



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

ANA PAULA BORGÓ

ANÁLISE POST-MORTEM DE COCAÍNA EM CABELO
UTILIZANDO A TÉCNICA DE LC-MS/MS

CAMPINAS

2016

ANA PAULA BORGÓ

ANÁLISE POST-MORTEM DE COCAÍNA EM CABELO UTILIZANDO A TÉCNICA
DE LC-MS/MS

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

ORIENTADOR: PROFA. DRA. NELCI FENALTI HÖEHR

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. MARCOS NOGUEIRA EBERLIN

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA ANA PAULA BORGÓ, E ORIENTADA PELA
PROF. DR^a NELCI FENALTI HÖEHR

CAMPINAS

2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 130269/2014-0

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

B644a Borgo, Ana Paula, 1990-
Análise de post-mortem de cocaína em cabelo utilizando a técnica de LC-MS/MS / Ana Paula Borgo. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

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

1. Cocaína. 2. Cabelo. 3. Toxicologia. 4. Validação. 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: Cocaine analysis post-mortem in hair using LC-MS/MS technique

Palavras-chave em inglês:

Cocaine

Hair

Toxicology

Validation

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Titulação: Mestra em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Nelci Fenalti Höehr [Orientador]

Lazaro Alessandro Soares Nunes

Damila Rodrigues de Moraes

Data de defesa: 11-01-2016

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

ANA PAULA BORGIO

ORIENTADOR: NELCI FENALTI HÖEHR

COORIENTADOR: MARCOS NOGUEIRA EBERLIN

MEMBROS:

1. PROF. DR. NELCI FENALTI HÖEHR

2. PROF. DR. DAMILA RODRIGUES DE MORAIS

3. PROF. DR. LAZARO ALESSANDRO SOARES NUNES

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

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: 11/01/2016

DEDICATÓRIA

À minha família...

Pelo apoio, motivação e união sempre em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus primeiramente por iluminar meus caminhos e não me deixar
nunca desistir

Aos meu pais pelo apoio, incentivo, e orações durante toda essa etapa estando
sempre ao meu lado nos bons e maus momentos.

Às minhas tias pelas orações e incentivo durante todo o tempo, que sempre me
apoiaram e me deram suporte nessa fase.

Ao meu namorado pelo apoio, incentivo e paciência durante as fases difíceis.

À minha orientadora Nelci, pela orientação e suporte durante todo esse tempo

Ao meu co-orientador Marcos, pelo suporte analítico

Ao meu amigo José por todo o suporte e apoio técnico, que estava sempre ao
meu lado me ajudando e não deixando desistir.

A minha amiga Carla que me ajudou no início ao fim sempre com palavras
motivadoras, obrigada pela parceria.

Aos meus colegas do laboratório ThoMSon de Espectrometria de Massas pela
companhia diária e por me auxiliarem.

Aos meus amigos Diogo, Andressa, Jéssica, Viviane, Natália pela amizade e
convivência durante todo o tempo.

RESUMO

A cocaína (COC) é uma droga de abuso com elevadas propriedades estimulantes e atualmente um problema de saúde pública. Análises toxicológicas em matrizes alternativas como unha, cabelo, meconio, saliva, humor vítreo vem ganhando espaço devido a suas vantagens em relação ao uso de sangue e urina. A proposta do uso do cabelo como matriz alternativa baseia-se no fato da mesma fornecer evidências retrospectivas do uso de drogas. Cada vez mais o desenvolvimento de equipamentos e métodos analíticos mais sensíveis se faz necessário com o surgimento dessas novas matrizes onde a droga está presente em menor quantidade para atender essa demanda. O objetivo do trabalho é o desenvolvimento e validação de um método rápido e sensível para detecção e extração de cocaína e metabólitos em amostras de cabelo utilizando a técnica de LC-MS/MS. A validação foi realizada estabelecendo a seletividade/especificidade, linearidade, precisão intra- e inter-ensaio, limite de detecção (LOD), LOQ e efeito de matriz. O LOD foi de 0,01 ng/mL para a COC, 0,05 ng/mL para a Benzoilecgonina (BZE) e 0,001 ng/mL para o Cocaetileno (COE) e o Limite de Quantificação (LOQ) foi de 0,5 ng/mL para todos os analitos. Os valores de linearidade mostraram coeficiente de correlação (r^2) para COC, benzoilecgonina (BZE) e cocaetileno (COE) maiores que 0,99 além de bons resultados de precisão intra e inter-ensaio e especificidade para todos os analitos avaliados sem interferência de efeito de matriz. Quando a técnica de LC-MS/MS é aplicada, observa-se que o cabelo pode ser uma amostra útil para a determinação crônica e retrospectiva do uso de COC.

Palavras chaves: Cocaína; cabelo; validação; toxicologia.

ABSTRACT

Cocaine (COC) is a drug of abuse with high stimulant properties and currently a public health problem. Toxicological analysis in alternative matrices as nail, hair, meconium, saliva, vitreous humor is becoming more popular due to their advantages over the use of blood and urine. The proposal hair use as an alternative matrix is based on the fact that it provide retrospective evidence of drug use. Increasingly, the development of equipment and more sensitive analytical methods is needed with the emergence of these new arrays where the drug is present in smaller quantities to meet this demand. The objective is the development and validation of a rapid and sensitive method for detecting and extracting cocaine and metabolites in hair samples using LC-MS / MS technique. The validation was performed establishing the selectivity / specificity, linearity, intra- and inter-assay precision, limit of detection (LOD) and LOQ Matrix effect. The LOD was 0.01 ng / ml for the COC, 0.05 ng / ml for Benzoyllecgonine (BZE) and 0.001 ng / mL for Cocaethylene (COE) and Limit of Quantification (LOQ) was 0.5 ng / mL for all analytes. The linearity values showed a correlation coefficient (r^2) to COC benzoyllecgonine (BZE) and cocaethylene (COE) higher than 0.99 but good results intra and inter-assay precision and specificity for all analytes evaluated without interference effect matrix. When the LC-MS / MS technique is applied, it is observed that the hair can be a useful sample for the determination and chronic retrospective of the COC.

Key words: Cocaine; hair; validation; toxicology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura molecular da cocaína.....	24
Figura 2. Ação da cocaína no SNC. [23]	25
Figura 3: Principais vias de biotransformação da cocaína administrada em humanos. Adaptado de Da Matta Chasin (1996) [26].....	26
Figura 4. Efeitos da COC no organismo [23].....	27
Figura 5. Fluxograma das etapas envolvidas no desenvolvimento de um procedimento para análise quantitativa.....	28
Figura 6. Mecanismo de incorporação da droga no cabelo.....	33
Figura 7. Esquema de funcionamento do LC-MS/MS [56]	39
Figura 8. Espectro de massas obtido para solução de cocaína.	56
Figura 10. Espectro de massas obtido para solução de cocaetileno.....	56
Figura 11. Espectro de massas obtido para solução de Benzoilecgonina.....	57
Figura 12. Mecanismo proposto para fragmentação da cocaína.....	57
Figura 13. Mecanismo proposto para fragmentação do cocaetileno	58
Figura 13. Mecanismo proposto para fragmentação da benzoilecgonina	58
Figura 15. Espectro de massas obtido para solução de cocaína-d3	59
Figura 16. Espectro de massas obtido para solução de cocaetileno-d3.....	59
Figura 17. Espectro de massas obtido para solução de benzoilecgonina-d3..	60
Figura 17. Cromatograma obtido de uma mistura contendo os padrões de benzoilecgonina, cocaína e cocaetileno e padrões internos em FMA: FMB 70:30 a partir do método otimizado.	62
Figura 18. Cromatograma obtido de uma mistura contendo os padrões de benzoilecgonina, cocaína e cocaetileno e padrões internos a partir do método otimizado.....	63
Figura 19. Cromatogramas obtidos da injeção da sequência: a) Branco, b) Mistura de padrão de benzoilecgonina, cocaína e cocaetileno, c) Branco e d) Branco.....	64
Figura 20. Fluxograma do processo de extração de cocaína e seus metabolitos no cabelo.....	67
Figura 21. Curva de calibração da Cocaína	70
Figura 22. Curva de calibração da Benzoilecgonina	70

Figura 23. Curva de calibração do Cocaetileno.....	71
Figura 24. Gráfico de Resíduos para (a) COC, (b) BZE e (c) COE	71
Figura 25. Cromatogramas de amostras brancas obtidos para o teste de seletividade.	74
Figura 26. Amostra de cabelo onde não foi detectada a presença de COC e metabolitos.	78
Figura 27. Cromatogramas das amostras reais positivas de cabelo provenientes do Instituto Médico-Legal.	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação entre as principais matrizes biológicas. [31] [11].....	30
Tabela 2. Métodos de determinação de cocaína e metabolitos em cabelos....	37
Tabela 3. Resultados obtidos para melhor ionização dos analitos	54
Tabela 4. Resultado da otimização das condições de fragmentação para determinação dos analitos no LC-MS/MS. A transição usada para quantificação esta sublinhada.	55
Tabela 5. Resultado da otimização das condições de fragmentação para determinação dos PIs no LC-MS/MS. A transição usada para quantificação esta sublinhada.	55
Tabela 6. Condições do sistema cromatográfico	61
Tabela 7. Proporção para o gradiente de fase móvel utilizado no método de determinação de cocaína e metabólitos em cabelo.	61
Tabela 8. Áreas obtidas para as replicatas das injeções de padrões de COC, BZE e COE.....	65
Tabela 9. Valores obtidos para recuperação dos analitos na matriz após o processo de descontaminação nas amostras previamente contaminadas.	66
Tabela 10. Recuperação dos analitos após o processo de extração nas amostras de cabelos fortificadas.	67
Tabela 11. Comparação de tempo de análise entre os métodos encontrados na literatura e o método desenvolvido no presente trabalho para a extração de cocaína e seus metabolitos em cabelo.	68
Tabela 12. Resultados obtidos para calibração dos analitos de COC, BZE e COE no sistema de LC-MS/MS.....	69
Tabela 13. Resultados de LOD e LOQ, obtidos para cocaína, benzoilecgonina e cocaetileno após o desenvolvimento e otimização do método analítico.	72
Tabela 14. Resultados obtidos para o teste de efeito de matriz para cocaína, benzoilecgonina e cocaetileno em cabelo.	73
Tabela 15. Estabilidade da benzoilecgonina na matriz de cabelo por um período de 120 horas.	75
Tabela 16. Estabilidade da cocaína na matriz de cabelo por um período de 120 horas.	76

Tabela 17. Estabilidade do cocaetileno na matriz de cabelo por um período de 120 horas.	76
Tabela 18. Resultados obtidos para os ensaios de precisão do método de detecção de cocaína e seus metabólitos em cabelo.	77
Tabela 19. Concentrações (ng.mg ⁻¹) encontradas nas amostras de cabelo analisadas.	79

LISTA DE ABREVIATURAS

- SNC** – Sistema Nervoso Central
- HIV** – Vírus da Imunodeficiência Humana
- COC**- Cocaína
- GC-MS** – Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
- LC-MS/MS** – Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas Sequencial
- LC-MS** - Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas
- BZE** - Benzoilecgonina
- ECG**- Ecgonina
- EME** – Éster Metilecgonina
- AEME** - Éster Metilandroecgonina
- NOR** - Norcocaína
- COET**- Cocaetileno
- BNE** - Norbenzoilecgonina
- HBZE** - m-Hidroxibenzoilecgonina
- ECGA** – Anidroecgonina
- SOHT** - Sociedade de Teste de Cabelo
- GTFCh**- Sociedade de Toxicologia Forense e Química da Alemanha
- Ppm** – Partes por milhão
- Ppb**- Partes por bilhão
- HCl**- Ácido Clorídrico
- NaOH**- Hidróxido de Sódio
- KOH** – Hidróxido de Potássio
- M** - Molar
- SIM** – Monitoramento Simples de Íon
- RDC** – Resolução da Diretoria Colegiada
- RE**- Resolução
- PI**- Padrão Interno
- HPLC**- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- ESI** – Ionização por Eletrospray

MRM – Monitoramento de reações Múltiplas

m/z- massa/carga

ANVISA – Agencia de Vigilância Sanitária

SPTC -Superintendência da Polícia Técnico Científica

IML – Instituto Médico Legal

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

LQ- Limite de Quantificação

LD – Limite de Detecção

CQA – Controle de Qualidade de Alta Concentração

CQM – Controle de Qualidade de Média Concentração

CQB - Controle de Qualidade de Baixa Concentração

LSQ – Limite Superior de Quantificação

LIQ – Limite Inferior de Quantificação

Rpm – rotações por minuto

CV – Coeficiente de Variação

DPR – Desvio Padrão Relativo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.2. Justificativa.....	19
2. OBJETIVOS.....	21
2.1 Objetivo Geral	21
2.2 Objetivos Específicos	21
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	22
3.1 Cocaína.....	22
3.1.1 História	22
3.1.2 Aspectos Sociais	23
3.1.3 Aspectos Toxicológicos	24
3.2 Matrizes biológicas alternativas	28
3.2.1 Cabelo como matriz biológica.....	31
3.2.2. Detecção de cocaína e metabolitos em cabelo	34
4.2 Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas.....	38
4.3 Validação de Métodos Analíticos	41
4.3.1 Seletividade	42
4.3.2 Linearidade.....	42
4.3.3 Precisão.....	42
4.3.4 Exatidão.....	43
4.3.5 Limite de Quantificação (LQ)	43
4.3.6 Limite de Detecção (LD)	43
4.3.7 Efeito Matriz.....	43
4.3.8 Estabilidade dos analitos na matriz	43
4.3.9 Efeito Residual.....	44
4.3.10 Recuperação	44

4. MATERIAS E MÉTODOS	45
4.1 Materiais.....	45
4.1.1 Materiais e outros reagentes	45
4.1.2 Soluções-padrão.....	45
4.1.3 Equipamentos e acessórios.....	45
4.2 Métodos	46
4.2.1 Amostra de cabelo.....	46
4.2.2 Desenvolvimento do método para determinação de cocaína e metabólitos em amostras de cabelo	47
4.2.3 Correlação com situação clínica.....	53
5. RESULTADOS	54
5.1 Otimização das condições do equipamento.....	54
5.2 Extração	65
5.3 Validação	68
5.3.1. Linearidade	68
5.3.2 Limite de Quantificação e Limite de Detecção	72
5.3.3 Efeito Matriz	72
5.3.4 Seletividade	73
5.3.5 Estabilidade de longa duração dos analitos em matriz	75
5.3.6 Precisão inter e intra-ensaio	76
5.3.7 Aplicação do método validado em amostras reais.....	77
6. DISCUSSÃO.....	80
7. CONCLUSÃO	82
8. REFERÊNCIAS	83
ANEXO A	90
ANEXO B	93
ANEXO C	96

1. INTRODUÇÃO

A utilização de substâncias psicoativas é antiga na história da civilização, as primeiras experiências humanas ocorreram por meio do consumo de plantas [1]. A cocaína constitui o mais importante alcalóide natural extraído das folhas do arbusto *Erythroxylon coca*. Em sua forma purificada, esta espécie constitui um sólido branco, cristalino, de odor aromático, sob a forma de um sal, o cloridrato de cocaína, o qual é solúvel em água e, portanto, pode ser aspirado ou dissolvido em água para uso endovenoso. A mistura da base livre da cocaína com bicarbonato de sódio, origina uma massa petrificada, geralmente de aspecto marrom-amarelado, popularmente conhecida como “crack” [2]. Por possuir potente ação estimulante acelera a atividade cerebral e outras partes do Sistema Nervoso Central (SNC), apresentando assim, alto potencial como droga de abuso. Era usado nas antigas civilizações em cerimônias religiosas e sociais, para inibir a fome, diminuir o cansaço e aumentar a resistência física [3].

A heroína, a cocaína (COC) e outras drogas matam cerca de 0,2 milhões de pessoas a cada ano, destruindo as famílias e trazendo miséria para milhares de outras pessoas. As drogas ilícitas prejudicam o desenvolvimento económico e social e contribui para o crime, a instabilidade, a insegurança e a propagação de doenças como o HIV. O mercado global de cocaína tem se expandido desde o final do século XIX e só recentemente foi mostrando alguns sinais de declínio. A produção mundial de cocaína aumentou acentuadamente nos anos 80 e os anos 90 e se estabilizou apenas ao longo da última década. Nos últimos anos, no entanto, as quantidades de COC disponíveis para consumo - após as apreensões feitas ao longo das rotas de tráfico - parecem ter diminuído.

O consumo de COC na América do Norte, a região com o maior mercado de COC, diminuiu significativamente ao longo da última década, embora essa aparente diminuição foi parcialmente compensada pelo aumento do consumo na Europa e na América do Sul. A utilização mundial de COC manteve-se estável em 0,3 a 0,4% da população com idade entre 15 e 64 anos (entre 13,2 e 19,5 milhões de usuários), mas também houve algumas mudanças no seu uso, com uma diminuição substancial na prevalência de uso de cocaína

na América do Norte e em alguns países da América do Sul e indicações de aumentos na Oceania, Ásia, África e alguns países da América do Sul [4].

A análise toxicológica é essencial em medicina forense, porque ajuda a esclarecer as causas da morte, se elas estão relacionadas a overdoses, vícios, acidentes ou ferimentos [5]. Nos últimos anos, a necessidade de análises forenses, toxicológicas e clínicas têm aumentado, e como uma consequência da complexidade da amostra, a análise tornou-se cada vez mais desafiadora devido a uma tendência crescente no uso de ilícito drogas e medicamentos não-medicinais. Suas aplicações exigem resultados rápidos e precisos que pode ser conseguida utilizando um método de análise genérico, criada para um grande número de compostos alvo [6].

A cocaína (COC) é uma das causas mais frequentes de mortes relacionadas ao consumo de droga por patologistas forenses. Os critérios de diagnósticos para uma morte por intoxicação aguda de COC comumente incluem uma revisão da investigação da polícia, autópsia, identificação e quantificação da COC e seus metabolitos no sangue. Contudo, a redistribuição post-mortem dificulta a interpretação dos níveis sanguíneos de COC e a análise de outros elementos do corpo podem melhorar o diagnóstico de mortes relacionadas com a cocaína [7].

Em casos post-mortem a escolha da amostra é muitas vezes ditada de acordo com o caso a ser estudado, porém as amostras mais comumente utilizadas para a análise de drogas de abuso em casos post-mortem incluem sangue, fígado e urina. No entanto, amostras como humor vítreo e cabelo têm usos importantes em casos de rotina, enquanto, cérebro, músculo, gordura, osso e derrames pleurais tem aplicações mais especializadas [8].

Tecidos humanos queratinizados, tais como unha e cabelo podem sequestrar xenobióticos e seus produtos de biotransformação, independentemente da fase de exposição. A captação de xenobióticos por queratina humana não é um fenômeno químico de superfície, é parte da distribuição da droga no corpo. A deposição e armazenamento de substâncias tóxicas no cabelo pode não ser prejudicial e pode ser considerada uma rota para sua eliminação do corpo. Assim, unhas e cabelos são propensos a serem

utilizadas como amostra biológica em análises toxicológicas para fins forenses, especialmente para a exposição crônica a longo prazo, com a grande vantagem de serem recolhidos numa forma não-invasiva [9]. A determinação de substâncias no cabelo não é apenas um meio de se avaliar a exposição atual, mas também tem potencial para avaliar e reconstruir episódios passados relevantes à saúde, mesmo que a ação no organismo já tenha cessado [10].

Para determinação de drogas em cabelo a técnica de cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) é uma ferramenta analítica bem consolidada e a mais utilizada. No entanto, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas no modo sequencial (LC-MS/MS) vem ganhando destaque cada vez mais na determinação de diversas drogas nestas matrizes complexas, devido à ionização mais branda e sua maior sensibilidade para compostos termolábeis, gerando menores limites de detecção e quantificação e, além disto, outra grande vantagem é que no preparo de amostra não são necessárias etapas de derivatização para a realização destas análises [11].

1.2. Justificativa

O uso de matrizes alternativas para detecção de substâncias ilícitas tem aumentado nos últimos anos. A proposta do uso do cabelo como matriz alternativa baseia-se no fato da mesma fornecer evidências retrospectivas do uso de drogas. O fio de cabelo pode armazenar fármacos administrados por meses, fornecendo informações sobre o uso passado de drogas que podem ter grande relevância judicial e/ou em processos admissionais, por exemplo. Dentre suas principais vantagens estão: o fato da coleta ser de fácil obtenção e não invasiva, a coleta pode ser monitorada dificultando adulterações e trocas de amostras, além de ser fácil de ser armazenado e transportado sem condições especiais devido a sua estabilidade.

A técnica de separação por cromatografia líquida apresenta boa sensibilidade, porém torna-se ainda mais eficiente para análises qualitativa e quantitativa quando utilizada em conjunto com a espectrometria de massas uma vez que fornece informações estruturais características dos analitos necessárias de forma inequívoca. O acoplamento entre estas duas técnicas dá origem a uma

ferramenta analítica versátil e de grande potencial tanto para análise qualitativa quanto para quantitativa. A técnica de LC-MS (Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas) vem apresentando-se relevante devido às suas vantagens em relação ao GC-MS (que atualmente é considerado padrão ouro), como a eliminação da etapa de derivatização da amostra que prejudica tanto o tempo de análise quanto a agressão ao sistema analítico, e geralmente, emprega um preparo de amostra mais simplificado, além do tempo curto de análise.

Diante disso, é de relevante importância o desenvolvimento de metodologia analítica para análise de drogas de abuso como por exemplo a cocaína em amostras de cabelo através de um método rápido e sensível pela técnica de LC-MS.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver e validar um método analítico simples e rápido para extração e quantificação de cocaína e seus metabólitos (benzoilecgonina e cocaetileno) em amostras de cabelo, pela técnica LC-MS/MS.

