropileno modelo Q3/2 Accurel® KM, com 600 μ m de diâmetro interno, 200 μ m de espessura de parede, tendo 70% de poros de tamanho 0,2 μ m, obtida da Wuppertal, DE.

5.1.2 Reagentes, soluções e padrões

Para as extrações e posteriores medições foram utilizados: acetato de etila (C₄H₈O₂) P.A; acetonitrila (C₂H₃N) P.A; álcool metílico (CH₄O) P.A; ATFA - anidrido trifluoracético C₄O₃F₆ P.A (ATFA); diexil éter - (CH₃(CH₂)₅O(CH₂)₅CH₃) P.A; e N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA).

Os padrões internos de anfetamina, anfetamina D5 (com deutério na cadeira lateral), cocaína, cocaína D3, THC e THC D3 foram obtidos de representantes da Cerilliant

Corporation no Brasil. Porque certificados, todos os padrões possuem laudos de qualidade com incertezas de análise e grau de pureza. As soluções de trabalho foram feitas a partir de diluições dos padrões com seus respectivos solventes, quais sejam, metanol e acetonitrila.

5.1.3 Amostras das matrizes de sangue

Para o desenvolvimento e validação dos métodos analíticos, amostras de sangue total foram doadas pelo serviço de hemoterapia do banco de sangue do Hospital Sírio Libanês. Tais amostras foram testadas para HBsAG, anti-Hbc, HBV-DNA (NAT), anti-HCV, HCV-RNA (NAT), HIV RNA (NAT), antiHIV1/2, antiHTLV-I/II, Sífilis e doença de Chagas, sendo negativa para todos os testes.

Para a aplicação do método desenvolvido foram utilizadas 48 amostras de sangue total de pessoas vivas e 21 amostras de sangue *post mortem*, ambas matrizes provenientes de indivíduos envolvidos em acidentes ou atos violentos, cujo sangue foi coletado pela polícia técnica-científica de São Paulo para investigações forenses legais (**Tabela 1**).

O uso do sangue proveniente da Superintendência da Polícia Técnico-Científica de São Paulo - SPPTC/SP foi aprovado pelo Comitê de Ética em Trabalhos Periciais da Secretaria de Segurança Pública do Estado de São Paulo e pelo Comitê de Ética em pesquisa da USP, Número do Parecer: 1.744.746 (**Anexo2**) (**Anexo3**).

Todas as amostras de sangue de vivos e post mortem utilizadas nesse estudo foram estocadas sob a presença dos anticoagulantes fluoreto de sódio e congeladas em freezer à temperatura de -18 °C.

Tabela 1 – Dados recebidos da SPTC/SP, relativos as 69 amostras de sangue de estudo forense investigados nesse trabalho.

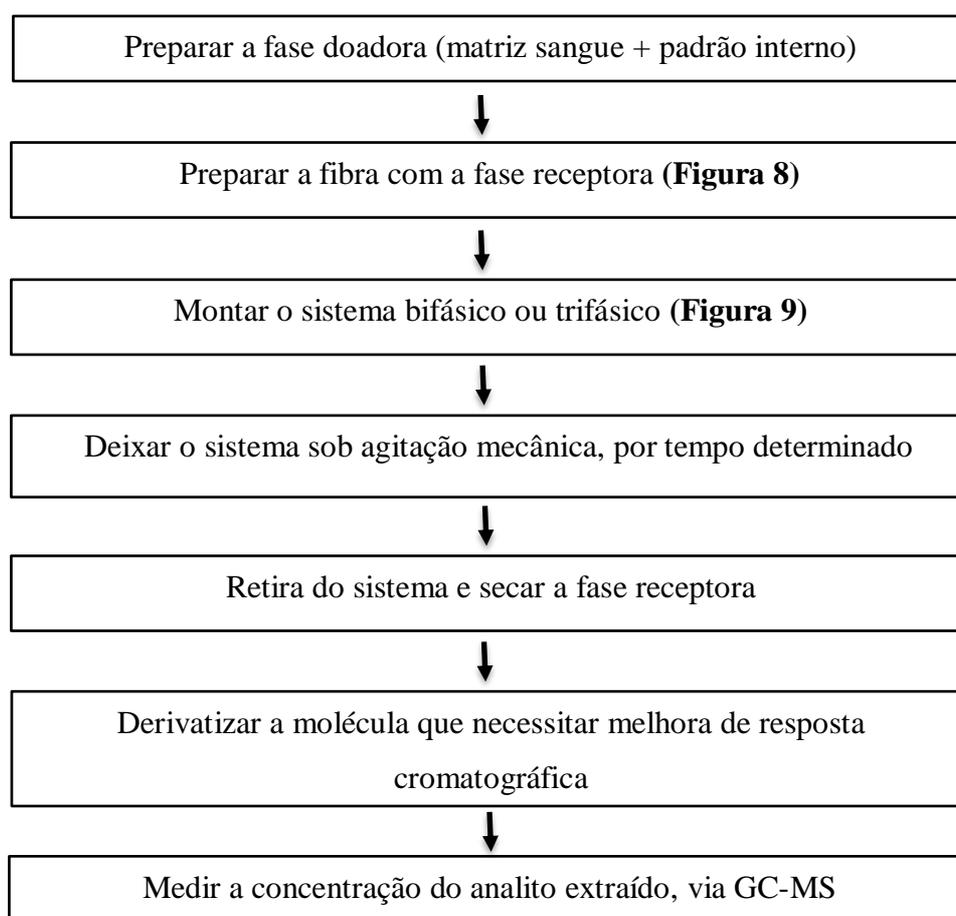
Nº	ANO	V/M	SEXO	IDADE	RAÇA	OCORRÊNCIA
1.	2015	Morto	M	45	branca	ac trânsito
2.	2015	Morto	M	49	branca	ac trânsito, capotamento
3.	2015	Morto	M			ac trânsito
4.	2015	Morto	M	38	branca	ac trânsito, capotamento caminhão
5.	2015	Morto	F	43	branca	ac trânsito, carrox caminhão
6.	2015	Morto	M	43	parda	ac trânsito, carrox caminhão
7.	2015	Morto	F	21	branca	ac trânsito, carrox caminhão
8.	2015	Morto	F	33	branca	ac trânsito, carrox caminhão
9.	2015	Morto	M	38	branca	ac trânsito, carroxcarroxbarranco
10.	2015	Morto	F	46	branca	ac trânsito, carroxárvore
11.	2015	Morto	M	18	branca	ac trânsito, atropelado por carro e caminhão
12.	2015	Morto	F	50	branca	ac trânsito, carroxcarreta
13.	2015	Morto	M	52	branca	ac trânsito, carretaxbicicleta
14.	2015	Morto	M	50	parda	atropelado por carro
15.	2015	Morto	M	41	branca	ac trânsito
16.	2015	Morto	M			hom. Af
17.	2015	Morto	M	53		suic. Af
18.	2015	Morto	M	17		ac aéreo, ultraleve
19.	2015	Morto	M	32		ac trânsito, motoxcaixa de contenção
20.	2017	Vivo	F	20		ac trânsito
21.	2017	Vivo	M	53	branca	ac trânsito, carroxcaçamba
22.	2017	Vivo	M	19	branca	embriagues
23.	2017	Vivo	M	28	branca	embriagues
24.	2017	Vivo	M	33	branca	ac trânsito
25.	2017	Vivo	M	54	branca	ac trânsito, carroxmoto
26.	2017	Vivo	M	29		embriagues
27.	2017	Vivo	M	26	branca	embriagues
28.	2017	Vivo	M	44	branca	embriagues
29.	2017	Vivo	M	25	branca	ac trânsito, carroxcarro estacionado
30.	2017	Vivo	M	31	parda	embriagues
31.	2017	Vivo	M			embriagues
32.	2017	Vivo	M			embriagues
33.	2017	Vivo	M			embriagues
34.	2017	Vivo	M	64	branca	embriagues
35.	2017	Vivo	F	28		embriagues

36.	2017	Vivo	M	29		embriagues
37.	2017	Vivo	M	41		embriagues
38.	2017	Vivo	M	55		embriagues
39.	2017	Vivo	M	19		embriagues
40.	2017	Morto	M	36		ac trânsito, passageiro preso ferragens
41.	2017	Vivo	M	41	branca	ac trânsito, carrocarro estacionado
42.	2017	Vivo	M	60		ac trânsito, carrocarro estacionado
43.	2017	Vivo	M	21	branca	ac trânsito, moto caiu
44.	2017	Vivo	M	44	parda	ac trânsito, carroxmoto
45.	2017	Vivo	M	34	branca	ac trânsito, carrocarro estacionado
46.	2017	Vivo	M	21	branca	embriagues
47.	2017	Vivo	M	48	branca	ac trânsito, carrocerca arame
48.	2017	Vivo	F	50	branca	ac trânsito, carrocarro
49.	2017	Vivo	M	35	parda	ac trânsito, carroônibus
50.	2017	Vivo	F	29		ac trânsito
51.	2017	Vivo	M	23	branca	embriagues
52.	2017	Morto	F	32		ac trânsito
53.	2017	Vivo	M	31	parda	embriagues
54.	2017	Vivo	M	39		embriagues
55.	2017	Vivo	F	22		embriagues
56.	2017	Vivo	M	21		embriagues
57.	2017	Vivo	M	49		embriagues
58.	2017	Vivo	M			embriagues
59.	2017	Vivo	M	29	branca	ac trânsito, motoxcarro
60.	2017	Vivo	M	45	preto	embriagues
61.	2017	Vivo	M	47	branca	ato obsceno
62.	2017	Vivo	M	37	branca	ac trânsito, carrocarro estacionado
63.	2017	Morto	F	21		ac trânsito, suicídio por enforcamento
64.	2017	Morto	M	39		afogamento, usuário drogas
65.	2017	Vivo	M	55	branca	ac trânsito
66.	2017	Vivo	M	25	branca	embriagues
67.	2017	Vivo	M	46	branca	ac trânsito, carrocarro estacionado
68.	2017	Vivo	M	21	parda	embriagues
69.	2017	Vivo	M	21		ac trânsito

5.2 Métodos

Todos os métodos desenvolvidos e validados se basearam na técnica de HF-LPME, que foi descrita por Rasmussen (2004), cujo procedimento geral foi adaptado para os analitos de interesse nessa tese e ilustrado na figura 7.

Figura 7 Etapas da HF-LPME - Procedimento geral



Fonte: Adaptado Rasmussen (2004).

Figura 8 - Preenchimento da fibra de polipropileno com solução receptora

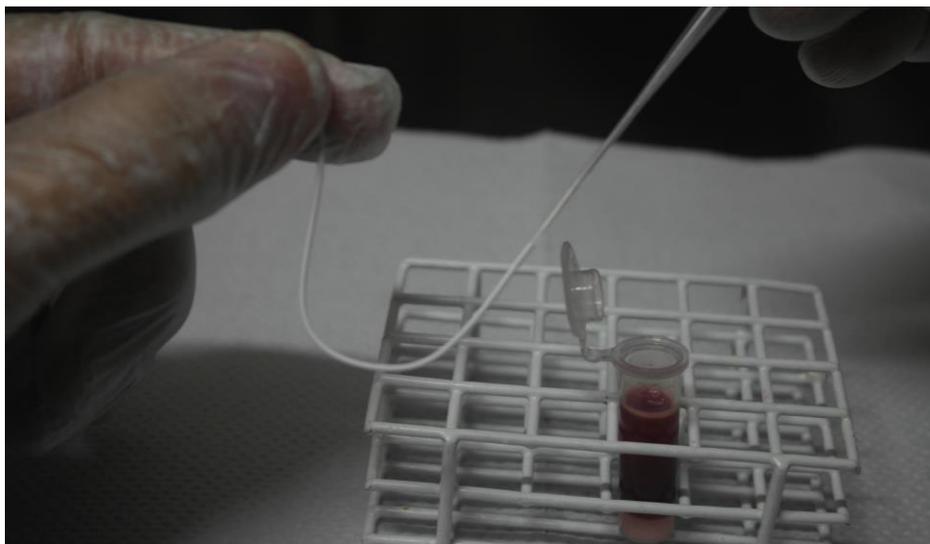
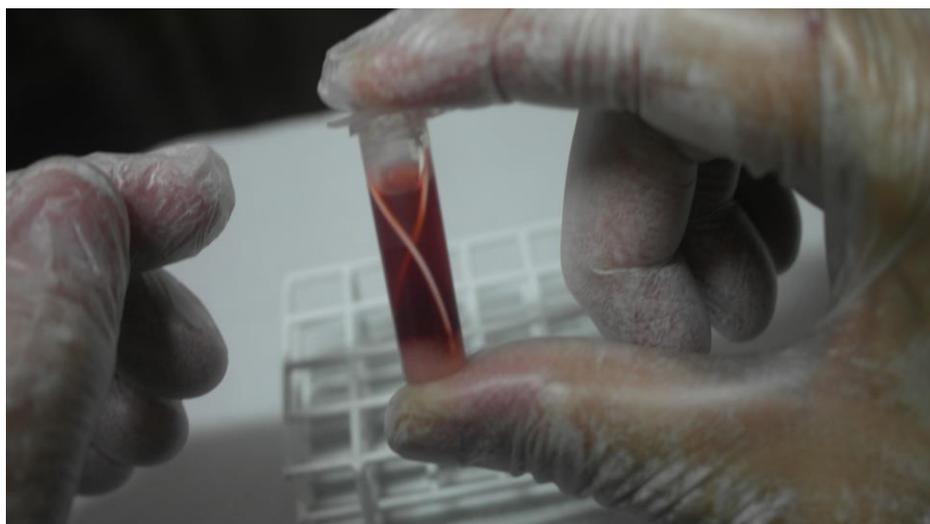


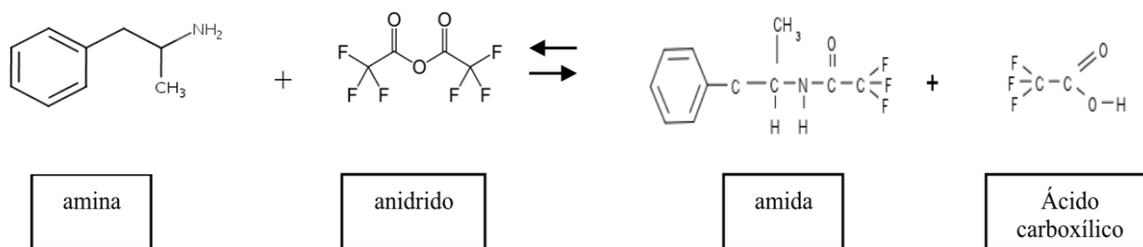
Figura 9 – Montagem e fechamento do sistema trifásico



5.2.1 Método HF-LPME para anfetamina e posterior medição via GC-MS

Foram realizados experimentos iniciais a partir do sistema trifásico, variando a alcalinidade da fase doadora pelo acréscimo de alíquotas de soluções de hidróxido de potássio (KOH), com concentrações na faixa de $0,05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ a $0,0005 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Para a fase receptora, foram utilizadas soluções de ácido clorídrico (HCl), em experimentos variando de $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ a $0,01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. A agitação foi feita por intermédio de agitador mecânico, combinando diferentes velocidades e tempos de agitação, sendo: 1200 RPM, 1800 RPM e 2400 RPM e 15, 30 e 45 minutos. Todos os extratos foram derivatizados com anidrido trifluoracético – ATFA para melhorar a resposta cromatográfica (**Figura 10**) (FURÉSZ et al., 2004; MOFFAT et al., 2011a).

Figura 10 - Reação genérica esperada entre anfetamina e anidrido trifluoracético (ATFA)



Fonte: Adaptado de Jacques et al. (2010) e Sigma-Aldrich (2017)

Ao final, foi estabelecido o seguinte método de extração: Transferir para um tubo de polipropileno de 2 mL uma alíquota da solução padronizada do analito e de seu padrão interno (deuterado), ambos na concentração necessária ao ensaio. Evaporar os solventes orgânicos presentes a temperatura de 40°C , utilizando um concentrador dotado de ventilação forçada de gás nitrogênio. Adicionar ao tubo uma alíquota de $200 \mu\text{L}$ de sangue e uma alíquota de $1000 \mu\text{L}$ de água deionizada recém preparada. Alterar o pH dessa solução com a adição de $15 \mu\text{L}$ de uma solução de hidróxido de potássio (KOH) $5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Juntar $200 \mu\text{g}$ de cloreto de sódio (NaCl) e avolumar a solução (solução doadora) para $1500 \mu\text{L}$, utilizando água desionizada recém preparada. Tampar o tubo e reservar. Submergir

totalmente em dióxido de etila, por 30 segundos, uma fibra de polipropileno de comprimento de 9 cm. Retirar do solvente e preencher o lúmen da fibra com uma solução (solução receptora) de ácido clorídrico (HCl) $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, utilizando uma ponteira para aplicação em eletroforese em gel. Fechar por esmagamento as pontas da fibra de forma que a solução receptora não possa sair do lume dessa fibra durante a etapa de agitação mecânica. Assim que preparada, introduzir a fibra na solução doadora, de forma a deixar suas pontas esmagadas voltadas para o lado de cima. Fechar a tampa do tubo. Agitar mecanicamente o sistema à temperatura ambiente por 30 minutos, a velocidade de 1800 RPM. Abrir o sistema e recuperar a fase receptora da fibra com o auxílio da ponteira para eletroforese em gel, transferindo todo o volume recuperado para um *vial* aquedado ao equipamento GC-MS, o qual será utilizado para as medições. Secar a solução por intermédio de um concentrador, à temperatura de 40°C , utilizando ventilação forçada de gás nitrogênio. Adicionar ao extrato seco $50 \mu\text{L}$ de acetato de etila e $50 \mu\text{L}$ de ATFA. Fechar o vial e reforçar o fechamento com parafilme. Aquecer a solução por 30 minutos a temperatura de 70°C . Abrir o sistema e evaporar a solução com o auxílio de um concentrador, a temperatura de 40°C , usando ventilação forçada de gás nitrogênio. Diluir o extrato final com $50 \mu\text{L}$ de acetato de etila.

