



JÚLIO CÉSAR SANTOS JÚNIOR

NOVAS TÉCNICAS ANALÍTICAS APLICADAS A DROGAS
DE ABUSO PRESENTES EM HUMOR VÍTREO

CAMPINAS

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

JÚLIO CÉSAR SANTOS JÚNIOR

NOVAS TÉCNICAS ANALÍTICAS APLICADAS A DROGAS
DE ABUSO PRESENTES EM HUMOR VÍTREO

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de concentração Ciências Biomédicas.

ORIENTADOR: NELCI FENALTI HÖEHR

CO-ORIENTADOR: MARCOS NOGUEIRA EBERLIN

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO JÚLIO
CÉSAR SANTOS JÚNIOR, E ORIENTADO PELA
PROF(A). DR(A). NELCI FENALTI HÖEHR.

[_____]

CAMPINAS

2014

Santos Júnior, Júlio César, 1985-
Sa59n Novas técnicas analíticas aplicadas a drogas de abuso presentes em humor
vítreo / Júlio César Santos Júnior. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Nelci Fenalti Höehr.
Coorientador: Marcos Nogueira Eberlin.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Ciências Médicas.

1. Corpo vítreo. 2. Drogas ilícitas. 3. Toxicologia forense. 4. Espectrometria de
massas. I. Höehr, Nelci Fenalti, 1947-. II. Eberlin, Marcos Nogueira, 1959-. III.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: New analytical techniques applied to drugs of abuse present in
vitreous humor

Palavras-chave em inglês:

Vitreous body

Street drugs

Forensic toxicology

Mass spectrometry

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Titulação: Mestre em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Nelci Fenalti Höehr [Orientador]

Mirela Batista Coelho

Erich Vinicius de Paula

Data de defesa: 15-07-2014

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

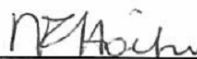
JÚLIO CÉSAR SANTOS JÚNIOR

Orientador (a) PROF(A). DR(A). NELCI FENALTI HOEHR

Coorientador (a) PROF(A). DR(A). MARCOS NOGUEIRA EBERLIN

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). NELCI FENALTI HOEHR



2. PROF(A). DR(A). MIRELA BATISTA COELHO



3. PROF(A). DR(A). ERICH VINICIUS DE PAULA



Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas

Data: 15 de julho de 2014

RESUMO

Embora as anfetaminas estejam proibidas no Brasil, elas continuam sendo adquiridas ilegalmente assim como os canabinóides e cocaína, que representam um dos principais problemas de saúde pública a serem enfrentados no nosso país. Um dos grandes desafios desta área é a dificuldade de obtenção de material para exames periciais. O humor vítreo por encontrar-se isolado em um compartimento relativamente protegido de contaminação externa, invasão de microorganismos e traumatismos em geral, bem como por sua simplicidade/estabilidade analítica e esterilidade durante um longo período após a morte constitui-se como uma excelente amostra para a determinação de xenobióticos em corpos politraumatizados, carbonizados ou em decomposição, auxiliando na delegação da *causa mortis*. O uso da espectrometria de massas e o advento de novas metodologias de ionização são ferramentas essenciais à toxicologia forense, a V-EASI (*venture easy ambient sonic-spray*), é uma fonte de ionização de fácil aplicação e instalação, que não requer fluxo de eluente e os demais fatores utilizados nas fontes comerciais. Além disso, o uso da espectrometria de massas de ressonância ciclônica de íons por transformada de Fourier (FT-ICR-MS) de ultra-alta resolução e exatidão (valores de m/z exatos) leva a exata composição molecular, alcançando erros abaixo de 1 ppm (partes-por-milhão). Perante isso a avaliação da fórmula molecular normalmente é inequívoca. Quando acoplada a ionização por *eletrospray* (ESI) espécies moleculares suaves são formadas reduzindo a complexidade do espectro e produzindo informação composicional livre de fragmentos em misturas complexas facilitando sua compreensão. Portanto este trabalho visa o desenvolvimento de metodologias analíticas para análise de drogas de abuso presentes em humor vítreo, empregando o uso de técnicas modernas de espectrometria de massas (FT-ICR-MS e V-EASI-MS).

Palavras-chave: humor vítreo, drogas de abuso, toxicologia forense, espectrometria de massas.

ABSTRACT

Although amphetamines are banned in Brazil, they remain illegally acquired as cannabinoids and cocaine, which account for a public health task to be faced in this country. The major challenge is to obtain material for investigation exams. The vitreous humor constitutes a good alternative for these exams, since it occurs isolated in a protected space, free of external contamination and of microorganisms and traumatism, and also due to its analytical stability and sterility preserving it for a long period after death. Moreover, the vitreous humor constitutes an excellent sample for the determination of xenobiotics even in polytraumatized bodies, carbonized or in decomposition, involved in the *causa mortis*. The use of mass spectrometry and the advent of new ionization methods are essential tools for forensic toxicology, the V-EASI (*venture easy ambient sonic-spray*), is a source of ionization easy to use and install, not requiring nitrogen flow, eluent flow and other factors used in commercial sources. Furthermore, the use of Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (FT-ICR-MS) provides ultra high resolution and accuracy in mass analysis and its accurate *m/z* values lead to the exact molecular composition, reaching errors below 1 ppm (parts-per-million) on normal operational conditions, the assigned molecular formula are normally unequivocal. When *electrospray* ionization (ESI) is used, soft molecular species are formed reducing spectra complexity and providing fragment-free compositional information about complex mixtures facilitating comprehension. Therefore, this work aims at the development of analytical methodologies for the analysis of drugs of abuse present in the vitreous humor, employing the use of modern techniques of mass spectrometry (FT-ICR-MS and V-EASI-MS).

Key-words: vitreous body, street drugs, forensic toxicology, mass spectrometry

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	lx
DEDICATÓRIA.....	xv
AGRADECIMENTOS.....	xvii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	xxi-xxii
LISTA DE TABELAS.....	xxiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xxv-xxviii
1 INTRODUÇÃO.....	1-9
1.1 Humor vítreo.....	4-6
1.2 Compostos anfetamínicos.....	6-7
1.3 Canabinóides.....	7-8
1.4 Cocaína.....	8-9
2 OBJETIVOS.....	11
2.1 Objetivo Geral.....	11
2.2 Objetivos Específicos.....	11
3 CAPÍTULO 1.....	13-22
3.1 Objetivos.....	13
3.1.1 Espectrometria de massas acoplada ao <i>venture easy ambient sonic-spray</i> (V-EASI-MS).....	13
3.2 Parte experimental.....	14-16

3.2.1 Material biológico (matriz humor vítreo).....	14-15
3.2.2 Screening de drogas de abuso.....	15-16
3.2.2.1 Preparação da amostra.....	15
3.2.2.2 Espectrometria de massas.....	15-16
3.3 Resultados e discussão.....	16-21
3.4 Conclusão.....	21-22
4 CAPÍTULO 2.....	23-38
4.1 Objetivos.....	23
4.1.1 Ionização por <i>eletrospray</i>	23-24
4.1.1.1 Espectrometria de massas de ressonância ciclôtrônica de íons por transformada de Fourier (FT-ICR-MS) acoplada à ionização por <i>eletrospray</i> (ESI).....	24-25
4.2 Parte experimental.....	26-28
4.2.1 Material biológico (matriz humor vítreo).....	26-27
4.2.2 Análise metabolômica de cocaína.....	27-28
4.2.2.1 Preparação da amostra.....	27
4.2.2.2 Espectrometria de massas.....	27-28
4.3 Resultados e discussão.....	28-38
4.4 Conclusão.....	38
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39-44
6 ANEXOS.....	45-52
6.1 ANEXO I – APROVAÇÃO CEP.....	45-46

6.2 ANEXO II – APROVAÇÃO GERAL IML/SPTC/SP.....	47
6.3 ANEXO III – APROVAÇÃO LOCAL DE COLETA 1 IML/SPTC/SP.....	48
6.4 ANEXO IV – APROVAÇÃO LOCAL DE COLETA 2 IML/SPTC/SP.....	49
6.5 ANEXO V – TCLE IML/SPTC/SP.....	50-52

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e irmã,
Júlio César Santos, Jussara Teresinha da Silveira Santos e,
Deise da Silveira Santos,
por seu apoio em todos os níveis
para a concretização deste projeto.

AGRADECIMENTOS

A Deus, razão do meu viver. Obrigado por tudo, por me conceder o dom da vida e por me abençoar e iluminar em todos os momentos!!!.

À amiga, e minha orientadora Profa. Dra. Nelci Fenalti Höehr e ao amigo, e pesquisador associado Prof. Dr. Roberto Rittner Neto, pelos ensinamentos, dedicação e paciência.

Ao amigo, e co-orientador Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin pela sua imensa benevolência e apoio primordial, principalmente pela disponibilidade de atenção, aconselhando e participando em todas as fases do trabalho, que fez com que eu pudesse vencer, a você minha mais sincera e eterna gratidão.

À amiga, e iniciadora da minha jornada na área da toxicologia forense, Profa. Dra. Renata Pereira Limberger, pela bondade, confiança, dedicação e paciência.

À Carla Giane Loss e Camila Cristina Moreira Silva pela colaboração, suporte técnico e amizade.

Ao Enrico Ferreira Martins Andrade, Pedro Carlos Mollo Filho, Ruggero Bernardo Felice Guidugli, pelo apoio essencial, profissionalismo e dedicação, tanto no tanger da aprovação do respectivo projeto quanto da coleta de material e amizade.

Aos funcionários dos Institutos Médico-Legais da zona oeste e sul, pelo apoio incondicional.

A funcionária da Seção de Bioquímica da Divisão de Patologia Clínica do Hospital das Clínicas - UNICAMP: Simone Dias Mesquita pelo apoio, gentileza, dedicação, profissionalismo e em especial pela amizade.

A todos os colegas do laboratório ThoMSon aos quais agradeço o carinho e ajuda: Mirela, Rosi, Raquel Fernandes, Marcos Albieri, Eduardo, Vinicius, Regina, Phellipe, Roberta, Vanessa, Núbia, especialmente à dona Cida.

A todos os irmãos(as), amigos(as) e conterrâneos que fazem parte dessa longa jornada: Gabriela Cristina Schmitt, Rachel Picada Bulcão, Eder Freire, Lauriana Lamb, Nara Maria Cardoso Soares, pelo incentivo, dedicação e pelo ombro amigo que nunca faltou. Que Deus os abençoe!!!! Amém

Aos meus pais, Júlio e Jussara, pela formação necessária para chegar até aqui.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e ao Fundo de Apoio ao Ensino, à Pesquisa e Extensão (FAEPEX), pelo apoio financeiro.

Muito Obrigado!

*“Embora ninguém possa voltar atrás e
fazer um novo começo,
qualquer um pode começar agora e
fazer um novo fim”*
(Francisco Cândido Xavier)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. <i>Close up</i> de um olho humano, destaque para o humor vítreo (zoom). Adaptado.....	5
Figura 2. Rota metabólica da anfetamina e metanfetamina.....	7
Figura 3. Principais vias de biotransformação do Δ^9 -THC.....	8
Figura 4. Metabolismo da cocaína. O cocaetileno está destacado.....	9
Figura 5. Esquema do funcionamento do V-EASI.....	13
Figura 6. Perfil da amostra de humor vítreo 2093 (<i>full scan</i>) por V-EASI-MS.....	17
Figura 7. Perfil da amostra de humor vítreo 278/12 (<i>full scan</i>) por V-EASI-MS.....	17
Figura 8. Perfil da amostra de humor vítreo 248/12 (<i>full scan</i>) por V-EASI-MS.....	17
Figura 9. Perfil da amostra de humor vítreo 269/12 (<i>full scan</i>) por V-EASI-MS.....	18
Figura 10. Perfil da amostra de humor vítreo 2323 (<i>full scan</i>) por V-EASI-MS.....	18
Figura 11. Fragmentações da benzoilecgonina por V-EASI-MS.....	18
Figura 12. Fragmentações da cocaína por V-EASI-MS.....	19
Figura 13. Fragmentações do cocaetileno por V-EASI-MS.....	19
Figura 14. Fragmentações do Δ^9 -THC por V-EASI-MS.....	19
Figura 15. Fragmentações do 11-nor-9-carboxi-THC por V-EASI-MS.....	20
Figura 16. Fragmentações da anfetamina por V-EASI-MS.....	20
Figura 17. Fragmentações da metanfetamina por V-EASI-MS.....	20
Figura 18. Desenho simplificado de uma fonte de ionização por <i>eletrospray</i> . Adaptado.....	24
Figura 19. Representação esquemática de uma cela analisadora FT-ICR cilíndrica.....	25

Figura 20. Perfil típico ESI(+)FT-ICR-MS da amostra de humor vítreo 248/12 para o período de 7 dias <i>post-mortem</i>	29
Figura 21 – Perfil típico ESI(+)FT-ICR-MS da amostra de humor vítreo 256/12.....	29
Figura 22 – Perfil típico ESI(+)FT-ICR-MS da amostra de humor vítreo 2223 para o período de 3 dias <i>post-mortem</i>	30
Figura 23 – Perfil típico ESI(+)FT-ICR-MS da amostra de humor vítreo 278/12.....	31
Figura 24 – Perfil típico ESI(+)FT-ICR-MS da amostra de humor vítreo 2227 para o período de 3 dias <i>post-mortem</i>	32
Figura 25. ESI(+) FT-ICR-MS de uma amostra de humor vítreo fortificada com 100 ng mL ⁻¹ de cocaína e (B) MS/MS da molécula protonada de cocaína de <i>m/z</i> 304 e (C) MS ³ do íon fragmento 182.....	33
Figura 26. ESI(+) FT-ICR-MS de uma amostra de humor vítreo fortificada com 100 ng mL ⁻¹ de cocaetileno e (B) MS/MS da molécula protonada de cocaetileno de <i>m/z</i> 318 e (C) MS ³ do íon fragmento 196.....	34
Figura 27. Confirmação da cocaína no humor vítreo (248/12 – R/DB) por ESI(+) FT-ICR-MS e experimentos MS ⁿ	35
Figura 28. Confirmação do cocaetileno no vítreo (256/12 – R/DB) por FT-ICR-MS: espectro <i>full scan</i> (A), íon <i>m/z</i> 318 (B) e fragmentações MS/MS do íon <i>m/z</i> 196.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Uso de diferentes drogas psicotrópicas entre 50.890 estudantes de ensino fundamental (1) e médio das redes pública e privada das 27 capitais brasileiras de acordo com os tipos de uso.....	2
Tabela 2. Determinação de drogas de abuso em amostra biológica (de 2009 a 2012).....	3
Tabela 3. Perfil das amostras de humor vítreo e período <i>post-mortem</i>	15
Tabela 4. Condições operacionais e parâmetros usados na determinação usando V-EASI-MS.....	16
Tabela 5. Drogas de abuso encontradas no humor vítreo.....	21
Tabela 6. Perfil das amostras de humor vítreo e período <i>post-mortem</i>	27
Tabela 7. Condições operacionais e parâmetros usados na determinação usando FT-ICR-MS.....	28
Tabela 8. Resultado da análise metabolômica para cocaína e cocaetileno por FT-ICR-MS.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

	Português	Inglês
ACN	acetonitrila	acetonitrile
Anf	anfetamina	amphetamine
BSTFA	nbis(trimetilsilo)trifluoroacetamida	nbis(trimetilsilo) trifluoroacetamide
bze	benzoilecgonina	benzoylecgonine
CBN	canabinol	cannabinol
ce	cocaetileno	cocaethylene
GC	cromatografia gasosa	gas chromatography
GC-MS	cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas	gas chromatography-mass spectrometry
Cn	índice de carbonos	carbon number
coc	cocaína	cocaine
DB	corpos em decomposição	decomposing bodies
DBCG	grupo controle corpos em decomposição	decomposing bodies control group
DBE	índice de ligação dupla equivalente	double bond equivalent index
DNA	ácido desoxirribonucléico	deoxyribonucleic acid
EASI	ionização ambiente por spray sônico	<i>easy ambient sonic-spray ionization</i>
ECG	ecgonina	ecgonine
EEE	éster etílico de ecgonina	ecgonine ethyl ester
EI	ionização por elétrons	electron ionization
ELL	extração líquido-líquido	liquid-liquid extraction
EME	ecgonina metiléster	ecgonine methylester

ESI	ionização por <i>eletrospray</i>	<i>electrospray</i> ionization
ESI(+)-FT-ICR-MS / ESI(+)-FT-MS	espectrometria de massas de ressonância ciclotrônica de íons por transformada de Fourier acoplada à ionização por <i>eletrospray</i> no modo iônico positivo	positive mode <i>electrospray</i> ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry
ESI(+)-MS	espectrometria de massas acoplada à ionização por <i>eletrospray</i> no modo iônico positivo	positive mode <i>electrospray</i> ionization mass spectrometry
FT-ICR-MS	espectrometria de massas de ressonância ciclotrônica de íons por transformada de Fourier	Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência	high performance liquid chromatography
HPLC-MS/MS	cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas <i>tandem</i>	high performance liquid chromatography-mass spectrometry
HV	humor vítreo	vitreous humor
IMLs	institutos médico-legais	medico-legal institutes
IT	armadilha de íons	ion trap
L	olho esquerdo	left eye
<i>m/z</i>	razão massa-carga	<i>mass/charge</i> values
manf	metanfetamina	metamphetamine
MDA	Metilenedioxianfetamina	3,4-methylenedioxyamphetamine
MDMA	3,4-metilenodioxo-N-metilanfetamina	3,4-methylenedioxy-N-methylamphetamine
MeOH	metanol	methanol
MIPs	polímeros molecularmente impressos	molecularly imprinted polymers
MRM	monitoramento de reações	multiple reaction monitoring

	múltiplas	
MS	espectrometria de massas	mass spectrometry
MS/MS	espectrometria de massas tandem	tandem mass spectrometry
MS/MSⁿ	experimentos de fragmentações de massa	mass fragmentations experiments
MSTFA	n-metil-n-trimetilsilil trifluoroacetamida	n-methyl-n-trimethylsilyl trifluoroacetamide
Na₂EDTA	EDTA dissódico	disodium EDTA
NaF	fluoreto de sódio	sodium fluoride
NDB	corpos não-decompostos	nom decomposing bodies
Ncoc	norcocaína	norcocaine
Norce	norcocaetileno	norcoecaethylene
ng mL⁻¹	nanogramas por mililitro	nanograms per millilitre
PChE	colinesterase plasmática	plasma cholinesterase
pH	potencial hidrogeniônico	hydrogen potential
PMR	redistribuição <i>post-mortem</i>	<i>post-mortem</i> redistribution
R	olho direito	right eye
SNC	sistema nervoso central	central nervous system
SPE	extração em fase sólida	solid phase extraction
SPTC	superintendência da polícia técnico-científica	police technical scientific superintendence
TCMS	triclorometilssilano	trichloromethylsilane
TFA	ácido trifluoroacético	trifluoroacetic-acid
THC-COOH	11-nor-9-carboxi-tetrahidrocanabinol	11-nor-9-carboxy-THC
V-EASI	ionização ambiente por spray sônico devido ao efeito <i>venture</i>	venture easy ambient sonic-spray
V-EASI-MS	espectrometria de massas acoplada a ionização ambiente por spray sônico devido ao efeito	venture easy ambient sonic-spray mass spectrometry

venture

Δ^9 -THC

delta-9-tetrahydrocannabinol

Δ^9 – tetrahydrocannabinol

1 INTRODUÇÃO

O Brasil, o maior país da América Latina, com uma população de mais de 190 milhões de habitantes e é a oitava economia mundial. Entretanto, a maioria da população não tem acesso às riquezas geradas no país. Cerca de 6% da população é composta por crianças de 10 anos ou mais de idade e grande parte dessas não tem acesso às necessidades básicas. As diferenças regionais do país são marcantes, refletindo-se em peculiaridades culturais que envolvem desde o nível de educação às práticas religiosas.¹