2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolvimento de técnica de descontaminação e extração das amostras de cabelo com cocaína e seus metabólitos, comparando os métodos existentes na literatura;
- Otimização das melhores condições de operação do equipamento para análise de cocaína e seus metabólitos;
- Aplicação dos métodos padronizados em amostras reais de cabelo provenientes do Instituto Médico Legal;
- Avaliação e interpretação dos resultados obtidos nas análises.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Cocaína

3.1.1 História

A COC é o principal alcaloide do arbusto *Erythroxylum coca*, também conhecida por coca ou epadú pelos índios brasileiros [18]. É uma planta nativa do Sri Lanka, Bolívia, Colômbia e Peru [20].

Desde a antiguidade, culturas nativas da América do Sul costumavam mascar folhas de coca em ocasiões religiosas e sociais, para inibir a fome, diminuir o cansaço e aumentar a resistência física devido à ação psicoativa proporcionada pelo alcaloide contido nas folhas, a cocaína. A antiga prática de mascar as folhas ainda hoje é reconhecida e realizada [12, 3].

Efeitos deletérios de cocaína foram registrados pela primeira vez por conquistadores espanhóis, que perceberam que os usuários habituais se tornaram letárgicos quando privado da droga [13].

No Brasil, a cocaína era legalmente comercializada no início do século XX, como parte integrante na formulação de remédios ou na sua forma pura. Em 1914, a cocaína passou por uma mudança de lugar do imaginário do brasileiro e começou a ser vista como um produto de comércio perigoso, que ameaçava a integridade e a vida das pessoas [12]. Em 1921 o Decreto-Lei Federal nº4.292 de 06 de julho de 1921 restringe o uso de cocaína. Na década de 70 a cocaína ressurgiu para uso recreacional e na década de 80 seu consumo torna-se abusivo. Em 1985 a cocaína na forma de “crack” também começa a ser consumida no Brasil [14].

Segundo Relatório Anual sobre drogas, na América do Sul, o consumo e tráfico de cocaína tornaram-se o mais proeminente, particularmente no Brasil, devido a fatores, incluindo sua localização geográfica e uma grande população urbana [4].

3.1.2 Aspectos Sociais

Um dos problemas que mais afetam o contexto social atual é o consumo de drogas ilícitas. Isso porque este consumo reflete não só na saúde, no convívio familiar e social, como também movimentam milhões de dólares por ano, consistindo em um mercado financeiro ilícito não só no Brasil, mas em muitos outros países também [2].

O consumo e dependência da cocaína e opiáceos continuam a ser uma preocupação de saúde pública. A evolução dos padrões de consumo a partir dos anos 1980, quando a heroína foi predominante, até os primeiros anos deste século, em que o consumo de COC tornou-se líder, reflete uma mudança no tipo de drogas consumidas, mas não nos níveis de consumo [5].

A cocaína é a segunda droga ilícita mais comumente utilizada, empatando com os opiáceos e ficando atrás da maconha [15], sendo o consumo de cocaína a causa mais frequente de mortes relacionadas com a droga. Seu uso está associado com ambas as complicações agudas e crônicas que podem envolver qualquer sistema, e sendo o sistema cardiovascular mais comum. O uso indevido da cocaína tem um grande efeito em usuários jovens e adultos com perda de produtividade e morbidade relacionado com efeitos cardíacos e cerebrovasculares resultante de seu uso. Muitos usuários de cocaína têm pouco ou nenhuma ideia dos riscos associados ao seu uso [16]. Com um custo menor do que a cocaína na forma de cloridrato, a “pedra” de cocaína base livre (crack) é hoje uma das drogas em grande expansão no mercado ilícito, principalmente entre os indivíduos de classes populacionais de menor poder aquisitivo, mas expandindo-se para outras populações [17]. A tendência do usuário é sempre aumentar a dose de uso na tentativa de sentir os efeitos mais intensos. Porém essas quantidades maiores acabam por levar o usuário a um comportamento violento, irritabilidade, tremores e atitudes bizarras devido ao aparecimento de paranoia o que leva muitas vezes a situações extremas de agressividade, eventualmente levando a alucinações e delírios. A esse conjunto de sintomas dá-se o nome de “psicose cocaínica” [18].

De forma geral, a possibilidade de uso abusivo de uma substância é aumentada pela rapidez do início de sua ação. Os efeitos que ocorrem logo após a administração desencadeiam uma série de eventos que levam à perda de controle sobre o uso da substância. Assim, os fatores que determinam a dependência são complexos e influenciados pelas características do indivíduo, dose e frequência de uso. Apesar de qualquer tentativa de determinar um perfil do usuário incorrer no risco de estigmatização do indivíduo, ou mesmo em interpretações errôneas, é fato que existe uma relação entre as drogas e a delinquência, principalmente quando o fármaco de abuso constitui um estimulante do sistema nervoso central (SNC) e apresenta alto potencial de abuso, como é o caso da cocaína [19].

3.1.3 Aspectos Toxicológicos

A figura 1 apresenta a estrutura molecular da COC.

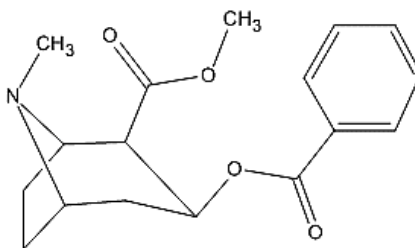


Figura 1: Estrutura molecular da cocaína

Ela está disponível em duas formas: (a) cloridrato de cocaína, um pó branco cristalino que pode ser inalado, ingerido ou injetado e (b) "crack", cloridrato de cocaína que foi transformado em sua forma de base livre através de uma reação com amônia ou bicarbonato e que é fumado [21].

Tanto a COC na forma de sal quanto na forma base livre pode ser adulterada com várias substâncias para obtenção da droga comercializada nas ruas. Dentre os adulterantes mais comumente referidos encontram-se os anestésicos locais, principalmente lidocaína, benzocaína e os estimulantes principalmente a cafeína [22].

O crack fumado atinge o pulmão que é intensivamente vascularizado e com grande superfície de contato leva a uma absorção instantânea, chegando rapidamente ao SNC, aparecendo os efeitos mais rápidos do que por outras vias. Os primeiros sintomas aparecem entre 10 a 15 segundos, enquanto que quando o pó é cheirado acontecem entre 10 e 15 minutos e após injeção de 3 a 5 minutos. Isto faz do crack uma droga poderosa do ponto de vista do usuário, pois o prazer ocorre instantaneamente, entretanto seus efeitos são mais rápidos, durando em média 5 minutos enquanto que a administração nasal e injetável dura cerca de 45 e 20 minutos respectivamente. Esse efeito rápido faz com que o usuário utilize a droga com mais frequência levando à dependência mais rapidamente do que as outras vias de consumo [18]

A COC age no sistema nervoso central estimulando a recompensa por ligação aos transportadores dopaminérgicos, tal ligação bloqueia a recaptção da dopamina (Figura 2) e aumenta a concentração, o tempo de permanência e a intensidade de ação da substância sobre os receptores pós-sinápticos. [23]. Infelizmente, para o usuário, quando a cocaína é transmitida a partir do sistema, a concentração de monoaminas nas sinapses cai drasticamente. O esgotamento monoamina nos receptores pré-sinápticos em que é referido como uma síndrome "crash", ou sentimentos de depressão e desconforto físico. A única maneira de escapar dos sentimentos "crash" é ingerir mais cocaína. Isto continua um ciclo vicioso de dependência. [24]

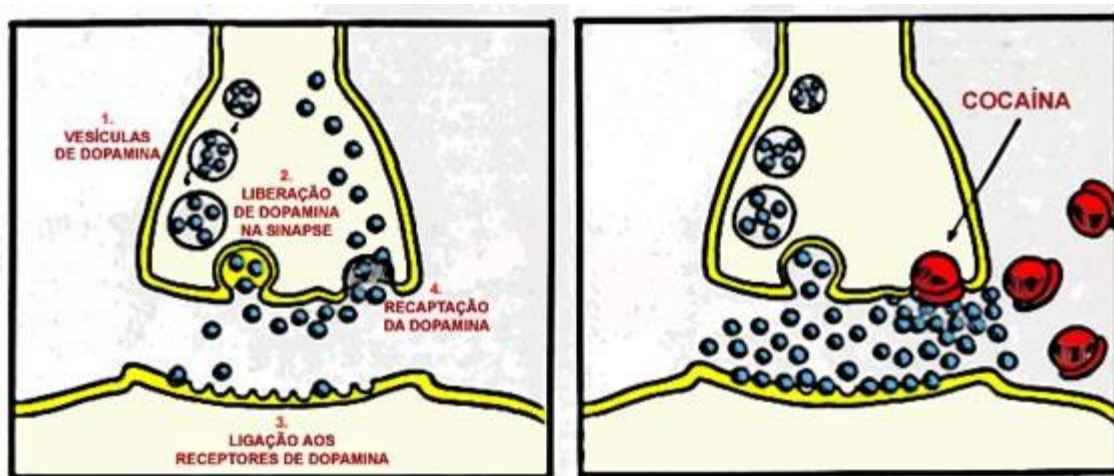


Figura 2. Ação da cocaína no SNC. [23]

A COC é rapidamente inativada *in vivo* pela hidrólise dos seus grupos éster, produzindo benzoilecgonina (BZE), éster metilecgonina (EME), e ecgonina (ECG). A COC também sofre biotransformação em norcocaina (NOR), e a BZE para norbenzoilecgonina (BNE) e m-hidroxibenzoilecgonina (HBZE). Quando a COC é fumada um produto de pirólise é formado, o éster metilanidroecgonina (AEME) que pode ser hidrolisado em anidroecgonina (ECGA) [25]. A COC é frequentemente consumida em conjunto com etanol, em decorrência disso um homólogo da COC psicoativa, cocaetilenol (COET), é formado resultante de transesterificação do grupo metil éster [21].

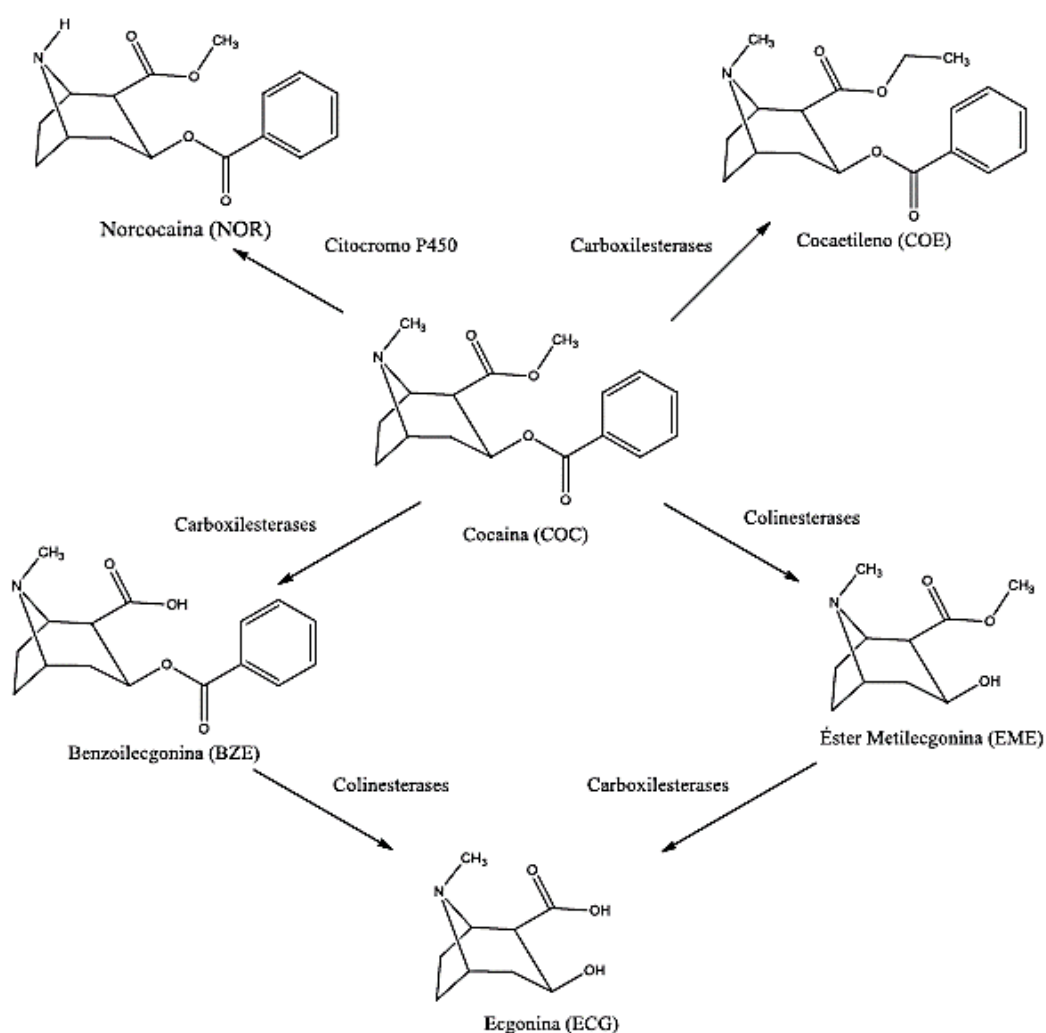


Figura 3: Principais vias de biotransformação da cocaína administrada em humanos. Adaptado de Da Matta Chasin (1996) [26].

As consequências do uso da COC podem combinar os efeitos a curto prazo e a longo prazo. Os efeitos na saúde pelo uso a curto prazo da COC são: aumento do nível de alerta; aumento da temperatura e euforia; respiração e pulsação rápida; respiração irregular; e, ritmo cardíaco irregular. A longo prazo, pode causar complicações cardiovasculares (por exemplo, miocardite, hipertensão e dissecção da aorta), perda de apetite, agitação, insônia e muitos outros problemas [27].

O aumento da concentração sináptica da dopamina não produz exclusivamente sintomas de euforia ou de reforço à recompensa. Juntamente com a noradrenalina, a dopamina ativa o sistema nervoso simpático, levando a efeitos tais como vasoconstrição e aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial. A cocaína provoca sobrecarga de catecolaminas na fenda sináptica. Com o uso crônico, a hipersensibilidade pós-sináptica de seus receptores intensifica a ação do sistema nervoso simpático sobre os órgãos por ele inervados. [23]

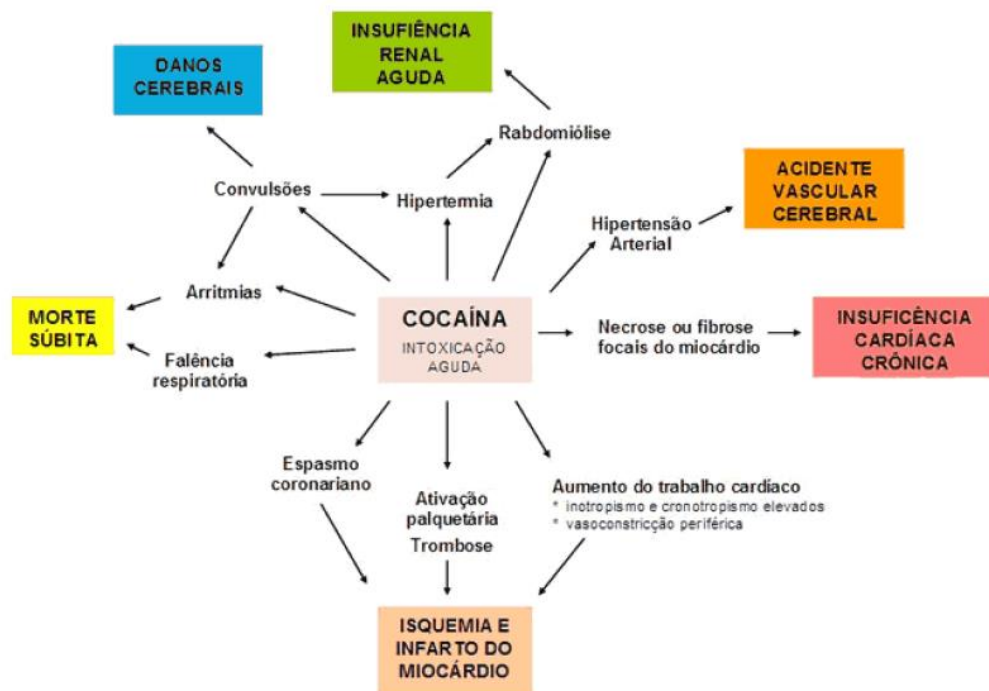


Figura 4. Efeitos da COC no organismo [23]

3.2 Matrizes biológicas alternativas

Cada matriz biológica apresenta complexidades variáveis. Conhecimentos sobre a estabilidade dos analitos no material biológico são de fundamental importância para garantir a confiabilidade dos resultados analíticos, uma vez que várias situações acabam por predefinir intervalos de tempo variáveis entre a coleta do material, seu transporte até o laboratório, armazenagem e tempo de execução da análise. A instabilidade dos analitos na matriz biológica e os fenômenos de redistribuição post-mortem são interferentes importantes em toxicologia forense. A escolha do material biológico para a realização de análises toxicológicas deve levar em consideração, principalmente, as características toxicocinéticas dos agentes investigados e a finalidade do laudo laboratorial da intoxicação no auxílio e/ou diagnóstico nos casos de envolvimento médico-legal [11].

O desenvolvimento de um procedimento para a análise quantitativa de uma matriz biológica inclui várias etapas, desde a amostragem, a preparação da amostra, análise cromatográfica e, finalmente, análise dos resultados. [28]



Figura 5. Fluxograma das etapas envolvidas no desenvolvimento de um procedimento para análise quantitativa.

A análise toxicológica para evidenciar o uso de drogas de abuso pode ser realizada em diversas amostras biológicas, como sangue, urina, suor, saliva entre outras [1]. As matrizes biológicas convencionais, como urina e sangue, já vêm sendo estudadas há muito tempo e seu emprego já está bem consolidado. Há muito tempo, a urina, o sangue, o humor vítreo e as amostras de tecidos são consideradas úteis. A urina, por exemplo, é a matriz de escolha para se verificar a exposição a drogas de abuso em programas de prevenção e controle do uso de drogas no trabalho, e em competições esportivas [11, 29, 30]. Porém, cabelos,

unhas, saliva, suor e outras matrizes biológicas têm sido utilizados como amostras não convencionais preferenciais, em alguns casos, para a análise de drogas, ou para complementar as análises realizadas em outras amostras, devido a seus procedimentos de coleta não invasivo. Além disso os equipamentos analíticos tornam-se cada vez mais sensíveis e específicos, permitindo a detecção e quantificação de drogas em quantidades muito baixas. A tendência tem sido a de usar a análise de segmentos de cabelo para expandir a janela temporal do uso de drogas e fornecer informações sobre a cronologia de uso [26].

A Tabela 1 mostra uma comparação entre as principais matrizes biológicas utilizadas na toxicologia forense para determinação de drogas de abuso.

Tabela 1. Comparação entre as principais matrizes biológicas. [31] [11]

Matriz Biológica	Coleta	Deteção	Analito	Vantagens	Problemas associados
Sangue	Invasiva	3 horas a 2 dias	Droga de origem e metabólitos	Técnica conhecida; método facilmente disponível; valores de corte estabelecidos	A cinética post-mortem pode modificar os valores encontrados
Urina	Não invasiva.	6 horas a 3 dias	Concentrações maiores de metabólitos	Técnica conhecida; método facilmente disponível; valores de corte estabelecidos	Necessita de privacidade na hora da coleta
Cabelo	Não invasiva	A partir de 3 dias a anos	Droga de origem e metabólitos	Janela cronológica de deteção; fácil coleta e armazenamento	Sem correlação com a dose
Saliva	Não invasiva	1 a 24 horas	Concentração maior da droga de origem	Amostras de fração de droga livre; presença da droga em si	Necessita de dispositivos de coletas especiais; amostra limitada
Suor	Não invasiva	3 horas a uma semana	Concentração maior da droga de origem	Medida cumulativa do uso de drogas	Necessita de dispositivos de coletas especiais "sweat patch"; amostra limitada
Unha	Não invasiva	A partir de 3 dias a meses	Droga de origem e metabólitos	Janela cronológica de deteção; fácil coleta e armazenamento	Quantidade de amostra escassa

A partir da tabela acima pode –se concluir que o uso da análise das amostras convencionais (sangue e urina) fornecem indícios do consumo recente de drogas, porém é de grande interesse, para fins práticos, ser associados à análise de cabelo e unha, pois apresentam maior janela de detecção, o que abre a possibilidade de fazer diferentes correlações como a ideia de uso recente da droga quando encontrado no sangue e não no cabelo; quando presente no sangue e presente no cabelo pode indicar uso crônico da droga entre outros [32].

3.2.1 Cabelo como matriz biológica

Um fio de cabelo humano é único, e por vezes, o único remanescente na cena de um crime. Em muitos casos, serve para confirmar ou excluir um possível suspeito. Devido ao fato do cabelo não se decompor como os fluidos corporais e tecidos moles, ele tem sido utilizado pelos patologistas forenses para determinar as circunstâncias de morte [32].

O cabelo pode ser utilizado na toxicologia clínica, forense e ocupacional. As drogas passam por difusão passiva até as células em crescimento na base do folículo capilar, de forma que as substâncias são incorporadas ao cabelo à medida que as células se alongam e envelhecem.

O cabelo é uma amostra obtida de uma forma não-invasiva, não é facilmente adulterado e pode ser armazenado e transportado, sem condições especiais, graças à sua estabilidade [33]. Além disso, a possibilidade de se identificar o uso da droga de forma retrospectiva e cronológica é considerada sua principal vantagem. Levando em consideração que o cabelo humano cresce, em média, de 1,0 a 1,5 cm por mês, é possível traçar um histórico de consumo da cocaína. O período de detecção é diretamente proporcional ao comprimento do cabelo do indivíduo avaliado, sendo o segmento da região proximal à raiz correspondente ao último mês de exposição e a extremidade do cabelo representaria o período mais distante [34].

A análise de toxicologia de cabelo *post-mortem* para as drogas pode fornecer valiosas informações para compreender as circunstâncias que rodearam a morte e para esclarecer a causa da morte. A maior desvantagem

associada com a análise do cabelo é o problema de contaminação externa. Como o cabelo é poroso, as drogas podem ser incorporadas não só de circulação do sangue na ponta da raiz, mas também a partir de sebo e de suor secreções que revestem o cabelo, a partir do fármaco realmente a ser depositada sobre o cabelo e de contaminação do meio ambiente [35].