Para as medições em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa - GC-MS, ajustar o cromatógrafo para o modo de injeção *splitless*, temperatura do *inlet* de 220°C , gás de arraste Hélio com fluxo constante de $0,6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Iniciar a rampa de temperatura a 80°C , subir $25^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ até 140°C ; diminuir a velocidade de aquecimento para $15^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ até 250°C e tornar a subir a velocidade para $20^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ até 275°C . O tempo total de corrida é de 12,9 minutos. Regular a temperatura de interface entre o cromatógrafo e o espectrômetro para 280°C . Ajustar o espectrômetro de massa do tipo ionização quadropolo para 70 eV, com baixa resolução, modo de operação *Selected Ion Monitorin (SIM)* e temperatura da fonte de 220°C .

5.2.2 Método HF-LPME para cocaína e posterior medição via GC-MS

Foram realizados experimentos iniciais a partir do sistema trifásico, variando a alcalinidade da fase doadora pelo acréscimo de alíquotas de soluções de hidróxido de potássio (KOH), com concentrações na faixa de $0,05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ a $0,0005 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Para a fase receptora foram utilizadas soluções de ácido clorídrico (HCl), em experimentos

variando de $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ a $0,005 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. A agitação foi feita por intermédio de agitador mecânico, combinando diferentes velocidades e tempos de agitação, sendo: 1200 RPM, 1800 RPM e 2400 RPM e 15, 30 e 45 minutos (MOFFAT et al., 2011a).

Ao final, foi estabelecido o seguinte método de extração: Transferir para um tubo de polipropileno de 2 mL uma alíquota da solução padronizada do analito e de seu deuterado, ambos na concentração necessária ao ensaio. Evaporar os solventes orgânicos presentes a temperatura de $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$, utilizando um concentrador dotado de ventilação forçada de gás nitrogênio. Adicionar ao tubo de polipropileno uma alíquota de $200 \text{ }\mu\text{L}$ de sangue e uma alíquota de $1000 \text{ }\mu\text{L}$ água deionizada recém preparada. Alterar o pH dessa solução com a adição de $15 \text{ }\mu\text{L}$ de uma solução de hidróxido de potássio (KOH) $0,05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Juntar $200 \text{ }\mu\text{g}$ de cloreto de sódio (NaCl) e avolumar a solução (solução doadora) para $1500 \text{ }\mu\text{L}$, utilizando água deionizada recém preparada. Tampar o tubo de polipropileno e reservar. Submergir totalmente em dióxido de etil, por 30 segundos, uma fibra de polipropileno de comprimento de 9 cm. Retirar do solvente e preencher o lúmen da fibra com uma solução (solução receptora) de ácido clorídrico (HCl) $0,005 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, utilizando uma ponteira de eletroforese. Fechar por esmagamento as pontas da fibra de forma que a solução receptora não possa sair do lume dessa fibra durante a fase a agitação mecânica. Assim que preparada, introduzir a fibra na solução doadora de forma a deixar suas pontas esmagadas voltadas para o lado de cima. Fechar a tampa do tubo de polipropileno. Agitar mecanicamente o sistema à temperatura ambiente por 30 minutos, a velocidade de 1800 RPM. Abrir o sistema e recuperar a fase receptora da fibra com o auxílio de uma ponteira de eletroforese, transferindo todo o volume recuperado para um *vial* aquedado ao equipamento GC-MS, o qual será utilizado para as medições. Secar a solução por intermédio de um concentrador, à temperatura de $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$, utilizando ventilação forçada de gás nitrogênio. Diluir o extrato final com $50 \text{ }\mu\text{L}$ de acetato de etila.

Para as medições em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa - GC-MS, ajustar o cromatógrafo para o modo de injeção *splitless*, temperatura do *inlet* de $250 \text{ }^{\circ}\text{C}$, gás de arraste Hélio com fluxo constante de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Iniciar a rampa de temperatura a $120 \text{ }^{\circ}\text{C}$, subir $25 \text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ até $120 \text{ }^{\circ}\text{C}$; diminuir a velocidade de aquecimento para $15 \text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ até $260 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e depois para $10 \text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ até $290 \text{ }^{\circ}\text{C}$. O tempo total de corrida é de 14,3 minutos. Regular a temperatura de interface entre o cromatógrafo e o espectrômetro para $290 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Ajustar o espectrômetro de massa do tipo ionização quadropolo

para 70 eV, com baixa resolução, modo de operação *Selected Ion Monitorin (SIM)* e temperatura da fonte de 220 °C.

5.2.3 Método HF-LPME para THC e posterior medição via GC-MS

Os experimentos iniciais foram realizados pelos dois sistemas, bifásicos e trifásicos. A solução doadora foi testada com diferentes pH, utilizando ácido acético para ajustes de pH 4 e 6, e hidróxido de potássio para ajuste de pH 8. Esses pHs foram escolhidos com base em trabalhos científicos publicados, com extração de THC em sangue por intermédio da técnica de LLE (SCHWILKE, et al., 2009; CHU; DRUMMER, 2002; ANDREWS; PERTERSON, 2012; MANWELL et al., 2014). Para o preenchimento dos poros da fibra de polietileno foram estudados os solventes decanol, octano, acetato de butila, hexano e éter diexílico. Para a fase receptora, nos sistemas trifásicos foram utilizadas soluções de KOH de 1 mol . L⁻¹ e 0,1 mol . L⁻¹. Foi utilizado agitador mecânicos de velocidade de 1200 RPM, 1800 RPM e 2400 RPM, todos por 30 minutos. Também utilizado o ultrassom como alternativa para a agitação. Experimentos foram programados para transcorrer tanto com ou sem derivatização com BSTFA. Os ensaios correram em paralelo como amostras sem analito ou padrão interno – PI e amostras sem analito, acrescidas de PI (**Quadro 1**) (MOFFAT et al., 2011c).

Quadro 1 – Variantes utilizadas nos ensaios destinados a extração do THC por HF-LPME.

Variante	Fases	Solvente	Solução Doadora (pH)	Solução Receptora solvente apolar	Solução Receptora com KOH (Molar)	Derivatização (*)
1	Duas	Diexil éter	4 e 8	Diexil éter	-	Não
2	Duas	Diexil éter	4, 6 e 8	Diexil éter	-	Sim
3	Duas	Octanol	4,6 e 8	Octanol	-	Não
4	Duas	Decanol (**)	4,6 e 8	Decanol (**)	-	Não
5	Duas	Diexil éter	8	Diexil éter	-	Não

6	Duas	Acetato de butila	8	Acetato de butila	-	Não
7	Duas	Diexil éter	6	Diexil éter	-	Sim
8	Duas	Diexil éter	6	Diexil éter	-	Não
9	Duas	Octanol	6	Octanol	-	Sim
10	Duas	Octanol	6	Octanol	-	Não
11	Duas	Decanol (**)	6	Decanol (**)	-	Sim
12	Duas	Decanol (**)	6	Decanol (**)	-	Não
13	Duas	Acetato de butila(***)	6	Acetato de butila(***)	-	Sim
14	Duas	Acetato de butila(***)	6	Acetato de butila(***)	-	Não
15	Três	Éter diexílico	6	-	0,1	Sim
16	Três	Éter diexílico	6	-	0,1	Não
17	Três	Éter diexílico	8	-	0,1	Não
18	Três	Éter diexílico	6	-	1	Não
19	Três	Octanol	6	-	0,1	Sim
20	Três	Octanol	6	-	0,1	Não
21	Três	Decanol (**)	6	-	0,1	Sim
22	Três	Decanol (**)	6	-	0,1	Não
23	Três	Acetato de butila(***)	6	-	0,1	Sim
24	Três	Acetato de butila(***)	6	-	0,1	Não
25	Três	Hexano(***)	6	-	1	Não

(*) BSTFA N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoracetamida.

- (**) A amostra de decanol levou mais de 30 minutos para secar em concentrador a 60 graus célsius, com ventilação forçada de nitrogênio.
- (***) Acetato de butila e hexano evaporaram durante o ensaio e, por isso, não são indicados para HF-LPME.

5.2.4 Íons pesquisados

Os íons expressos em razão massa/carga (m/z), que foram pesquisados via espectrometro de massa foram estabelecidos com adaptações a partir de dados da literatura, com base nas metodologias existentes de LLE em sangue total e posterior medição via GC-MS, e nos certificados dos padrões analíticos adquiridos. Esses íons estão especificados no Quadro 2 (MOFFAT et al., 2011a; MOFFAT et al., 2011b; MOFFAT et al., 2011c).

Quadro 2 – Íons relativos a cada analito e seu respectivo padrão interno deuterado.

Analito de interesse	Íons pesquisados (m/z)
Anfetamina	118, <u>140</u> , 154
Anfetamina D5 (deutérios na cadeia)	123, <u>144</u> , 158
Cocaína	82, <u>182</u> , 303
Cocaína D3	85, <u>185</u> , 306
THC	231, 271, 299, 314
THC D3	234, 274, 302, 317
THC, derivatizado com BSTFA	303, 371, 386

Obs: Os íons grifados são os íons quantificadores, para serem utilizados nos cálculos de concentração para cada analito. Para THC, esses íons quantificadores foram observados, juntamente com os resultados dos experimentos pré-validação.

5.2.5 Ensaios de validação

Para anfetamina e cocaína, os métodos desenvolvidos foram validados aplicando, avaliando e estabelecendo parâmetros para os limites de quantificação, linearidade, limites de detecção, precisão, recuperação, exatidão, seletividade e *carryover*, nessa ordem (UNODC, 2009; ALMEIDA et al., 2012; SWGTOX, 2013).

5.2.5.1 Limite baixo de quantificação (LLOQ)

Foi determinado por intermédio de análise de conjuntos de 6 réplicas de amostras de sangue, fortificadas de adicionados de analito e seu respectivo padrão interno deuterado, ambos materiais certificados, em concentrações decrescentes, até alcançar um coeficiente de variação das replicatas de, no máximo, 20% (UNODC, 2009).

5.2.5.2 Linearidade

Foi observada em 6 réplicas de adicionados de analito e padrão de referência, em 5 concentrações diferentes. Foram elas, para cocaína 10, 300, 600, 1000 e 1200 ng . mL⁻¹ de sangue total. Para anfetamina, a curva foi iniciada com 5 ng . mL⁻¹ ao invés de 10 ng . mL⁻¹. Dado o pressuposto de linearidade entre leitura e concentração, confirmada pela própria modelagem descrita a seguir, foram determinados a equação da reta (ver abaixo) e coeficiente de determinação R² desta, visando um mínimo de 0,99, ou seja, que a variável independente explique 99% da variação da variável dependente. Foi testada a homocedasticidade dos dados por intermédio do teste F. Para os casos de constatação de heterocedasticidade, foi calculado o modelo de regressão linear ponderada de menor erro (ANVISA, 2008; UNODOC, 2009; ALMEIDA et al, 2012).

Modelo linear:

$$y(x) = a \cdot x + b \quad (1)$$

Sendo:

y: área ponderada média das respostas cromatográficas de cada analito, correspondente a cada concentração nominal, após medições por GC-MS, considerando apenas as respostas relativas ao íon quantificador desse analito e seu padrão deuterado.

x: concentração nominal do analito.

a: $\frac{dy}{dx}$ (inclinação da reta).

b: intercepto com o eixo y.

5.2.5.3 Limite de Detecção (LOD)

Foi determinado por intermédio da análise cromatográfica de 20 amostras de sangue, sem fortificação de adicionados de analito, mas com adicionados de padrão interno deuterado (UNODC, 2009).

5.2.5.4 Precisão intradia e interdia

A precisão do método foi observada em 6 replicatas de adicionados de analito e padrão de referência, em 3 concentrações, por 3 dias consecutivos. As concentrações utilizadas de analito foram: controle baixo (CBp) de 30 ng . mL⁻¹ de sangue total; controle médio (CMp) de 500 ng . mL⁻¹ de sangue total; e controle alto (CAp) de 900 ng . mL⁻¹ de sangue total. Os resultados foram analisados como precisão interdia e precisão intradia. O nível de aceitação foi de CV máximo de 20%, para concentrações baixas e 15% para concentrações mais altas (SWGTOX, 2013).

5.2.5.5 Exatidão

A exatidão do método, ou seja, a possibilidade de o método determinar concentrações compatíveis com valores teóricos esperados em uma amostra de valor conhecido e comprovado, foi observada por intermédio do ensaio 6 réplicas de adicionados de analito e padrão de referência, em 3 concentrações (CBe, CMe e CAe), as quais foram extraídas e medidas em 3 dias consecutivos, com um total de 54 amostras testadas. As concentrações de analito utilizadas para os ensaios foram: controle baixo (CBe) de 50 ng . mL⁻¹ de sangue total; controle médio (CMe) de 400 ng . mL⁻¹ de sangue total; e controle alto (CAe) de 800 ng . mL⁻¹ de sangue total.

Paralelamente às extrações, curvas de 3 pontos foram confeccionadas com 3 replicatas para os pontos 10, 600 e 1200 ng . mL⁻¹ de sangue total, a fim de permitir a comparação da concentração dos analitos extraídos. Os valores da curva foram corrigidos pelo modelo de regressão linear ponderada, que foi estabelecido quando do estudo de linearidade. O nível de aceitação foi de CV máximo de $\pm 20\%$, para concentrações média e alta e $\pm 15\%$ para o de baixa concentração (UNODC, 2009).

5.2.5.6 Recuperação

A recuperação foi observada em conjunto com os ensaios de precisão, aproveitando desses os valores médios das razões das áreas entre analito e seu padrão deuterado em cada ponto, quais sejam alto, médio e baixo. Para permitir as comparações, as concentrações do ensaio de recuperação foram as mesmas do ensaio de precisão, incluindo a concentração utilizada do padrão interno na matriz.

Os valores do ensaio de recuperação foram, portanto, determinados com 6 réplicas de adicionados de padrão de referência deuterado, tendo o analito sido adicionado somente após as extrações. As concentrações utilizadas de analito foram: controle baixo (CBr) de 30 ng . mL⁻¹ de sangue total; controle médio (CMr) de 500 ng . mL⁻¹ de sangue total; e controle alto (CAr) de 900 ng . mL⁻¹ de sangue total. Por fim, os resultados foram calculados, comparando os valores conhecidos do ensaio de precisão, com os valores obtidos no ensaio das amostras recuperadas, os quais representam a concentração de 100% do analito.

5.2.5.7 Seletividade

O ensaio foi realizado por intermédio de 6 amostras, cada uma coletada da matriz de sangue total de distintos doadores que apresentaram traços do analito aquém do limite de detecção, utilizando para comparação duas amostras sem analito, mas com adição de padrão interno na concentração do LLOQ) e uma amostra com adicionados de analito e padrão interno, ambos na concentração do LLOQ. Também foi realizado ensaio com amostras de adicionados de substâncias psicoativas de diversos outros grupos, todas na concentração acima daquela mais alta, utilizada para o ensaio de linearidade. O critério de aceitação foi a ausência de sinal no tempo de saída do analito durante a corrida cromatográfica, medido por intermédio de seu íon quantificador no modo monitoramento de íons selecionado - SIM (UNODC, 2009).

5.2.5.8 Carryover

Foi estudado por intermédio da passagem de uma amostra de adicionado de analito e padrão interno em alta concentração, acima de $1200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, imediatamente seguida pela passagem de três amostras sem analito e padrão interno. O critério de aceitação foi que o sinal das medições, utilizando o seu íon quantificador no modo monitoramento de íons selecionados – SIM, não ultrapasse 10% do valor do LLOQ (SWGTOX, 2013).

5.2.6 Determinação de anfetamina e cocaína em sangue de casos forenses

A metodologia aplicada foi a mesma que a desenvolvida e validada conforme (5.2.5), porém sem adição dos padrões dos analitos, mas com a adição dos padrões de referência deuterados para permitir o estudo por intermédio de áreas relativas, as quais foram estabelecidas entre a quantidade encontrada da substância no sangue em relação ao padrão de referência adicionado a amostra. Todos os ensaios foram realizados em comparativo com curvas de três replicatas de 3 dos pontos, idênticas às que foram utilizadas para o estudo de linearidade de cada substância nos ensaios de validação. Foram elas $5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $600 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ e $1200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ de sangue para anfetamina e $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 600 ng

mL^{-1} e $1200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ de sangue para cocaína. Foram aplicados os respectivos fatores de correção linear ponderado para cada curva, utilizando o modelo de menor erro apresentado durante os ensaios de validação. Além da curva, foram preparadas amostras sem adição de analito, mas com adição de PI e amostras de adicionados na concentração de $3 \text{ ug} \cdot \text{mL}^{-1}$ para a checagem da aplicação do método.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Pré-validação de metodologias

6.1.1 Ensaio para THC

A técnica de HF-LPME não foi aplicável para THC, via sistema trifásico. Considerando que essa técnica se baseia na capacidade de analitos não dissociados migrarem para solventes apolares e considerando que o coeficiente de partição logP do THC é de 6,97, valor bem maior que o próprio solvente apolar escolhido para essa tese (logP do diétil éter de 5,20), diversas tentativas de extração foram realizadas pelo sistema bifásico (SIGMA-ALDRICH, 2015; ECHA, 2017). Contudo, esse sistema também não resultou em extrações do THC detectáveis via GC-MS, considerando seus íons característicos.

