UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Comissão de Pós-Graduação

CÍNTIA ROSA

**ESTUDO DE ESTABILIDADE DE DROGAS
DE ABUSO E MEDICAMENTOS DE
INTERESSE FORENSE EM
*DRIED BLOOD SPOT***

Versão corrigida da Dissertação

São Paulo

Data de Depósito na SPG:
23/07/2018

CÍNTIA ROSA

**ESTUDO DE ESTABILIDADE DE DROGAS
DE ABUSO E MEDICAMENTOS DE
INTERESSE FORENSE EM
*DRIED BLOOD SPOT***

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do Título
de Mestre em Ciência (Programa – Química)

Orientador: Prof. Dra. Marina Franco Maggi Tavares

São Paulo
2018

Cíntia Rosa

Estudo de estabilidade de drogas de abuso e medicamentos de interesse forense em *Dried Blood Spot*.

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Química

.....

Aprovado em: 21 de novembro de 2018.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

**À Deus que, por intercessão de Nossa Senhora
das Graças, me abriu portas e colocou anjos no
meu caminho, tornando tudo possível.**

**Dedico este trabalho aos meus pais.
Pelo amor incondicional e por estarem sempre ao
meu lado.**

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Marina F. M. Tavares, por ter acreditado na proposta de trabalho e pela confiança no meu potencial.

À toda equipe do laboratório do Núcleo de Toxicologia Forense, em especial ao Dr. Victor A. P. Gianvecchio e aos peritos criminais por terem viabilizado o presente trabalho, ao disponibilizarem o espaço e as amostras necessários para o estudo.

Aos amigos Karen, Bia e Márcio pela inestimável ajuda técnica, não esquecerei!

Agradeço novamente aos meus pais, pelo amor, pelo apoio, pela fé e pela força e, em especial à minha mãe, pela companhia nas longas horas de preparo de amostras.

À FAPESP pelo fornecimento da verba necessária para aquisição dos insumos para realização do presente trabalho.

RESUMO

Rosa, C. **Estudo de Estabilidade de drogas de abuso e medicamentos de interesse forense em *Dried Blood Spot***. 2018. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

No contexto analítico forense, questões relacionadas à estabilidade química dos compostos a serem avaliados podem acarretar desvios analíticos consideráveis, o que pode gerar conclusões equivocadas a respeito da composição da amostra. Dessa forma, diante das estratégias para conservação da composição química em amostras biológicas atualmente disponíveis, buscou-se, com o presente trabalho, avaliar a aplicabilidade da técnica de DBS (*Dried Blood Spot*) para o contexto forense, uma vez que vem sendo sugerido que esta técnica promove maior estabilidade química e, ainda, não interfere na composição da amostra, dentre outras vantagens. Assim, no presente estudo foi avaliada a estabilidade da cocaína, éster metilecgonina, benzoilecgonina, clonazepam, diazepam e alprazolam em amostras de sangue total *post mortem* aplicadas ou não em DBS, para que se pudesse comparar os resultados obtidos, e, então, verificar a viabilidade do acondicionamento das amostras em cada uma dessas matrizes. Concomitantemente, foi avaliado o impacto da temperatura sobre a estabilidade química dessas substâncias nas diferentes matrizes. Para alcançar o objetivo final, foram desenvolvidas e validadas metodologias analíticas por LC/MS-MS, segundo parâmetros sugeridos em guias de validação internacionais. Posteriormente, foram incubadas amostras contendo concentrações conhecidas das substâncias de interesse em DBS e em sangue total, as quais foram acondicionadas em diversas temperaturas e analisadas em diferentes intervalos de tempo. Os dados obtidos para estudo de estabilidade da cocaína e metabólitos sugerem que, apesar das amostras de sangue total acondicionadas em *freezer* não apresentarem redução na concentração acima de 20%, de maneira geral, amostras de DBS promoveram maior estabilidade química aos compostos monitorados. O estudo sugere, ainda, que a temperatura apresenta grande impacto sobre a estabilidade desses compostos, em consonância com outros estudos publicados na literatura. Já os dados de estudo de estabilidade obtidos para os benzodiazepínicos selecionados apresentaram maior uniformidade que os dados obtidos para cocaína e metabólitos. Assim, para todas as condições avaliadas, ou seja, para as duas diferentes matrizes e para as diferentes temperaturas, foi observado que os compostos, de maneira geral, não apresentaram queda na concentração acima de 20% durante o período de estudo. A análise estatística indica não haver, em termos gerais, diferença significativa entre as diferentes formas de acondicionamento. Por fim, o estudo realizado mostra a compatibilidade da técnica de DBS com aplicações forenses, e, em alguns casos, sugere qualidade técnica superior em relação à

análise em sangue total, já que é capaz de manter a estabilidade de compostos considerados instáveis em meio aquoso.

Palavras-chave: toxicologia forense, espectrometria de massas, cocaína, benzodiazepínicos, DBS, estabilidade.

ABSTRACT

Rosa, C. **Stability study of drugs of abuse and drugs of forensic interest in Dried Blood Spot**. 2018. Master's Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

In the forensic context, instability of chemical compounds may result in considerable analytical errors that could lead to inaccurate conclusions regarding the composition of the sample. Thus, given the available chemical composition conservation strategies for biological samples, this work aims to assess the applicability of the DBS (Dried Blood Spot) technique to the forensic context, considering that this approach improves the chemical stability, and does not interfere with the composition of the sample. Therefore, this study investigated the chemical stability of cocaine, methylecgonine ester, benzoylecgonine, diazepam and alprazolam in *post mortem* whole blood samples. The DBS method was used for the processing of part of the samples, in order to compare results, and then evaluate the storage conditions on the viability of each blood matrix (whole blood in relation to DBS). Concurrently, the effects of temperature on the stability of those chemical substances were also evaluated. Analytical methodologies based on LC/MS-MS were developed and validated, according to parameters suggested by international guidelines. Afterward, samples containing known concentrations of the analytes were incubated in two distinct matrices (DBS and whole blood) at several temperatures, and were analyzed at different time intervals. Although whole blood samples stored in freezer do not present concentration decay above 20 per cent, results suggest that DBS samples promoted greater chemical stability of the compounds of interest. Furthermore, temperature appears to affect greatly the stability of those analytes, consonant with previous studies. Regarding the stability study data obtained for the selected benzodiazepines, they presented greater uniformity than the data obtained for cocaine and metabolites. Therefore, considering all the described conditions, i.e., the two distinct matrices and the different temperatures, the compounds of interest did not present a decrease in concentration above 20 per cent during the study period. The statistical analysis indicate that there is no significant differences between the deployed storage methods. Thus, further studies, with a greater number of samples, are recommended in order to corroborate the statistical findings for the benzodiazepine compounds presented in this study. This study shows the compatibility of the DBS technique with forensic applications, and, in some cases, suggests its superior technical quality in relation to the whole blood analysis, since it preserves the chemical stability of compounds.

Keywords: forensic toxicology, mass spectrometry, cocaine, benzodiazepines, DBS, stability.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALP - Alprazolam
APHL – *Association of Public Health Laboratories*
BZE - Benzoilecgonina
CEBRID - Centro Brasileiro de Informações Sobre Drogas Psicotrópicas
CF - Constituição Federal
COC - Cocaína
CPP - Código de Processo Penal
CQA - Controle de qualidade alto
CQB – Controle de qualidade baixo
CQM - Controle de qualidade médio
CV - Coeficiente de variação
DBS - *Dried Blood Spot*
DZP - Diazepam
EBF - *European Bioanalysis Forum*
EMCDDA - *European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction*
EME - Éster metilecgonina
ESI - *Electrospray*
F_{crit} – F crítico
FDA - *Food and Drug Administration*
F_{exp} - F experimentalmente
GABA - Ácido gama aminobutírico
hCE1 - carboxilesterase hepática humana tipo 1
IML - Instituto Médico Legal
LC-MS/MS - *Liquid chromatography–mass spectrometry in tandem*
MRM - *Multiple Reaction Monitoring*
MS - *Mass Spectrometry*
NaF - Fluoreto de sódio
NIDA - National Institute on Drug Abuse
NTF - Núcleo de Toxicologia Forense
SENAD - Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas
SENASP - Secretaria Nacional de Segurança Pública
SgT - Sangue total
SINITOX - Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas
SPTC - Superintendência da Polícia Técnico-Científica
SWGTOX - *Scientific Working Group for Forensic Toxicology*
UNODC - *United Nations Office on Drugs and Crime*
WHO - *World Health Organization*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Quantidades de cocaína apreendida, por região, no período de 1998-2014.	23
Figura 2: Mortes por overdose envolvendo cocaína no Estados Unidos.	24
Figura 3: Número de mortes por overdose envolvendo benzodiazepínicos.....	25
Figura 4: Prevalência do uso de substâncias psicoativas por condutores de veículos automotivos	27
Figura 5: Resultados de análises toxicológicas de vítimas fatais de acidentes de trânsito	28
Figura 6: Metabolismo da cocaína via hidrólise <i>in vivo</i>	31
Figura 7: Estrutura das 1,4-benzodiazepinas.....	33
Figura 8: Estrutura química do alprazolam.	34
Figura 9: Metabolização do alprazolam.	35
Figura 10: Estrutura do clordiazepóxido e diazepam.	36
Figura 11: Perfil metabólico do diazepam.	37
Figura 12: Equação que apresenta o mecanismo geral de hidrólise de ésteres.	38
Figura 13: Metabolismo da cocaína via hidrólise <i>in vitro</i>	40
Figura 14: Rotas de hidrólise para benzodiazepínicos.	41
Figura 15: Inibição enzimática promovida pelo NaF.	45
Figura 16: Perfil de fotodegradação do diazepam.....	48
Figura 17: Coleta de DBS, estoque e manipulação.	51
Figura 18: Natureza química dos polímeros de celulose e sua interação com a água e pequenas moléculas	54
Figura 19: Natureza da porosidade das fibras do papel de filtro e macromoléculas e/ou componentes celulares.....	55
Figura 20: Relação entre a microamostragem de sangue líquido e DBS.	57
Figura 21: Efeito cromatográfico: distribuição de radioatividade em DBS obtida por aplicação de sangue adicionado de compostos marcados com isótopos de ¹⁴ C em cinco diferentes papéis de DBS.....	58
Figura 22: Fotografias tiradas em diferentes tempos de secagem de 10 µl de sangue humano aplicado em papel sintético.....	60
Figura 23: O efeito da secagem do DBS em diferentes períodos de tempo e o perfil de intensidade correspondente extraído da fotografia.	60
Figura 24: Perfil do DBS em diferentes níveis de hematócrito (Hct).	62
Figura 25: Gradiente de solventes utilizado na separação cromatográfica.	82
Figura 26: Cromatograma obtido através da separação cromatográfica descrita.....	82
Figura 27: Gradiente de solventes utilizado na separação cromatográfica.	83
Figura 28: Cromatograma obtido através da separação cromatográfica descrita.....	83
Figura 29: Gradiente de solventes utilizado na separação cromatográfica.	84
Figura 30: Cromatograma obtido através da separação cromatográfica descrita.....	85
Figura 31: Gradiente de solventes utilizado na separação cromatográfica.	86
Figura 32: Cromatograma obtido através da separação cromatográfica descrita.....	86
Figura 33: Perfil de estabilidade obtido na análise das amostras incubadas em <i>freezer</i> para cocaína (COC), éstermetilecgonina (EME) e benzoilecgonina (BZE), nas concentrações dos controles de qualidade.	98
Figura 34: Balanço entre a formação e degradação da EME, fornecendo possível explicação para o acúmulo da EME, em que as setas indicam extensão da metabolização.	99
Figura 35: Perfil de estabilidade obtido na análise das amostras-controle incubadas em geladeira para cocaína (COC), éstermetilecgonina (EME) e benzoilecgonina (BZE).	100
Figura 36: Perfil de estabilidade obtido na análise das amostras reais incubadas em <i>freezer</i> para cocaína (COC), éstermetilecgonina (EME) e benzoilecgonina (BZE).....	104

Figura 37: Perfil de estabilidade obtido na análise das amostras reais em geladeira para cocaína (COC), éstermetilecgonina (EME) e benzoilecgonina (BZE).	107
Figura 38: Perfil de estabilidade obtido na análise das amostras-controle em DBS incubadas em <i>freezer</i> para cocaína (COC), éster metilecgonina (EME) e benzoilecgonina (BZE).	110
Figura 39: Perfil de estabilidade obtido na análise das amostras-controle em DBS incubadas em geladeira para cocaína (COC), éstermetilecgonina (EME) e benzoilecgonina (BZE).	112
Figura 40: Perfil de estabilidade obtido na análise das amostras-controle incubadas em temperatura ambiente para cocaína (COC), éstermetilecgonina (EME) e benzoilecgonina (BZE).	113
Figura 41: Perfil de estabilidade obtido na análise das amostras reais em <i>freezer</i> para cocaína (COC), éstermetilecgonina (EME) e benzoilecgonina (BZE).	117
Figura 42: Perfil de estabilidade obtido na análise das amostras reais em geladeira para cocaína (COC), éstermetilecgonina (EME) e benzoilecgonina (BZE).	119
Figura 43: Perfil de estabilidade obtido na análise das amostras reais em temperatura ambiente para cocaína (COC), éstermetilecgonina (EME) e benzoilecgonina (BZE).	121
Figura 44: Diferença de concentração de benzoilecgonina (BZE) obtida da análise das amostras, após seis meses de incubação, nas diferentes concentrações de controle, e nas diferentes condições de acondicionamento.	122
Figura 45: Diferença de concentração de cocaína (COC) obtida da análise das amostras, após seis meses de incubação, nas diferentes concentrações de controle, e nas diferentes condições de acondicionamento.	123
Figura 46: Diferença de concentração de éster metilecgonina (EME) obtida da análise das amostras, após seis meses de incubação, nas diferentes concentrações de controle, e nas diferentes condições de acondicionamento.	123
Figura 47: Diferença de concentração de cocaína (COC), éstermetilecgonina (EME) e benzoilecgonina (BZE) obtida da análise das amostras, após seis meses de incubação, acondicionadas em freezer, nas diferentes concentrações de controle.	125
Figura 48: Diferença de concentração de cocaína (COC), éstermetilecgonina (EME) e benzoilecgonina (BZE) obtida da análise das amostras, após seis meses de incubação, acondicionadas em geladeira, nas diferentes concentrações de controle.	126
Figura 49: Perfil de estabilidade obtido na análise das amostras-controle de sangue total incubadas em <i>freezer</i> para alprazolam (ALP) e diazepam (DZP).	128
Figura 50: Perfil de estabilidade obtido na análise das amostras-controle incubadas em <i>freezer</i> para diazepam (DZP) e alprazolam (ALP).	129
Figura 51: Perfil de estabilidade obtido na análise das amostras reais incubadas em <i>freezer</i> para diazepam (DZP) e alprazolam (ALP).	130
Figura 52: Perfil de estabilidade obtido na análise das amostras incubadas em geladeira para diazepam (DZP) e alprazolam (ALP).	130
Figura 53: Perfil de estabilidade obtido na análise das amostras-controle em DBS incubadas em <i>freezer</i> para diazepam (DZP) e alprazolam (ALP).	133
Figura 54: Perfil de estabilidade obtido na análise das amostras-controle em DBS acondicionadas em geladeira para diazepam (DZP) e alprazolam (ALP).	133
Figura 55 - Perfil de estabilidade obtido na análise das amostras-controle em DBS acondicionadas em temperatura ambiente para diazepam (DZP) e alprazolam (ALP).	134
Figura 56 - Perfil de estabilidade obtido na análise das amostras reais em DBS acondicionadas em <i>freezer</i> para diazepam (DZP) e alprazolam (ALP).	135
Figura 57 - Perfil de estabilidade obtido na análise das amostras reais acondicionadas em geladeira para diazepam (DZP) e alprazolam (ALP).	136
Figura 58 - Perfil de estabilidade obtido na análise das amostras reais em DBS acondicionadas em temperatura ambiente para diazepam (DZP) e alprazolam (ALP).	136

Figura 59 - Diferença de concentração de diazepam (DZP) e alprazolam (ALP), obtidas da análise das amostras-controle, após três meses de incubação.	138
Figura 60 - Diferença de concentração de diazepam (DZP) e alprazolam (ALP), obtidas da análise das amostras-controle acondicionadas em geladeira, após três meses de incubação.	138
Figura 61 - Diferença de concentração de alprazolam (ALP) e diazepam (DZP), obtidas da análise das amostras-controle acondicionadas em freezer, após três meses de incubação.	139

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Substituintes das posições R1, R2, R3 e R7 das 1,4-benzodiazepínicos.....	34
Tabela 2 - Íons monitorados para cada substância analisada e seus respectivos tempos de retenção.....	82
Tabela 3 - Íons monitorados para cada substância analisada e seus respectivos tempos de retenção.....	84
Tabela 4 - Íons monitorados para cada substância analisada e seus respectivos tempos de retenção.....	85
Tabela 5 - Íons monitorados para cada substância analisada e seus respectivos tempos de retenção.....	86
Tabela 6 - Avaliação da linearidade do método para análise de benzodiazepínicos em DBS	89
Tabela 7 - Avaliação da linearidade do método para análise de cocaína e seus produtos de biotransformação em DBS	89
Tabela 8 - Avaliação da linearidade do método para análise de benzodiazepínicos em sangue total	89
Tabela 9 - Avaliação da linearidade do método para análise de cocaína e seus produtos de biotransformação em sangue total	90
Tabela 10 - Resultados de precisão, exatidão, recuperação e efeito matriz do método para análise de benzodiazepínicos em DBS	93
Tabela 11 - Resultados de precisão, exatidão, recuperação e efeito matriz do método para análise de cocaína e seus produtos de biotransformação em DBS	93
Tabela 12 - Resultados de precisão, exatidão e recuperação do método para análise de benzodiazepínicos em sangue total.....	94
Tabela 13 - Resultados de precisão, exatidão e recuperação do método para análise de cocaína e seus produtos de biotransformação em sangue total	94
Tabela 14 – Valores de porcentagem de variação obtidos para as análises de estudo de estabilidade em amostras-controles de sangue total acondicionadas em <i>freezer</i>	98
Tabela 15 - Valores de porcentagem de variação obtidos para as análises de estudo de estabilidade em amostras-controles de sangue total acondicionadas em geladeira.....	100
Tabela 16 - Valores de porcentagem de variação obtidos para as análises de estudo de estabilidade em amostras reais de sangue total acondicionadas em <i>freezer</i>	103
Tabela 17 - Valores de porcentagem de variação obtidos para as análises de estudo de estabilidade em amostras reais de sangue total acondicionadas em geladeira	106
Tabela 18 – Valores de porcentagem de variação obtidos para as análises de estudo de estabilidade para amostras-controle em DBS acondicionadas em <i>freezer</i>	110
Tabela 19 – Valores de porcentagem de variação obtidos para as análises de estudo de estabilidade para amostras-controle em DBS acondicionadas em <i>freezer</i>	112
Tabela 20 – Valores de porcentagem de variação obtidos para as análises de estudo de estabilidade para amostras-controle em DBS acondicionadas em temperatura ambiente.....	113
Tabela 21 – Valores de porcentagem de variação obtidos para as análises de estudo de estabilidade para amostras reais em DBS acondicionadas em <i>freezer</i>	116
-Tabela 22 – Valores de porcentagem de variação obtidos para as análises de estudo de estabilidade para amostras reais em DBS acondicionadas em geladeira.....	118
Tabela 23 - Valores de porcentagem de variação obtidos para as análises de estudo de estabilidade para amostras reais em DBS acondicionadas em temperatura ambiente	120
Tabela 24 - Valores obtidos para as análises de estudo de estabilidade de benzodiazepínicos para amostras-controles de sangue total acondicionadas em <i>freezer</i>	128
Tabela 25 - Valores obtidos para as análises de estudo de estabilidade de benzodiazepínicos para amostras-controles em sangue total acondicionadas em geladeira.	128

Tabela 26 - Valores obtidos para as análises de estudo de estabilidade de benzodiazepínicos para amostras reais em sangue total acondicionadas em <i>freezer</i>	129
Tabela 27 - Valores obtidos para as análises de estudo de estabilidade de benzodiazepínicos para amostras reais em sangue total acondicionadas em geladeira.	130
Tabela 28 - Valores obtidos para as análises de estudo de estabilidade de benzodiazepínicos para amostras-controle em DBS acondicionadas em <i>freezer</i>	132
Tabela 29 - Valores obtidos para as análises de estudo de estabilidade de benzodiazepínicos para amostras-controle em DBS acondicionadas em geladeira	133
Tabela 30 - Valores obtidos para as análises de estudo de estabilidade de benzodiazepínicos para amostras-controle em DBS acondicionadas em temperatura ambiente.	134
Tabela 31 - Valores obtidos para as análises de estudo de estabilidade de benzodiazepínicos para amostras reais em DBS acondicionadas em <i>freezer</i>	135
Tabela 32 - Valores obtidos para as análises de estudo de estabilidade de benzodiazepínicos para amostras reais em DBS acondicionadas em geladeira.	135
Tabela 33 - Valores obtidos para as análises de estudo de estabilidade de benzodiazepínicos para amostras reais em DBS acondicionadas em temperatura ambiente	136

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	17
1.1.	Toxicologia	18
1.1.1.	Toxicologia Forense.....	19
1.2.	Cadeia de Custódia e Contra-perícia.....	20
1.3.	Justificativa do Estudo.....	22
1.4.	Classes de Substâncias de Interesse Toxicológico.....	23
1.4.1.	Levantamento estatístico	23
1.4.2.	Aspectos gerais em cocaína.....	28
1.4.3.	Aspectos gerais em benzodiazepínicos.....	32
1.4.3.1.	Alprazolam.....	34
1.4.3.2.	Diazepam.....	36
1.5.	Estudos de estabilidade	37
1.5.1.	Aspecto gerais em estudos de estabilidade	37
1.5.2.	Estudo de estabilidade em matrizes biológicas <i>post mortem</i>	41
1.5.3.	Perfil de estabilidade da cocaína e seus produtos de biotransformação.....	44
1.5.4.	Perfil de estabilidade dos benzodiazepínicos estudados.....	47
1.5.4.1.	Diazepam.....	47
1.5.4.2.	Alprazolam.....	48
1.5.5.	Aspecto técnicos em estudo de estabilidade	49
1.6.	Dried Blood Spot (DBS)	50
1.6.1.	Histórico	50
1.6.2.	Caracterização da técnica.....	51
1.6.3.	DBS: papel de filtro e suas propriedades	53
1.6.4.	Problemas Quantitativos Relacionados ao DBS	56
1.6.4.1.	Homogeneidade da Amostra em DBS.....	56
1.6.4.2.	Efeito cromatográfico.....	57
1.6.4.3.	Efeito do Volume de Sangue.....	61
1.6.4.4.	Efeito do hematócrito	61
1.6.4.5.	Extração do DBS Total	63
1.6.5.	Espectrometria de Massas e DBS.....	64
1.6.6.	Estabilidade do analito em DBS.....	66
1.6.7.	DBS e Toxicologia Forense	67
2.	OBJETIVOS.....	69

2.1.	Objetivo Geral	70
2.2.	Objetivos Específicos.....	70
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	71
3.1.	Materiais.....	72
3.2.	Soluções.....	72
3.2.1.	Fases Móveis.....	72
3.2.2.	Substâncias Investigadas.....	73
3.3.	Amostras.....	74
3.4.	Procedimentos	76
3.4.1.	Preparo das “amostras DBS”	76
3.4.2.	Procedimento de extração para as “amostras DBS”	77
3.4.3.	Ensaio de recuperação e efeito-matriz em DBS	77
3.4.4.	Preparo das “amostras sangue total”	78
3.4.5.	Procedimento de extração para as “amostras sangue total”	79
3.4.6.	Ensaio de Recuperação e Efeito-Matriz em sangue total	79
3.5.	Equipamentos.....	81
3.6.	Métodos analíticos	81
3.6.1.	Validação analítica.....	81
3.6.2.	Métodos desenvolvidos para análise de amostras em DBS	81
3.6.3.	Métodos desenvolvidos para análise de amostras de sangue total	84
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
4.1.	Validação Analítica.....	88
4.1.1.	Linearidade	88
4.1.2.	Precisão e Exatidão.....	90
4.1.3.	Recuperação e Efeito Matriz	91
4.1.4.	Limites de detecção e quantificação	95
4.2.	Estudo de Estabilidade de Cocaína e metabólitos.....	96
4.2.1.	Resultados obtidos da análise de amostras de sangue total (SgT).....	96
4.2.1.1.	Análise do perfil de estabilidade em diferentes temperaturas de acondicionamento das amostras-controle	96
4.2.1.2.	Análise do perfil de estabilidade em diferentes temperaturas de acondicionamento das amostras reais.....	102
4.2.2.	Resultados obtidos da análise de amostras de DBS	109
4.2.2.1.	Análise do perfil de estabilidade de amostras-controle acondicionadas sob diferentes temperaturas.....	109

4.2.2.2. Análise do perfil de estabilidade de amostras reais acondicionadas sob diferentes temperaturas.....	115
4.2.2.3. Análise da diferença de perfil de estabilidade dos compostos em DBS com ênfase na diferença de temperatura de acondicionamento	122
4.2.3. Análise da diferença de perfil de estabilidade dos compostos em DBS e em sangue total (SgT).....	124
4.3. Estudo de Estabilidade dos Benzodiazepínicos Seleccionados	127
4.3.1. Resultados obtidos da análise de amostras de sangue total (SgT)	127
4.3.1.1. Análise do perfil de estabilidade em diferentes temperaturas de acondicionamento das amostras-controle.....	127
4.3.1.2. Análise do perfil de estabilidade em diferentes temperaturas de acondicionamento das amostras reais.....	129
4.3.2. Resultados obtidos da análise de amostras de DBS.....	132
4.3.2.1. Análise do perfil de estabilidade de amostras-controle acondicionadas sob diferentes temperaturas.....	132
4.3.2.2. Análise do perfil de estabilidade de amostras reais acondicionadas sob diferentes temperaturas.....	134
5. CONCLUSÕES.....	140
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	143
ANEXOS.....	155

1. INTRODUÇÃO

1.1. Toxicologia

Ao longo da história, a toxicologia foi definida por diversos autores e de diferentes maneiras, sendo a definição de *Paracelsus* uma das mais citadas, cujo enunciado diz que “a diferença entre medicamento e o veneno está na dose” (KLAASSEN *et al.*, 2013). Atualmente, a Toxicologia é definida, de modo mais amplo, como sendo o estudo dos efeitos adversos de substâncias químicas, quando em contato com sistemas biológicos vivos (KLAASSEN *et al.*, 2013; PASSAGLI, 2013).

A toxicologia é uma ciência multidisciplinar que abrange, portanto, diversas áreas do conhecimento, as quais, em conjunto, possibilitam entender a interação entre o agente tóxico e o organismo vivo e, assim, alcançar os objetivos principais desta ciência, que são a prevenção, o diagnóstico e o tratamento dos indivíduos expostos aos toxicantes. Nesse contexto, a toxicologia pode ser classificada de acordo com a natureza do agente químico ou, também, de acordo com as circunstâncias em que a exposição ocorreu. Assim, podem ser enumeradas as seguintes grandes áreas da toxicologia (para revisão, PASSAGLI, 2013):

- Toxicologia ambiental: estuda a interação entre agentes tóxicos presentes no meio ambiente e os organismos vivos;
- Toxicologia ocupacional: tem enfoque dado à exposição química de um indivíduo em seu ambiente de trabalho;
- Toxicologia de alimentos: tem por objetivo estudar os efeitos adversos provocados pelo consumo de alimentos, tanto no que se refere a alimentos contaminados, quanto a substâncias presentes no alimento em decorrência de seu processamento (como a adição de corantes, por exemplo);
- Toxicologia social: cujo objetivo é estudar os efeitos tóxicos relacionados ao consumo de drogas e medicamentos pelo homem em sua vida em sociedade;
- Toxicologia forense: definida como o estudo dos efeitos nocivos de compostos químicos sobre seres humanos, nos casos em que houver relação com investigações criminais. Por ser o escopo desse trabalho, será descrita mais detalhadamente a seguir.

1.1.1. Toxicologia Forense

A toxicologia forense é a aplicação da toxicologia aos propósitos da lei (LEVINE, 2010; KLAASSEN *et al.*, 2013). Seu principal objetivo é identificar o composto químico que possa estar relacionado à morte ou lesão corporal de um indivíduo, ou mesmo identificar o composto químico utilizado para a produção de danos ao patrimônio, com a finalidade de produzir provas concretas, que serão utilizadas durante o processo legal para apuração dos fatos (KLAASSEN *et al.*, 2013; PASSAGLI, 2013).

Assim, por apresentar o objetivo claro e específico de identificar substâncias, não se pode menosprezar a importância da química analítica nesse processo, uma vez que esta fornece as ferramentas necessárias para a identificação e quantificação dos compostos químicos de interesse forense (GONZÁLEZ, 2012; KLAASSEN *et al.*, 2013; PASSAGLI, 2013). Mathieu Orfila (1783-1853) foi o primeiro a aplicar a química analítica na identificação de compostos tóxicos em tecidos e fluidos biológicos, e a produzir uma prova legal de intoxicações, quando isolou o arsênio de uma variedade de amostras biológicas *post mortem*, principal grupo de amostras associado às ciências forenses até o século XX (CARRAZA, 2008; LEVINE, 2010).

Isso porque, até o século XX, o campo de atuação dos toxicologistas forenses se limitava à pesquisa e identificação de agentes tóxicos em cadáveres no âmbito médico-legal. Entretanto, a abrangência desta ciência é atualmente bem mais vasta e envolve análise em amostras de indivíduos vivos, além de análise em materiais de origem não-biológica, como nos casos envolvendo falsificação e adulteração de medicamentos, e outras circunstâncias de interesse jurídico (PASSAGLI, 2013).

Em termos legais, a toxicologia forense, no Brasil, é regida por diferentes dispositivos que visam regulamentar a prática desta ciência, de maneira a garantir a irrefutabilidade legal dos resultados obtidos. Nesse contexto, o Código de Processo Penal (CPP) versa, de maneira ampla, sobre os requisitos mínimos exigidos para a produção de provas com validade legal. Assim, segundo Artigo 159 do CPP: “O exame de corpo de delito e outras perícias serão realizados por perito oficial, portador de diploma de curso superior” (BRASIL, CPP). Em consonância com o CPP, de acordo com Passagli (2013), no âmbito do Sistema de Justiça Criminal, são os peritos criminais e os peritos médico-legistas, que se utilizarão dos conhecimentos fornecidos pela toxicologia forense, para estudar os aspectos médico-legais do uso de substâncias químicas pelo homem, com o intuito de esclarecer as circunstâncias e causas de um possível delito.

No Estado de São Paulo, as análises toxicológicas forenses oficiais em amostras biológicas são realizadas no Núcleo de Toxicologia Forense (NTF), laboratório do Instituto Médico Legal (IML) da Superintendência da Polícia Técnico-Científica (SPTC), cujas atribuições, segundo o artigo nº. 34 do Decreto 48.009, publicado em 11 de agosto de 2003, são “realizar exames em sangue, urina, secreções e vísceras de seres humanos, a fim de detectar substâncias que causem envenenamento ou dependência”.