O mecanismo pelo qual a droga é depositada nesta matriz e a estabilidade das ligações químicas da droga com os sítios ligantes é um dos fatores importantes para a interpretação dos resultados obtidos quando são analisadas amostras de cabelo. Em relação aos possíveis sítios de ligação de drogas, três componentes da estrutura capilar podem ser considerados: proteínas, lipídeos e melanina. Em alguns estudos foi evidenciado que os principais responsáveis pela interação das drogas nos cabelos são a melanina e as proteínas. A quantidade de melanina presente nos cabelos é um fator relevante na determinação de drogas nesta matriz, por causa das diferenças individuais [1]. Devido a esse fato, este tipo de matriz pode sofrer influências da pigmentação, ou mais especificamente o teor de melanina presente. Cabelos com pigmentação apresentam uma quantidade maior da droga do que os cabelos sem pigmentação devido a interação droga-melanina através de ligações iônicas [36].

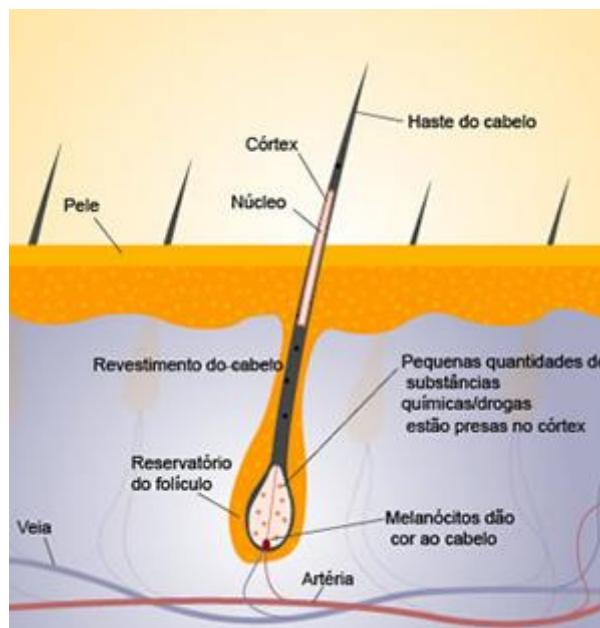


Figura 6. Mecanismo de incorporação da droga no cabelo.

Componentes reativos de produtos cosméticos capilares e condições de reação utilizadas durante a aplicação destes pode converter moléculas de drogas suscetíveis aos procedimentos em outras formas químicas ou até degradá-las [37]. A estabilidade do analito no cabelo pode ser influenciada por procedimentos como permanentes, tinturas, branqueadores e exposição a ultravioleta. [38] Com isso, alterações acentuadas ao nível estrutural e alterações nas propriedades físico-químicas da fibra capilar após ondulação permanente e branqueamento resultam na diminuição ou perda de moléculas de droga anteriormente constituinte da fibra [37]. De um modo geral, a concentração de um analito no cabelo declina 30 a 80% quando se compara o valor observado antes com aqueles obtidos após esses tratamentos, sendo necessário o conhecimento do histórico de cosméticos para detecção das drogas de abuso em cabelo para ajudar na análise. [38]

Além disso a contaminação externa também é um dos problemas encontrados devendo ser realizada a lavagem das amostras de cabelo antes da análise por dois objetivos principais: em primeiro lugar, para remover produtos para os cabelos, suor, sebo ou material de superfície (por exemplo, células da pele, piolhos, fluidos corporais, etc.) que possam interferir na análise ou que podem reduzir a recuperação de extração as drogas. Em segundo lugar, para

remover a contaminação potencial externo de drogas a partir do ambiente. Para isso, várias abordagens têm sido descritas para discriminar entre a contaminação externa e drogas incorporadas através da ingestão. Com isso é geralmente aceito que o uso de solventes orgânicos irá remover apenas a contaminação da superfície [39].

3.2.2. Detecção de cocaína e metabolitos em cabelo

A análise de drogas no cabelo é hoje reconhecida como uma importante ferramenta de detecção para toxicologistas. Uma vez incorporado no cabelo a droga pode ser detectada muito depois de ter sido eliminada a partir de amostras mais convencionais, tais como sangue e urina. Assim, foi encontrada aplicações para a análise do cabelo em programas de tratamento de drogas, testes no local de trabalho, casos de justiça penal e as disputas de custódia de crianças e violência sexual promovida pelo uso de drogas (DFSA). Em muitos desses casos, as reclamações são feitas para a Polícia após qualquer droga ter sido eliminado do sangue ou urina [41].

Enquanto que a forma mais frequente e imediata para descobrir o uso agudo de COC é a análise de urina, recentemente a análise do cabelo tornou-se um meio muito frequente para detectar o uso de COC crônica. A análise do cabelo é perfeitamente adequada para este fim devido a matriz do cabelo absorver COC e prender-se em sua estrutura. As concentrações de COC no cabelo em diferentes distâncias da raiz também podem estar relacionadas com o tempo decorrido desde a ingestão da droga; para este propósito, o cabelo deve ser cortado a partir da região de vértice posterior da cabeça, uma vez que esta é a região de menor variação na taxa de crescimento. Isto permite um monitoramento completo e constante do uso de drogas. Na verdade, a análise do cabelo para drogas de abuso é amplamente utilizada para testes de local de trabalho, contextos de justiça penal e para fins de diagnóstico e monitoramento em programas de reabilitação. Níveis de COC tipicamente encontrados no cabelo de usuários variam de centenas de picogramas por miligrama (ppb) a dezenas de nanogramas por miligrama (ppm) [40].

Embora o composto mais importante encontrado no cabelo de usuários de cocaína seja, na maioria dos casos, a própria cocaína não metabolizada, apenas as determinações concomitantes com seus metabolitos fornecem informações necessárias para confirmação de consumo. Como a COC decompõe-se espontaneamente para BZE, a presença deste último no cabelo não é uma prova suficiente da utilização da COC, mas fornece informações em sua ausência, pois a presença apenas de cocaína tem que levar a uma conclusão de contaminação externa. Do mesmo modo, a ocorrência única de EME também não é suficiente. Por outro lado, a presença de COE atesta a utilização concomitante de COC e etanol, fornece uma ferramenta para diferenciar entre a exposição sistemática e contaminação externa e a existência de vestígios AEME pode demonstrar que a mesma foi fumada, sendo interessante não analisar somente a COC, mas também AEME, EME, COE para confirmar o consumo de COC. Sendo assim, a AEME e COE podem ser utilizados como marcadores de diferentes maneiras e formas de ingestão da COC, sendo que a monitorização da AEME pode ser útil para distinguir administração intranasal e intravenosa [21], [41].

Como a COC decompõe-se espontaneamente para BZE, a presença deste último no cabelo não é uma prova suficiente da utilização da COC. Do mesmo modo, a ocorrência única de EME também não é suficiente. Por outro lado, a presença de COE atesta a utilização concomitante de COC e etanol, e a existência de vestígios AEME pode demonstrar que a mesma foi fumada, sendo interessante não analisar somente a COC, mas também AEME, EME, COE para confirmar o consumo de COC. Sendo assim, a AEME e COE podem ser utilizados como marcadores de diferentes maneiras e formas de ingestão da COC, sendo que a monitorização da AEME pode ser útil para distinguir administração intranasal e intravenosa [21].

A análise de drogas no cabelo é hoje reconhecida como uma importante ferramenta de detecção para toxicologistas. Uma vez incorporado no cabelo a droga pode ser detectada muito depois de ter sido eliminada a partir de amostras mais convencionais, tais como sangue e urina. Assim, foi encontrada aplicações para a análise do cabelo em programas de tratamento de drogas,

testes no local de trabalho, casos de justiça penal e as disputas de custódia de crianças e violência sexual promovida pelo uso de drogas (DFSA). Em muitos desses casos, as reclamações são feitas para a Polícia após qualquer droga ter sido eliminado do sangue ou urina [42].

Os níveis da droga no cabelo são consideravelmente mais baixos do que os encontrados em matrizes rotineiramente testados como sangue e urina e, como tal, apenas em conjunto com a espectrometria de massa são empregados para a confirmação de drogas no cabelo. A separação e detecção de substâncias de interesse é conseguida utilizando métodos cromatográficos hifenadas com espectrometria de massa, por exemplo, GC-MS e LC-MS são técnicas de confirmação devem ter sensibilidade suficiente para os baixos níveis de drogas encontradas no cabelo e são direcionados para refletir o perfil de drogas no cabelo. Além de que seus métodos de confirmação incluem a determinação do fármaco original e seus metabolitos para ajudar a distinguir entre a contaminação e ingestão. [39]

Em 2004, a Sociedade de Teste de Cabelo (SOHT) publicou novas recomendações para testes de cabelo em casos forenses. Adicionalmente pode recorrer-se aos documentos de orientação emitido pela Sociedade de Toxicologia Forense e Química da Alemanha (GTFCh) que compreendem mais alguns detalhes especialmente relativa a validação de métodos em toxicológica forense e métodos analíticos com recomendações especiais para testes em cabelo [43].

A tabela 2 ilustra os métodos encontrados na literatura para determinação de cocaína e metabolitos nos últimos anos.

Tabela 2. Métodos de determinação de cocaína e metabolitos em cabelos.

Analito	Quantidade detectada ng/mg	Descontaminação	Solvente de extração	Condições de extração	Método Analítico	Quantidade de Amostra (mg)	Referência Bibliográfica
COC	3,99	Lavagem com metanol	HCl 0,1M	Overnight a 45°C	GC-MS	NI	Vingnali et al 2012 [45]
COC	NI	Lavagem com Diclorometano	Metanol	Overnight a 56°C	GC-MS	10	Aleksa et al 2011 [46]
COC BE EME	4,0 2,5 0,5	Shampoo/ Diclorometano/ Isopropanol	HCl 0,1M	Overnight 25°C	GC-MS	50	Cordero et al 2010 [47]
COC	0,1	Metanol	HCl 0,1M	Overnight a 45°C	CG-MS	NI	Stramesi et al 2008 [48]
COC	1,7	Metanol	HCl 0,1M	Overnight a 45°C	HPLC	5	Mercolini et al 2008 [42]
COC BZE EME ECG	NI	Éter de Petróleo / Metanol	Metanol:Água (3:7, v/v)	4 horas em ultrassom a 50°C	LC-MS	100	Hoelzle et al 2008 [49]
COC	0,2	Metanol	Metanol	6 horas em ultrassom 25°C	GC-MS	NI	Tsanaclis e wicks 2007 [50]
COC EME AEME COE	160 6,4 7,3 2,8	Diclorometano/ Água/Metanol	HCl 0,1M	Overnight a 60°C	GC-MS	50	Cognard et al 2005 [21]

Legenda: Cocaína (COC), Benzoilecgonina (BZE), Cocaetileno (COE), Ester Metilecgonina (EME) e Ester Metilanidroecgonina (AEME).

4.2 Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas

Nas últimas décadas, um interesse crescente tem sido observado na determinação de drogas em materiais biológicos alternativos, promovido principalmente pelo desenvolvimento intensivo de técnicas altamente sensíveis e seletivas, especialmente a cromatografia líquida (LC) e a cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (LC-MS) [50].

A HPLC é uma das principais técnicas utilizadas na análise de compostos não voláteis e/ou termicamente instáveis [51]. É uma técnica de separação com finalidade qualitativa e quantitativa que apresenta boa sensibilidade e permite a separação de substâncias químicas, pode ser considerada um método físico-químico de separação por conter uma fase móvel e uma fase estacionária, sendo que a amostra a ser analisada é injetada na entrada da coluna e a fase móvel é bombeada continuamente fazendo com que os analitos da amostra migrem de forma diferencial decorrente das interações intermoleculares entre a fase móvel e a fase estacionária. No outro lado da coluna é instalado um detector que transmite para um registrador um sinal que é interpretado em forma de cromatograma, sendo a área e a altura deste proporcional a concentração do analito [52].

Apesar de ser uma excelente técnica de separação, a HPLC necessita de uma técnica confirmatória quando a análise for qualitativa. Dentre as várias opções existentes, a espectrometria de massas é a técnica que melhor fornece as informações estruturais necessárias; o acoplamento entre estas duas técnicas dá origem a uma ferramenta analítica versátil e de grande potencial na análise qualitativa e quantitativa [46], porque juntas combinam a elevada seletividade da detecção por espectrometria de massa com a possibilidade de analisar diretamente amostras aquosas e hidrofílicas, e analitos termolábeis e não-voláteis [53].

A espectrometria de massas (MS) é uma técnica de química analítica com base na determinação da razão massa/carga dos íons característicos dos analitos estudados. Os íons do analito pode ser fragmentado dentro do espectrômetro de massa, que está sob vácuo, gerando íons produtos que estão carregados. Este processo é conhecido como a dissociação induzida por colisão. A razão massa/carga

(m/z) dos íons dos fragmentos produzidos podem então ser determinado numa segunda etapa do MS, dando origem aos termos MS / MS ou espectrometria de massa em *tandem*. Uma vez que os fragmentos e suas abundâncias são determinadas pela estrutura da substância a analisar, este padrão de fragmentação e as massas dos íons dos produtos são característicos do analito. Ambos os íons moleculares e os fragmentos podem ser utilizados para a identificação e a quantificação do analito. [54]

A forma mais simples de espectrometria de massas em *tandem* combina dois analisadores de massas tipo quadrupolo. O primeiro quadrupolo (Q1) é utilizado para selecionar um único precursor de m/z , que é característica de um dado analito numa mistura. Os íons selecionados em massa passam por uma câmara de colisão com um gás neutro, chamado gás de colisão onde ocorre a dissociação induzida por colisão (CID), gerando assim os íons fragmentos. O terceiro quadrupolo (Q3) é usado para monitorar os íons fragmentos e separa-los de acordo com a sua m/z . O espectro resultante "MS / MS" consiste apenas de íons produtos do precursor selecionado. [55]

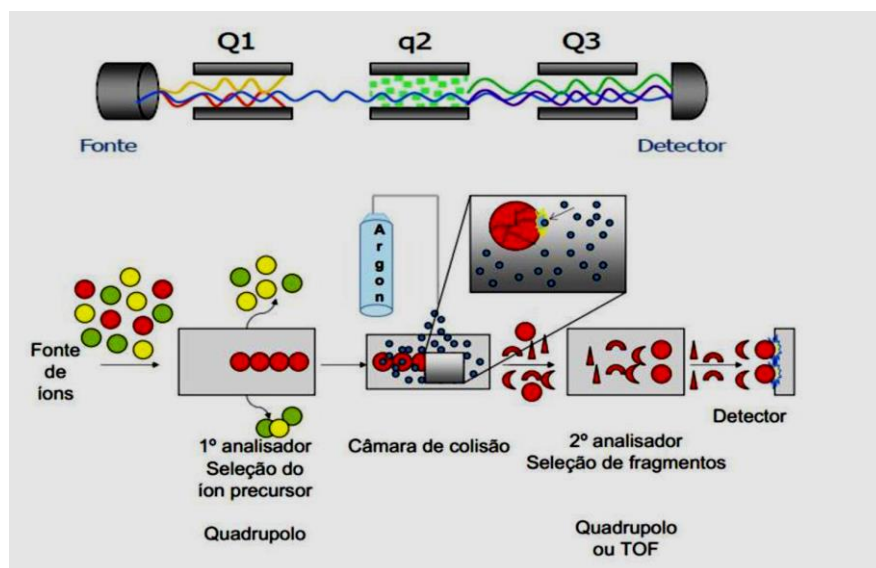


Figura 7. Esquema de funcionamento do LC-MS/MS [56]

O surgimento de novas técnicas de ionização, como a ionização por Electrospray (ESI) expandiu a gama de moléculas que podem ser analisadas por

espectrometria de massas, incluindo moléculas de alta polaridade, alta massa molecular e grande complexidade estrutural. Esse tipo de ionização é conhecido pela habilidade de transferir espécies carregadas em solução para a fase gasosa de forma suave, assim, muitos dos íons gerados na fase gasosa mantêm exatamente a mesma estrutura e carga das espécies em solução, o que é perfeito para análise de espécies não voláteis.

A espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (ESI-MS) tornou-se uma das técnicas analíticas mais poderosas e amplamente utilizada. Dentre as vantagens de ESI-MS incluem alta sensibilidade e seletividade, facilidade de uso e consumo reduzido de amostra. Uma das principais características da técnica é a capacidade para produzir íons multiplamente carregados, dependendo das características da amostra, reduzindo assim a razão m/z , de tal modo que é possível analisar compostos de elevada massa molecular. A segunda característica importante é que as amostras a serem analisadas devem ser introduzidas em solução, o que faz com que seja possível o acoplamento com muitas técnicas de separação. Por último, ESI é uma técnica de ionização suave, provocando pouca (ou nenhuma) fragmentação dos analitos estudados [56].

A análise de COC e metabólitos por GC/MS é bem estabelecido, porém requer uma etapa crítica de preparo de amostra, a derivatização do analito e seus metabólitos correspondentes, etapa esta que pode introduzir excessos de derivatizantes agressivos para o sistema analítico gerando contaminação do sistema. Na análise por LC-ESI-MS, uma característica importante das moléculas de interesse é a presença de um grupo amina básica que oferece um sítio de protonação o qual apresenta uma excelente sensibilidade. Além do mais a análise de cocaína e metabólitos por esta técnica mostra uma grande vantagem a eliminação da etapa de derivatização [57].

4.3 Validação de Métodos Analíticos

A importância da validação em análise química tornou-se mais acentuada a partir da constatação da enorme variabilidade de resultados obtidos em estudos Inter laboratoriais na década de setenta [58].

O bom desempenho de qualquer técnica analítica depende crucialmente de dois parâmetros: a qualidade das medidas instrumentais e a confiabilidade estatística dos cálculos envolvidos no seu processamento. Uma forma de assegurar a aplicabilidade e o alcance de um método durante as operações de rotina de um laboratório é estabelecendo os limites destes parâmetros por meio da estimativa das figuras de mérito, numa etapa conhecida como validação [59].

A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência. Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado, o que garante informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra. A necessidade de se mostrar que a qualidade das medições químicas está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Dados analíticos não confiáveis, podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis [60].

Segundo a RE nº899 de 29 de maio da ANVISA [61], a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados.

A Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012 define validação como a confirmação por ensaio e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos

Os seguintes parâmetros devem ser avaliados para validação:

- Seletividade/Especificidade;
- Linearidade;
- Precisão;

- Limite de quantificação;
- Limite de Detecção;
- Exatidão;
- Efeito Residual;
- Efeito Matriz;
- Estabilidade das amostras.

4.3.1 Seletividade

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa [60]. Esses interferentes podem ser substâncias quimicamente relacionadas com o analito, entre elas isômeros, metabólitos, substâncias endógenas, produtos de degradação, impurezas entre outros. [62]

4.3.2 Linearidade

A função calibração de um processo de medição química é a relação funcional entre o valor esperado para o sinal ou resposta e a quantidade de analito [63], sendo assim, linearidade é a capacidade de um método analítico em produzir resultados que sejam linearmente proporcionais à concentração do analito nas amostras, em uma dada faixa de concentração [64]. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser igual a 0.99 [61].

4.3.3 Precisão

A precisão corresponde ao grau de concordância de resultados de testes independentes obtidos sob condições estabelecidas e é expressa pela estimativa do desvio padrão (s) ou estimativa do desvio padrão relativo (RSD) [62]. Para a determinação da precisão deve ser realizada em no mínimo, 3 corridas em 3 dias diferentes [61].

4.3.4 Exatidão

Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro [60]. Assim, a exatidão está sempre associada a valores de precisão, então estes limites podem ser mais estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis de traços [65].

4.3.5 Limite de Quantificação (LQ)

O Limite de Quantificação é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de exatidão e precisão. Os critérios adotados para o LQ, é a relação 10:1, ou seja, pode ser calculado utilizando o método visual, a relação sinal-ruído. [60].

4.3.6 Limite de Detecção (LD)

O LD é definido como sendo a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas [62]. É adotado como a concentração do analito que produz um sinal de três a cinco vezes a razão sinal/ruído do equipamento. [66]

4.3.7 Efeito Matriz

Este efeito ocorre quando substâncias inerentes à matriz biológica coeluem com os compostos de interesse, sendo alvo de especulação em métodos bioanalíticos [67]. Esse estudo de seletividade objetiva averiguar possíveis interferências causadas pelas substâncias que compõem a matriz amostral gerando, basicamente, fenômenos de diminuição ou ampliação do sinal ou resposta instrumental.

4.3.8 Estabilidade dos analitos na matriz

Para gerar resultados confiáveis e reprodutíveis, as amostras, os padrões e reagentes usados devem ser estáveis por um período razoável. A estabilidade das amostras e padrões é importante em termos de temperatura e tempo faz-se necessário avaliar a estabilidade da substância para determinar o tempo de estocagem das amostras. Tempos longos de estocagem de amostras biológicas, por

exemplo, aumentam a probabilidade de degradação dos compostos de interesse, com subsequente formação de metabólitos. Conhecendo a estabilidade, as análises podem ser completadas antes de ocorrer a degradação [60].

4.3.9 Efeito Residual

Pode ser definido como um aumento de concentração em uma amostra, proveniente de resquícios da amostra anterior. É avaliado com análises de amostras brancas após análises de amostras de alta concentrações do analito [68].

4.3.10 Recuperação

A recuperação avalia a eficiência do método de tratamento das amostras biológicas. Este parâmetro é calculado comparando-se a resposta obtida para o analito adicionado na matriz biológica e extraído com a resposta obtida para o analito em amostras preparadas em solvente [67].

4. MATERIAS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Materiais e outros reagentes

- Metanol, grau HPLC, 99,8%, (J. T. Baker®).
- Acetonitrila, grau HPLC, 99,8%, (J. T. Baker®).
- Ácido fórmico 98-100%, (Merk®).
- Formiato de amônio ($\geq 99,995\%$), (Sigma Aldrich®).
- Acetato de Etila (grau HPLC), (Tedia®).