Apesar de não apresentarem resultados a partir das extrações, os parâmetros utilizados no GC-MS para a detecção de THC pareceram adequados, tanto para a detecção do analito, quanto para o seu padrão interno deuterado, conforme se observa nas Figuras 11,12, e 13. A concentração utilizada foi de 20 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, a qual, foi escolhida assim concentrada para se certificar que a ausência de sinal no tempo de retenção esperado não fosse causada por baixa concentração do analito.

Importante salientar que não foi possível encontrar na literatura artigos científicos sobre extração de THC em amostras de sangue, utilizando técnica de HF-LPME.

Figura 11 - Cromatograma de uma solução de THC, na concentração de $20 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ de metanol. Método SIM

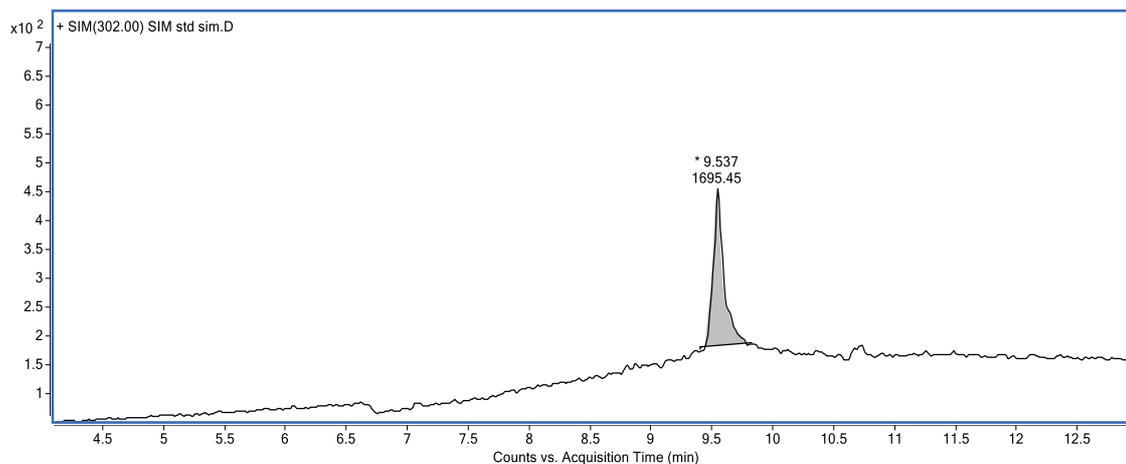
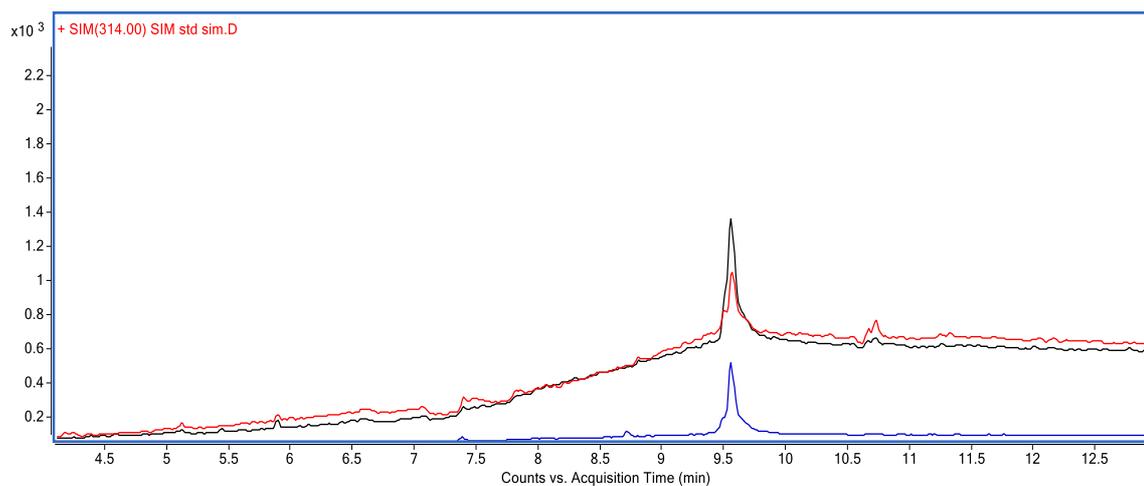
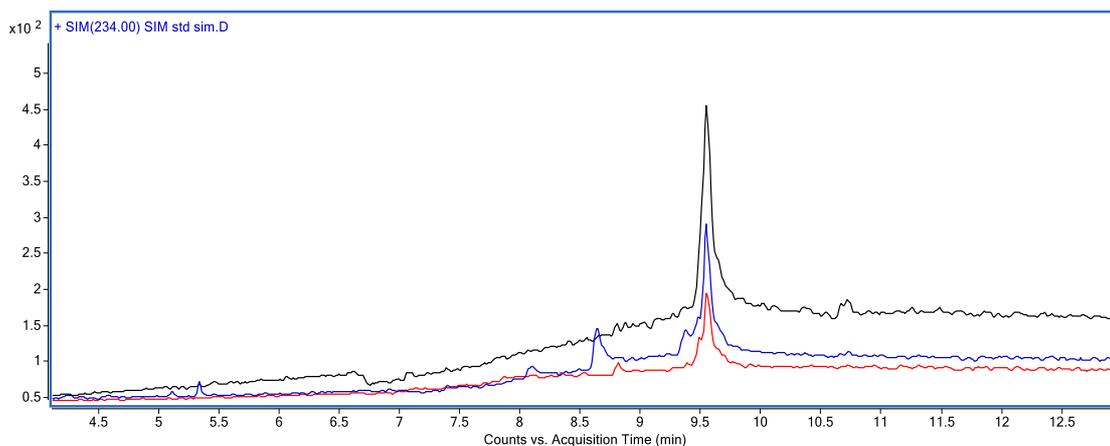


Figura 12 - Cromatograma de uma solução de THC, na concentração de $20 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ de metanol. Três íons característicos, sendo o íon $299 m/z$ o quantificador. Método SIM



Preto: íon $299 m/z$; vermelho: íon $314 m/z$; azul: íon $231 m/z$

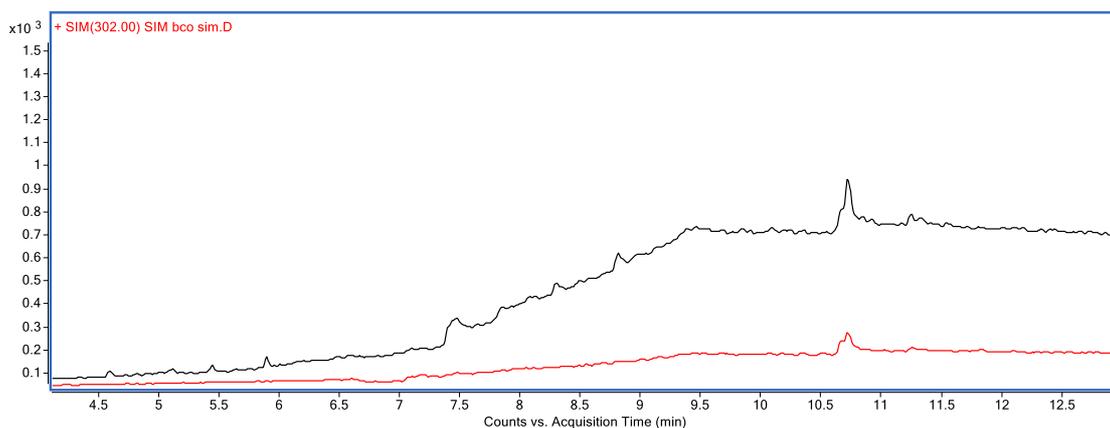
Figura 13 - Cromatograma da análise de uma solução de THC com 3 deutérios, na concentração de $20 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ de metanol. Três íons característicos. Método SIM. Tempo de saída do analito de aproximadamente 9.6 min.



Preto: íon $302 m/z$; azul: íon $234 m/z$; vermelho: íon $274 m/z$

Não houve sinal significativo no tempo de resposta da corrida cromatográfica de extraídos de amostras de sangue que não receberam a adição de THC (**Figura 14**).

Figura 14 - Cromatograma da análise de extração relativo a matriz sangue, sem adição de THC e de seu deuterado, Método SIM

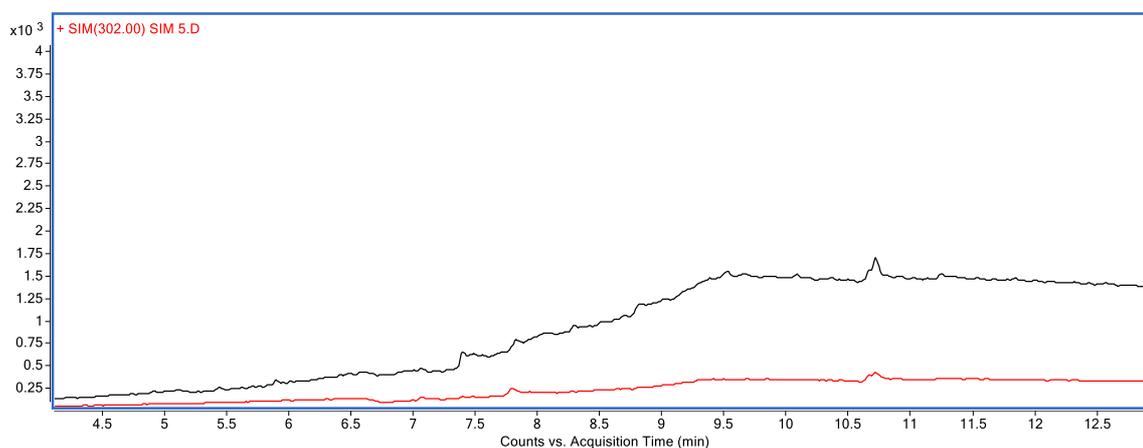


Preto: íon $299 m/z$; Vermelho: íon $302 m/z$. Tempo esperado 9.5 (min.)

O cromatograma apresentado na figura 15 exemplifica o padrão de comportamento de todas as tentativas de extração que foram reportadas no quadro 1.

Observa-se que em nenhuma das variantes estudadas foi possível extrair THC por micro extração em fase líquida HF-LPME.

Figura 15 - Cromatograma representativo das tentativas de extração da matriz de sangue, com adição de THC $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de sangue. Método SIM. Sem detecção no tempo de saída próximo de 9.6 min.



Preto: íon 299 m/z ; Vermelho: íon 302 m/z . Tempo esperado 9.5 (min.)

6.1.2 Solventes utilizados nas HF-LPME

A respeito dos solventes testados nos ensaios de validação, observou-se empiricamente durante os experimentos que o éter diexílico demonstrou características adequadas e desejáveis para a aplicação da técnica de HF-LPME trifásica em anfetamina e cocaína. Isso porque, além ter se mostrado adequado para a migração dos referidos analitos pouco ionizados, esse solvente permaneceu aderido à fibra oca de polipropileno em quantidade satisfatória e por tempo suficiente para permitir as extrações, sem ter havido, inclusive, a necessidade da retirada de excessos de solvente por lavagens manuais, em sonificador ou equipamentos similares. Outro fator importante a ser considerado em favor do uso do éter diexílico foi que ele não impediu ou dificultou o fechamento das pontas das fibras por esmagamento. Esse fechamento é condição para que a fase receptora se mantenha isolada da fase doadora, como determina a técnica de HF-

LPME. O quadro 3 apresenta algumas observações sobre o uso de diversos solventes ao longo dos experimentos desse estudo.

Quadro 3 – Observações empíricas sobre o uso de diferentes solventes para a extração de anfetamina e cocaína via HF-LPME pelo sistema trifásico.

Solvente	Necessidade da retirada de excesso?	Fechamento seguro das pontas da fibra?	Permanência na fibra durante o ensaio?	Houve Extração?
Diexil éter	Não	Adequado	Sim	Sim
Octanol	Sim	Pouco adequado (*)	Sim	Não
Decanol	Sim	Pouco adequado (*)	Sim	Não
Acetato de etila	Não	Adequado	Não	Não
Hexano	Não	Adequado	Não	Não

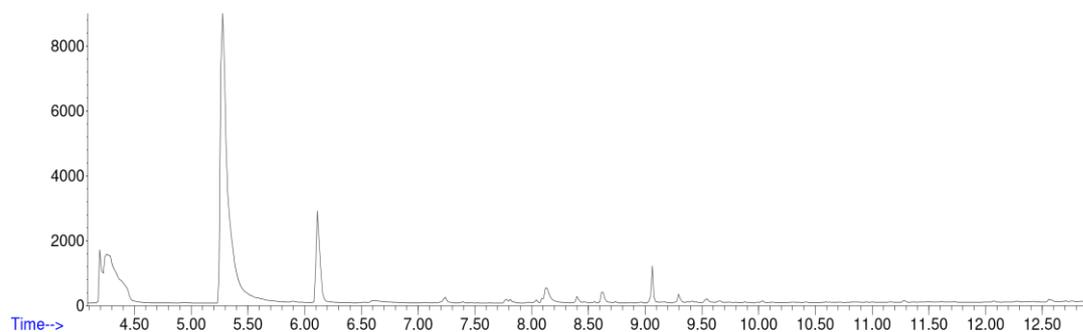
(*) Só possível após a retirada do excesso em água utilizando sonificador.

6.1.3 Cromatogramas e espectros de massa para anfetamina e cocaína

As figuras 16 a 19 ilustraram os cromatogramas e espectros de massa de anfetamina derivatizada e cocaína, respectivamente.

Figura 16 – Cromatograma da anfetamina e de seu padrão interno com 5 deutérios na cadeia, medidos pelos seus íons quantificadores, 140 m/z e 144 m/z , respectivamente

Abundance Ion 140 m/z



Abundance íon 144 m/z

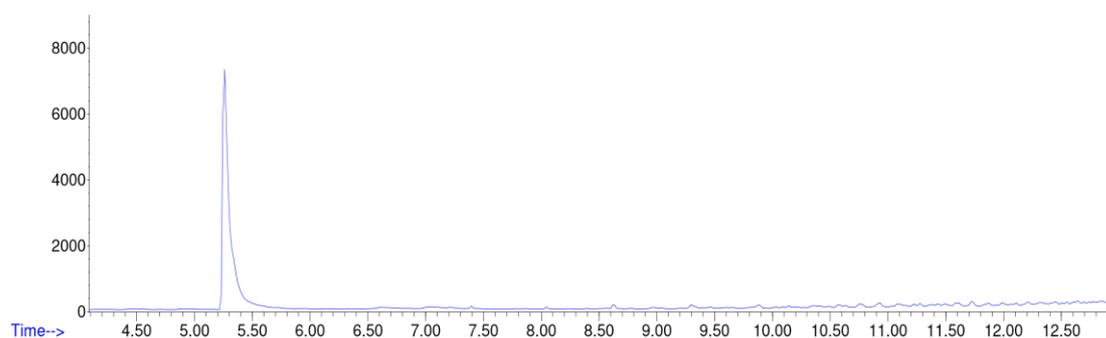


Figura 17 – Espectro de massa da anfetamina derivatizada com anidrido trifluoracético (ATFA)

Abundance

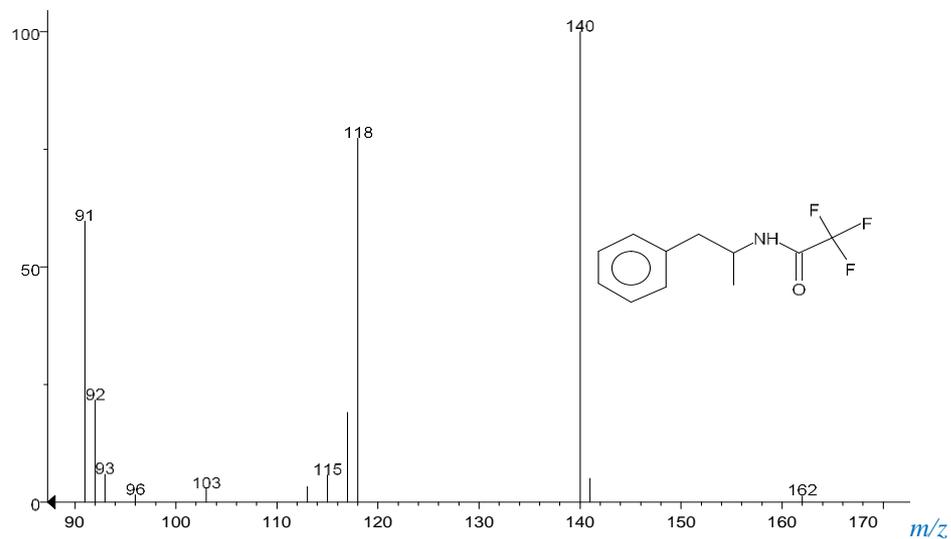
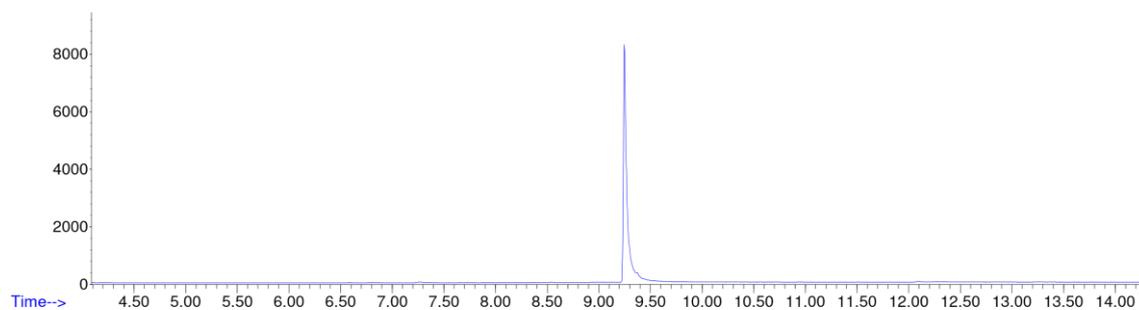