1.2. Cadeia de Custódia e Contra-perícia

Segundo o artigo 158 do CPP, “quando a infração deixar vestígios, será indispensável o exame de corpo de delito, direto ou indireto, não podendo supri-lo a confissão do acusado” (BRASIL, CPP). Nesse contexto, a realização do referido exame de corpo de delito deverá seguir um conjunto de normas e procedimentos, que visam preservar a validade da prova pericial, sendo esse conjunto de procedimentos denominado cadeia de custódia. A cadeia de custódia é formalmente definida como o conjunto de todos os procedimentos utilizados para manter e documentar a história cronológica do vestígio, a fim de possibilitar o rastreamento de sua posse e manuseio, desde de seu reconhecimento até o descarte, segundo a portaria nº. 82 de 2014, da Secretaria Nacional de Segurança Pública (SENASP). Adicionalmente, esta portaria estabelece as diretrizes sobre os procedimentos a serem observados no tocante à cadeia de custódia de vestígios (SENASP, 2014).

Nesse sentido, a documentação da sequência de eventos a que um vestígio foi submetido é parte essencial da cadeia de custódia. Tais eventos devem estar de tal forma interligados que podem ser imaginados como elos de uma corrente, em que cada elo é qualquer pessoa que tenha tido acesso ao vestígio, ou mais precisamente, qualquer pessoa que tenha tido a custódia desse vestígio. A documentação deverá conter informações que possibilitem identificar cada elo desta sequência, durante todo o processo legal, uma vez que é direito do acusado obter tais informações, e dever do Estado fornecê-las (EDINGER, 2016). Assim, para Geraldo Prado, “cadeia de custódia da prova nada mais é que um dispositivo dirigido a assegurar a fiabilidade do elemento probatório, ao colocá-lo sob proteção de interferências capazes de falsificar o resultado da atividade probatória” (PRADO, 2014).

Portanto, a cadeia de custódia, além de garantir a confiabilidade dos resultados obtidos, deve garantir, sempre que possível, a preservação das características inerentes do vestígio pelo

tempo que for necessário, idealmente até o trânsito em julgado, uma vez que ao acusado é garantido o direito de, em momento oportuno, solicitar nova perícia, conforme preconiza o artigo 170 do CPP: “Nas perícias de laboratório, os peritos guardarão material suficiente para a eventualidade de nova perícia.” (BRASIL, CPP).

A Constituição Federal (CF), em seu artigo 5º, inciso LV, diz que “aos litigantes, em processo judicial ou administrativo, e aos acusados em geral são assegurados o contraditório e ampla defesa, com os meios e recursos a ela inerentes”. Sendo assim, ainda que indiretamente, a CF também garante ao acusado o direito de realização de nova perícia (BRASIL, CF, 1988).

Para tanto, de cada amostra submetida à análise em laboratórios forenses, uma parte deverá ser armazenada até o fim do processo judicial, visando garantir o direito de ampla defesa do acusado. A contra-perícia deverá ser realizada por meio da figura do assistente técnico, cuja atuação é regulamentada nos parágrafos 3º e 4º do artigo 159 do CPP, que garantem ao acusado o direito de formulação de quesitos e indicação de assistente técnico, a fim de lhe permitir realizar questionamentos a respeito do exame pericial:

“Art. 159 §3º. Serão facultadas ao Ministério Público, ao assistente de acusação, ao ofendido, ao querelante, e ao acusado a formulação de quesitos e indicação de assistente técnico.”

“Art. 159 §4º. O assistente técnico atuará a partir de sua admissão pelo juiz e após a conclusão dos exames e elaboração do laudo pelos peritos oficiais, sendo as partes intimadas desta decisão.”

Considerando as condições em que a contra-perícia será realizada, e considerando os procedimentos a respeito da cadeia de custódia preconizados pela portaria nº. 82 SENASP (2014), já mencionada, o armazenamento da prova pericial deverá ser feito em condições adequadas, para realização de uma possível contra-perícia. O armazenamento da prova pericial deverá ser feito vinculando a peça ao número do laudo correspondente, para manter o fluxo da cadeia de custódia.

Assim, complementando a Constituição Federal, que garante o direito ao acusado de contestar a prova pericial, e complementando também o CPP, que institui a obrigatoriedade da guarda de material para realização de contra-perícia, legislações específicas versam sobre a temática do armazenamento de provas periciais. E, nesse caso, a portaria nº. 82 (SENASP, 2014) não só pressupõe que todo órgão oficial de perícia armazene amostras para contra-perícia, mas também que seja armazenado de maneira adequada, garantindo a rastreabilidade e conservação da prova pericial, de tal forma que não se altere suas características fundamentais,

a fim de que os resultados obtidos através de análises técnicas não sofram interferências devido a quaisquer processos de degradação ou deterioração.

Com isso, tendo vista os conceitos e legislações acerca da cadeia de custódia, e considerando sua atribuição legal, foi elaborada a Portaria do Diretor Técnico de Departamento do Instituto Médico Legal, de 04 de julho de 2012, que dispõe sobre normas e procedimentos para envio de materiais biológicos para análise ao NTF. Tal portaria dispõe sobre as normas de coleta e acondicionamento dos materiais biológicos humanos que são encaminhados para exame toxicológico, além de versar sobre as providências a serem tomadas em relação às amostras após terem sido realizadas as análises oficiais e determina “uma vez que os agentes tóxicos presentes nas matrizes biológicas são passíveis de alterações o material será descartado após a expedição do resultado das análises”.

Dessa maneira, atualmente, os procedimentos de armazenamento de amostras biológicas atualmente disponíveis nos laboratórios de análise forense oficiais podem não ser capazes de evitar a degradação dos toxicantes, e de garantir a reprodutibilidade dos resultados obtidos após transcurso de longos períodos de tempo, inviabilizando a realização da contra-perícia. Além disso, o espaço físico para armazenamento das amostras é limitado frente à demanda de análises toxicológicas de um laboratório, como o NTF, que é responsável pelos exames em amostras biológicas de todo o Estado de São Paulo.

1.3. Justificativa do Estudo

Considerando o aspecto jurídico da necessidade de armazenamento de quantidade suficiente de amostra para eventual nova perícia, e considerando que os procedimentos de armazenamento, atualmente disponíveis, podem não garantir condições adequadas para cumprir tal recomendação, nota-se a relevância de se buscar alternativas que possam transpor tais dificuldades técnicas, as quais tornam inviável a guarda de amostras de contra-prova uma vez que os processos de degradação a que tais amostras estão suscetíveis alterariam características fundamentais das mesmas, o que, por conseguinte, poderiam oferecer divergência de resultados entre os que foram obtidos originalmente e os que forem obtidos após nova perícia, colocando-os em dúvida.

Assim sendo, o presente trabalho levanta a hipótese da utilização de amostras de sangue *post mortem* aplicado em papel, como modelo para estudos de estabilidade de fármacos e drogas de abuso de interesse para a toxicologia forense, a fim de fornecer conhecimentos práticos que

possam ser aplicados para o acondicionamento adequado de amostras biológicas a longo prazo, permitindo a realização de contra-perícia.

1.4. Classes de Substâncias de Interesse Toxicológico

1.4.1. Levantamento estatístico

Para selecionar quais compostos seriam analisados durante o presente estudo, levou-se em consideração a relevância das classes de substâncias a que a população como um todo está exposta, com maior interesse para a população brasileira. Para isso, fez-se um levantamento bibliográfico de frequência de uso, prescrição, dispensação e nível de dependência na população brasileira em relação a medicamentos e drogas de abuso.

Nesse contexto, apesar do conhecido crescimento do consumo de drogas sintéticas, a análise de dados estatísticos relacionados à apreensão de drogas a nível mundial mostra a grande disponibilidade de cocaína, em que 655 toneladas da substância foram apreendidas no ano de 2014, enquanto, no mesmo período, a apreensão de drogas sintéticas (anfetamina, metanfetamina, êxtase e novas substâncias psicoativas) soma 197 toneladas. A Figura 1 ilustra a quantidade de cocaína apreendida por continente/região anualmente no período de 1998-2014 e, a partir dela, é possível observar a relevância da cocaína para a América do Sul. Especificamente no caso brasileiro, o mesmo levantamento indica que o aumento de cocaína apreendida no mesmo período é de, aproximadamente, 7% (UNODC, 2016).

Figura 1: Quantidades de cocaína apreendida, por região, no período de 1998-2014 (adaptado de UNODC, 2016).

Além disso, estudos demonstram que o número de usuários de cocaína no mundo aumentou, aproximadamente, 30% no período de 1998-2014. Fato esse confirmado por pesquisas regionais, em que foi observado crescimento de consumo de cocaína na Europa, entre 2011 e 2016, e na América do Norte, entre 2010 e 2014 (EMCDDA, 2017; UNODC, 2016).

Assim, além dos dados estatísticos observados, é importante salientar o impacto que o consumo dessa substância apresenta, uma vez que o abuso de cocaína pode acarretar óbitos, principalmente relacionados à overdose e a acidentes de trânsito fatais. Nos Estados Unidos, dados do *National Institute on Drug Abuse* (NIDA) mostram que nos anos de 2013 a 2015, houve uma tendência de aumento no número de mortes por overdose envolvendo cocaína, em que, aproximadamente, 7000 estadunidenses morreram em decorrência do abuso dessa substância, conforme ilustra a Figura 2 (NIDA, 2016). Outros dados norte-americanos mostram que a cocaína tem grande influência em acidentes de trânsito fatais, cujo impacto apenas não é mais relevante que o impacto das anfetaminas nesse cenário (WHO, 2016).

Figura 2: Mortes por overdose envolvendo cocaína no Estados Unidos (adaptado de NIDA, 2016).

Analisando a exposição mundial a essas classes de substâncias, que apresentam potencial para abuso, observa-se a relevância de outras substâncias psicotrópicas, inclusive de uso prescrito, em especial, os benzodiazepínicos. Isso porque, esta é uma das únicas classes de medicamentos prescritos que figuram em listas de consumo abusivo de substâncias químicas e, para isso, contribuem diversos fatores. O primeiro fator a ser mencionado, possivelmente o mais

importante, é o fato de os benzodiazepínicos serem uma das classes de medicamentos mais prescritas no mundo, apesar de seu conhecido potencial em causar dependência. Além disso, estudos demonstram que é comum a associação de benzodiazepínicos a substâncias ilícitas, sendo também utilizada isoladamente como substância recreativa. (TAN; RUDOLPH; LÜSCHER, 2011; HOOD *et al.*, 2012; IMO, 2015).

Dessa forma, a facilidade de acesso e o elevado potencial de abuso e dependência apresentado pelos benzodiazepínicos refletem no número de mortes observado. Assim, dados do NIDA mostram o número crescente de mortes por overdose envolvendo benzodiazepínicos em que, aproximadamente, 9000 estadunidenses morreram por overdose dessa classe de medicamentos, conforme ilustra a Figura 3 (NIDA, 2016a). Outros dados norte-americanos mostram a grande influência do consumo de benzodiazepínicos sobre acidentes de trânsito fatais, sendo a classe de medicamentos mais importante nesse aspecto (WHO, 2016).

Figura 3: Número de mortes por overdose envolvendo benzodiazepínicos (adaptado de NIDA, 2016a).

No cenário brasileiro, os dados relativos à exposição da população a drogas de abuso são escassos, principalmente quando comparados ao número de estudos estatísticos publicados em outros países. Porém, existem alguns dados que permitem traçar um panorama a respeito do comportamento da população brasileira em relação a substâncias que apresentam potencial para abuso.

Assim, o Centro Brasileiro de Informações Sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID), órgão vinculado à Unifesp, publicou, em 2005, dados de um levantamento domiciliar

mostrando que, aproximadamente, 20% dos entrevistados já fizeram uso de algum tipo de droga ao longo da vida, incluindo neste valor as drogas de abuso, os benzodiazepínicos, medicamentos orexígenos (estimulantes do apetite) e os barbitúricos, excluindo álcool e tabaco. O levantamento mostra que maconha, solventes e benzodiazepínicos disputam, em todas as regiões, as três primeiras posições, em termos de uso na vida. E, ainda, mostra que cerca de 15% dos entrevistados durante o estudo, relataram já terem feito uso de maconha, cocaína, opiáceos e alucinógenos. O estudo revela também que os benzodiazepínicos são a classe de medicamentos que mais causou dependência entre os entrevistados, ficando atrás apenas do álcool, tabaco e maconha (CEBRID, 2006).

Por outro lado, analisando a exposição da população brasileira a drogas de abuso e medicamentos, através de dados de intoxicação, o principal agente causador de intoxicação humana, no Brasil, foram os medicamentos, representando, aproximadamente, 30% das intoxicações humanas (SINITOX, 2015), tendo sido observado que os benzodiazepínicos, antigripais, antidepressivos e anti-inflamatórios são as classes de medicamentos que mais causaram intoxicações em nosso país (BORTOLETTO; BOCHNER, 1999).

Já a análise de prescrições e dispensação de medicamentos psicotrópicos, em uma Unidade Básica de Saúde em um município paulista de grande porte, mostra que os antidepressivos são os medicamentos controlados mais receitados. Dentre eles, os mais frequentemente prescritos são os antidepressivos tricíclicos e inibidores de serotonina, seguidos dos benzodiazepínicos, incluídos na classe dos ansiolíticos e hipnóticos, em que 17% dos receituários indicavam a prescrição dos benzodiazepínicos (SILVA; IGUTI, 2012).

Porém, apesar de serem uma das classes de medicamentos mais receitadas, estudos que analisaram a adequabilidade das prescrições de benzodiazepínicos demonstram que a minoria delas eram apropriadas, tendo sido observado o uso crônico dessa classe de medicamentos, o fato não aconselhável, já que o consumo a longo prazo desse tipo de substância aumenta o risco de dependência, acidentes, suicídios, entre outros eventos indesejáveis. Também foi observada inadequabilidade das prescrições de benzodiazepínicos quanto à dose e interações medicamentosas (NALOTO *et al.*, 2016).

Tais dados ilustram o amplo acesso e o impacto que os benzodiazepínicos apresentam sobre a população no geral. Dessa forma, de maneira complementar às informações que foram apresentadas até o momento, serão aqui considerados dados de exposição em relação a segmentos específicos da população. Assim, inicialmente será analisado o uso de drogas e medicamentos por motoristas dos diversos tipos de veículos automotores nas estradas brasileiras. A Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas (SENAD) juntamente com o Centro

de Pesquisa em Álcool e Drogas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) realizou um estudo no Hospital de Clínicas de Porto Alegre demonstrando que em relação às amostras que apresentaram resultado positivo para substâncias psicoativas, cerca de 44,7% eram positivas para cocaína, 32,6% para maconha e 22,7% para benzodiazepínicos. Sendo assim, é possível sugerir que essas três classes de substâncias são as mais utilizadas por esse segmento da população, porém esse estudo não pôde fazer análise de anfetamínicos para todas as amostras, em que apenas 35% das amostras foram testadas para a presença de anfetamínicos o que representa um viés analítico importante. Além disso, o estudo realizou a análise confirmatória das amostras positivas (incluindo as positivas para anfetamínicos) e identificou os diversos tipos de substâncias utilizadas pelos motoristas abordados. As classes químicas e as substâncias identificadas foram dispostas em gráfico, ilustrado na Figura 4.

Figura 4: Prevalência do uso de substâncias psicoativas por condutores de veículos automotivos (adaptado de SENAD, 2010).

O SENAD (2010) coletou, ainda, dados oriundos de análises toxicológicas realizadas pelo Departamento Médico Legal de Porto Alegre, em amostras de vítimas fatais de acidente de trânsito. Dessa forma, foram testadas 231 amostras para presença de substâncias psicoativas, não considerando a presença de álcool. Do total de amostras analisadas, aproximadamente, 11% delas apresentaram resultado positivo para substâncias psicoativas, em que 5% delas apresentaram resultado positivo para maconha; cerca de 3% para cocaína e 2% para benzodiazepínicos, tendo sido encontrados resultados positivos para outras substâncias psicoativas, conforme ilustra a Figura 5.

Figura 5: Resultados de análises toxicológicas de vítimas fatais de acidentes de trânsito (SENAD, 2010).

Nesse mesmo contexto, de exposição de motoristas brasileiros a substâncias psicotrópicas, Yonamine (2004) realizou análises em urina e saliva de motoristas de caminhão em rodovias brasileiras para verificar a presença de etanol, anfetamina e metanfetamina, cocaína e maconha. Do total de 558 amostras de urina analisadas, 39 apresentaram resultado positivo para as substâncias pesquisadas, sendo cerca de 8% positivo para benzoilecgonina (indicativo da exposição à cocaína) e, cerca de 10%, para benzoilecgonina e ácido 11-nor-delta-9-tetraidrocanabinol carboxílico simultaneamente.

Em suma, os estudos mencionados, realizados com diferentes enfoques demonstram semelhanças no perfil de uso de substâncias psicoativas pela população brasileira, sendo possível dizer que, além de serem escassos, os dados estatísticos referentes à exposição da população brasileira a substâncias psicoativas, quando disponíveis são, frequentemente, desatualizados ou restritos a um grupo específico da população, como nos casos acima mencionados. Porém, a forma como o conjunto de dados estatísticos aqui enumerados se apresenta, considerando para tanto dados de entrevistas, número de intoxicações, número de prescrição e dispensação de fármacos, além dos dados analíticos relativos aos motoristas em estradas brasileiras, é possível inferir qual seja o perfil de exposição da população em geral a diversas classes de substâncias, demonstrando o grande impacto que a cocaína e os benzodiazepínicos possuem sobre a população brasileira, no tocante à saúde pública, o que justifica a relevância de métodos analíticos voltados a essas classes de substâncias.

1.4.2. Aspectos gerais em cocaína

A cocaína é um alcalóide extraído das folhas da planta *Erytroxylum coca*, cuja ação sobre o sistema nervoso é conhecida há mais de 2000 anos. Relatos indicam seu uso desde os

Incas, no Peru, tendo sido aplicada no tratamento da depressão e da dependência da morfina e aplicada como anestésico local, até que, devido a sua elevada toxicidade, foi proibida em diversos países, sendo atualmente uma das drogas de abuso ilícita mais consumida no mundo (ISENSCHMID, 2010). Seu consumo se dá por diversas vias, como a via nasal, intravascular, oral e inalatória (*crack*). O consumo através das vias nasal e oral apresenta baixa taxa de absorção e os efeitos surgem após longos períodos de tempo, ao contrário da ingestão por vias intravascular e inalatória (CARVALHO, 2013; ISENSCHMID, 2010).

Seus efeitos são principalmente relacionados à interferência no sistema dopaminérgico, estimulante do sistema nervoso central. O mecanismo pelo qual a cocaína interfere nesse sistema se dá através da inibição da receptação de dopamina pelas células nervosas, prolongando a atuação desse neurotransmissor sobre o sistema nervoso. Por outro lado, há estudos que demonstram que a cocaína atua, também, no aumento da liberação de dopamina na fenda sináptica (NESTLER, 2005; VENTON *et al.*, 2006). A alta concentração de células responsivas à dopamina no sistema límbico, muito relacionado à sensação de intenso bem-estar, faz com que o indivíduo queira repetir a experiência que o fez sentir aquela sensação, explicando, ao menos parcialmente, o elevado grau de risco de dependência associado ao uso da cocaína (NESTLER, 2005; SORA *et al.*, 2001). Assim, os efeitos mais comuns relacionados ao abuso da cocaína são sentimento de euforia, sensação de bem estar e autoconfiança, aumento do estado de alerta mental e aumento da sensibilidade sensorial, visual e auditiva, sendo considerada um potente estimulante (NIDA, 2016b; ISENSCHMID, 2010; DRUMMER, 2014; RODRIGUES; PASSAGLI, 2013).

O uso crônico induz diversas alterações no organismo. No sistema nervoso central associa-se o uso da cocaína à hemorragia intracerebral, sendo também associada à interferência nas funções cognitivas, induzindo problemas de memória, atenção, tomadas de decisão e realização de atividades motoras (VONMOOS *et al.*, 2014; PORTER, 2012). No sistema cardiovascular são reportados diminuição da função sistólica, hipertrofia ventricular, vasoconstrição, indução de aterosclerose e formação de trombos, favorecendo a ocorrência de infarto do miocárdio (MACEIRA *et al.*, 2014; RODRIGUES; PASSAGLI, 2013; RIEZZO *et al.*, 2012). Já no trato respiratório, a cocaína pode induzir pneumonia, exacerbação da asma, hemorragia e enfisema (RESTREPO *et al.*, 2007). Salienta-se que a cocaína atravessa a barreira placentária podendo induzir má formação fetal, e, além disso, pode ser encontrada no leite materno levando à intoxicação de lactentes decorrentes da exposição à cocaína (MEYER; ZHANG, 2009; CARRAZA *et al.*, 2013).

A cocaína é metabolizada, principalmente, em benzoilecgonina (BE) e éster metilecgonina (EME) por diferentes mecanismos e, minoritariamente, em norcocaína. *In vivo*, a cocaína é metabolizada a BE, por hidrólise química espontânea, favorecida sob condições fisiológica e alcalina, e por hidrólise enzimática, através da carboxilesterase hepática humana tipo 1 (hCE1). Já a metabolização da cocaína em EME ocorre através de hidrólise enzimática catalisada por enzimas plasmáticas, através da butilcolinesterase (classe das pseudocolinesterases). A Figura 6 ilustra o metabolismo da cocaína *in vivo*, indicando as enzimas e compostos envolvidos (BROWNE *et al.*, 1998; WARNER; NORMAN, 1999; ISENSCHMID, 2010; KISZKA *et al.*, 2000; SCHINDLER; GOLDBERG, 2012).

Figura 6: Metabolismo da cocaína via hidrólise *in vivo*.

1.4.3. Aspectos gerais em benzodiazepínicos

Os benzodiazepínicos são uma das classes de medicamentos mais prescritas no mundo, a despeito de seus efeitos colaterais e elevado potencial para abuso e dependência, assim como demonstrado no levantamento bibliográfico estatístico (TAN; RUDOLPH; LÜSCHER, 2011; HOOD *et al.*, 2012; IMO, 2015; NIDA, 2016a; WHO, 2016).

Os benzodiazepínicos são substâncias que atuam sobre receptores GABA (ácido gama aminobutírico), subtipo A, presentes no sistema nervoso central. Estes são receptores de natureza inibitória e, por isso, diminuem a excitabilidade dos neurônios. A estimulação dos receptores GABA-A facilita o influxo de íons cloreto inibindo a ação de células nervosas, e diminuindo a atividade cerebral. (GRIFFIN, *et al.*, 2013). Por isso, esses medicamentos apresentam vasta aplicação clínica, sendo empregados em tratamentos de estresse, distúrbios do sono, pânico, depressão induzida por ansiedade e alcoolismo. Também são explorados em pré-operatórios, em virtude de suas propriedades ansiolíticas e de induzir amnésia anterógrada (GRIFFIN, *et al.*, 2013; MELO; BASTOS; TEIXEIRA, 2012; DIXON; MBEUNKUI; WIEGEL, 2015).

Os diversos fármacos desta classe apresentam ação clínica semelhante, porém se diferenciam em seu comportamento farmacocinético, em que apresentam particularidades no perfil de absorção e eliminação, determinante para caracterização do tempo de início de ação e de duração do efeito farmacológico de cada composto (GRIFFIN, *et al.*, 2013; ARCHER; FRYDRYCH; LAFLEUR, 2016).

Sua estrutura química básica apresenta um anel benzênico fundido a um anel de sete átomos constituído por dois átomos de nitrogênio, denominado diazepina, conforme ilustra a Figura 7. Baseado em sua estrutura química, os benzodiazepínicos podem ser classificados em cinco grupos principais (SZATKOWSKA *et al.*, 2014):

- 1) Derivados 1,4-benzodiazepínicos: grupo mais importante, que inclui clordiazepóxido, diazepam, clonazepam e flunitrazepam;
- 2) Derivados 1,5-benzodiazepínicos: que inclui o clobazam;
- 3) Triazolbenzodiazepínicos: que inclui o alprazolam;
- 4) Derivados do tienobenzodiazepínicos
- 5) Imidazolbenzodiazepínicos: grupo do midazolam.

Figura 7: Estrutura das 1,4-benzodiazepinas. Legenda R₁, R₂, R₃ e R₇: possíveis substituintes da estrutura básica das 1,4-benzodiazepinas.

Os três anéis (A, B e C) ilustrados na Figura 7 são importantes para interação com o receptor GABA, em que grupos substituintes nas posições indicadas por R₁, R₂, R₃ e R₇ podem aumentar ou diminuir a atividade dos benzodiazepínicos (FERREIRA, 1992). Assim, a presença de grupos eletronegativos na posição R₇ irá aumentar a afinidade da substância ao receptor (caso do alprazolam, clonazepam, diazepam, flutrazepam e outros) e a substituição em outras posições do anel A irá reduzir a potência do fármaco. Quanto ao anel B, os substituintes R₁, em geral, são grupamentos pequenos, em que a presença de grupamentos metila (caso do diazepam, flutrazepam e outros) melhoram a absorção e grupamentos maiores reduzem a atividade farmacológica. Em R₃, a presença de grupo hidroxila facilita a glicuronidação e, por facilitar essa rota de eliminação, diminui o tempo de ação do fármaco. Já as substituições em R₂ do anel C (posição orto) favorecem aumento da atividade farmacológica na presença de compostos eletronegativos R₂ (caso do clonazepam, flunitrazepam e outros), por outro lado a substituição em outras posições (meta ou para) reduz a atividade (FERREIRA, 1992; SZATKOWSKA *et al.*, 2014). A Tabela 1 ilustra os substituintes de diversas substâncias dessa classe de medicamentos.

Tabela 1 - Substituintes das posições R1, R2, R3 e R7 das 1,4-benzodiazepínicos

1,4-Benzodiazepínicos	R ₁	R ₂	R ₃	R ₇
Clonazepam	H	Cl	H	NO ₂
Diazepam	CH ₃	H	H	Cl
Flunitrazepam	CH ₃	F	H	NO ₂
Lorazepam	H	Cl	OH	Cl
Oxazepam	H	H	OH	Cl
Temazepam	CH ₃	H	OH	Cl

(Adaptado de Ferreira, 1992).

1.4.3.1. Alprazolam

O alprazolam, primeiro composto de sua classe comercializado na América do Norte, é denominado triazolbenzodiazepínico, devido à presença de um grupo triazol, anel de cinco membros, constituído por dois átomos de carbono e três átomos de nitrogênio. A estrutura do alprazolam segue ilustrada na Figura 8. Atribui-se à presença do anel triazol a maior estabilidade do alprazolam, quando comparada à estabilidade de outros benzodiazepínicos, isso porque esse grupo promove proteção contra hidrólise (FAWCETT; KRAVITZ, 1982; DIXON; MBEUNKUI; WIEGEL, 2015). Este fármaco é utilizado, na prática clínica, no tratamento de depressão, ansiedade generalizada e síndrome do pânico (KRAVITZ; FAWCETT; NEWMAN, 1993; MANDRIOLI; MERCOLINI; RAGGI, 2008).

Figura 8: Estrutura química do alprazolam, com indicação do grupo triazol.

O alprazolam cruza a barreira hemato-encefálica e liga-se de maneira não-seletiva a receptores GABA-A no sistema nervoso central, cujo mecanismo de ação é, de maneira geral, semelhante aos demais compostos da classe. No caso particular do alprazolam, a influência exercida sobre receptores GABA-A reflete nos sistemas serotoninérgicos, dopaminérgicos e noradrenérgicos, o que contribui para a efetividade dos efeitos clínicos no tratamento da

ansiedade e depressão. Os efeitos adversos mais comumente reportados são sedação, fraqueza, problemas de memória e outros. É considerado um fármaco com rápido início de ação, em que na primeira semana começa a produzir efeitos, e também, de curta duração, havendo elevado risco de surgimento de efeito rebote quando da retirada do medicamento, sugerindo que sua retirada seja lenta (ALFAZIL, 2009; VERSTER; VOLKERTS, 2004; BENTUE'-FERRER *et al.*, 2001).

Segundo reportado em literatura, o alprazolam não apresenta elevado grau de dependência e abuso entre os pacientes que fazem uso clínico da substância. Porém, foi observado que indivíduos com histórico de abuso de drogas fazem uso recreativo do alprazolam, devido a um suposto efeito de euforia que este medicamento provoca nesses indivíduos, efeito inverso ao que é observado em indivíduos que não apresentam histórico de dependência a drogas de abuso (VERSTER; VOLKERTS, 2004).

O alprazolam é metabolizado, no organismo humano, através de oxidação catalisada por enzimas do sistema P450, especificamente pelas isoformas CYP3A4 e CYP3A5. São, atualmente, conhecidos 29 metabólitos do alprazolam, porém os dois mais importantes são o 4-hidroxi alprazolam, oriundo da ação da isoforma CYP3A4, e o alfa-hidroxi alprazolam, oriundo da ação da isoforma CYP3A5. Porém, esses metabólitos não se ligam aos receptores GABA-A com a mesma eficiência que o alprazolam e, portanto, considera-se que o alprazolam não possui metabólitos ativos. As principais rotas de metabolização do alprazolam seguem esquematizadas na Figura 9 (VERSTER; VOLKERTS, 2004; HIROTA *et al.*, 2001; MANDRIOLI; MERCOLINI; RAGGI, 2008).

Figura 9: Metabolização do alprazolam (adaptado de HIROTA *et al.*, 2001; MANDRIOLI; MERCOLINI; RAGGI, 2008).

1.4.3.2. Diazepam

O diazepam, derivado estrutural do clordiazepóxido, pertence ao grupo dos 1,4-benzodiazepínicos, assim como seu precursor. A maior potência sedativa atribuída ao diazepam auxiliou na disseminação de seu uso na prática clínica, demonstrado através do fato de que, apesar de ter sido o segundo benzodiazepínico a ser comercializado, ainda é um dos fármacos mais prescritos do mundo. É utilizado na prática clínica como anticonvulsivante, auxiliar nos preparativos anestésicos, atuando, como sedativo, relaxante muscular e, principalmente, no tratamento de transtornos de ansiedade (MANDRIOLI *et al.*, 2008; GRIFFIN, *et al.*, 2013; SZATKOWSKA *et al.*, 2014). A Figura 10 ilustra as estruturas do clordiazepóxido e do diazepam.

Figura 10: Estrutura do clordiazepóxido e diazepam.

Este fármaco, extensamente metabolizado através de enzimas hepáticas, apresenta apenas uma proporção muito pequena eliminada na forma inalterada pela urina. É considerado um fármaco de potência média e de longa ação, para a qual contribui a ação de seus diversos metabólitos ativos, sendo os principais desmetildiazepam (nordiazepam), temazepam e oxazepam. Em consequência, ajustes de dose são necessários em pacientes idosos, neonatos e com disfunções hepáticas e renais (KLOTZ *et al.*, 1975; MANDRIOLI *et al.*, 2008; GRIFFIN, *et al.*, 2013).

As principais enzimas envolvidas no metabolismo no diazepam, assim como para os outros benzodiazepínicos, pertencem ao complexo P450. No caso do diazepam, as isoformas mais importantes são a CYP2C19 e a CYP3A4, de acordo com o resumo esquemático da Figura 11. Alguns autores indicam ainda a participação da S-mefenitoína-hidroxilase na conversão do diazepam a nordiazepam (ou nordiazepam). Tanto o oxazepam e temazepam são metabólitos

rapidamente conjugados e eliminados (ANDERSSON *et al.*, 1994; MANDRIOLI *et al.*, 2008; BERTILSSON *et al.*, 1990).