Essa variabilidade também se reflete no cenário do consumo de drogas psicotrópicas, chegando a ser marcante para algumas drogas específicas. O consumo de cocaína é um exemplo típico, concentrando-se em algumas regiões do país, em especial no Sudeste e no Sul do Brasil, sendo mais comum em algumas populações específicas e praticamente inexistentes em outras. Por outro lado, vale considerar que existem drogas cujo consumo se distribui de forma mais uniforme no território nacional, como é o caso do álcool e do tabaco. Também merecem destaque as diferenças de padrão de consumo entre homens e mulheres, sendo as drogas ilícitas (maconha e cocaína) mais consumidas por homens, e os medicamentos psicotrópicos (ansiolíticos, anfetaminas, entre outros) preferidos pelas mulheres.²

O conhecimento dessas peculiaridades é essencial para subsidiar as políticas públicas. No entanto, ainda é pouco conhecida a real dimensão do uso de drogas no Brasil, bem como os problemas decorrentes desse uso, especialmente devido à carência de estudos nessa área, o que se acentua diante das dificuldades relacionadas à clandestinidade que envolve o uso de drogas ilícitas. Entre os poucos estudos epidemiológicos até hoje realizados no Brasil, destaca-se o levantamento realizado pelo Cebrid (Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas) em 2010, entre estudantes do ensino fundamental e médio das redes pública e privada de ensino nas 27 capitais brasileiras, o qual indica o álcool (42,4%) e o tabaco (9,6%), respectivamente como os psicotrópicos mais consumidos. Entretanto, excetuando estes, 25,5% dos estudantes entrevistados, relataram já ter ao menos experimentado drogas. Os inalantes (solventes) foram os psicotrópicos mais citados (5,2%), seguidos pela maconha (3,7%), pelos medicamentos ansiolíticos (2,6%), cocaína (1,8%) e pelos anfetamínicos (1,7%), conforme demonstrado na tabela 1 abaixo.³

Tabela 1: Uso de diferentes drogas psicotrópicas entre 50.890 estudantes de ensino fundamental (1) e médio das redes pública e privada das 27 capitais brasileiras, de acordo com os tipos de uso.³

Tipo de Droga	Tipos de Uso % ⁽⁵⁾				
	Vida ⁽³⁾	Ano ⁽⁴⁾	Mês ⁽⁴⁾	Frequente ⁽⁴⁾	Pesado ⁽⁴⁾
Maconha	5,7	3,7	2,0	0,3	0,4
Cocaína	2,5	1,8	1,0	0,2	0,2
Crack	0,6	0,4	0,3	0,0	0,1
Anfetamínicos	2,2	1,7	0,9	0,1	0,3
Solventes/Inalantes	8,7	5,2	2,2	0,2	0,3
Ansiolíticos	5,3	2,6	1,3	0,1	0,1
Anticolinérgicos	0,5	0,4	0,2	0,0	0,0
Analgésicos Opiáceos	0,6	-	-	-	-
Esteróides/Anabolizantes	1,4	-	-	-	-
Ópio/Heroína	0,3	-	-	-	-
LSD	1,0	-	-	-	-
Êxtase	1,3	-	-	-	-
Metanfetamina	0,3	-	-	-	-
Ketamina	0,2	-	-	-	-
Benflogin®	0,4	-	-	-	-
Energético com Álcool	15,4	-	-	-	-
Qualquer Droga ⁽²⁾	25,5	10,6	5,5	0,8	1,1
Tabaco	16,9	9,6	5,5	0,7	1,5
Álcool	60,5	42,4	21,1	2,7	1,6

Nota: Rede pública engloba as escolas municipais, estaduais e federais.

(1) A partir do 6º ano.

(2) Excluindo álcool e tabaco.

(3) Maconha, cocaína, crack, anfetaminas, solventes, ansiolíticos, anticolinérgicos, analgésicos opiáceos, esteróides/anabolizantes, ópio/heroina, LSD, êxtase, metanfetamina, ketamina, benflogin®, energético com álcool.

(4) Maconha, cocaína, crack, anfetaminas, solventes, ansiolíticos, anticolinérgicos.

(5) Dados ponderados e expressos em porcentagem.

Mediante os argumentos acima, faz-se necessário à utilização de métodos mais rápidos de detecção de drogas, de fácil manuseio, aplicação e instalação. Na literatura, no período de 2009 a 2012, foram descritos estudos analíticos com um grande número de drogas, no humor vítreo, através dos mais diversos métodos.⁴⁻⁶

As técnicas que estão sendo propostas (FT-ICR-MS e V-EASI-MS) possuem vantagens, em relação às descritas na Tabela 2 (abaixo), como a não preparação da amostra, como por exemplo, o uso de cartuchos de extração em fase sólida (SPE) e, além disso, a retirada do artifício de precipitação da parte protéica com o uso de solventes orgânicos (MeOH, ACN) e o uso do processo de extração tanto por interação líquido-líquido (ELL), quanto assistida por micro-ondas. Fora isso, dispensa a necessidade de derivatização química dos compostos de interesse e o processo de separação cromatográfica utilizado respectivamente nos métodos por CG e HPLC. As variantes anteriormente descritas, no tocante ao procedimento de preparo de amostra, são desvantagens desses procedimentos analíticos, em relação ao novo método proposto. Este pretende fornecer respostas rápidas, ser de fácil aplicação em relação aos métodos disponíveis, contribuindo para a criação de estratégias analíticas que minimizem o esforço técnico-científico na elucidação da *causa mortis*.

Tabela 2. Determinação de drogas de abuso em amostra biológica (de 2009 a 2012).⁴⁻⁶

Analitos	Tipo de amostra	Preparação de amostra	Modo de detecção
Anfetaminas, metadona, 2-etilideno-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina, morfina, codeína, 6-acetilmorfina, dihidrocodeína, benzodiazepínicos, grupo da cocaína.	Humor Vítreo	ELL (pH 8) Pentafluoropropil	GC-MS (EI)
morfina, 6-acetilmorfina, codeína.	Humor Vítreo	SPE (Screen de limpeza ZSDAU020) BSTFA + 1% TCMS	GC-MS (EI)
morfina, 6-acetilmorfina, codeína.	Humor Vítreo	TFA	GC-MS (EI)
Δ^9 -tetrahydrocannabinol, benzoilecgonina, hidrocodona, codeína, morfina, 6-acetilmorfina, anfetamina, metanfetamina.	Humor Vítreo	Cozart DDS801 Teste Kits	GC-MS (EI) HPLC-MS/MS
morfina, codeína, 6-acetilmorfina, benzoilecgonina, cocaína, cocaetileno, 2-etilideno-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina, metadona.	Humor Vítreo	SPE (cartuchos Oasis® HLB)	HPLC-PDA
cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno, morfina, 6-acetilmorfina, metadona, 2-etilideno-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina, codeína.	Humor Vítreo	MAE (extração assistida por micro-ondas) SPE (cartuchos Oasis® HLB)	HPLC-DAD
codeína, morfina, 6-acetilmorfina.	Humor Vítreo	Extração por pipeta descartável (DPX) / MSTFA	GC-NPD
cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno, morfina, codeína, 6-acetilmorfina.	Humor Vítreo	SPE	GC-MS/MS (Ion Trap)
cocaína, morfina, 6-acetilmorfina, anfetamina, ecstasy, LSD, 2-etilideno-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina.	Humor Vítreo	SPE	HPLC-TOF-MS

Nesse sentido, este trabalho visa contribuir para o estudo dos teores de drogas de abuso, através da análise do humor vítreo utilizando metodologias mais recentes, a FT-ICR-MS e a V-EASI-MS.

Como este estudo prevê a análise de material de cadáveres do IML, que usualmente se referem a moradores de rua e criminosos (corpos ainda não sepultados), supõe-se encontrar os compostos mencionados em teores significativos. Os resultados auxiliarão a Polícia Civil com informações para os prontuários dos mesmos. Hoje, essas análises vêm sendo feitas nos laboratórios do IML, porém por métodos demorados e pouco precisos, devido aos poucos recursos disponíveis.

Face ao exposto e considerando a importância dos exames periciais, contudo no auxílio aos toxicologistas forenses, às amostras biológicas não-convencionais (também chamadas de alternativas), em relação aos tradicionais urinas, sangue ou aos seus derivados (soro e plasma), vem sendo utilizadas com sucesso para verificação da exposição de xenobióticos, onde cada matriz biológica possui

peculiaridades, vantagens e desvantagens; e o conhecimento sobre a estabilidade dos analitos no material biológico é de fundamental importância nas análises toxicológicas, uma vez que várias situações acabam por inserirem intervalos de tempo variáveis entre a coleta do material, seu transporte até o laboratório e o momento da análise. Dentre isso, o humor vítreo encontra-se isolado em um compartimento relativamente protegido de contaminação externa, invasão de microorganismos e traumatismos em geral, constituindo-se como uma amostra privilegiada.⁷

Por isso, o uso de compostos anfetamínicos, canabinóides e cocaína (separado ou conjunto), sendo esses, possuidores de efeitos diversos sobre o SNC, torna-se importantíssima tanto a sua detecção quanto a sua confirmação na delegação da *causa mortis*.⁸

Com isso, nas análises forenses de corpos politraumatizados, carbonizados ou em decomposição, onde a inexistência de amostra fátível para a coleta (sangue, urina, soro, plasma), decorrente tanto dos fenômenos putrefativos, quanto de fatores oriundos de outrem, faz-se impreterivelmente o uso da única matriz resistente, ali presente, ou seja, o humor vítreo.⁷

Mediante discriminado anteriormente, este trabalho visa o desenvolvimento de novas técnicas analíticas aplicadas a drogas de abuso presentes em humor vítreo.

1.1 Humor vítreo

O humor vítreo que é uma matriz disponível apenas nas análises *post-mortem*, desempenha um papel importante ajudando a resolver muitas questões na examinação. Devido a isso, deve ser recolhido em todos os casos, sempre que possível, incluindo estes em que nenhuma autópsia é realizada.^{7,9-10}

Trata-se de um fluido aquoso, gelatinoso (seroso), transparente e incolor, contendo pouca proteína; portanto, qualquer xenobiótico ou metabólito presente, muitas vezes podem ser extraídos como se estivessem em solução tampão. Encerrado nas telas do corpo vítreo nos quatro quintos posteriores do bulbo do olho, posterior à lente (câmara postrema ou vítrea, ou segmento posterior); mantido coeso por uma delicada rede de fibrilas, cuja sua viscosidade relativamente alta é devida à presença do ácido hialurônico e colágeno. Além de transmitir luz, mantém a retina no lugar e sustenta a lente^{7,11-14} (imagem em zoom da figura 1).

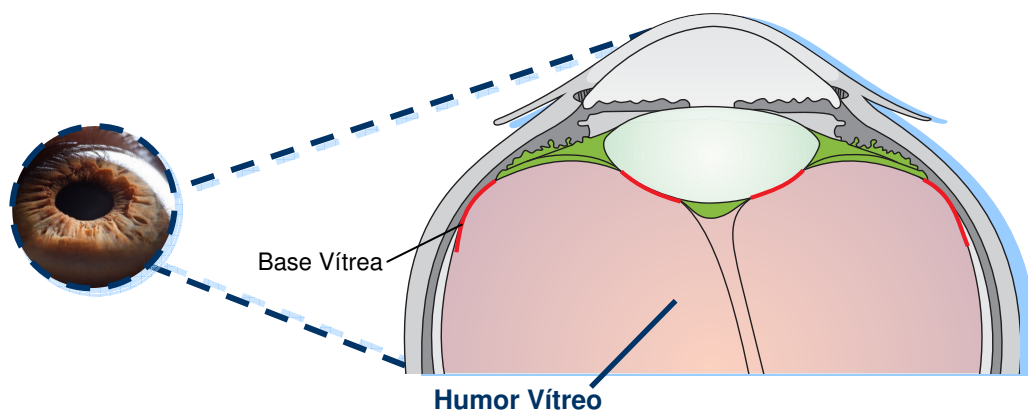


Figura 1 – *Close up* de um olho humano, destaque para o humor vítreo (zoom). Adaptado.¹⁵

Constitui matriz sumamente simples e estável em termos analíticos quando comparados à urina e ao sangue, ou aos seus derivados (soro e plasma). Seu uso é indicado na análise de vários xenobióticos de interesse forense (ricina, fenciclidina, canabinóides, morfina, barbitúricos, antidepressivos tricíclicos, benzodiazepínicos, anfetamínicos (MDA, MDMA), digoxina).^{7, 9, 13, 15-18}

A passagem de xenobióticos para o humor vítreo, da-se por difusão simples através da barreira lipídica entre esse fluido e o sangue, limitada apenas pela lipossolubilidade destes no pH fisiológico. De modo geral, fármacos com pequena taxa de ligação a proteínas plasmáticas e com lipossolubilidade adequada para atravessar barreiras biológicas, mas que ainda se apresentam hidrossolúveis, podem difundir prontamente da corrente sanguínea para o humor vítreo.⁷

Possui denotado valor para a análise *post-mortem* de glicose, uréia, creatinina, lactato, ácido úrico e compostos nitrogenados, bem como, sódio, potássio, cálcio, cloreto, magnésio, fosfato e lítio. A medição destes analitos é importante para documentar tipos de diabetes (diabetes melito), grau de hidratação, equilíbrio eletrolítico e o estado da função renal.^{11-12, 19-22}

Por conter alta quantidade de água (90-98%), propicia a troca de determinadas substâncias com o sangue, circunstância que permite uma boa correlação entre os níveis que se podem encontrar simultaneamente nos fluidos de um determinado xenobiótico, em um dado momento.⁷

Utiliza-se também do humor vítreo como amostra primoriente para determinar à estimativa do tempo de morte; recentemente, constitui fonte potencial de extração de DNA.^{20, 23-25}

O humor vítreo tem sido utilizado por muitos anos como amostra preferida para confirmação *post-mortem* da ingestão de álcool (“álcool vítreo”), sendo que, a formação de etanol *post-mortem* não ocorre de forma significativa no humor vítreo; porque ele permanece estéril durante um período de dias após a morte (até os

estágios mais avançados de decomposição), mesmo na presença de concentrações elevadas de glicose: isso provavelmente resulta da relativa falta de esterases no olho (que hidrolisam certas drogas e seus metabólitos), em comparação com o sangue. Só no caso de putrefação muito grave, em que o olho seca e pouco líquido está disponível, é visto um ligeiro aumento na concentração de etanol, mas é rara a extensão desse efeito, se alguma vez, acima de 20 mg 100 mL⁻¹. Por esta razão, o humor vítreo é particularmente útil para a estimativa de etanol em corpos em decomposição, politraumatizados e carbonizados; e pode proporcionar uma oportunidade única de estabelecer uma concentração de etanol *ante-mortem* em corpos embalsamados.^{7-8, 10, 16, 19, 26-36}

Em face da sua qualidade, e por encontrar-se bem protegido de contaminantes na intimidade do globo ocular, recorre-se ao humor vítreo para a análise metabolômica de diferentes doenças oculares.^{23,37}

As amostras devem ser coletadas em cada olho separadamente, acrescentando conservante químico inibidor enzimático fluoreto de sódio (NaF) de 1-2% (p/v), que impede a formação adicional de etanol. O íon fluoreto é aparentemente eficaz em inibir a atividade de vários tipos de enzimas, como a enolase um componente da via glicolítica, e é importante para a ação de leveduras, fungos e muitos microorganismos responsáveis pela fermentação.^{22,38}

Em análises toxicológicas *post-mortem*, esse fluido biológico oferece uma série de vantagens, como facilidade de obtenção; preservação devido à posição anatômica (por estar contido em um compartimento periférico, há uma demora tanto na absorção de drogas e álcool dentro desse líquido, por conseguinte, um atraso no processo de excreção).^{7,19}

A principal desvantagem do humor vítreo é relativamente seu pequeno volume, cerca de 3 mL em cada olho, outrossim, há pouca informação relativa na literatura sobre a concentração esperada após doses terapêuticas para a maioria das drogas.¹⁶

1.2 Compostos anfetamínicos

A anfetamina (anf) e seus derivados são aminas aromáticas (fenilalquilaminas), compostos orgânicos com apreciável basicidade.³⁹ Sua estrutura permite substituições no anel aromático, nos carbonos *alfa* e *beta* e no grupo *amino* terminal originando muitos derivados.³⁹

Em relação à toxicocinética dos compostos anfetamínicos, de um modo geral, podemos considerar:

a) absorção: pelo trato gastrointestinal, efeitos em 30 min após administração de 10 a 15 mg, concentração plasmática máxima de 1-2 h, absorção completa de 4-6 h.³⁹

b) distribuição: cérebro, rins, pulmões, fígado, liga-se 16-20% às proteínas plasmáticas. O restante fica na forma livre com alta afinidade tecidual atingindo elevadas concentrações no SNC e no líquido.³⁹

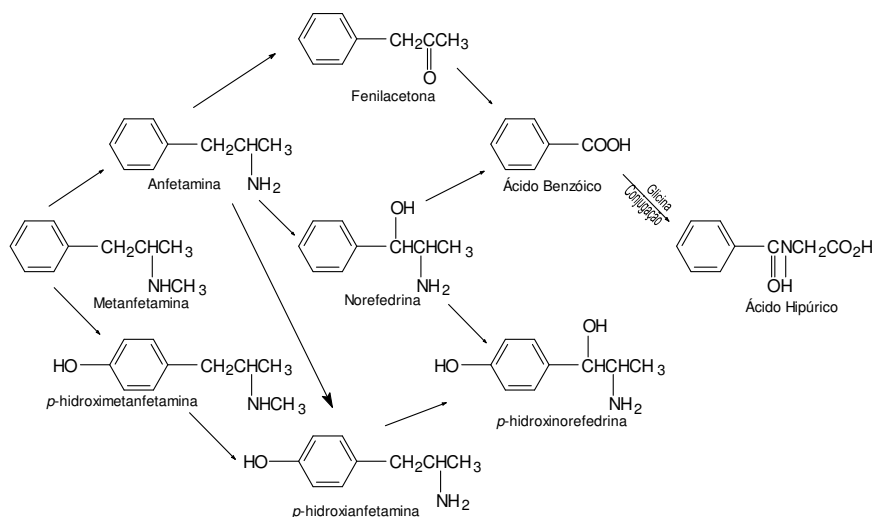


Figura 2 – Rota metabólica da anfetamina e metanfetamina.³⁹

c) metabolismo e excreção: sofrem hidroxilação do anel aromático, levando a formação de *p*-OH-derivados que são excretados inalterados na urina ou conjugados com ácido glicurônico.

d) também podem sofrer β -hidroxilação da cadeia lateral, N-desalquilação, com formação de amina primária e desaminação oxidativa com formação de fenilacetona e ácido benzóico, o qual é conjugado com glicina (formando ácido hipúrico) ou com ácido glicurônico (Figura 2).³⁹

A excreção depende de vários fatores entre eles volume de urina, fatores individuais e pH urinário. Os produtos hidroxilados são normalmente excretados conjugados com sulfato, sendo que 50% são eliminados na forma inalterada.³⁹

1.3 Canabinóides

A *Cannabis* é a droga ilícita mais cultivada, traficada e consumida em todo o mundo. Com isso, a sua identificação botânica é imprescindível; mas, devido às características intrínsecas de sua folha (presença de folhetos separados e gumes serrilhados), bem como, tricomas (estruturas contentoras/secretoras de resina) glandulares e não-glandulares cistolíticas, essa função torna-se razoavelmente fácil.⁴⁰⁻⁴¹

Até hoje foram identificados 489 compostos naturais da *Cannabis sativa L.*, sendo que 70 são fitocanabinóides pertencentes a diferentes tipos ou subgrupos. Dentre todos os fitocanabinóides contidos na *Cannabis sativa L.*, o Δ^9 -THC é, reconhecidamente, o principal composto químico com efeito psicoativo; mas, existem outros fitocanabinóides psicoativos, como o Δ^8 -THC e o canabinol (CBN). Porém, como são encontrados em pequenas concentrações ou são bem menos potentes, não interferem nos efeitos da *Cannabis*.⁴¹⁻⁴²