Figura 18 - Cromatograma e espectro de massa da cocaína e de seu padrão interno com 3 deutérios, medidos nos seus íons quantificadores, 182 m/z e 185 m/z , respectivamente

Abundance íon 182 m/z



Abundance íon 185 m/z

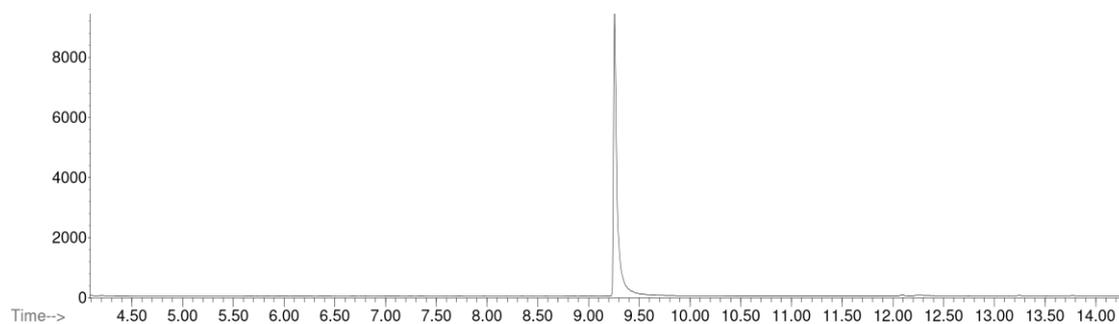
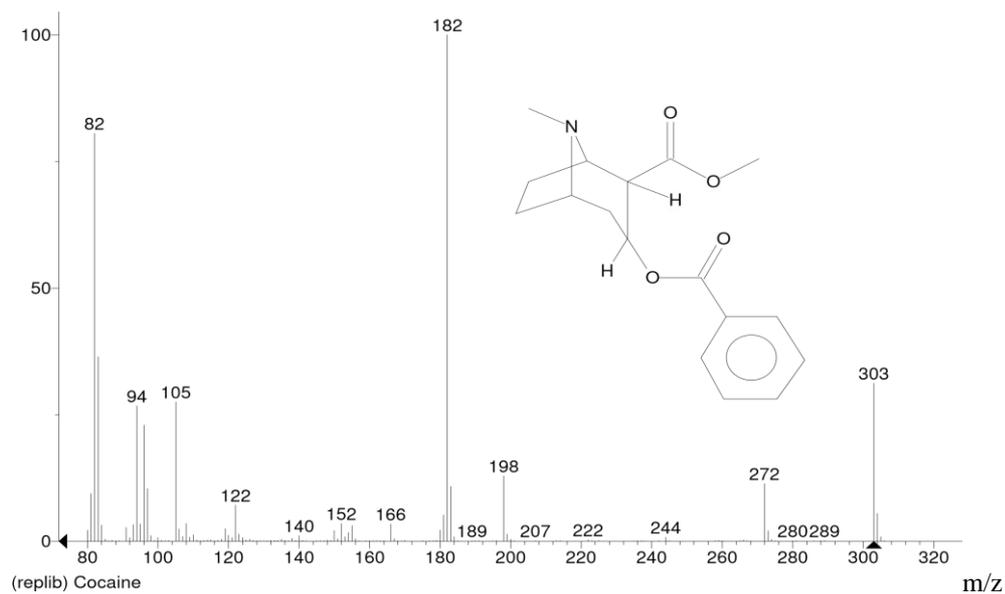


Figura 19 - Espectro de massa da cocaína

Abundance

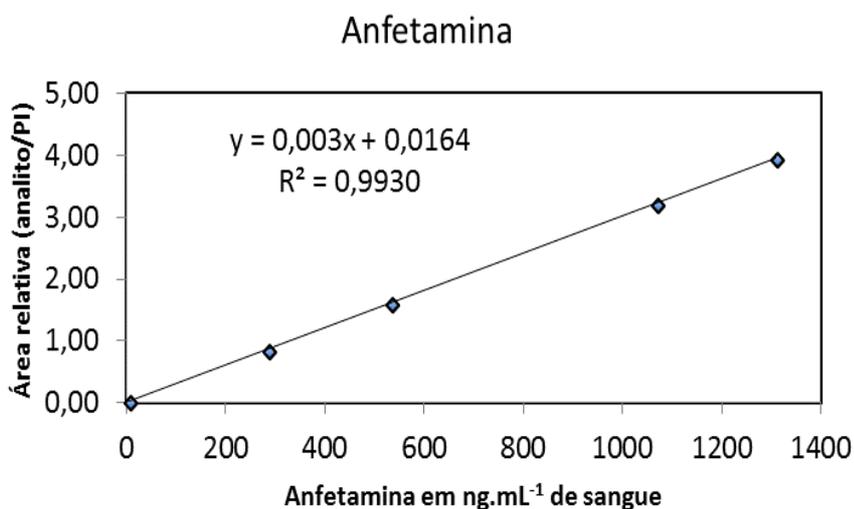


6.2 Resultados da validação do método para anfetamina

Inicialmente, foi estabelecida a menor concentração quantificável de analito, alcançando um resultado de (LLOQ) = 5 ng . mL⁻¹ para um CV de 8,5 %. Na sequência, foi analisado o comportamento da linearidade alcançada pelo método em uma faixa de concentração entre o LLOQ até 1200 ng . mL⁻¹. Como resultado, o coeficiente de determinação (R²) de 0,99 mostrou-se adequado, segundo os critérios de aprovação dos principais guias utilizados para esse estudo (UNODC, 2009; SWGTOX, 2013). Porém, aplicado o teste-F, a comparação das variâncias rejeitou a hipótese de homocedasticidade. Portanto, foram estudados coeficientes de ponderação para corrigir a equação obtida pelo método dos mínimos quadrados comum. Foram eles: 1.x^{-1/2}; 1.x⁻¹; 1.x⁻²; 1.y^{-1/2}; 1.y⁻¹; 1.y⁻². Desses, a regressão linear ponderada de menor somatória de erros foi dada pelo modelo (1.x⁻²) (**Tabela 2**) (**Figura 20**). Esse modelo de ponderação foi adotado para todos os demais ensaios neste estudo. Sobre o limite de detecção (LOD) do analito em sangue total, esse foi calculado por intermédio de medidas de extratos de amostras de sangue sem a adição de anfetamina, corrigidas por padrão interno, comparando os resultados obtidos com uma equação de reta elaborada dentro da faixa de linearidade. Todos os valores utilizados foram ajustados pelo coeficiente de ponderação. O valor do LOD obtido desse modo foi multiplicado por 3 para representar o triplo do sinal ruído. Devido ao comportamento cromatográfico da anfetamina para o GC-MS utilizado nesse estudo, optou-se por segurança dos resultados considerar o limite de detecção igual ao limite baixo de quantificação. Desse modo, esses limites foram compatíveis com os limites reportados em publicações científicas que utilizaram métodos similares (HENSEY; CODY, 1999; HE; KANG, 2006; MARQUET et al., 1997 apud MOFFAT et al, 2011a; NAMERA et al., 2000 apud MOFFAT et al, 2011a; OKGIMA et al., 2011 apud MOFFAT et al, 2011a).

Tabela 2 – Critérios de ponderação estudados para anfetamina

Critério de ponderação	intercepto	inclinação	soma dos residuais (%)
$w_i = 1$	-0,11036	0,003309	774,2780939
$w_i = 1.x^{-1/2}$	0,014096	0,003108	42,5441679
$w_i = 1.x^{-2}$	0,016424	0,003012	31,8921676
$w_i = 1.y^{-1/2}$	-0,00287	0,003165	145,4688333
$w_i = 1.y^{-1}$	0,012155	0,003092	55,6659056
$w_i = 1.y^{-1}$	0,016583	0,002971	32,6495343
$w_i = 1.y^{-2}$	-0,01068	0,003166	193,9534185

Figura 20 – Curva de calibração para anfetamina, já considerado o modelo de regressão linear ponderada de menor somatória de erros

Os valores apresentados dos limites de detecção e quantificação, bem como o coeficiente de determinação e a da equação de reta do ensaio de linearidade após aplicado o coeficiente de ponderação são apresentados na tabela 3.

Tabela 3 – Limite de detecção (LOD), limite baixo de quantificação (LLOQ) e coeficiente de correlação linear para anfetamina, resultantes da aplicação da técnica de HF-LPME em sangue total

Analito	LOD (ng. mL ⁻¹)	LLOQ (ng . mL ⁻¹)	Coeficiente de determinação (R ²)
Anfetamina	5	5	0,99

Os resultados apresentados na tabela 4 são originários do estudo da variância (ANOVA), considerando 3 concentrações, 6 replicatas cada concentração, com extrações realizadas em 3 dias, total de 54 experimentos. Com esses resultados fica demonstrado que o método é preciso dentro da faixa de concentração estudada, uma vez que os CV das replicatas de cada ponto apresentaram valores menores que 20% e 15%, estando compatíveis com os critérios de aprovação, tanto da SWGTOX (2013), quanto do UNODC (2009).

Tabela 4 - Valores do ensaio de precisão do método HF-LPME em sangue total, para anfetamina, expresso em coeficiente de variação

Controles	Precisão intra-ensaio (CV%)	Precisão interensaio (CV%)
CBpa ¹	11,0	4,2
CMpa ²	7,8	3,0
CApa ³	11,2	4,2

Legenda: ¹ Controle baixo (30 ng . mL⁻¹); ² Controle médio (500 ng . mL⁻¹); ³ Controle alto (900 ng . mL⁻¹)

Os resultados apresentados na tabela 5 são as médias das diferenças das concentrações determinadas empiricamente, em relação a concentração teórica de cada ponto. Com esses resultados fica demonstrado que o método é exato dentro da faixa de concentração estudada, uma vez que os CV das replicatas de cada ponto apresentaram

valores menores que 20% e 15%, estando compatíveis com os critérios de aprovação do UNODC (2009).

Tabela 5 - Valores do ensaio de exatidão para anfetamina, resultantes da aplicação da técnica de HF-LPME

Controles	Primeiro dia	Segundo dia	Terceiro dia
	(%)	(%)	(%)
CBea ¹	-3,1	-17,1	-9,9
CMea ²	2,7	-8,1	-7,2
CAea ³	10,7	-7,2	10,9

Legenda: ¹Controle baixo (50 ng . mL⁻¹); ²Controle médio (400 ng . mL⁻¹); ³Controle alto (800 ng . mL⁻¹)

A tabela 6 se refere aos valores de recuperação da anfetamina, por intermédio da técnica de HF-LPME. Uma vez que não há um limite mínimo a se alcançar nesse tipo de ensaio, apesar de a UNODC (2009) relatar que o ideal seria um valor de 100%.

Tabela 6 - Valores médios do ensaio de recuperação do método HF-LPME para a determinação de anfetamina em sangue total

Controles	Recuperação
	(%)
CBra ¹	50,6
CMra ²	59,7
CAra ³	67,8

Legenda: ¹ Controle baixo (30 ng . mL⁻¹); ² Controle médio (500 ng . mL⁻¹); ³ Controle alto (900 ng . mL⁻¹)

Não foram observados picos no tempo de retenção da anfetamina derivatizada com ATFA, em nenhuma das amostras sem adição de analito, mas com adição de PI que foram utilizadas no ensaio de seletividade, ou em amostras contendo soluções de cocaína,

mdma, THC, codeína e metanfetamina, considerando o seu íon quantificador 140 *m/z*. Da mesma forma, não foi observado efeito de *carryover* em nenhuma das amostras testadas.

6.3 Resultados da validação do método para cocaína

Inicialmente, foi estabelecida a menor concentração quantificável de analito, alcançando um resultado de (LLOQ) = 10 ng . mL⁻¹ para um CV de 11,6%. Depois, foi analisado o comportamento da linearidade alcançada pelo método em uma faixa de concentração entre o LLOQ até 1200 ng . mL⁻¹. A escolha limite máximo foi baseada em pesquisa de trabalhos científicos similares, uma vez que não existe indicação de dose terapêutica para cocaína (LOGAN et al., 1997; SHIMURA et al., 2001; GIROUD et al., 2004; JONES; HOLMGREN, 2014). Como resultado, o coeficiente de determinação (R^2) de 0,99 mostrou-se adequado, segundo os critérios de aprovação dos principais guias utilizados para esse estudo (UNODC, 2009; SWGTOX, 2013). Porém, aplicado o teste-F, a comparação das variâncias rejeitou a hipótese da homocedasticidade. Portanto, como no caso anterior, foram estudados coeficientes de ponderação para corrigir a equação obtida pelo método dos mínimos quadrados comum. Foram eles: $1.x^{-1/2}$; $1.x^{-1}$; $1.x^{-2}$; $1.y^{1/2}$; $1.y^{-1}$; $1.y^{-2}$. Desses, a regressão linear ponderada de menor somatória de erros foi dada pelo modelo ($1.x^{-2}$) (**Tabela 7**) (**Figura 21**). Esse modelo de ponderação foi adotado para todos os demais ensaios neste estudo.

Sobre o limite de detecção (LOD) do analito em sangue total, esse foi calculado por intermédio de medidas de extratos de amostras de sangue sem a adição de cocaína, corrigidas por padrão interno, comparando os resultados obtidos com uma equação de reta elaborada dentro da faixa de linearidade. Todos os valores utilizados foram ajustados pelo coeficiente de ponderação. O valor do LOD obtido desse modo foi multiplicado por 3 para representar o triplo do sinal ruído. Devido ao comportamento cromatográfico da cocaína para o GC-MS utilizado nesse estudo, optou-se por segurança dos resultados considerar o limite de detecção igual ao limite baixo de quantificação. Tanto o limite de detecção quanto o limite baixo de quantificação alcançados pelo método foram compatíveis com os limites reportados em publicações científicas que utilizaram métodos

similares (SHIMOMURA et al., 2001; GUNNAR et al., 2004; PERES et al, 2013; PELIÇÃO et al., 2014).

Tabela 7 – Critérios de ponderação dos estudados para cocaína

Critério de ponderação	intercepto	inclinação	soma dos residuais (%)
$w_i = 1$	0,060642	0,003115	139,779153
$w_i = 1.x^{-1/2}$	0,020038	0,003180	13,787713
$w_i = 1.x^{-2}$	0,018537	0,003213	8,219973
$w_i = 1.y^{-1/2}$	0,027280	0,003160	36,251004
$w_i = 1.y^{-1}i-1/2$	0,020734	0,003177	15,977404
$w_i = 1.y^{-1}$	0,018615	0,003208	8,608712
$w_i = 1.y^{-2}$	0,029143	0,003157	41,985252

Os valores apresentados dos limites de detecção e quantificação, bem como o coeficiente de determinação da equação de reta do ensaio de linearidade após aplicado o coeficiente de ponderação ($1.x^{-2}$) são apresentados na tabela 8.

Figura 21 – Curva de calibração para cocaína, já considerado o modelo de regressão linear ponderada de menor somatória de erros

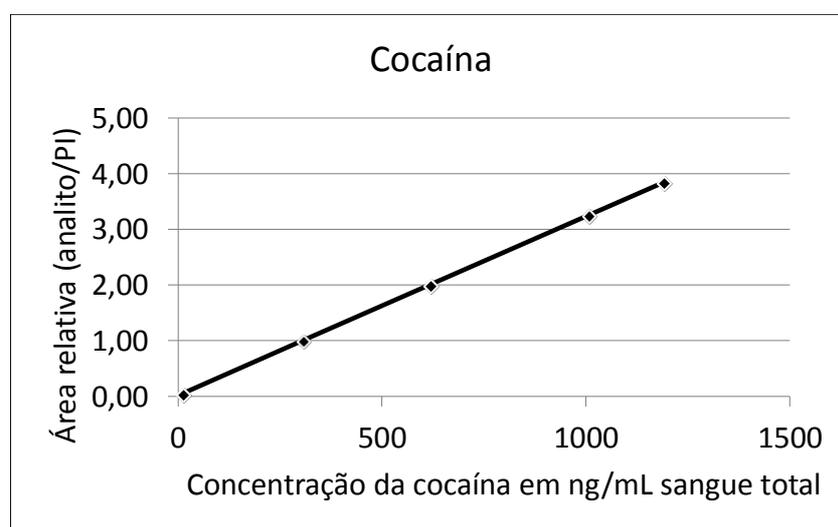


Tabela 8 – Limite de detecção (LOD), limite baixo de quantificação (LLOQ) e coeficiente de correlação linear para cocaína, resultantes da aplicação da técnica de HF-LPME em sangue total

Analito	LOD (ng . mL ⁻¹)	LLOQ (ng . mL ⁻¹)	Coefficiente de determinação (R ²)
Cocaína	5	10	0,99

Os resultados apresentados na tabela 9 por ANOVA, considerando 3 concentrações, 6 replicatas cada concentração, com extrações realizadas em 3 dias, total de 54 experimentos. Com esses resultados fica demonstrado que o método é preciso dentro da faixa de concentração estudada, uma vez que os CV das replicatas de cada ponto apresentaram valores menores que 20% e 15%, estando compatíveis com os critérios de aprovação, tanto da SWGTOX (2013), quanto do UNODC (2009).