Figura 11: Perfil metabólico do diazepam (adaptado de MANDRIOLI *et al.*, 2008).

1.5. Estudos de estabilidade

1.5.1. Aspecto gerais em estudos de estabilidade

Estabilidade química pode ser entendida como a capacidade de um composto em manter sua integridade estrutural de tal forma que sua concentração não se altere, ou se altere dentro de limites aceitáveis, em um meio submetido a condições determinadas, por um dado intervalo de tempo (SKOOP, 2004). O limite de variação de concentração considerado aceitável coincidirá com os limites de precisão e exatidão do método de análise validado para a substância

estudada, segundo o guia “*Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology*” publicado pelo *Scientific Working Group for Forensic Toxicology* (SWGTOX, 2013).

O conhecimento sobre estabilidade química é de extrema importância nas mais diversas áreas, sendo possível mencionar, sob o ponto de vista farmacêutico, o fato de que a degradação química de substâncias ativas poderá gerar metabólitos tóxicos, além de queda na concentração da substância, o que implicará diminuição de sua eficácia farmacológica (YOSHIOKA; STELLA, 2002). Já no contexto analítico, esse conhecimento permitirá que o analista determine o tempo máximo de armazenamento da substância de interesse sob determinadas condições, sem que sua concentração se altere além dos limites aceitáveis, e possibilita, ainda, que tais conhecimentos sejam utilizados para interferir nos mecanismos de degradação, a fim de aumentar a estabilidade dos compostos (SKOOP, 2004). Portanto, nota-se que é de grande utilidade analisar a estrutura química dos compostos, a fim de predizer seu perfil de degradação nas condições de interesse (YOSHIOKA; STELLA, 2002). Dessa forma, serão feitas, aqui, algumas considerações a respeito da estrutura química e os mecanismos de degradação das classes de substâncias selecionadas neste trabalho.

De maneira geral, é possível dizer que as substâncias químicas apresentam, em sua estrutura molecular, ligações que podem ser rompidas sob determinadas condições, tornando-as suscetíveis à degradação química (YOSHIOKA; STELLA, 2002). Já é conhecido que alguns grupos funcionais são mais suscetíveis à transformação que outros, podendo acarretar diminuição de estabilidade dos compostos em que estão presentes, como por exemplo, grupamentos ésteres, grupos fotossensíveis, grupos que contenham enxofre e outros grupos funcionais que podem sofrer reações de oxidação-redução (KERRIGAN, 2011). Tais grupos funcionais apresentam diferentes mecanismos de degradação química, incluindo hidrólise, desidratação, isomerização, racemização, eliminação, oxidação, fotodegradação e interações com outras substâncias presentes no meio em que se encontram, como no caso de excipientes em medicamentos (YOSHIOKA; STELLA, 2002).

A hidrólise é um dos principais mecanismos de reação química a que os fármacos são submetidos, sendo particularmente importante para degradação de substâncias que contém grupos amida e éster, presentes em grande parte dos compostos com ação farmacológica (YOSHIOKA; STELLA, 2002), conforme exemplificado na Figura 12.

Figura 12: Equação que apresenta o mecanismo geral de hidrólise de ésteres.

Considerando os grupos de substâncias que serão aqui estudados, a cocaína apresenta dois grupamentos ésteres susceptíveis à hidrólise, e dependendo de qual desses grupos sofrerem hidrólise formará benzoilecgonina ou éster metilecgonina, produtos esses que apresentam um grupamento éster também susceptíveis à hidrólise, conforme ilustrado na Figura 13 (YOSHIOKA; STELLA, 2002).

Figura 13: Metabolismo da cocaína via hidrólise *in vitro* (adaptado de BROWNE *et al*; 1998).

Já os benzodiazepínicos, que apresentam um anel benzênico fundido a um anel heterocíclico, sofrem hidrólise, principalmente, através da abertura do anel. De maneira geral, os benzodiazepínicos são bastante suscetíveis à hidrólise devido à presença de ligações amida, cujo mecanismo segue ilustrado na Figura 14, e indica a formação de dois compostos intermediários, de acordo com o fármaco envolvido. Assim, para o diazepam, por exemplo, o intermediário formado é o composto II ilustrado na Figura 14. Os nitrobenzodiazepínicos, bem como os triazolbenzodiazepínicos são pouco susceptíveis à hidrólise, por não apresentarem ligação amida e, no caso do segundo grupo, pelo efeito protetivo fornecido pela presença do anel triazol (FERREIRA, 1992; ALFAZIL, 2009; KOSKI, 2005; TANIGUCHI; GUENGERICH, [20-?]; CABRERA; DE WAISBAUM; NUDELMAN, 2005).

Figura 14: Rotas de hidrólise para benzodiazepínicos. Legenda: BDP – benzodiazepínico; BP – benzofenona; I – composto intermediário I; II – composto intermediário II; III – derivado glicínico (adaptado de CABRERA; DE WAISBAUM; NUDELMAN, 2005).

Apesar de existirem vários mecanismos agindo na degradação de compostos químicos, para as classes estudadas no presente trabalho, o principal mecanismo de transformação é a hidrólise (FERREIRA, 1992; YOSHIOKA; STELLA, 2002). Tal fato toma importância ainda maior, considerando que os estudos de estabilidade neste trabalho serão realizados em sangue, matriz que apresenta grande quantidade de água.

1.5.2. Estudo de estabilidade em matrizes biológicas *post mortem*

No contexto forense, intervenções nos processos de degradação podem ser consideradas a qualquer momento na cadeia de custódia da prova material, ou seja, desde o momento em que a amostra é coletada, até o momento em que é analisada. Neste intervalo, a degradação química

de amostras biológicas *post mortem* é mais impactante que em amostras biológicas *ante mortem*, uma vez que a coleta de amostras *post mortem* é limitada ao momento da necropsia. Por isso, se tais intervenções não forem adotadas com urgência, em alguns casos extremos, a degradação química poderá extinguir a substância da matriz analisada, induzindo conclusões analíticas errôneas, levando a resultados falso-negativos. Dessa forma, nota-se a relevância do conhecimento dos mecanismos de degradação química de cada substância nas matrizes de interesse e de seus produtos de degradação a fim de auxiliar na análise toxicológica *post mortem* (SKOOP, 2004; DRUMMER, 2004).

No entanto, apesar da notória relevância, a busca por trabalhos científicos publicados que tratam de estudos de estabilidade revela que a minoria deles versa sobre estabilidade de substâncias em matrizes biológicas, e uma parcela ainda menor trata de estudo de estabilidade em matrizes biológicas *post mortem*, o que pode ser explicado pela maior dificuldade analítica devido ao número de fatores envolvidos no processo de degradação nesse grupo de amostras, além da maior dificuldade de acesso a amostras reais *post mortem*.

No que tange aos fatores intrínsecos a amostras biológicas, a maior complexidade do meio, devido à presença de enzimas endógenas e de outras substâncias, adiciona variáveis determinantes no processo de degradação. A questão se torna ainda mais complexa, se forem consideradas matrizes biológicas *post mortem*, uma vez que diversos processos, que contribuem para a degradação, ocorrem concomitantemente. Assim, processos metabólicos típicos de um organismo vivo, como a biotransformação de compostos químicos, podem continuar ocorrendo após a morte até a exaustão da capacidade do sistema tamponante do sangue (KISZKA, 2000; SKOPP, 2004).

Dessa maneira, algumas enzimas podem permanecer ativas mesmo após a morte, ou após a coleta da amostra, e, assim, continuarem o processo de degradação e transformação das substâncias (KERRIGAN, 2011; MACKEY-BOJACK, 2000; ZAITSU *et al.*, 2008). Como é o caso das esterases, classe de enzimas que favorece a hidrólise de substâncias químicas em geral, de grande relevância no processo de degradação em amostras de sangue *post mortem*, uma vez que continuam ativas após a morte e após a coleta (ALLAN; ROBERTS, 2008; KISZKA, 2000; TOENNES; KAUERT, 2001). Além disso, a presença microbiana, em decorrência da putrefação, acelera o processo de degradação dos analitos, já que induz alteração de pH do meio, além de induzir autólise causando extravasamento do conteúdo intracelular, rico em enzimas, contribuindo ainda mais para a instabilidade dos compostos químicos presentes na matriz analisada (SKOPP, 2004; DRUMMER, 2004).

Nesse contexto, alguns autores estudaram a influência de diversos fatores que promoveriam aumento de estabilidade de diversos toxicantes em amostras biológicas *post mortem*. Sugestões para aumento de estabilidade versam a respeito da inibição enzimática, alteração do pH do meio, diminuição da temperatura de acondicionamento, adição de compostos estabilizantes, como anticoagulantes e outros agentes conservantes, dentre outras estratégias. Porém, no cenário forense tais intervenções devem ser selecionadas com cuidado, tendo-se em mente que a composição da amostra deve ser conservada, para garantir a obtenção de resultados inequívocos, devido à importância judicial desse contexto.

Assim, no cenário forense, uma das principais estratégias para conservação de amostras *post mortem* sugeridas é a adição de agentes conservantes, como o fluoreto de sódio (NaF), que atua como inibidor de diversas enzimas envolvidas no metabolismo de grande variedade de substâncias químicas. O NaF atua inibindo diretamente a conversão química de toxicantes, como a cocaína, mas também atua inibindo enzimas essenciais do metabolismo bacteriano, fato de interesse forense, porque, dessa forma, o NaF retarda os processos putrefativos (ISENSCHMID *et al.*, 1989; LUSTHOF; BOSMAN, 2011; KERRIGAN, 2011). Por ser de interesse do presente trabalho, os mecanismos de ação do NaF sobre a degradação da cocaína e dos benzodiazepínicos serão discutidos nos capítulos de cada substância, especificamente.

Outras estratégias sugeridas, como a alteração do pH do meio e adição de outras substâncias conservantes devem ser descartadas em laboratórios forenses, uma vez que as amostras analisadas nesses laboratórios podem apresentar grande variedade de substâncias com diferentes reatividades e podem ser alteradas quimicamente se tais estratégias forem adotadas. Por outro lado, a diminuição da temperatura e a diminuição da disponibilidade de água no meio demonstram impacto bastante positivo no ganho em estabilidade de diferentes compostos, sem que, para isso, alterem a composição química das amostras (SKOPP, 2004; DRUMMER, 2004). Dentre essas estratégias mencionadas, aquelas que apresentam maior interesse ao presente trabalho serão discutidas posteriormente, em capítulos em que se considera mais adequados.

Em síntese, fatores intrínsecos à estrutura molecular dos compostos e fatores relacionados à matriz convergem no sentido de alterar o perfil de estabilidade química dos compostos. Assim, ao selecionar as estratégias para aumento de estabilidade e ao analisar dados quantitativos em matrizes biológicas, em especial quando se trata de matrizes *post mortem*, os fatores mencionados devem ser considerados, a fim de se evitar conclusões equivocadas, subestimando ou superestimando os efeitos de substâncias a que o indivíduo encontrava-se no momento da morte.

1.5.3. Perfil de estabilidade da cocaína e seus produtos de biotransformação

Estudos demonstram que a principal via de transformação da cocaína *in vitro* ocorre através de sua conversão à EME pela ação catalítica da butilcolinesterase, assim como *in vivo*, devido à presença dessa classe de enzimas no plasma. Assim, apenas uma pequena quantidade de cocaína é convertida à BZE em amostras de sangue acondicionadas em longos períodos de tempo e, nesse caso, ou seja, *in vitro*, a conversão de cocaína à BZE ocorre somente através hidrólise química espontânea. Por outro lado, em amostras de sangue adicionadas de inibidores de esterases, observa-se favorecimento da conversão de cocaína à BZE, devido à inibição da rota de formação da EME (BROWNE *et al.*; 1998; WARNER; NORMAN, 1999; ISENSCHMID, 2010; KISZKA *et al.*; 2000; SCHINDLER; GOLDBERG, 2012).

Os mecanismos de degradação da BZE e EME não são muito bem estabelecidos, contudo, é conhecido o fato de ambas serem convertidas a ecgonina, em que o grupo benzoil éster da BZE é metabolizado por hidrólise enzimática, através da butilcolinesterase, e o grupo metil éster da EME é metabolizado por hidrólise química. (BROWNE *et al.*; 1998; ISENSCHMID, 2010).

Conforme mencionado anteriormente, esses processos de degradação não ocorrem apenas em organismos vivos, podendo permanecer ativos mesmo após a morte e após a coleta da amostra, e, assim, continuam o processo de degradação e transformação das substâncias *in vitro*. Porém, existem diversas estratégias que visam minimizar esses processos de degradação, a fim de aumentar a estabilidade dos analitos, como, por exemplo, a adição de conservantes além de controles de pH e de temperatura.

Nesse sentido, existem diversos tipos de conservantes que podem ser utilizados para promover a estabilidade de analitos. No tocante ao aumento de estabilidade da cocaína, ganham importância o fluoreto de sódio (NaF) e compostos organofosforados, ambos agentes inibidores enzimáticos não-específicos das esterases (ISENSCHMID *et al.*, 1989; LUSTHOF; BOSMAN, 2011). Estudos demonstram a relevância da adição de NaF para o aumento de estabilidade da cocaína, mesmo sem aplicar qualquer outra estratégia para isso, como, por exemplo, ajuste de pH ou refrigeração. Porém, quando tais estratégias são utilizadas simultaneamente o ganho em estabilidade é consideravelmente maior. A Figura 15 ilustra a inibição enzimática promovida pelo NaF sobre o metabolismo da cocaína e seus metabólitos (ISENSCHMID *et al.*, 1989).

Figura 15: Inibição enzimática promovida pelo NaF.

Porém, existem inibidores de esterases mais eficientes que o NaF, como os compostos da classe dos organofosforados. Isso porque a inibição através de NaF pode ser reversível. Apesar disso, ainda é preferível o uso do NaF, devido à provável interferência sobre a análise de praguicidas que possam estar presentes nas amostras analisadas, comum na rotina de laboratórios de análise forense, além do risco elevado de exposição ocupacional a organofosforados (ISENSCHMID *et al.*, 1989).

Ainda assim, apesar das vantagens aqui mencionadas oriundas da adição de NaF, sua ação é limitada, uma vez que atua apenas sobre as esterases, não sendo capaz de inibir a hidrólise química, espontânea em pH fisiológico e alcalino, não impedindo, portanto, a conversão da cocaína a BZE, sendo necessário adotar estratégias adicionais para inibir essa via metabólica (KERRIGAN, 2011).

Dessa forma, o pH da solução é fator importante a ser considerado, principalmente quando se trata de análise de amostra de sangue *post mortem*. Isso porque foi demonstrado que, em amostras cujo pH diminuiu com o tempo, houve considerável aumento da estabilidade da cocaína. Ou seja, amostras de sangue *post mortem* que apresentam pH reduzido favorecem o aumento de estabilidade da cocaína (ISENSCHMID *et al.*, 1989). Isso pode ser explicado pelo fato de que as ligações ésteres, presentes na estrutura da cocaína, apresentam instabilidade em meios alcalinos, fazendo com que a redução do pH do meio iniba a transformação química da cocaína em BE, aumentando, portanto, sua estabilidade (KERRIGAN, 2011). Além disso, estudos demonstram que a adição de agentes conservantes associado à diminuição do pH do meio garante aumento ainda maior da estabilidade da cocaína quando comparado à influência de cada um desses fatores isoladamente (ISENSCHMID *et al.*, 1989; KISZKA *et al.*, 2001).

Apesar de ser conhecido o impacto positivo da redução do pH sobre a estabilidade da cocaína, no contexto forense, o ajuste de pH em amostras analisadas rotineiramente é desaconselhado, uma vez que outros analitos, instáveis em meio ácido, podem estar presentes e sua degradação pode levar a resultados equivocados, com risco elevado de haver falsos negativos para essas outras substâncias possivelmente presentes (KERRIGAN, 2011).

Assim, a fim de melhorar a estabilidade de compostos como a cocaína e seus metabólitos, diversos autores sugerem o acondicionamento das amostras sob refrigeração, demonstrando o impacto positivo desse tipo de intervenção sobre a estabilidade. Além disso, o manejo da temperatura das amostras não interfere em sua composição, mostrando que tal estratégia é a mais adequada para armazenamento de amostras no contexto forense (ISENSCHMID *et al.*, 1989; KISZKA *et al.*, 2001).

Portanto, em virtude dos fatos experimentais aqui expostos, o presente trabalho buscou estudar a estabilidade da cocaína e alguns de seu metabólitos em amostras de sangue *post mortem* adicionadas de NaF, comparando as diferenças de perfis de estabilidade entre amostras incubadas sob diferentes temperaturas. Outra estratégia para tentar promover aumento de estabilidade desses compostos foi a aplicação das amostras em papel para diminuir a quantidade de água disponível, porém tal estratégia será discutida em tópico à parte, por ser o principal escopo deste trabalho. Assim, não foram levadas em consideração outras estratégias também sugeridas na literatura para aumento de estabilidade.

1.5.4. Perfil de estabilidade dos benzodiazepínicos estudados

1.5.4.1. Diazepam

O diazepam sofre o processo de transformação química *in vitro* típico dos demais benzodiazepínicos, que ficou descrito acima, ou seja, é altamente suscetível à hidrólise pela abertura do anel diazepina, tanto em meios ácidos quanto em meios alcalinos (CABRERA; DE WAISBAUM; NUDELMAN, 2005; ALFAZIL, 2009). Em virtude disso, tem sido demonstrado que há ganho em estabilidade quando amostras de sangue são acondicionadas sob refrigeração (-4°C e -20°C) e quando adicionadas de NaF (ATANASOV *et al.*, 2012).

Estudos demonstram, também, que o diazepam além de sofrer hidrólise, devido à presença da ligação amida, sofre também fotodegradação, principalmente, quando da exposição à luz solar. O esquema de fotodegradação do diazepam segue ilustrado na Figura 16 (WEST; ROLAND, 2012; CABRERA; DE WAISBAUM; NUDELMAN, 2005; ALFAZIL, 2009).

Figura 16: Perfil de fotodegradação do diazepam (adaptado de WEST; ROLAND, 2012).

1.5.4.2. Alprazolam

Ao contrário de outros fármacos benzodiazepínicos, a conversão por hidrólise do alprazolam é pouco favorecida, tendo sido demonstrado que esse tipo de conversão ocorre, porém, de maneira reversível. Isso se dá pelo fato de que o alprazolam não apresenta grupamento éster ou amida acrescida da proteção contra a abertura do anel de sete membros oferecida pelo anel triazol. Além disso, as principais enzimas envolvidas no metabolismo do alprazolam estão presentes, principalmente, no fígado e, em pequena proporção em outros tecidos como cérebro, intestino e pulmão e, portanto, não estão presentes em sangue, sugerindo que este fármaco apresente elevada estabilidade em amostras de sangue (ALFAZIL, 2009; KOSKI, 2005; CABRERA; DE WAISBAUM; NUDELMAN, 2005).

Porém, estudos demonstram a suscetibilidade do alprazolam a outros mecanismos de degradação, como a fotodegradação, por exemplo. A fotodegradação é um processo de transformação química influenciada por diversos fatores, dentre eles a fonte de radiação e fatores relacionados ao meio onde o composto se encontra, como o pH da solução, favorecendo esse tipo de conversão em meios ácidos (TRAWIŃSKI; SKIBIŃSKI, 2017; CABRERA; DE WAISBAUM; NUDELMAN, 2005). Dessa forma, infere-se que o ambiente aquoso favoreça a fotoconversão do alprazolam. Assim, a observação da estabilidade do alprazolam em amostras de sangue pode demonstrar a extensão e a importância desse mecanismo de degradação sobre sua estrutura, já que a hidrólise apresenta pequena relevância nesse cenário para este fármaco.

(ALFAZIL, 2009; KOSKI, 2005; TANIGUCHI; GUENGERICH [20-?]; CABRERA; DE WAISBAUM; NUDELMAN, 2005).

1.5.5. Aspecto técnicos em estudo de estabilidade

Por serem afetados por diversos fatores, ensaios de estabilidade devem ser planejados e conduzidos a fim de abrangerem as condições sob as quais as amostras a serem analisadas serão submetidas (SWGTOX, 2013). Os estudos de estabilidade devem ser realizados de forma que possibilitem avaliar o perfil de estabilidade das substâncias analisadas a longo prazo na matriz de interesse, bem como avaliar a estabilidade em diferentes temperaturas. Sendo importante salientar que o entendimento do processo de degradação sob uma das condições estudadas não permite, necessariamente, inferir qual seria o perfil de degradação da substância, quando submetida a outras condições (KERRIGAN, 2011).

Segundo o SWGTOX, para realização de estudos de estabilidade, deve-se inicialmente preparar amostras suficientes para serem analisadas em triplicata durante todo o período de estudo. Assim, em cada dia de ensaio, as amostras deverão ser analisadas em triplicata para determinação de sua concentração média, através do uso da curva analítica e da adição de padrão interno. Além do fato de que todo estudo de estabilidade deve incluir amostras preparadas a partir da adição, em baixa e alta concentração, de padrões analíticos das substâncias estudadas na matriz utilizada no método (SWGTOX, 2013).

No primeiro dia de estudo, ou seja, no dia da incubação das amostras para todo o estudo (T₀), as amostras serão analisadas em triplicata a fim de se obter a média de concentrações inicial. Essa concentração inicial será utilizada como parâmetro de comparação para os demais ensaios de estabilidade, os quais ocorrerão em dias pré-determinados (T_x) e cujos intervalos serão selecionados de acordo com os objetivos do trabalho. O analito será considerado estável se a diminuição da concentração obtida no dia de análise (T_x) em relação ao dia de incubação (T₀) estiver dentro dos limites de variação aceitáveis de precisão e exatidão do método.

1.6. Dried Blood Spot (DBS)

1.6.1. Histórico

Dr. Robert Guthrie, médico e bacteriologista, considerado o pai da triagem neonatal, teve um trajetória científica bastante peculiar, iniciada no interesse pelas causas da doença de seu filho, que apresentava problemas de desenvolvimento mental. Esse interesse o levou a conhecer a fenilcetonúria, uma desordem metabólica responsável por milhares de casos de pacientes com problemas no desenvolvimento intelectual, em decorrência do acúmulo de fenilalanina, cujo diagnóstico baseava-se em exames caros e complicados. Os problemas na análise diagnóstica da doença levaram o Dr. Guthrie a se interessar em desenvolver um método de detecção mais simples, utilizando técnicas já estudadas em seu laboratório de pesquisa em leucemia infantil. Com isso, passou a aplicar amostras de soro de sangue dos pacientes em discos de papel de filtro os quais eram incubados em placa de ágar, como meio de cultura de bactérias responsivas à presença de fenilalanina. Posteriormente, utilizou amostras de sangue total para realização do teste, fazendo surgir a ideia de coletar sangue de pacientes através da simples punção de seu calcanhar, deixando gotejar o sangue em papel dedicado, surgindo o teste de triagem neonatal da forma como conhecemos atualmente. O primeiro Estado a impor a obrigatoriedade legal de submeter neonatos ao exame foi o Estado de Massachusetts, nos EUA, em 1963, ano considerado um marco para a história do programa de triagem neonatal. Depois, outros grupos de pesquisadores passaram a estudar a inclusão de testes para outras doenças metabólicas no programa, utilizando esta técnica de amostragem (APHL, 2013).

Com o desenvolvimento do programa de triagem neonatal, as exigências técnicas foram aumentando, e com o intuito de aprimorá-lo, passou-se a objetivar a redução da ocorrência de distúrbios não diagnosticados (falsos-negativos), bem como a redução da taxa de falsos-positivos, com a finalidade de melhorar a qualidade de vida dos pacientes submetidos a esses exames e de suas famílias. Em decorrência de tais objetivos, o programa exige, atualmente, o emprego de técnicas diagnósticas com alta sensibilidade e seletividade (FDA, 2016).

Esse nível de refinamento analítico alcançado pelos exames de triagem fez com que diversos pesquisadores se interessassem pela amostragem de espécimes biológica em papel, passando a aplicá-la em suas áreas de atuação, valendo-se dos conhecimentos adquiridos ao longo dos anos de experiência com a triagem neonatal (HENION; OLIVEIRA; CHACE, 2013; STOVE *et al.*, 2012).

1.6.2. Caracterização da técnica

A técnica de DBS consiste em coletar pequenos volumes de sangue total, ou outras matrizes biológicas líquidas, e aplicá-las em filtro de papel adequado, do qual, após secar ao ar, uma pequena parte será recortada e submetida à extração para obtenção da substância de interesse, com propósito analítico. Por utilizar pequenos volumes de amostra, na faixa de microlitros, é denominada como técnica de “microamostragem” (NIROGI *et al.*, 2012; HENION; OLIVEIRA; CHACE, 2013). A Figura 17 ilustra uma possibilidade de aplicação da técnica.

Figura 17: Coleta de DBS, estoque e manipulação. Legenda: A: Coleta de amostra de DBS a partir da punção do dedo; B: Armazenamento adequado do DBS; C: Coleta de amostra a partir do DBS, através de perfuração do cartão; D: DBS em processo de secagem sob condições laboratoriais; E: DBS em processo de secagem em campo (adaptado de SCHIFFER *et al.*, 2012).

Atualmente, o DBS vêm sendo empregado em estudos pré-clínicos (fase I-IV) e ensaios de bioequivalência (MESS *et al.*, 2012; STOVE *et al.*, 2012), podendo ser facilmente aplicado em estudos epidemiológicos que abranjam um grande número de pessoas que não estejam, necessariamente, próximas de centros de pesquisa (WAGNER *et al.*, 2014; STOVE *et al.*, 2012). Isso decorre das diversas vantagens apresentadas por essa técnica já mencionadas na literatura, como, por exemplo, a facilidade no processo de amostragem, armazenamento e transporte. Além disso, vêm sendo sugerido um aumento da estabilidade de alguns analitos em amostras coletadas em DBS em relação a amostras congeladas (WILHELM; den BURGER; SWART, 2014). Todas essas vantagens seguem abaixo discutidas e, por ser de maior interesse

ao presente estudo, aspectos relacionados ao aumento de estabilidade de compostos em DBS serão discutidos em capítulo à parte.

A facilidade na obtenção da amostra reside no fato de que, no DBS, o sangue é coletado através de uma simples punção, que pode ser realizada pelo próprio paciente descartando a necessidade de um profissional treinado. Já na amostragem clássica de sangue total, a coleta se dá através da punção venosa, realizada obrigatoriamente por profissionais da área. Por não exigir punção venosa, a técnica de DBS é consideravelmente menos invasiva que a técnica convencional, proporcionando maior conforto ao paciente (WILHELM; den BURGER; SWART, 2014).

As vantagens logísticas atribuídas ao DBS relacionam-se ao tamanho reduzido das amostras, o que diminui o custo com transporte e armazenamento, além de facilitá-los, por ocuparem espaços menores, quando comparados a amostras de sangue coletadas em tubos convencionais (HENION; OLIVEIRA; CHACE, 2013). Além disso, vêm sendo demonstrado que o processo de secagem a que essas amostras são submetidas leva à inativação de patógenos, reduzindo, significativamente, a exposição e risco de contágio por doenças infecciosas das pessoas envolvidas na manipulação desse tipo de amostra e, por isso, podem ser, até mesmo, enviadas através do sistema de postagem comum (WILHELM *et al.*, 2014; MESS *et al.*, 2012; HENION; OLIVEIRA; CHACE, 2013).

Adicionalmente, a possibilidade de coleta de volumes sanguíneos reduzidos é particularmente interessante quando o volume de sangue a ser coletado é limitado (WAGNER *et al.*, 2014; WILHELM *et al.*, 2014). Como, por exemplo, coleta de amostras em neonatos prematuros, pelo fato de apresentarem quadro clínico complexo, exigindo maior volume sanguíneo para acompanhamento especializado, a despeito do baixo volume sanguíneo disponível. Outro aspecto importante na redução do volume sanguíneo coletado, e que relaciona redução de custos e ética em pesquisa, diz respeito ao uso de animais em laboratórios de pesquisa em farmacocinética, em que apenas 1 mL de sangue coletado de ratos, por exemplo, implica sacrifício do animal. Entretanto, quando se reduz o volume sanguíneo necessário para análise, não haverá necessidade de sacrificar o animal que poderá ser reutilizado em outros estudos, reduzindo custos e aumentando o conforto dos animais (HENION; OLIVEIRA; CHACE, 2013).

Além das vantagens relacionadas a aspectos éticos e logísticos aqui apresentadas, essa técnica de microamostragem em papel vem sendo utilizada na aplicação de outras matrizes alternativas ao sangue total e os resultados obtidos demonstram boa correlação entre as amostras aplicadas no papel e a matriz tradicional, não aplicada no papel, como no uso de

plasma (HAGAN *et al.*, 2013; AABAYE *et al.*, 2013; RODRIGUEZ-AUAD *et al.*, 2015; KOLOCOURI *et al.*, 2010; BRAMBILLA *et al.*, 2003; PARRA *et al.*, 2016), saliva (ABDEL-REHIM, A.; ABDEL-REHIM, M., 2014; ISHIKAWA *et al.*, 1996) e urina (RELLO *et al.*, 2012; ANTUNES *et al.*, 2013).

Porém, por ser de interesse para o presente trabalho, serão aqui estudados os aspectos relacionados à amostragem de sangue total em papel.

1.6.3. DBS: papel de filtro e suas propriedades

O conhecimento das características da composição dos cartões de DBS é de grande importância uma vez que elas podem influenciar no comportamento da amostra quando depositada no papel. Além disso, o conhecimento de tais propriedades oferece ao analista poder de manipulação da composição do cartão, o que permite adicionar propriedades de interesse para a rotina analítica. Os cartões de DBS são filtros de papel, uma vez que são barreiras semi-permeáveis, cuja finalidade é agir como um suporte absorvente. As características desejáveis desses cartões baseiam-se na compatibilidade entre o material de que é composto e a amostra a ser aplicada, a fim de que as características inerentes de ambos não sejam alteradas. Sendo assim, é essencial que o cartão se mantenha íntegro após a aplicação da amostra e, por isso, as fibras do cartão devem ter a capacidade de se manterem unidas mesmo após o contato com amostras líquidas. Além disso, também é fundamental que haja compatibilidade química entre os materiais, a fim de que o papel não reaja com os analitos alterando a composição das amostras (HENION; OLIVEIRA; CHACE, 2013).

Atualmente, existem diversos tipos de papéis utilizados em DBS, os quais podem ser divididos em duas classes: papéis não tratados e os quimicamente tratados. Os papéis não tratados quimicamente são compostos, predominantemente, por celulose (WAGNER *et al.*, 2014). Para este tipo de cartão alguns mecanismos já foram propostos para explicar a interação entre o suporte (celulose) e o sangue e seus componentes, como biopolímeros (DNA, proteína), pequenas moléculas (metabólitos) e eletrólitos. Henion, Oliveira e Chace (2013) propuseram dois mecanismos em que diferenciam a interação da celulose com pequenas ou grandes moléculas. A Figura 18 ilustra a interação entre a celulose, a água e pequenas moléculas.

Figura 18: Natureza química dos polímeros de celulose e sua interação com a água e pequenas moléculas (adaptado de HENION; OLIVEIRA; CHACE, 2013).