Os principais produtos de biotransformação são os compostos monoidratados, especialmente o 11-hidroxi(OH)- Δ^9 -THC e o 8-beta-hidroxi(OH)- Δ^9 -THC. São compostos ativos, sendo que o primeiro exibe atividade e disposição similar ao Δ^9 -THC. Posteriormente, o 11-OH- Δ^9 -THC é oxidado a ácido 11-nor-9-carboxi- Δ^9 -THC, também conhecido como THC-COOH, que é um composto inativo. Esse produto de biotransformação é conjugado com ácido glicurônico e excretado em quantidades significativas na urina (Figura 3). A taxa de eliminação do THC na urina pode variar de três a sete dias, em usuários ocasionais, e até 60 dias em usuários crônicos.⁴¹⁻⁴²

Os canabinóides possuem moderada redistribuição *post-mortem* (PMR), sendo que os mais comumente encontrados são: Δ^9 -THC, 11-hidroxi- Δ^9 -THC (11-OH- Δ^9 -THC) e 11-nor-9-carboxi- Δ^9 -THC (THCCOOH).⁴²

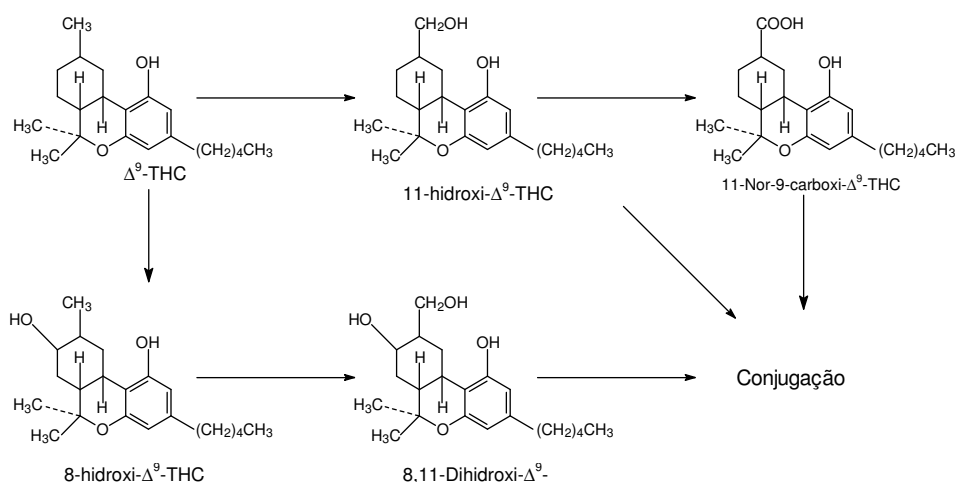


Figura 3 – Principais vias de biotransformação do Δ^9 -THC.⁴²

1.4 Cocaína

A cocaína é uma das drogas ilícitas mais utilizadas, portanto, constituindo um importante problema de saúde pública. Ela é largamente disponível e existe formas relativamente baratas de cocaína, tais como a base livre, conhecida como “crack”.⁴³⁻⁴⁴ A cocaína é um poderoso estimulante que se liga aos transportadores de dopamina, noradrenalina e serotonina, acelerando a atividade do sistema

nervoso central.⁴⁵ O metabolismo de cocaína prossegue por três principais vias iniciais de transformações metabólicas: clivagem do éster benzoílico para dar o éster metílico de ecgonina; clivagem do diéster metílico para dar benzoilecgonina (bze) e a N-desmetilação oxidativa para dar norcocaína. Na presença de etanol, esterases hepáticas catalisam a transesterificação da cocaína para formar o metabólito farmacologicamente ativo *cocaetileno* (ce, figura 4).⁴⁶⁻⁴⁷

O ce serve como um marcador metabólico chave para o uso concomitante de etanol e cocaína *ante e post-mortem*.

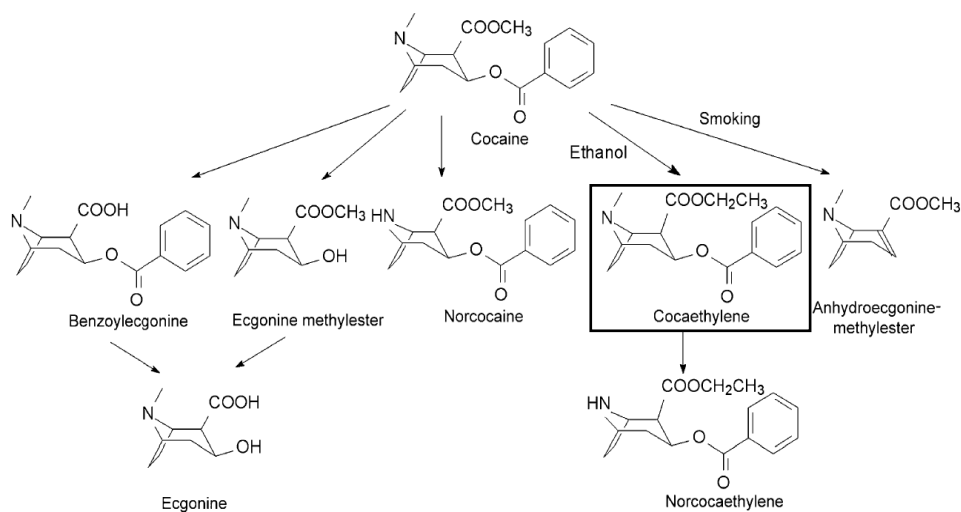


Figura 4 - Metabolismo da cocaína. O cocaetileno está destacado.⁴⁵

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O principal objetivo deste projeto é o desenvolvimento de novas técnicas analíticas para a análise de drogas presentes no humor vítreo que permitam avaliar o seu uso em cadáveres do IML de São Paulo, utilizando como “corpo de prova” as drogas de abuso, presentes na quase totalidade dos indivíduos encontrados naquela Instituição. Eventualmente, esse método poderá ser estendido a outros compostos, no caso da ausência de drogas de abuso, que forem julgados adequados à essa avaliação.

Os métodos que serão utilizados na definição das drogas de abuso (acima relacionadas), presentes no humor vítreo de cadáveres, serão a FT-ICR-MS e a V-EASI-MS sem o auxílio de qualquer técnica refinada de preparo de amostra, como os polímeros molecularmente impressos (MIPs).

2.2 objetivos específicos

1) Desenvolver metodologia analítica para análise de drogas de abuso presentes em humor vítreo, empregando o uso de técnicas modernas de espectrometria de massas, no caso, a fonte de ionização *venture easy ambient sonic-spray* (V-EASI);

2) Desenvolver metodologia analítica para análise de drogas de abuso presentes em humor vítreo, empregando o uso de técnicas modernas de espectrometria de massas, no caso, a espectrometria de massas de ressonância ciclônica de íons por transformada de Fourier (FT-ICR-MS) acoplada à ionização por *eletrospray* (ESI).

3 CAPÍTULO 1

3.1 Objetivos

Desenvolver metodologia analítica para análise de drogas de abuso presentes em humor vítreo, empregando o uso de técnicas modernas de espectrometria de massas, no caso, a fonte de ionização *venture easy ambient sonic-spray* (V-EASI).

3.1.1 Espectrometria de massas acoplada ao *venture easy ambient sonic-spray* (V-EASI-MS).

O *venture easy ambient sonic-spray* (V-EASI) que foi originado da técnica de EASI (*easy ambient sonic-spray ionization*), é uma nova fonte de ionização, de fácil aplicação e instalação, não requer fluxo de eluente e os demais fatores utilizados nas fontes comerciais. Por se tratar de uma ionização ambiente, apresenta espectros de massas mais suaves e limpos, apenas com as informações necessárias para as análises. A fonte de ionização V-EASI, funciona de tal maneira, que através do efeito venturi de sucção da amostra através de um capilar de sílica fundido, sendo, portanto, a amostra levada até o fluxo de ar. Assim o spray com a amostra é formado em microgotas em desequilíbrio de carga, que secam e levam os íons para fase gasosa, esses íons são levados para dentro do espectrômetro de massas (Figura 5).⁴⁸

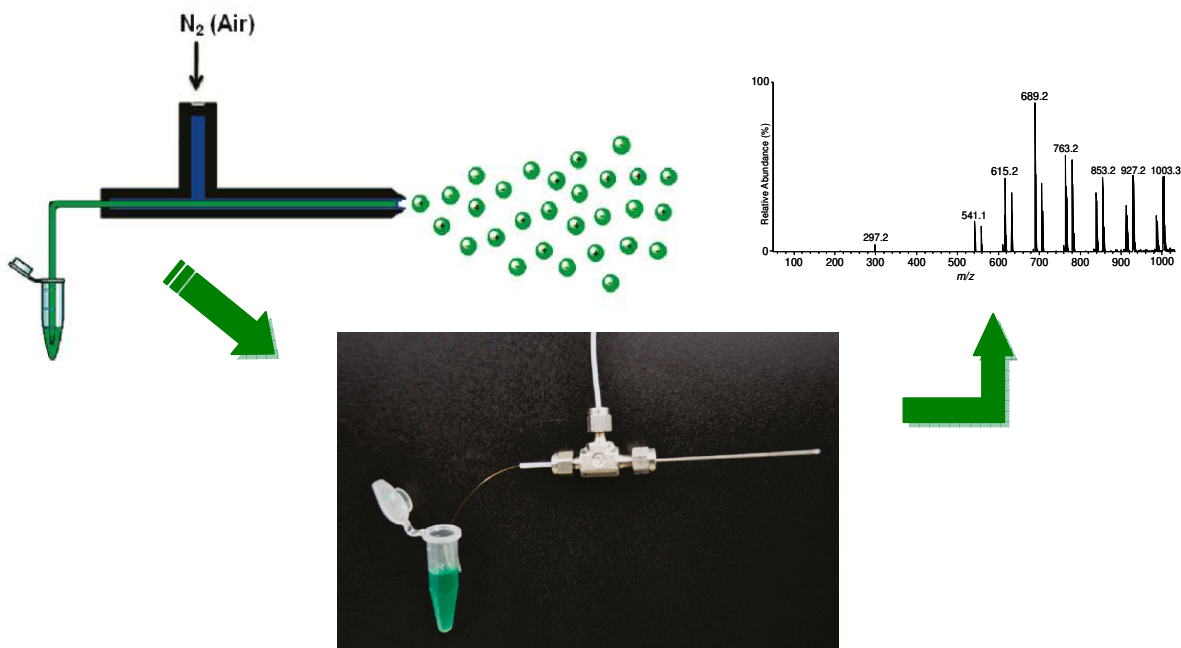


Figura 5 - Esquema do funcionamento do V-EASI.⁴⁸

3.2 Parte experimental

3.2.1 Material biológico (matriz humor vítreo)

As amostras de humor vítreo serão fornecidos pela Superintendência da Polícia Técnico-Científica (SPTC) da cidade de São Paulo, coletados nos Institutos Médico-Legais (IMLs) da zona oeste e sul. Este material será coletado mediante os seguintes critérios de:

- Inclusão: cadáveres putrefeitos de *causa mortis* desconhecida, onde é importante fazer o exame toxicológico para excluir a intoxicação; bem como, cadáveres não putrefeitos de *causa mortis* desconhecida, onde é importante fazer o exame toxicológico.
- exclusão: cadáveres putrefeitos/cadáveres não putrefeitos de *causa mortis* conhecida.
- grupo controle: o grupo controle será composto de cadáveres cuja *causa mortis* foi natural.

O material biológico será coletado através da utilização de punção com um trocarte com 0,51 mm de calibre externo, com bisel trifacetado e mandril metálico com calibre externo de 0,42 mm. O acesso ideal é a bissetriz dos ângulos dos quadrantes superiores do olho, com auxílio de afastadores de pálpebras, fugindo assim dos tecidos mais vascularizados, como o canto externo do olho. Todo o material retirado deve ser separado e identificado referente às amostras do olho esquerdo; bem como, do direito; conjunto a isso, deve ser acondicionado em tubos Vacutainer® da marca BD (REF 368521), de dimensões 13x75 mm com capacidade para 4 mL, contendo 6,0 mg do conservante químico fluoreto de sódio (NaF) e 12,0 mg de EDTA dissódico (Na₂EDTA). (Protocolos Éticos de Aprovação (ANEXOS I, II, III e IV)).

Em relação à cadeia de custódia, o material biológico seguirá os seguintes passos: o material coletado pelo técnico de necropsia do IML - Sr. Pedro Carlos Mollo Filho sob coordenação do médico legista responsável Sr. Ruggero Bernardo Felice Guidugli será lacrado e receberá uma numeração com registro em livro próprio, que ficará no necrotério. Estabeleceu-se como parâmetro de quantidade necessária de material, num total de 250 amostras. O material será encaminhado ao laboratório de Lesões Oxidativas sobre a coordenação da Profª Dra. Nelci Fenalti Höehr, onde será recebido pelo pesquisador Sr. Júlio César Santos Júnior registrado e armazenado em freezer adequado a - 80 °C, cujo acesso é restrito à Profª Dra. Nelci Fenalti Höehr e ao pesquisador Sr. Júlio César Santos Júnior; os

exames serão realizados pelo pesquisador Sr. Júlio César Santos Júnior e os resultados constarão de um laudo que será encaminhado ao IML para ser anexado no laudo definitivo no prazo máximo de 60 dias para contribuir para a elucidação da causa da morte (*causa mortis*); os resíduos serão armazenados durante 6 meses, caso haja necessidade de contra prova, antes de serem dispensados.

3.2.2 Screening de drogas de abuso

3.2.2.1 Preparação de amostra

As amostras de humor vítreo analisadas (casos) foram classificadas em 3 amostras-caso A1 (1 dia de período *post-mortem*), A2 (3 dias de período *post-mortem*) e A3 (7 dias de período *post-mortem*) coletadas entre Junho e Setembro de 2012 (Tabela 3).

Tabela 3. Perfil das amostras de humor vítreo e período *post-mortem*

	Identificação das amostras	Período <i>post-mortem</i>
A1	2093 – R/NDB 2323 – L/DB	1 DIA
A2	269/12 – R/DB 278/12 – L/DB	3 DIAS
A3	248/12 – R/DB	7 DIAS

R – direito / L – esquerdo olho, DB – corpos em decomposição, NDB – corpos em não-decomposição, e amostras-caso A1, A2 e A3.

As amostras de humor vítreo (100 µL) foram dissolvidas em 1 mL de metanol. 100 µL de humor vítreos (diluído 10x) foram fortificadas com 50 µL de soluções de cocaína (coc), benzoilecgonina (bze), cocaetileno (ce), Δ^9 -THC, THC-COOH, anfetamina (anf) e metanfetamina (manf) de 100 ng mL⁻¹ ambas diluídas em 1 mL de metanol com 0.1% ácido fórmico (soluções controle).

3.2.2.2 Espectrometria de massas:

Para as análises no modo iônico positivo, as amostras foram colocadas em um vial âmbar de 2000 µL de capacidade, e 20 µL min⁻¹ foram injetados mediante o uso de um capilar de sílica e uma agulha. As *m/z* da bze, coc, ce, Δ^9 -THC, THC-COOH, anf e manf ambos protonados foram então monitoradas por V-EASI -MS em um espectrômetro de massas IT (íon trap) modelo HCT 3D (Bruker, Billerica, Massachusetts) acoplado a uma fonte de ionização por *easy ambient sonic-spray* (EASI). As drogas de abuso foram identificadas pela comparação com o espectro

de massas dos compostos padrões (soluções controle). A Tabela 4 resume as principais condições usadas.

Tabela 4. Condições operacionais e parâmetros usados na determinação usando V-EASI-MS

Parâmetros	
Gás nebulizador (N ₂) (L min ⁻¹)	3.5
Fluxo de gás de secagem (L min ⁻¹)	5
Temperature de secagem (°C)	300

3.3 Resultados e discussão

Via V-EASI(+)-MS, os perfis das amostras de humor vítreo intactas foram obtidos. As Figuras 6, 7, 8, 9 e 10 mostram espectros característicos para amostras de humores vítreos livres de drogas de abuso. Os perfis variaram muito devido a diferente composição bioquímica em diferentes períodos *post-mortem*.

As figuras 11, 12, 13, 14, 15, 16 e 17 ilustram bem, o V-EASI(+)-MS do humor vítreos fortificados com 100 ng mL⁻¹ de benzoilecgonina, cocaína, cocaetileno, Δ^9 -THC, THC-COOH, anfetamina e metanfetamina permitindo a adequada caracterização destas sete moléculas no fluido em corpos em estado de decomposição e em corpos não decompostos devido a detecção das formas protonadas de *m/z* 290, 304, 318, 315, 345, 136 e 150, respectivamente. Nota-se a análise de massa com precisão, bem como, que os padrões de fragmentação característicos foram determinados por experimentos MS/MS.

Esses sete metabólitos estavam também bem ionizados por EASI(+), o que portanto, facilita a sua detecção no meio de moléculas presentes em humor vítreos tanto de corpos não-decompostos quanto em decomposição. Os efeitos de matriz também foram minimizados devido ao efeito de diluição aplicado as amostras em questão. Felizmente, para as amostras-caso de humor vítreos, benzoilecgonina, cocaína e anfetamina para as amostras 248/12, 278/12 e 269/12 puderam ser bem caracterizados mesmo depois do período *post-mortem* de 7 dias e 3 dias respectivamente.

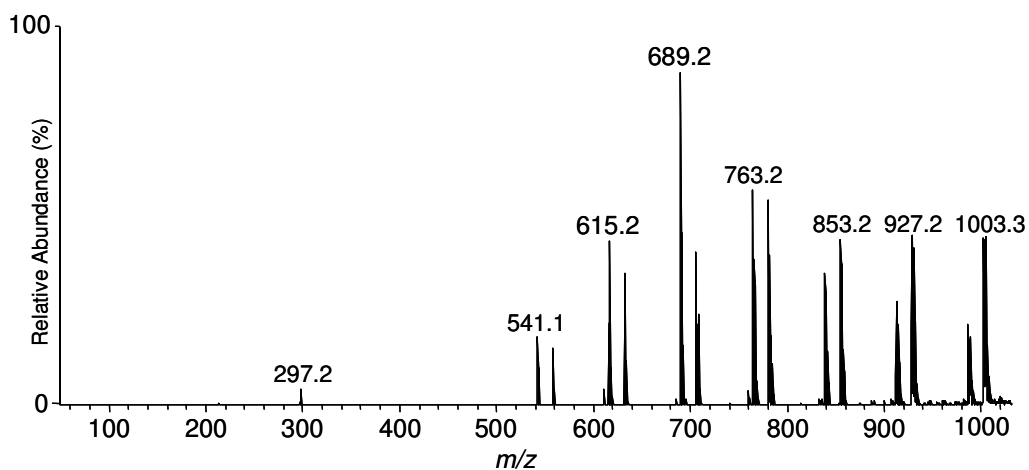


Figura 6 Perfil da amostra de humor vítreo 2093 (*full scan*) por V-EASI-MS.

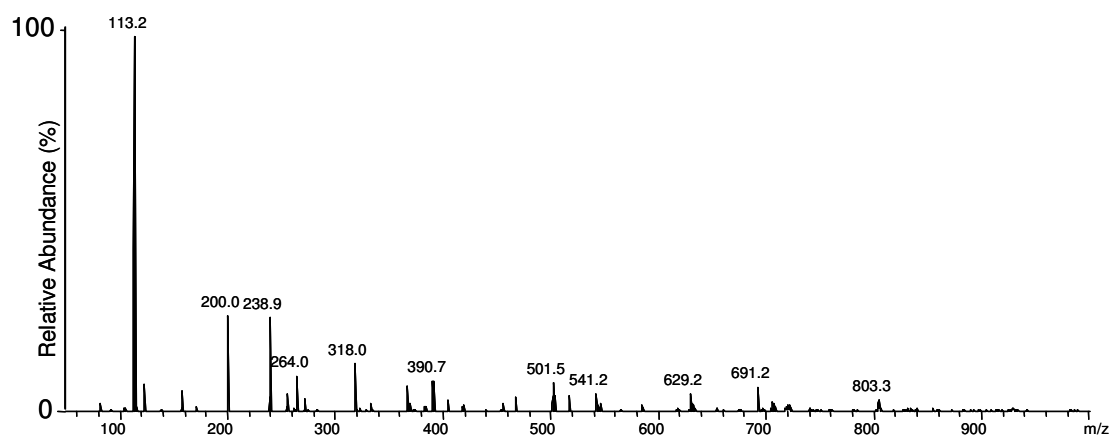


Figura 7 Perfil da amostra de humor vítreo 278/12 (*full scan*) por V-EASI-MS.