Tabela 9 - Valores do ensaio de precisão do método HF-LPME em sangue total, para cocaína, expresso em coeficiente de variação

Controles	Precisão intra-ensaio (CV%)	Precisão interensaio (CV%)
CBpc ¹	9,8	3,7
CMpc ²	4,0	1,5
CApc ³	4,9	1,8

Legenda: ¹ Controle baixo (30 ng . mL⁻¹); ² Controle médio (500 ng . mL⁻¹); ³ Controle alto (900 ng . mL⁻¹)

Os resultados apresentados na tabela 10 representam as médias das diferenças das concentrações determinadas empiricamente, em relação a concentração teórica de cada ponto. Com esses resultados fica demonstrado que o método é exato dentro da faixa de concentração estudada, uma vez que os CV das replicatas de cada ponto apresentaram valores menores que 20% e 15%, estando compatíveis com os critérios de aprovação do UNODC (2009).

Tabela 10 - Valores do ensaio de exatidão para cocaína, resultantes da aplicação da técnica de HF-LPME

Controles	Primeiro dia	Segundo dia	Terceiro dia
	(%)	(%)	(%)
CBec ¹	6,6	-6,9	-3,0
CMec ²	8,9	-4,8	2,5
CAec ³	4,2	-9,1	-0,2

Legenda: ¹Controle baixo (50 ng . mL⁻¹); ²Controle médio (400 ng . mL⁻¹); ³Controle alto (800 ng . mL⁻¹)

A tabela 11 se refere aos valores de recuperação da cocaína, por intermédio da técnica de HF-LPME. Porque não possui um limite mínimo a se alcançar nesse tipo de ensaio, apesar de a UNODC (2009) relatar que o ideal seria um valor de 100%.

Tabela 11 - Valores médios do ensaio de recuperação do método HF-LPME para a determinação de cocaína em sangue total

Controles	Recuperação
	(%)
CBrc ¹	53,9
CMrc ²	50,5
CArc ³	56,6

Legenda: ¹ Controle baixo (30 ng . mL⁻¹); ² Controle médio (500 ng . mL⁻¹); ³ Controle alto (900 ng . mL⁻¹)

Não foram observados picos no tempo de retenção da cocaína em nenhuma das amostras sem adição de analito, mas com adição de PI utilizadas no ensaio de seletividade, ou em amostras contendo soluções de anfetamina, femproporex, mdma, THC, codeína e metanfetamina considerando o seu íon quantificador 182 *m/z*. Da mesma forma, não foi observado efeito de carryover, em nenhuma das amostras testadas.

6.4 Resultados das amostras de sangue recebidas da SPTC/SP

Foram realizados ensaios para determinação de anfetamina e para cocaína em 69 amostras de sangue, sendo 48 provenientes de sangue de vivos e 21 provenientes de sangue *post mortem*. Os ensaios foram realizados de acordo com o método validado nesse estudo.

Todas as amostras testadas tiveram seus resultados de concentração determinados com o auxílio de uma curva padrão, ajustada pelo coeficiente de regressão linear ponderada $1/x^2$, com coeficiente de determinação $R^2 = 0,99$.

6.4.1 Anfetamina

Os ensaios das 69 amostras recebidas da SPTC/SP foram realizados simultaneamente a uma curva de calibração de 3 concentrações, quais sejam $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $600 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ e $1200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$. Tanto as amostras recebidas da SPTC/SP quanto as replicatas da curva foram analisadas com a adição de padrões internos certificados, 5 deutérios na cadeia. Como resultado, não foi possível determinar áreas cromatográficas a qual pudesse ser medida no tempo de saída do analito anfetamina, considerando seu íon quantificador 140 m/z . Portanto, não foi possível detectar anfetamina de forma precisa e exata em nenhuma das amostras recebidas. Uma das causas desse resultado poderia ser explicada por algum tipo de instabilidade da molécula na matriz de sangue. Contudo, Peters et al (2003) realizaram ensaios de estabilidade de anfetaminas em plasma para 3 ciclos de congelamento e descongelamento, temperatura de congelamento de 20°C , por 21 horas e 3 horas de descongelamento em bancada. Como resultado, todos os ensaios foram aprovados, considerando um coeficiente de variação máximo de 10%. Também fizeram ensaio de estabilidade do analito após extraído, realizando injeções em GC-MS com intervalos regulares de 3 horas, durante 30 horas. Como resultado, todos os ensaios apresentaram aceitável estabilidade. DA mesma forma Peters, Leis et al. (2003) não observaram instabilidade nos enantiômeros *R* e *S* de anfetamina após 3 ciclos de congelamento e descongelamento, e em um período de 24 horas do analito já extraído. Em trabalho mais recente, Fernández et al. (2009) realizou ensaios de estabilidade de anfetaminas em sangue total, tanto para 3 ciclos de congelamento e descongelamento

quanto para estabilidade no amostrador automático, não tendo, também, detectado instabilidade em nenhum desses experimentos.

Outra causa para a não detecção poderia ser a falta de seletividade do método proposto. Porém, os resultados dos ensaios de seletividade realizados durante a fase de validação da metodologia foram satisfatórios, não apresentando quaisquer picos no tempo de retenção esperado para anfetamina, os quais pudessem mascarar a presença dessa molécula.

Importante a ser considerado é a incidência de casos positivos para anfetaminas em estudos epidemiológicos recentes. Nesse aspecto, é necessário salientar que a professora Vilma Leyton, docente da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) já observou em suas pesquisas que motoristas de caminhão tem preferido cocaína a anfetamina para manterem-se em alerta durante suas atividades profissionais (LEYTON, 2009). Também importante salientar que o relatório da Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas (SENAD), publicado em 2010 já apontava em suas observações um baixo índice de resultados positivos para compostos anfetamínicos (BRASIL, 2010).

Por fim, também é importante considerar que os medicamentos a base de anfetaminas, os quais haviam sido usados há mais de 30 anos no país foram banidos pela Anvisa em 2011. Contudo, tal proibição foi provisoriamente renogada em 2014, e confirmada em 2017. Sendo assim, parece possível inferir que a diminuição desse medicamento no mercado nesse período poderia ter levado usuários a procurarem outras drogas ilícitas de efeito clínico similar como, por exemplo, a cocaína, para uso abusivo no país.

6.4.2 Cocaína

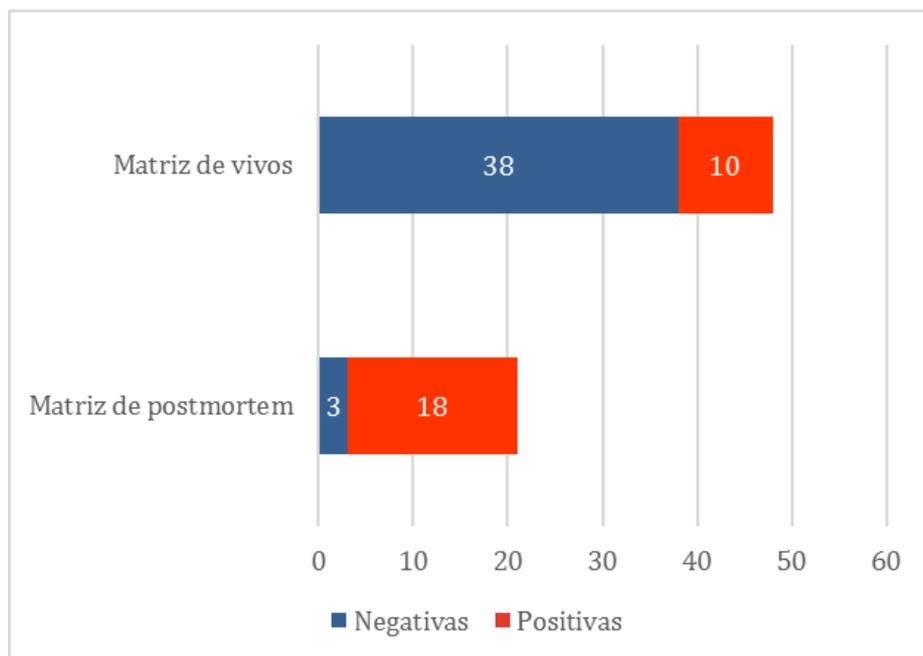
Do total de amostra de sangue testadas, 40% delas apresentaram resultados positivos para cocaína (**Tabela12**). Considerando apenas o grupo de amostras de sangue de vivos, o número de positivos nesse grupo foi de 21%. Já no âmbito do grupo de sangue *post mortem*, o número de casos positivos no grupo foi mais elevado, representando 86% dos casos, apesar do elevado tempo de estocagem. Porque não se tem informações sobre os elementos preponderantes necessários para inferir sobre a causa da diferença de resultados entre os grupos, esse estudo se limitou a considerar o fato de a metodologia ter

vido capaz de determinar a substância cocaína nos dois tipos de matriz, tendo resultados concretos tanto na faixa de concentração do LOD quanto na faixa que vai do LLOQ e além desse (**Figura 22**).

Tabela 11 - Resultado dos ensaios realizados com as amostras da SPTC/SP, considerando apenas os 28 casos positivos de detecção ou quantificação de cocaína

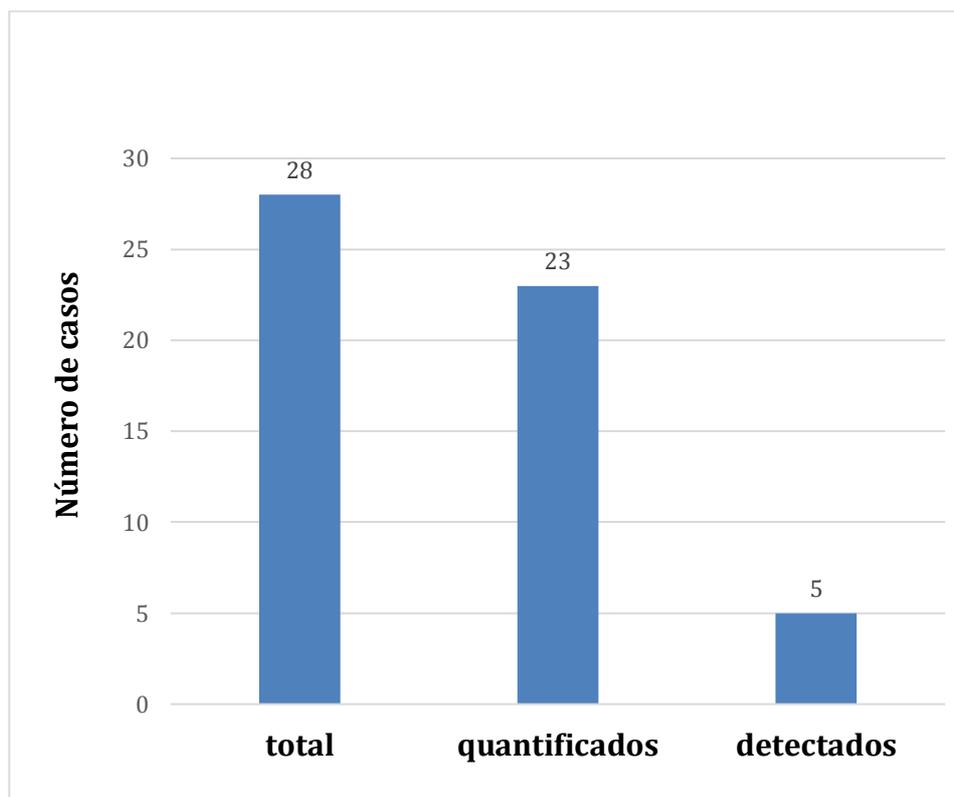
Amostra	Concentração de cocaína em sangue (ng.mL⁻¹)
1	5,26
2	5,71
3	7,43
4	8,50
5	9,11
6	10,38
7	10,50
8	10,65
9	12,47
10	13,04
11	13,85
12	16,18
13	17,42
14	22,63
15	22,79
16	23,80
17	24,32
18	24,47
19	31,38
20	39,61
21	52,62
22	73,02
23	82,04
24	105,21
25	178,83
26	285,95
27	492,22
28	523,51

Figura 22– Número de amostras negativas e positivas para cocaína, segundo o tipo da matriz utilizada



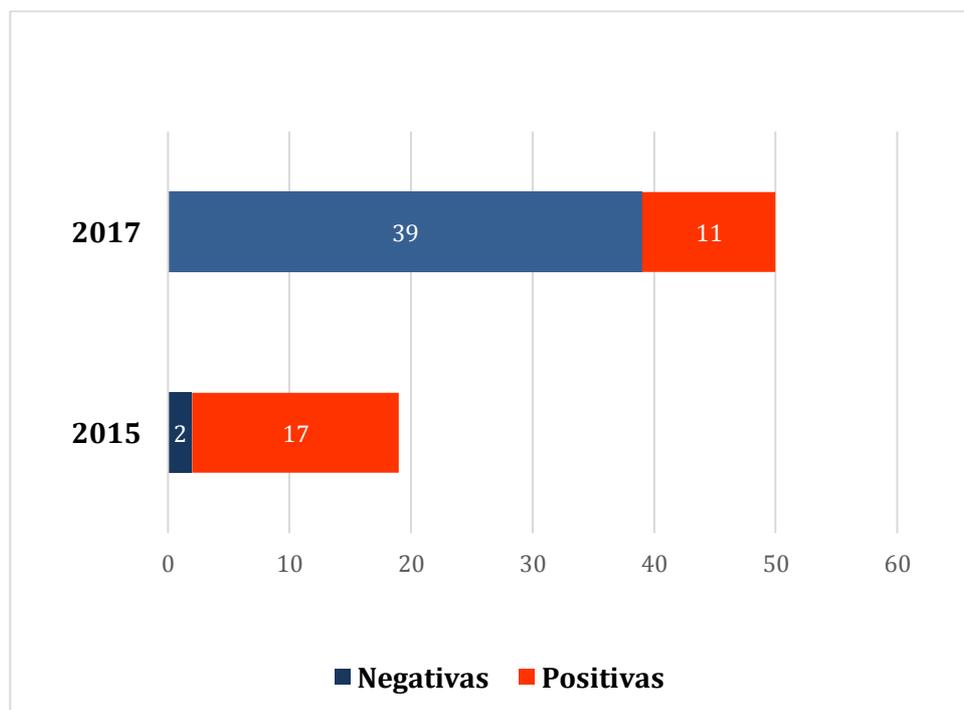
Das amostras positivas para cocaína, 18% delas apresentaram resultados entre o limite de detecção e o limite de quantificação alcançados pelo método. Quanto as demais amostras, 82% delas, seus valores de quantificação variaram do (LLOQ) até $500 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, não tendo sido necessário realizar diluições na matriz. Portanto, o método se mostrou adequado para determinações, tanto para valores de LOD, quanto para a quantificação de valores, os quais estavam dentro da faixa de concentração proposta nesse estudo, qual seja de $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ a $1200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ (**Figura 23**).

Figura 23 – Número total de amostras positivas, segundo sua possibilidade de detecção ou quantificação de cocaína



As amostras de sangue recebidas da SPTC/SP foram coletadas em dois períodos diferentes, quais sejam o primeiro semestre de 2015 e de 2017. Todas as amostras coletadas em 2015 eram de sangue *post mortem*. Todas as amostras foram conservadas com fluoreto de sódio, estocadas sob temperatura de -18°C . Isso, porque a hidrólise espontânea da cocaína formando benzoilecgonina, bem como a biotransformação resultante da colinesterase serica é evitada com a adição de fluoreto de sódio ou outro inibidor das pseudocolinesterases (CLAUWAERT et al., 1997; GOLDSTEIN et al., 2009; REES et al., 2012). Todas as amostras foram abertas e testadas no primeiro semestre de 2017. Assim considerado, parece relevante ressaltar que o tempo de estocagem não foi fator impeditivo para a determinação de cocaína em aproximadamente 90% das amostras de sangue *post mortem* que foram recebidas em 2015 (**Figura 24**). Contudo, não se pode afirmar que não houve perda de concentração durante a estocagem, uma vez que a temperatura usada para congelamento foi superior a indicada por Chen et al. (2017), cujo trabalho não observou tais perdas de cocaína contida em amostras de sangue quando congeladas apenas em temperatura de -70°C .

Figura 24 – Número de amostras positivas e negativas para cocaína, segundo ano de realização da coleta.