Na Figura 18, a região superior esquerda sugere uma ilustração da organização molecular das fibras de celulose em um cartão de DBS antes da aplicação da amostra, em que as fibras mantêm-se unidas por ligações de hidrogênio. Quando a amostra é aplicada, a água presente rompe as ligações de hidrogênio das fibras e passam a fazer novas ligações de hidrogênio, como ilustra a região superior direita da figura. Segundo o mecanismo proposto, a presença de pequenos analitos interage de maneira semelhante às moléculas de água, e o fazem simultaneamente. A presença dessas novas moléculas faz com que as fibras se mantenham ligeiramente afastadas, porém, após a secagem, a perda das moléculas de água permite nova aproximação das fibras de celulose, estabilizando os analitos na matriz, entre as fibras. Já para moléculas grandes, o mecanismo proposto sugere que as moléculas não fazem ligações intermoleculares, mas se alojam nos espaços existentes entre as fibras de celulose, como ilustra a Figura 19.

Na região superior da Figura 19, encontra-se uma representação da estrutura das fibras de celulose, em que A seria a visualização aproximada da organização dessas fibras, B seria a visualização da disposição de várias fibras de celulose e, C, a visualização macroestrutural de como as fibras estariam dispostas, em que a aleatoriedade permite a formação de diversos vãos e poros. Na região abaixo, os retângulos representam a disposição das fibras de celulose e as formas arroxeadas são as macromoléculas; em D e E, as setas indicam as possibilidades de espalhamento do material líquido e seus componentes, ou seja, indica a dispersão do sangue,

água e macromoléculas entre as fibras de celulose. D representa a dispersão em papel cujas fibras encontram-se mais espalhadas que em E, e, por isso, a dispersão em D é maior. F representa como se encontram aprisionadas as macromoléculas entre as fibras de celulose após o processo de secagem (HENION; OLIVEIRA; CHACE, 2013).

Figura 19: Natureza da porosidade das fibras do papel de filtro e macromoléculas e/ou componentes celulares. Legenda: A e B: organização de fibras de celulose; C: visualização macroscópica da disposição das fibras de celulose; D: dispersão de sangue, água e macromoléculas entre as fibras de papel; E: dispersão de sangue, água e macromoléculas entre fibras de papel mais aproximadas; F: macromoléculas aprisionadas entre as fibras de celulose após o processo de secagem (adaptado de HENION; OLIVEIRA; CHACE, 2013).

Já os papéis quimicamente tratados são impregnados com substâncias capazes de alterar as propriedades da amostra, de tal forma a proporcionar vantagens analíticas, como aumentar a estabilidade da substância de interesse, aumentar sua recuperação ou diminuir a exposição ocupacional a doenças infecciosas, através da lise celular, inativação de patógenos, denaturação de enzimas e outras proteínas. Muitos desses papéis estão disponíveis comercialmente, porém, alternativamente, papéis não tratados podem ser impregnados por imersão em solução contendo o agente químico de interesse e submetidos à secagem antes do uso (WAGNER *et al.*, 2014).

1.6.4. Problemas Quantitativos Relacionados ao DBS

1.6.4.1. Homogeneidade da Amostra em DBS

A experiência com a técnica de DBS adquirida ao longo dos anos em que ela vem sendo utilizada, mostrou a existência de diversos aspectos quantitativos, cujos conceitos devem ser discutidos, uma vez que são parâmetros especificamente relacionados a esta técnica, e que podem repercutir nos resultados obtidos durante o trabalho.

Assim, o primeiro e mais relevante aspecto quantitativo relativo à amostragem por DBS é a homogeneidade. Nesta técnica, apenas parte da amostra é analisada, uma vez que após a secagem da amostra aplicada no papel, um pequeno disco será recortado e submetido à extração e análise. Dessa forma, é fundamental conhecer a representatividade da amostra obtida (disco recortado) em relação ao total (mancha de sangue total ou DBS total), já que a ausência de homogeneidade fará com que amostras obtidas em diferentes partes do disco apresentem diferentes resultados, podendo impactar negativamente nos resultados quantitativos de precisão e exatidão obtidos (WAGNER *et al.*, 2014; COBB *et al.*, 2013).

Para avaliar a homogeneidade da distribuição da amostra líquida no papel, a Figura 20 oferece uma representação de como o sangue aplicado penetra o papel, mostrando como seria sua distribuição vertical e horizontal. Na Figura 20, é possível observar que o sangue pode não penetrar totalmente o papel, principalmente ao longo do eixo horizontal. Sendo assim, a análise de amostras retiradas da região central da mancha de sangue apresentará resultados diferentes se comparados aos resultados obtidos da análise de amostras coletadas da periferia da mancha. Desta maneira, fica demonstrado que, devido à ausência de homogeneidade da distribuição de sangue pelo papel, é de extrema importância a escolha da região do DBS para o recorte da amostra a ser extraída (HENION; OLIVEIRA; CHACE, 2013).

Assim como é de fundamental importância verificar a homogeneidade do DBS, os fatores que a influenciam também devem ser considerados, uma vez que, o conhecimento das causas da ausência de homogeneidade pode ser utilizado como estratégia para contorná-las, e assim indicar, por exemplo, que tipo de cartão será utilizado, além do tamanho e localização do disco que será recortado a partir do DBS total (TIMMERMAN *et al.*, 2013).

Figura 20: Relação entre a microamostragem de sangue líquido e DBS (adaptado de HENION; OLIVEIRA; CHACE, 2013).

Nesse contexto, o Fórum Europeu de Bioanálises (EBF, do inglês *European Bioanalysis Forum*) conduziu um estudo colaborativo para avaliar os diversos aspectos quantitativos relacionados ao DBS, introduzindo diversas variáveis para avaliar sua influência na formação do DBS. Dessa forma, o grupo pôde concluir que a ausência de homogeneidade em amostras de DBS é, certamente, afetada por fatores, como o tipo de cartão de DBS utilizado e valor de hematócrito da amostra de sangue aplicada, além de outros fatores não mencionados (COBB *et al.*, 2013). Cada um desses fatores será discutido a seguir.

1.6.4.2. Efeito cromatográfico

Um dos fatores atribuídos ao papel utilizado como suporte em DBS, dito papel-substrato, que acarreta ausência de homogeneidade de amostras de DBS, é o efeito cromatográfico, que se trata de uma diferença de mobilidade entre componentes celulares e compostos químicos através do papel gerando diferentes concentrações do analito no centro e na periferia da amostra (COBB *et al.*, 2013).

De maneira geral, a falta de homogeneidade se mostra em uma distribuição do analito na forma de um vulcão (“efeito vulcão”) em que as concentrações mais baixas do composto estão no centro da mancha e as maiores na periferia da mancha. Nesse sentido, Ren e colaboradores (2010) avaliaram o “efeito vulcão” utilizando autoradiografia, que mede a concentração de compostos radioativos através da intensidade de luminescência-fóton

estimulada/mm². Assim, compostos marcados com isótopos de ¹⁴C foram utilizados para avaliar a distribuição de analitos no papel. Diferentes tipos de cartões foram utilizados e, para todos eles, foi observado que a intensidade de luminescência-fóton estimulada/mm² dos compostos era menor no centro que na periferia, sugerindo que as concentrações do composto radioativo no papel obedecia ao padrão de distribuição em “vulcão”. Nesse estudo, quatro diferentes substâncias foram utilizadas e, para todas elas, observou-se esse mesmo padrão de distribuição. A Figura 21 ilustra os resultados obtidos. Nela, é possível observar que o “efeito vulcão” é mais pronunciado em alguns casos que em outros. Nota-se na figura, bem como mencionam os autores do estudo, que o efeito mais pronunciado se dá nos cartões de DBS tratados (do tipo FTA e FTA elute).

Figura 21: Efeito cromatográfico: distribuição de radioatividade em DBS obtida por aplicação de sangue adicionado de compostos marcados com isótopos de ¹⁴C em cinco diferentes papéis de DBS. Fileira superior: DBS; fileira central: autoradiogramas e fileira inferior: concentração de radioatividade, expressada em luminescência-fóton estimulada/mm² através do diâmetro da mancha de sangue (adaptado de REN *et al.*, 2010).

A aplicação de compostos radioativos para avaliar a homogeneidade da amostra de DBS já foi mencionada algumas vezes na literatura (CLARK *et al.*, 2010; REN *et al.*, 2010; COBB *et al.*, 2013). Outra metodologia comum reportada é a avaliação através da análise de amostras obtidas a partir de diferentes pontos do DBS (WAGNER *et al.*, 2014). Nesta abordagem analítica, é possível visualizar claramente o impacto do efeito cromatográfico sobre desvios quantitativos.

A EBF (COBB *et al.*, 2013) conduziu um experimento para avaliar a diferença na concentração do analito quando diferentes regiões do DBS são analisadas. Dessa forma, amostras de sangue foram adicionadas de um ou mais compostos e aplicadas no papel. Após a secagem, foram obtidas amostras do centro e da periferia da mancha. Nesse estudo avaliou-se também a influência do efeito do hematócrito sobre a homogeneidade do DBS, porém a influência desse fator será discutido em tópico a parte. O estudo concluiu que, na maioria dos casos, para os tipos de cartões estudados, a concentração do analito encontrada era maior na periferia da mancha que no centro, corroborando os achados científicos anteriormente mencionados. Concluiu-se também que, apesar da natureza do composto e o nível do hematócrito serem fatores que impactam na homogeneidade da amostra, o fator preponderante, nesse aspecto, é o tipo de cartão utilizado (COBB *et al.*, 2013).

Stickle e colaboradores (2008), a fim de analisar o efeito cromatográfico e sua influência na partição de componentes celulares, mediram a concentração de chumbo em diferentes pontos de amostras de DBS. O chumbo foi utilizado, pois, devido a sua conhecida ligação à hemoglobina, tende a concentrar-se no interior de hemácias. Para a realização do estudo, o grupo preparou uma solução, representativa da composição sanguínea, que era, então, aplicada em pequenos volumes sequenciais, na tentativa, de simular o fluxo sanguíneo quando aplicado no papel. Dessa forma, o grupo pôde confirmar achados científicos prévios, que demonstravam a maior concentração de hemácias nas periferias da mancha. Com base nesses estudos, propuseram que a aplicação sequencial de sangue em filtro de papel particiona componentes plasmáticos e celulares do sangue total devido à exclusão por tamanho dos componentes sólidos do sangue pelas fibras da matriz do papel, promovida pela aplicação de sangue líquido sobre o sangue já seco. Assim, a fração inicialmente líquida é adsorvida pelo papel e, quando novo volume líquido é adicionado, os compostos sólidos, que já estavam depositados no papel, são eluídos para áreas periféricas da mancha, enquanto a fração líquida que já estava seca fica aprisionada entre as fibras do papel. Concluíram, assim, que a partição de líquidos em volumes móveis e imóveis faz com que o volume móvel inicial se torne imediatamente concentrado em sólidos, o qual move-se em direção a regiões secas do papel.

Por outro lado, Lenk e colegas (2015) consideram o modelo de exclusão cromatográfica uma simplificação que não reflete a rotina real de coleta de amostras, em que o sangue pode ser gotejado diretamente no papel, sem o auxílio de micropipetas, por exemplo, como no caso de aplicações clínicas (LENK *et al.*, 2015). Além disso, o modelo de exclusão cromatográfica proposto considera apenas o fluxo sanguíneo durante a aplicação da amostra e não considera fenômenos que possam ocorrer devido ao processo de secagem a que a amostra é submetida

(WAGNER *et al.*, 2014). Assim, em contraposição, propõem um modelo denominado “efeito da mancha de café”. O modelo sugere que o fluxo de evaporação se inicia na periferia da gota, enquanto esta se desloca para a periferia do papel. A periferia da gota, em processo de secagem, é reabastecida pelo líquido interno da gota. Neste processo, o líquido arrasta material particulado componente da amostra e, assim, esse fluxo gera maior concentração de compostos particulados, incluindo células, na região externa da mancha. As Figuras 22 e 23 ilustram a formação de diferentes regiões na mancha, que ficam então classificadas como centro e periferia.

Figura 22: Fotografias tiradas em diferentes tempos de secagem de 10 µl de sangue humano aplicado em papel sintético. A abertura de poros no centro é causada pela evaporação de água na periferia, que é reabastecido pelo sangue do centro. A intensidade da cor na periferia aumenta ao longo do tempo e é causado pelo aumento de células vermelhas na periferia. Após a secagem completa, um anel escuro permanece na periferia da mancha, demonstrando a formação da mancha de café do sangue quando aplicado em substrato poroso (adaptado de LENK *et al.*, 2015).

Figura 23: O efeito da secagem do DBS em diferentes períodos de tempo e o perfil de intensidade correspondente extraído da fotografia. Inicialmente a distribuição homogênea torna-se não homogênea durante a secagem com maior intensidade de cor na periferia que no centro. No final a diferença crescente na intensidade da cor aparece por causa da redução do oxigênio presente na hemoglobina. A distribuição não homogênea permanece, demonstrando a redistribuição de células sanguíneas vermelhas durante o processo de secagem (adaptado de LENK *et al.*, 2015).

Contudo, técnicas alternativas de extração têm sido sugeridas que podem sobrepujar este problema, como por exemplo, sugere-se que as amostras, a serem extraídas, sejam sempre cortadas na mesma posição nas diferentes manchas de sangue, para análise de um mesmo composto a partir de diferentes amostras de DBS. Porém, com isso haverá a necessidade de se criar procedimentos para garantir que de fato as amostras sejam sempre obtidas na mesma posição (COBB *et al.*, 2013). Além disso, essa estratégia possibilita contornar apenas problemas

relacionados ao efeito cromatográfico e não aborda outros problemas relacionados à homogeneidade da amostra de DBS. Outra alternativa que vem sendo sugerida é a extração de toda a mancha de sangue (DBS total), assegurando que todo analito presente na amostra aplicada ao DBS seja extraído e analisado, conforme será discutido em detalhe (COBB *et al.*, 2013).

Em resumo, a partir dos estudos reportados na literatura e aqui mencionados, é possível dimensionar a importância do efeito cromatográfico sobre a homogeneidade de amostras de DBS. Assim, em consonância com o que foi aqui descrito, devido aos diversos fatores envolvidos, se faz necessária a realização de ensaios que comprovem que problemas de homogeneidade não irão gerar problemas de exatidão nos resultados obtidos, independente das técnicas de preparo e extração da amostra que serão utilizados.

1.6.4.3. Efeito do Volume de Sangue

Na prática clínica, em que não se encontram disponíveis pipetas automáticas para a aplicação de amostras de sangue no papel, não há controle do volume de sangue utilizado nas análises, uma vez que o sangue puncionado é aplicado diretamente no papel. Tal fato irá resultar em imprecisões analíticas, pois se o volume de amostra não é conhecido, não é possível calcular a concentração correta do analito em solução (WAGNER *et al.*, 2014).

Assim, para contornar tais problemas, é recomendada a saturação total do papel com sangue nas etapas de coleta da amostra e em todas as etapas analíticas, incluindo validação, preparo da curva analítica e controles de qualidade. Isso porque estudos demonstram que, uma vez garantida a saturação total do papel, diferentes volumes de sangue aplicados não resultarão em diferentes concentrações do analito (KVASKOFF *et al.*, 2012).

Porém, nos estudos em que todas as etapas são realizadas em laboratório, a aplicação de amostras de sangue no papel é sempre feita através do uso de micropipetas automáticas e, portanto, essas amostras apresentam volumes definidos, fazendo com que esse viés analítico seja eliminado, caso do presente estudo.

1.6.4.4. Efeito do hematócrito

Hematócrito é um parâmetro sanguíneo que se refere à porcentagem, em volume, de hemácias em relação ao volume total de sangue e, por impactar consideravelmente na

viscosidade sanguínea, pode influenciar na forma como o sangue irá dispersar no papel, afetando a homogeneidade da amostra o que pode gerar problemas quantitativos em ensaios bioanalíticos usando DBS (WILHELM; DEN BURGER; SWART, 2014; YOUHNOVSKI, *et al.*, 2011; DE VRIES, *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2012). É conhecida a influência de diversos fatores no valor do hematócrito e, por isso, esse valor varia com a idade, gênero, condições clínicas do paciente, e, até mesmo, com a etnia. A literatura diverge sobre o intervalo de variação do hematócrito, mas, em geral, é reportado que o hematócrito varia de 40% a 50% para homens adultos e de 35% a 45% para mulheres adultas (WAGNER *et al.*, 2014).

Essa variação faz com que, para um valor de diâmetro fixo de disco cortado a partir da mancha total, diferentes volumes de sangue seco sejam extraídos. Isto decorre do fato de que, no caso de reduzidos valores de hematócrito, há diminuição da viscosidade sanguínea, e, por consequência, favorecimento da dispersão do sangue no papel, aumentando a área da mancha, implicando menor quantidade de amostra extraída em relação a amostras de sangue com hematócrito elevado. (WILHELM; DEN BURGER; SWART, 2014; YOUHNOVSKI, *et al.*, 2011; DE VRIES, *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2012; WAGNER *et al.*, 2014). A Figura 24 ilustra o fenômeno.

Figura 24: Perfil do DBS em diferentes níveis de hematócrito (Hct). Legenda: Hct = 0.18 (A); Hct = 0.35 (B); Hct = 0.5 (C). Alíquotas de 50 µl de sangue foram aplicados no papel e submetido à secagem por 4h em condições ambientes de laboratório. A diferença no nível do hematócrito foi simulada através do preparo de diferentes misturas de células sanguíneas vermelhas e soro. Os círculos pré-impressos possuem 13 mm de diâmetro (adaptado de WILHELM; den BURGER; SWART, 2014).

Portanto, conclui-se que o hematócrito tem grande impacto sobre a formação da mancha de sangue, podendo repercutir negativamente em análises quantitativas (TIMMERMAN *et al.*, 2013). Além disso, os demais aspectos técnicos que prejudicam a homogeneidade da amostra de DBS, já mencionados, podem se somar ao efeito do hematócrito, podendo aumentar os desvios analíticos, gerando a necessidade de se criar soluções técnicas para transpor tais dificuldades.

Uma maneira de diminuir o impacto negativo do efeito do hematócrito seria considerar diferentes valores de hematócrito durante a validação do método e durante o preparo das curvas analíticas na rotina de um laboratório (DE VRIES, *et al.*, 2013). Porém, apesar da adoção dessa estratégia diminuir o efeito do hematócrito, não o eliminaria, uma vez que, para isso, idealmente, seria necessário realizar a validação e preparo das curvas no valor exato do hematócrito de cada amostra, solução impraticável. Além disso, essa alternativa seria específica para contornar o efeito do hematócrito, não diminuindo o impacto dos outros fatores que influenciam a homogeneidade da mancha.

Com isso, é possível observar que as soluções para as questões problemáticas em DBS não são abrangentes, impondo a necessidade de que tais alternativas sejam utilizadas em conjunto a fim de minimizar os desvios analíticos observados. Porém, muitos trabalhos vêm utilizando uma estratégia que demonstrou ser menos influenciada pelos efeitos aqui mencionados que é a extração do total do DBS, discutida a seguir.

1.6.4.5. Extração do DBS Total

Conforme mencionado, diversas estratégias já foram relatadas na literatura na tentativa de contornar os problemas técnicos característicos e únicos da técnica de DBS a fim de aumentar a repetibilidade dos resultados. Sendo assim, atualmente, a técnica mais discutida para esse propósito é a extração do DBS total, cuja proposta é extrair todo o volume de sangue aplicado no papel, tornando desnecessária a discussão a respeito do quanto a amostra coletada é representativa do todo. No entanto, nesse procedimento, será necessário garantir que os volumes de sangue a serem aplicados no papel sejam exatos, o que exigirá do laboratório a utilização de pipetas automáticas calibradas, restringindo sua aplicação a laboratórios que disponibilizem esse aparato, não sendo compatível com aplicações clínicas (WAGNER *et al.*, 2014).

Para aplicação dessa estratégia, a maioria dos trabalhos publicados se utiliza de discos previamente cortados a fim de limitar a dispersão do papel às bordas do corte produzido antes

da aplicação da amostra. Salienta-se que, nessa proposta, o volume de sangue utilizado deve ser bastante reduzido em relação ao volume utilizado na técnica convencional de extração de DBS. A razão para isso está em evitar a saturação do papel, garantindo que todo o volume aplicado se restrinja à área cortada previamente. Contudo, a utilização de volumes tão reduzidos gera outras questões técnicas, como, por exemplo, a disponibilidade de pipetas capazes de dispensar precisamente volumes de pequena magnitude, além do fato de haver redução da quantidade de amostra disponível a ser extraída e analisada, podendo acarretar problemas de detectabilidade. Assim, sugere-se que as amostras produzidas dessa maneira sejam submetidas à análise através de técnicas com alta sensibilidade, como a espectrometria de massas, conforme discutido a seguir. (LI *et al.*, 2012; YOUHNOVSKI *et al.*, 2011; WAGNER *et al.*, 2011, WAGNER *et al.*, 2014).

1.6.5. Espectrometria de Massas e DBS

A pequena quantidade de sangue manipulada em análises a partir de DBS é, como já mencionado, uma das maiores vantagens na aplicação dessa técnica de microamostragem, principalmente devido à facilidade de armazenamento e transporte. Por outro lado, o pequeno volume de amostra gera questões problemáticas em termos de detectabilidade e seletividade analítica, exigindo técnicas adequadas para transpor essa dificuldade, o que poderia diminuir a aplicabilidade da técnica de DBS (WAGNER *et al.*, 2014; HENION *et al.*, 2013; WILHELM *et al.*, 2014).

Nesse contexto, a espectrometria de massas (MS, do inglês *Mass Spectrometry*) apresenta características fundamentais no que se refere ao desempenho analítico exigido pela técnica de DBS e, por isso, a associação entre DBS e MS vem se mostrando bastante adequada. Porém, foi apenas a partir dos anos 90 que essa associação começou a ser aplicada de fato, momento que coincide com a popularização da técnica de MS. Isso porque foi nesse período que as fontes de ionização por *electrospray* (ESI) passaram a ser comercializadas. O advento das fontes ESI possibilitou o acoplamento da espectrometria de massas à cromatografia líquida automatizando o processo analítico. Adicionalmente, as fontes ESI ampliaram o espectro de aplicações dos analisadores do tipo quadrupolo (WAGNER *et al.*, 2014).

Os quadrupolos são instrumentos de bancada, tecnicamente mais amigáveis para o analista, além de apresentarem, quando comparados a outros analisadores de massas, baixo custo, manutenção simplificada, alta velocidade de varredura, sensibilidade adequada para

grande quantidade de substâncias, distribuição iônica independente da energia inicial e faixa de massas linear. Todavia, apresentam reduzida faixa de leitura de massas, resolução e exatidão, em relação a outros analisadores de massas, o que poderia limitar seu uso à análise de compostos de pequenas massas. A limitação foi transposta com o advento da fonte ESI, devido à sua capacidade gerar íons de múltiplas cargas, possibilitando que biopolímeros de alta massa molecular fossem analisados através de quadrupolos. Soma-se a isto o fato de que sua compatibilidade com a fonte ESI possibilitou o acoplamento dos quadrupolos às técnicas cromatográficas, eletroforéticas e de indução por chama (DASS, 2007).

Dessa forma, é inegável que o avanço do desenvolvimento das técnicas relativas à fonte de íons e aos analisadores de massas, popularizaram a espectrometria de massas, levando ao crescente interesse em substituir as técnicas analíticas de grande popularidade até então, como as técnicas de imunoensaio e de cromatografia líquida com detecção por UV, que, apesar de seu baixo custo, não são capazes de atender a requisitos de validação bioanalítica, quando se trabalha com baixas concentrações de analito. Assim, atualmente, a espectrometria de massas vem sendo a técnica analítica de eleição em laboratórios que exigem alta detectabilidade e seletividade, como é o caso dos laboratórios que realizam análise de DBS (WAGNER *et al.*, 2014; KEEVIL, 2011).

Por outro lado, a pequena quantidade de amostra disponível, em análise por DBS, se mostra uma vantagem quando se trata de análise por espectrometria de massas com fontes ESI que, por ser uma técnica sujeita a efeito matriz, menores volumes de amostra injetados implicam diminuição dos efeitos de supressão iônica decorrentes da presença de componentes próprios da matriz. Nesse sentido, para análise por espectrometria de massas, seria preferível realizar amostragem por DBS que outras técnicas, pois outras formas de amostragem podem exigir preparos de amostras mais complexos a fim de minimizar o efeito matriz (DÉGLON *et al.*, 2011; KEEVIL, 2011).

Além disso, o uso das duas técnicas em conjunto gera algumas possibilidades de automação, com a substituição da necessidade de extração prévia da amostra pela extração *online*. Uma das possibilidades foi sugerida por Déglon e colegas (2011), em que o grupo criou uma célula de dessorção de DBS compatível com cromatografia líquida. No aparato o cartão de DBS é posicionado de tal forma a permitir a passagem de líquido através da mancha de sangue em direção a um capilar que conduz a amostra ao cromatógrafo. O grupo afirma que o dispositivo é capaz de substituir o processo de extração tradicional, com sensibilidade adequada e redução de efeito matriz. Outros autores afirmam, porém, que é indispensável o estudo da eficiência da dessorção para os analitos de interesse, uma vez que esse tipo de extração pode

diminuir a recuperação do analito, gerando problemas de detectabilidade. Outras formas de automação tem sido reportados na literatura (ZACARIA *et al.*, 2016).

Assim, em virtude das razões mencionadas, é desejável a associação entre a amostragem por DBS e análise por espectrometria de massas, devido à sensibilidade, seletividade e automação adequadas aos propósitos analíticos, e, por isso, a busca por trabalhos científicos relacionados à análise de diferentes tipos de substâncias mostra a grande aplicação dessa associação (KOSTER *et al.*, 2017; PAGE-SHARP *et al.*, 2017; LA MARCA *et al.*, 2012; ROSTING, 2017; FERRONE *et al.*, 2017; DUTHALER *et al.*, 2017; CALCAGNO *et al.*, 2015; GARCIA BOY *et al.*, 2008; JANTOS *et al.*, 2011).

1.6.6. Estabilidade do analito em DBS

O EBF considera escasso o conhecimento que se tem, atualmente, a respeito da estabilidade de amostras em DBS por longos períodos de tempo, sendo aconselhada a realização de estudos acerca do impacto do acondicionamento prolongado de amostras de DBS (TIMMERMAN *et al.*, 2013). Contudo, em alguns trabalhos publicados, vem sendo demonstrado que a estabilidade alcançada com DBS é comparável ou, até, melhor que a estabilidade alcançada com amostras de sangue adicionadas de conservantes ou anticoagulantes (ALFAZIL, 2008; ALFAZIL, 2009). Uma possível explicação para isso decorre da redução da quantidade de água disponível na amostra o que, consequentemente, reduz a ocorrência de reações de hidrólise química e enzimática. De acordo com estudos já abordados no presente trabalho, as reações de hidrólise são as principais responsáveis pela degradação dos fármacos e drogas de abuso. Assim, a diminuição da quantidade de água acarreta maior estabilidade para classes de substâncias suscetíveis a esses mecanismos de degradação, como os benzodiazepínicos e cocaína (ALFAZIL, 2008; D'ARIENZO *et al.*, 2010).

Porém, para alguns analitos, cujas estruturas moleculares são mais suscetíveis à degradação, o DBS não é suficiente para preservar amostras estocadas por períodos de tempo prolongados. Nesses casos, têm sido sugeridas estratégias para aumentar a estabilidade dos compostos, como utilizar papéis para DBS modificados, alteração do pH da amostra, adição de agentes conservantes na amostra, redução da temperatura de acondicionamento do DBS e aquecimento do papel após aplicação da amostra (ALFAZIL, 2008; WAGNER *et al.*, 2014). Alguns estudos descrevem o tratamento de papéis de DBS, a fim de aumentar a estabilidade de compostos, através da aplicação prévia de ácidos no papel (LIU *et al.*, 2011). Porém, a alteração

do pH da amostra, bem como, o aquecimento do papel não são indicados, devido à possibilidade de estarem presentes na amostra substâncias instáveis em meios ácidos ou alcalinos ou termolábeis. Esses fatores são ainda mais relevantes em amostras no contexto forense, uma vez que sua composição, muitas vezes, não é conhecida. Além disso, tem sido reportado que alguns aditivos utilizados para aumentar a estabilidade das amostras em DBS interferem nas análises, podendo aumentar o efeito matriz e alterar outros parâmetros analíticos como a recuperação ou até mesmo a dispersão do sangue no papel (WAGNER *et al.*, 2014; KOSTER *et al.*, 2015; CLARK; HAYNES, 2011).

Portanto, no presente trabalho, foram descartadas tais estratégias, tendo sido mantidos procedimentos tradicionais, comumente utilizados na rotina de qualquer laboratório de análise forense, em especial, o NTF, onde todas as amostras de sangue são adicionadas de NaF, quando de seu recebimento, e mantidas sob refrigeração até o momento do preparo. Ou seja, dois fatores que convergem, segundo estudos aqui mencionados, para o aumento de estabilidade das substâncias serão utilizados no presente trabalho: amostras de sangue adicionadas de NaF que serão aplicadas em papel para secagem, sendo, adicionalmente estudado o impacto da temperatura sobre a estabilidade dos compostos selecionados.

1.6.7. DBS e Toxicologia Forense

A análise de substâncias psicoativas em matrizes biológicas é de grande importância em diversas áreas da toxicologia e o surgimento de novas técnicas pode auxiliar tais análises, uma vez que, em virtude da complexidade do tipo de matriz envolvido, existem diversos aspectos problemáticos, como, por exemplo, questões a respeito de estabilidade. Essa questão pode ser ainda mais relevante no contexto forense, pois, nesse caso, há a necessidade de armazenamento de amostras para contra-perícia, que poderão ser analisadas meses após a coleta da amostra (STOVE *et. al.*, 2012; SAUSSEREAU *et al.* 2012; QURAISHI *et al.*, 2013).

Como ficou exposto acima, diversas estratégias são aplicadas atualmente para aumentar a estabilidade dos compostos, porém, no contexto forense, essas estratégias devem ser utilizadas com extremo cuidado, a fim de que os aditivos utilizados não interfiram na composição da amostra levando a conclusões equivocadas (ISENSCHMID *et al.*, 1989; KERRIGAN, 2011). Assim, a técnica de amostragem por DBS se mostra uma alternativa promissora para aplicações forenses, já que não altera a composição química das amostras.

Além disso, apesar de ser comumente relacionada a análises de amostras *post mortem*, a toxicologia forense possui campo de atuação mais amplo e abrange também análises de

amostras *ante mortem*, como nos casos de exame anti-*doping*, no caso de exame de amostras de motoristas sob suspeita de terem consumido substâncias psicoativas, e no caso de amostras de vítimas de abuso sexual. Assim, analisando por esse prisma, as vantagens relacionadas à facilidade de coleta de amostra e o pequeno volume necessário para análise, podem ser de grande utilidade aos propósitos forenses, uma vez que torna menos invasiva a coleta de amostras de indivíduos vivos (STOVE *et al.*, 2012; SAUSSEREAU *et al.* 2012).