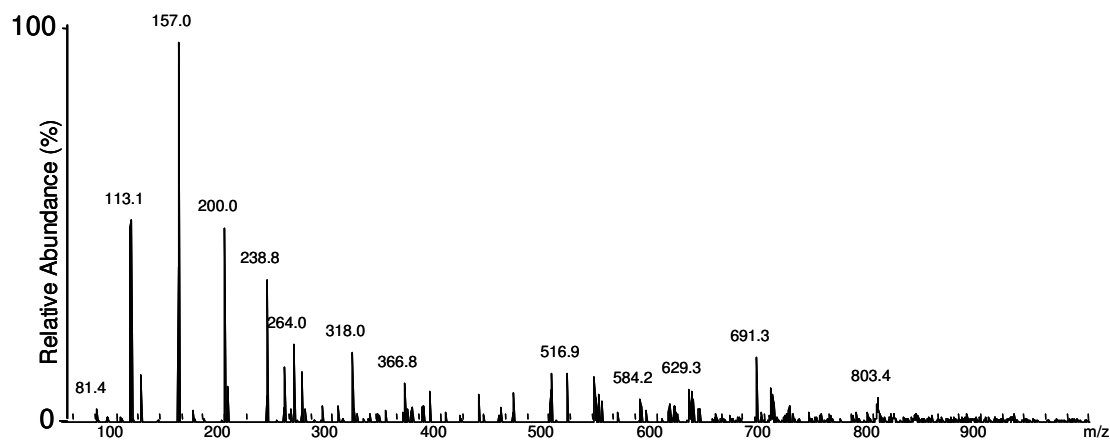


Figura 8 Perfil da amostra de humor vítreo 248/12 (*full scan*) por V-EASI-MS.

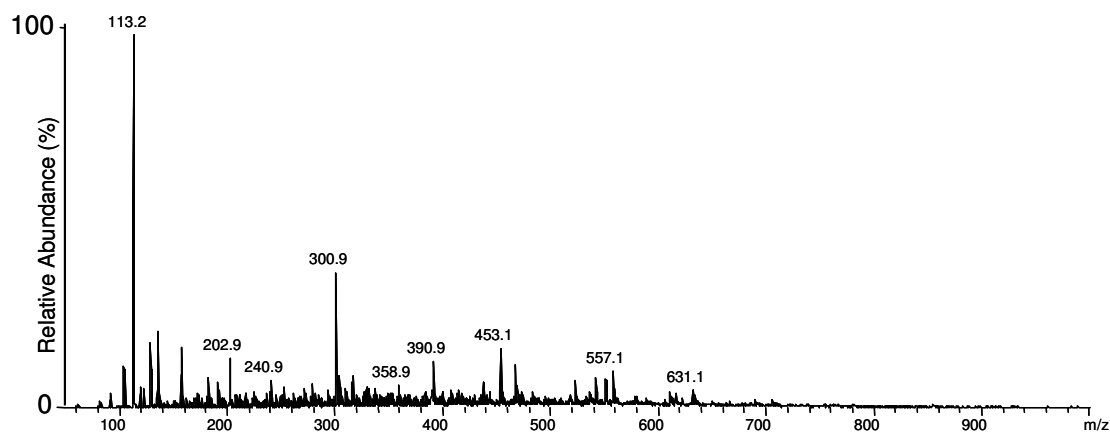


Figura 9 Perfil da amostra de humor vítreo 269/12 (*full scan*) por V-EASI-MS.

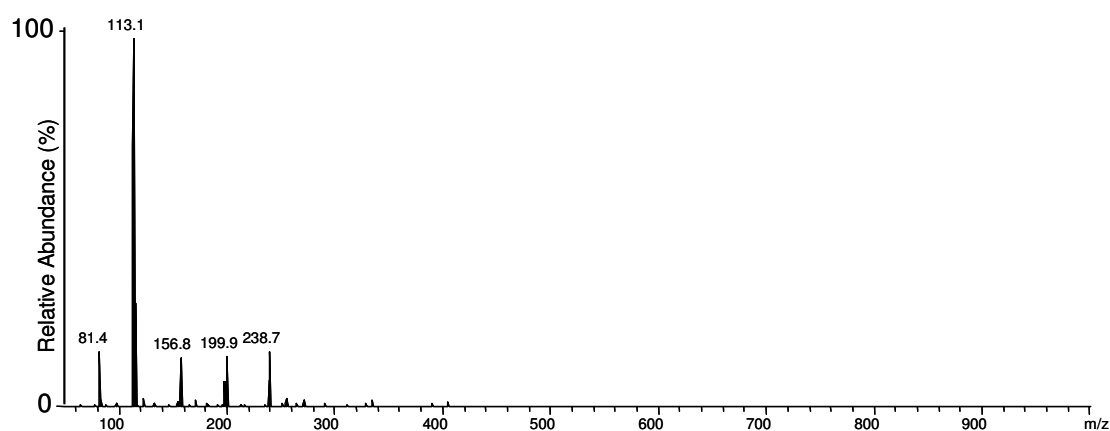


Figura 10 Perfil da amostra de humor vítreo 2323 (*full scan*) por V-EASI-MS.

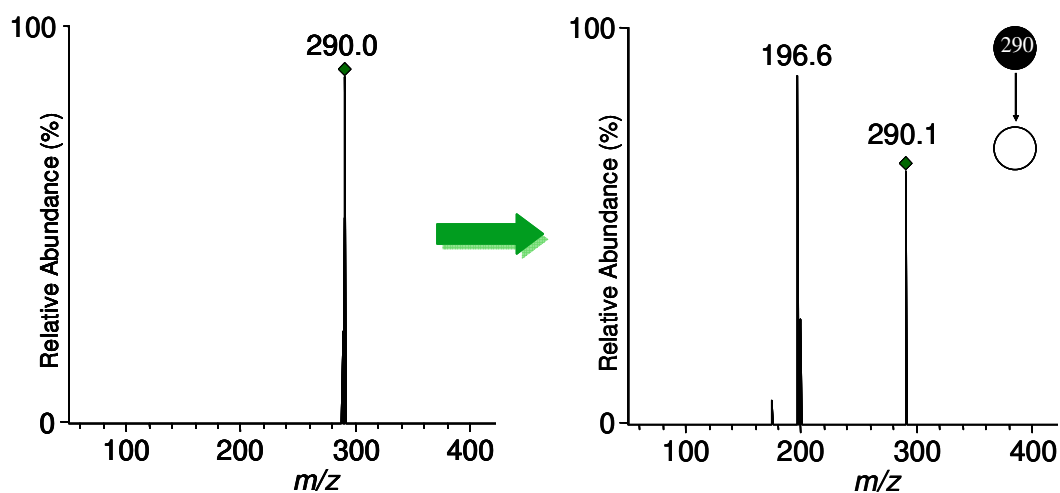


Figura 11 Fragmentações da benzoilecgonina por V-EASI-MS.

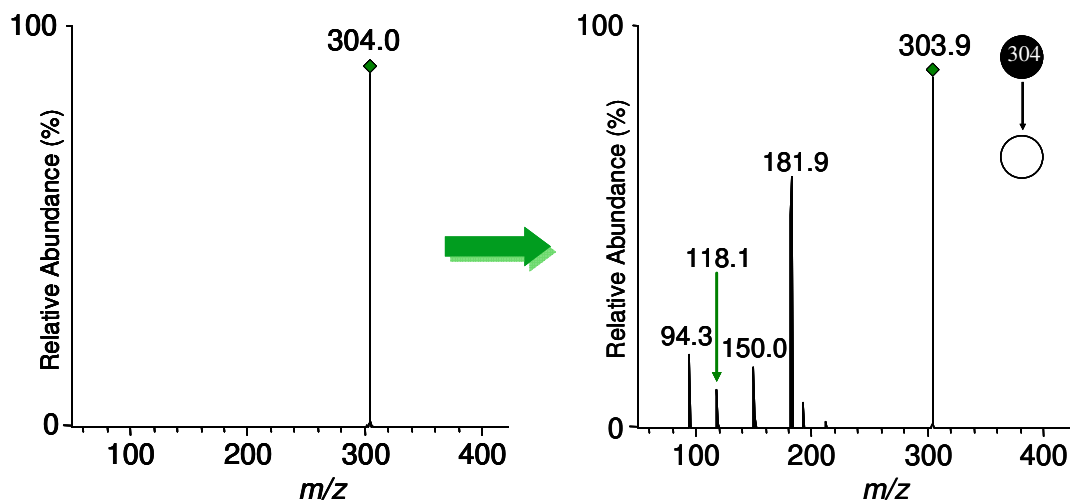


Figura 12 Fragmentações da cocaína por V-EASI-MS.

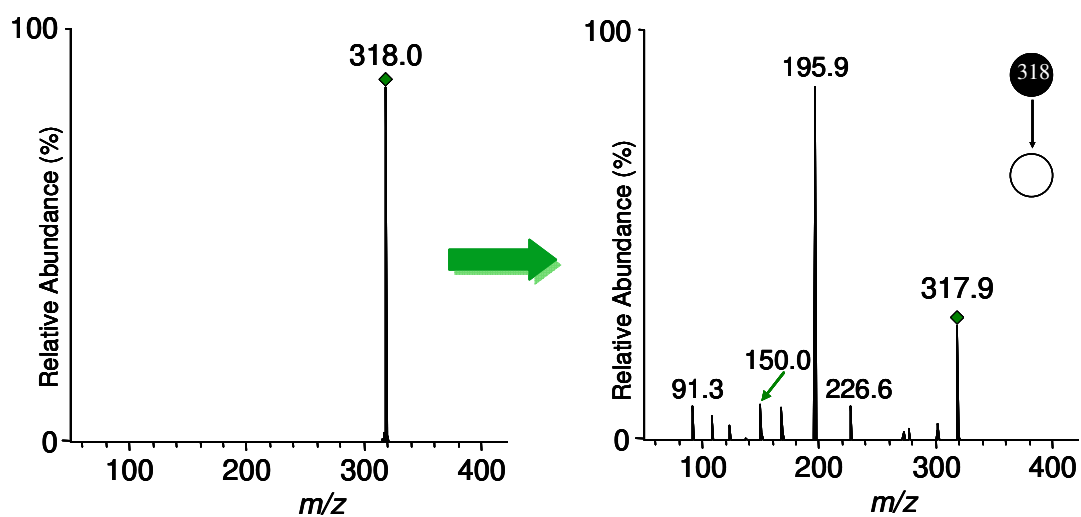


Figura 13 Fragmentações do cocaetileno por V-EASI-MS.

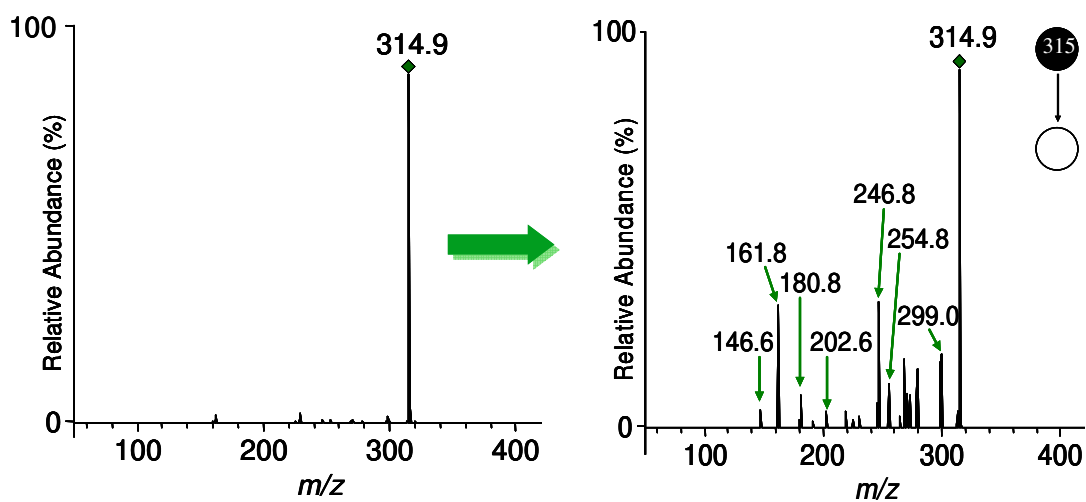


Figura 14 Fragmentações do Δ^9 -THC por V-EASI-MS.

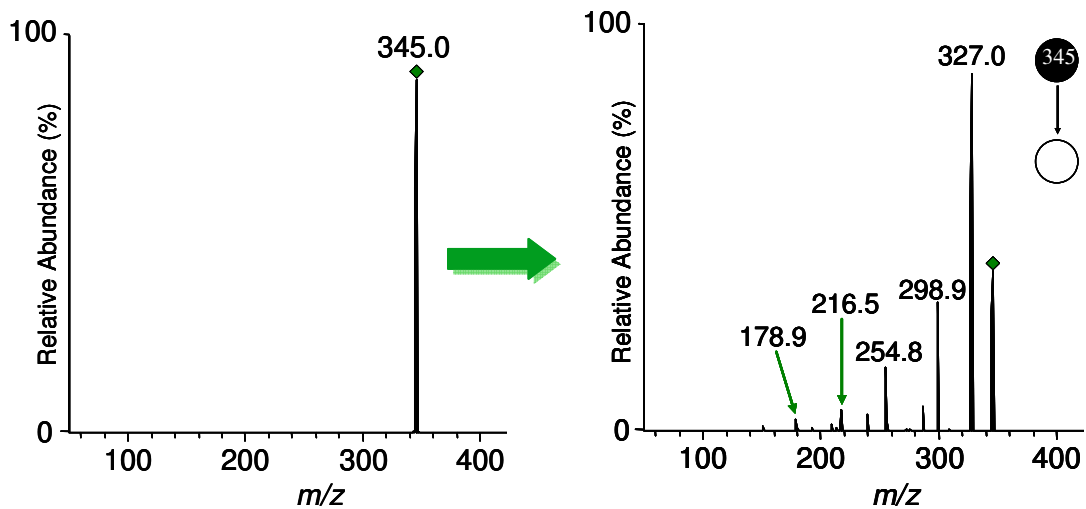


Figura 15 Fragmentações do 11-nor-9-carboxi-THC por V-EASI-MS.

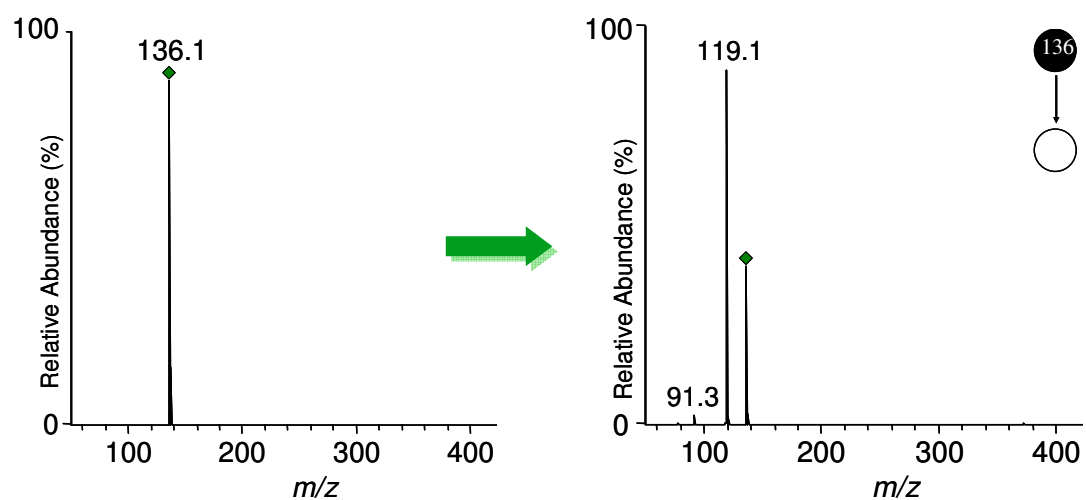


Figura 16 Fragmentações da anfetamina por V-EASI-MS.

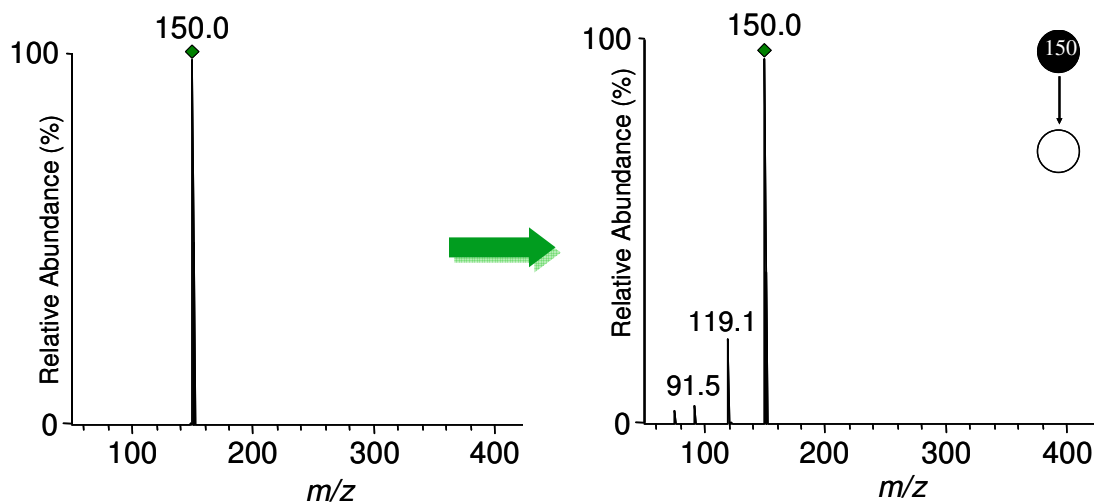


Figura 17 Fragmentações da metanfetamina por V-EASI-MS.

Tabela 5. Drogas de abuso encontradas no humor vítreo

Amostras	Metabólitos detectados	Íons de confirmação
HV _{248/12} – DB	bze	290,168
HV _{278/12} – DB	coc	304,182
HV ₂₃₂₃ – DB	ce	318,196
HV ₂₀₉₃ – NDB	Δ^9 -THC	315, 254
HV ₂₀₉₃ – NDB	THC-COOH	345, 254
HV _{269/12} – DB	anf	136,119
HV ₂₀₉₃ – DB	manf	150,119

DB – corpos em decomposição, NDB – corpos não-decompostos.

Por conseguinte, o humor vítreo é realmente a matriz para investigações forenses e toxicológicas devido à contaminação reduzida e traumatismos, e também devido a sua estabilidade analítica e esterilidade para um grande número de dias após a morte. Por conter pouca proteína, os constituintes podem ser extraídos como se estivessem numa solução tampão. O humor vítreo constitui também uma excelente amostra para a determinação de xenobióticos em corpos politraumatizados, carbonizados ou em decomposição envolvidos na *causa mortis*.

Os fragmentos mais abundantes nas Figuras 11, 12, 13, 14, 15, 16 e 17 são normalmente usados nas transições (290>168, 304>182, 318>196, 315>254, 345>254, 136>119, 150>119, respectivamente) normalmente selecionadas para confirmação e quantificação de bze, coc, ce, Δ^9 -THC, THC-COOH, anf e manf usando o modo MRM em análises HPLC-MS/MS.