4.1.2 Soluções-padrão

As soluções-padrão certificados de cocaína, cocaetileno e benzoilecgonina e seus respectivos deuterados (cocaína-d₃, benzoilecgonina-d₃ e cocaetileno-d₃) foram obtidas da Cerilliant® na concentração de 1 mg.mL⁻¹ em acetonitrila.

A partir dessas soluções, foram preparadas soluções de trabalho, diluídas em acetonitrila nas concentrações de 1 µg.mL⁻¹ de cada substância. As soluções foram armazenadas a -20°C. As soluções finais nas concentrações dos níveis da curva de calibração foram diluídas em fase móvel na proporção inicial do gradiente proposto.

4.1.3 Equipamentos e acessórios

Foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência da Agilent Technologies®, modelo 1260, acoplado à Espectrômetro de Massas híbrido QTRAP modelo 5500, (AB Sciex®), e a aquisição de dados foi realizada através do software Analyst versão 1.6.1 e o processamento dos dados usando o programa MultiQuant versão 1.3.1..

- Coluna cromatográfica, fase estacionária C18, tamanho do poro 100 Å, tamanho da partícula 2,6 µm, comprimento 100 mm e diâmetro interno de 3,00 mm, lote nº 596153-94, fabricada pela Kinetex®.
- Pipetas de volume variável, (Eppendorf®).
- Gases especiais para LC-MS/MS: nitrogênio 5,0.
- Balança analítica, modelo Q-500L210C (min 1mg; máx 210g) (Quimis®).
- Agitador orbital tipo Vortex (Ika®).
- Banho de ultrassom (modelo Ultrasonic Cleaner (Unique®).
- Concentrador de amostras com pressão de nitrogênio e temperatura ambiente (Marconi®)
- Centrífuga modelo 5418 (Eppendorf®)

4.2 Métodos

4.2.1 Amostra de cabelo

As amostras de cabelo foram concedidas pela Superintendência da Polícia Técnico Científica (SPTC) da cidade de São Paulo, coletadas nos institutos Médico Legal (IML) da zona oeste e sul, com aprovação da comissão científica do IML e sob autorização de familiar responsável legal através de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo A).

Amostras de controle negativos foram coletadas de voluntários doadores sob autorização através de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo B).

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP (número do parecer: 681.045) (ANEXO C)

As amostras foram armazenadas em embalagem plástica, devidamente esterilizado e identificado, e então foram armazenadas em freezer a -15°C até o momento da análise.

4.2.2 Desenvolvimento do método para determinação de cocaína e metabólitos em amostras de cabelo

4.2.2.1. Otimização das condições de operação do ESI-MS

Para determinação de cocaína e seus metabólitos em cabelo foi utilizado o equipamento descrito anteriormente, configurado para o monitoramento de reações múltiplas (MRM) onde o íon precursor é selecionado a partir de sua m/z e a partir dele obtém-se dois fragmentos característicos para análise, um fragmento gerado com maior intensidade para cada analito foi utilizado para quantificação e um segundo fragmento gerado foi utilizado para confirmação do analito analisado, sendo assim para cada composto em análise foram selecionadas duas transições. Foi utilizada fonte de ionização *electrospray* (ESI), no modo positivo de aquisição de íons.

Em extrações que se destinam a ensaios cromatográficos para quantificação, erros devido perda da substância a ser analisadas podem ser compensados pelo uso de padrão interno (PI) com propriedades físico-químicas semelhantes ao analito. Assim para funcionar como PI deve-se manter o grupo funcional crítico, para responder de forma semelhante a todas as etapas de extração. [65] Com esse intuito foram utilizados padrões internos para cada um dos analitos, sendo estes a molécula de interesse deuterada (d_3). Onde também foram avaliadas as melhores condições de análises para os respectivos PI's,

A otimização dos analitos e seus respectivos fragmentos foi feito por injeção direta do analito no equipamento avaliando essas condições. A otimização dos parâmetros de fragmentação foi realizada a fim de selecionar as melhores condições de fragmentação e detecção dos íons em análise por LC-MS, permitindo assim valores de detecção e quantificação mais baixos.

O processo de otimização da ionização e fragmentação dos analitos e seus respectivos fragmentos foi feito por experimentos de infusão direta do analito no equipamento. As condições otimizadas da fonte de ionização encontram-se descritas a seguir:

a) Parâmetros de ionização

Buscando obter a maior intensidade do sinal e, conseqüentemente uma melhor sensibilidade na análise, realizou-se a otimização dos parâmetros de ionização avaliando as condições da fonte. Os fatores avaliados foram: fluxo de gás (15, 20, 25, 30 L.min⁻¹), temperatura da fonte (450, 500, 550, 600, 650 °C).

4.2.2.2 Otimização das condições do LC

A cromatografia foi desenvolvida numa coluna Kinetex C18 (100 mm x 3,0 mm x 2,6 µm) e as fases móveis foram a solução A (Solução aquosa de 5 mM de formiato de amônio com 0,1 % de ácido fórmico) e a solução B (Acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico). As condições otimizadas do LC encontram-se descritas a seguir:

a) Precisão do injetor

A fim de verificar a repetibilidade dos dados obtidos, realizou-se um teste de precisão do injetor. Para tal, foram realizadas injeções sequenciais de seis amostras da mistura de padrões contendo COC (4,81 ng mL⁻¹), BZE (4,81 ng.mL⁻¹) e COE (4,81 ng mL⁻¹) e os padrões internos nas mesmas concentrações.

b) Condições cromatográficas

A fim de promover uma melhor separação dos analitos foram avaliados os seguintes parâmetros: volume de injeção (1µL, 2µL, 3µL e 5µL), e gradiente de fase móvel.

c) Efeito de memória (Carryover)

Tal análise foi realizada com o intuito de avaliar a contaminação por efeito de memória entre uma análise e outras subsequentes. Nesse sentido, realizou-se injeções sequenciais (4 injeções) do branco, padrão no Controle de Qualidade de Alta Concentração (CQA) e dois brancos.

4.2.2.3 Matrizes Biológicas – cabelo

4.2.2.3.1 Descontaminação.

Para avaliar o processo de descontaminação externa das amostras de cabelo, provenientes tanto da manipulação da droga pelo indivíduo quanto de contaminação ambiental, foram pesados 10 mg da amostra de cabelo obtidos através de voluntários, transferindo-as para tubo Eppendorf de 1,5 mL. Adicionou-se padrões de COC, BZE e COE acompanhadas de seus respectivos PI, em concentrações conhecidas para realizar a contaminação do cabelo branco. Evaporou-se o solvente presente na amostra à temperatura ambiente e sob fluxo de nitrogênio, a partir dessa etapa inicia-se o processo de descontaminação.

Foi adicionado 1 mL de água ultrapura no Eppendorf contendo a amostra contaminada, agitando em vórtex durante 1 minuto, essa água de descontaminação foi coletada para posterior análise no equipamento. Uma segunda lavagem foi realizada com metanol adicionando-se 1 mL de metanol agitando em vórtex por 1 minuto, o metanol de lavagem foi coletado para análise subsequente.

4.2.2.3.2 Extração

Após realização da lavagem da amostra, a mesma foi seca novamente em temperatura ambiente sob fluxo de nitrogênio e posteriormente submetidas ao processo de moagem criogênica visando a pulverização das amostras aumentando assim a superfície de contato entre a amostra e o solvente durante o procedimento de extração dos analitos de interesse, contribuindo assim para melhor eficiência do processo. Para a realização desse processo, as amostras foram congeladas com

nitrogênio líquido a uma temperatura de -196°C e trituradas com auxílio de um pistilo em gral de porcelana.

Após a obtenção das amostras pulverizadas as amostras de cabelo controle negativas foram fortificadas com $100\ \mu\text{L}$ dos padrões com concentrações conhecidas de COC ($93,8\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), BZE ($93,8\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) e COE ($93,8\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) e seus respectivos PI na concentração de $48,1\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$. Para a eliminação do solvente da amostra foi submetida novamente a secagem sob fluxo de nitrogênio à temperatura ambiente.

Foi adicionado $500\ \mu\text{L}$ de acetato de etila no eppendorf contendo a amostra contaminada, deixando-a em ultrassom por 5 minutos e em seguida centrifugada por 5 minutos a $14000\ \text{rpm}$ e retirado o sobrenadante. O mesmo processo foi realizado por mais duas vezes, obtendo um volume final de $1,5\ \text{mL}$.

Esta solução foi concentrada novamente em temperatura ambiente sob fluxo de nitrogênio, e finalmente ressuspensa em $1\ \text{mL}$ do diluente e injetada no equipamento.

4.2.2.4. Validação do método

O método de análise previamente otimizado foi validado estabelecendo os valores de recuperação, linearidade, precisão intra e interensaio, limite de detecção, limite de quantificação e estabilidade dos analitos na matriz seguindo a RDC nº 27 de 17 de maio de 2012. Todas as amostras foram adicionadas de padrão interno deuterado antes do procedimento de preparo de amostra.

4.2.2.4.1. Linearidade

Para realização da curva de calibração foram feitas análises de uma amostra branco (matriz de cabelo isenta do analito e seus metabólitos), uma amostra zero (matriz biológica com adição apenas dos padrões internos) e amostras contendo

os padrões dos metabólitos e seus correspondentes padrões internos deuterados de acordo com as concentrações descritas abaixo.

O estudo de linearidade foi realizado pela análise das amostras de cabelo nas seguintes concentrações: COC (0,5, 1,5, 3,0, 4,81 e 9,38 ng.mL⁻¹), BZE (0,5, 1,5, 3,0, 4,81 e 9,38 ng.mL⁻¹) e COE (0,5, 1,5, 3,0, 4,81 e 9,38 ng.mL⁻¹). As análises da linearidade para as amostras de cabelo foram realizadas em triplicata e em três dias diferentes, considerando para todas as curvas o coeficiente de correlação maior que 0,99.

4.2.2.4.2. Limite de detecção e limite de quantificação

O LD foi definido através da análise em amostras negativas de cabelo que serão fortificadas com soluções de padrões em concentrações decrescentes. Foi considerado como LD aquele referente à menor concentração na qual foi possível obter picos integrados pelo equipamento que se diferenciaram do ruído, no mínimo 3 vezes, em quatro replicatas, nas condições especificadas e que apresentou coeficiente de variação (CV) $\leq 20\%$ [66].

O limite de quantificação (LQ), foi a menor concentração para medidas quantitativamente precisas, determinado através da análise em amostras negativas de cabelo fortificadas com soluções de padrões em concentrações decrescentes e foi considerado como LQ a menor concentração que apresentou CV $\leq 15\%$, na qual será possível obter picos integrados pelo equipamento que se diferenciarão do ruído, no mínimo 10 vezes [66].

4.2.2.4.3. Recuperação

Para avaliação da recuperação foram preparadas amostras controles negativas de cabelo contendo COC, BZE e COE de forma a se obter concentrações do Controle de Qualidade de Baixa, Média e Alta concentração (CQB, CQM e CQA).

A recuperação do método mediu a eficiência do processo de extração comparando a resposta das amostras de controle positivo preparadas por dopagem, submetidas ao método de extração proposto e em duplicata, com a resposta de

soluções de padrões dos analitos, adicionadas aos extratos das amostras referência negativa. Os resultados foram expressos em porcentagem, de acordo com a equação:

$$R = \frac{RAM}{RAP} \times 100$$

Onde: R é a recuperação, RAM é a resposta do analito (padrão) adicionado à matriz antes do processo de extração e RAP é a resposta do analito (padrão) adicionado à amostra referência negativa após o processo de extração.

4.2.2.4.4. Precisão intra- e inter-ensaio

A precisão intra- e inter-ensaio foi determinada indiretamente pelo cálculo de imprecisão através da determinação do coeficiente de variação do método (CV) conforme o cálculo mostrado abaixo. O estudo foi conduzido analisando amostras de cabelo em três dias diferentes, contendo as concentrações do LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD. As análises serão realizadas em cinco replicatas para cada concentração.

$$CV = \frac{\text{Desvio Padrão} \times 100}{\text{Concentração média experimental}}$$

4.2.2.4.5. Estabilidade dos analitos na matriz

Amostras de cabelo contendo COC, BZE e COE nas concentrações de 0,5 e 7,04 ng mL⁻¹, onde foram armazenadas e analisadas através do método padronizado em três replicatas para cada concentração. A estabilidade dos analitos em cabelo foi avaliada por meio da comparação da resposta obtida no tempo zero com a resposta obtida após o período de armazenamento de 96 horas em condições de temperatura controlada a 10°C no amostrador do equipamento.

4.2.2.4.6. Efeito de matriz

O efeito de matriz (efeito dos constituintes da matriz na resposta cromatográfica) foi avaliado preparando amostras de matrizes biológicas

processadas, posteriormente adicionadas de analito e PI, e soluções, nas mesmas concentrações das amostras de 1,5 e 7,04 ng mL⁻¹ para os analitos e 4,81 ng mL⁻¹ para os PIs.

4.2.2.4.7 Exatidão

A exatidão foi determinada em uma mesma corrida analítica (exatidão intracorrída) e em três corridas diferentes (exatidão intercorrídas), utilizando as concentrações do LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD.

4.2.2.4.8 Seletividade

Uma forma simples de verificar a seletividade de um método cromatográfico foi observando a presença de picos na região do tempo de retenção do analito de interesse injetando um branco com a mesma matriz a ser analisada [56].

Sendo assim, as amostras foram analisadas em seis fontes distintas de amostras branco avaliando as respostas de picos interferentes na região próxima ao tempo de retenção do analito que devem ser inferiores a 20% da resposta do analito em relação as amostras do LIQ.

Todos os cálculos utilizados na validação do método foram realizados com o auxílio do Microsoft Excel® do programa Microsoft Office XP Professional 2007 e software MultiQuant®1.3.1.

4.2.3 Correlação com situação clínica

Para comprovar a eficiência do método de análise validado, o mesmo foi aplicado em amostras reais de periciados provenientes do Instituto Médico-Legal (IML).

5. RESULTADOS

5.1 Otimização das condições do equipamento

Para a fonte de ionização, foi observado que os parâmetros que proporcionaram um ganho significativo na intensidade do sinal estão descritos na tabela a seguir.

Tabela 3. Resultados obtidos para melhor ionização dos analitos

Parâmetro	Resultado
CUR (L.min ⁻¹)	30
CAD (L.min ⁻¹)	6
NC (L.min ⁻¹)	5
TEM (°C)	650
GS1 (L.min ⁻¹)	45

As melhores condições de fragmentação dos íons monitorados foram: voltagem do capilar de 4,5 kV sendo a energia de colisão diferente para cada analito.

A Tabela 4 e 5 apresentam os resultados de energia de colisão, tempo de retenção e os íons de quantificação e confirmação selecionados.

Tabela 4. Resultado da otimização das condições de fragmentação para determinação dos analitos no LC-MS/MS. A transição usada para quantificação esta sublinhada.

Composto	MRM	Tempo de Retenção (min)	Energia de Colisão (eV)	DP (V)	EP (V)
Cocaína	<u>304>182</u>	4,3	-30	75	10
	304>82		-45	75	10
Benzoilecgonina	<u>290>168</u>	4,9	-30	90	10
	290> 105		-45	90	10
Cocaetileno	<u>318> 196</u>	5,4	-30	100	10
	318>82		-45	100	10

Tabela 5. Resultado da otimização das condições de fragmentação para determinação dos PIs no LC-MS/MS. A transição usada para quantificação esta sublinhada.

Composto	MRM	Tempo de Retenção (min)	Energia de Colisão (eV)	DP (V)	EP (V)
Cocaína d-3	<u>307>185</u>	4,3	-30	95	10
	307>85		-43	95	10
Benzoilecgonina d-3	<u>293>171</u>	4,9	-32	90	10
	293> 105		-45	90	10
Cocaetileno d-3	<u>321> 199</u>	5,4	-30	100	10
	321>85		-45	100	10

A seleção de duas transições só é possível por um analisador de massas sequencial (LC-MS/MS) que separa os íons gerados através da sua relação m/z, e através da câmara de colisão consegue fragmentar o íon precursor em transições de interesse tornando os resultados mais confiáveis. O fragmento mais intenso (mais

estável) de cada analito foi escolhido para quantificação do composto e o segundo fragmento mais intenso para confirmação do mesmo.

As Figura 8, Figura 9 e Figura 10 apresentam os espectros de massas obtidos através da infusão direta das soluções dos analitos no espectrômetro de massas, de onde foi possível obter os resultados de fragmentação.

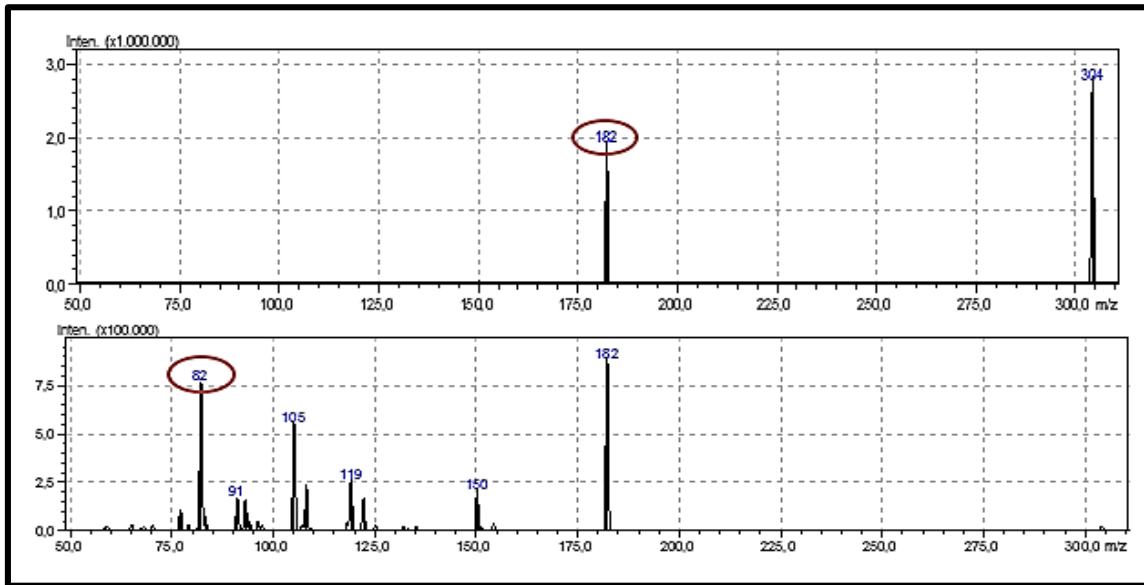


Figura 8. Espectro de massas obtido para solução de cocaína.

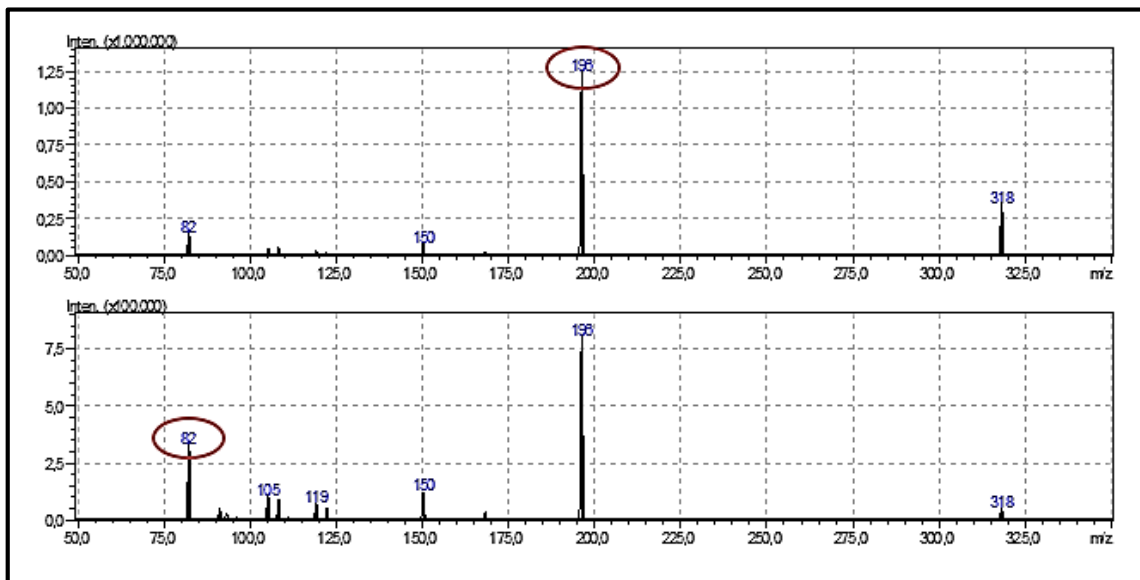


Figura 9. Espectro de massas obtido para solução de cocaetileno.