Adicionalmente, de maneira geral, as vantagens logísticas relacionadas ao DBS também são aplicáveis já que, por ocuparem espaços reduzidos, os custos com armazenamento de amostras sob refrigeração serão reduzidos (HENION; OLIVEIRA; CHACE, 2013). Além disso, muitas vezes, no Brasil, os laboratórios de análise em toxicologia forense não estão próximos aos postos do IML, onde as amostras são coletadas. Em casos extremos, as amostras são recebidas pelos laboratórios muitos dias após a coleta. Tais fatos demonstram que seria vantajosa a aplicação de técnicas de amostragem, como o DBS, no processo de transporte e conservação das amostras em contexto forense.

Salienta-se ainda, a redução da exposição ocupacional a doenças infecciosas dos profissionais envolvidos no processo, devido à mencionada inativação de patógenos promovida pelo DBS, o que para amostras *post mortem* apresentam relevância ainda maior (WILHELM *et al.*, 2014; MESS *et al.*, 2012; HENION *et al.*, 2013; QURAISHI *et al.*, 2013).

Dessa forma, há, atualmente na literatura diversos trabalhos que descrevem os estudos relacionados à aplicação de DBS em toxicologia forense. Stove e colaboradores (2012) fizeram um levantamento dos artigos relacionados à análise de drogas de abuso em DBS publicados até 2011. O levantamento realizado pelos autores mostra a extensa aplicação da técnica de DBS em amostras de indivíduos *ante mortem* e *post mortem* na análise de medicamentos, drogas de abuso e álcool no contexto toxicológico-forense.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Este estudo tem por objetivo avaliar a estabilidade da cocaína e seus metabólitos e dos compostos benzodiazepínicos alprazolam e diazepam em amostras de sangue *post mortem* obtidas no NTF-IML/SP. Através da análise por métodos validados em LC-MS/MS, será avaliada a variação da concentração dos compostos mencionados ao longo do tempo.

2.2. Objetivos Específicos

A variação da concentração será analisada sob diferentes aspectos:

- a) Em amostras de sangue *post mortem* em que os compostos de interesse estão presentes aplicadas em papel, ou seja, via DBS;
- b) Em amostras de sangue *post mortem* em que os compostos de interesse estão presentes não aplicadas em papel. Neste trabalho este grupo de amostras será denominado sangue total.

Além disso, será avaliada a influência da temperatura sobre a estabilidade dos compostos nos dois grupos de amostras mencionados, organizados da seguinte forma:

- a) Para amostras de DBS será avaliada a estabilidade dos compostos em temperatura ambiente, em geladeira e *freezer*;
- b) Para amostras de sangue total será avaliada a estabilidade dos compostos apenas em geladeira e *freezer*.

É importante salientar que todas as amostras eram adicionadas de NaF.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Os reagentes utilizados no presente trabalho apresentavam grau analítico, sendo que para o preparo das soluções utilizou-se metanol e acetonitrila, ambos grau HPLC adquiridos da Merck, água deionizada (Milli-Q), ácido fórmico (98-100%) e 1-clorobutano (99,8%) adquiridos da Merck, formiato de amônio (grau HPLC $\geq 99\%$) adquirido da Fluka; acetato de amônio (para análises) e tetraborato de sódio (para análises) adquiridos da Merck. O preparo das fases móveis seguem descritos no item 3.2.1. Os padrões analíticos de cocaína, benzoilecgonina, éstermetilecgonina, ecgonina, diazepam e alprazolam foram adquiridos da Cerilliant, bem como todos os padrões internos cocaína-d3, benzoilecgonina-d3, éstermetilecgonina-d3, diazepam-d5 e flunitrazepam-d7. O preparo de todos os padrões segue descrito no item 3.2.2. Os cartões para preparo de amostras em DBS eram Whatman 903 Protein Saver Card adquiridos da GE Healthcare.

3.2. Soluções

3.2.1. Fases Móveis

Para os métodos de análise desenvolvidos para cocaína e seus metabólitos tanto a partir de amostras de sangue total como amostras de DBS, as fases móveis foram preparadas e identificadas da seguinte forma:

- Fase A: fase aquosa com formiato de amônio a 2 mmol/L e 0,1% v/v de ácido fórmico;
- Fase B: fase metanólica, constituída das mesmas concentrações de aditivos.

Para o método de análise desenvolvido para os benzodiazepínicos selecionados a partir de amostras de DBS, as fases móveis foram preparadas e identificadas da seguinte forma:

- Fase A: fase aquosa com formiato de amônio a 2mmol/L e 0,1% v/v de ácido fórmico;
- Fase B: fase orgânica, constituída de acetonitrila pura.

Para o método de análise desenvolvido para os benzodiazepínicos selecionados a partir de amostras de sangue total, as fases móveis foram preparadas e identificadas da seguinte forma:

- Fase A: fase aquosa com acetato de amônio a 5mmol/L;
- Fase B: fase orgânica, constituída de acetonitrila pura.

3.2.2. Substâncias Investigadas

Diante do levantamento bibliográfico realizado e descrito no item 1.4.1 e tendo em vista a casuística do NTF se realizou um cotejamento no qual foram selecionadas duas classes de substâncias, e para cada classe foram selecionados os compostos mais representativos estatisticamente para o NTF¹. Assim, foram selecionadas as seguintes classes e compostos:

- Drogas de abuso: cocaína e seus produtos de biotransformação benzoilecgonina, éster metilecgonina;
- Benzodiazepínicos: alprazolam e diazepam.

Os padrões analíticos de cocaína e seus produtos de biotransformação foram preparados em soluções-estoque metanólicas que continham os analitos selecionados nas seguintes concentrações: 250, 500, 750, 1000, 2000, 5000, 10000, 15000 e 20000 ng/mL. Essas soluções eram, então, adicionadas em sangue negativo (definido a seguir), em uma proporção de 1:10, para preparo das amostras de sangue nas concentrações desejadas para a construção da curva analítica e dos controles de qualidade. Assim, a curva analítica era composta por soluções nas concentrações 25, 50, 75, 100, 200, 500, 1000, 1500 e 2000 ng/mL e os controles de qualidade pelas concentrações 75 ng/mL (CQB), 500 ng/mL (CQM) e 1500 ng/mL (CQA).

A solução de padrões internos para o método de análise de cocaína e seus produtos de biotransformação em **DBS**, foi preparada em solução-estoque metanólica que continha cocaína-d3, benzoilecgonina-d3 e éster metilecgonina-d3 a 20 ng/mL. A solução de padrões internos para o método de análise de cocaína e seus produtos de biotransformação em **sangue total**, foi preparada em soluções-estoque metanólica que continha cocaína-d3 a 2000 ng/mL.

Os padrões analíticos de benzodiazepínicos foram preparados em soluções-estoque metanólicas nas seguintes concentrações: 100, 500, 750, 1000, 2500 e 5000 ng/mL. De maneira análoga ao que foi descrito anteriormente, essas soluções eram, então, adicionadas em sangue, em uma proporção de 1:10, para preparo das amostras de sangue adicionadas nas concentrações desejadas para a construção da curva analítica e dos controles de qualidade. Assim, a curva analítica era composta por soluções nas concentrações 10, 50, 75, 100, 250 e 500 ng/mL e os controles de qualidade pelas concentrações 30 ng/mL (CQB), 150 ng/mL (CQM) e 400 ng/mL (CQA).

¹ Levantamento informal realizado pelos funcionários do NTF.

A solução de padrões internos para o método de análise de benzodiazepínicos em **DBS**, foi preparada em solução-estoque metanólica que continha diazepam-d5 e flunitrazepam-d7 a 20 ng/mL. A solução de padrões internos para o método de análise de benzodiazepínicos em **sangue total**, foi preparada em solução-estoque metanólica que continha diazepam-d5 e flunitrazepam-d7 a 200 ng/mL.

3.3. Amostras

O presente trabalho utilizou uma coleção de amostras de sangue *post mortem* encaminhadas para exame toxicológico ao NTF. Assim, foram utilizadas apenas amostras em que os exames oficiais já tinham sido encerrados e o respectivo laudo pericial emitido e, por isso, a amostra seria destinada ao descarte. Por não ser relevante para as análises realizadas no presente estudo, não se teve acesso a qualquer dado de identificação de vítimas, número de boletim de ocorrência, ou processo judicial. Dessa forma, o estudo foi realizado com garantia de sigilo e anonimato dos casos analisados.

Assim, para realização do estudo proposto foram utilizadas amostras de sangue negativo de diversos indivíduos diferentes, ou seja, amostras que apresentaram resultados negativos nos exames toxicológicos oficiais, que foram misturados em um *pool* de sangue negativo. As amostras de sangue negativo foram destinadas ao preparo de amostras-padrão, ou seja, amostras de sangue negativo nas quais foram adicionados os analitos de interesse nas concentrações desejadas (conforme procedimento descrito no item 3.2.2), para o preparo dos pontos da curva analítica, controles de qualidade, limite de detecção, quantificação, estudo de recuperação e efeito-matriz, além de ter sido utilizado para o preparo de parte das amostras destinadas ao estudo de estabilidade. Nesse caso, uma vez que essas amostras apresentavam a concentração dos controles, as amostras preparadas para estudo de estabilidade foram denominadas **amostras-controle**. O número de amostras de sangue negativo não pôde ser precisado, uma vez que, durante o presente trabalho utilizou-se as amostras de sangue negativo disponibilizadas pelo laboratório, as quais, por vezes, eram compostas de misturas de amostras de sangue negativo de diferentes indivíduos. Assim, apenas é possível estimar, que o número de amostras de sangue negativo tenha sido próximo de 30.

Foram também utilizadas amostras de sangue positivo, ou seja, amostras que apresentaram resultado positivo para as substâncias selecionadas nos exames toxicológicos oficiais, as quais foram destinadas ao estudo de estabilidade. Para realização do estudo de estabilidade de cocaína e seus produtos de biotransformação, foram utilizadas 08 amostras

positivas para uma das substâncias ou mais. Por fim, para a realização do estudo de estabilidade de benzodiazepínicos foram utilizadas, no total, 04 amostras positivas, sendo duas delas positivas para diazepam, e duas positivas para alprazolam. Essas amostras positivas foram denominadas **amostras reais positivas**.

Assim, no presente trabalho foi realizado estudo de estabilidade nas diferentes temperaturas a que as amostras de sangue são submetidas no NTF, para que fosse possível comparar a estabilidade dos compostos selecionados nas condições de trabalho atuais com a nova técnica de amostragem, ou seja, comparar amostras de sangue total com amostras de DBS, em termos de estabilidade. Assim, as amostras foram incubadas à temperatura ambiente, geladeira e *freezer*, em que para cada temperatura distinguiram-se dois grupos: amostras aplicadas em papel (DBS) e amostras não aplicadas em papel (Sangue total). Nesse último caso, as amostras não foram incubadas a temperatura ambiente em virtude de problemas decorrentes da putrefação das amostras de sangue nestas condições.

Portanto, o estudo de estabilidade se desenhou conforme ilustra Quadro 1:

Quadro 1. Desenho dos estudos de estabilidade.

A estabilidade dos analitos armazenados em diferentes temperaturas, em amostras DBS e sangue total, foi investigada em diferentes intervalos de tempo estabelecidos da seguinte forma: T_0 (dia da incubação, ou seja, T_0 refere-se à análise realizada no mesmo dia do preparo das amostras de DBS destinadas ao estudo de estabilidade), e T_x , em que x corresponde a 1 mês,

3 meses ou 6 meses após o preparo das amostras para o estudo de estabilidade da cocaína e metabólitos e 1 mês ou 3 meses para estudo de estabilidade de benzodiazepínicos.

Nos intervalos de tempo determinados, as amostras incubadas foram submetidas aos respectivos processos de extração abaixo descritos e, então, analisadas em triplicata.

3.4. Procedimentos

Durante o estudo, para todos os métodos desenvolvidos, foram preparadas amostras para as etapas de validação analítica e para estudo de estabilidade. Assim, para as etapas de validação analítica, era necessário o preparo de amostras referentes à construção da curva de analítica, controles de qualidade, limites de detecção e quantificação, além de preparo de amostras para estudo de recuperação e efeito-matriz, conforme preconiza o SWGTOX (2013). Já para o estudo de estabilidade, as amostras-controle e as amostrais reais positivas eram preparadas e incubadas, conforme descrito a seguir, para serem analisadas em dias pré-determinados. Para cada dia de análise do estudo de estabilidade, eram preparadas as amostras para construção da curva analítica e controles de qualidade do dia (“curva fresca”).

3.4.1. Preparo das “amostras DBS”

Para as etapas de validação, eram necessárias amostras para a construção da curva analítica, controles de qualidade da curva e limites de detecção e quantificação. Para prepará-las utilizou-se amostras de sangue adicionadas das soluções-estoque dos padrões nas concentrações desejadas, na proporção 1:10, conforme ficou acima descrito. De maneira geral, as amostras eram preparadas para obtenção de 200 µL de volume final, assim adicionava-se 20 µL das soluções-estoque a 180 µL de sangue negativo. Após serem homogeneizadas, por agitação mecânica por, aproximadamente 10 segundos, alíquotas de 15 µL dessas amostras eram aplicadas em discos de papel com 6 mm de diâmetro previamente recortados. Os discos eram dispostos em uma placa de vidro devidamente identificada, para que, então, fossem submetidos à secagem por pelo menos 3 h em temperatura ambiente, pela simples exposição ao ar. Após o período de secagem, as amostras eram extraídas.

O preparo das amostras-controle para estudo de estabilidade, ou seja, amostras de sangue negativo adicionadas das soluções-padrão nas concentrações dos controles de qualidade (CQB, CQM e CQA, acima descritos) seguiu as etapas de diluição e aplicação no papel descritos anteriormente, porém, após o período de secagem, as amostras foram armazenadas

nas diferentes condições que o presente trabalho visa analisar, ou seja, em temperatura ambiente, em geladeira (à 4°C) e *freezer* (-20°C).

Já as amostras reais positivas destinadas ao estudo de estabilidade, por apresentarem as substâncias de interesse, dispensam o preparo inicial aqui descrito. Assim, após serem homogeneizadas, 15 µL dessas amostras eram aplicadas em discos de papel com 6 mm de diâmetro previamente recortados, depois submetidos à secagem por pelo menos 3 h em temperatura ambiente e, então, armazenadas nas diferentes condições que o presente trabalho visa analisar, ou seja, em temperatura ambiente, em geladeira (à 4°C) e *freezer* (-20°C).

3.4.2. Procedimento de extração para as “amostras DBS”

Após o período de secagem, cada disco era submetido à extração individualmente, em tubo cônico de polipropileno, com 300 µL de metanol e 100 µL de padrão interno a 20 ng/mL, por 15 minutos em agitador mecânico (vórtex), e, então submetidos à centrifugação por 10 minutos a 14000 rpm.

Após a centrifugação, todo o volume de solvente era transferido a outro tubo, o qual era submetido à evaporação, em placa aquecida, provida de fluxo de nitrogênio, com posterior ressuspensão do extrato com 100 µL de metanol, no caso das amostras de benzodiazepínicos, e com 100 µL de uma mistura a 10% de metanol em fase aquosa (formiato de amônio - 2mmol/L, ácido fórmico - 0,1% v/v), no caso de amostras de cocaína e seus produtos de biotransformação.

Assim, com as amostras ressuspendidas, os tubos foram submetidos à agitação mecânica por 5 min e o volume final foi transferido para *vial* com *insert*.

As amostras incubadas, para estudo de estabilidade, também foram submetidas ao mesmo procedimento de extração, no dia pré-determinado de sua análise.

3.4.3. Ensaio de recuperação e efeito-matriz em DBS

O **ensaio de recuperação** é realizado através da análise em quintuplicata de amostras adicionadas de solução-estoque nas concentrações dos controles de qualidade baixo e alto (CQB e CQA), preparados da forma como segue (SWGTOX, 2013).

Para o ensaio de recuperação, 15 µL de sangue negativo foi aplicado em discos de papel com 6 mm de diâmetro previamente recortados, os quais eram dispostos em uma placa de vidro devidamente identificada, para que, então, fossem submetidos à secagem por pelo menos 3 h em temperatura ambiente, pela simples exposição ao ar. Após o período de secagem, as

amostras eram extraídas. O procedimento de extração segue o procedimento descrito em 3.4.2, porém, ao serem adicionadas as soluções de extração (300 μ L metanol e 100 μ L padrão interno), deve-se adicionar também 15 μ L da solução-estoque do CQB ou CQA.

Dessa forma, o procedimento de preparo da amostra DBS para ensaio de recuperação assemelha-se ao procedimento anteriormente descrito, porém, nesse caso, não se adiciona solução-padrão ao sangue negativo durante o preparo da amostra, e sim, na primeira etapa da extração.

O ensaio para análise do **efeito-matriz**, não envolve amostras de sangue, o procedimento de preparo se resume à diluição da solução-estoque em metanol. Para estudo de efeito-matriz em DBS, para análise de benzodiazepínicos prepara-se uma solução a 4,5 ng/mL (referente ao CQB) e 60 ng/mL (referente ao CQA). Para análise de cocaína e seus produtos de biotransformação prepara-se uma solução a 11,25 ng/mL (referente ao CQB) e 150 ng/mL (referente ao CQA). Essas concentrações se referem à concentração final obtida da solução que de fato é injetada no equipamento, uma vez que apenas uma parte da solução preparada de sangue é aplicada no papel, e não o volume total.

3.4.4. Preparo das “amostras sangue total”

Assim como para as etapas de validação para amostras DBS, para validação de amostras de sangue total, eram necessárias amostras para a construção da curva analítica, controles de qualidade da curva e limites de detecção e quantificação. Para prepará-las utilizou-se amostras de sangue adicionadas das soluções-estoque dos padrões nas concentrações desejadas, na proporção 1:10, conforme ficou acima descrito no item 3.1.2. Para tanto, eram aliquoteados 225 μ L de sangue negativo aos quais eram adicionados 25 μ L das soluções-estoque previamente preparadas. Após a adição das soluções-estoque, as amostras eram homogeneizadas por agitação mecânica por, aproximadamente, 10 segundos.

O preparo das amostras-controle para estudo de estabilidade, ou seja, amostras de sangue negativo adicionadas das soluções-padrão nas concentrações dos controles de qualidade (CQB, CQM e CQA, acima descritos) seguiu as etapas descritas anteriormente, porém, após o preparo, as amostras foram armazenadas nas diferentes condições que o presente trabalho visa analisar, ou seja, em geladeira (à 4°C) e *freezer* (-20°C).

Já as amostras reais positivas destinadas ao estudo de estabilidade, por apresentarem as substâncias de interesse dispensam o preparo inicial aqui descrito. Assim, após serem homogeneizadas, 250 μ L dessas amostras eram aliquoteadas e, então, armazenadas nas

diferentes condições que o presente trabalho visa analisar, ou seja, em geladeira (à 4°C) e *freezer* (-20°C).

3.4.5. Procedimento de extração para as “amostras sangue total”

a) Benzodiazepínicos

Às amostras preparadas, conforme descrito no item 3.4.4, eram adicionados 25 µL da solução de padrão interno (200 ng/mL), 250 µL de solução saturada de tetraborato de sódio e 1250 µL de solvente extrator (1-clorobutano). Os tubos eram homogeneizados por inversão (no mínimo 10 vezes) e então submetidos à agitação mecânica (vórtex) por 5 minutos e, posteriormente, à centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos.

Em seguida, 1,1 mL do sobrenadante eram transferidos para outro tubo de polipropileno o qual era submetido à evaporação em bloco de aquecimento a 45° e leve fluxo de nitrogênio. O extrato resultante foi ressuspenso em 500 µL de metanol e submetido à agitação mecânica por 20 segundos e o volume final foi transferido para o *vial* de análise.

As amostras incubadas, para estudo de estabilidade, também foram submetidas ao mesmo procedimento de extração.

b) Cocaína e seus produtos de biotransformação

Às amostras preparadas, conforme descrito no item 3.2.4, eram adicionados 25 µL da solução de padrão a 2000 ng/mL e 1 mL de acetonitrila gelada. Os tubos eram homogeneizados por inversão (no mínimo 10 vezes) e então submetidos à agitação mecânica por 5 minutos e, posteriormente, à centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos. E 600 µL do volume final resultante foram transferidos para o *vial* de análise.

As amostras incubadas, para estudo de estabilidade, também foram submetidas ao mesmo procedimento de extração.

3.4.6. Ensaio de Recuperação e Efeito-Matriz em sangue total

O **ensaio de recuperação** é realizado através da análise em quintuplicata de amostras adicionadas de solução-estoque nas concentrações dos controles de qualidade baixo e alto (CQB e CQA), preparados da forma como segue.

Para o ensaio de recuperação para o método de **benzodiazepínicos** em sangue total, o procedimento de preparo de amostra inicial limita-se a, somente, alíquotar 250 μL de sangue negativo, não adicionado de solução-padrão. A extração segue como descrito nos itens 3.4.5(a), porém ao final, ao contrário do procedimento normal, em que o extrato é ressuspenso com 500 μL de metanol, deve-se adicionar 25 μL da solução-estoque do CQB ou CQA e 475 μL de metanol.

Dessa forma, o procedimento de preparo e extração da amostra sangue total para ensaio de recuperação assemelha-se ao procedimento anteriormente descrito, porém, nesse caso, não se adiciona solução-padrão ao sangue negativo na etapa de preparo da amostra, e sim, na última etapa da extração. O raciocínio no preparo das amostras desse ensaio para sangue total é diferente do raciocínio do preparo para DBS, isso porque neste caso toda a amostra preparada é submetida à extração.

O ensaio para análise do **efeito-matriz** de **benzodiazepínicos** em sangue total, não envolve amostras de sangue, o procedimento de preparo se resume em diluir 25 μL da solução-estoque de CQB ou CQA em 475 μL de metanol.

Para o ensaio de recuperação para o método de **cocaína** em sangue total, o procedimento de preparo de amostra inicial limita-se a, somente, alíquotar 250 μL de sangue negativo, não adicionado de solução-padrão. A extração segue como descrito nos itens 3.4.5(b), porém, ao final, ao contrário do procedimento normal, após a centrifugação, deve-se retirar 25 μL da acetonitrila gelada sobrenadante e adicionar 25 μL da solução-estoque do CQB ou CQA.

Dessa forma, o procedimento de preparo e extração da amostra sangue total para ensaio de recuperação assemelha-se ao procedimento anteriormente descrito, porém, nesse caso, não se adiciona solução-padrão ao sangue negativo, e sim, na última etapa da extração.

O ensaio para análise do **efeito-matriz** de **cocaína** em sangue total, não envolve amostras de sangue, o procedimento de preparo se resume diluir 25 μL da solução-estoque de CQB ou CQA em 975 μL de metanol.

3.5. Equipamentos

Os métodos foram desenvolvidos em sistema LC-MS/MS, composto por cromatógrafo líquido Shimadzu Proeminence e espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo Shimadzu modelo 8040 e modelo 8050, com ionização por *electrospray*. As análises foram realizadas em modo de Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM, do inglês *Multiple Reaction Monitoring*), com ionização positiva.

3.6. Métodos analíticos

3.6.1. Validação analítica

O método desenvolvido permite a análise simultânea dos toxicantes e produtos de biotransformação elencados no item 3.2.2. Os métodos para análise de cocaína e seus produtos de biotransformação em DBS e para análise de benzodiazepínicos tanto em DBS quanto em sangue total foram desenvolvidos e validados. Já para análise de cocaína e seus produtos de biotransformação em sangue total, foi validado o método que já vinha sendo utilizado na rotina do laboratório.

3.6.2. Métodos desenvolvidos para análise de amostras em DBS

O método desenvolvido e validado para os benzodiazepínicos possui como parâmetros cromatográficos fluxo de 0,35mL/min com tempo total de corrida de 16 min. Utilizou-se o gradiente de solventes ilustrado na Figura 25, em que a proporção de solventes se inicia com 20% de Fase B, aumentando até que aos 10 min atinge 100%, mantendo essa proporção por 1,5 min, momento em que a proporção é reduzida a 20% (condição inicial), que é mantida por 4 min. O cromatograma resultante segue ilustrado na Figura 26.

Figura 25: Gradiente de solventes utilizado na separação cromatográfica.

Figura 26: Cromatograma obtido através da separação cromatográfica descrita. Sistema: LC-MS/MS, modo MRM. Condições: Coluna Atlantis® Waters (3 μ m, 3.0x150mm). Gradiente: de 20% a 100% de Fase B, em 10 min, essa proporção é mantida por 1,5 min e, então, é reduzida a 20% (condição inicial), fluxo de 0,35mL/min, temperatura 40°C.

Os íons precursores (antes da fragmentação), quantificadores (íons que após a fragmentação são selecionados para, com base em sua área, quantificar a concentração do analito na amostra) e qualificadores (íons que após a fragmentação são selecionados para confirmação da presença da substância) seguem listados na Tabela 2 bem como os tempos de retenção de cada analito. Na figura acima, cada cor representa uma transição de massas (íon precursor-íon quantificador ou íon precursor-íon qualificador), o pico de sinal mais intenso representa a transição íon precursor-íon quantificador.

Tabela 2 - Íons monitorados para cada substância analisada e seus respectivos tempos de retenção

Analito	Íons precursores (<i>m/z</i>)	Íons quantificadores (<i>m/z</i>)	Íons qualificadores (<i>m/z</i>)	Tempo de Retenção (min)
Alprazolam	309,1	281,0	205,0	8,19
Diazepam-d5	290,0	198,0	154,0	9,74
Diazepam	284,9	193,0	154,0	9,76

O método desenvolvido e validado para a cocaína e seus produtos de biotransformação possui como parâmetros cromatográficos fluxo de 0,35mL/min com tempo total de corrida de 11 minutos. Utilizou-se o gradiente de solventes ilustrado na Figura 27, em que a proporção de solventes se inicia com 5% de Fase B, aumentando até que aos 4 min atinge 95%, mantendo essa proporção por 1,5 min, momento em que a proporção é reduzida a 5% (condição inicial), que é mantida até o final da corrida. O cromatograma resultante segue ilustrado na Figura 28.

Figura 27: Gradiente de solventes utilizado na separação cromatográfica.

Figura 28: Cromatograma obtido através da separação cromatográfica descrita. Sistema: LC-MS/MS, modo MRM. Condições: Coluna Atlantis® Waters (3µm, 3.0x150mm). Gradiente: de 5% a 95% de Fase B, em 4 min, essa proporção é mantida por 1,5 min e, então, é reduzida a 5% (condição inicial), fluxo de 0,35mL/min, temperatura 40°C.

Os íons precursores, quantificadores e qualificadores seguem listados na Tabela 3 bem como os tempos de retenção de cada analito.

Tabela 3 - Íons monitorados para cada substância analisada e seus respectivos tempos de retenção

Analito	Íons Precusores (<i>m/z</i>)	Íons quantificadores (<i>m/z</i>)	Íons qualificadores (<i>m/z</i>)	Tempo de Retenção (min)
EME	200,1	182,2	82,1	2,47
EME-d3	203,0	185,1	85,1	2,47
Cocaína	304,0	182,1	82,0	6,01
Cocaína-d3	307,0	185,0	85,0	6,01
Benzoilecgonina	290,1	168,1	105,0	6,22
Benzoilecgonina-d3	293,0	171,1	105,0	6,22

3.6.3. Métodos desenvolvidos para análise de amostras de sangue total

O método desenvolvido e validado para os benzodiazepínicos possui como parâmetros cromatográficos fluxo de 0,30mL/min com tempo total de corrida de 15 minutos. Utilizou-se do gradiente de solventes ilustrado na Figura 29, em que a proporção de solventes se inicia com 20% de Fase B, aumentando até que aos 10 min atinge 100%, mantendo essa proporção por 1,5 min, momento em que a proporção é reduzida a 20% (condição inicial), que é mantida até o final da corrida, aos 15 min. O cromatograma resultante segue ilustrado na Figura 30.

Figura 29: Gradiente de solventes utilizado na separação cromatográfica.

Figura 30: Cromatograma obtido através da separação cromatográfica descrita. Sistema: LC-MS/MS, modo MRM. Condições: Coluna Atlantis® Waters (3µm, 3.0x150mm). Gradiente: de 20% a 100% de Fase B, em 10 min, essa proporção é mantida por 1,5 min e, então, é reduzida a 20% (condição inicial), fluxo de 0,30mL/min, temperatura 40°C.

Os íons precursoros, quantificadores e qualificadores seguem listados na Tabela 4 bem como os tempos de retenção de cada analito.

Tabela 4 - Íons monitorados para cada substância analisada e seus respectivos tempos de retenção

Analito	Íons Precursores (<i>m/z</i>)	Íons Quantificadores (<i>m/z</i>)	Íon Qualificadores (<i>m/z</i>)	Tempo de Retenção (min)
Alprazolam	309,1	281,0	205,0	8,19
Diazepam-d5	290,0	198,0	154,0	9,80
Diazepam	284,9	193,0	154,0	9,85

O método validado para a cocaína e seus produtos de biotransformação possui como parâmetros cromatográficos fluxo de 0,35mL/min com tempo total de corrida de 16 minutos. Utilizou-se do gradiente de solventes ilustrado na Figura 31, em que a proporção de solventes se inicia com 5% de Fase B, aumentando até que aos 8,5 min atinge 95%, mantendo essa proporção por 1,5 min, momento em que a proporção é reduzida a 5% (condição inicial), que é mantida até o final da corrida, aos 15 min. O cromatograma resultante segue ilustrado na Figura 32.

Figura 31: Gradiente de solventes utilizado na separação cromatográfica.

Figura 32: Cromatograma obtido através da separação cromatográfica descrita. Sistema: LC-MS/MS, modo MRM. Condições: Coluna Atlantis® Waters (3µm, 3.0x150mm). Gradiente: de 5% a 95% de Fase B, em 8 min, essa proporção é mantida por 1,5 min e, então, é reduzida a 5% (condição inicial), fluxo de 0,35mL/min, temperatura 40°C.

Os íons precursores, quantificadores e qualificadores seguem listados na Tabela 5 bem como os tempos de retenção de cada analito.

Tabela 5 - Íons monitorados para cada substância analisada e seus respectivos tempos de retenção

Analito	Íons Precusores (m/z)	Íons Quantificadores (m/z)	Íons Qualificadores (m/z)	Tempo de retenção (min)
EME	200,1	182,2	82,1	2,41
Cocaína	304	182,1	82	7,99
Cocaína-D3	307	185	85	7,99
Benzoilecgonina	290,1	168,1	105	8,18

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Validação Analítica

Segundo proposto para o presente trabalho, foi realizada a validação dos métodos analíticos para os benzodiazepínicos bem como para a cocaína e seus produtos de biotransformação. Assim, para validação de metodologia analítica quantitativa, foram considerados os parâmetros e limites sugeridos pelo SWGTOX (2013), tendo sido validados os seguintes parâmetros: linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão, recuperação e efeito matriz.

4.1.1. Linearidade

Para avaliação do modelo de calibração deve ser avaliada a correlação entre concentração do analito da amostra e resposta do equipamento, para a faixa de trabalho selecionada. Assim para avaliação da linearidade do método, foram levados em consideração os níveis terapêuticos plasmáticos das substâncias selecionadas no caso dos benzodiazepínicos e concentrações plasmáticas em overdose para a cocaína.