3.4 Conclusão

No presente trabalho, a cocaína e seus metabolitos (figuras 11, 12 e 13), canabinóides (Figuras 14 e 15) e anfetaminas (Figuras 16 e 17) foram detectados no humor vítreo *post-mortem* (Tabela 5) analisado. Mediante o fato da fonte de ionização V-EASI, ser de fácil aplicação e instalação, não requerendo fluxo de eluente e os demais fatores utilizados nas fontes comerciais, essa se faz de extrema importância e simplicidade analítica para a análise de drogas de abuso na matriz humor vítreo tanto em corpos em decomposição quanto em corpos não-decompostos. Assim, o humor vítreo por encontrar-se isolado em um compartimento relativamente protegido de contaminação externa, invasão de microorganismos e traumatismos em geral, bem como, por sua simplicidade/estabilidade analítica e esterilidade durante um longo período após a morte, constitui-se como uma excelente amostra para análises toxicológicas em corpos politraumatizados, carbonizados ou em decomposição. Finalmente, o método proposto, baseado no screening por V-EASI-MS mostrou ser satisfatório na verificação *post-mortem*. Constitui, portanto, uma importante ferramenta de

"fingerprinting" em análises toxicológicas *post-mortem*, o que é essencial para a rotina tanto da toxicologia quanto da patologia forense.

4 CAPÍTULO 2

4.1 Objetivos

Desenvolver metodologia analítica para análise de drogas de abuso presentes em humor vítreo, empregando o uso de técnicas modernas de espectrometria de massas, no caso, a espectrometria de massas de ressonância ciclotrônica de íons por transformada de Fourier (FT-ICR-MS) acoplada à ionização por *eletrospray* (ESI).

4.1.1 Ionização por *Eletrospray* (ESI)

A técnica *electrospray* (ESI) foi inicialmente desenvolvida por M.Dole em 1968 e aplicada por J.B.Fenn para análise de moléculas pequenas e de proteínas. A fonte ESI transfere para a fase gasosa moléculas polares de diversos tamanhos e que frequentemente são termicamente instáveis, permitindo a análise por espectrometria de massas de biomoléculas, tais como proteínas. Fato antes impossível por técnicas clássicas como ionização por elétrons (EI), onde somente moléculas voláteis e termoestáveis poderiam ser ionizadas. Além disso, EI é muito energético, pois fragmenta as moléculas de tal maneira que o íon molecular pode não ser visualizado no espectro e a identificação do composto químico fica comprometida. O método ESI possui uma ionização branda, sendo capaz de ionizar moléculas até 600 Da na sua forma monocarregada, sem fragmentação, possibilitando a visualização de íons individuais em misturas complexas.⁴⁹⁻⁵⁰

Por trabalhar com moléculas em solução e ser compatível com os solventes mais frequentemente utilizados em HPLC com fase reversa (água, metanol e acetonitrila), a fonte ESI pode ser usada como interface entre métodos de separação por HPLC e de identificação dos compostos por espectrometria de massas (MS) ou seqüencial (MS/MSⁿ). Para facilitar a protonação de sítios básicos ou a desprotonação de sítios ácidos, é comum adicionar um agente modificador à solução. Para analisar as moléculas [M] básicas são adicionados 0,1 a 0,2% de ácido fórmico à solução o que permitirá a protonação mais rápida e eficiente do composto. Neste caso, ocorrerá a formação de íons $[M+H]^+$ e sua análise é feita em modo positivo. Para as moléculas ácidas adiciona-se 0,1 a 0,2% de solução de hidróxido de amônio à solução para facilitar a desprotonação da molécula, formando íons $[M-H]^-$ com a análise sendo realizada no modo negativo.

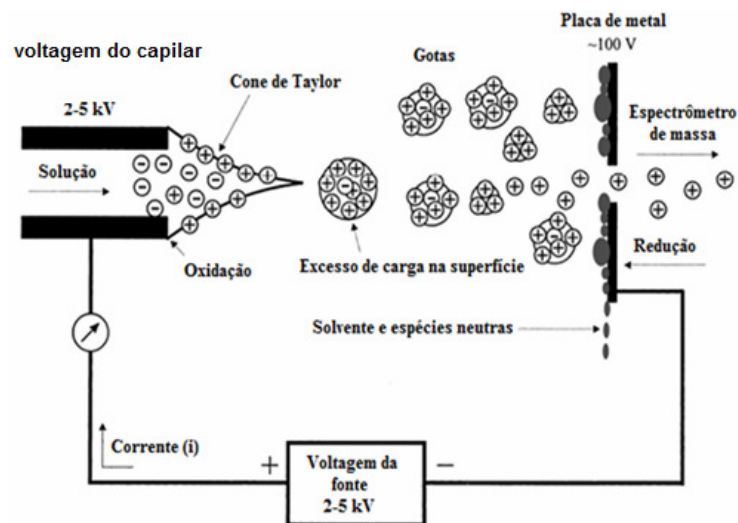


Figura 18 Desenho simplificado de uma fonte de ionização por *eletrospray*. Adaptado.⁴⁹

A **Figura 18** apresenta um desenho simplificado de uma fonte de ESI. A solução proveniente de uma bomba seringa ou um sistema de HPLC numa vazão de $1-15 \mu\text{L min}^{-1}$ é inserida no capilar em cuja extremidade é aplicada uma alta voltagem que poderá ser positiva quando a protonação (ionização no modo positivo) for requerida ou uma voltagem negativa quando a desprotonação (ionização no modo negativo) for desejada. O gás nitrogênio, mais empregado como gás nebulizador, é aquecido para facilitar ainda mais a volatilização. Dois mecanismos são propostos para a transferência dos íons do interior das gotículas para a fase gasosa: (1) a “evaporação” dos íons a partir da superfície das gotículas e (2) a subdivisão progressiva das gotículas com evaporação do solvente, sendo que na prática é provável que ocorram ambos os mecanismos. Ou seja, a transferência ocorre através da divisão e evaporação das gotas contendo um excesso de cargas (positivas ou negativas dependendo do modo de aquisição) e os íons são transferidos para a fase gasosa e atraídos para dentro do espectrômetro de massas através de um gradiente de potenciais. Uma contra corrente de gás nitrogênio é aplicada para evitar a formação de agregados de íons (*clusters*) e também para evitar a entrada de moléculas neutras para o interior do espectrômetro de massas.⁵¹

4.1.1.1 Espectrometria de massas de ressonância ciclôtrônica de íons por transformada de Fourier (FT-ICR-MS).

A Espectrometria de massas de ressonância ciclôtrônica de íons por transformada de Fourier (FT-ICR-MS) tem como base o princípio da ressonância ciclôtrônica de íons, na qual um íon inserido em um campo magnético se move em uma órbita circular de frequência ciclôtrônica (figura 19), sendo característica ou

seletiva a sua m/z . Os íons são excitados para uma órbita de maior raio, usando um pulso de campo elétrico de radiofrequência, onde sua imagem de carga é detectada em uma placa receptora de sinal no domínio do tempo. A transformação de Fourier do sinal no domínio de tempo resulta em um sinal no domínio de frequência, que é convertido em um espectro de massas com base na relação inversa entre a frequência ciclotrônica e a m/z .⁵²

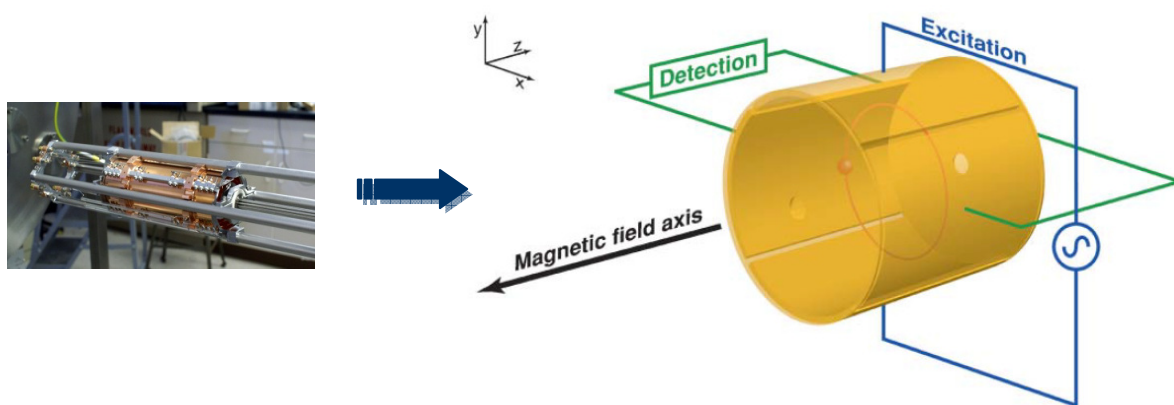


Figura 19 – Representação esquemática de uma cela analisadora FT-ICR cilíndrica.⁵³

Conforme isso, a FT-ICR-MS produz ultra-alta resolução e exatidão em análises de massas e seus valores de m/z exatos levam a exata composição molecular. Portanto, os equipamentos encontram erros abaixo de 1 ppm (partes-por-milhão) em condições operacionais normais, e a avaliação da fórmula molecular normalmente é inequívoca. Quando a ionização por *eletrospray* (ESI) é usada espécies moleculares suaves são formadas reduzindo a complexidade do espectro e produzindo informação composicional livre de fragmentos em misturas complexas. A FT-ICR-MS pode ser visto, portanto como um espectrômetro de fórmula molecular.⁵⁴⁻⁵⁵

Sabendo a composição molecular de cada constituinte, seu índice de ligação dupla equivalente (DBE) e número de carbonos (Cn) podem ser determinados.⁵⁴

Misturas complexas tais como extrato de produto natural própolis,⁵⁶ café,⁵⁷ whisky⁵⁸ e petróleo⁵⁹ podem ser portanto classificados.

4.2 Parte experimental

4.2.1 Material biológico (matriz humor vítreo)

As amostras de humor vítreo serão fornecidos pela Superintendência da Polícia Técnico-Científica (SPTC) da cidade de São Paulo, coletados nos Institutos Médico-Legais (IMLs) da zona oeste e sul. Este material será coletado mediante os seguintes critérios de:

- Inclusão: cadáveres putrefeitos de *causa mortis* desconhecida, onde é importante fazer o exame toxicológico para excluir a intoxicação; bem como, cadáveres não putrefeitos de *causa mortis* desconhecida, onde é importante fazer o exame toxicológico.
- exclusão: cadáveres putrefeitos/cadáveres não putrefeitos de *causa mortis* conhecida.
- grupo controle: o grupo controle será composto de cadáveres cuja *causa mortis* foi natural.

O material biológico será coletado através da utilização de punção com um trocarte com 0,51 mm de calibre externo, com bisel trifacetado e mandril metálico com calibre externo de 0,42 mm. O acesso ideal é a bissetriz dos ângulos dos quadrantes superiores do olho, com auxílio de afastadores de pálpebras, fugindo assim dos tecidos mais vascularizados, como o canto externo do olho. Todo o material retirado deve ser separado e identificado referente às amostras do olho esquerdo; bem como, do direito; conjunto a isso, deve ser acondicionado em tubos Vacutainer® da marca BD (REF 368521), de dimensões 13x75 mm com capacidade para 4 mL, contendo 6,0 mg do conservante químico fluoreto de sódio (NaF) e 12,0 mg de EDTA dissódico (Na₂EDTA). (Protocolos Éticos de Aprovação (ANEXOS I, II, III e IV)).

Em relação à cadeia de custódia, o material biológico seguirá os seguintes passos: o material coletado pelo técnico de necropsia do IML - Sr. Pedro Carlos Mollo Filho sob coordenação do médico legista responsável Sr. Ruggero Bernardo Felice Guidugli será lacrado e receberá uma numeração com registro em livro próprio, que ficará no necrotério. Estabeleceu-se como parâmetro de quantidade necessária de material, num total de 250 amostras. O material será encaminhado ao laboratório de Lesões Oxidativas sobre a coordenação da Profª Dra. Nelci Fenalti Höehr, onde será recebido pelo pesquisador Sr. Júlio César Santos Júnior registrado e armazenado em freezer adequado a - 80 °C, cujo acesso é restrito à Profª Dra. Nelci Fenalti Höehr e ao pesquisador Sr. Júlio César Santos Júnior; os exames serão realizados pelo pesquisador Sr. Júlio César Santos Júnior e os

resultados constarão de um laudo que será encaminhado ao IML para ser anexado no laudo definitivo no prazo máximo de 60 dias para contribuir para a elucidação da causa da morte (*causa mortis*); os resíduos serão armazenados durante 6 meses, caso haja necessidade de contra prova, antes de serem dispensados.

4.2.2 Análise metabolômica de cocaína

4.2.2.1 Preparação de amostra

As amostras de humor vítreo analisadas (ambos controles e casos) foram classificadas em grupo controle de corpos em decomposição (DBCG) e 2 amostras-caso A1 (3 dias de período *post-mortem*), A2 (7 dias de período *post-mortem*) coletadas entre Junho e Setembro de 2012 (Tabela 6).

Tabela 6. Perfil das amostras de humor vítreo e período *post-mortem*

Identificação das amostras		Período <i>post-mortem</i>	Identificação das amostras		Período <i>post-mortem</i>
DBCG	2223 – R/DB 2223 – L/DB 2227 – R/DB 2227 – L/DB	3 DIAS	A1	269/12 – L/DB	3 DIAS
				278/12 – R/DB	
				278/12 – L/DB	
			A2	248/12 – R/DB	7 DIAS
				248/12 – L/DB	
				256/12 – R/DB	
				256/12 – L/DB	

R – direito / L – esquerdo olho, DB – corpos em decomposição, DBCG – grupo controle de corpos em decomposição, e amostras-caso A1 e A2.

As amostras de humor vítreo (10 µL) foram dissolvidas em 1 mL de metanol. 100 µL de humor vítreos (diluído 100x) foram fortificadas com 50 µL de soluções de cocaína e cocaetileno de 100 ng mL⁻¹ ambas diluídas em 1 mL de metanol com 0.1% ácido fórmico (DBCG).

4.2.2.2 Espectrometria de massas

Para as análises no modo iônico positivo, as amostras foram colocadas em um compartimento para 96 amostras (200 µL de volume total em cada container), e 10 µL foi injetado mediante o uso do sistema robótico Advion TriVersa NanoMate[®].⁶⁰ A *m/z* da cocaína protonada e seu metabólito foram então monitoradas por FT-ICR-MS em um espectrômetro de massas LTQ-FT Ultra

(Thermo Scientific, Bremen, Germany) acoplado a uma fonte de ionização por *electrospray* (ESI). A Tabela 7 resume as principais condições usadas.

Tabela 7. Condições operacionais e parâmetros usados na determinação usando FT-ICR-MS

Parâmetros	
Fonte de ionização	ESI
Modo iônico	+
Volume de injeção (µL)	10
Pressão do Gás (psi)	0,45
Voltagem do Capilar (kV)	1,85
Temperatura do Capilar (°C)	280

4.3 Resultados e discussão

Via ESI(+) FT-ICR-MS, os perfis das amostras de humor vítreo intactas foram obtidos. As Figuras 20, 21, 22, 23 e 24 mostram espectros característicos para amostras de humores vítreos. Tais perfis foram considerados similares para as amostras de mesmo período, mas variaram muito devido a diferente composição bioquímica em diferentes períodos *post-mortem*. Essa variação tem sua origem muito provavelmente no estado fisiológico do doador, que é influenciado, por exemplo, pelo: estado clínico (sistema imune, doenças clínicas pregressas e fatores genéticos), estado nutricional, gênero e idade.

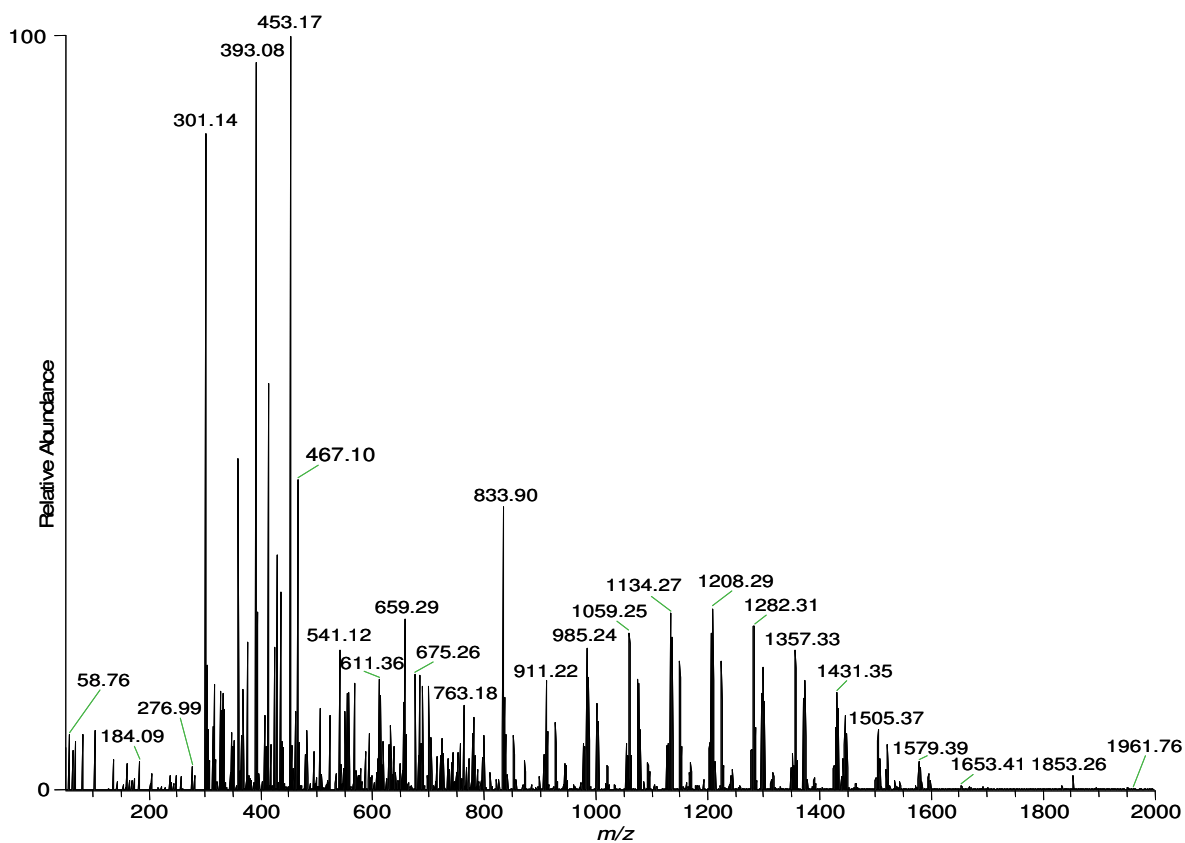


Figura 20 – Perfil típico ESI(+)-FT-ICR-MS da amostra de humor vítreo 248/12 para o período de 7 dias *post-mortem*.