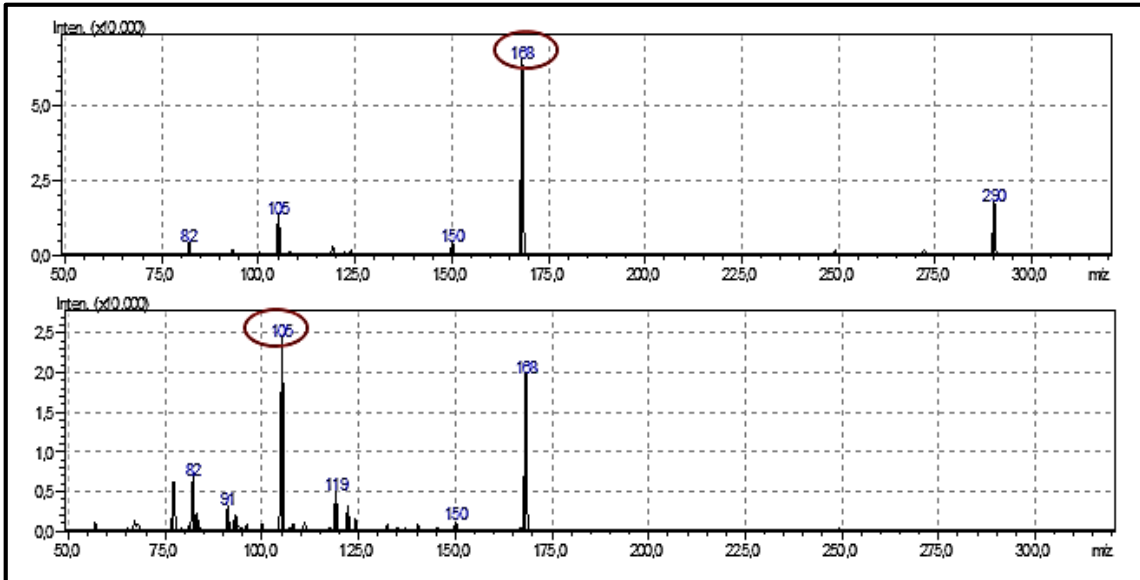


Figura 10. Espectro de massas obtido para solução de Benzoilecgonina

As figuras 11, 12 e 13 apresentam as estruturas propostas das moléculas analisadas.

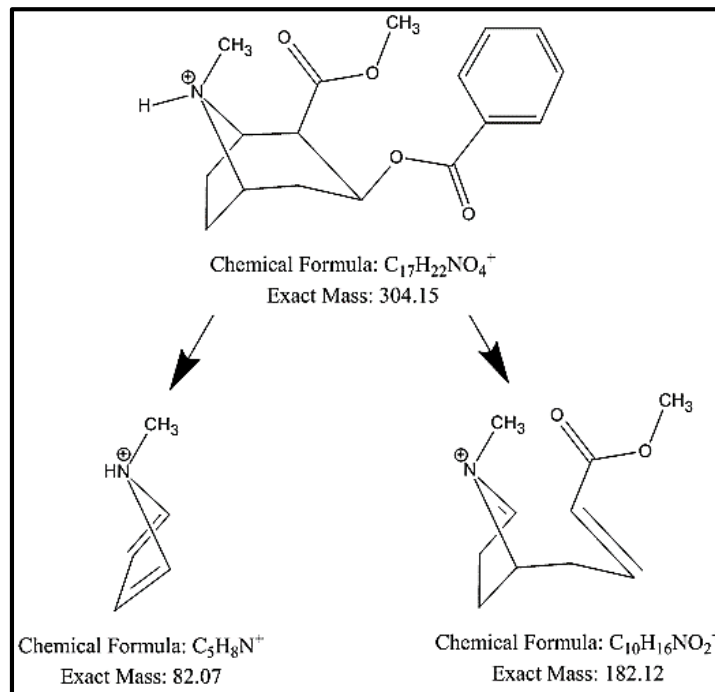


Figura 11. Mecanismo proposto para fragmentação da cocaína

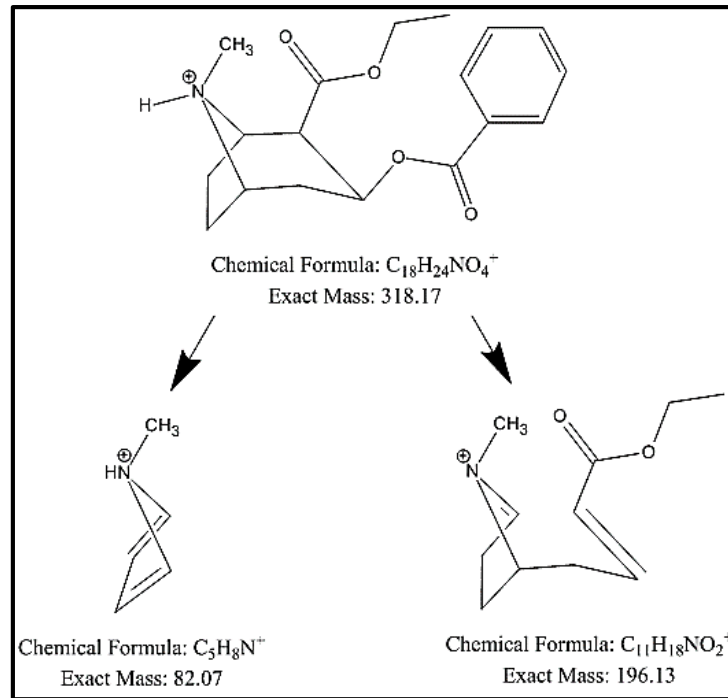


Figura 12. Mecanismo proposto para fragmentação do cacaetileno

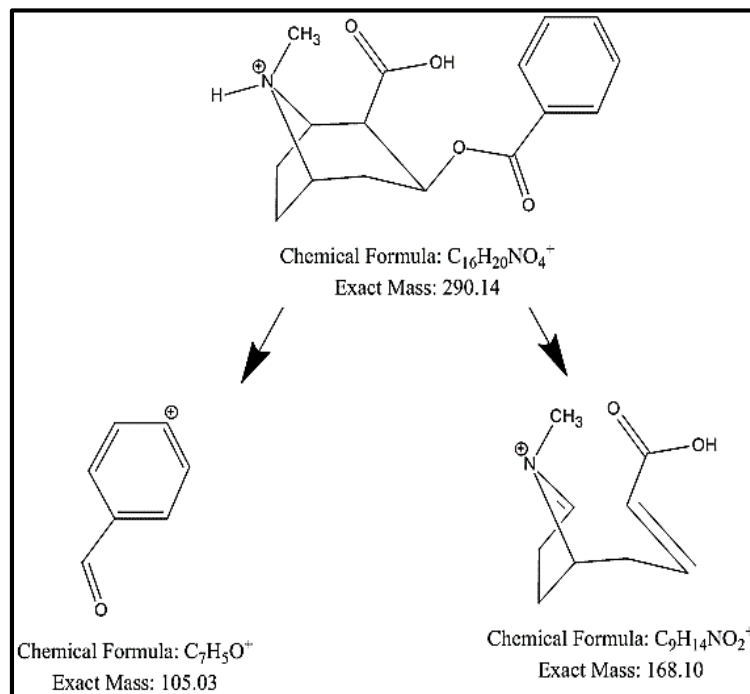


Figura 13. Mecanismo proposto para fragmentação da benzoilecgonina

E as Figuras 14, Figura 15 e Figura 16 apresentam os espectros dos padrões internos deuterados utilizados (COC-d3, BZE-d3 e COE-d3).

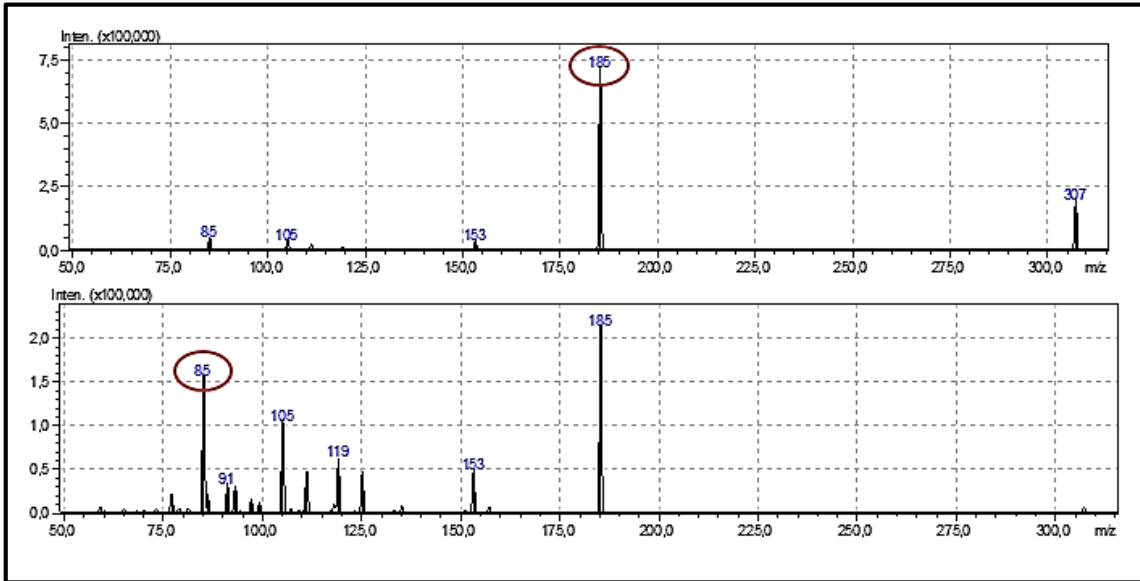


Figura 14. Espectro de massas obtido para solução de cocaína-d3

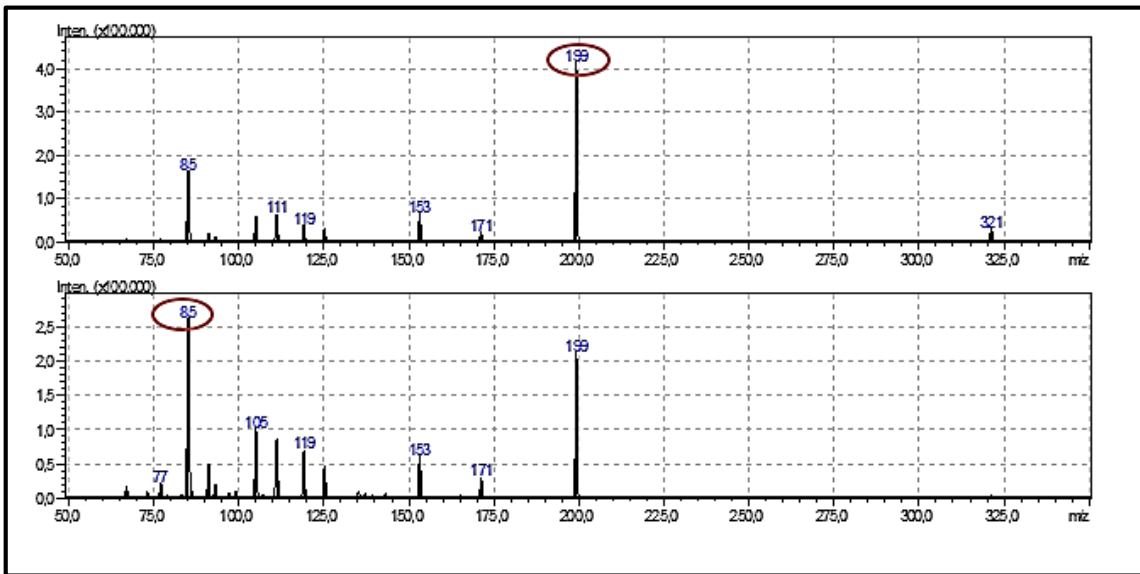


Figura 15. Espectro de massas obtido para solução de cocaetilenod3.

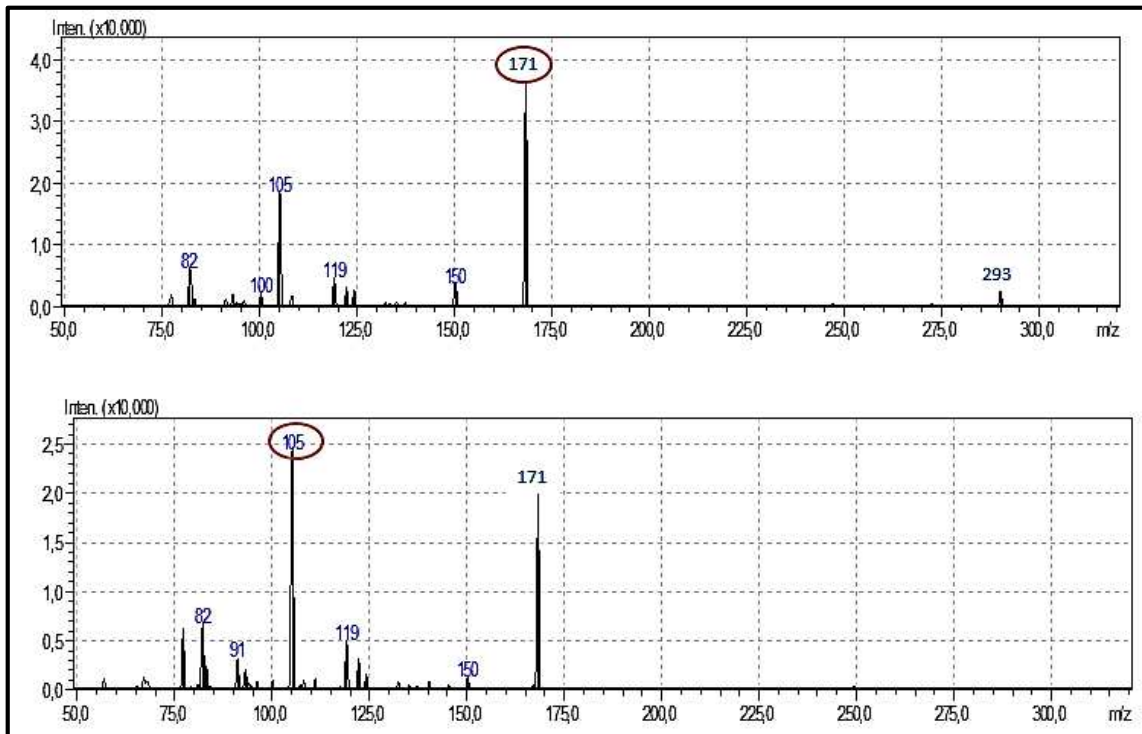


Figura 16. Espectro de massas obtido para solução de benzoilecgonina-d3.

Definidos os parâmetros no espectrômetro de massa, procedeu-se a otimização das condições de separação cromatográfica.

De acordo com as características dos analitos e os dados encontrados na literatura a cromatografia desenvolvida optando-se por uma coluna Kinetex C18 (100 mm x 3,0 mm x 2,6 μ m). Depois de testes de diferentes fases móveis as escolhidas foram a solução A (Solução aquosa de 5 mM de formiato de amônio com 0,1 % de ácido fórmico), pois a adição do formiato de amônio à água ajudou na cromatografia tamponando o meio e o ácido fórmico ajudou na ionização dos analitos, gerando melhor sinal e a solução B (Acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico) por gerar um cromatograma mais limpo. A Tabela 6 mostra as condições cromatográficas utilizadas.

Tabela 6. Condições do sistema cromatográfico

Parâmetros	Condições cromatográficas
Coluna	Kinetex® 2,6 µm C18 100 Å (100 mm x 3.0 mm)
Fase Móvel	A: (5mM de formiato de amônio + 0,1% ácido fórmico) B: (Acetonitrila + 0,1% Ácido fórmico)
Eluição	Gradiente
Vazão	0,45 mL min ⁻¹
Volume de Injeção	5 µL

Feito a escolha da fase móvel foram testados alguns gradientes, sendo o que está mostrado na Tabela 7 o escolhido por proporcionar boa separação dos picos com resolução necessária e um tempo de corrida curto com tempo de lavagem e condicionamento da coluna.

Tabela 7. Proporção para o gradiente de fase móvel utilizado no método de determinação de cocaína e metabólitos em cabelo.

Tempo	Concentração A (%)	Concentração B (%)
0,0	90	10
4,0	30	70
4,1	5	95
5,0	5	95
5,2	90	10
9	90	10

As amostras foram diluídas e ressuspendidas em uma mistura FMA:FMB na proporção 95:5. A escolha foi feita após vários testes de proporção dessas soluções, sendo a BZE o composto mais problemático, sofrendo interação com maior

quantidade de ACN e apresentando alargamento de pico conforme ao cromatogramas mostrados na Figura 17.

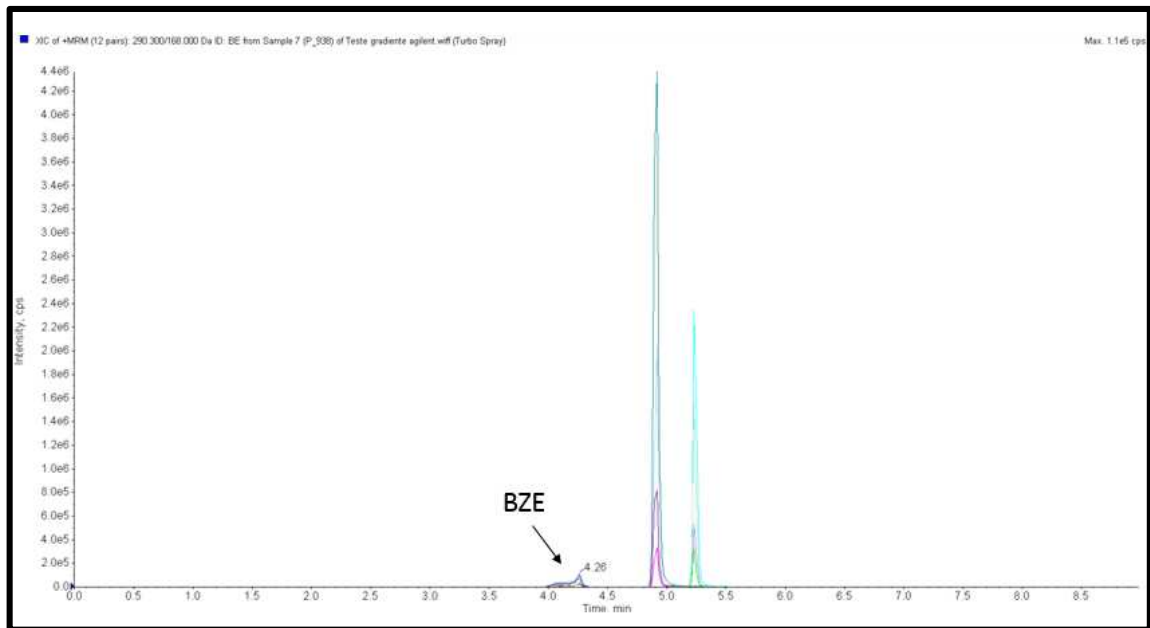


Figura 17. Cromatograma obtido de uma mistura contendo os padrões de benzoilecgonina, cocaína e cocaetilenos e padrões internos em FMA: FMB 70:30 a partir do método otimizado.

A Figura 18 apresenta o cromatograma obtido de acordo com as condições cromatográficas descritas nas Tabelas 6 e 7 no modo de ionização positivo de uma solução da mistura de padrões de COC, BZE e COE e seus respectivos padrões internos nas concentrações de $4,81 \text{ ng.mL}^{-1}$. O tempo total da análise foi de 9 minutos, incluindo lavagem e estabilização da coluna. Após otimização de todos os parâmetros descritos acima, observou-se um ganho significativo de intensidade do sinal, bem como obteve-se melhores picos mais definidos, e bem resolvidos o que resultou em aumento da sensibilidade do método e consequentemente a obtenção de menores LD e LQ.

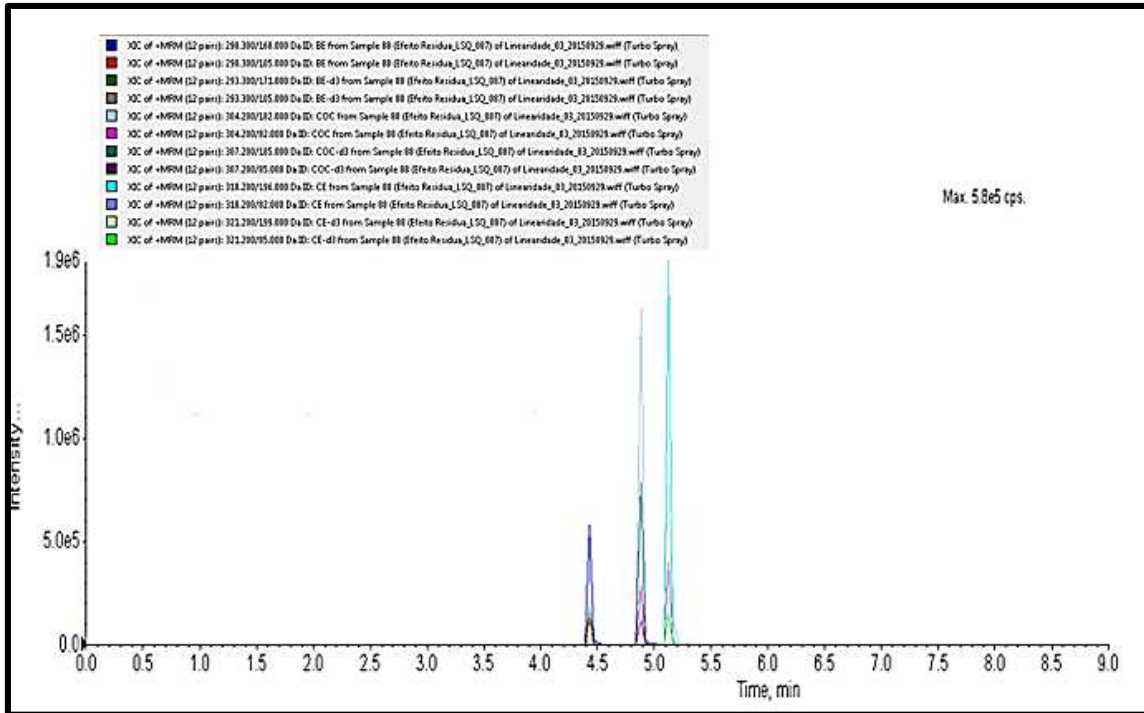


Figura 18. Cromatograma obtido de uma mistura contendo os padrões de benzoilecgonina, cocaína e cocaetileno e padrões internos a partir do método otimizado.

Para avaliação do efeito residual e contaminação cruzada foram realizadas injeções da mistura de padrões na maior concentração seguidas de injeções do branco em triplicata. O método não apresentou efeito de memória, como observado na figura 19.