Para avaliação da linearidade dos métodos avaliou-se a homocedasticidade dos dados. Essa avaliação é importante nos casos em que o desvio padrão das medidas de concentração não são constantes e variam em função de x . Quando isso ocorre, ou seja, quando verifica-se a heterocedasticidade da curva analítica, é necessário utilizar um modelo de regressão linear dos mínimos quadrados ponderados. Assim, avaliou-se a heterocedasticidade dos dados através dos valores obtidos da análise da curva analítica em quintuplicata, em que aplicou-se o teste F , para comparação do F experimental (F_{exp}) em relação ao F crítico (F_{crit}). O valor de F_{crit} foi obtido através da tabela F , com intervalo de confiança de 99%, e 4 graus de liberdade, já que cada ponto da curva foi analisado em quintuplicata. Já para o cálculo de F_{exp} , analisou-se a variância dos dados de área relativa (área do analito dividida pela área do padrão interno) das replicatas da maior concentração em relação a variância dos dados de área relativa das replicatas da menor concentração, para cada curva analítica.

Assim, para a curva analítica de benzodiazepínicos foram utilizados os valores de área relativa das concentrações de 10 ng/mL e 500 ng/mL e, para a curva analítica de cocaína e seus produtos de biotransformação, foram utilizados os valores de área relativa das concentrações de 25 ng/mL e 2000 ng/mL (HEARD; PALMER; ZAHNISER, 2008). Através desses cálculos, foi verificada a heterocedasticidade dos dados ($F_{\text{exp}} > F_{\text{crit}}$) (ALMEIDA; CASTEL-BRANCO;

FALCÃO, 2002). Por isso, os fatores de peso para as equações representativas das curvas analíticas foram calculados e avaliados segundo a porcentagem de erro relativo (Erro da Regressão). Para o método analítico para cocaína e seus produtos de biotransformação foi selecionado o fator $1/x^2$ e para benzodiazepínicos $1/x$, uma vez que as equações que utilizavam esses fatores de peso apresentaram a menor porcentagem de erro.

Os valores de coeficientes angular (a), coeficiente linear (b), coeficiente de determinação (r^2), p-valor, F_{exp} e F_{crit} e erro da regressão seguem descritos nas tabelas 6 e 7, para os métodos de análise via DBS, e nas tabelas 8 e 9 para os métodos de análise via sangue total.

Tabela 6 - Avaliação da linearidade do método para análise de benzodiazepínicos em DBS

Analito	a	b	r^2	p-valor	F_{exp}	Erro da Regressão
Alprazolam	0,0116	0,0377	0,997	3,59E-06	912,739	1,60E-13
Diazepam	0,0094	0,0122	0,999	1,27E-05	485,525	-1,24E-13

Legenda: (a) = Coeficientes angular; (b) = linear; (r^2) = coeficiente de determinação; F_{exp} = F obtido experimentalmente; para F_{crit} de 6,39

Tabela 7 - Avaliação da linearidade do método para análise de cocaína e seus produtos de biotransformação em DBS

Analito	a	b	r^2	p-valor	F_{exp}	Erro da Regressão
EME	0,0057	0,036	0,9993	1,05e-07	5337,4	8,79e-14
Cocaína	0,0063	-0,0005	0,9997	1,52e-05	443,1	-7,9e-14
Benzoilecgonina	0,005	0,059	0,9994	6,54e-06	676,1	-9,6e-14

Legenda: (a) = Coeficientes angular; (b) = linear; (r^2) = coeficiente de determinação; F_{exp} = F obtido experimentalmente; para F_{crit} de 6,39.

Tabela 8 - Avaliação da linearidade do método para análise de benzodiazepínicos em sangue total

Analito	a	b	r^2	p-valor	F_{exp}	Erro da Regressão
Alprazolam	0,0269	-0,0023	0,99953	3,90E-07	2771,22	-5,24E-14
Diazepam	0,05205	0,08967	0,99933	6,54362E-07	2139,84	2,20E-13

Legenda: (a) = Coeficientes angular; (b) = linear; (r^2) = coeficiente de determinação; F_{exp} = F obtido experimentalmente; para F_{crit} de 6,39.

Tabela 9 - Avaliação da linearidade do método para análise de cocaína e seus produtos de biotransformação em sangue total

Analito	a	b	r ²	p-valor	F _{exp}	Erro da Regressão
EME	0,00085	0,00113	0,99912	8,57967E-07	1868,6	-1,53E-13
Cocaína	0,00485	0,02491	0,99945	1,18E-06	1590,04	2,53E-14
Benzoilecgonina	0,00292	0,00245	0,99862	1,04E-07	5364,91	7,08E-14

Legenda: (a) = Coeficientes angular; (b) = linear; (r²) = coeficiente de determinação; F_{exp}= F obtido experimentalmente; para F_{crit} de 6,39.

4.1.2. Precisão e Exatidão

Segundo o SWGTOX (2013), a exatidão do método reflete a concordância entre a média de valores de concentrações medidos e o valor aceito como verdadeiro. A avaliação da exatidão do método deverá ser realizado através da análise, em triplicata, de amostras preparadas pela adição de padrão na matriz de interesse em três diferentes concentrações (baixa, média e alta). E, ainda, esse estudo deverá ser conduzido em cinco análises diferentes. Após obtidos os valores de concentração, através da curva analítica, deverá ser realizado o seguinte cálculo:

$$\text{Exatidão} = \frac{(\text{Média das concentrações medidas} - \text{Concentração Nominal}) \times 100}{\text{Concentração Nominal}}$$

Serão aceitos valores que variem entre -20% e 20%.

Ainda segundo o SWGTOX (2013), ensaios de exatidão deverão ser conduzidos em conjunto com ensaios de precisão. A precisão de um método reflete a concordância entre os valores de concentração medidos. Também será realizado através da medida de três níveis de concentrações diferentes em triplicata, em cinco dias diferentes. A precisão será expressa através do coeficiente de variação (CV, expresso em %), que será calculado da seguinte forma:

$$\%CV = \frac{\text{Desvio padrão da média de concentrações} \times 100}{\text{Média das concentrações}}$$

Nesse caso, também não serão aceitos valores que variem acima de 20% ($\pm 20\%$), sendo assim, é expresso numericamente como imprecisão.

Para avaliação da precisão e exatidão dos métodos, foram analisadas três replicatas de amostras de sangue negativo enriquecidas nas concentrações 30, 150 e 400 ng/mL para os benzodiazepínicos e nas concentrações 75, 500 e 1000 ng/mL para a cocaína e seus produtos de biotransformação, conforme procedimentos de preparo e extração acima descritos. A precisão e a exatidão do método foram avaliadas através do coeficiente de variação (%) dos valores de concentrações obtidos através de curva analítica.

Os resultados obtidos para determinação da precisão e exatidão dos métodos desenvolvidos seguem descritos nas Tabelas 10, 11, 12 e 13.

4.1.3. Recuperação e Efeito Matriz

Os ensaios de recuperação têm por objetivo avaliar a eficiência das técnicas de extração aplicadas durante o estudo. Para isso, deve-se comparar as áreas dos picos do analito obtidas da análise de amostras preparadas conforme procedimento normal, ou seja, com a adição do analito durante o preparo da amostra (grupo 1), antes da extração, em relação às áreas dos picos do analito obtidas da análise de amostras preparadas sem adição de padrão prévia, em que o padrão será adicionado ao final do processo de extração (grupo 2). Dessa forma, as áreas obtidas da análise das amostras do grupo 2 é isenta da interferência do processo da extração, uma vez que, nesse grupo o padrão é adicionado às amostras apenas ao final da extração. E, portanto, quanto mais próximos forem os valores obtidos entre os tipos de preparo, mais eficiente é o processo de extração. Segundo o SWGTOX (2013) esse ensaio deverá ser realizado nas concentrações dos controles de qualidade baixo e alto, em quintuplicata, para os dois conjuntos de amostras. O cálculo a ser realizado é:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Média das Áreas 1}}{\text{Média das Áreas 2}} \times 100$$

Em conjunto com o ensaio de recuperação sugere-se que se avalie o efeito matriz. Esse efeito é um fenômeno mais comumente observado em análises por LC-MS/MS, que resulta na supressão ou aumento da ionização do analito em decorrência da co-eluição de compostos presentes na matriz analisada (SWGTOX, 2013). Para avaliação desse efeito, são sugeridas algumas alternativas, a selecionada e aplicada no presente estudo, estabeleceu a relação entre dois conjuntos de dados. O primeiro conjunto de dados seriam os dados de áreas dos picos do analito obtidas da análise de amostras preparadas sem adição de padrão prévia, em que o padrão

será adicionado ao final do processo de extração, ou seja, os mesmos dados que já foram utilizados para o ensaio de recuperação (denominados como grupo 2, para o ensaio de recuperação). O segundo conjunto de dados seriam as áreas dos picos do analito obtida através da análise de uma solução diluída, em que não foi realizada qualquer extração, denominada *neat* (grupo 3). Essa abordagem considera que com a injeção da solução *neat* é possível conhecer qual a área obtida pela análise sem que haja qualquer interferência na ionização, ou seja, sem interferências de extração e sem interferências na ionização supostamente promovida pelos componentes da matriz. E, a partir da análise das áreas amostras do grupo 2, em que o padrão foi adicionado após a extração, é possível conhecer as áreas obtidas quando apenas a matriz pode interferir na análise, mas não a extração. Assim, a comparação desses dois conjuntos de dados permite avaliar o efeito dos componentes da matriz sobre a ionização. E, portanto, quanto mais próximos forem os valores obtidos entre os tipos de preparo, menor é a interferência dos componentes da matriz sobre a análise, ou seja, menor é o efeito matriz. Segundo o SWGTOX (2013) esse ensaio deverá ser realizado nas concentrações dos controles de qualidade baixo e alto, em quintuplicata, para os dois conjuntos de amostras.

Os resultados obtidos para determinação da recuperação e efeito matriz dos métodos desenvolvidos seguem descritos nas Tabelas 10, 11, 12 e 13.

$$\text{Efeito Matriz (\%)} = \frac{\text{Média das Áreas 2}}{\text{Média das Áreas 3}} \times 100$$

Tabela 10 - Resultados de precisão, exatidão, recuperação e efeito matriz do método para análise de benzodiazepínicos em DBS

Analito	Níveis de concentração estudados						Recuperação (%)		Efeito Matriz (%)	
	30 ng/mL		150 ng/mL		400 ng/mL		Baixo	Alto	Baixo	Alto
	Precisão (%CV)	Exatidão	Precisão (%CV)	Exatidão	Precisão (%CV)	Exatidão	30 ng/mL	400 ng/mL	30 ng/mL	400 ng/mL
Alprazolam	7,1	100,85	7,3	97,38	9,9	93,50	109,25	100,14	81,03	100,26
Diazepam	5,7	98,94	6,1	100,62	7,3	99,23	109,65	101,55	65,20	82,83

Legenda: CV: coeficiente de variação.

Tabela 11 - Resultados de precisão, exatidão, recuperação e efeito matriz do método para análise de cocaína e seus produtos de biotransformação em DBS

Analito	Níveis de concentração estudados						Recuperação %		Efeito Matriz %	
	75 ng/mL		500 ng/mL		1000 ng/mL		Baixo	Alto	Baixo	Alto
	Precisão (%CV)	Exatidão	Precisão (%CV)	Exatidão	Precisão (%CV)	Exatidão	75 ng/mL	1000 ng/mL	75 ng/mL	1000 ng/mL
EME	5,8	104,69	5,8	107,07	6,9	99,16	73,74	60,44	46,98	50,68
Cocaína	4,9	99,94	6,1	104,45	6,1	101,59	84,05	74,05	83,26	86,52
BE	5,0	100,05	6,2	105,67	5,4	100,76	80,96	78,95	116,29	99,61

Legenda: CV: coeficiente de variação; EME: éster métilecgonina; BE: benzoilecgonina.

Tabela 12 - Resultados de precisão, exatidão e recuperação do método para análise de benzodiazepínicos em sangue total

Analito	Níveis de concentração estudados						Recuperação (%)		Efeito Matriz (%)	
	30 ng/mL		150 ng/mL		400 ng/mL		Baixo	Alto	Baixo	Alto
	Precisão (%CV)	Exatidão	Precisão (%CV)	Exatidão	Precisão (%CV)	Exatidão	30 ng/mL	400 ng/mL	30 ng/mL	400 ng/mL
Alprazolam	7,1	96,02	5,9	98,12	5,9	99,92	79,56	79,85	98,86	99,79
Diazepam	2,8	100,79	3,6	101,66	4,7	97,95	73,18	82,40	99,33	96,24

Legenda: CV: coeficiente de variação.

Tabela 13 - Resultados de precisão, exatidão e recuperação do método para análise de cocaína e seus produtos de biotransformação em sangue total

Analito	Níveis de concentração estudados						Recuperação %		Efeito Matriz %	
	75 ng/mL		500 ng/mL		1000 ng/mL		Baixo	Alto	Baixo	Alto
	Precisão (%CV)	Exatidão	Precisão (%CV)	Exatidão	Precisão (%CV)	Exatidão	75 ng/mL	1000 ng/mL	75 ng/mL	1000 ng/mL
EME	7,18	101,91	5,80	104,18	6,47	101,94	44,07	45,04	148,32	149,62
Cocaína	5,08	103,60	3,31	103,75	5,12	102,00	48,04	49,00	176,67	189,51
BE	7,21	99,48	6,07	102,25	5,55	99,12	45,69	45,32	186,37	180,60

Legenda: CV: coeficiente de variação; EME: éster métilcegonina; BE: benzoilecgonina.

4.1.4. Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção de um método pode ser definido como a menor concentração de uma amostra em que a resposta instrumental pode ser diferenciada da resposta instrumental obtida da análise do branco, e, assim, identificar a presença do analito. Existem diversas formas de obter esse valor e o SWGTOX (2013) considera suficiente, para algumas situações, o que se denominou “ponto de decisão”, em que o limite de detecção é definido administrativamente, independente se o equipamento é capaz de detectar concentrações ainda menores. Porém, é necessário comprovar que o equipamento é capaz de identificar o analito na concentração estipulada, e, para isso, deve-se analisar a amostra na referida concentração em, no mínimo, três diferentes corridas e, em cada uma delas, em triplicata.

Já o limite de quantificação é a menor concentração de um analito que o equipamento é capaz de medir com aceitáveis valores de precisão e exatidão. Também é possível determinar esse valor administrativamente. Porém, assim como para o limite de detecção, é necessário comprovar a adequabilidade do limite de quantificação selecionado e, para isso, deve-se analisar a amostra na referida concentração em, no mínimo, três diferentes corridas e, em cada uma delas, em triplicata. Para todas essas análises, é necessário que todos os critérios de detecção, identificação, precisão e exatidão sejam atingidos.

Conforme citado anteriormente, para estipular a faixa de trabalho para análise de benzodiazepínicos levou-se em consideração a faixa terapêutica de concentração plasmática, e, para a cocaína, considerou-se doses de intoxicação (ou overdose). Assim, considerou-se que concentrações muito abaixo das faixas selecionadas não seriam relevantes para avaliar efeitos toxicológicos dessas substâncias.

Portanto, considerou-se o ponto de concentração mais baixo na curva analítica como limite de quantificação para todos os métodos de análise utilizados no presente estudo. Dessa maneira, para o método de benzodiazepínicos (tanto via DBS quanto via sangue total) o limite de quantificação estipulado foi de 10 ng/mL, que atendia a todas as exigências mencionadas. Já para o método de cocaína (tanto via DBS quanto via sangue total) o limite de quantificação estipulado foi de 25 ng/mL, que também atendia a todas as exigências mencionadas. Já para o limite de detecção, foi estipulado o valor de 5 ng/mL para o método para análise de benzodiazepínicos e de 10 ng/mL para o método de cocaína.

4.2. Estudo de Estabilidade de Cocaína e metabólitos

A porcentagem de variação na concentração da cocaína e seus metabólitos em sangue total ou em DBS, acondicionados sob diferentes temperaturas, seguem ilustrados nas Tabelas 14 a 23, elaboradas com a finalidade de possibilitar a comparação dos resultados quando uma mesma amostra é acondicionada sob diferentes condições. As Figuras 33, 35 a 48 compilam os dados numéricos que geraram os gráficos em questão.

Como definido anteriormente, para melhor entendimento, as amostras de sangue negativo nas quais foram adicionados os analitos de interesse nas concentrações dos controles de qualidade foram denominadas **amostras-controle**. No caso do estudo de estabilidade da cocaína, as concentrações das amostras-controle eram 75 ng/mL para controle de qualidade baixo (CQB), 500 ng/mL para controle médio (CQM) e 1000 ng/mL para controle alto (CQA). Já as **amostras reais positivas** são as que apresentaram resultado positivo para as substâncias selecionadas nos exames toxicológicos oficiais.

Assim, os dados obtidos através da análise de amostras-controles e os dados obtidos da análise de amostras de sangue reais positivas seguem ilustrados separadamente nos gráficos e tabelas mencionados. As porcentagens de variação descritas foram obtidas a partir da comparação entre o valor de concentração obtido no dia do estudo de estabilidade (T_x) em relação ao valor de concentração inicial, obtido no dia da incubação das amostras (T_0).

4.2.1. Resultados obtidos da análise de amostras de sangue total (SgT)

4.2.1.1. Análise do perfil de estabilidade em diferentes temperaturas de acondicionamento das amostras-controle

A análise da tabela de variação na concentração para amostras-controle incubadas sugere que a cocaína e os metabólitos aqui considerados são estáveis por todo o período de tempo de estudo, quando as amostras são armazenadas em *freezer*, uma vez que estas amostras apresentaram porcentagem de variação menor que os limites de precisão e exatidão do método, ou seja, apresentaram variação menor que 20%. Cabe ressaltar que todas as amostras analisadas são adicionadas de NaF e, assim, a estabilidade observada pode ser interpretada como resultado da associação entre a ação da inibição enzimática promovida pelo NaF e o acondicionamento

das amostras em baixa temperatura (-20°C). Tais resultados são compatíveis com dados de estudo de estabilidade de cocaína e metabólitos em sangue já publicados, que demonstram o impacto positivo da associação entre os dois fatores mencionados (ISENSCHMID *et al.*, 1989; KISZKA *et al.*, 2001). A Tabela 14 ilustra os valores de porcentagem de variação obtidos para as análises de estudo de estabilidade em amostras-controles de sangue total acondicionadas em *freezer*. Esses valores de porcentagem foram obtidos a partir da média de valores de concentração medidos em triplicatas no dia do estudo (T_x) em relação ao dia da incubação. A Figura 33 ilustra os gráficos em que se observa a variação na concentração das amostras ao longo do período estudado.

Tabela 14 – Valores de porcentagem de variação obtidos para as análises de estudo de estabilidade em amostras-controles de sangue total acondicionadas em *freezer*.

SANGUE TOTAL		Tempo de análise								
		1 mês			3 meses			6 meses		
Matriz	Analito	CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA
FREEZER	EME	13,75	28,8	24,11	1,9	1,87	10,77	-2,13	15,37	7,03
	COCAÍNA	10,02	2,78	-5,63	-3,25	-1,22	2,85	-18,72	-10,38	-12,51
	BZE	4,21	-1,16	-10,12	5,86	-2,91	-3,77	-11,42	-5,31	-12,97

Legenda: EME: éster metilecgonina; BZE: benzoilecgonina; CQB: controle de qualidade baixo; CQM: controle de qualidade médio; CQA: controle de qualidade alto.

Figura 33: Perfil de estabilidade obtido na análise das amostras incubadas em *freezer* para cocaína (COC), éstermetilecgonina (EME) e benzoilecgonina (BZE), nas concentrações dos controles de qualidade.

Já o aumento na concentração da EME observado no primeiro mês para os controles médio e alto, pode ser atribuído ao fato de que as amostras, quando incubadas, foram preparadas com a adição de iguais concentrações de cocaína, BZE e EME. Como o processo de metabolização não está totalmente suprimido, mesmo *in vitro*, com o transcorrer do tempo, a cocaína é convertida a EME aumentando sua concentração no meio. Por outro lado, ainda está ocorrendo a metabolização da própria EME, uma vez que esse processo também não é interrompido. Assim, no meio há diversos processos ocorrendo simultaneamente: o de formação da EME a partir da hidrólise enzimática da cocaína e o de degradação da EME a partir da hidrólise química de seu grupo metiléster.

Porém, da forma como os dados se apresentam, é possível supor que, para as amostras em questão, a inibição da hidrólise química, que levaria à degradação da EME, decorrente da acidificação de amostras de sangue *post mortem* e da diminuição da temperatura se deu de maneira mais eficiente que a inibição da hidrólise enzimática, que levaria à formação da EME. E, assim, no balanço final dos dois processos em curso, o saldo resultou em aumento da concentração da EME, no primeiro mês. Posteriormente, a redução da concentração da cocaína, ou seja, a redução do precursor da EME, devido à degradação química, possivelmente, levou a uma diminuição da formação de EME, acarretando em um equilíbrio entre a formação e a degradação da EME. A Figura 34 ilustra a possível explicação para o aumento da concentração da EME observado.

Figura 34: Balanço entre a formação e degradação da EME, fornecendo possível explicação para o acúmulo da EME, em que as setas indicam extensão da metabolização.

Já para a BZE, é possível que os dois processos estivessem em equilíbrio e, por isso, as concentrações observadas não sofreram grandes flutuações.

Para as amostras-controle acondicionadas em geladeira, observa-se que a cocaína apresentou variação menor que 20% nos primeiro e terceiro mês de incubação, porém, no sexto mês as análises dos controles baixo e médio apresentaram diminuição na concentração em mais de 20% (-29,4% e -27,9%, respectivamente) e o controle alto apresentou queda de 18,1%, conforme ilustram a Tabela 15 e a Figura 35.

Tabela 15 - Valores de porcentagem de variação obtidos para as análises de estudo de estabilidade em amostras-controles de sangue total acondicionadas em geladeira

SANGUE TOTAL		Tempo de análise								
		1 mês			3 meses			6 meses		
Matriz	Analito	CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA
GELADEIRA	EME	2,39	1,75	3,62	-12,14	-24,46	-23,16	-48,89	-46,94	-45,95
	COCAÍNA	-16,57	-7,88	-6,6	-11,31	-19,7	-16,63	-29,39	-27,93	-18,08
	BZE	4,81	3,2	1,52	19,42	12,06	4,66	9,56	16,14	9,72

Legenda: EME: éster metilecgonina; BZE: benzoilecgonina; CQB: controle de qualidade baixo; CQM: controle de qualidade médio; CQA: controle de qualidade alto.

Figura 35: Perfil de estabilidade obtido na análise das amostras-controle incubadas em geladeira para cocaína (COC), éstermetilecgonina (EME) e benzoilecgonina (BZE).

Portanto, é possível afirmar que, nas condições em que o trabalho foi realizado, a cocaína mantém sua estabilidade química até o terceiro mês. Para conhecer o período exato em que a variação da concentração da cocaína ainda se mantém dentro dos limites considerados aceitáveis seriam necessárias análises intermediárias entre o terceiro e sexto mês.

Assim, comparando com o que foi observado para o acondicionamento em *freezer*, tais dados corroboram conclusões de trabalhos realizados anteriormente, sugerindo maior estabilidade para a cocaína no acondicionamento em *freezer* que no acondicionamento em geladeira.

Quando se considera a EME sob as mesmas condições de armazenamento (geladeira), observa-se que já no terceiro mês houve queda de concentração acima de 20% para os controles médio e alto (-24,5% e -23,2%, respectivamente). No sexto mês, o perfil de queda na concentração se acentuou e a análise das concentrações revelou queda de concentração próxima a 50% (-48,9; -46,9 e -45,9 para os controles baixo, médio e alto, respectivamente). Esses dados mais uma vez indicam a importância do fator temperatura sobre a estabilidade dos analitos em questão. Uma vez que, em contraposição ao que foi discutido para o comportamento da concentração da EME em *freezer*, em que foi observado aumento da concentração da EME no primeiro mês de incubação, o aumento da temperatura em que as amostras foram acondicionadas favoreceu os processos de degradação da cocaína e da EME de maneira generalizada e, por isso, uma diminuição importante da concentração da EME foi observada logo no terceiro mês de incubação.

Já a análise das concentrações de BZE nas amostras incubadas, mostra que a BZE apresentou variação de concentração abaixo de 20%, ou seja, a porcentagem de variação não extrapolou os limites de precisão e exatidão do método. Assim, de maneira geral, para amostras de sangue total acondicionadas em geladeira, sugere-se que apenas a BZE apresentou equilíbrio entre os dois processos desde o início e, por isso, as concentrações observadas não sofreram grandes flutuações.

Diante de tais observações, seria possível se conjecturar a respeito da eficiência da redução da temperatura quando aplicada isoladamente, excluindo a necessidade de adição de agentes conservantes em amostras de sangue. Porém, apesar de neste estudo não ter sido proposto comparar tais cenários, além do fato das amostras aqui analisadas serem sempre adicionadas de NaF, estudos demonstram que a utilização das duas ferramentas concomitantemente é a mais impactante, garantindo baixas variações na concentração da cocaína presente em amostras de sangue acondicionadas por longos períodos de tempo (ISENSCHMID *et al.*, 1989; KISZKA *et al.*, 2001).

4.2.1.2. Análise do perfil de estabilidade em diferentes temperaturas de acondicionamento das amostras reais

A análise das concentrações de amostras reais, apresenta variações nas concentrações as quais são, de certa forma, diferentes do que foi observado nas amostras-controle. Os dados seguem ilustrados nas Tabela 16 e 17 e nas Figura 36 e 37.

Para as amostras reais armazenadas em *freezer*, a cocaína, de maneira geral, apresentou variação na concentração menor que 20% até o sexto mês, à exceção da amostra 05, que no sexto mês apresentou diminuição de 24,2% em sua concentração.

Os dados observados para BZE apresentam comportamento semelhante no perfil de degradação da cocaína, em que, de maneira geral, apresentou variação na concentração menor que 20% até o sexto mês, à exceção da amostra 07 que apresentou aumento de 34,2% e 26,7% na concentração de BZE no terceiro e sexto mês, respectivamente.

Já para a EME, a queda da concentração das amostras de 01 a 06 foi maior que 20%, no primeiro mês. No terceiro mês, a única amostra que apresentou redução na concentração maior que 20%, em relação ao dia da incubação, foi a amostra 05. Ou seja, de maneira geral, foi observado um aumento na concentração da EME no terceiro mês e, tal aumento, foi particularmente importante para as amostras 04 e 07 que apresentaram aumento na concentração de tal forma que extrapolaram o limite de 20% aceitável (22,97% e 26,97%, respectivamente). No sexto mês, as amostras 01, 02, 05 e 06 apresentaram queda na concentração maior que 20%, as demais apresentaram variação na concentração dentro dos limites aceitáveis.

Tabela 16 - Valores de porcentagem de variação obtidos para as análises de estudo de estabilidade em amostras reais de sangue total acondicionadas em *freezer*

<i>FREEZER</i>		Tempo de análise							
		1 mês							
Matriz	Analito	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Amostra 7	Amostra 8
Sangue Total	EME	-35,64	-29,44	-20,14	-21,27	-33,68	-29,80	-1,55	-9,13
	COCAÍNA	-	-5,22	2,96	-0,70	-4,82	-2,03	-0,21	4,28
	BZE	-12,55	-0,62	2,88	1,13	8,08	0,09	18,19	10,53
		3 meses							
Matriz	Analito	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Amostra 7	Amostra 8
Sangue Total	EME	-6,86	-14,47	8,17	22,97	-20,20	-4,78	26,97	8,42
	COCAÍNA	-	-4,15	2,80	-10,66	-17,14	-8,12	-4,22	-5,47
	BZE	-0,08	2,89	14,34	6,47	4,51	5,06	34,15	13,22
		6 meses							
Matriz	Analito	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Amostra 7	Amostra 8
Sangue Total	EME	-32,20	-40,55	-14,57	-0,99	-48,31	-30,43	0,48	-0,62
	COCAÍNA	-	2,82	0,62	-12,46	-24,17	-5,18	5,73	1,76
	BZE	1,07	0,62	17,61	10,73	-8,38	-4,48	26,72	13,20

Legenda: EME: éster metilecgonina; BZE: benzoilecgonina.

Figura 36: Perfil de estabilidade obtido na análise das amostras reais incubadas em *freezer* para cocaína (COC), éstermetilecgonina (EME) e benzoilecgonina (BZE).

O aumento da concentração da BZE para a amostra 07 e o aumento da concentração da EME para as amostras 04 e 07 observados, se deve ao fato já discutido para a EME em amostras-controle, em que, inicialmente, as amostras foram preparadas com iguais concentrações de cocaína, EME e BZE e, por ocorrerem dois processos simultaneamente, o de degradação e o de formação de metabólitos, é possível inferir que para algumas amostras um dos processos se apresente de maneira mais acentuada que outro, acarretando resultados diferenciados, fazendo com que, por vezes, se observe aumento da concentração de alguns metabólitos.

Apesar de terem sido observadas algumas exceções, de maneira geral, o perfil de variação nas concentrações da cocaína e da BZE presentes em amostras reais acondicionadas em *freezer* foi semelhante ao que foi observado para amostras-controle, em que a variação na concentração se manteve dentro dos limites aceitáveis até o sexto mês de análise. Porém, ainda que tenha sido observada uma tendência no perfil de degradação dos analitos nas amostras reais, algumas exceções foram observadas, e tais exceções serão discutidos a seguir.

Para as amostras reais armazenadas em **geladeira**, observou-se que, a cocaína apresentou variação menor que 20% no primeiro mês de incubação, à exceção da amostra 05,

que apresentou queda na concentração de 23,2%. No terceiro mês, à exceção da amostra 02, de maneira geral, houve queda acima de 20% da concentração de cocaína nas amostras analisadas. Conforme ilustram a Tabela 17 e a Figura 37. No sexto mês, o perfil de queda na concentração da cocaína se confirmou, ao ponto que para a amostra 04 não foi detectada a presença de cocaína. Portanto, observa-se que a cocaína manteve-se estável até o primeiro mês de incubação para a cocaína em amostras de sangue acondicionadas em geladeira, já apresentando nível de degradação acima do limite de aceitável no terceiro mês, à exceção da amostra 02 em que a cocaína se mostrou estável até o sexto mês. Isso é diferente do que foi observado para as amostras-controle em que a cocaína se mostrou estável até o terceiro mês em amostras de sangue acondicionadas em geladeira. Salienta-se que a amostra 01 não apresentou resultado positivo para cocaína, e foi selecionada para estudo, a fim de possibilitar a análise do comportamento dos metabólitos da cocaína.