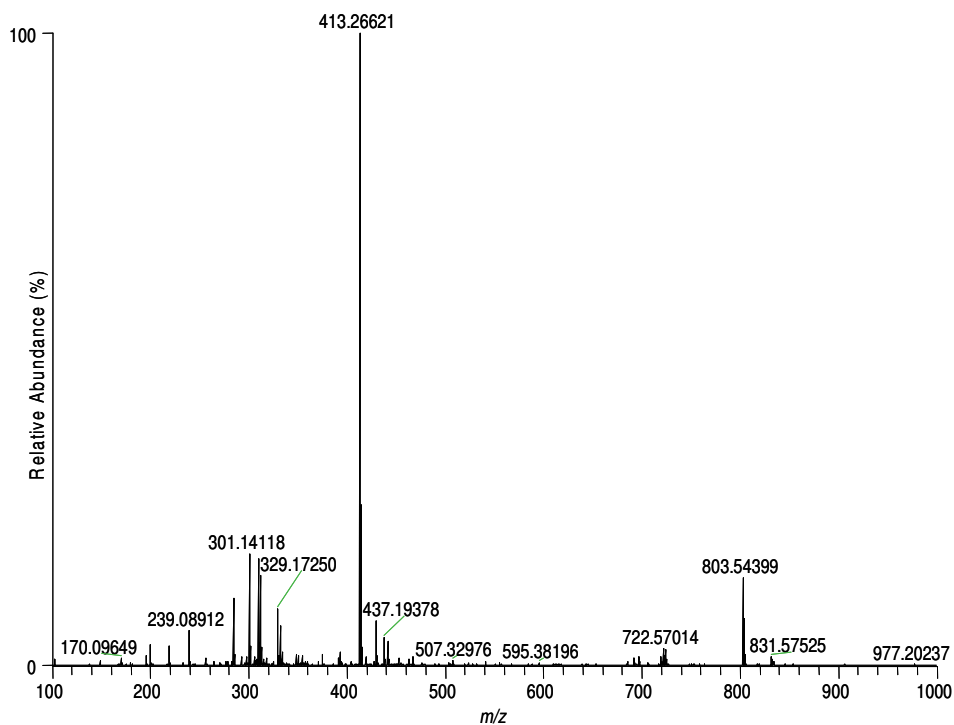


Figura 21 – Perfil típico ESI(+)-FT-ICR-MS da amostra de humor vítreo 256/12.

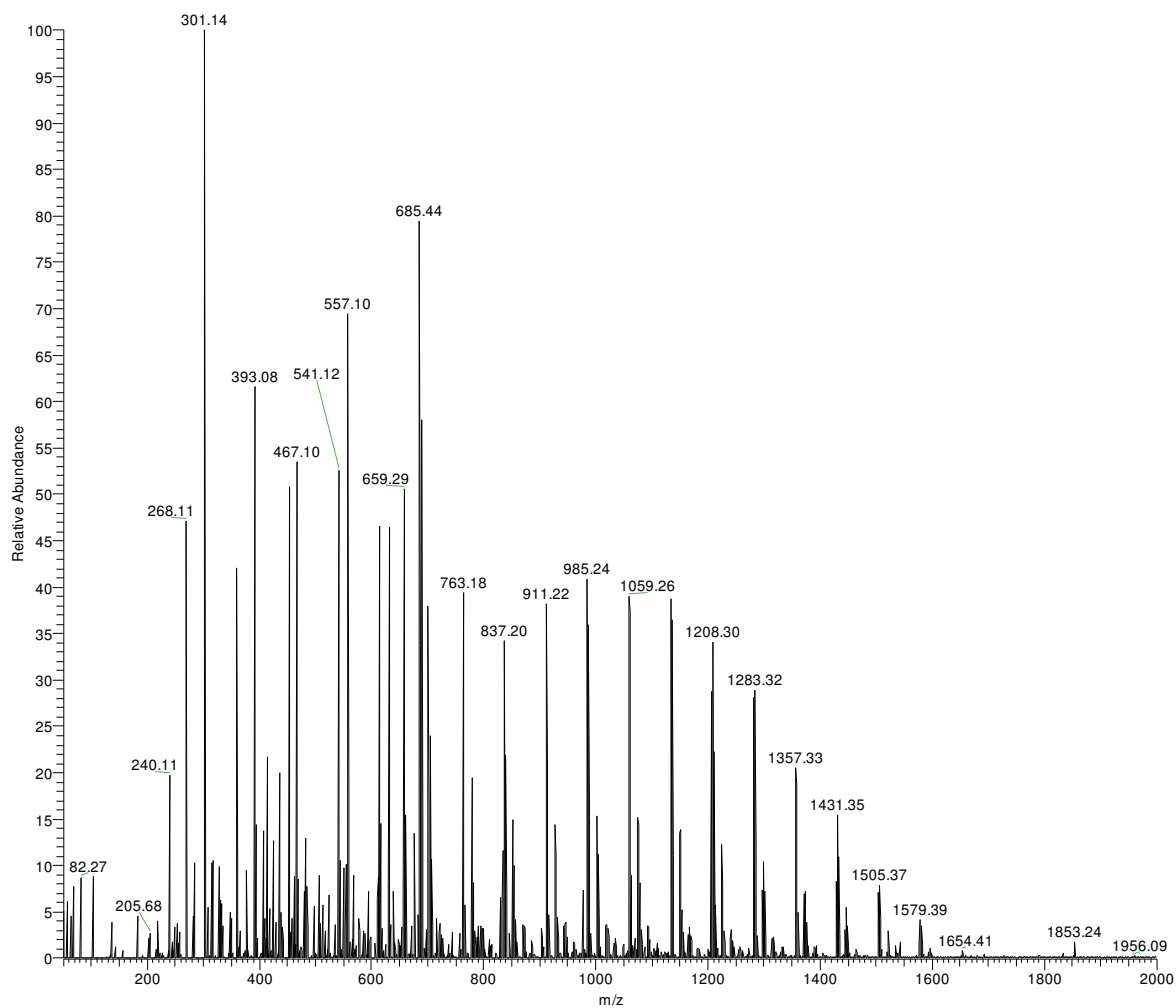


Figura 22 – Perfil típico ESI(+)-FT-ICR-MS da amostra de humor vítreo 2223 para o período de 3 dias *post-mortem*.

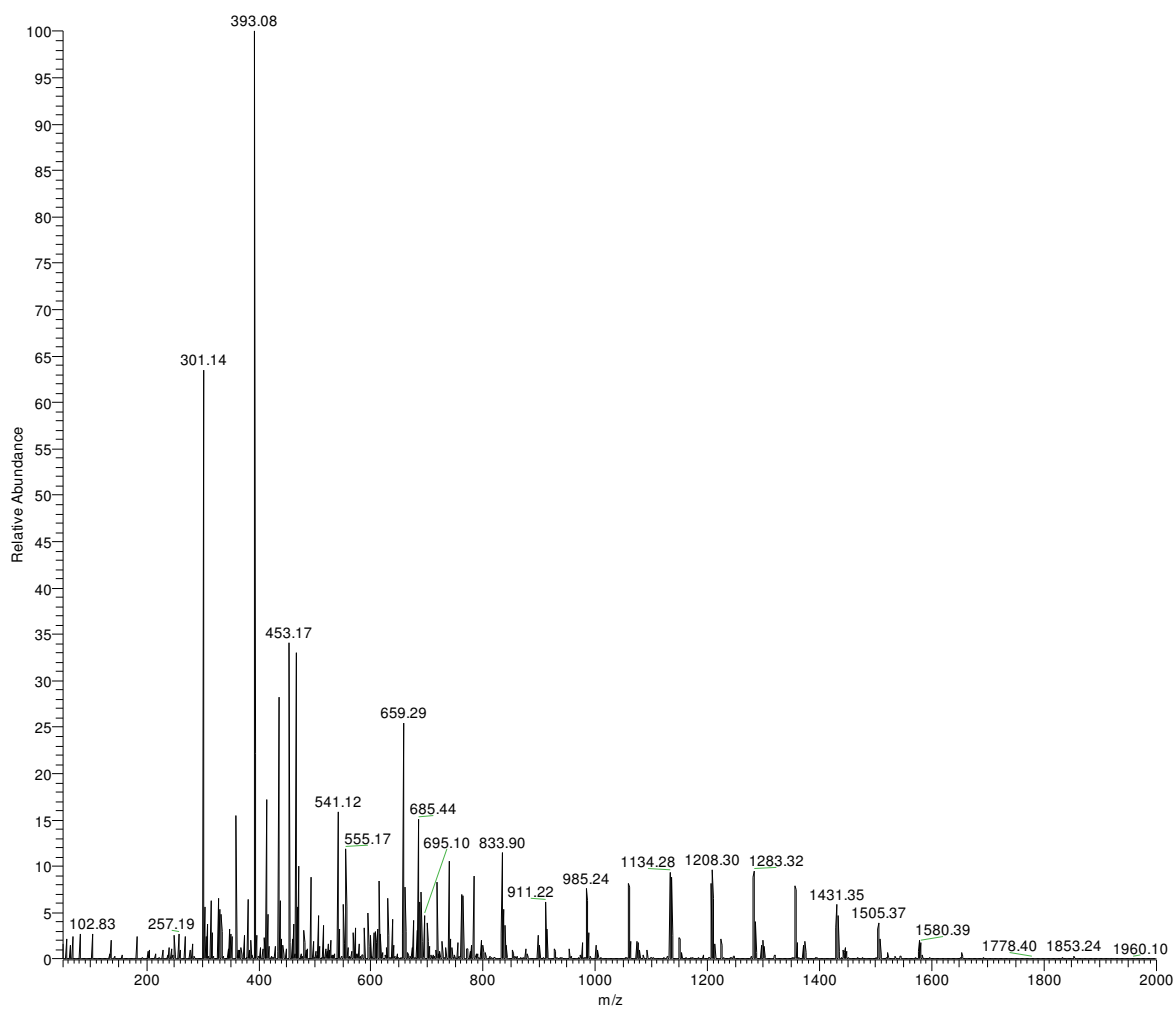


Figura 23 – Perfil típico ESI(+)-FT-ICR-MS da amostra de humor vítreo 278/12.

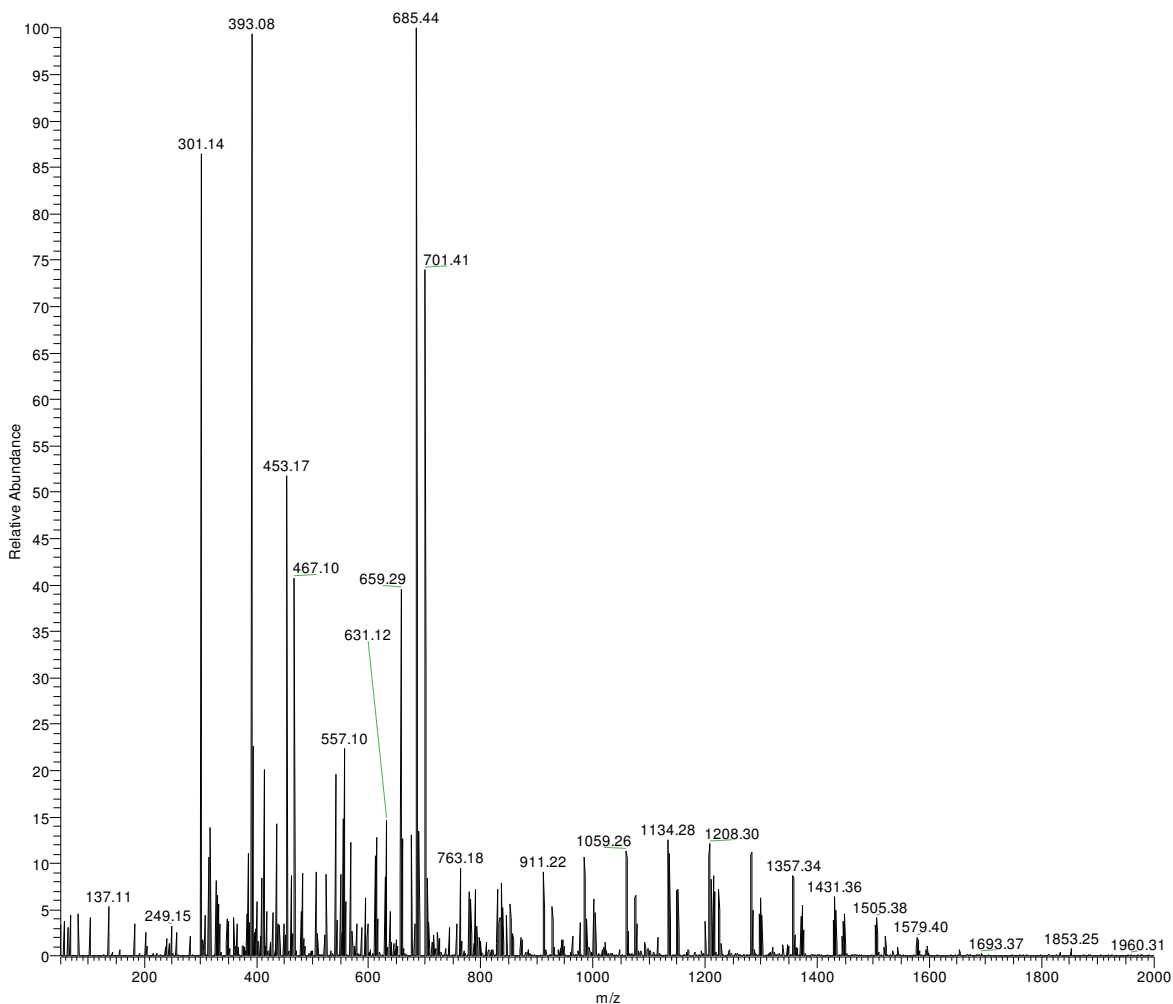


Figura 24 – Perfil típico ESI(+)-FT-ICR-MS da amostra de humor vítreo 2227 para o período de 3 dias *post-mortem*.

As Figuras 25 e 26 ilustram bem, o ESI(+) FT-ICR-MS de humor vítreos fortificados com tão pouco como 100 ng mL^{-1} de cocaína e cocaetileno permitindo a adequada caracterização destas duas moléculas no fluido em decomposição devido a detecção das formas protonadas de m/z 304 e 318. Nota-se a análise de massa com alta precisão (A) bem como, que os padrões de fragmentação característicos foram determinados por experimentos MS/MS (B) e MS^3 (C). Esses dois metabólitos estavam também bem ionizados por ESI(+), o que, portanto, facilita a sua detecção no meio de moléculas presentes em humor vítreos em decomposição.

Os efeitos de matriz também foram minimizados devido à altíssima resolução e precisão da análise FT-ICR-MS que funciona como um método eficiente de separação com base em diferentes valores de m/z , mesmo para moléculas isobáricas (com a mesma massa nominal). Felizmente, para as

amostras de humor vítreo do “mundo real” (Figuras 27 e 28), cocaína para as amostras 269 e 278 e cocaetileno para as amostras 248 e 256 puderam ser bem caracterizadas mesmo depois do período *post-mortem* de 3 dias e 7 dias, respectivamente.

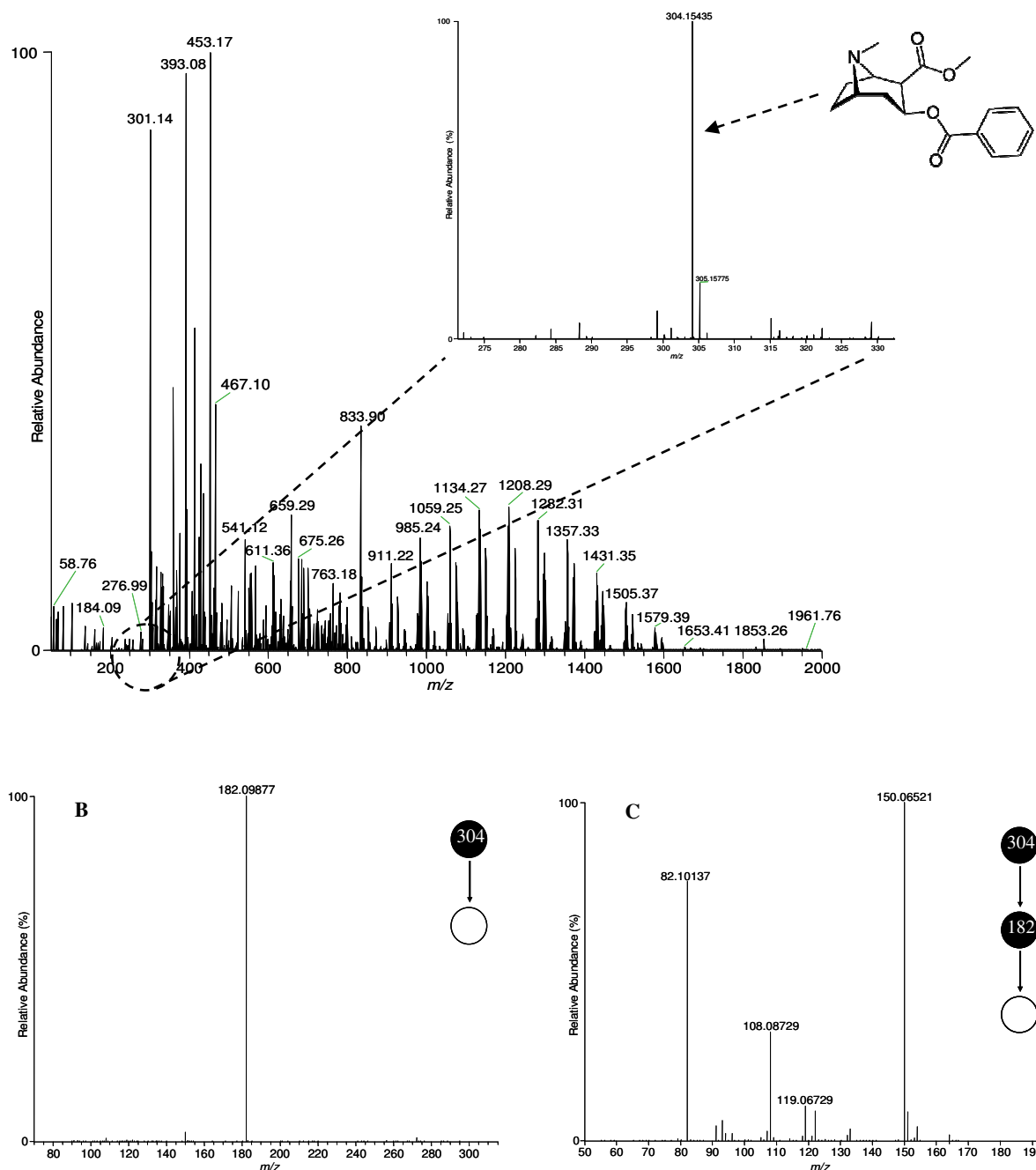


Figura 25 – ESI(+)-FT-ICR-MS de uma amostra de humor vítreo fortificada com 100 ng mL^{-1} de cocaína e (B) MS/MS da molécula protonada de cocaína de m/z 304 e (C) MS³ do íon fragmento 182.