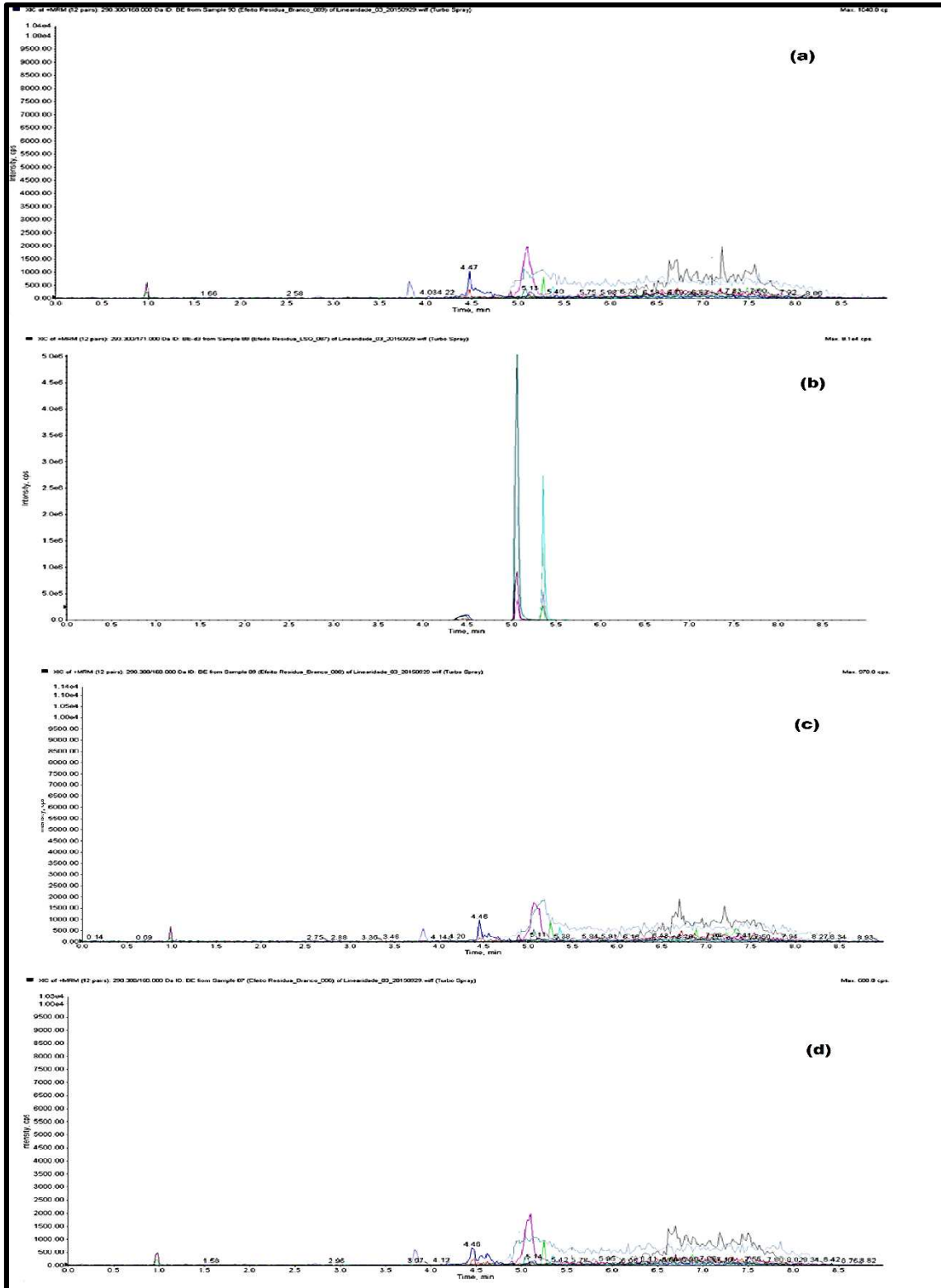


Figura 19. Cromatogramas obtidos da injeção da sequência: a) Branco, b) Mistura de padrão de benzoilecgonina, cocaína e cocaetileno, c) Branco e d) Branco.

A precisão do injetor também foi avaliada com o intuito de verificar a repetibilidade das injeções. Para o teste foi injetado uma mistura de padrões dos analitos e padrões internos dos mesmos em sextuplicata nas concentrações de 4,81 ng mL⁻¹ para os padrões e 4,81 ng mL⁻¹ para os PI. Foram observados desvios padrões (CV) menores que 2% (sendo de 1,70 % para COC, 1,38 % para BZE e 1,32 % para COE) conforme mostra a tabela 8.

Tabela 8. Áreas obtidas para as replicatas das injeções de padrões de COC, BZE e COE.

	Cocaína	Benzoilecgonina	Cocaetileno
R1	2,882.10 ⁶	1,902.10 ⁵	2,884.10 ⁶
R2	2,907.10 ⁶	1,947.10 ⁵	2,975.10 ⁶
R3	2,907.10 ⁶	1,975.10 ⁵	2,900.10 ⁶
R4	2,976.10 ⁶	1,943.10 ⁵	2,951.10 ⁶
R5	2,823.10 ⁶	1,943.10 ⁵	2,974.10 ⁶
R6	2,902.10 ⁶	1,975.10 ⁵	2,958.10 ⁶
DPR (%)	1,70	1,38	1,32

5.2 Extração

Após o processo de descontaminação da amostra a água da primeira lavagem realizada conseguiu extrair com eficiência todos os analitos, ou seja, a água demonstrou-se eficaz para retirar toda a contaminação externa além de outros resíduos polares presentes na superfície do cabelo. A tabela 9 mostra os resultados obtidos para a primeira etapa da descontaminação.

Tabela 9. Valores obtidos para recuperação dos analitos na matriz após o processo de descontaminação nas amostras previamente contaminadas.

	COC (%)	BZE (%)	COE (%)
Amostra 01	94,33	98,02	96,61
Amostra 02	93,97	96,45	94,91
Amostra 03	95,11	94,01	95,46
Média	94,47	97,23	95,66
DPR (%)	0,62	1,14	0,91

O uso do metanol subsequente apenas reforça a descontaminação, ficando em contato com o cabelo por um curto período de tempo e com isso restringe a possibilidade de início da extração dos analitos na matriz antes do período desejado. O metanol utilizado na sequencia não mostrou concentrações significantes do analito, não sendo possível a quantificação de recuperação no final dessa etapa, porém seu uso faz-se necessário por contribuir para uma amostra mais limpa e consequentemente cromatogramas também mais limpo quando aplicado em casos *post-mortem*.

A Figura 20 mostra um fluxograma do processo de extração.

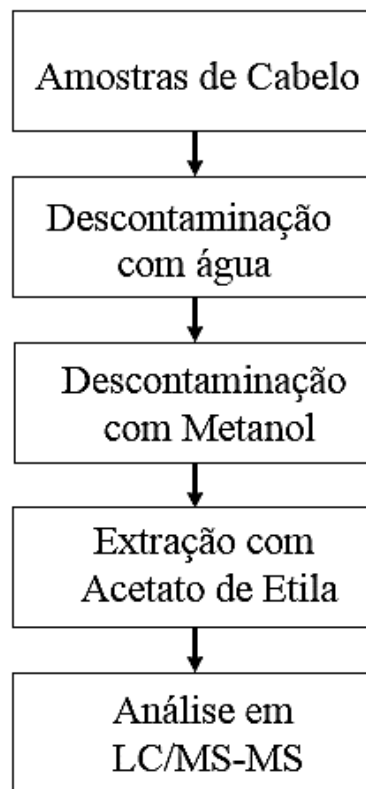


Figura 20. Fluxograma do processo de extração de cocaína e seus metabolitos no cabelo

Depois do processo de extração descrito as amostras fortificadas com a mistura dos padrões foram analisadas e quantificadas. A Tabela 10 mostra a recuperação do processo de extração.

Tabela 10. Recuperação dos analitos após o processo de extração nas amostras de cabelos fortificadas.

	COC (%)	BZE (%)	COE (%)
Amostra 01	98,11	99,22	96,05
Amostra 02	96,22	98,46	97,18
Amostra 03	99,30	96,52	99,89
Média	97,87	98,01	97,70
DPR (%)	1,55	1,39	1,97

As recuperações obtidas na tabela 10 acima para os analitos mostra que o método utilizado na extração foi eficaz na retirada dos mesmos da matriz. Além disso o método proposto possui um tempo de preparo reduzido quando comparado com a outros métodos de extração presentes na literatura como mostra a Tabela 11. Esta vantagem torna o método adequado para implementar-se em análise de rotina.

Tabela 11. Comparação de tempo de análise entre os métodos encontrados na literatura e o método desenvolvido no presente trabalho para a extração de cocaína e seus metabolitos em cabelo.

Referência	Tempo estimado de extração	Tempo de análise por corrida cromatográfica
Vingnali et al 2012	12 horas	NI
Aleksa et al 2011	12 horas	30 minutos
Cordero et al 2010	12 horas	NI
Stramesi et al 2008	12 horas	20 minutos
Mercolini et al 2008	12 horas	8 minutos
Hoelzle et al 2008	4 horas	8,5 minutos
Tsanaclis e wicks 2007	24-48 horas	NI
Cognard et al 2005	12 horas	20 minutos
Método desenvolvido	1,5 horas	9 minutos

5.3 Validação

Todos os ensaios foram realizados de acordo com a RDC nº 27, de 17 de maio de 2012.

5.3.1. Linearidade

As curvas de calibrações foram analisadas através de injeções de amostras branco (contendo apenas a matriz), amostra zero (matriz adicionada de PI) e 6 pontos de calibrações.

As curvas foram construídas fortificando amostras de cabelo com a mistura dos padrões e seus respectivos PI's nas concentrações 0,5, 1,5, 3,0, 4,81, 7,04 e 9,38ng mL⁻¹ para os analitos e 4,81ng mL⁻¹ para os PI's. O método mostrou-se linear para a faixa de concentrações estudada. Na Tabela 12 estão representados os resultados obtidos para a calibração dos analitos (COC, BZE e COE) no equipamento de LC-MS e nas Figura 22, Figura 23 e Figura 24, encontram-se suas respectivas curvas de calibração.

Tabela 12. Resultados obtidos para calibração dos analitos de COC, BZE e COE no sistema de LC-MS/MS.

Analito	Curva analítica na matriz de cabelo	
BZE	Dia 01	y=02225x-0,1853 r ² =0,9906 / r=0,9994
	Dia 02	y=02329x-0,2103 r ² =0,99064 / r=0,9996
	Dia 03	y=02297x-0,2001 r ² =0,9926 / r=0,9988
	Dia 01	y=00446x-0,0082 r ² =0,9963 / r=0,9981
	Dia 02	y=00453x-0,0082 r ² =0,9964 / r=0,9982
	Dia 03	y=00446x-0,0099 r ² =0,9928 / r=0,9964
COE	Dia 01	y=0,1826x-0,0092 r ² =0,9996 / r=0,9997
	Dia 02	y=0,1832x-0,0094 r ² =0,9995 / r=0,9997
	Dia 03	y=0,1831x-0,0094 r ² =0,9979 / r=0,9989

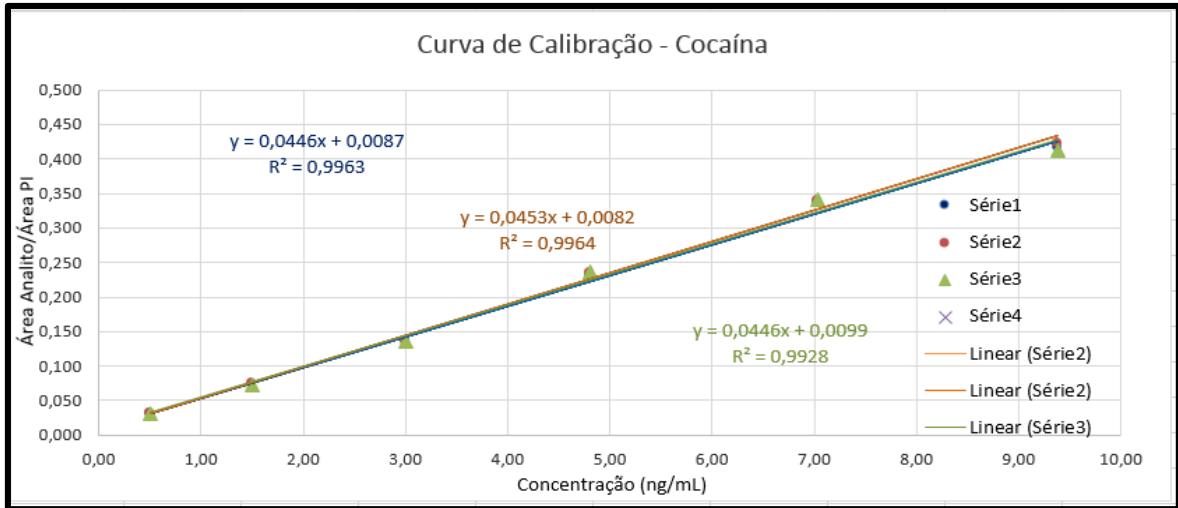


Figura 21. Curva de calibração da Cocaína

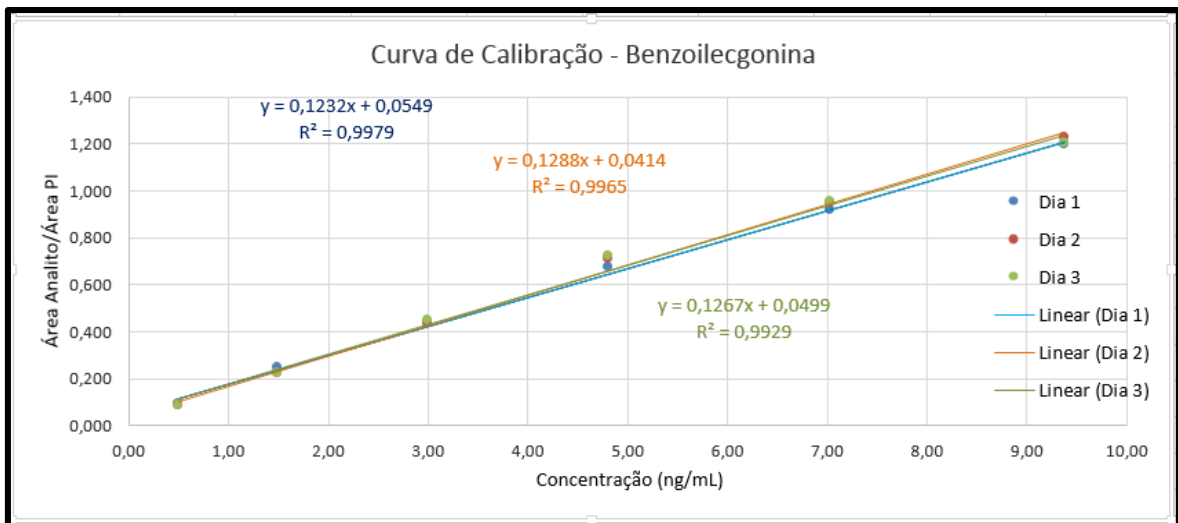


Figura 22. Curva de calibração da Benzoilecgonina

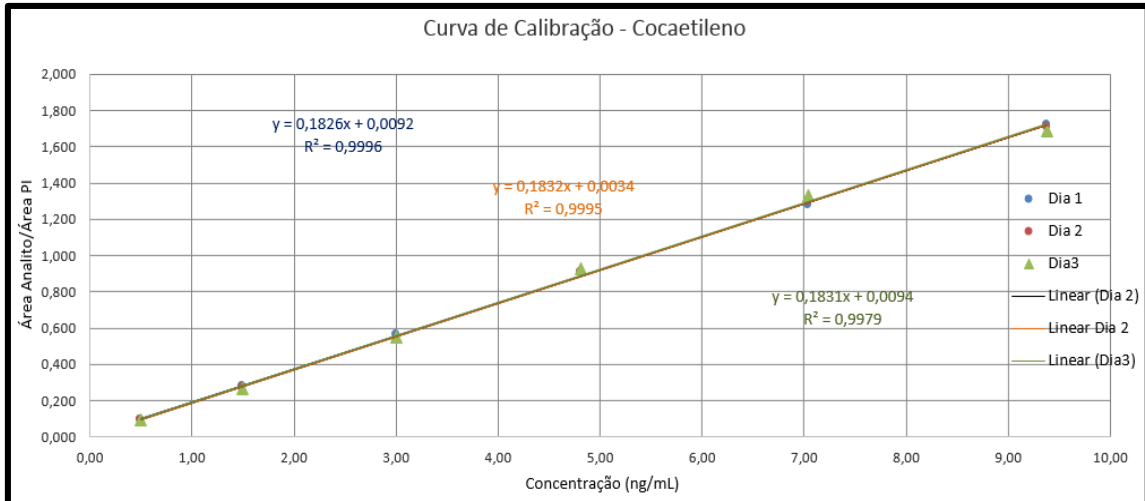


Figura 23. Curva de calibração do Cocaetileno

Através dos resultados obtidos para a construção das curvas analíticas representadas acima, pode-se observar valores de coeficiente de correlação (r) maiores de 0,99, estando de acordo com os valores preconizados pela ANVISA, a qual recomenda que o valor de r seja maior ou igual a 0,99. O gráfico da análise de resíduos a fim de avaliar a adequação do modelo está representado na Figura 25.

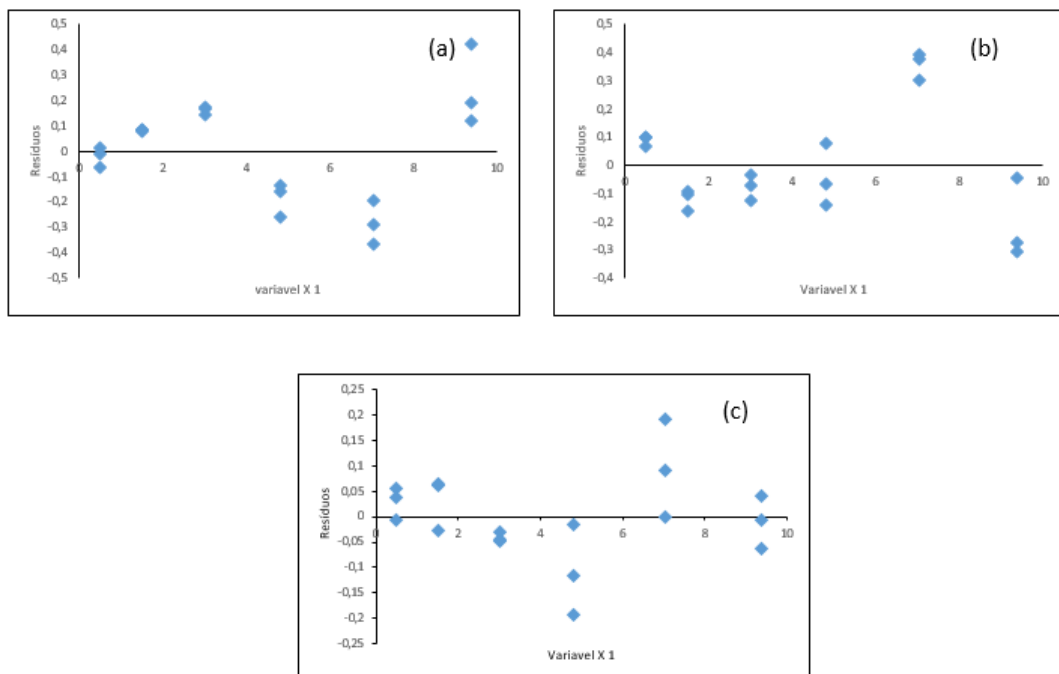


Figura 24. Gráfico de Resíduos para (a) COC, (b) BZE e (c) COE

A partir dos gráficos obtidos pode-se dizer que o método apresentou relativa aleatoriedade nos pontos ao longo da faixa de trabalho estudada.

Aplicando-se o teste de Cochran (C), determinou-se o C calculado e comparou-se com C tabelado. O valor obtido para o C calculado foi menor que o tabelado comprovando-se uma condição de homocedasticidade, indicando que a precisão das medidas é independente do valor da concentração e que a regressão linear é o modelo matemático adequado.

5.3.2 Limite de Quantificação e Limite de Detecção

A partir da otimização do método é possível obter limites de detecção e quantificação mais baixos. Para o método proposto os valores de LQ e LD obtidos estão mostrados na Tabela 13.

Tabela 13. Resultados de LOD e LOQ, obtidos para cocaína, benzoilecgonina e cocaetileno após o desenvolvimento e otimização do método analítico.

Analito	LQ (ng.mL⁻¹)	LD (ng.mL⁻¹)
COC	0,5	0,01
BZE	0,5	0,05
COE	0,5	0,001

5.3.3 Efeito Matriz

A avaliação do efeito matriz foi realizada através da fortificação da matriz com os analitos na concentração de 1,5 e 7,04 ng.mL⁻¹ em sextuplicata de preparo. O resultado obtido para a matriz foi comparado com o resultado obtido com os analitos em solução diluente. Ao final da análise pode-se observar valores de CV < 15%, ou seja, nenhuma substância presente na matriz está interferindo na análise pelo método validado.

A Tabela 14 mostra os valores encontrados para o teste.

Tabela 14. Resultados obtidos para o teste de efeito de matriz para cocaína, benzoilecgonina e cocaetileno em cabelo.

	Analito		
	COC	BZE	COE
Média FMN	1,01	0,99	0,98
Desvio Padrão	0,04	0,03	0,03
CV (%)	3,4	3,7	2,8

*FMN: Fator de matriz normalizado

$$FMN = \frac{\text{Resposta do analito em matriz/Resposta do PI em matriz}}{\text{Resposta do analito em solução/Resposta do PI em solução}}$$

5.3.4 Seletividade

O teste de seletividade foi analisado através de injeções de 6 amostras branco obtidas de fontes distintas. Não foram observados picos de interferentes próximo aos tempos de retenção dos analitos e nem dos seus padrões internos como mostrado na Figura 25.