Com maior número de casos positivos, 79% do total de positivos, o sexo masculino se sobressaiu na amostragem (**Figura 25**). Essa predominância no grupo parece coincidir com dois trabalhos publicados na Suécia, os quais, reportam prevalência de homens usuários de cocaína em casos de motoristas flagrados no trânsito por uso de drogas, com valores que chegam a patamares acima de 95% (JONES et al., 2007; JONES; HOLMGREN, 2014). Em trabalhos específicos sobre o envolvimento de homens e mulheres como vítimas de acidente de trânsito na cidade de Porto Alegre, Saldanha et al. (2014) também identificaram que o número de homens usuários de álcool e outras drogas ultrapassava o de mulheres, sendo que o envolvimento de mulheres em acidente era mais frequente como passageiras ou pedestres.

Apesar de o grupo de homens ter se sobressaído quando ao número total de casos positivos, é importante considerar que número de casos positivos dentro de cada grupo. Separadamente, essa porcentagem de casos positivos no grupo de homens foi de 38,6%, e no o grupo de mulheres, a porcentagem de positivos foi de 50% dos casos (**Figura 26**).

Figura 25 – Número de amostras positivas para cocaína, segundo divisão por sexo

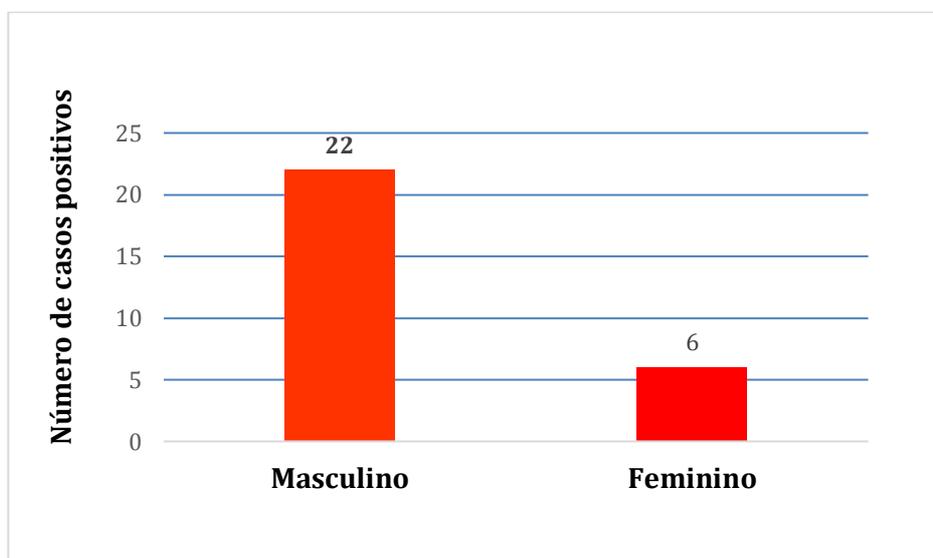
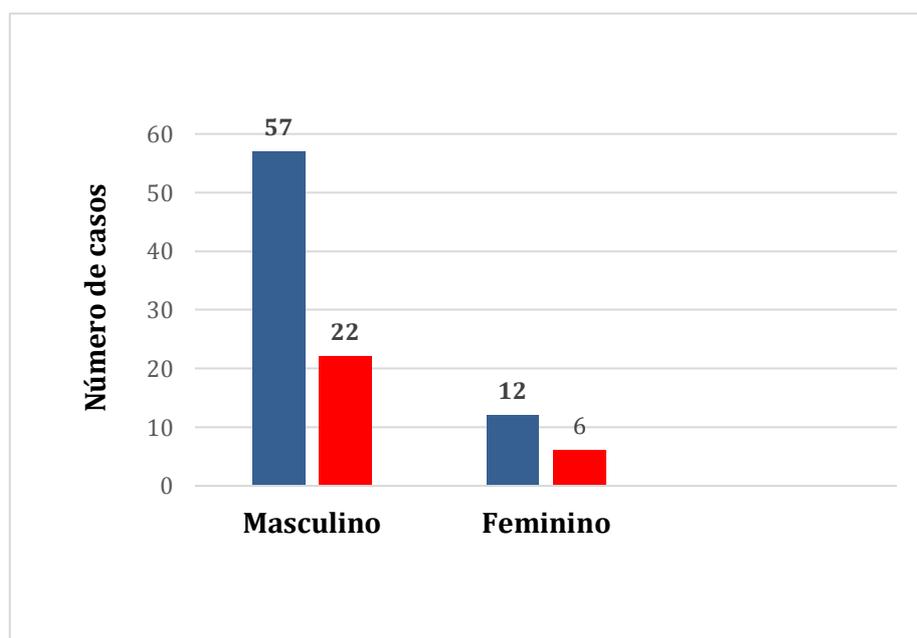


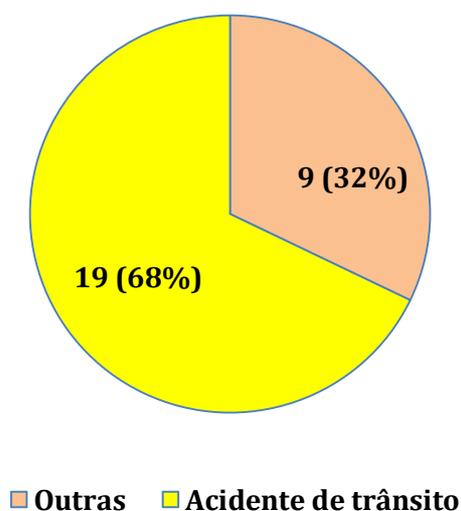
Figura 26 – Número de casos positivos, comparados com o número total de casos apresentados, por sexo.



As 69 amostras recebidas da SPTC/SP tiveram como ocorrência acidentes de trânsito, afogamentos, suicídios, homicídios, acidentes aéreos, embriagues e realização de ato obsceno. Considerando que a vinculação de um tipo de ocorrência com um

resultado positivo poderia implicar, indiretamente na quebra de sigilo de informação, foi decidido dividir as ocorrências em dois grandes grupos, quais sejam os da categoria de acidentes de trânsito e os das demais categorias. A partir dessa classificação é possível observar que os acidentes de trânsito representam o maior número de ocorrência onde se pode detectar a presença de cocaína (**Figura 27**). Essa constatação a partir da amostragem utilizada para o estudo de caso nessa tese parece coincidir com as conclusões de Ponce e Leyton (2008), o quais afirmam haver claros indícios do aumento de risco acidentes de trânsito com o uso abusivo de drogas ilícitas no Brasil, propondo, inclusive, que uma legislação seja estabelecida no país para tratar especificamente deste tema.

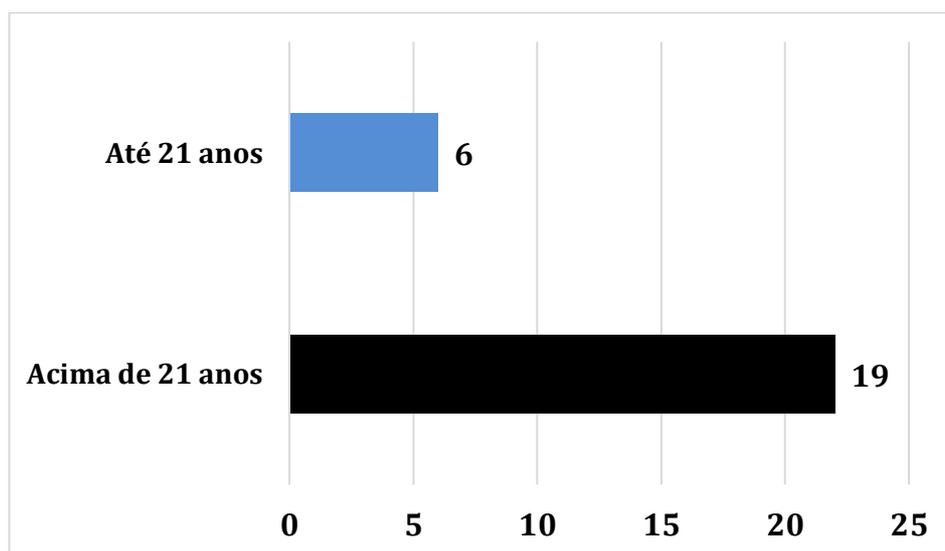
Figura 27 – Porcentagem do número de casos positivos para cocaína, segundo o tipo de ocorrência, conforme classificação dada pela SPTC/SP



A lei ordinária que dispõe sobre o estatuto da criança e do adolescente LEI 8.069/1990 de 13/07/1990, classifica como adolescente todo o jovem de idade até 21 anos, incluindo aqui os casos especiais previstos nessa lei. Sendo assim, esse estudo classificou os casos positivos para cocaína em dois grandes grupos, sendo: - um grupo até 21 anos e outro acima de 21 anos. O resultado dessa classificação é que jovens e adolescentes representaram apenas 21% dos casos positivos, do total de 28 casos detectados, não sendo, portanto, o maior grupo de risco avaliado nesse estudo (**Figura**

28). Essa conclusão parece estar de acordo com dois trabalhos publicados na Suécia, os quais reportam médias de usuários de cocaína apreendidos no trânsito daquele país próximas de 29 anos de idade. Ou seja, de uma população jovem, mas não adolescente. (JONES et al., 2007; JONES; HOLMGREN, 2014)

Figura 28 – Casos positivos para cocaína, segundo faixa etária do doador da amostra



Obs: Do total de casos positivos, 3 amostras não tinham identificação a respeito da idade do doador.

7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que:

- A técnica de HF-LPME apresentar menor risco ocupacional e ambiental porque utiliza ínfimas quantidades de solventes orgânicos.
- Para os parâmetros de ensaio adotados no presente estudo, a técnica de HF-LPME não é aplicável para extrações de THC a partir de sangue total.
- Os métodos desenvolvidos para quantificar anfetamina e cocaína na matriz de sangue foram validados e se mostraram precisos e exatos na faixa de concentração que do LLOQ a 1200 ng/mL^{-1} .
- Os limites de detecção e quantificação de cocaína e anfetamina, os quais foram alcançados pelos métodos desenvolvidos são compatíveis com a literatura científica recente.
- Os estudos sugeriram que a cocaína esteve mais presente que a anfetamina nos episódios de acidentes ocorridos na região de São Paulo durante os anos de 2015 e 2017
- Homens adultos, usuários de cocaína formam grupo de maior risco para acidentes, sobretudo para acidentes de trânsito.

8. REFERÊNCIAS

ALICOT, A. L. P. et al. Mechanisms Underlying Postmortem Redistribution of Drugs: A Review. **Journal of Analytical Toxicology**, v.27, p.533-544, 2003.

ALMEIDA, A. M.; BRANCO, M. M. C.; FALCÃO A.C. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. **Journal of Chromatography B**, v.774, p.215 – 222, 2002.

ANDREWS, R.; PATERSON, S. A validated method for the analysis of cannabinoids in post mortem blood using liquid–liquid extraction and two-dimensional gas chromatography–mass spectrometry. **Forensic Science International**. v.222, p.111–117, 2012.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Esclarecimentos sobre a aplicação da RE nº 899/2003 – Validação de Métodos Bioanalíticos**. Brasília, 2008. 6p. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/RE_899_validacao.pdf>. Acesso em 05.07.2017.

ASHTON, C. H. Pharmacology and effects of cannabis: a brief review. **The British Journal of Psychiatry**, n.178, p.101-106, 2001.

BAKER, J. et al. Acute Cocaine Responses Following Cocaethylene Infusion. **The American Journal of Drug and Alcohol Abuse**, n.32, p.619–625, 2007.

BARNHART, F. E.; FOGACCI, J.R.; REED, D.W. Methamphetamine - A study of postmortem redistribution. **Journal of analytical toxicology**, v.23, p.69-70,1999.

BASELT, R. C.; YOSHIKAWA, D.; CHANG, B. S. J.; LI, J. B. S. Improved Long-Term Stability of Blood Cocaine in Evacuated Collection Tubes. **Journal of Forensic Sciences**, v.38, n.4, p.935-937, 1993.

BENAVIDES, D. C. et al. Road rage among drug dependent patients. **Accident Analysis and Prevention**, v.5, p.848– 853, 2013.

BÉVALOT, F. et al. Vitreous humor analysis for the detection of xenobiotics in forensic toxicology: a review. **Forensic Toxicol**, n.34, p.12-40, 2016

BJERGAARD, P. S.; RASMUSSEN, K. E. Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid–liquid extraction. **Journal of Chromatography A**, v.1184, p.132-142, 2007.

BORTOLOTTI, R. G. et al. Toxicokinetics of Cocaine and Metabolites: The Forensic Toxicological Approach. **Current Medicinal Chemistry**. n.34, v.19, p.5658-5663, 2012

BRAMNESS, J. G. et al. Amphetamine-induced psychosis - a separate diagnostic entity

or primary psychosis triggered in the vulnerable?. **BMC Psychiatry**, [n.p.], 2012. Disponível em: <<https://bmcp psychiatry.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-244X-12-221>>. Acesso em: 24.06.2017

BRASIL – **Constituição da República Federativa do Brasil 1988**. Presidência da República. Casa Civil. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L9503Compilado.htm>. Acesso em 20.07.2017.

BRASIL – Lei 11.705/2008. Altera o código de trânsito brasileiro. **Diário Oficial da União**, Brasília - DF, n.117, 20.06.2008, p.1. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/l11705.htm>. Acesso em 20.07.2017.

BRASIL – Lei 12.760/2012. Altera o código de trânsito brasileiro. **Diário Oficial da União**, Brasília - DF, 05.05.2016, p.1. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2012/lei/l12760.htm>. Acesso em 20.07.2017.

BRASIL – Lei 13.281/2016. Altera o código de trânsito brasileiro. **Diário Oficial da União**, Brasília - DF, n.245, 20.12.2012, p.1. Disponível em: <<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=1&data=05/05/2016>>. Acesso em 20.07.2017.

BRASIL – Lei 9.503/1997. Código de trânsito brasileiro. **Diário Oficial da União**, Brasília - DF, n.184, 23/07/1997, p.21201. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2012/lei/l12760.htm>. Acesso em 20.07.2017.

BRASIL – Lei 13.454/2017. Autoriza a produção, a comercialização e o consumo, sob prescrição médica, dos anorexígenos sibutramina, anfepramona, femproporex e mazindol. **Diário Oficial da União**, Brasília - DF, n.120, 26.06.2017, p.1. Disponível em: <<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=1&data=26/06/2017>>. Acesso em 20.07.2017.

BRASIL – PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA. SECRETARIA NACIONAL DE POLÍTICAS SOBRE DROGAS. **Relatório brasileiro sobre drogas**. Brasília:SENAD, 2009, 364p. BRASIL – PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA. SECRETARIA NACIONAL DE POLÍTICAS SOBRE DROGAS. Acesso em: 20/06/2017.

BRASIL – PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA. SECRETARIA NACIONAL DE POLÍTICAS SOBRE DROGAS. **Uso de bebidas alcoólicas e outras drogas nas rodovias brasileiras e outros estudos**. Brasília:SENAD, 2010a, 121p. Disponível em: <obid.senad.gov.br/obid/dados-informacoes-sobre-drogas/...e.../uso-nas-estradas.pdf>. Acesso em: 23.06.2013

BRASIL – PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA. SECRETARIA NACIONAL DE POLÍTICAS SOBRE DROGAS. **I Levantamento nacional sobre o uso de álcool**,

tabaco e outras drogas entre universitários das 27 capitais brasileiras. 2010b, 284P. Disponível em: <<http://www.grea.org.br/userfiles/GREA-I LevantamentoNacionalUniversitarios.pdf>>. Acesso em: 23.06.2017
 BRASIL – PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA. SECRETARIA NACIONAL DE POLÍTICAS SOBRE DROGAS. OBSERVATÓRIO BRASILEIRO DE INFORMAÇÕES SOBRE DROGAS. **Pesquisa Nacional sobre o Uso de Crack.** 2014. Disponível em: <<http://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/10019/2/UsodeCrack.pdf>>. Acesso em: 23.06.2017.

CAMPORA, P. et al. Quantitation of Cocaine and Its Major Metabolites in Human Saliva Using Gas Chromatography-Positive Chemical Ionization-Mass Spectrometry (GC-PCI-MS). **Journal of Analytical Toxicology**, V. 27, P.270-274, 2003.

CHEN, X. et al. A quantitative LC–MS/MS method for simultaneous determination of cocaine and its metabolites in whole blood. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 134, p.243–251, 2017.

CHIANG, J. S.; HUANG, S. Simultaneous derivatization and extraction of amphetamine and methylenedioxyamphetamine in urine with headspace liquid-phase microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, n.1185, p.19-22, 2008.

CHU, M. H. C.; DRUMMER, O. H. Determination of delta 9 - THC in Whole Blood using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Journal of Analytical Toxicology**, v.26, p.575-581, 2002.

CLAUWAERT, K. M. et al. Liquid Chromatographic Determination of Cocaine, Benzoylecgonine, and Cocaethylene in Whole Blood and Serum Samples with Diode-Array Detection. **Journal of Chromatography**, v.35, p.321-328, 1997.

COLLINS, M. et al. GC-MS-MS confirmation of unusually high Δ^9 -tetrahydrocannabinol levels in two postmortem blood samples. **Journal of Analytical Toxicology**, v.21, p.538-542, 1997.