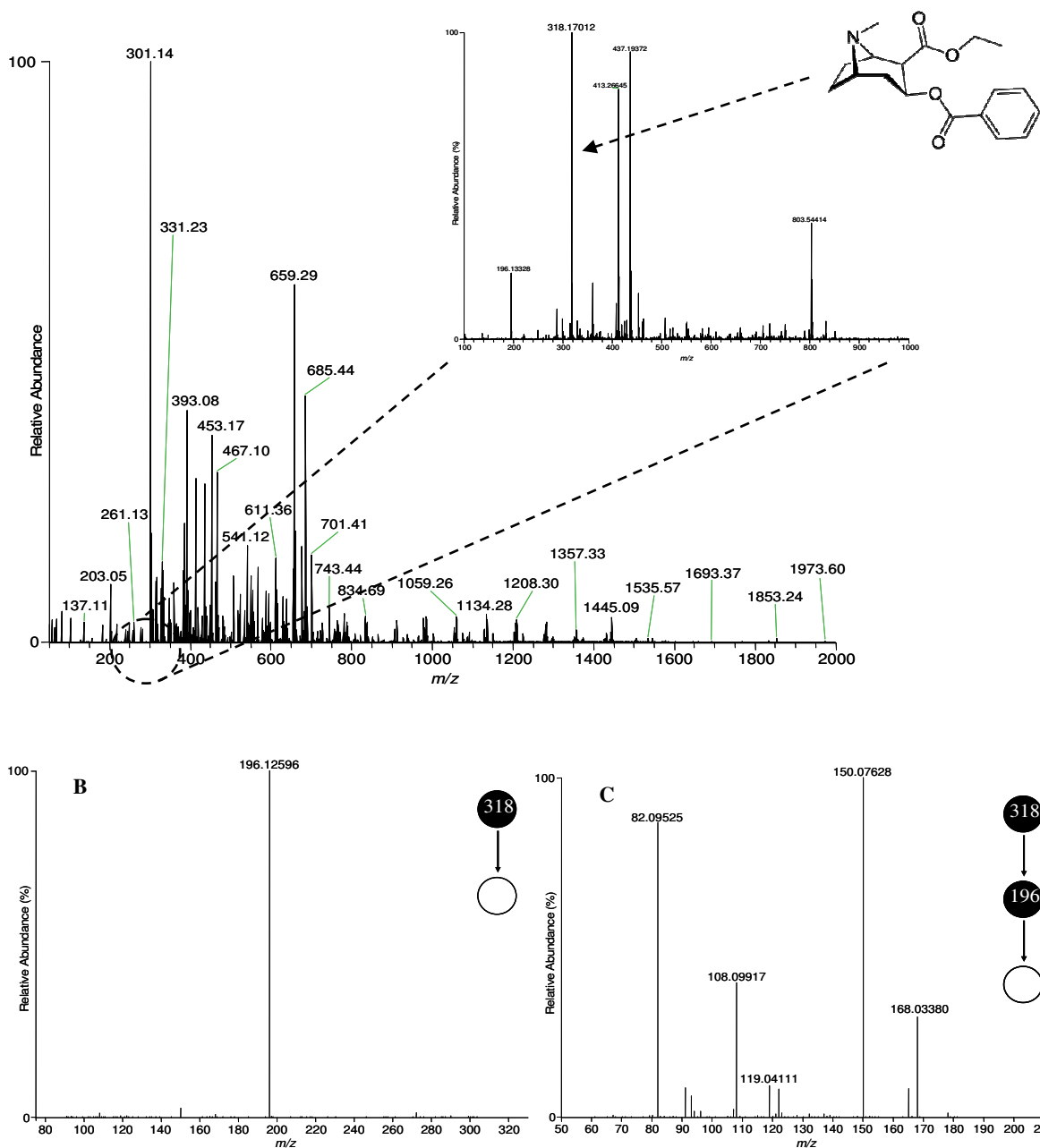


Figura 26 – ESI(+)-FT-ICR-MS de uma amostra de humor vítreo fortificada com 100 ng mL^{-1} de cocaeteno e (B) MS/MS da molécula protonada de cocaeteno de m/z 318 e (C) MS³ do íon fragmento 196.

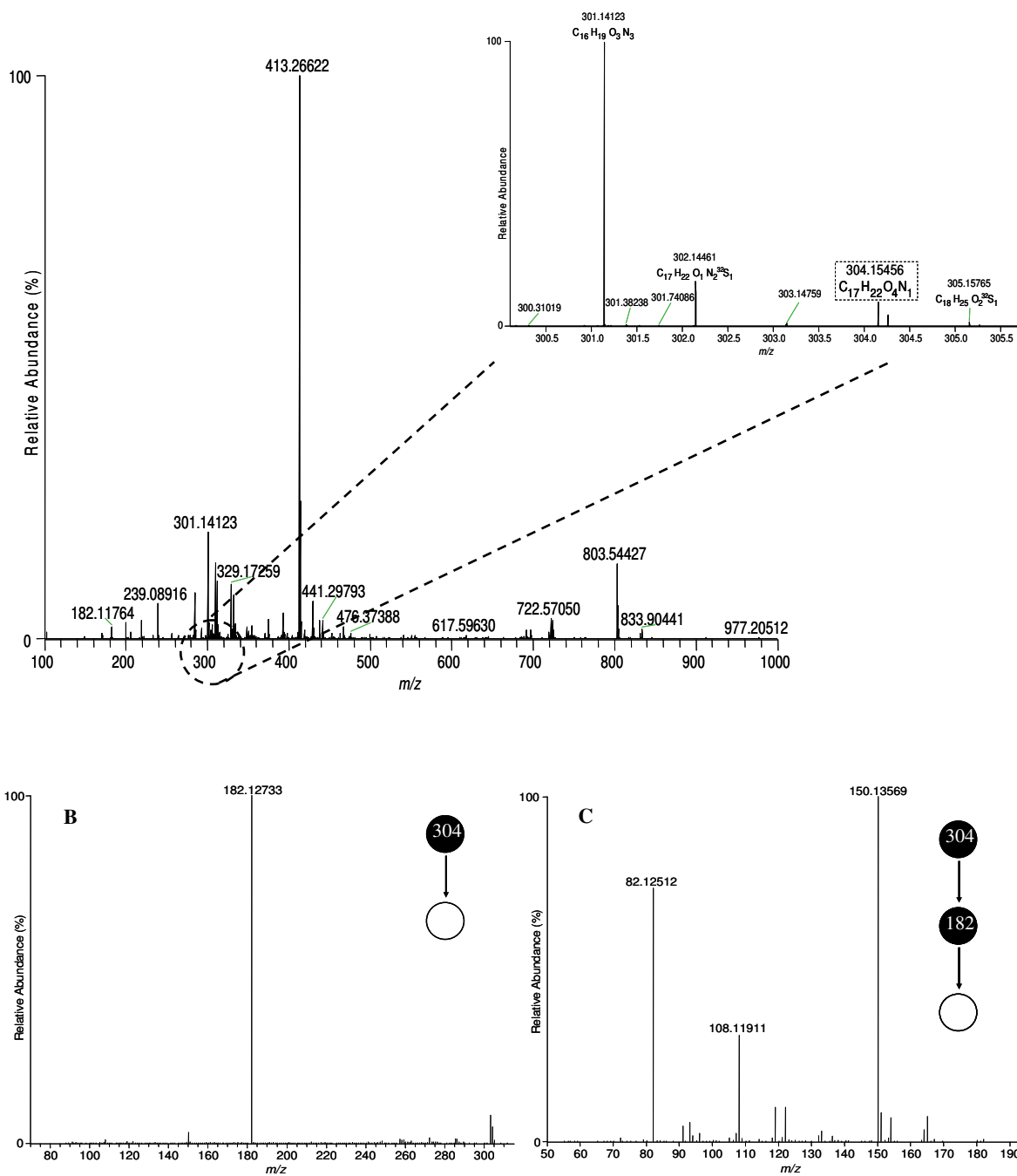


Figura 27 – Confirmação da cocaína no humor vítreo (248/12 – R/DB) por ESI(+) FT-ICR-MS e experimentos MSⁿ.

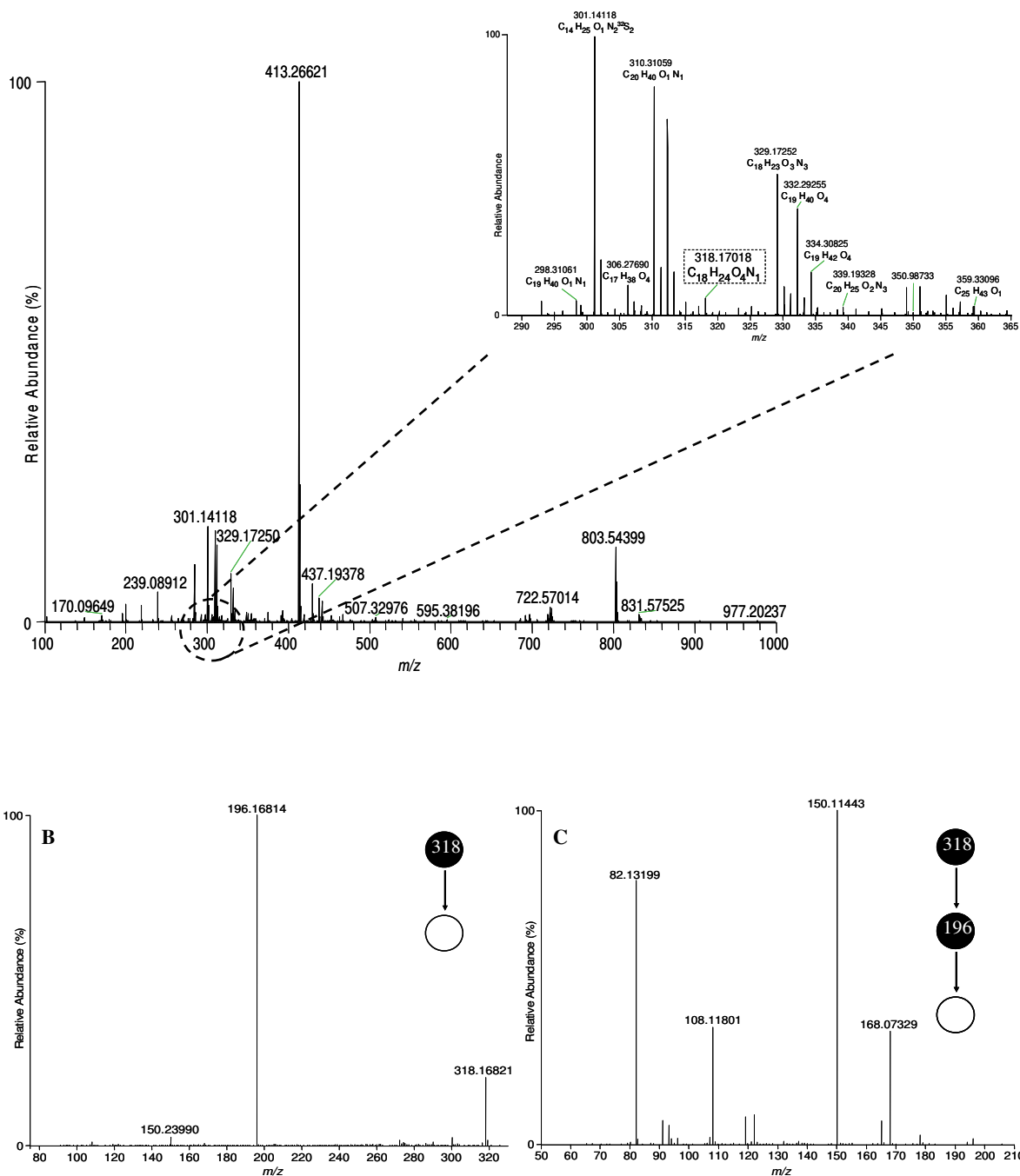


Figura 28 – Confirmação do cocaetileno no vítreo (256/12 – R/DB) por FT-ICR-MS: espectro *full scan* (A), íon m/z 318 (B) e fragmentações MS/MS do íon m/z 196.

Tabela 8. Resultado da análise metabolômica para cocaína e cocaetileno por FT-ICR-MS

Amostras	Fórmula [M-H] ⁺	Massa Teórica	Massa Experimental	Erro (ppm)	Fórmula [M-H] ⁺	Massa Teórica	Massa Experimental	Erro (ppm)
248/12 – R/DB	Cocaína C ₁₇ H ₂₂ N ₁ O ₄	304,15433	304,15440	0,214	Cocaetileno C ₁₈ H ₂₄ N ₁ O ₄	318,17012	318,16997	-
248/12 – L/DB			304,15451	0,575			318,17005	0,047
256/12 – R/DB			304,15449	0,510			318,16989	-
256/12 – L/DB			304,15453	0,641			318,17003	0,299
269/12 – L/DB			304,15446	0,411			318,17016	0,141
278/12 – R/DB			304,15449	0,510			318,17020	0,550
278/12 – L/DB			304,15439	0,181			318,17015	0,676
2223 – R/DB			304,15451	0,575			318,17010	0,518
2223 – L/DB			304,15439	0,181			318,17019	0,361
2227 – R/DB			304,15452	0,608			318,17019	0,644
2227 – L/DB			304,15440	0,214			318,17013	0,644
								0,456

É sabido que em sangue ou em soluções aquosas em geral, incluindo, portanto o humor vítreo, a cocaína (coc) é rapidamente degradada. *In vivo*, cocaína é rapidamente inativada pela ação de esterases hepáticas e colinesterase plasmática (PChE) para formar ecgonina metiléster (EME) ou por hidrólise espontânea a benzoilecgonina (bze). Ambos os metabólitos são ainda mais hidrolisados para ecgonina (ECG). Na presença de etanol, a cocaína também é convertida em cocaetileno (ce) por uma reação de transesterificação no fígado, sendo adicionalmente transformada em norcocaetileno (Norce) e éster etílico de ecgonina (EEE) (Figura 4). A presença de etanol também aumenta a desmetilação da cocaína para o metabólito ativo norcocaína (Ncoc).⁴⁵ Além disso, a cocaína é constantemente degradada em amostras de sangue, plasma ou humor vítreo não-estabilizadas até o tempo de análise. Portanto, o metabólito bze é considerado como o analito alvo mais viável na investigação de casos forenses utilizando amostras de humor vítreo com a suspeita de abuso prévio de cocaína.⁴⁵

Mas se a bze estiver ausente nas amostras de humor vítreo testadas, somente a cocaína e cocaetileno poderiam ser detectados. Parece que a cocaína é muito mais preservada em humor vítreo em comparação com plasma e urina.

O humor vítreo é realmente a matriz para investigações forenses e toxicológicas devido à contaminação reduzida e traumatismos, e também devido a sua estabilidade analítica e esterilidade para um grande número de dias após a morte. Por conter pouca proteína, os constituintes podem ser extraídos muitas vezes como se estivessem numa solução tampão. O humor vítreo constitui também uma excelente amostra para a determinação de xenobióticos em corpos politraumatizados, carbonizados ou em decomposição envolvidos na *causa mortis*.

Para uma detecção inequívoca da cocaína, MS/MS e MS³ são de fato

benéficos. A Figura 25 mostra que os íons fragmentos de m/z 182 ($[M+H-PhCO_2H]^+$ e m/z 82 ($C_5H_8N^+$) são mais abundantes e característicos na MS/MS da cocaína protonada, enquanto que o íon de m/z 182 mostra um padrão rico de fragmentação.⁶¹ Para o cocaetileno, a Figura 26 mostra que o íon fragmento de m/z 196 ($C_{10}H_{14}NO_3^+$) e m/z 150 ($C_9H_{12}NO^+$) são mais abundantes no MS/MS de suas moléculas protonadas,⁶² considerando que o MS³ da íon fragmento de m/z 196 também é diversificado e muito característico.

Os fragmentos mais abundantes nas Figuras 25 e 26 são normalmente usados nas transições (304>182 / 304>82 e 318>196 / 318>150, respectivamente) normalmente selecionadas para identificação, confirmação e quantificação de cocaína e cocaetileno usando o modo MRM em análises HPLC-MS/MS.

Como mostra a Tabela 3, os dois principais metabólitos resultantes de uso de cocaína (cocaína e cocaetileno) puderam ser inequivocamente identificados com alta resolução e exatidão via análise direta ESI(+) FT-ICR-MS(/MS) de amostras de humor vítreo. Os erros encontrados nos valores m/z experimentais em comparação com os valores teóricos, em ambos os metabólitos foram inferiores a 1 ppm, demonstrando a viabilidade analítica do método sugerido.

4.4 Conclusão

Embora os perfis das amostras de humor vítreos como revelado pela monitorização por ESI(+) MS, mostraram uma grande variabilidade na sua composição (bio)química em função do período *post-mortem*, devido às intensas atividades dos fenômenos putrefativos, que também promovem a degradação do metabólito, ainda a cocaína e cocaetileno puderam ser tanto identificados e confirmados com precisão em amostras fortificadas, bem como, humor vítreos reais coletados de corpos em decomposição com diferentes tempos *post-mortem* via análise ESI(+)FT-MS direta, rápida e livre de separação.

A ultra-alta resolução e precisão da análise MS, eliminou interferências isobáricas e permitiu a detecção inequívoca desses metabólitos, que também foi corroborado por scans MS/MS e MS³.

A análise metabolômica por ESI(+)FT-ICR-MS através da análise direta de humor vítreos provou, portanto, fornecer uma ferramenta confiável nas investigações forenses e toxicológicas na pesquisa de drogas de abuso, como demonstrado aqui para cocaína e além do uso de cocaína e álcool. Ao todo, a metabolômica *post-mortem* de humor vítreos via FT-ICR-MS parece fornecer uma ferramenta rápida, segura e bastante abrangente em toxicologia *post-mortem* e patologia forense.

5 REFERÊNCIAS

- 1 IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo demográfico 2010 – Características da população e dos domicílios**. Rio de Janeiro, 270 pp., 2011.
- 2 NOTO, A. R.; GALDURÓZ, J. C. F. **Use and prevention of psychotropic drugs**. Ciência & Saúde Coletiva, Brazil, n. 4, v. 1, pp. 145-151, 1999.
- 3 NOTO A. R.; CARLINI E. A.; SANCHEZ, Z. V. D. M.; CARLINI, C. M. A.; LOCATELLI, D. P.; ABEID, L. R.; AMATO, T. C.; OPALEYE, E. S.; TONDOWSKI, C. S.; MOURA, Y. G. **VI Levantamento Nacional sobre o Consumo de Drogas Psicotrópicas entre Estudantes do Ensino Fundamental e Médio das Redes Pública e Privada de Ensino nas 27 Capitais Brasileiras** – Centro Brasileiro de Informações Sobre Drogas Psicotrópicas, Departamento de Psicobiologia, Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 1 ed, 506 pp., 2010.
- 4 BARROSO, M.; GALLARDO E.; VIEIRA D. N.; QUEIROZ J. A.; LÓPEZ-RIVADULLA M. **Bioanalytical procedures and recent developments in the determination of opiates/opioids in human biological samples**. Anal Bioanal Chem., Portugal, v. 400, pp. 1665–1690, 2011.
- 5 FERNÁNDEZ, A. A.; AMIGÓ, N.; CARBONÉ, M. T.; MORA, A.; PINTO, M.; BELTRAN, J.; GASSÓ, S. **Application of the Cozart DDS system to postmortem screening of drugs of abuse in vitreous humor**. Forensic Toxicol., Spain, v. 27, pp. 90–93, 2009.
- 6 FERNÁNDEZ, P.; SEOANE, S.; VÁZQUEZ C.; TABERNERO, M. J.; CARRO, A. M.; LORENZO R. A. **Chromatographic determination of drugs de abuse in vitreous humor using solid-phase extraction**. J. Appl. Toxicol., Spain, v. 32, pp. 1099-1263, 2012.
- 7 MOREAU, R. L. DE MORAES; DE SIQUEIRA, M. E. P. B. **Toxicologia Analítica**. 1. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2008, 344p.
- 8 TRIPATHI, K. D. **Farmacologia Médica** 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 796p.
- 9 BRUNET, B., DOUCET, C., VENISSE, N., HAUET, T., HÉBRARD, W., PAPET, Y., MAUCO, G., MURA, P. **Validation of Large White Pig as an animal model for the study of cannabinoids metabolism: Application to the study of THC distribution in tissues**. Forensic Sci. Int., France, v. 161, pp. 169-174, 2006.