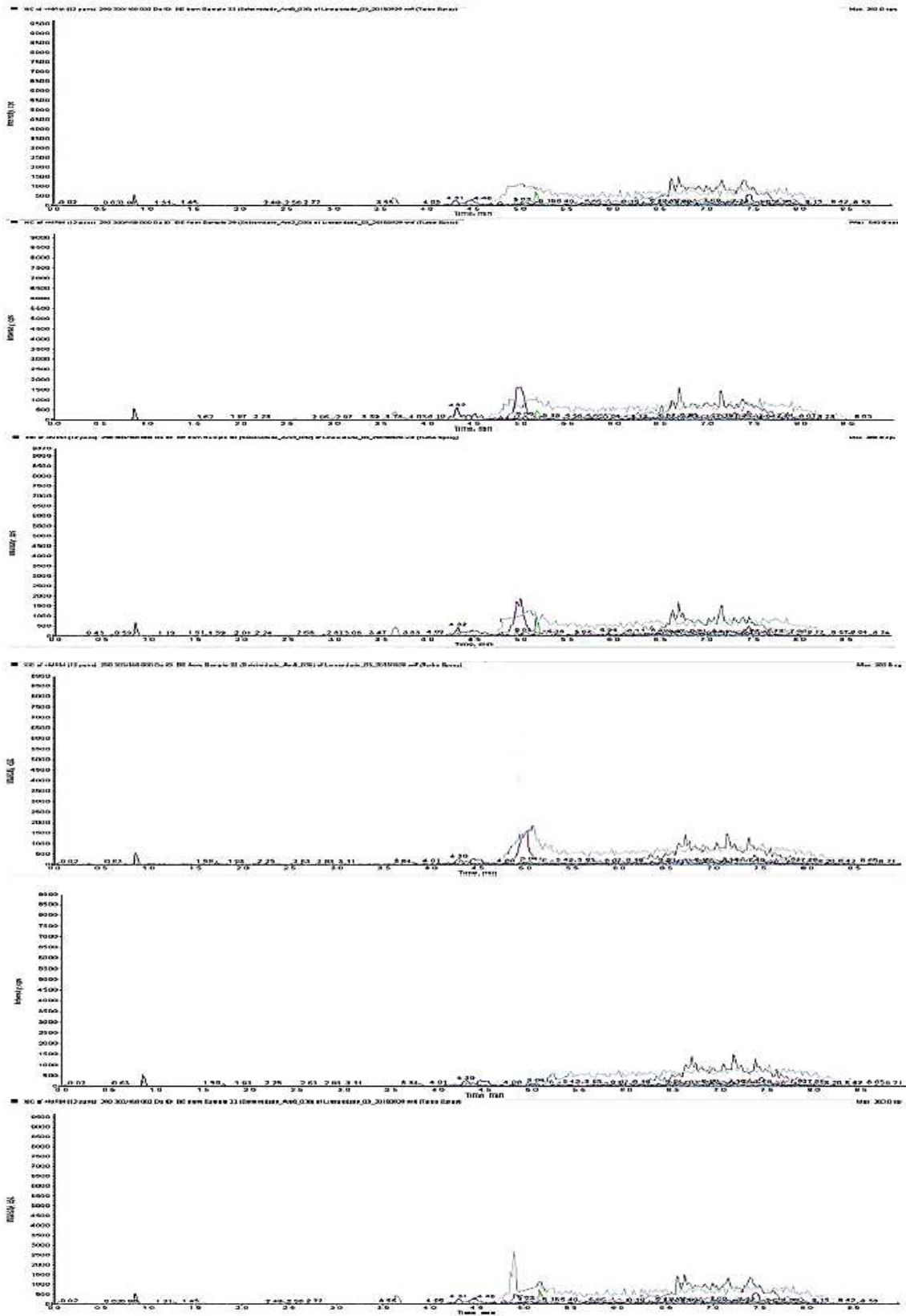


Figura 25. Cromatogramas de amostras brancas obtidos para o teste de seletividade.

5.3.5 Estabilidade de longa duração dos analitos em matriz

Para o estudo da estabilidade de longa duração dos analitos na matriz de cabelo adotou-se a análise no período de 120 horas em condições de armazenamento no amostrador do equipamento onde ficam as amostras a serem injetadas com temperatura controlada de 10°C, e a análise foi feita através da comparação da amostra recém fortificada com a concentração calculada após o tempo pré-definido da mesma amostra.

De acordo com a RDC 27, a estabilidade é demonstrada quando não se observa desvio superior a 15% da média das concentrações obtidas, portanto, de acordo com os resultados obtidos, os analitos em estudo, mostraram-se estáveis frente as condições analisadas como mostrado nas Tabelas 15, 16 e 17.

Tabela 15. Estabilidade da benzoilecgonina na matriz de cabelo por um período de 120 horas.

			Amostra Recém fortificada	Amostra após 120 horas
BZE	CQB	Média (ng/mL)	1,546	1,523
		DPR (%)	1,54	0,27
		CV (%)	1,05	
	CQB	Média	6,932	6,77
		DPR(%)	0,16	0,30
		CV (%)	1,67	

Tabela 16. Estabilidade da cocaína na matriz de cabelo por um período de 120 horas.

			Amostra Recém fortificada	Amostra após 120 horas
COC	CQB	Média (ng/mL)	1,550	1,545
		DPR (%)	1,54	0,27
		CV (%)	0,24	
	CQB	Média	6,948	6,892
		DPR(%)	0,22	1,45
		CV (%)	0,57	

Tabela 17. Estabilidade do cocaetileno na matriz de cabelo por um período de 120 horas.

			Amostra Recém fortificada	Amostra após 120 horas
COE	CQB	Média (ng/mL)	1,521	1,45
		DPR (%)	3,04	1,07
		CV (%)	3,17	
	CQB	Média	7,51	7,34
		DPR(%)	0,21	0,79
		CV (%)	1,64	

5.3.6 Precisão inter e intra-ensaio

Os resultados de precisão intra e inter-ensaio foram determinados pelo cálculo de imprecisão do desvio padrão relativo (RSD %), onde foram feitas análises de amostras de cabelo fortificadas com 4 (quatro) níveis de concentração diferentes dos analitos. Os resultados foram expressos em CV (%), não se admitindo valores

superiores a 15%, exceto para a menor concentração avaliada ($0,5 \text{ ng.mL}^{-1}$), para a qual se admite valores menores ou iguais a 20%.

Foram obtidos $CV < 15\%$ para todos os analitos, para todos os níveis de concentração estudados. Todos os valores obtidos apresentam-se dentro desse intervalo e, portanto, o método está de acordo com os parâmetros exigidos pela RDC 27.

Os resultados obtidos para o teste de precisão do método estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18. Resultados obtidos para os ensaios de precisão do método de detecção de cocaína e seus metabólitos em cabelo.

Parâmetro	Valores			
	C1	C2	C2	C4
COC				
Precisão intra-ensaio (CV%)	2,15	2,62	2,08	2,60
Precisão inter-ensaio (CV%)	3,69	1,94	3,92	2,04
BZE				
Precisão intra-ensaio (CV%)	3,21	2,62	3,25	1,20
Precisão inter-ensaio (CV%)	5,61	5,11	2,53	1,81
COE				
Precisão intra-ensaio (CV%)	0,50	1,47	2,13	1,77
Precisão inter-ensaio (CV%)	3,55	3,28	2,01	2,98

5.3.7 Aplicação do método validado em amostras reais

A fim de comprovar a eficiência do método desenvolvido e validado, o mesmo foi aplicado em amostras reais de cabelo provenientes do Instituto Médico Legal – IML de São Paulo. O método foi aplicado para um total de 5 amostras e todas as amostras de cabelo foram adicionadas do padrão interno deuterado.

Nas Figuras 26 e 27 estão representados exemplos dos cromatogramas obtidos referentes as amostras de cabelo analisadas. Dentre as amostras analisadas, a COC e BZE foram detectadas em 2 amostras analisadas (a-b). O COE foi detectado em apenas uma das amostras analisadas.

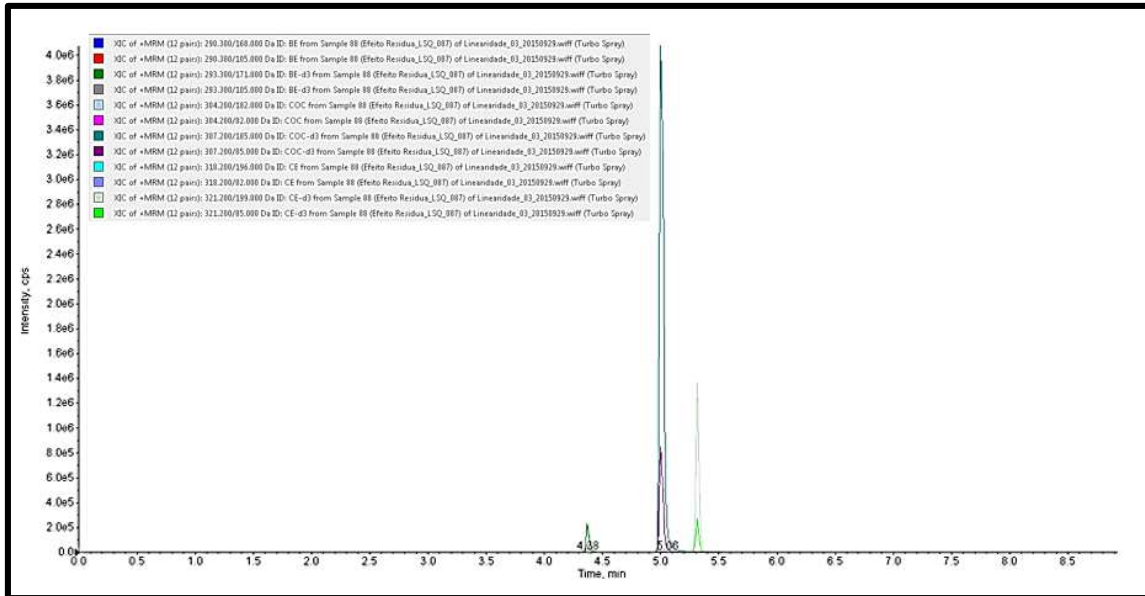


Figura 26. Amostra de cabelo onde não foi detectada a presença de COC e metabolitos.

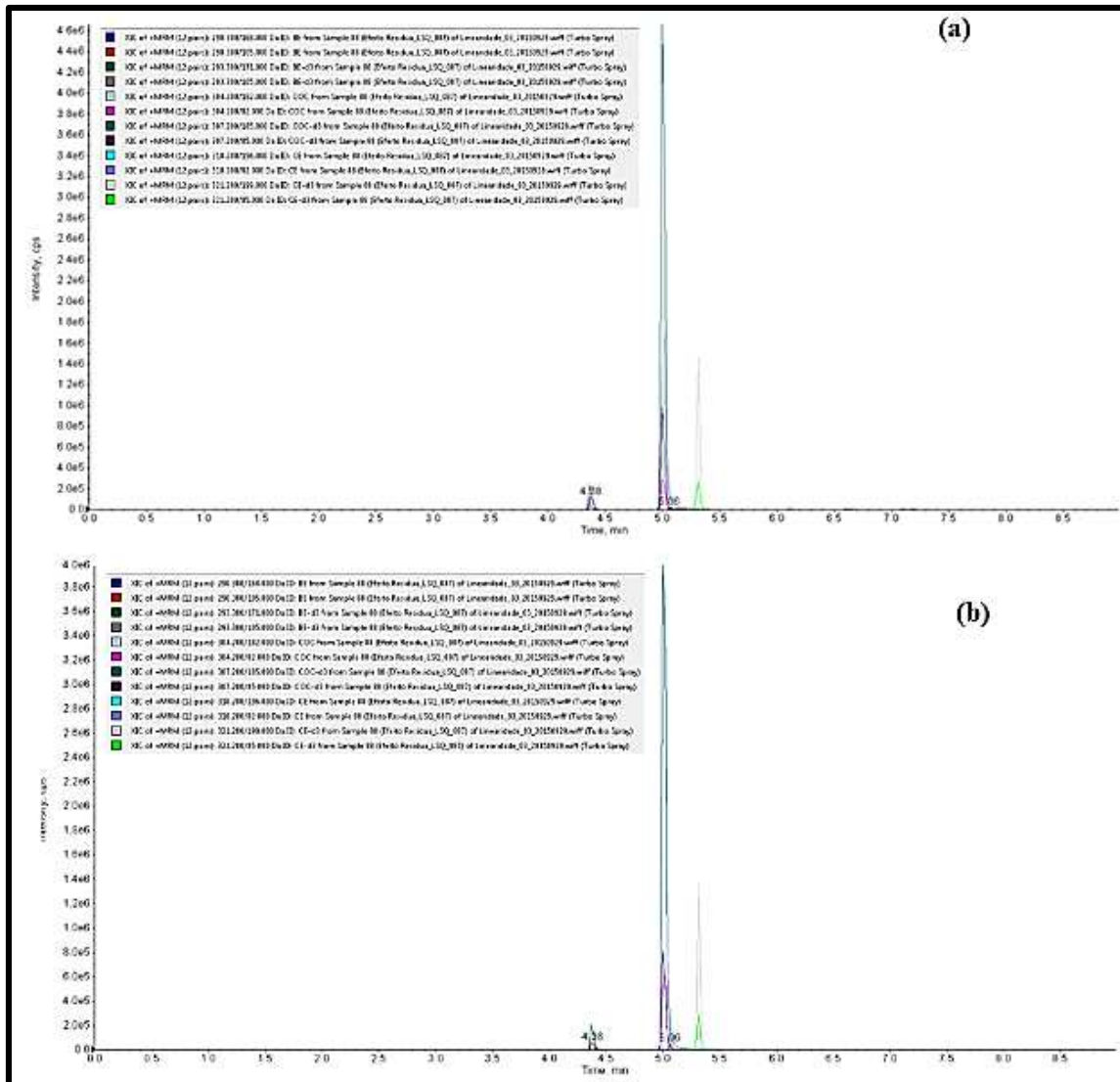


Figura 27. Cromatogramas das amostras reais positivas de cabelo provenientes do Instituto Médico-Legal.

Na Tabela 19 estão representadas as concentrações (ng.mg^{-1}) obtidas na análise das amostras de unhas provenientes do IML.

Tabela 19. Concentrações (ng.mg^{-1}) encontradas nas amostras de cabelo analisadas.

Amostra	COC (ng.mg^{-1})	BZE (ng.mg^{-1})	COE (ng.mg^{-1})
A	0,896	0,476	<LQ
B	1,996	0,2114	N.D.

< LOQ: valores encontrados abaixo do limite de quantificação do método ($0,50\text{ng/mg}$)

6. DISCUSSÃO

Embora o consumo de cocaína vem apresentando-se estável ainda há um número grande de pessoas que são vítimas da mesma, devido a isso, tem –se observado interesse no desenvolvimento de novas técnicas mais rápidas e sensíveis para detecção de drogas de abuso, além de novas matrizes alternativas para a detecção das mesmas.

Entre as principais vantagens do cabelo encontram-se a sua boa estabilidade, sendo facilmente armazenado, tempo longo de detecção apresentando também a possibilidade de estabelecer o uso de forma cronológica de acordo com a parte analisada além de que a coleta de amostra é obtida de forma não invasiva. Entretanto algumas desvantagens também devem ser consideradas como a facilidade de contaminação externa, por isso a importância de realizar uma descontaminação minuciosa se necessário com o uso de solventes orgânicos, como por exemplo metanol, tomando o devido cuidado para remover apenas os contaminantes da superfície.

É normal que a COC e seus metabólitos sejam incorporados na matriz queratinizada em quantidades relativamente pequenas, no entanto a técnica de LC-MS/MS mostra-se mais sensível quando comparada a outras técnicas mais comumente utilizadas atualmente, possibilitando detecções baixas da droga de abuso na matriz utilizada e com isso maior confiabilidade dos resultados das análises.

O método otimizado e validado proposto por este trabalho permite a separação e a identificação dos compostos em um tempo menor que 10 minutos ponto positivo quando comparado com os outros métodos já descritos na literatura e uma vantagem quando a análise for realizada em grande escala há além da redução do tempo de análise com resultados mais rápidos como também redução no consumo de solventes. Acetonitrila e água com adição de aditivos voláteis tais como ácido fórmico e formiato de amônio utilizando um sistema de separação em gradiente foram os solventes escolhidos como fases móveis, pois permitiram uma satisfatória separação dos analitos com resolução esperada entre os picos. A acidificação da fase móvel foi necessária porque proporcionou a melhora na protonação do grupo amina dos

analitos alvos, favorecendo a ionização no modo positivo e com isso uma intensidade de sinal maior. Após a otimização do método proposto, houve uma nítida melhora dos picos cromatográficos, bem como ganho da intensidade do sinal o que possibilita obter um método com maior sensibilidade, e conseqüentemente detectar compostos de baixas concentrações. O método de extração também foi muito mais rápido do que os publicados na literatura, gastando em média uma hora para a realização de toda a etapa de extração. A utilização de água como solvente principal de lavagem conseguiu retirar toda a droga incorporada na superfície do cabelo deixando posteriormente a amostra foi deixada em metanol por um curto intervalo de tempo e com isso diminuindo riscos de extração no momento da descontaminação da amostra.

Após ajuste todos os parâmetros, foi possível obter picos definidos e um ganho de intensidade do sinal significativamente maior, o que acarretou em um método mais sensível e, conseqüentemente, na obtenção de menores valores de LD e LQ.

A etapa de validação realizada mostrou que o método é rápido e eficaz na identificação e determinação de cocaína e metabólitos em amostras de cabelo. Todos os parâmetros validados para os analitos COC, BZE e COE mostraram-se dentro do proposto pela legislação, a linearidade com r^2 maior que 0,99 conclui que modelo de regressão linear apresenta-se adequado para as determinações analíticas em estudo. Além do mais, foram obtidos bons resultados de precisão intra- e inter-ensaio, o método mostrou-se específico para os analitos em estudo e não foi observado nenhum efeito de matriz.

7. CONCLUSÃO

O cabelo vem sendo utilizado atualmente como terceira matriz de escolha na detecção de cocaína devido a todos os benefícios apresentados com isso a importância de desenvolvimentos de novos métodos para análise que permite cada vez mais resultados rápidos e confiáveis.

A análise no método desenvolvido e validado permitiram obtenção na redução do tempo de análise instrumental e no tempo de preparo da amostra quando comparado com outros métodos descritos na literatura. A análise de cabelo através do método por LC-MS/MS utilizando acetato de etila como solvente extrator, mostrou ser rápido, eficiente e aumentou significativamente os valores de LOD da cocaína e metabólitos. As condições cromatográficas utilizadas permitiram a separação e identificação dos compostos em um tempo menor que 10 minutos o que acaba sendo vantajoso quando se trata em análises rápidas e consequentemente reduzido consumo de solventes.

O método mostrou-se rápido, eficiente e seletivo para quantificação de COC e seus metabólitos em cabelos sendo viável para fins de documentar o uso retrospectivo e/ou crônico a cocaína para os mais diversos fins de aplicação. Podendo ser aplicado em várias ocasiões como no ambiente de trabalho, clinico, forense, epidemiológico, esporte entre outros.

8. REFERÊNCIAS

- [1] E. Lima e C. Silva , “Cabelo como Matriz Analítica Alternativa para a determinação de drogas de abuso,” *NewsLab*, vol. 82, pp. 156-169, 2007.
- [2] M. Oliveira, J. Alves, J. Andrade , Saczk AA e Okumura LL, “Análise do teor de cocaína em amostras apreendidas pela polícia utilizando-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV-Vis,” *Eclética Química*, vol. 34, nº 3, pp. 77-83, 2009.
- [3] Stark J, Pacini D, Franquemonet C e Coca and Cocaine, “Effects on People and Policy in Latin America,” *Journal of Interamerican Studies and World Affairs*, vol. 30, p. 235, 1998.
- [4] UNITED NATIONS, “Office on Drug and Crime. World Drug Report,” em *United Nations Publications*, New York, 2012.
- [5] Fernandez P, Seone S, Vasquez C, A. Bermejo, Carro AM e Lorenzo RAA, “Rapid analytical method based on microwave-assisted extraction for the determination of drugs of abuse in vitreous humor,” *Anal Bioanal Chem*, pp. 2177-2186, 2011.
- [6] Minohata T, Hiranoi, J. Iada, Kudi K, Ikeda N, Zaitu K, Shima N, Katagi M, Tsuchihashi H e Suzuki K, “Screening analysis for drugs of abuse by LC-MS/MS enables fast polarity switching MRM triggered product ion scanning on the fly,” *Shimadzu Corporation*, 2012.
- [7] Carvalho VM, Fukushima AR, Fontes LR, Fuzinato DV, Florio JC e Chasin AM, “Cocaine postmortem distribution in three brain structures: A comparison with whole blood and vitreous humour,” *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 2013; 20: 143-145..
- [8] Drummer OH, “Postmortem toxicology of drugs of abuse,” *Forensic Science International*, 2004; 142 : 101–113.
- [9] Y. M. M. R. S. O. Campos SV, “Validation of a method to detect cocaine and its metabolites in nails by Gas chromatography–mass spectrometry,” *Forensic Science International*, 2006; 159: 218–222.
- [10] Pozebon D., Dressler VL e Curtius AJ, “Análise de cabelo: uma revisão dos procedimentos para a determinação de elementos traço e aplicações,” *Química Nova*, 1999; 22: 838-846.