Tabela 17 - Valores de porcentagem de variação obtidos para as análises de estudo de estabilidade em amostras reais de sangue total acondicionadas em geladeira

GELADEIRA		Tempo de análise							
		1 mês							
Matriz	Analito	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Amostra 7	Amostra 8
Sangue Total	EME	-38,32	-29,52	-19,27	-8,15	-39,80	-29,65	-4,40	-34,57
	COCAÍNA	-	-5,25	-11,44	-6,73	-23,24	-6,04	-6,06	-5,81
	BZE	-12,56	-0,02	-0,56	-0,97	7,68	-2,10	15,30	-14,67
		3 meses							
Matriz	Analito	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Amostra 7	Amostra 8
Sangue Total	EME	-35,53	-15,61	0,35	-11,02	-33,27	-9,58	32,06	-1,01
	COCAÍNA	-	-10,52	-27,12	-44,16	-40,81	-24,49	-21,26	-22,50
	BZE	-24,46	11,90	16,99	-5,03	42,80	8,88	54,32	11,44
		6 meses							
Matriz	Analito	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Amostra 7	Amostra 8
Sangue Total	EME	-53,11	-38,50	-37,54	-45,10	-51,31	-33,06	-8,48	-25,84
	COCAÍNA	-	-3,26	-49,21	-100,00	-48,29	-26,89	-32,01	-34,89
	BZE	-14,23	13,19	7,30	-6,78	59,24	5,44	62,79	8,95

Legenda: EME: éster metilecgonina; BZE: benzoilecgonina

GELADEIRA

Figura 37: Perfil de estabilidade obtido na análise das amostras reais em geladeira para cocaína (COC), éstermetilecgonina (EME) e benzoilecgonina (BZE).

Para EME, as amostras 01, 02, 05, 06 e 08 apresentaram diminuição na concentração maior que 20% no primeiro mês. Porém, no terceiro mês, à exceção da amostra 04, todas as outras apresentaram aumento na concentração de EME. E, no sexto mês, houve redução na concentração de todas as amostras. Esta redução se deu de tal forma que excedeu o limite de 20% considerado aceitável, à exceção da amostra 07. Este perfil de comportamento foi diferente do que foi observado para amostras-controle acondicionadas em geladeira, em que foi observada queda na concentração da EME já no terceiro mês.

Já as concentrações de BZE não extrapolaram o limite de 20% de variação no primeiro mês. No terceiro mês, de maneira geral, a concentração de BZE nas amostras também não extrapolaram o limite de 20% de variação, às exceções se devem à amostra 01, que apresentou queda de -24,5%, e às amostras 05 e 07, que apresentaram variação positiva na concentração, apresentando aumento de 42,8% e 54,3% em sua concentração em relação à concentração inicial. Este mesmo perfil foi observado no sexto mês, em que amostras não extrapolaram o limite de 20% de variação, à exceção das amostras 05 e 07, que apresentaram variação positiva

na concentração, apresentando aumento de 59,2% e 62,8% em sua concentração em relação à concentração inicial, demonstrando uma tendência em aumento de concentração para as amostras 05 e 07. Os dados para a BZE se mostram de tal forma que mais uma vez é possível supor que as vias de formação e degradação da BZE se mantiveram em equilíbrio e, por isso, sua concentração se manteve dentro dos limites de variação aceitáveis.

Assim, comparando os dados de variação de concentração para amostras reais conservadas em geladeira com os dados para amostras-controle, observa-se que, a cocaína apresentou, de maneira geral, perfil de degradação mais pronunciado nas amostras reais que nas amostras-controle. Também foram observadas diferenças no perfil de variação da concentração da EME nas amostras-controle em relação às amostras reais, possivelmente refletindo o comportamento da cocaína nesses dois grupos de amostra.

As diferenças observadas entre as amostras-controle e amostras reais podem ser atribuídas ao fato de que as amostras-controle foram preparadas a partir de um *pool* de amostras de sangue negativo, ou seja, amostras de sangue negativo de diferentes indivíduos foram misturadas a fim de se preparar o sangue negativo ao qual os analitos nas concentrações dos controles seriam adicionados. Esse processo acaba por homogeneizar as condições da matriz e, assim, as discrepâncias observadas nas amostras reais não se reproduzem nas amostras-controle. Porém, se os controles fossem adicionados em diferentes amostras de sangue individualizadas, é possível que as discrepâncias fossem evidenciadas. Por isso, o presente trabalho se propôs a analisar amostras reais positivas, já que, neste universo de amostras, as variabilidades individuais evidenciariam as discrepâncias.

Essa variabilidade encontrada no perfil de estabilidade das amostras reais em contraposição à maior homogeneidade e previsibilidade nas amostras-controle pode ilustrar o impacto da conhecida complexidade de amostras de sangue *post mortem* em análises quantitativas. Muitos fatores desconhecidos acerca da composição do sangue de amostras reais influenciam o perfil de estabilidade dos compostos, como por exemplo, a presença de outras substâncias a que o indivíduo foi exposto no período *ante mortem* que podem alterar o pH sanguíneo, ou, então, colocar no cenário substâncias que podem competir pelo sítio ativo das enzimas envolvidas no processo de metabolização da cocaína, já que as esterases são enzimas inespecíficas e atuam na metabolização de diversos compostos. Além disso, a diferença na atividade das esterases plasmáticas pode contribuir para as diferenças observadas, uma vez que o nível de atividade enzimática é característico de cada indivíduo e determinado geneticamente (ISENSCHMID *et al.*, 1989; KISZKA *et al.*, 2001).

Além disso, as condições a que os cadáveres foram expostos antes da coleta do sangue, influenciam o estágio de putrefação em que a amostra se encontra no momento de sua manipulação, uma vez que reflete no nível de acidificação da amostra, o que por sua vez, reflete na estabilidade dos compostos analisados (SKOPP, 2004).

Isenschmid e colaboradores (1989) fizeram um amplo estudo para analisar os fatores que influenciam a estabilidade da cocaína em sangue. E, assim como os dados para amostras reais de sangue total aqui apresentados sugere, os autores perceberam que havia considerável variação na estabilidade da cocaína entre as diferentes amostras de sangue *post mortem* consideradas e, por sua vez, na taxa de formação de EME, o que implica maior dificuldade na análise dos dados obtidos de concentração de cocaína e seus metabólitos.

Portanto, diversos fatores estão envolvidos na degradação química da cocaína e seus metabólitos e, por isso, a análise de amostras reais revela dados que fogem ao observado nas amostras-controle.

4.2.2. Resultados obtidos da análise de amostras de DBS

4.2.2.1. Análise do perfil de estabilidade de amostras-controle acondicionadas sob diferentes temperaturas

A análise dos dados de porcentagem de variação na concentração para amostras-controle incubadas mostra que, quando armazenadas em *freezer*, nenhum dos compostos aqui considerados apresentou queda na concentração maior que 20% durante todo o período do estudo, conforme pode ser observado na Tabela 18 e na Figura 38. A variação na concentração da EME, para os controles médio e alto, apresentou aumento de 23,1% e 20,8% na concentração, respectivamente, no primeiro mês. No terceiro mês, a variação se manteve dentro dos limites aceitáveis de variação. E, no sexto mês, o aumento de concentração para os controles médio e alto extrapolou novamente o limite de 20% (20,2% e 25,3%, respectivamente).

Já a variação nas concentrações da BZE manteve-se dentro dos limites aceitáveis de variação, à exceção das amostras dos controles médio e alto, que, no primeiro mês, apresentaram variação positiva de 34,9% e 39,5%.

Tabela 18 – Valores de porcentagem de variação obtidos para as análises de estudo de estabilidade para amostras-controle em DBS acondicionadas em *freezer*

DBS		Tempo de análise								
		1 mês			3 meses			6 meses		
Matriz	Analito	CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA
FREEZER	EME	-0,43	23,1	20,8	7,52	7,29	13,68	16,83	20,19	25,32
	COCAÍNA	-5,08	7,0	16,81	-9,41	-7,48	2,42	-2,04	2,72	12,93
	BZE	15,61	34,89	39,49	0,68	1,13	6,75	11,7	10,34	9,48

Legenda: EME: éster metilecgonina; BZE: benzoilecgonina; CQB: controle de qualidade baixo; CQM: controle de qualidade médio; CQA: controle de qualidade alto.

Figura 38: Perfil de estabilidade obtido na análise das amostras-controle em DBS incubadas em *freezer* para cocaína (COC), éster metilecgonina (EME) e benzoilecgonina (BZE).

Quando considerado o acondicionamento em geladeira, para todas as amostras de controle em DBS, a variação na concentração dos analitos se comportou, de maneira geral, como as amostras armazenadas em *freezer*, em que nenhum dos compostos aqui considerados apresentou queda na concentração maior que 20% durante todo o período de tempo do estudo. Porém, a BZE nas amostras de controles médio e alto apresentaram, no primeiro mês, aumento na concentração de 31,15% e 35,25% no primeiro mês. Como pode ser observado na Tabela 19 e na Figura 39.

As exceções observadas para a BZE e para a EME, que apresentaram aumento de concentração em algumas amostras, assim como já explicado para as amostras de sangue total, se devem ao fato de que quando incubadas, as amostras foram preparadas com a adição de concentrações iguais de cocaína, BZE e EME. Considerando o fato do processo de metabolização não ser totalmente suprimido, mesmo *in vitro*, com o transcorrer do tempo, a cocaína é convertida a EME e a BZE, bem como esses compostos estão sendo degradados. Assim, a variação na concentração dos metabólitos da cocaína será resultado de um balanço entre a formação e degradação desses compostos.

Para amostras-controle em DBS armazenadas em temperatura ambiente, observa-se que, para a cocaína, a variação na concentração manteve-se dentro dos limites aceitáveis, apenas no primeiro mês. No terceiro mês, apenas o controle alto manteve a variação abaixo de 20%. E, por fim, no sexto mês, todas as amostras apresentaram queda acima de 20% na concentração. Um perfil de variação semelhante foi observado para a EME, em que, a partir do terceiro mês, a queda na concentração foi maior que 20%. Já para a BE, nenhuma amostra apresentou queda de concentração acima dos limites aceitáveis, porém, em temperatura ambiente, a BE, em seus controles médio e alto no primeiro e no sexto mês apresentaram aumento maior que 20% na concentração. Conforme ilustram a Tabela 20 e a Figura 40.

Tabela 19 – Valores de porcentagem de variação obtidos para as análises de estudo de estabilidade para amostras-controle em DBS acondicionadas em *freezer*

DBS		Tempo de análise								
		1 mês			3 meses			6 meses		
Matriz	Analito	CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA
GELADEIRA	EME	3,15	14,85	17,72	-2,22	2,78	13,32	11,94	16,14	26,38
	COCAÍNA	-7,48	3,16	15,28	-14,2	-6,17	6,48	-6,69	-2,24	14,39
	BZE	12,05	31,15	35,25	-6,33	4,85	10,56	7,05	8,02	17,42

Legenda: EME: éster metilecgonina; BZE: benzoilecgonina; CQB: controle de qualidade baixo; CQM: controle de qualidade médio; CQA: controle de qualidade alto.

Figura 39: Perfil de estabilidade obtido na análise das amostras-controle em DBS incubadas em geladeira para cocaína (COC), éstermetilecgonina (EME) e benzoilecgonina (BZE).

Tabela 20 – Valores de porcentagem de variação obtidos para as análises de estudo de estabilidade para amostras-controle em DBS acondicionadas em temperatura ambiente.

DBS		Tempo de análise								
		1 mês			3 meses			6 meses		
Matriz	Analito	CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA
TEMPERATURA AMBIENTE	EME	-15,01	-3,87	1,93	-37,71	-44,13	-37,92	-57,33	-64,85	-63,59
	COCAÍNA	-8,27	0,10	3,97	-26,31	-26,72	-17,14	-41,81	-37,53	-35,69
	BZE	19,22	31,15	35,38	9,77	5,85	13,42	14,81	21,60	27,36

Legenda: EME: éster metilecgonina; BZE: benzoilecgonina; CQB: controle de qualidade baixo; CQM: controle de qualidade médio; CQA: controle de qualidade alto.

Figura 40: Perfil de estabilidade obtido na análise das amostras-controle incubadas em temperatura ambiente para cocaína (COC), éstermetilecgonina (EME) e benzoilecgonina (BZE).

Nesse mesmo contexto, em que se propõe realizar estudos de estabilidade em amostras biológicas, alguns autores, assim como no presente trabalho, já vêm reportando o comportamento de certas substâncias em DBS. Assim, Alfazil e colaboradores (2008) estudaram o comportamento da cocaína em DBS e demonstraram que sua estabilidade é mantida por um mês, quando as amostras são acondicionadas a -20°C e 4°C, sendo estável também em temperatura ambiente, porém, apresentando perda de 19,9%, em um mês, no limite do considerado aceitável.

Ainda, nesse mesmo contexto, Alfazil (2009) estudou a estabilidade da cocaína em DBS, sob diferentes temperaturas, e reportou que, quando as amostras são acondicionadas em *freezer*, a concentração de cocaína apresentou perda de, aproximadamente, 31% já no terceiro mês. Quando incubadas em geladeira, a concentração de cocaína encontrada no segundo mês foi 30% menor que a concentração inicial e, em temperatura ambiente, já no 14º dia apresentou queda de 20,9% em sua concentração.

A diferença no perfil de estabilidade encontrada nos trabalhos de Alfazil (2009), Alfazil e colaboradores (2008) e no presente trabalho pode ser explicada pelos tipos de amostras utilizadas. Uma vez que nos trabalhos mencionados foram utilizados concentrados de células vermelhas ressuspendidas em solução salina isotônica, com adição de anticoagulante, ou seja, utilizou-se um preparado que se *assemelhava* a sangue em oposição ao presente trabalho, que se utilizou de amostras reais de sangue de cadáver, amostras conhecidamente mais ácidas, em virtude dos processos de putrefação já mencionados. Por outro lado, o fato de não ter sido utilizado sangue verdadeiro, o nível de degradação da cocaína pode ter subestimado, uma vez que a substituição do plasma pela solução salina possivelmente reduziu a disponibilidade de esterases plasmáticas, principal responsável pela degradação da cocaína em sangue. Esse questionamento foi levantado por Fuller e colaboradores (entre 2008 e 2017), cujos resultados mostram que a cocaína apresentou queda em sua concentração de 44% já no 14º dia, quando acondicionada em temperatura ambiente, queda muito maior que a observada por Alfazil (2009). Uma possível explicação reside no fato de que Fuller e colaboradores utilizaram amostras de sangue real coletadas em tubos contendo EDTA não adicionados de agentes conservantes. Assim, é possível levantar a hipótese de que o trabalho descrito por Fuller e colaboradores é mais próximo do real, quando comparado ao trabalho de Alfazil e colaboradores (2008), em que, devido à ausência das esterases, a estabilidade encontrada por este último grupo foi melhor.

Dessa forma, observa-se que a estabilidade da cocaína nas amostras analisadas sob as condições propostas no presente trabalho foi maior que a estabilidade dos trabalhos expostos.

Considerando que todos os trabalhos mencionados analisam amostras de DBS, a diferença reside no fato de que a coleção de amostras utilizada no presente trabalho era composta de sangue de cadáver adicionado de NaF. O que impõe dois fatores considerados primordiais no ganho em estabilidade observado no presente trabalho. O primeiro fator é a maior acidez de amostras de sangue de cadáver em relação a amostras de sangue no geral, que inibe a ocorrência de hidrólise química. O segundo fator é a adição de NaF que, por sua vez, inibe a ocorrência de hidrólise enzimática. Assim, é possível supor que tais fatores diferenciam as amostras consideradas no presente trabalho das amostras utilizadas nos estudos aqui mencionados e propõe possíveis explicações para as diferenças encontradas. (ISENSCHMID *et al.*, 1989; LUSTHOF; BOSMAN, 2011; KERRIGAN, 2011; KISZKA *et al.*, 2001).

4.2.2.2. Análise do perfil de estabilidade de amostras reais acondicionadas sob diferentes temperaturas

Considerando os dados obtidos através da análise de amostras reais, observa-se que a cocaína manteve sua variação em concentração dentro dos limites aceitáveis no período de estudo, independente se as amostras foram acondicionadas em geladeira ou *freezer*, assim como foi observado nas amostras-controle. Em que, de todos os dados, a única exceção observada foi para a amostra 04, que, no terceiro mês, apresentou variação positiva acima de 20% (22,20%), na análise do material acondicionado em geladeira, conforme ilustram as Tabelas 21 e 22 e nas Figuras 41 e 42.

Já a EME, como pode ser observado nas mesmas tabelas, para todas as amostras analisadas, apresentou variação dentro dos limites aceitáveis, nas condições de armazenamento em geladeira e *freezer*. O mesmo foi observado para a BZE, porém, com uma exceção, em que a amostra 02 apresentou queda na concentração acima de 20% (-21,1%) para o material acondicionado em *freezer*, no terceiro mês de análise.

Essas observações permitem inferir que, de maneira geral, as amostras reais aplicadas em DBS e acondicionadas sob refrigeração (geladeira ou *freezer*) apresentaram um perfil de estabilidade semelhante ao que foi exposto para as amostras-controle, em que os compostos se mantêm estáveis sob as condições mencionadas durante todo o período de estudo, diferente do que foi descrito para as amostras de sangue total não aplicadas em papel.

Tabela 21 – Valores de porcentagem de variação obtidos para as análises de estudo de estabilidade para amostras reais em DBS acondicionadas em *freezer*

<i>FREEZER</i>		Tempo de análise							
		1 mês							
Matriz	Analito	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Amostra 7	Amostra 8
DBS	EME	-4,87	8,88	6,75	-12,46	-2,86	-2,03	-3,21	-0,28
	COCAÍNA	-	-5,12	13,36	8,81	-5,27	-5,78	-11,81	4,62
	BZE	1,00	-12,16	13,72	10,60	6,47	-3,87	-6,41	6,03
		3 meses							
Matriz	Analito	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Amostra 7	Amostra 8
DBS	EME	8,42	-3,66	-3,11	-4,95	6,50	-2,28	0,26	1,84
	COCAÍNA	-	-3,77	5,47	19,30	-4,65	-6,58	-8,29	5,60
	BZE	8,19	-21,07	-2,02	3,08	2,23	-8,34	-6,64	-5,98
		6 meses							
Matriz	Analito	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Amostra 7	Amostra 8
DBS	EME	4,09	2,22	15,36	-3,03	7,63	7,11	0,83	3,06
	COCAÍNA	-	10,69	14,45	9,33	3,77	5,95	-2,65	6,42
	BZE	1,21	-2,97	0,33	1,51	3,20	-6,27	-8,01	-10,10

Legenda: EME: éster metilecgonina; BZE: benzoilecgonina.

FREEZER

Figura 41: Perfil de estabilidade obtido na análise das amostras reais em *freezer* para cocaína (COC), éstermetilecgonina (EME) e benzoilecgonina (BZE).

-Tabela 22 – Valores de porcentagem de variação obtidos para as análises de estudo de estabilidade para amostras reais em DBS acondicionadas em geladeira

GELADEIRA		Tempo de análise							
		1 mês							
Matriz	Analito	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Amostra 7	Amostra 8
DBS	EME	-1,34	2,78	-3,87	-14,42	2,52	-5,81	-5,81	1,54
	COCAÍNA	-	-10,33	1,29	6,83	-3,62	-4,14	-8,89	0,39
	BZE	-1,02	-10,52	0,36	1,48	7,36	-4,32	-5,63	-2,70
		3 meses							
Matriz	Analito	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Amostra 7	Amostra 8
DBS	EME	0,75	-6,49	2,84	-12,61	7,21	4,07	-2,57	-2,34
	COCAÍNA	-	-6,23	7,06	22,20	-4,17	-5,84	-6,43	-0,49
	BZE	0,68	-19,94	-6,39	5,47	6,87	-8,24	-6,45	-6,90
		6 meses							
Matriz	Analito	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Amostra 7	Amostra 8
DBS	EME	-6,77	1,15	15,22	-1,23	4,68	13,16	7,75	1,43
	COCAÍNA	-	6,59	15,90	19,31	2,21	6,18	-1,25	8,50
	BZE	1,16	-5,64	4,32	9,15	10,49	-2,19	-9,35	-4,61

Legenda: EME: éster metilecgonina; BZE: benzoilecgonina.

GELADEIRA

Figura 42: Perfil de estabilidade obtido na análise das amostras reais em geladeira para cocaína (COC), éstermetilecgonina (EME) e benzoilecgonina (BZE).

Por outro lado, para as amostras reais de DBS incubadas a temperatura ambiente, a cocaína não apresentou variação acima de 20% na análise realizada no primeiro mês de incubação, fato que se repetiu no terceiro mês, para cinco das sete amostras analisadas e que apresentam cocaína inicialmente, em que a amostra 02 apresentou diminuição na concentração de 21,6% e a amostra 07 apresentou diminuição na concentração de 22%. No sexto mês, à exceção da amostra 03, a redução na concentração de todas as amostras foi maior que 20%, conforme ilustra Tabela 23 e a Figura 43.

Para a EME, as amostras reais tiveram queda na concentração dentro dos limites de variação aceitável no primeiro mês, à exceção das amostras 01, 04 e 05. No terceiro e sexto mês todas as amostras apresentaram queda na concentração acima de 20%.

Já para a BZE, nenhuma amostra apresentou diminuição importante na concentração, do primeiro ao sexto mês de análise. À exceção de duas amostras, todas apresentaram variação dentro dos limites aceitáveis. As exceções se devem à amostra 02, que no sexto mês apresentou aumento na concentração de 22,6% e, à amostra 05, que no sexto mês apresentou aumento na concentração de 46,1%.

Tabela 23 - Valores de porcentagem de variação obtidos para as análises de estudo de estabilidade para amostras reais em DBS acondicionadas em temperatura ambiente

TEMPERATURA AMBIENTE		Tempo de análise							
		1 mês							
Matriz	Analito	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Amostra 7	Amostra 8
DBS	EME	-20,11	-7,41	-14,46	-29,55	-25,68	-8,26	-15,03	-11,04
	COCAÍNA	-	-14,91	-1,03	4,24	-7,55	-13,24	-13,17	-4,05
	BZE	0,85	-13,60	-6,35	2,47	7,38	-7,53	-5,34	-6,13
		3 meses							
Matriz	Analito	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Amostra 7	Amostra 8
DBS	EME	-48,99	-21,02	-30,35	-63,85	-55,13	-27,81	-28,12	-33,70
	COCAÍNA	-	-21,59	-12,57	-2,50	-16,49	-17,62	-21,98	-16,49
	BZE	4,73	-13,53	-2,63	4,71	27,04	-5,58	-8,79	-14,07
		6 meses							
Matriz	Analito	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Amostra 7	Amostra 8
DBS	EME	-72,39	-34,32	-60,48	-82,65	-79,55	-53,94	-48,38	-53,66
	COCAÍNA	-	-20,96	-18,93	-31,81	-28,58	-22,86	-30,38	-20,45
	BZE	6,94	22,63	-4,09	-2,41	46,05	1,87	2,25	-15,69

Legenda: EME: éster metilecgonina; BZE: benzoilecgonina.

TEMPERATURA AMBIENTE

Figura 43: Perfil de estabilidade obtido na análise das amostras reais em temperatura ambiente para cocaína (COC), éstermetilecgonina (EME) e benzoilecgonina (BZE).

Assim, para temperatura ambiente, diferente do que foi observado para amostras acondicionadas sob refrigeração, nota-se algumas exceções nos perfis de estabilidade dos compostos analisados.

A diferença observada no perfil de estabilidade da cocaína entre as amostras-controle e amostras reais em DBS, quando acondicionadas sob refrigeração ou não, pode ser explicada pelo fato de que em temperaturas reduzidas, em conjunto com os outros fatores inibidores, os processos de degradação estejam de tal forma reduzidos, que as substâncias se mantenham estáveis e, assim, não é possível notar as diferenças no perfil de degradação, já que os valores de concentração se mantêm dentro dos limites de variação aceitáveis. Assim, quando as amostras são acondicionadas em temperatura ambiente, os processos de degradação não estão fortemente inibidos permitindo visualizar as diferenças no comportamento das amostras reais entre si, as quais decorrem da acentuada heterogeneidade das amostras, fato já discutido para amostras de sangue não aplicados em papel.

4.2.2.3. Análise da diferença de perfil de estabilidade dos compostos em DBS com ênfase na diferença de temperatura de acondicionamento

A análise dos dados referentes à estabilidade da cocaína e seus metabólitos em DBS mostra que, se as amostras forem acondicionadas sob refrigeração, esses compostos se mantêm estáveis por um período de seis meses, independente se o acondicionamento foi em geladeira ou *freezer*. Isso porque a concentração desses compostos na grande maioria das amostras, excetuando uma apenas (BZE na amostra 02 – acondicionamento em *freezer* no terceiro mês), não caiu além do limite de variação aceitável de 20% em relação à concentração inicial. As Figuras 44, 45 e 46 ilustram as diferenças de concentração obtidas no sexto mês de incubação das amostras-controle, nas diferentes temperaturas de acondicionamento. Os gráficos apresentam o nível de significância da diferença entre o acondicionamento sob refrigeração em relação ao acondicionamento em temperatura ambiente.

Figura 44: Diferença de concentração de benzoilecgonina (BZE) obtida da análise das amostras, após seis meses de incubação, nas diferentes concentrações de controle, e nas diferentes condições de acondicionamento. Legenda: *** - p-valor<0,001, significância da diferença de concentração em relação ao acondicionamento em temperatura ambiente.

Figura 45: Diferença de concentração de cocaína (COC) obtida da análise das amostras, após seis meses de incubação, nas diferentes concentrações de controle, e nas diferentes condições de acondicionamento. Legenda: *** - p -valor $<0,001$; ** - p -valor $<0,01$, significância da diferença de concentração em relação ao acondicionamento em temperatura ambiente.

Figura 46: Diferença de concentração de éster metilecgonina (EME) obtida da análise das amostras, após seis meses de incubação, nas diferentes concentrações de controle, e nas diferentes condições de acondicionamento. Legenda *** - p -valor $<0,001$, significância da diferença de concentração em relação ao acondicionamento em temperatura ambiente.

Essa mesma tendência não foi observada para acondicionamento de amostras em temperatura ambiente, em que apenas a BZE se manteve estável durante o período de estudo, sendo que a cocaína se manteve estável até o terceiro mês, para maior parte das amostras e a EME se manteve estável até o primeiro mês, para maior parte das amostras.

Em consonância com esses dados apresentados, a análise estatística revela que o acondicionamento sob refrigeração das amostras garante melhora no perfil de estabilidade quando comparado com as amostras acondicionadas em temperatura ambiente. Por outro lado, a análise estatística mostra que não existe uma diferença significativa na melhora da estabilidade entre amostras armazenadas em geladeira ou *freezer*.

Portanto, é permitido dizer que, não havendo diferença significativa na melhora da estabilidade entre amostras armazenadas em geladeira ou *freezer*, é preferível acondicionar as amostras de DBS contendo cocaína e seus metabólitos em geladeira, tendo em vista redução de custos.

4.2.3. Análise da diferença de perfil de estabilidade dos compostos em DBS e em sangue total (SgT)

A análise dos dados das Tabelas 14, 16, 18 e 21 e das Figuras 33, 36, 38 e 41 apresentados permite dizer que a cocaína e seus metabólitos são estáveis em amostras de sangue adicionadas de NaF e acondicionadas em *freezer*, independentes se são amostras de DBS ou de sangue total (SgT). Porém, quando os dados são submetidos à análise estatística é possível observar uma diferença significativa em ambas as formas de amostragem, ainda que, de maneira geral, a estabilidade seja mantida em ambas, em que o acondicionamento em DBS fornece ganho ainda maior em estabilidade.

Por outro lado, a análise dos dados das Tabelas 15, 17, 19 e 22 e das Figuras 35, 37, 39 e 42 para amostras de sangue adicionadas de NaF e acondicionadas em geladeira já permite dizer que aplicar as amostras em DBS garante maior estabilidade dos compostos em relação às amostras de SgT. Assim, a análise estatística vem apenas confirmar esta conclusão.

Portanto, é permitido concluir que aplicar amostras de sangue em DBS é vantajoso, quando se objetiva alcançar maior estabilidade para cocaína e metabólitos, sendo possível inferir que o processo de secagem fornece a explicação para o aumento da estabilidade observado, uma vez que o processo de degradação desses compostos ocorre em meio aquoso, através de hidrólise química e enzimática, e no DBS a quantidade de água disponível para ocorrência dessas reações é mínima (ALFAZIL; ANDERSON, 2008). As Figuras 47 e 48

ilustram as diferenças de concentração obtidas no sexto mês de incubação das amostras-controle, quando em DBS ou em sangue total. Os gráficos apresentam o nível de significância da diferença de concentração entre DBS e sangue total, demonstrando haver diferença significativa entre as duas formas de amostragem.

Figura 47: Diferença de concentração de cocaína (COC), éstermetilecgonina (EME) e benzoilecgonina (BZE) obtida da análise das amostras, após seis meses de incubação, acondicionadas em freezer, nas diferentes concentrações de controle. Legenda: ***, **, * representam p-valor <0,001; p-valor <0,01; p-valor <0,05, respectivamente, e equivalem à significância da diferença de concentração entre DBS e sangue total.

Figura 48: Diferença de concentração de cocaína (COC), éstermetilecgonina (EME) e benzoilecgonina (BZE) obtida da análise das amostras, após seis meses de incubação, acondicionadas em geladeira, nas diferentes concentrações de controle. Legenda: ***, **, * representam p-valor <0,001; p-valor <0,01; p-valor <0,05, respectivamente, e equivalem à significância da diferença de concentração entre DBS e sangue total.

Alguns estudos já vêm demonstrando o perfil de estabilidade da cocaína em DBS. Ellefsen e colaboradores (2015) reportaram, em seu estudo de estabilidade da cocaína, BZE e norcocaína, que todos os analitos foram considerados estáveis em DBS sob todas as condições estudadas: 24h em temperatura ambiente, 72h a 4° e -20°C e após três ciclos de congelamento-descongelamento, resultado diferente do que foi observado em amostras de sangue não aplicadas em papel, em que a cocaína apresentou perda de 25% quando acondicionada a 4°C. As amostras utilizadas nesse trabalho não eram adicionadas de NaF.

Assim, diante dos fatos científicos aqui expostos, a fim de aumentar a estabilidade da cocaína em amostras de sangue, é preciso considerar quais técnicas não irão interferir na composição da amostra analisada, para que a análise não seja acometida de erros, sendo desaconselhadas a acidificação do meio e a adição de conservantes organofosforados. Por outro lado, o controle de temperatura e a presença de conservantes fluoretados, em conjunto, possuem efeito sinérgico e promovem aumento considerável da estabilidade da cocaína.

Finalmente, após os fatos discutidos, é possível acrescentar, como estratégia para promover aumento de estabilidade da cocaína e de seus metabólitos, o uso de amostras de sangue em papel, uma vez que esta técnica promove grande aumento de estabilidade dos

analitos, mantendo-os estáveis por, pelo menos, 6 meses, quando as amostras são acondicionadas em geladeira e *freezer*. Além disso, essa estratégia apresenta como vantagem adicional o fato de não interferir negativamente na análise dos demais compostos que, por ventura, estejam presentes nas amostras, sendo possível, inclusive, que o acondicionamento de sangue seco promova aumento de estabilidade dos demais analitos também, fato este que, obviamente, precisa ser avaliado.

4.3. Estudo de Estabilidade dos Benzodiazepínicos Seleccionados

A porcentagem de variação na concentração dos benzodiazepínicos estudados em sangue total ou em DBS, acondicionados sob diferentes temperaturas, seguem ilustrados nas Figuras 49 a 58, elaboradas com a finalidade de possibilitar a comparação dos resultados quando uma mesma amostra é acondicionada sob diferentes condições. As Tabelas 24 a 33 compilam os dados numéricos que geraram os gráficos em questão.

No caso do estudo dos benzodiazepínicos, as concentrações das **amostras-controle** eram 30 ng/mL para controle de qualidade baixo (CQB), 150 ng/mL para controle médio (CQM) e 400 ng/mL para controle alto (CQA). Já as **amostras reais positivas** são as que apresentaram resultado positivo para as substâncias seleccionadas nos exames toxicológicos oficiais.