COOK, D. S. BRAITHWAITE, R.R.; HALE, K. A. Estimating antemortem drug concentrations from postmortem blood samples: the influence of postmortem redistribution. **Journal of Clinical Pathology**, v.53(4), p.282, 2000.

DAILYMED. **Drug Label Information: dronabinol capsule.** US National Library of Medicine, 2010. Disponível em <<http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/lookup.cfm?setid=68b4168b-5782-4e68-a25a-5b4e4408dbce>>. Acesso dia 03.07.2017.

DESROSIERS, N. A. et al. Phase I and II Cannabinoid Disposition in Blood and Plasma of Occasional and Frequent Smokers Following Controlled Smoked Cannabis. **Clinical Chemistry**, v.60, p.631-643, 2014.

DRUMMER, O.H. et al. The involvement of drugs in drivers of motor vehicles killed in Australian road traffic crashes. **Elsevier**, [S.L.], V.36, P.239-248, 2004.

ECHA - EUROPEAN CHEMICALS AGENCY. Dihexyl ether: partition coefficiente Disponível em <<https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/16485/4/8>>. Acesso e 15.07.2017.

ELPHICK, M R.; EGERTOVÁ, M. The Neurobiology and Evolution of Cannabinoid Signalling. **The Royal Society**, London, p.382-404, 2001.

EMCDDA. **Cocaine and crack cocaine: A Growing public health issue**. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 2007. p.19-23.

FAVRETTO, D. et al. High performance liquid chromatography–high resolution mass spectrometry and micropulverized extraction for the quantification of amphetamines, cocaine, opioids, benzodiazepines, antidepressants and hallucinogens in 2.5 mg hair samples. **Journal of chromatography A**, n.1218, p.6583-6593, 2011.

FELGATE, P. D.; DINAN, A. C. The Determination of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol and 11-Nor-9-Carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol in Whole Blood Using Solvent Extraction Combined with Polar Solid-Phase Extraction. **Journal of Analytical Toxicology**, v.24, p.127-132, 2000.

FERNÁNDEZ, M. M. R. High-Throughput Analysis of Amphetamines in Blood and Urine with Online Solid-Phase ExtractionLiquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. **Journal of analytical toxicology**, v.33, p.578-587, 2009.

FLANAGAN, R. J. et al. **Fundamentals of analytical toxicology**. West Sussex. John Wiley & Sons, Ltd. 2007, p.63-67.

FRAVAT, B. et al. Two cases of "cannabis acute psychosis" following the administration of oral cannabis. **BMC Psychiatry**, [n.p.], 2005. Disponível em:< <https://bmcp psychiatry.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-244X-5-17>>. Acesso em 24.06.2017.

FURÉSZ, J. et al. Mass Selective Detection of Amphetamine, Methamphetamine, and Related Compounds in Urine. **Journal of Chromatographic Science**, v.42, p.259-262, 2004.

GIROUD C.A. et al. Delta 9-THC, 11-OH-Delta 9-THC and Delta 9-THCCOOH plasma or serum to whole blood concentrations distribution ratios in blood samples taken from living and dead people. **Forensic Science International**, v.123, p.164 -169, 2001.

GIROUD C.A. et al. Fatal overdose of cocaine Associated with Coingestion of Marijuana, Buprenorphine, and Fluoxetine. Body fluid and tissue distribution of cocaine and its metabolites determined by hydrophilic interaction chromatography – mass spectrometry (HILIC-MS). **Journal of analytical chromatography** v. 28. P.464-474, 2004

GJELSTAD, A. et al. Hollow-Fiber Liquid-Phase Microextraction in the Three-Phase Mode – Practical Considerations. **LCGC North America**, v.29, n.12, p.1038-1045, 2011.

GOLDSTEIN, R., A. et al. Cocaine: History, social implication, and toxicity: a review. **Seminars and Diagnostic Pathology**, v.26, p.10-17, 2009.

GROTENHERMEN, F. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cannabinoids.

Clinical Pharmacokinetics, v.42, p.327-360, 2003.

GUARESCHI N. M. F. et al. Discussões sobre Violência: Trabalhando a Produção de Sentidos. **Psicologia: Reflexões & Críticas**, [s.n.], 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/prc/v19n1/31301.pdf>> Acesso em: 24.06.2017.

GUNNAR T. et al. Validated semiquantitative/quantitative screening of 51 drugs in whole blood as silylated derivatives by gas chromatography-selected ion monitoring mass spectrometry and gas chromatography electron capture detection. **Journal of Chromatography B**, v.806, p.205-219, 2004.

HALL, W.; DEGENHARDT, L. Adverse health effects of non-medical cannabis use. **Lancet**, v.374, p.1383-1391, 2009.

HE, Y.; KANG, Y.J. Single drop liquid-liquid-liquid microextraction of methamphetamine and amphetamine in urine. **Journal of Chromatography A**, n.1133, p.35-40, 2006.

HENSLEY D.; CODY, J. T. Simultaneous Determination of Amphetamine, Methamphetamine, Methylenedioxyamphetamine (MDA), Methylenedioxymethamphetamine (MDMA), and Methylenedioxyethylamphetamine (MDEA) Enantiomers by GC-MS. **Journal of Analytical Toxicology**, Vol.23, p.523, 1999.

HOFFMAN A. F.; LUPICA C. R. Mechanisms of Cannabinoid Inhibition of GABA_A Synaptic Transmission in the Hippocampus. **The Journal of Neuroscience**, p.2470-2479, 2000.

HOROWITZ, J. M.; TORRES, G. Cocaine: effects on brain systems and behavior. **Addiction biology**, n.4, p.127-140, 1999.

HUESTIS, M. A. Human Cannabinoid Pharmacokinetics. **Chem Biodivers**. n.4, p.1770-1804, 2007.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Estimativas populacionais para os municípios brasileiros em 01.07.2012**. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=2204&id_pagina=1>. Acesso em 18.06.2013

ILO – INTERNATIONAL LABOUR OFFICE. **Management of alcohol- and drug-related issues in the workplace**. Geneva: International Labor Office, 1996. 44p. Disponível em: <http://www.ilo.org/wcmsp5/groups/public/---ed_protect/---protrav/---safework/documents/normativeinstrument/wcms_107799.pdf>. Acesso em: 20.06.2017

ILO – INTERNATIONAL LABOUR OFFICE. **Drugs abuse**. Disponível em: <<http://www.ilo.org/Search5/search.do?searchLanguage=en&searchWhat=DRUGS+abuse>>. Acesso em: 11.08.2017

IPCS – INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY. **Amphetamine**. 2017b. Disponível em <[http://www.inchem.org/documents/pims/pharm/pim934.htm#SectionTitle:6.1 Absorption by route of exposure](http://www.inchem.org/documents/pims/pharm/pim934.htm#SectionTitle:6.1Absorption%20by%20route%20of%20exposure)>. Acesso em: 01.06.2017.

IPCS – INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY. **Cocaine**. 2017a. Disponível em

<<http://www.inchem.org/documents/pims/pharm/pim139e.htm#SectionTitle:6.1>
Absorption by route of exposure>. Acesso em: 01.06.2017.

JACQUES, A. L. B. et al. **Estudo de agentes derivatizantes para análise de p-sinefrina em Cromatografia Gasosa**. Salão de Iniciação Científica 22.: 2010 out. 18-22: Porto Alegre, RS. Livro de resumos. Porto Alegre: UFRGS, 2010.

JANCOVA, P.; ANZENBACHER, P.; ANZENBACHEROVA, EVA. Phase II Drug Metabolizing Enzymes. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, v.154, n.2, p.103-116, 2010.

JENKINS, A. J.; CONE, E. J. Drug abuse handbook: Pharmacokinetics: drug absorption, distribution, and elimination. CRC press LLC, 1998. [n.p.]. Disponível em: <https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Pharmacokinetics%3A%20drug%20absorption%2C%20distribution%2C%20and%20elimination&author=A.J.%20Jenkins&author=E.J.%20Cone&pages=151-202&publication_year=1998>. Acesso 14.07.2017.

JONES, A. W.; HOLMGREN, A. Concentrations of Cocaine and Benzoyllecgonine in Femoral Blood from Cocaine-Related Deaths Compared with Venous Blood from Impaired Drivers. **Journal of Analytical Toxicology**, v.38, p.38-46, 2014.

JONES, A. W.; HOLMGREN, A.; KUGELBERG, F. C. Concentrations of cocaine and its major metabolite benzoyllecgonine in blood samples from apprehended drivers in Sweden. **Forensic Science International**, v. 177, p.133–139, 2007.

KARCH, S. B. Drug abuse handbook. Taylor & Francis group, 2006 p.169-171; 181-184; 189

KARSCHNER, E. L. et al. - Do Delta 9 tetrahydrocannabinol concentrations indicate recent use in chronic cannabis users? **NIH - National Institute of Health: Addiction** 2009, v.104, p.2041-2048, 2009.

KRAEMER, T.; MAURER, H. Determination of amphetamine, methamphetamine and amphetamine-derived designer drugs or medications in blood and urine. **Journal of Chromatography, B: Biomedical Sciences and Applications**, v.713, n.1, p.163-187, 1998.

KRAMER, K. E.; ANDREWS, A. R. J. Screening method for 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in urine using hollow fiber membrane solvent microextraction with in-tube derivatization. **Journal of Chromatography B**, v.760. p.27-36, 2001.

LEIS, H. J. et al. Enantioselective trace analysis of amphetamine in human plasma by gas chromatography/negative ion chemical ionization mass spectrometry. **Rapid communications in mass spectrometry**, v.17, p.569-575, 2003.

LEMOES, N. P.; INGLE, E. A. Cannabinoids in Postmortem Toxicology. **Journal of Analytical Toxicology**, v.35, p.394-401, 2011.

LEYTON, V. Cocaína é o novo 'rebite' de caminhoneiros, diz pesquisa. **Último Segundo Brasil**, 11 set. 2009.

LIU, Y.; BUDD, R. D.; GRIESEMER, E. C. Study of the stability of cocaine and benzoylecgonine, its major metabolite in blood samples. **Journal of Chromatograph**, v.48, p.318-320, 1982.

LOGAN, B. K.; SMIRNOW, D.; GULLBERG, R. G. Lack of Predictable Site-Dependent Differences and Time Dependent Changes in Postmortem Concentrations of Cocaine, Benzoylecgonine, and Cocaethylene in Humans. **Journal of Analytical Toxicology**, v.20, p.23-31, 1997.

MAHAN, B. H.; MYERS, R. J. **Química - um curso universitário**, São Paulo: Edgard Blücher, 4ed., 2003. MANWELL, L. A. et al. A vapourized Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) delivery system part I: Development and validation of a pulmonary cannabinoid route of exposure for experimental pharmacology studies in rodents. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v.70, n.1, p.120-127, 2014.

MARZZOCO, A. TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**. 3ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. p.6-57.

MCINTYRE L. M. et al. Antemortem and Postmortem Methamphetamine Blood Concentrations: Three Case Reports. **Journal of Analytical Toxicology**, p.1-4, 2013. MOFFAT, A. C. et al. **Clark's Analysis of Drugs and Poisons: Anfetamine**. 4ed., Farmaceutical press, v.2, 2011a. p. 871-875. MOFFAT, A. C. et al. **Clark's Analysis of Drugs and Poisons: Cocaine**. 4ed., Farmaceutical press, v.2, 2011b. p.1152-1155.

MOFFAT, A. C. et al. **Clark's Analysis of Drugs and Poisons: delta 9- THC**. 4ed., Farmaceutical press, v.2, 2011c. p.2126-2127.

MORRISON, R. T.; BOYD, R. N. **Organic Chemistry: Structure and properties**. 6ed., New Delhi: Hall of India. Private Limited, 2002, p.35.

MTBE – MINISTÉRIO DO TRABALHO E EMPREGO - **Características do Emprego Formal segundo a Relação Anual de Informações Sociais, 2006** Disponível em: http://portal.mte.gov.br/data/files/FF8080812CB90335012CCB1D41F67834/resultado_2006.pdf>. Acesso em 18.06.2013.

NAHAS, G.; LATOUR, C.; TROUVÉ, R. Potentialisation des effets toxiques aigus de la cocaïne par l'alcool éthylique. **Bull Acad Natl Med**, v.176, n.2, p.193-197, 1992.

NELSON, D. L.; COX, M. M. LEHNINGER. **Principals of Biochemistry**. 4ed., **W.H. Freeman**, 2005, p.81

NIDA – NATIONAL INSTITUTE ON DRUG ABUSE. Pharmacology Effects and Treatment of Abuse. **In: Research Monograph Series 79: Structure-Activity Relationships of the Cannabinoids**, 1987. p. 173-188. Disponível em: <<https://archives.drugabuse.gov/pdf/monographs/download79.html>>. Acesso em 10.07.2017.

ØIESTAD, E. L. et al., A. Drug Screening of Whole Blood by Ultra-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Analytical Toxicology**, v.35, 2011.

OLIVEIRA, A. R. M. et al. Microextração em fase líquida (LPME): fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Química Nova**, v. 31, n.3, p.637-644, 2008.

PANTALEÃO, L.N; **Análise toxicológica de anfetaminas e benzodiazepínicos em amostras de cabelo por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas**. 2012. 150p. Dissertação para obtenção do grau de mestre – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

PELIÇÃO, F. S. et al. A One-Step Extraction Procedure for the Screening of Cocaine, Amphetamines and Cannabinoids in Postmortem Blood Samples. **Journal of Analytical Toxicology**. v.38, p.341–348, 2014.

PERES, M. D et al. Simultaneous Quantification of Cocaine, Amphetamines, Opiates and Cannabinoids in Vitreous Humor. **Journal of Analytical Toxicology**. v.38, p. 39–45, 2013.

PETERS, F. T. et al. Screening for and validated quantification of amphetamines and of amphetamine- and piperazine-derived designer drugs in human blood plasma by gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of mass spectrometry**, v.38, p.659-676, 2003.

PETERS, F. T.; DRUMMER, O. H., MUSSHOFF, F. Validation of new methods. **Forensic Science International**. v.165, p.216-224, 2007.

PONCE J. C.; LEYTON V. Drogas ilícitas e trânsito: problema pouco discutido no Brasil. **Revista de psiquiatria clínica**, São Paulo, n.35, supl1, p. 65-69, 2008.

POPA, D. S. et al. Determination of cocaine and benzoylecgonine in human plasma by lc-ms/ms. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.57, n.3, p.301, 2009.

RASMUSSEN, K. E.; BJERGAARD, P. S. Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n.1, p.1-10, 2004.

REES K. A. et al. The effect of sodium fluoride preservative and storage temperature on the stability of cocaine in horse blood, sheep vitreous and deer muscle. **Forensic Science International**, v.217, p.182-188, 2012.

RIDDLE, M.; FLECKENSTEIN, A.; HANSON, G. Role of monoamine transporters in mediating psychostimulant effects. **AAPS Journal**, v.7, n.4 Art.81, 2005, p.e847-e871.

SALDANHA, R. F., et al. Differences between attendance in emergency care of male and female victims of traffic accidents in Porto alegre, Rio Grande do Sul state, Brazil, **Ciênc. Saúde coletiva**, v.19, n.9, p.3925-3929. 2014.

SCHEIDWEILER, K. B. et al. Pharmacokinetics of Cocaine and Metabolites in Human Oral Fluid and Correlation with Plasma Concentrations following Controlled Administration. **NIH-PA. Author Manuscript**. *Ther Drug Monit*, v. 32, n.5, p.628–637, 2010.

SCHWILKE, E. W. et al. Intra- and Intersubject Whole Blood/Plasma Cannabinoid Ratios Determined by 2-Dimensional, Electron Impact GC-MS with Cryofocusing. **Clinical Chemistry**, n.55, v.6, p.1188-1195, 2009.

SHIMOMURA, E.T.; HODGE, G. D.; PAUL, B. D. Examination of postmortem fluids and tissues for the presence of methylecgonidine, ecgonidine, cocaine, and benzoylecgonine using solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. **Clinical Chemistry**, v.47:6, p.1040-1047, 2001.

SIGMA-ALDRICH. **Derivatization Reagents for selective response and detection in complex matrices**. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/migrationresource4/Derivatization%20Rgts%20brochure.pdf>>. Acesso em 04.07.2017.

SIGMA-ALDRICH. **Ficha de informação de produtos químicos – Dihexyl ether**, v. 5.2. 2015. Disponível em <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=112-58-3&interface=CAS%20No.&N=0&mode=partialmax&lang=pt®ion=BR&focus=product>>. Acesso em 04.07.2017.

SILVA JÚNIOR, C.; SASSON, S. **Biologia**. São Paulo: Saraiva, 1998. P. 168.

SILVA, M. I.; CITÓ, M. C.; VASCONCELOS, P. F.; SOUZA, F. C. Cocaine: historial background, neurobiology of addiction and relapse and therapeutic perspective. **Acta Médica Portuguesa**, v.23, p247-258, 2010.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. Phenols and Aryl Halides In: _____ . **Organic Chemistry**, 10ed, John Wiley & Sons, Inc, 2011, cap.18 p.969-972.

SWGTOX - SCIENTIFIC WORKING GROUP FOR FORENSIC TOXICOLOGY. **Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology**. SWGTOX, 2013. 59p. Disponível em: < <http://www.swgtox.org/documents/Validation3.pdf>>. Acesso em 03.07.2017.

TANIGUCHI, C.; GUENGERICH, F.P. Metabolismo dos Fármacos. In: Golan, D.E. **Princípios da farmacologia**. 2ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2009. cap.4, p.48.