- 10 KUGELBERG, F. C., JONES, A. W. **Interpreting results of ethanol analysis in postmortem specimens: a review of the literature.** Forensic Sci. Int., Sweden, v. 165, pp. 10-29, 2006.
- 11 THIERAUF, A., MUSSHOFF, F., MADEA, B. **Post-mortem biochemical investigation of vitreous humor.** Forensic Sci. Int., Germany, v. 192, pp. 78-82, 2009.
- 12 FLANAGAN, R. J.; TAYLOR, A. A.; WATSON, I. D.; WHELPTON, R. **Fundamentals of Analytical Toxicology.** 1. ed. London, Wiley-Blackwell, pp. 38-39, 2008.
- 13 JENKINS, A., OBLOCK, J. **Phencyclidine and cannabinoids in vitreous humor.** Legal Med. New York, v. 10, pp. 201-203, 2008.
- 14 MOORE, K. L.; DALLEY, A. F. **Anatomia Orientada Para a Clínica.** 5. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2007, 1142 p.
- 15 LANG, G. K. **Ophthalmology: A Pocket Textbook Atlas.** 2. ed. New York, Thieme, pp.287,289, 2006.
- 16 JONES, G. R. Postmortem Toxicology. In: MOFFAT, A. C.; OSSELTON, M. D.; WIDDOP, B.; JICKELLS, S.; NEGRUSZ, A. Clarke's **Analytical Forensic Toxicology.** 1. ed. London: Pharmaceutical Press, pp. 194-195, 211, 2008.
- 17 FUCCI, N., DE GIOVANNI, N., DE GIORGIO, F. LIDDI, R., CHIAROTTI, M. **An evaluation of the Cozart® RapiScan system as an on-site screening tool for drugs of abuse in a non-conventional biological matrix: vitreous humor.** Forensic Int., Italy, v. 156, pp. 102-105, 2005.
- 18 DE LETTER, E. A., BOUCHE, M. P. L. A., BOCXLAER, J. F. V., LAMBERT, W. E. PIETTE, M. H. A. **Interpretation of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) blood level: discussion by means of a distribution study in two fatalities.** Forensic Sci. Int., Belgium, v. 141, pp. 85-90, 2003.
- 19 HEPLER, B. R.; ISENSCHMID, D. S. Specimen Selection, Collection, Preservation, and Security. In: KARCH, S. B. **Postmortem Toxicology of Abused Drugs.** USA: CRC Press, pp. 18, 21-22, 2007.
- 20 MADEA, B., RÖDING, A. **Time of death dependent criteria in vitreous humor – Accuracy of estimating the time since death.** Forensic Sci. Int., Germany, v. 164, pp. 87-92, 2006.
- 21 DRUMMER, O. H. **Postmortem toxicology of drugs of abuse.** Forensic Sci. Int., Australia, v. 142, pp. 101-113, 2004.
- 22 LOUGH, P. S.; FEHN, R. **Efficacy of 1% sodium fluoride as a preservative in urine samples containing glucose and Candida albicans.** J. Forensic Sci., v. 38, pp. 266-271, 1993.

- 23 DE FRANÇA, G. V. **Medicina Legal**. 8. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, pp. 404, 2008.
- 24 SOLTYSZEWSKI, I., JANICA, A. N., PEPIŃSKI, W., SPÓLNICKA, M., ZBIEC, R., JANICA, J. **Vitreous humour as a potential DNA source for postmortem human identification**. *Folia His. Poland*, v. 45, n. 2, pp. 135-136, 2007.
- 25 BARÚS, J. I. M., SUÁREZ-PENARANDA, J. M., OTERO, X. L., RODRÍGUES-CALVO, M. S., COSTAS, E., MIGUÉNS, X., CONCHEIRO, L. **Improved estimation of postmortem interval based on differential behavior of vitreous potassium and hypoxanthine in death by hanging**. *Forensic Sci. Int.*, Spain, v. 125, pp. 67-74, 2001.
- 26 FLANAGAN, R. J.; TAYLOR, A. A.; WATSON, I. D.; WHELPTON, R. **Fundamentals of Analytical Toxicology**. 1. ed. London, Wiley-Blackwell, pp. 480-487, 2008.
- 27 JONES, A. W.; POUNDER, D. Post-Mortem Alcohol – Aspects of interpretation. In: KARCH, S. B. **Forensic Issues in Alcohol Testing**. USA: CRC Press, pp. 70-72, 2007.
- 28 JONES, G. R. Interpretation of Postmortem Drug Levels. In: KARCH, S. B. **Postmortem Toxicology of Abused Drugs**. USA: CRC Press, pp. 116-117, 2007.
- 29 ATHANASELIS, S., STEFANIDOU, M., KOUTSELINIS, A. **Interpretation of postmortem alcohol concentrations**. *Forensic Sci. Int.*, Greece, v. 149, pp. 289-291, 2004.
- 30 BERKOWICZ, A., WALLERSTEDT, S., WALL, K., DENISON, H. **Analysis of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) in vitreous humour as a forensic tool for detection of alcohol misuse**. *Forensic Sci. Int.*, Sweden, v. 137, pp. 119-124, 2003.
- 31 DE MARTINIS, B. S., MARTIN, C. C. S. **Automated headspace solid-phase microextraction and capillary gas chromatography analysis of ethanol in postmortem specimens**. *Forensic Sci. Int.*, Brazil, v. 128, pp. 115-119, 2002.
- 32 OSUNA, E., D. PÉREZ-CÁRCELES, M., MORENO, M., BEDATE, A., CONEJERO, J., ABENZA, J. M., MARTÍNEZ, P., LUNA, A. **Vitreous humor carbohydrate-deficient transferrin concentrations in the postmortem diagnosis of alcoholism**. *Forensic Sci. Int.*, Spain, v. 108, pp. 205-213, 1999.
- 33 KRAUT, A. **Vitreous alcohol**. *Forensic Sci. Int.*, Canada, v. 73, pp. 157-158, 1995.
- 34 POUNDER, D. J., KURODA, N. **Vitreous alcohol: the author's reply**. *Forensic Sci. Int.*, UK, v. 73, pp. 159-160, 1995.

- 35 YIP, D. C. P. **Vitreous humor alcohol**. Forensic Sci. Int., Hong Kong, v. 73, pp. 155, 1995.
- 36 WINEK, C. L. Jr., WINEK, C. L., WAHBA, W. W. **The role of trauma in postmortem blood alcohol determination**. Forensic Sci. Int., Pittsburgh, v. 71, pp. 1-8, 1994.
- 37 WALLACE, G. R., MURRAY, P. I., SCOTT, R. A. H., BANERJEE, S. P., TREVINO, V., FALCIANI, F., NESSIM, M., YOUNG, S. P. **Metabolic analysis of human vitreous humor differentiates ocular inflammatory disease**. Molecular Vis. Birmingham, v. 15, pp. 1210-1217, 2009.
- 38 HELANDER, A.; DAHL, H. **Urinary tract infection: a risk factor for false-negative urinary ethyl glucuronide but not ethyl sulfate in the detection of recent alcohol consumption**. Clin. Chem., v. 51, pp. 1728-1730, 2005.
- 39 GOODMAN & GILMAN'S. **The pharmacological basis of therapeutics**. 10th. ed. New York: McGraw-Hill, 2001, 2148p.
- 40 KING, L. A.; MCDERMOTT, S. D.; JICKELLS, S.; NEGRUSZ, A. Drug of abuse. In: FLANAGAN, R. J.; TAYLOR, A. A.; WATSON, I. D.; WHELPTON, R. **Fundamentals of Analytical Toxicology**. 1. ed. London, Wiley-Blackwell, 2008, pp. 47.
- 41 SMITH, F.; SIEGEL, J. A. **Handbook of Forensic Drug Analysis**. 1. ed. USA. Academic Press, 2004, pp. 51.
- 42 HOLLAND, M. G.; SCHWOPE D. M.; STOPPACHER R.; GILLEN S. B.; HUESTIS M. A. **Postmortem redistribution of Δ^9 – tetrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxy-THC (11-OH-THC), and 11-nor-9-carboxy-THC (THCCOOH)**. Forensic Sci. Int., Germany, v.212, pp. 247-251, 2011.
- 43 UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME (UNODC). (2012). **World Drug Report 2012** (United Nations publication, Sales No. E.12.XI.1).
- 44 ÁLVAREZ Y., PÉREZ-MAÑÁ C., TORRENS M., FARRÉ M. **Antipsychotic drugs in cocaine dependence: A systematic review and meta-analysis**. Journal of Substance Abuse Treatment. Spain, v. 45, pp. 1-10, 2013.
- 45 MUSSHOFF, F., MADEA, B. **Cocaine and benzoylecgonine concentrations in fluorinated plasma samples of drivers under suspicion of driving under influence**. Forensic Science International. Germany, v. 200, pp. 67-72, 2010.
- 46 FOWLER, J. S., VOLKOW, N. D., WANG, G. J. *et al.* **Cocaine: PET studies of cocaine pharmacokinetics, dopamine transporter availability and dopamine transporter occupancy**. Nuclear Medicine and Biology. USA, v. 28, n. 5, pp. 561-572, 2001.

- 47 REES, K. A., MCLAUGHLIN, P. A., OSSELTON, M. D. **Validation of Gas Chromatography- Ion Trap-Tandem Mass Spectrometry assay for the simultaneous quantification of cocaine, benzoylecgonine, cocaethylene, morphine, codeine, and 6-acetylmorphine in aqueous solution, blood and skeletal muscle tissue.** Journal of analytical toxicology. UK, v. 36, pp. 1-11, 2012.
- 48 EBERLIN, M. N.; SANTOS, V. G.; REGIANI, T.; DIAS, F. F. G.; ROMÃO, W.; JARA, J. L. P.; KLITZKE, C. F.; COELHO, F. **Venturi Easy Ambient Sonic-Spray Ionization.** Anal. Chem., Brazil, v. 83, pp. 1375–1380, 2011.
- 49 DOLE, M., MACK, L. L., HINES, R. L., MOBLEY, R. C., FERGUSON, L. D., ALICE, M. B. **Molecular Beams of Macroions.** J. Chem. Phys. USA, v 49, pp. 2240-2249, 2006.
- 50 FENN, J.B.; MANN, M.; MENG, C.K.; WONG, S.F. **Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules.** Science, v. 246, pp. 64-71, 1989.
- 51 SAWAYA, A.C.H.F. **Análise da composição química de própolis brasileira por espectrometria de massas.** Tese de doutorado. Instituto de Química-UNICAMP. 2006.
- 52 VESSECCHI, R. *et al.* **Nomenclaturas espectrometria de massas em língua portuguesa.** Quim. Nova, Brazil, v. 34, n. 10, pp. 1875-1887, 2011.
- 53 BARROW, M. P., BURKITT, W. I., DERRICK, P. J. **Principles of Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry and its application in structural biology.** Analyst, UK, vol. 130, 18–28, 2005.
- 54 MARSHALL, A. G., HENDRICKSON, C. L., JACKSON, G. S. **Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: a primer.** Mass Spectrometry Reviews. USA, v. 17, pp. 1-35, 1998.
- 55 COMISAROW, M. B., MARSHALL, A. G. **Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Spectroscopy.** Chemical Physical Letters. Canada, v. 25, n. 2, pp. 282-283, 1974.
- 56 RODGERS, R. P., SCHAUB, T. M., MARSHALL, A. G. **Petroleomics: MS returns to its roots.** Analytical Chemistry. USA, v. 77, n. 1, pp. 20A-27A, 2005.
- 57 GIMÉNEZ-CASSINA LOPEZ B., SCHMIDT E. M., EBERLIN, M. N., SAWAYA, A. C. H. F. **Phytochemical markers of different types of red propolis.** Food Chemistry. Brazil, v. 146, pp. 174-180, 2014.
- 58 GARRETT, R., SCHMIDT, E. M., PEREIRA, L. F. P., KITZBERGER, C. S. G., SCHOLZ, M. B. S., EBERLIN, M. N., REZENDE, C. M. **Discrimination of arabica coffee cultivars by electrospray ionization Fourier transform ion**

- cyclotron resonance mass spectrometry and chemometrics.** LWT - Food Science and Technology. Brazil, v. 50, pp. 496-502, 2013.
- 59 GARCIA, J. S., VAZ, B. G., CORILO, Y. E. *et al.* **Whisky analysis by electrospray ionization-Fourier transform mass spectrometry.** Food Research International. Brazil, v. 51, pp. 98-106, 2013.
- 60 CHRISTINA R. F. *et al.* **Mass spectrometry fingerprinting of media used for in vitro production of bovine embryos.** Rapid Comm Mass Spec. Brazil, v. 23, n. 9, pp. 1313-1320, 2009.
- 61 WANG, P. P., BARLETT, M. G. **Collision-induced Dissociation Mass Spectra of Cocaine, and its Metabolites and Pyrolysis Products.** J Mass Spec. USA, v. 33, n. 10, pp. 961-967, 1998.
- 62 SMITH, R. M., CASALE, J. F. **The Mass Spectrum of Cocaine: Deuterium Labeling and MS/MS Studies.** Microgram Journal. USA, v. 7, n. 1, pp.16-41, 2010.

6 ANEXOS

6.1 ANEXO I – APROVAÇÃO CEP



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 03/08/11
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 1270/2010 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).
CAAE: 0998.0.146.000-10

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “NOVAS TÉCNICAS ANALÍTICAS APLICADAS A DROGAS DE ABUSO PRESENTES EM HUMOR VÍTREO”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Júlio César Santos Júnior

INSTITUIÇÃO: Hospital das Clínicas/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 09/12/2010

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 03/08/12 (O formulário encontra-se no *site* acima).

II - OBJETIVOS

Desenvolvimento de novas técnicas analíticas para análise de drogas presentes no humor vítreo.

III - SUMÁRIO

A quantificação de drogas em matrizes biológicas, pressupõe o prévio desenvolvimento e validação de método analítico. O humor vítreo se caracteriza como uma matriz não convencional (em oposição a plasma, urina), para o qual infere-se (a partir da exposição do autor) que não existem métodos validados. Por outro lado a utilização desta matriz é de grande importância em toxicologia forense, por se encontrar "isolado em um compartimento relativamente protegido de contaminação externa, invasão de microorganismos e traumatismos em geral...". Para o desenvolvimento de metodologias específicas é necessário a obtenção da matriz biológica alvo do desenvolvimento analítico. O material será fornecido pela Superintendência da Polícia Técnico-Científica das cidades de São Paulo e Campinas, de cadáveres de causa mortis desconhecida, onde seja importante fazer o exame toxicológico para excluir casos de intoxicação

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES.

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

V - PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem



restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES.

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

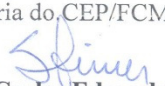
O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII- DATA DA REUNIÃO.

Homologado na I Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 18 de janeiro de 2011.


Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

6.2 ANEXO II – APROVAÇÃO GERAL IML/SPTC/SP



SECRETARIA DA SEGURANÇA PÚBLICA
INSTITUTO MÉDICO LEGAL



COMISSÃO CIENTÍFICA DO INSTITUTO MÉDICO LEGAL

(Resultado emitido pela Comissão Científica e CEP)

Projeto nº:

Título da Pesquisa: NOVAS TÉCNICAS ANALÍTICAS APLICADAS A DROGAS DE ABUSO PRESENTES EM HUMOR VÍTREO.

Pesquisador Responsável: JÚLIO CÉSAR SANTOS JÚNIOR

Considerações do Relator: *Aprovado.*

Data e Assinatura do Relator:

03/05/11

Enrico F. M. de Andrade.

Aprovação pela Comissão Científica do IML.

Parecer: *O Aprovado*

Data da sessão: *03/05/11.*

Dra. Marta Candido
Assessora de Trabalho
Técnico - Científico
DTD - IML

Sessão: 000/05/10

6.3 ANEXO III – APROVAÇÃO LOCAL DE COLETA 1 IML/SPTC/SP



SECRETARIA DA SEGURANÇA PÚBLICA
SUPERINTENDÊNCIA DA POLÍCIA TÉCNICO-CIENTÍFICA
INSTITUTO MÉDICO LEGAL

instituto médico-legal

OF. DTD –IML n°. 687/2012.

RSC – NDT.

São Paulo, 13 de junho de 2012.

Informo que o projeto do aluno Julio César Santos Junior, foi aprovado por esta Comissão e será realizado no Necrotério do IML Oeste, devido a sua particularidade, sendo monitorado diretamente pelo Dr. Ruggero Bernardo Felice Guidugli.

Solicitamos o acolhimento do pesquisador, juntamente com o Dr. Ruggero Bernardo Felice Guidugli, para a realização deste projeto em conjunto com a UNICAMP.

Atenciosamente,

DR. ENRICO FERREIRA MARTINS ANDRADE

Médico Legista

Assessor Técnico Científico – DTD-IML

A Ilma

Dra. Flavia Amado Bassanezi

Chefe da EPML - Oeste

CÓPIA

6.4 ANEXO IV – APROVAÇÃO LOCAL DE COLETA 2 IML/SPTC/SP



SECRETARIA DA SEGURANÇA PÚBLICA
SUPERINTENDÊNCIA DA POLÍCIA TÉCNICO-CIENTÍFICA
INSTITUTO MÉDICO LEGAL



OF. DTD –IML nº. 736/2012.

RSC – cpc

São Paulo, 02 de julho de 2012.

Informo que o projeto do aluno Julio César Santos Junior, foi aprovado por esta Comissão e será realizado no Necrotério do IML Sul, devido a sua particularidade, sendo monitorado diretamente pelo Dr. Ruggero Bernardo Felice Guidugli.

Solicitamos o acolhimento do pesquisador, juntamente com o Dr. Ruggero Bernardo Felice Guidugli, para a realização deste projeto em conjunto com a UNICAMP.

Atenciosamente,

DR. ENRICO FERREIRA MARTINS ANDRADE
Médico Legista
Assessor Técnico Científico – DTD-IML

A Ilma.

Dr^a. Elza Maria Dias Laporte
Chefe da EPML – Sul

Cc: Dr. Ruggero Bernardo Felice Guidugli

Cc: Julio César Santos Junior.

Rua Moncorvo Filho, 410 - 3º andar - Butantã - Capital - SP - CEP: 05507-060 ☎ (011)3031-5063.

6.5 ANEXO V – TCLE IML/SPTC/SP



SECRETARIA DA SEGURANÇA PÚBLICA
SUPERINTENDÊNCIA DA POLÍCIA TÉCNICO-CIENTÍFICA
INSTITUTO MÉDICO LEGAL



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU LEGAL RESPONSÁVEL

1. Nome do Paciente:
Documento de Identidade nº Sexo: () M () F
Data de Nascimento:/...../.....
Endereço: nº Aptº:
Bairro: Cidade:
CEP: Telefone:

2. Responsável Legal:
Natureza (grau de parentesco, tutor, curador, etc):
Documento de Identidade nº Sexo: () M () F
Data de Nascimento:/...../.....
Endereço: nº Aptº:
Bairro: Cidade:
CEP: Telefone:

II – DADOS SOBRE A PESQUISA

1. Título do Protocolo de Pesquisa: Novas técnicas analíticas aplicadas a drogas de abuso presentes em humor vítreo (Projeto nº 09/11) – Aprovado pela Comissão Científica do IML em 03/05/2011.

2. Pesquisador: Júlio César Santos Júnior
Cargo/Função: Pesquisador Responsável/Executante Inscrição Conselho Regional nº
Departamento: Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
Sem Risco (X) Risco Mínimo () Risco Médio ()
Risco Baixo () Risco Maior ()
(Probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo. Nos projetos com coleta de sangue, incluir detalhadamente, como observação as possíveis reações decorrentes desse procedimento.)

4. Duração da Pesquisa: 24 meses

III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

Seção Lavratura de Laudos
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, nº 600 – Cerq. César – CEP: 05403-000 - SP/SP - Fone: 3088-7732
Impresso em 27/04/2012



1. Justificativa e os objetivos da pesquisa; 2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos; incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais. 3. Desconfortos e riscos esperados; 4. Benefícios que poderão ser obtidos; 5. Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo.

IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA

1. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
3. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
4. Da indenização por parte do Patrocinador por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

V – INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

VI – OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

.....

.....

.....

.....

VII – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de _____

Assinatura do sujeito de pesquisa
ou responsável legal

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

INSTRUÇÕES PARA PREENCHIMENTO DO TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

1. Este termo conterá o registro das informações que o pesquisador fornecerá ao sujeito da pesquisa, em linguagem clara e acessível, evitando-se de vocábulos técnicos não compatíveis com o grau de conhecimento do interlocutor.
2. A avaliação do grau de risco deve ser minuciosa, levando em conta qualquer possibilidade de intervenção e de dano à integridade física do sujeito da pesquisa.
3. O formulário poderá ser em letra de forma legível, datilografia ou meios eletrônicos.
4. Este termo deverá ser elaborado em duas vias, ficando uma via em poder do paciente ou seu representante legal e outra deverá ser juntada ao prontuário do paciente.



SECRETARIA DA SEGURANÇA PÚBLICA
SUPERINTENDÊNCIA DA POLÍCIA TÉCNICO-CIENTÍFICA
INSTITUTO MÉDICO LEGAL



5. A via do Termo de Consentimento Pós-Informação submetida à análise do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deverá ser idêntica aquela que será fornecida ao sujeito da pesquisa