- [11] Bulcão R, Garcia SC, Limberger RP, Baierle M, Arbo MD, Chasin AAM, Thiesen F V e Tavares R, "Designer drugs: aspectos analíticos e biológicos," *Química Nova*, 2012; 35 (1): 149-158.
- [12] Bahls FC e Bahls SC, "Cocaína: origem, passado e presente," *Interação em Psicologia*, 2002; 6(2): 177-181.
- [13] Dackis CA e O'Brien CP, "Cocaine dependence: a disease of brain's reward centers," *Journal of Substance Abuse Treatment*, 2001;21 :111-117.
- [14] Vargas RM e Talhavini M, "Cocaína. Relatório de atividades do projeto FAPDF," em *Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal*, Brasília, 2000.
- [15] UNITED NATIONS, "Office on Drug and Crime. World Drug Report," Washington, 2010.
- [16] Egred M, Davis G K., "Cocaine and the heart," *Postgrad Med J*, 2005; 81: 568–571.
- [17] Romão W, Schwab N, Bueno AIMS, Sparrapan R e Eberlin MN, "Química forense: perspectivas sobre novos métodos analíticos aplicados à documentoscopia, balística e drogas de abuso," *Química Nova*, 2011; 34 (10): 1717-1728.
- [18] . Carlini EA, Nappo AS, Galduróz JCF e Noto AR, "Drogas Psicotrópicas – O que são e como agem," *Revista IMESC*, 2001; (3): 9-35, 2001.
- [19] Carvalho VM, *Redistribuição da cocaína e sua influência na neuroquímica post mortem. [Tese - Doutorado]*, São Paulo (SP): Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2011.
- [20] Menezes ML, "Determinação por injeção direta no HPLC de cocaína em amostras de urina e em amostras de papelotes de cocaína e crack," *Salusvita*, 2000; 19(2): 73-80.
- [21] Cognard E, Rudaz R, Bouchonnet S, Staub C, "Analysis of cocaine and three of its metabolites in hair by gas chromatography-mass spectrometry using ion-trap detection for CI/MS/MS," *Journal of Chromatography B*, 2005; 826: 17–25.
- [22] Carter JC, Brewer WE, Angel SM, "Raman Spectroscopy for the in situ identification of cocaine and selected adulterants," *Applied Spectroscopy*, 2000; 54(12): 1876-1881.
- [23] M. Ribeiro e Laranjeira R, "Álcool e Drogas sem Distorção," 2004. [Online]. Available: http://apps.einstein.br/alcooledrogas/novosite/atualizacoes/ac_126.htm.

- [24] Billings KE, "Development of a Simple Method to Detect and Quantify Benzoylecgonine, a Cocaine Metabolite, in urine," Illinois Wesleyan University, 2003.
- [25] Cardona PS, Chaturvedi AK, Soper JW, Canfield DV, "Simultaneous analyses of cocaine, cocaethylene, and their possible metabolic and pyrolytic products," *Forensic Science International*, 2006; 157: 46–56.
- [26] Chasin AA, "Cocaína e cocaetileno influência do etanol nas concentrações de cocaína em sangue humano post mortem," *São Paulo, SP*, 1996. 144.
- [27] Janicka M, Kot-Wasik A, Namiesnik J, "Analytical procedures for determination of cocaine and its metabolites in biological samples," *Trends in Analytical Chemistry*, 2010; 29 (3): 209-224.
- [28] Valente MJ, Carvalho F, Bastos ML e Carvalho M, Pinho PG, "Chromatographic Methodologies for Analysis of Cocaine and Its Metabolites in Biological Matrices," *Gas Chromatography – Biochemicals, Narcotics and Essential Oils*, 2012, 164-194.
- [29] Yonamine, M., *Derivação de benzoilecgonina urinária com diazometano para verificação da exposição à cocaína por técnicas cromatográficas. (Mestrado)*, São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2000.
- [30] Yonamine, M., *A saliva como espécime biológico para monitorar o uso de álcool, anfetamina, metanfetamina, cocaína e maconha por motoristas profissionais. (Doutorado)*, São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2004.
- [31] Wenning, R, "Potential problems with the interpretation of hair analysis results," *Forensic Science International*, 2000; 107: 5 –12.
- [32] Kinz P, "Value of hair analysis in postmortem toxicology," *Forensic science international*, 2004;142(2-3):127-34.
- [33] Kintz P, Mangin P, "Simultaneous determination of opiates, cocaine and major metabolites of cocaine in human hair by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS)," *Forensic Science International*, 1995; 73: 93-100.
- [34] Toledo FCP, Yonamine M, Moreau RLM, Silva OA, "Determination of cocaine, benzoylecgonine and cocaethylene in human hair by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry," *Journal of Chromatography B*, 2003; 798: 361–365.

- [35] Toledo FCP, Yonamine M, Silva OA, "Utilização da imunofluorescência polarizada na determinação de benzoilecgonina em cabelo de usuários de cocaína," *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.*, 2001; 37 (1) 113-118.
- [36] Paterson S, Lee S, Cordero R, "Analysis of hair after contamination with blood containing cocaine and blood containing benzoylecgonine," *Forensic Science International*, 2010; 194: 94-96.
- [37] Scheidweiler KB, Huestis MA, "Simultaneous Quantification of Opiates, Cocaine, and Metabolites in Hair by LC-APCI-MS/MS," *Química Analítica*, 2004; 76: 4358-4363.
- [38] Skopp G; Potech L; Moeller MR; "On cosmetically treated hair-aspects and pitfalls of interpretation," *Forensic Science International*, 84: 43-52, 1997.
- [39] Neto FRA, Marques MAS e Pereira HMG, "ontrole de dopagem no esporte: aspectos químicos e farmacológicos que afetam a detecção de drogas no cabelo," *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 2002.
- [40] Cooper GAA, Kronstrand R, Kintz P, "Society of Hair Testing Guidelines for drug testing in hair," *Forensic Science International*, 2012; 218: 20-24.
- [41] Mercolini L, Mandrioli R, Saladini B, Conti M e Baccini C, Raggi MA, "Quantitative analysis of cocaine in human hair by HPLC with fluorescence detection," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2008; 48: 456–461.
- [42] Clauwaert KM, Bocxlaer JFV, Lambert WE e Leenheer AP, "Segmental analysis for cocaine and metabolites by HPLC in hair of suspected drug overdose cases," *Forensic Science International*, 2000;110: 157–166.
- [43] Irving RC, Dickson AJ, "The detection of sedatives in hair and nail samples using tandem LC–MS–MS," *Forensic Science International*, 2007; 166: 58–67.
- [44] Musshoff F, Madea B, "New trends in hair analysis and scientific demands on validation and technical notes," *Forensic Science International*, 2006; 165: 204–215.
- [45] Vignali C, Stramesi C, Vecchio M, Groppi A, "Hair testing and self-report of cocaine use," *Forensic Science International*, 2012; 215: 77-88.
- [46] Aleksa K, Walasek P, Fulga N, Kapur B, Gareri J e Koren G, "Simultaneous detection of seventeen drugs of abuse and metabolites in hair using solid phase micro extraction (SPME) with GC/MS," *Forensic Science International*, 2011; 218: 31–36.

- [47] Cordero R, Lee S, Paterson, S, "Distribution of Concentrations of Cocaine and its Metabolites in Hair Collected Postmortem from Cases with Diverse Causes/Circumstances of Death," *Journal of Analytical Toxicology*, 2010; 34: 543-548.
- [48] Stramesi C, Polla M, Vignali, C, Zucchella A e Groppi A, "Segmental hair analysis in order to evaluate driving performance," *Forensic Science International*, 2008; 176: 34-37.
- [49] Hoelzle C, Scheufler F, Uhl M, Sachs H e Thieme D, "Application of discriminant analysis to differentiate between incorporation of cocaine and its congeners into hair and contamination," *Forensic Science International*, 2008; 176: 13–18.
- [50] Tsanaclis L, Wicks JFC, "Differentiation between drug use and environmental contamination when testing for drugs in hair," *Forensic Science International*, 2007; 176: 19–22.
- [51] Madej KA, "Analysis of meconium, nails and tears for determination of medicines and drugs of abuse.," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2010; 29(3): 246-259.
- [52] Lanças FM, "Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente "compatíveis"?, " *Scientia Chromatographica*, 2009;1(2): 35-61.
- [53] Nogueira NM, Soares BTM, Andrade ABN e Singh AK, "Méritos comparativos da Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência em escala convencional e minituarizada," *Revista Brasileira de Farmácia*, 2011; 92(2) :44-55.
- [54] Peters FT, "Recent advances of liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry in clinical and forensic toxicology," *Clinical Biochemistry*, 2011; 44:4–65.
- [55] Freue GVC e Borchers CH, "Multiple Reaction Monitoring (MRM)- Principles and Application to Coronary Artery Disease," *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 2012. 5:378.
- [56] JEOL Mass Spectrometers;, *Tandem Mass Spectrometry (MS/MS)*, USA, 2006.
- [57] Passagli MF, "Toxicologia Forense: Teoria e Prática," Campinas, Millenium, p. 2013. 455.
- [58] Diniz MER, *Uso da técnica de espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) para o estudo do mecanismo de reações orgânicas e avaliação do perfil de fragmentação de bis-hidroxiiminas aromáticas [Tese - Mestrado]*, Belo Horizonte (MG): Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

- [59] Huges JM, "Determination of Cocaine and Metabolites in Urine Using Electrospray LC/MS," *Agilent technologies*, 2000.
- [60] Lanças FM, "Validação de métodos cromatográficos de análise," *São Carlos*, 2004: 62.
- [61] Ribeiro FALR, Ferreira MMC, Morano SC, Silva LR e Schneider R.P, "Planilha de Validação: Uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados".
- [62] Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSF e Melo LFC, "Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos," *Química Nova*, 2004; 27: 771-780.
- [63] "Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)," [Online]. Available: http://redsang.ial.sp.gov.br/site/docs_leis/vm/vm1.pdf. Acesso em 10/01/2016..
- [64] Paschoal JAR; Rath S e Airoidi FPS; Reyes FGR, "VALIDAÇÃO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM ALIMENTOS," *Química Nova*, 2008: 31(5); 1190-1198.
- [65] Barros C, "Validação de Métodos analíticos.Apostila REMESP," 2005.
- [66] ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas, "NBR ISO/IEC 17025:requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração," Rio de Janeiro, 2001: 20.
- [67] Sabin GP, "Desenvolvimento e validação de método utilizando SPE e GC-MS para a determinação multiresíduo de pesticidas em água potável," Santa Maria, RS, 2007.
- [68] Forti MC; Alcaide RLM, "Validação de Métodos analíticos do laboratório de aerossóis, soluções aquosas e tecnologias- LAQUATEC," São José dos Campos , 2011.
- [69] Cassiano NM; Barreiro JC; Rocha LR e Oliveira RV; Cass QB, "Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas," *Química Nova*, 2009: 32(4); 1021-1030.
- [70] Camargo SPS, "Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de canabidiol e tetraidrocanabidiol em amostras de plasma por cromatografia em fase gasosa/ espectrometria de massas," Ribeirão Preto, 2008.
- [71] Chasin AAM, Midio AF, "Revisão dos métodos analíticos para a identificação e quantificação de cocaína em material biológico," *Revista Brasileira de Toxicologia*, 1991, 4: 22-29.

- [72] Dadgar D, Burnett PE, Gerry Choc M, Gallicano, K e Hooper JW, "Application issues in bioanalytical method validation, sample analysis and data reporting," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1995; 13(2): 89-97, 1995.
- [73] Diniz MER, "Uso da técnica de espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) para o estudo do mecanismo de reações orgânicas e avaliação do perfil de fragmentação de bis-hidroxiiminas".

ANEXO A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO (TCLE)

Grupos de cadáveres

Título do projeto	Nº cadastro
PERFIL TOXICOLÓGICO POST-MORTEM DE UNHAS E CABELOS: UMA FERRAMENTA METABOLÔMICA NA INVESTIGAÇÃO CRIMINAL	

AUTORIZAÇÃO DE COLETA DE AMOSTRA POR MEMBRO FAMILIAR

O nosso **OBJETIVO** é avaliar a presença de substâncias como maconha, cocaína e anfetaminas nas matrizes de unhas e cabelo de cadáveres a fim de desenvolver novos métodos de detecção dessas substâncias.

Sendo assim, essa pesquisa constitui uma importante ferramenta científica na elucidação da *causa mortis* conjunta a área da patologia clínica, com ênfase na toxicologia forense, devido a sua alta estabilidade em relação ao período post-mortem.

COMO FAREMOS ISSO?

-Utilizaremos amostra de unha **ou** cabelo, por meio de autorização do responsável legal do falecido, para verificação da presença/ausência de drogas.

-Destaca-se que a **coleta não é invasiva** e é relativamente **fácil**, tornando-a um importante objeto de estudo, perante isso, venho através desse solicitar a utilização do termo de consentimento livre esclarecido, pois, mesmo que a amostra requerida para o projeto seja denotada como amostra de descarte, trata-se de vidas

que devem ser respeitadas, por isso, compulsória a petição de autorização dos familiares para o seu uso.

ATENÇÃO

-A autorização da coleta de amostra para participação neste estudo é **totalmente voluntária e a identidade do cadáver será mantida em sigilo.**

-Todas as informações de identificação pessoal coletadas serão mantidas de forma confidencial.

-O nome do participante não será vinculado aos resultados desse estudo quando os mesmos forem publicados, porque os dados serão avaliados e divulgados de forma coletiva.

-As informações sobre presença de substâncias na unha e cabelo serão acessadas por um código de identificação impessoal e utilizadas apenas pelo grupo de pesquisadores deste projeto.

RISCOS E BENEFÍCIOS: Não há riscos previstos, bem como não haverá benefícios diretos ao cadáver

RESSARCIMENTO: Não haverá ressarcimento.

PARA DEMAIS INFORMAÇÕES você poderá entrar em contato com a Dra. Nelci Fenalti Höehr pelo telefone [19- 3521-9455](tel:19-3521-9455) ou com seus alunos Júlio César Santos Júnior, Carla Giane Loss e Ana Paula Borgo pelos telefones 19-994238260, 19-982146928, 19-983034391, respectivamente (em horário comercial) ou através dos e-mails: juliocsj@fcm.unicamp.br, carlagiane@gmail.com, e apborgo@gmail.com.

Endereço Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, Bairro Barão Geraldo, Campinas-SP.
CEP 13083881. Faculdade de Ciências Médicas - Departamento de Patologia Clínica,
UNICAMP.

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) recebe reclamações e denúncias sobre os aspectos éticos deste estudo pelo telefone 19-35218936 ou pelo e-mail cep@fcm.unicamp.br

Endereço Rua Tessália Vieira de Camargo, 126. Bairro Barão Geraldo, Campinas-SP.
CEP 13.083-887

Declaro, ter lido e discutido o conteúdo do presente Termo de Consentimento e concordo em autorizar a coleta de amostra para esse estudo de forma livre e esclarecida. Também declaro ter recebido cópia deste termo.

Assinatura do responsável legal

___/___/___
Data

Assinatura do responsável pela coleta

___/___/___
Data

Campinas, ___ de _____ de_____.

ANEXO B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO (TCLE)

Grupo VIVO

Título do projeto	Nº cadastro
PERFIL TOXICOLÓGICO POST-MORTEM DE UNHAS E CABELOS: UMA FERRAMENTA METABOLÔMICA NA INVESTIGAÇÃO CRIMINAL	

VOCÊ está sendo CONVIDADO a participar de uma pesquisa desenvolvida pela Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. Os pesquisadores responsáveis são a Dra. Nelci Fenalti Höehr junto com seus alunos Júlio César Santos Júnior, Carla Giane Loss e Ana Paula Borgo.

O nosso OBJETIVO é avaliar a presença de substâncias como maconha, cocaína e anfetaminas nas unhas e cabelo de pessoas, a fim de desenvolver novas técnicas analíticas para detectar drogas nesses materiais.

COMO FAREMOS ISSO?

- Utilizaremos amostras de unhas ou cabelo fornecidas pelo voluntário, onde auxiliaremos na coleta do material, para verificar a presença de drogas.

A SUA PARTICIPAÇÃO CONSISTIRÁ EM:

- 1) Doar amostras de unhas **e/ou** cabelo;
- 2) Responder algumas perguntas, através de uma entrevista, sobre sua idade e histórico de uso de drogas nos últimos meses.

- O TEMPO necessário para realizar a coleta e responder as perguntas é de aproximadamente dez (10) minutos.

- ATENÇÃO:

A sua participação neste estudo é **totalmente voluntária e sua identidade será mantida em sigilo.**

Algumas perguntas poderão lhe gerar um certo desconforto, por isso mesmo que tenha concordado em participar desta pesquisa, você poderá desistir a qualquer momento, sem ter que dar qualquer justificativa ou explicação.

RISCOS E BENEFÍCIOS: Não há riscos previstos, bem como não haverá benefícios diretos ao participante.

RESSARCIMENTO: Não haverá ressarcimento ao participante.

Todas as informações de identificação pessoal coletadas serão mantidas de forma confidencial.

O seu nome não será vinculado aos resultados desse estudo quando os mesmos forem publicados, porque os dados serão avaliados e divulgados de forma coletiva.

As informações sobre presença de substâncias de unha e cabelo serão acessadas por um código de identificação impessoal e utilizadas apenas pelo grupo de pesquisadores deste projeto.

Sinta-se à vontade para esclarecer quaisquer dúvidas antes de decidir sobre a sua participação no estudo.

PARA DEMAIS INFORMAÇÕES você poderá entrar em contato com a Dra. Nelci Fenalti Höehr pelo telefone [19- 3521-9455](tel:19-3521-9455) ou com seus alunos Júlio César Santos Júnior, Carla Giane Loss e Ana Paula Borgo pelos telefones 19-99423826, 19-982146928 e 19-983034391 respectivamente (em horário comercial) ou através dos e-mails: juliocsj@fcm.unicamp.br e carlagiane@gmail.com, apborgo@gmail.com.

Endereço Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, Bairro Barão Geraldo, Campinas-SP. CEP 13083881. Faculdade de Ciências Médicas - Departamento de Patologia Clínica, UNICAMP.

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) recebe reclamações e denúncias sobre os aspectos éticos deste estudo pelo telefone 19-35218936 ou pelo e-mail cep@fcm.unicamp.br

Endereço Rua Tessália Vieira de Camargo, 126. Bairro Barão Geraldo, Campinas-SP. CEP 13.083-887

Declaro, ter lido e discutido o conteúdo do presente Termo de Consentimento e concordo em participar desse estudo de forma livre e esclarecida. Também declaro ter recebido cópia deste termo.

_____ / /
Assinatura do participante Data

_____ / /
Assinatura do familiar responsável legal Data

_____ / /
Nome do responsável pela coleta Data

Campinas, ____ de _____ de ____.

ANEXO C

FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PERFIL TOXICOLÓGICO POST-MORTEM DE UNHAS E CABELOS: UMA FERRAMENTA METABOLÔMICA NA INVESTIGAÇÃO CRIMINAL

Pesquisador: JÚLIO CÉSAR SANTOS JÚNIOR

Área Temática:

Versão: 6

CAAE: 17753813.3.0000.5404

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 681.045

Data da Relatoria: 19/05/2014

Apresentação do Projeto:

O estudo prevê a utilização da unha e o cabelo, materiais biológicos de fácil obtenção, na avaliação do perfil toxicológico envolvido em investigações criminais. Pretende-se realizar a caracterização de compostos em misturas complexas, através da V-ESI-MS e MS Fingerprinting (injeção direta). Outra estratégia a ser empregada será o uso de polímeros molecularmente

impressos (MIPs), que possuem materiais poliméricos sintéticos com sítios específicos, que facilitam o reconhecimento e a captação do analito em amostras complexas com economia de tempo e de custo. Assim, o presente trabalho visa o desenvolvimento de metodologias analíticas para análise de compostos anfetamínicos, canabinóides e opiáceos, empregando o uso dos MIPs como método de preparo refinado de amostra que serão auxiliares para a utilização da técnica de (V-EASI-MS) para a identificação dos compostos presentes tanto na unha quanto no cabelo. O estabelecimento de novas metodologias na área de toxicologia forense permitirá o aprimoramento no desenvolvimento científico na formação de pesquisadores e também de profissionais em área de grande relevância e forte demanda em Ciência e Tecnologia no Brasil.

Objetivo da Pesquisa:

Definir os teores de drogas de abuso (compostos anfetamínicos, canabinóides e opiáceos)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)



Continuação do Parecer: 681.045

presentes na unha e cabelo de cadáveres putrefeitos e não putrefeitos utilizando V-EASI-MS.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Como se trata apenas de amostra de unha e cabelo de descarte, ou seja, não envolve o paciente diretamente, não apresenta riscos tampouco benefícios aos participantes da pesquisa ou seus representantes legais.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto original e relevante, com proposta de aplicação da técnica de espectrometria de massa V-EASI-MS à detecção de droga adição em cadáveres, cujos resultados serão comparados a um grupo de internados em enfermaria com histórico comprovado de drogas de abuso.

Critério de Inclusão:

Para o grupo Cadáveres: cadáveres putrefeitos ou não putrefeitos, de causa mortis desconhecida, ou seja, cadáveres encontrados em locais suspeitos (rios, terrenos, etc.); cadáveres cuja morte se deu por envolvimento em situações delituosas suspeitas (assassinato, homicídio, etc.), onde é importante a realização de exames toxicológicos.

Para o grupo vivo: Pacientes internados na enfermaria psiquiátrica com histórico de uso de drogas de abuso, onde é importante fazer o exame toxicológico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados o projeto original, o formulário gerado pela Plataforma Brasil, Folha de Rosto devidamente assinada e o TCLE que estão condizentes com as premissas da Resolução 466-2012, CNS,MS. O TCLE apresenta todos os elementos necessários, tendo sido adequadamente ajustado às recomendações realizadas. Riscos e benefícios, assim com a metodologia como um todo estão satisfatórios às exigências éticas do sistema CEP-CONEP.

Há carta de anuência do estudo, emitida pela comissão científica do Instituto Médico legal- IML.

Recomendações:

—

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado em reunião do colegiado, em 27-05-2014.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

FACULDADE DE CIENCIAS
MEDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)



Continuação do Parecer: 681.045

Considerações Finais a critério do CEP:

- Se o TCLE tiver mais de uma página, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, e o pesquisador responsável deverão rubricar todas as folhas desse documento, apondo suas assinaturas na última página do referido termo (Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS).
- Cabe ao pesquisador desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado, elaborar e apresentar os relatórios parciais e final, bem como encaminhar os resultados para publicação com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto (Resolução 466/2012 CNS/MS). Os relatórios deverão ser enviados através da Plataforma Brasil- ícone Notificação.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo deverão ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada (com destaque) e suas justificativas. As modificações deverão ter parecer de aprovação deste CEP antes de serem implementadas.

CAMPINAS, 10 de Junho de 2014

Assinado por:
Fátima Aparecida Bottcher Luiz
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br