TAVARES, G. P.; ALMEIDA, R. M. M. Violência, dependência química e transtornos mentais em presidiários. **Estudos de psicologia**, Campinas, v.27, n.4, p.545-552, 2010.

TOXNET – TOXICOLOGY DATA NETWORK. **Amphetamine. 2017b**. Disponível em: <<https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/f?./temp/~WPAYb7:3>>. Acesso em: 01.07.2017.

TOXNET – TOXICOLOGY DATA NETWORK. **Cocaine. 2017a**. Disponível em: <<https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+6469>>. Acesso em: 01.07.2017.

TOXNET – TOXICOLOGY DATA NETWORK. **Delta 9-Tetrahydrocannabinol**. 2017c. Disponível em: <<https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/f?./temp/~sfUO9F:1>>. Acesso em: 01.07.2017.

UNECE - UNITED NATIONS ECONOMIC COMMISSION FOR EUROPE. **Consolidated resolution on road traffic United Nations publication:** Working Party on Road Traffic Safety. New York and Geneva, 2010, p.17-18. Disponível em: <https://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/roadsafe/publications/docs/Consolidated_Resolution_on%20Road_Traffic_RE1_e.pdf>. Acesso em 20.06.2017.

UNODC - UNITED NATIONS 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.** United Nations publication, Austria, 2009. 67p.

UNODC - UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. **World Drug Report 2017.** New York, [s.n.], 2017. Disponível em <<http://www.unodc.org/wdr2017/>>. Acesso em: 20.08.2017.

USP - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS. **O sangue.** Disponível em: <<http://www.ib.usp.br/microgene/files/biblioteca-22-PDF.pdf>>. Acesso em 05.07.2017.

VALERO, S. et al. Psychopathology and traffic violations in subjects who have lost their driving license. **Comprehensive Psychiatry**, v.76, p.45-55, 2017.

VIEIRA JUNIOR, F.U. et al. Hemólise na circulação extracorpórea: correlação com tempo e procedimentos realizados. **Rev Bras Cir Cardiovasc**, São José do Rio Preto, v.27, n.4, p.535-541, 2012.

VOGEL, A. I. **Química analítica qualitativa.** Editora Mestre Jô, 1981. p.148.

WADA - WORLD ANTI-DOPING AGENCY. **International Standard for Testing.** World anti-doping agency, Montreal, 2012. 92p.

WANG, J. Q.; MCGINTY J. F. Glutamate-dopamine interactions mediate the effects of psychostimulant drugs. **Addiction biology**. 1999, p. 141-150 **WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Management of substance abuse. Disponível em: <http://www.who.int/substance_abuse/terminology/abuse/en/>. Acesso em: 20.06.2017**

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The global burden of disease – 2004.** Switzerland: WHO press, n.74, 2008. 146p. Disponível em: <http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_full.pdf>. Acesso em: 20.06.2017

XIONG, J. et al. Simultaneous quantification of amphetamines, caffeine and ketamine in urine by hollow fiber liquid phase microextraction combined with gas chromatography-flame ionization detector. **Talanta**, n.82, p.969-975, 2010.

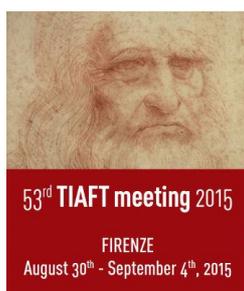
YAMAMOTO, B.; MOSZCZYNSKA, A.; GUDELSKY, G. Amphetamine toxicities: classical and emerging mechanisms. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1187, p.101-121, 2010.

YAREMA, M. C.; BECHER, C. E. Key Concepts in Postmortem Drug Redistribution. **Clinical Toxicology**, v.43, p.235-24, 2005.

YONAMINE, M. **Derivação de benzoilecgonina urinária com diazometano para a verificação da exposição à cocaína por técnicas cromatográficas**. 2000, 96p. Dissertação mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

9. ANEXOS

Anexo 1 - Poster enviado para o 53 TIAFT meeting 2015



Poster abstracts

- P20. QUANTIFICATION OF COCAINE, COCAETHYLENE AND ANHYDROECGONINE METHYL ESTER (AEME) IN WHOLE BLOOD USING HOLLOW-FIBRE LIQUID PHASE MICROEXTRACTION (HF-LPME) AND GAS-CHROMATOGRAPHY MASS-SPECTROMETRY (GC-MS)

Sanchez C., Fonseca Pego A.M. (anamiguel14@hotmail.com)*, Yonamine M., Souza Nascimento E. University of São Paulo ~ São Paulo ~ Brazil

According to the statistic data provided by the United Nations Office on Drugs and Crime, Brazil today consumes 18% of the world's yearly supply of the cocaine. Estimates have shown that Brazil's coke explosion has been called "the most worrying side-effect of the country's recent consumer boom," with its use spreading not only across slums, known as "cracolândias", but also among the swelling middle class, who now comprises of more than half of the population. Consequently, this contributes to the high number of deaths by overdose of this drug and accidents.

A method for the determination of cocaine, cocaethylene and anhydroecgonine methyl ester (AEME-crack bio- marker) in whole blood samples was developed in the present work, using hollow fiber liquid phase microextraction (HF-LPME) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).

An aliquot of 200 μ L whole blood was pipetted into a 1.5 mL eppendorf tube, followed by the addition of 15 μ L of potassium hydroxide (0.05 M) along with sodium chloride (200 mg) and filled up to approximately 1.5 mL with deion- ized water. A 9-cm of hollow fiber was immersed into diethyl ether, filling its pores with the solvent. The fiber was then filled with acceptor phase consisting of hydrochloric acid (5 mM) and introduced into the sample solution. The extraction was performed by lateral vortex mixing the solution for 15 min at 2400 rpm. After extraction, the acceptor phase was withdrawn

from the fiber and dried under nitrogen stream (40 °C). The residue was re-suspended in 50 µL of ethyl acetate and injected into the GC-MS. Cocaine-d3 was used as internal standard and UNODC guidelines were followed.

The limit of quantification (LoQ) was 10 ng/mL for all analytes. The calibration curves were linear over a concentration range of 10.0 ng/ml to 1200 ng/ml ($R^2 = 0,99$). The method showed to be precise (RSD <15%) and sensitive with a recovery value of 56%. A total of three real samples have been tested from which two of them yielded a positive result for cocaine.

This method has allowed not only for the determination of low amounts of cocaine, cocaethylene and AEME at once but also for the application of an environmental and cost-friendly HF-LPME technique. When compared to conventional extraction techniques such as LLE or SPE, this microextraction has proven to be much faster, significantly less harmful due to its reduced use of hazardous solvents, sensitive considering the low volume of blood required for analysis and of general easy clean-up.

Anexo 2 – Parecer com aprovação conselho de ética da Polícia Técnico Científica do estado de São Paulo.



SECRETARIA DA SEGURANÇA PÚBLICA
SUPERINTENDÊNCIA DA POLÍCIA TÉCNICO-CIENTÍFICA
Gabinete da Superintendência
Rua Moncorvo Filho, 410 - 4º andar - Ala I - Capital - SP - CEP: 05507-060.
☎ (011) 3811-7000 R 7009 – FAX: (011) 3031-1311 – www.policiacientifica.sp.gov.br

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO E ANUÊNCIA DE PESQUISA CIENTÍFICA

Declaro que o projeto de pesquisa intitulado “Determinação de substâncias psicoativas em sangue post-mortem, utilizando técnica de microextração em fase líquida HF-LPME” foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Superintendência de Polícia Científica do Estado de São Paulo nos moldes em que foi proposto.

Declaro estar ciente e de acordo com a realização da pesquisa, sob responsabilidade dos pesquisadores Dr. Clóvis Sanchez e Prof. Dra. Elizabeth Nascimento. Declaro conhecer e fazer cumprir as resoluções éticas brasileiras, em especial a Resolução CNS 466/2012.

Declaro que esta instituição está ciente de suas corresponsabilidades como instituição coparticipante do presente projeto de pesquisa e de seu compromisso no resguardo da segurança e do bem-estar dos participantes de pesquisa nela recrutados. Declaro, por fim, que esta instituição dispõe da infraestrutura necessária para a garantia de tais condições.

São Paulo, 08 de julho de 2016.

IVAN-DIEB MIZIARA
Superintendente da Polícia Técnico-Científica

Anexo 3 – Parecer com aprovação do conselho de ética da USP



Anexo 3 – Parecer com aprovação do conselho de ética em pesquisa da USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Detecção e quantificação de anfetamina, cocaína e maconha em sangue total e postmortem, utilizando técnica de microextração em fase líquida (HF-LPME) **Pesquisador:** Elizabeth de Souza Nascimento **Área Temática:**

Versão: 1

CAAE: 59014616.1.0000.0067

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

Patrocinador Principal: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.744.746

Apresentação do Projeto:

O uso ilícito de substâncias psicoativas tem sido associado com a ocorrência de doenças, acidentes, violências e mortes. O relatório brasileiro sobre drogas mostrou que a maconha, anfetamínicos e cocaína foram responsáveis por um número elevado de ocorrências na área da saúde como internações, afastamentos do trabalho, aposentadorias precoces e óbitos. Porém, existe uma carência no Brasil de estudos científicos sobre a participação dessas substâncias como promotores psíquicos de acidentes ou atos violentos. Sendo assim, este estudo propõe a investigação da presença de drogas de abuso em casos de mortes violentas ocorridas em São Paulo, utilizando para isso metodologias inéditas, as quais serão especialmente desenvolvidas por este estudo para a detecção de

anfetaminas, cocaína e 9 – THC em sangue total, com base na técnica de microextração em fase líquida (Hollow-fiber liquid-phase microextraction HF-LPME).

Uma vez observado que substâncias ilícitas estão sendo utilizadas no país e que os usuários dessas substâncias formam um grupo de elevado risco para acidentes de diversos tipos, estudos devem ser realizados para que esse risco seja investigado frente às realidades e particularidades nacionais, até que haja informação suficiente para o estabelecimento de programas adequados à proteção da sociedade brasileira, seja ela usuária ou não dessas drogas. Entre os estudos possíveis, um que permita investigar regionalmente a presença de drogas ilícitas no organismo de pessoas suspeitas de causarem acidentes seria especialmente relevante, pois permitiria o estabelecimento de um programa de gerenciamento de risco com base em dados reais. Portanto, mais adequado aos problemas daquela região investigada.

Considerando as dificuldades operacionais para se coletar amostras consentidas de matrizes de pessoas vivas envolvidas em acidentes ou atos violentos, (BRASIL, 1988), o uso da matriz sangue post-mortem torna-se uma opção de interesse, sobretudo, por haver amostras disponíveis, as quais são rotineiramente coletadas e enviadas para a polícia técnica-científica do País para avaliações forenses.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral: Desenvolver, validar e aplicar métodos para a avaliação de anfetaminas e cocaína e 9 – tetrahydrocannabinol (9 - THC) em matriz de sangue total e post-mortem, visando colaborar com as inferências forenses à respeito do envolvimento de drogas de abuso em casos de óbito provocados por acidentes de trânsito.

Objetivos específicos:

- Desenvolvimento de métodos para a avaliação de anfetaminas e cocaína e 9 – tetrahydrocannabinol (9 THC) em sangue total;
- Validação das metodologias específicas para anfetaminas e cocaína e THC, com base na matriz sangue humano;
- Testar o método desenvolvido e validado com 50 amostras de sangue post-mortem, as quais apresentaram cocaína e ou anfetamina nos ensaios conduzidos pela polícia técnica-científica, durante os ensaios que realizaram via seus protocolos e normas internas.
- Aplicação das metodologias validadas em 50 amostras de sangue, as quais foram recebidas pela polícia técnica-científica de São Paulo para análise forense.
- Avaliar o número de casos de morte nos quais anfetamina e ou cocaína estejam presentes no sangue do indivíduo vitimado.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não está gerando riscos as pessoas (estudo com amostras post-mortem).

Benefícios: desenvolvimento de um método para análises de substâncias psicoativas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Nesse estudo serão desenvolvidas metodologias com tecnologias mais atuais para a detecção de uso recente e quantificação de anfetaminas, cocaína e 9 – THC em sangue total, utilizando nova técnica de microextração (Hollow-fiber liquid-phase microextraction HF-LPME) com quantificação feita via cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS). Tratar-se-á de metodologias para determinações quantitativas, adequada para matrizes complexas como o sangue. Também trará vantagens econômicas e ambientais, já que utilizarão muito pouco solvente orgânico, comparando-as com métodos tradicionais. Posteriormente, uma população de vítimas fatais de acidentes será investigada por intermédio dessas metodologias para determinar a presença de substâncias psicoativas. Essa investigação é poderá colaborar com o direcionamento das políticas públicas voltadas para a segurança da população brasileira, usuária ou não d substâncias psicoativas de uso proibido ou controlado no país.

Amostras de sangue post-mortem, provenientes de indivíduos envolvidos em acidentes, as quais foram enviadas para o polícia técnica-científica de São Paulo para atender a rotina forense daquela entidade pública. Todas as amostras foram coletadas de acordo com protocolos forenses que regem o instituto. O uso desse material foi aprovado pela Comissão Científica e de Ética em Trabalhos Periciais da Secretaria de Segurança Pública do Estado de São Paulo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Solicita dispensa de aplicação de TCLE porque vão utilizar material biológico enviado para análise na Polícia Técnica do Estado de São Paulo.

Segundo carta da pesquisadora responsável, Profa Dra Elizabthe Nascimento, a justificativa para não aplicação do TCLE baseia-se na certeza de que não está gerando riscos as pessoas, tampouco causando constrangimentos e desconfortos de qualquer espécie, ou ainda tomando ações que possam tirar o direito civil das pessoas, ou ofender os princípios de ética.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem inadequações/pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

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

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Declaração de Instituição e	anuencia.pdf	23/08/2016 11:21:57	JORGE ALVES DE LIMA	Aceito
Infraestrutura	anuencia.pdf	23/08/2016 11:21:57	JORGE ALVES DE LIMA	Aceito

Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_700624.pdf	18/08/2016 22:25:07		Aceito
Outros	policiacientifica.pdf	18/08/2016 22:23:42	CLOVIS SANCHEZ	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetoparaetica.doc	18/08/2016 22:21:38	CLOVIS SANCHEZ	Aceito
Declaração de Pesquisadores	participacao.pdf	18/08/2016 22:12:23	CLOVIS SANCHEZ	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	dispensa2.pdf	18/08/2016 22:07:13	CLOVIS SANCHEZ	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	dispensa1.pdf	18/08/2016 22:05:43	CLOVIS SANCHEZ	Aceito
Orçamento	orcamento.pdf	18/08/2016 22:03:57	CLOVIS SANCHEZ	Aceito
Folha de Rosto	folharosto1.pdf	18/08/2016 22:01:18	CLOVIS SANCHEZ	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 26 de Setembro de 2016

Assinado por:
Cristina Northfleet de Albuquerque
(Coordenador)



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
 Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9141 - 3010466/2 - Clovis Sanchez

Email: clovissanchez@usp.br
 Data de Nascimento: 30/11/1960
 Cédula de Identidade: RG - 11.572.392 - SP
 Local de Nascimento: Estado de São Paulo
 Nacionalidade: Brasileira
 Graduação: Bacharel em Ciências - Habilitação: Química Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras - Faculdades Oswaldo Cruz - São Paulo - Brasil
 Mestrado: Mestre em Farmácia - Área: Toxicologia e Análises Toxicológicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2002

Curso: Doutorado
 Programa: Toxicologia e Análises Toxicológicas
 Data de Matrícula: 23/08/2013
 Início da Contagem de Prazo: 23/08/2013
 Data Limite para o Depósito: 21/12/2017
 Orientador: Prof(a). Dr(a). Elizabeth de Souza Nascimento - 23/08/2013 até o presente. Email: esnasci@usp.br
 Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 23/08/2013
 Prorrogação(ões): 120 dias
 Período de 23/08/2017 até 21/12/2017
 Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 13/10/2015
 Data do Depósito do Trabalho:
 Título do Trabalho:
 Data Máxima para Aprovação da Banca:
 Data de Aprovação da Banca:
 Data Máxima para Defesa:
 Data da Defesa:
 Resultado da Defesa:
 Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 23/08/2013
 Prorrogação em 25/07/2017

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Prorrogação em 25/07/2017



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
 Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9141 - 3010466/2 - Clovis Sanchez

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc	Situação
FBC5737- 3/2	Farmacocinética Avançada	03/10/2013	11/12/2013	120	8	90	A	N	Concluída
FBC5741- 6/2	Análise Toxicológica de Fármacos e drogas que Causam Dependência	10/03/2014	13/04/2014	60	4	90	A	N	Concluída
FBC5803- 3/3	Sistemas de Garantia da Qualidade em Laboratórios de Ensaio	11/03/2014	24/03/2014	30	2	75	A	N	Concluída
FBA5728- Didático 3/9	Aprimoramento	25/03/2014	21/04/2014	60	4	87	A	N	Concluída
FBC5802- 3/6	Tópicos Avançados em Toxicologia I	03/03/2015	16/06/2015	15	1	90	A	N	Concluída
FBC5784- 3/7	Tópicos Avançados em Toxicologia II	04/08/2015	16/11/2015	15	1	90	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	10	20	20
Estágios:			
Total:	10	20	20

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Prorrogação em 25/07/2017

Impresso em: 05/12/2017 16:09:46