Assim, os dados obtidos através da análise de amostras-controles e os dados obtidos da análise de amostras reais positivas seguem ilustrados separadamente nos gráficos e tabelas mencionados. As porcentagens de variação descritas foram obtidas a partir da relação obtida entre o valor de concentração obtido no dia do estudo de estabilidade (T_x) em relação ao valor de concentração inicial, obtido no dia da incubação das amostras (T_0).

4.3.1. Resultados obtidos da análise de amostras de sangue total (SgT)

4.3.1.1. Análise do perfil de estabilidade em diferentes temperaturas de acondicionamento das amostras-controle

A análise da tabela de variação na concentração para amostras-controle incubadas sugere que os benzodiazepínicos aqui considerados são estáveis por todo o período de tempo do estudo, quando as amostras são armazenadas em *freezer* e em geladeira, uma vez que as amostras analisadas apresentaram porcentagem de queda na concentração menor que 20%,

determinado como valor máximo de variação para considerar uma substância estável (SWGTOX, 2013). Conforme ilustram as Tabelas 24 e 25 as Figuras 49 e 50.

Tabela 24 - Valores obtidos para as análises de estudo de estabilidade de benzodiazepínicos para amostras-controles de sangue total acondicionadas em *freezer*.

SANGUE TOTAL		TEMPO DE ANÁLISE					
		1 mês			3 meses		
	ANALITO	CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA
FREEZER	ALPRAZOLAM	14,1	-12,3	-9,39	15,5	-9,88	-7,15
	DIAZEPAM	2,28	-1,86	-2,58	8,02	9,29	7,51

Legenda: CQB: controle de qualidade baixo; CQM: controle de qualidade médio; CQA: controle de qualidade alto.

Figura 49: Perfil de estabilidade obtido na análise das amostras-controle de sangue total incubadas em *freezer* para alprazolam (ALP) e diazepam (DZP).

Tabela 25 - Valores obtidos para as análises de estudo de estabilidade de benzodiazepínicos para amostras-controles em sangue total acondicionadas em geladeira.

SANGUE TOTAL		TEMPO DE ANÁLISE					
		1 mês			3 meses		
	ANALITO	CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA
GELADEIRA	ALPRAZOLAM	15,1	-10,9	-4,15	14,4	-9,70	-5,77
	DIAZEPAM	2,57	1,82	-0,97	7,60	9,15	7,40

Legenda: CQB: controle de qualidade baixo; CQM: controle de qualidade médio; CQA: controle de qualidade alto.

GELADEIRA

Figura 50: Perfil de estabilidade obtido na análise das amostras-controle incubadas em *freezer* para diazepam (DZP) e alprazolam (ALP).

4.3.1.2. Análise do perfil de estabilidade em diferentes temperaturas de acondicionamento das amostras reais

Para realizar o estudo de estabilidade de benzodiazepínicos em amostras reais foram disponibilizadas e incubadas 04 amostras reais que apresentavam alprazolam e diazepam em sua composição. Assim, as amostras 1 e 2 referem-se às amostras que continham diazepam e as amostras 3 e 4 referem-se às amostras que continham alprazolam. A observação dos dados obtidos a partir da análise de amostras reais mostra que as variações nas concentrações são, de maneira geral, semelhantes ao que foi observado nas amostras-controle, ou seja, em todo o período de tempo estudado, tanto o diazepam quanto o alprazolam apresentaram queda em sua concentração menor que 20%, independente se as amostras eram acondicionadas em *freezer* ou em *geladeira*. Conforme ilustram as Tabelas 26 e 27 e as Figuras 51 e 52.

Tabela 26 - Valores obtidos para as análises de estudo de estabilidade de benzodiazepínicos para amostras reais em sangue total acondicionadas em *freezer*.

FREEZER		TEMPO DE ANÁLISE			
		1 mês			
ANALITO	AMOSTRA	AMOSTRA	AMOSTRA	AMOSTRA	
	1	2	3	4	
ALPRAZOLAM	-	-	1,26	2,87	
DIAZEPAM	1,42	0,51	-	-	
		3 meses			
ANALITO	AMOSTRA	AMOSTRA	AMOSTRA	AMOSTRA	
	1	2	3	4	
ALPRAZOLAM	-	-	-7,26	5,21	
DIAZEPAM	11,0	10,8	-	-

Figura 51: Perfil de estabilidade obtido na análise das amostras reais incubadas em *freezer* para diazepam (DZP) e alprazolam (ALP).

Tabela 27 - Valores obtidos para as análises de estudo de estabilidade de benzodiazepínicos para amostras reais em sangue total acondicionadas em geladeira.

GELADEIRA		TEMPO DE ANÁLISE			
1 mês					
AMOSTRA	AMOSTRA	AMOSTRA	AMOSTRA	AMOSTRA	
ANALITO	1	2	3	4	
ALPRAZOLAM	-	-	-0,12	3,30	
DIAZEPAM	1,70	2,57	-	-	
3 meses					
AMOSTRA	AMOSTRA	AMOSTRA	AMOSTRA	AMOSTRA	
ANALITO	1	2	3	4	
ALPRAZOLAM	-	-	-9,72	3,12	
DIAZEPAM	9,81	9,55	-	-

Figura 52: Perfil de estabilidade obtido na análise das amostras incubadas em geladeira para diazepam (DZP) e alprazolam (ALP).

Como pôde ser observado, os compostos não apresentaram queda na concentração acima 20% para as amostras de sangue total em qualquer uma das condições estudadas, no período de 3 meses. Na literatura, foram encontrados achados experimentais semelhantes, conforme pode ser observado.

Skopp e colaboradores (1998) e Lufti (1998) realizaram estudos de estabilidade de benzodiazepínicos em sangue total **não** adicionados de agentes conservantes possibilitando analisar, isoladamente, o impacto da refrigeração sobre a estabilidade química dos benzodiazepínicos. Skopp e colaboradores (1998), realizaram um estudo de estabilidade de alguns benzodiazepínicos presentes em amostras de sangue total acondicionadas em geladeira (4°C) e reportaram terem recuperado, aproximadamente, 60% da concentração inicial de diazepam, após 60 dias de acondicionamento. Lufti (1998) também observou que o acondicionamento em geladeira (4°C) não era capaz de manter a estabilidade do diazepam, por períodos prolongados de tempo, já que foi relatada queda de 20% na concentração inicial do diazepam após um ano de acondicionamento, em oposição ao acondicionamento a -20°C que foi capaz de manter a estabilidade do composto pelo tempo proposto no estudo.

Apesar de ser conhecido o fato do diazepam estar sujeito à hidrólise, tipo de reação inibida pelo NaF, Robertson e Drummer (1998) relataram que, mesmo em amostras adicionadas de NaF, a conversão química do diazepam continuava ocorrendo, uma vez que o acondicionamento em geladeira (4°C) garantiu a estabilidade por apenas 10 meses. Por outro lado, quando as amostras foram acondicionadas a -20°C, a estabilidade do diazepam foi garantida por um período de 24 meses. Atanasov e colaboradores (2012) também buscaram estudar o efeito do NaF sobre a estabilidade do diazepam e, em seu trabalho, sugerem que a adição de NaF causou maior impacto sobre a estabilidade do diazepam em amostras acondicionadas em temperatura ambiente e em geladeira (4°C), porém, quando as amostras foram acondicionadas a -20°C, a presença de NaF não influenciou a estabilidade diazepam (baixa significância estatística).

Alfazil (2009) analisou o perfil de estabilidade do alprazolam e, após o período de 1 ano, sua concentração apresentou queda menor que 10% independente da forma de acondicionamento (em temperatura ambiente ou sob refrigeração) e da adição de agentes conservantes. Atribui-se a esse composto elevada estabilidade em virtude da presença do anel triazol que oferece proteção contra a abertura do anel de sete membros (FAWCETT; KRAVITZ, 1982; DIXON; MBEUNKUI; WIEGEL, 2015; ALFAZIL, 2009).

De maneira mais ampla, Alfazil (2009) também avaliou o efeito da adição de NaF sobre a estabilidade de diversos benzodiazepínicos, concluindo que a presença de NaF melhora a

estabilidade de alguns compostos dessa classe, porém o que é determinante para a estabilização desses compostos é a redução da temperatura.

O presente estudo não se propôs estudar o efeito da adição de NaF sobre a estabilidade dos benzodiazepínicos em amostras de sangue, porém alguns autores realizaram estudos de estabilidade com base nessa condição e observa-se o impacto positivo da adição de NaF nessa matriz biológica, principalmente se forem consideradas amostras que serão acondicionadas em temperaturas acima de -20°C (ROBERTSON; DRUMMER, 1995; ALFAZIL, 2009).

Assim, diante dos dados aqui reportados, é possível sugerir que o perfil de estabilidade alcançado no presente trabalho foi um pouco melhor que alguns dados publicados na literatura, possivelmente, em virtude das amostras analisadas no presente estudo serem sempre adicionadas de NaF, condição pré-determinada em virtude dos protocolos e procedimentos adotados no IML/SP, além de serem acondicionadas sob refrigeração. Dessa forma, por serem desconhecidas as circunstâncias a que as amostras de sangue podem ser submetidas, principalmente nas etapas de coleta e transporte, sugere-se a adição de NaF como estratégia adicional para garantir a maior estabilidade desses compostos (DRUMMER, 2004; SKOPP, 2004; ROBERTSON; DRUMMER, 1995).

4.3.2. Resultados obtidos da análise de amostras de DBS

4.3.2.1. Análise do perfil de estabilidade de amostras-controle acondicionadas sob diferentes temperaturas

A análise dos dados de porcentagem de variação na concentração para amostras-controle incubadas mostra que, para qualquer uma das temperaturas de acondicionamento (temperatura ambiente, geladeira e *freezer*), nenhum dos compostos aqui considerados apresentou queda na concentração maior que 20% durante todo o período do estudo, conforme pode ser observado nas Tabelas 28, 29 e 30 e nas Figuras 53, 54 e 55.

Tabela 28 - Valores obtidos para as análises de estudo de estabilidade de benzodiazepínicos para amostras-controle em DBS acondicionadas em *freezer*.

DBS		TEMPO DE ANÁLISE					
		1 mês			3 meses		
	ANALITO	CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA
<i>FREEZER</i>	ALPRAZOLAM	9,94	11,2	-15,9	-6,38	1,23	13,9
	DIAZEPAM	13,5	13,8	8,22	-5,58	5,15	14,5

Legenda: CQB: controle de qualidade baixo; CQM: controle de qualidade médio; CQA: controle de qualidade alto.

FREEZER

Figura 53: Perfil de estabilidade obtido na análise das amostras-controle em DBS incubadas em *freezer* para diazepam (DZP) e alprazolam (ALP).

Tabela 29 - Valores obtidos para as análises de estudo de estabilidade de benzodiazepínicos para amostras-controle em DBS acondicionadas em geladeira

DBS	ANALITO	TEMPO DE ANÁLISE					
		1 mês			3 meses		
		CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA
GELADEIRA	ALPRAZOLAM	12,7	-1,42	-16,4	-7,09	-0,79	7,46
	DIAZEPAM	5,19	10,8	5,06	1,13	9,37	14,7

Legenda: CQB: controle de qualidade baixo; CQM: controle de qualidade médio; CQA: controle de qualidade alto.

GELADEIRA

Figura 54: Perfil de estabilidade obtido na análise das amostras-controle em DBS acondicionadas em geladeira para diazepam (DZP) e alprazolam (ALP).

Tabela 30 - Valores obtidos para as análises de estudo de estabilidade de benzodiazepínicos para amostras-controle em DBS acondicionadas em temperatura ambiente.

DBS	ANALITO	TEMPO DE ANÁLISE					
		1 mês			3 meses		
		CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA
TEMPERATURA AMBIENTE	ALPRAZOLAM	5,23	-5,50	-19,5	-5,87	-9,31	10,9
	DIAZEPAM	6,99	3,01	3,54	-1,68	4,47	12,7

Legenda: CQB: controle de qualidade baixo; CQM: controle de qualidade médio; CQA: controle de qualidade alto.

TEMPERATURA AMBIENTE

Figura 55 - Perfil de estabilidade obtido na análise das amostras-controle em DBS acondicionadas em temperatura ambiente para diazepam (DZP) e alprazolam (ALP).

4.3.2.2. Análise do perfil de estabilidade de amostras reais acondicionadas sob diferentes temperaturas

A análise dos dados de porcentagem de variação na concentração para amostras reais incubadas mostra que, para qualquer uma das temperaturas de acondicionamento (temperatura ambiente, geladeira e *freezer*), nenhum dos compostos aqui considerados apresentou queda na concentração maior que 20% durante todo o período do estudo, conforme pode ser observado nas Tabelas 31, 32 e 33 e nas Figuras 56, 57 e 28.

Tabela 31 - Valores obtidos para as análises de estudo de estabilidade de benzodiazepínicos para amostras reais em DBS acondicionadas em *freezer*.

FREEZER		TEMPO DE ANÁLISE		
1 mês				
ANALITO	AMOSTRA 1	AMOSTRA 2	AMOSTRA 3	AMOSTRA 4
ALPRAZOLAM	-	-	-15,38	-5,87
DIAZEPAM	18,86	8,61	-	-
3 meses				
ANALITO	AMOSTRA 1	AMOSTRA 2	AMOSTRA 3	AMOSTRA 4
ALPRAZOLAM	-	-	0,59	3,84
DIAZEPAM	15.53	10.03		-

FREEZER

Figura 56 - Perfil de estabilidade obtido na análise das amostras reais em DBS acondicionadas em *freezer* para diazepam (DZP) e alprazolam (ALP).

Tabela 32 - Valores obtidos para as análises de estudo de estabilidade de benzodiazepínicos para amostras reais em DBS acondicionadas em geladeira.

GELADEIRA		TEMPO DE ANÁLISE		
1 mês				
ANALITO	AMOSTRA 1	AMOSTRA 2	AMOSTRA 3	AMOSTRA 4
ALPRAZOLAM	-	-	-17,41	-7,96
DIAZEPAM	8,48	11,23	-	-
3 meses				
ANALITO	AMOSTRA 1	AMOSTRA 2	AMOSTRA 3	AMOSTRA 4
ALPRAZOLAM	-	-	-4,61	15,53
DIAZEPAM	9,92	8,03	-	-

GELADEIRA

Figura 57 - Perfil de estabilidade obtido na análise das amostras reais acondicionadas em geladeira para diazepam (DZP) e alprazolam (ALP).

Tabela 33 - Valores obtidos para as análises de estudo de estabilidade de benzodiazepínicos para amostras reais em DBS acondicionadas em temperatura ambiente

TEMPERATURA AMBIENTE		TEMPO DE ANÁLISE			
		1 mês			
ANALITO	AMOSTRA	AMOSTRA	AMOSTRA	AMOSTRA	
	1	2	3	4	
ALPRAZOLAM	-	-	-13,71	-9,02	
DIAZEPAM	16,14	8,45	-	-	
		3 meses			
ANALITO	AMOSTRA	AMOSTRA	AMOSTRA	AMOSTRA	
	1	2	3	4	
ALPRAZOLAM	-	-	7,63	11,67	
DIAZEPAM	12,75	12,55	-	-	

TEMPERATURA AMBIENTE

Figura 58 - Perfil de estabilidade obtido na análise das amostras reais em DBS acondicionadas em temperatura ambiente para diazepam (DZP) e alprazolam (ALP).

A análise dos dados obtidos para DBS revela grande similaridade no perfil de estabilidade das substâncias, em que os compostos estudados não apresentaram perda maior que 20% em sua concentração, independente da temperatura de acondicionamento. Acrescenta-se aqui os dados obtidos para temperatura ambiente, condição na qual o perfil de estabilidade dos compostos estudados foi semelhante ao que foi observado para as demais condições contempladas no trabalho.

Os resultados obtidos no presente trabalho estão em consonância com outros resultados publicados em literatura em que os compostos aqui analisados mantêm-se estáveis sob diferentes temperaturas por períodos de tempos prolongados, possibilitando a detecção desses compostos mesmo tendo transcorrido 1 ano da incubação, independente da adição de NaF (ALFAZIL, 2009; ALFAZIL, ANDERSON, 2008; CHEPYALA *et al.*, 2017).

Alfazil (2009) analisou amostras de sangue aplicadas em papel para avaliar a estabilidade de benzodiazepínicos, porém, naquele trabalho as amostras não foram adicionadas de NaF e, ainda assim, amostras acondicionadas em temperatura ambiente apresentaram variação na concentração de, no máximo, 20% para o diazepam, no período de um ano. Assim, quando as amostras foram acondicionadas sob refrigeração (4°C e -20°C), o diazepam apresentou-se estável no período estudado. Resultados semelhantes foram encontrados por Chepyala e colaboradores (2017). O grupo realizou um estudo de estabilidade englobando diversos compostos, dentre eles os dois benzodiazepínicos contemplados no presente trabalho. E, assim como aqui observado, os compostos apresentaram estabilidade em todo o período de estudo e em todas as condições estudadas.

No presente estudo, para amostras de DBS, a influência da temperatura sobre a estabilidade dos compostos selecionados foi avaliada estatisticamente. Os dados obtidos seguem ilustrados na Figura 59. A análise estatística sugere que não há diferença significativa entre as diferentes temperaturas de acondicionamento.

DBS

Figura 59 - Diferença de concentração de diazepam (DZP) e alprazolam (ALP), obtidas da análise das amostras-controle, após três meses de incubação.

Também buscou-se avaliar possíveis diferenças no perfil de estabilidade dos compostos estudados nas amostragens por DBS e por sangue total e, conforme ilustram as Figuras 60 e 61, não foram encontradas diferenças estatisticamente relevantes entre as duas formas de amostragem, quando a amostra é armazenada em geladeira. Porém, quando as amostras eram acondicionadas em *freezer* foram observadas diferenças significativas entre a amostragem por DBS e por sangue total para os compostos estudados a 400 ng/mL.

GELADEIRA

Figura 60 - Diferença de concentração de diazepam (DZP) e alprazolam (ALP), obtidas da análise das amostras-controle acondicionadas em geladeira, após três meses de incubação.

FREEZER

Figura 61 - Diferença de concentração de alprazolam (ALP) e diazepam (DZP), obtidas da análise das amostras-controle acondicionadas em freezer, após três meses de incubação.

Os resultados encontrados para os compostos benzodiazepínicos mostram que não há diferença significativa quanto ao perfil de estabilidade dos compostos nas duas matrizes estudadas (DBS e sangue total), quando as amostras são acondicionadas em geladeira. Já quando as amostras são acondicionadas em *freezer*, os dados para controles altos mostram haver diferença significativa entre DBS e sangue total.

Porém, é importante salientar que os trabalhos científicos mencionados não reportaram uma análise estatística dos dados para que fosse possível uma comparação com os dados obtidos no presente trabalho. Além disso, para obtenção de dados com maior relevância estatística sugere-se estudo com maior número de amostras e que se seja observado o perfil de estabilidade por períodos de tempos maiores, para melhor avaliação dos fatores envolvidos na degradação dos compostos benzodiazepínicos estudados.

5. CONCLUSÕES

No presente trabalho foram desenvolvidas e validadas as metodologias analíticas para análise de cocaína e metabólitos e de alguns benzodiazepínicos, para possibilitar o estudo de estabilidade dessas substâncias em amostras de sangue total e em DBS em diferentes temperaturas.

Os dados obtidos para estudo de estabilidade da cocaína e metabólitos sugerem que, de maneira geral, a variação negativa da concentração de todos os compostos se manteve abaixo de 20%, para as amostras acondicionadas em *freezer*, durante todo o período de estudo independentes se forem analisadas amostras de DBS ou sangue total. Porém, a análise estatística mostra que há diferença significativa entre as duas matrizes, sugerindo que em DBS a estabilidade dos compostos estudados é maior. Para as amostras acondicionadas em geladeira, os dados revelam que, de maneira geral, a variação da concentração dos compostos se manteve abaixo de 20%, para as amostras de DBS para todo o período de estudo, diferente do que foi observado para as amostras de sangue total, em que apenas a BZE apresentou variação abaixo de 20% durante o período de estudo; sugerindo que, nessa condição, a cocaína se mantém estável, apenas, no primeiro mês e a EME nos três primeiros meses. Apenas para as amostras de DBS foram avaliados os perfis de estabilidade em temperatura ambiente, em que os dados mostraram que a cocaína e a EME apresentou redução acima de 20% já no terceiro mês de incubação sugerindo estabilidade de um mês acondicionada nessa condição; já a BZE não apresentou decaimento acima de 20% durante o período de estudo.

Já os dados de estudo de estabilidade obtidos para os benzodiazepínicos selecionados apresentaram maior uniformidade que os dados obtidos para cocaína e metabólitos. Assim, para todas as condições avaliadas, ou seja, para as duas diferentes matrizes e para as diferentes temperaturas, foi observado que os compostos, de maneira geral, não apresentaram queda na concentração acima de 20% durante o período de estudo. A análise estatística indica não haver, em termos gerais, diferença significativa entre as diferentes formas de acondicionamento. A pesquisa bibliográfica realizada não permite uma avaliação crítica da análise estatística aqui realizada. Salienta-se que o número de amostras reais utilizadas no presente trabalho foi reduzido, para o estudo de estabilidade dos benzodiazepínicos, assim sugere-se que seja realizado um estudo com maior número de amostras do que foi aqui apresentado a fim de comprovar os achados estatísticos do presente estudo para os compostos benzodiazepínicos.

Os resultados sugestivos de aumento de estabilidade obtidos encontram explicação no processo de secagem das amostras, uma vez que as principais reações químicas que levam à degradação dos compostos ocorrem em meio aquoso. Adicionalmente, assim como o DBS, a redução da temperatura não interfere na composição da amostra, sendo bastante conveniente a

aplicação das duas técnicas simultaneamente para garantia de maior estabilidade aos analitos estudados. Por fim, a partir do que foi observado, a técnica de DBS se mostra adequada aos propósitos forenses, devido à compatibilidade química e ao perfil de estabilidade dos compostos nele depositados, cujos resultados eram comparáveis ou melhor que quando adicionados em amostras de sangue total.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

AABAYE, M. G.; LATORRE, I.; DIAZ, J.; MALDONADO, J.; MIALDEA, I.; EUGEN-OLSEN, J.; RAVN, P.; DOMINGUEZ, J.; RUHWALD, M. Dried plasma spots in the diagnosis of tuberculosis: IP-10 release assay on filter paper. **The European Respiratory Journal**, v. 42, n. 2, p. 495-503, 2013.

ABDEL-REHIM, A.; ABDEL-REHIM, M. Dried saliva spot as a sampling technique for saliva samples. **Biomedical Chromatography**, v. 28, n. 6, p. 875-877, 2014.

ALFAZIL, A. A. **Stability of drugs and pesticides of forensic toxicological interest and their metabolites in biological samples**. 2009. 296p. Thesis (Doctor of Philosophy) – Department of Forensic Medicine and Science - University of Glasgow, 2009.

ALFAZIL, A. A.; ANDERSON, R. A. Stability of Benzodiazepines and Cocaine in Blood Spots Stored on Filter Paper. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 32, n. 7, p.511-515, 2008.

ALLAN, A. R.; ROBERTS, I. S. D. Post-mortem toxicology of commonly-abused drugs. In: MINI-SYMPOSIUM: NON-FORENSIC AUTOPSY. DIAGNOSTIC HISTOPATHOLOGY, v. 15, n. 1, p. 33-41, 2008. Disponível em [https://www.diagnostichistopathology.co.uk/article/S1756-2317\(08\)00205-3/pdf](https://www.diagnostichistopathology.co.uk/article/S1756-2317(08)00205-3/pdf). Acesso em 15 de junho de 2018.

ALMEIDA, A. M.; CASTEL-BRANCO, M. M.; FALCÃO, A. C. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. **Journal of Chromatography B**, v. 774, n. 2, p. 215-222, 2002.

ANDERSSON, T.; MINERS, J. O.; VERONESE, M. E.; BIRKETT, D. J. Diazepam metabolism by human liver microsomes is mediated by both S-mephenytoin hydroxylase and CYP3A isoforms. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 38, n. 2, p. 131-137, 1994.

ANTUNES, M. V.; NIEDERAUER, C. G.; LINDEN, R. Development, validation and clinical evaluation of a dried urine spot method for determination of hippuric acid and creatinine. **Clinical Biochemistry**, v. 46, n. 13-14, p. 1276-1280, 2013.

ASSOCIATION OF PUBLIC HEALTH LABORATORIES (APHL). The Newborn Screening Story, [S.l.: s.n.], 2013. cap. 1, p. 17-30. Disponível em https://www.aphl.org/aboutAPHL/publications/Documents/NBS_2013May_The-Newborn-Screening-Story_How-One-Simple-Test-Changed-Lives-Science-and-Health-in-America.pdf. Acesso em 06 de fevereiro de 2017.

ATANASOV, V. N.; STOYKOVA, S.; RUNIOV, A.; DIMITROVA, T.; ALEKSANDROVA, D.; TSAKOVSKI, S.; MITEWA, M. Stability of diazepam in blood samples at different storage conditions and in the presence of alcohol. **Forensic Science International**, v. 215, n. 1-3, p. 159-163, 2012.

BERTILSSON, L.; BAILLIE, T. A.; REVIRIEGO, J. Factors influencing the metabolism of diazepam. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 45, n. 1, p. 85-91, 1990.

BORTOLETTO, M. E.; BOCHNER, R. Impacto dos medicamentos nas intoxicações humanas no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 4, p. 859-869, 1999.

BOY, R. G.; HENSELER, J.; MATTERN, R.; SKOPP, G. Determination of Morphine and 6-Acetylmorphine in Blood With Use of Dried Blood Spots. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 30, n. 6, p. 733-739, 2008.

BOY, R. G.; HENSELER, J.; MATTERN, R.; SKOPP, G. Determination of morphine and 6-acetylmorphine in blood with use of dried blood spots. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 30, n. 6, p. 733-9, 2008.

BRAMBILLA, D.; JENNINGS, C.; ALDROVANDI, G.; BREMER, J.; COMEAU, A. M.; CASSOL, S. A.; DICKOVER, R.; JACKSON, J. B.; PITT, J.; SULLIVAN, J. L.; BUTCHER, A.; GROSSO, L.; REICHELDERFER, P.; FISCUS, S. A. Multicenter Evaluation of Use of Dried Blood and Plasma Spot Specimens in Quantitative Assays for Human Immunodeficiency Virus RNA: Measurement, Precision, and RNA Stability. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 1888-1893, 2003.

BRASIL. **Código de Processo Penal (1941)**. Presidência da República Casa Civil Subchefia para Assuntos Jurídicos. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto-lei/Del3689.htm. Acesso em 18 de agosto de 2014.

BRASIL. **Constituição (1988)**. Constituição da República Federativa do Brasil. Brasília, DF: Senado, 1988.

BRASIL. PORTARIA n. 82, de 16 de julho de 2014. A Secretaria Nacional De Segurança Pública estabelece as Diretrizes sobre os procedimentos a serem observados no tocante à cadeia de custódia de vestígios. **Diário Oficial da União**, Brasília, n. 136, 18 jul. 2014. Seção 1, p. 42.

BRASIL. Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas. **Uso de bebidas alcoólicas e outras drogas nas rodovias brasileiras e outros estudos**. Porto Alegre: SENAD; 2010. 121 p.

BROWNE, S. P.; SLAUGHTER, E. A.; COUCH, R. A.; RUDNIC, E. M.; MCLEAN, A. M. The Influence of Plasma Butyrylcholinesterase Concentration on the *In Vitro* Hydrolysis of Cocaine in Human Plasma. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v. 19, n. 5, p. 309-314, 1998.

CABRERA, C. G.; de WAISBAUM, R. G.; NUDELMAN, N. S. Kinetic and mechanistic studies on the hydrolysis and photodegradation of diazepam and alprazolam. **Journal of Physical Organic Chemistry**, n. 18, n. 2, p. 156-161, 2005.

CALCAGNO, A.; MOTTA, I.; MILIA, M. G.; ROSTAGNO, R.; SIMIELE, M.; LIBANORE, V.; FONTANA, S.; D'AVOLIO, A.; GHISSETTI, V.; DI PERRI, G.; BONORA, S. Dried plasma/blood spots for monitoring antiretroviral treatment efficacy and pharmacokinetics: a cross-sectional study in rural Burundi. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 79, n. 5, p. 801-808, 2015.

CARVALHO, P. D. Drogas estimulantes do sistema nervoso central. In: PASSAGLI, M. F. **Toxicologia Forense. Teoria e Prática**. 4º ed. Campinas: Millennium Editora, 2013. cap. 5, p. 133-191.

CHEPYALA, D.; TSAI, I. L.; LIAO, H. W.; CHEN, G. Y.; CHAO, H. C.; KUO, C. H. Sensitive screening of abused drugs in dried blood samples using ultra-high-performance liquid

chromatography-ion booster-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1491, p. 57-66, 2017.

CLARK, G. T.; HAYNES, J. J. Utilization of DBS within drug discovery: A simple 2D-LC-MS/MS system to minimize blood- and paper-based matrix effects from FTA elute (TM) DBS. **Bioanalysis**, v. 3, p. 1253–1270, 2011.

COBB, Z.; DE VRIES, R; SPOONER, N.; WILLIAMS, S.; STAELENS, L.; DOIG, M.; BROADHURST, R.; BARFIELD, M.; VAN DE MERBEL, N.; SCHMID, B.; SIETHOFF, C.; ORTIZ, J.; VERHEIJ, E.; VAN BAAR, B; WHITE, S.; TIMMERMAN, P. In-depth study of homogeneity in DBS using two different techniques: results from the EBF DBS-microsampling consortium. **Bioanalysis**, v. 5, n. 17, p. 2161-2169, 2013.

DASS, C. MASS ANALYSIS AND ION DETECTION. In: _____. **Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry**. Nova Jersey: John Wiley & Sons, Inc, 2007. cap. 3, p. 67-110.

DE VRIES, R.; BARFIELD, M.; VAN DE MERBEL, N.; SCHMID, B.; SIETHOFF, C.; ORTIZ, J.; VERHEIJ, E.; VAN BAAR, B.; COBB, Z.; WHITE, S.; TIMMERMAN, P. The effect of hematocrit on bioanalysis of DBS: results from the EBF DBS-microsampling consortium. **Bioanalysis**, v. 5, n. 17, p. 2147-2160, 2013.

DIXON, R.; MBEUNKUI, F.; WIEGEL, J. V. Stability study of opioids and benzodiazepines in urine samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Analytical Science and Technology**, v. 6, n. 17, 2015.

DRUMMER, O. H; ROBERTSON, M. D. Postmortem Drug Metabolism by Bacteria. **Journal of Forensic Science**, v. 40, n.3, p. 382-386, 1995.

DRUMMER, O.H. Post mortem toxicology of drugs of abuse. **Forensic Science International**, v.142, n. 2-3, p.101-113, 2004.

DUTHALER, U; BERGER, B; ERB, S; BATTEGAY, M; LETANG, E; GAUGLER, S; KRÄHENBÜHL, S; HASCHKE, M. Automated high throughput analysis of antiretroviral drugs in dried blood spots. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 52, n. 8, p. 534-542, 2017.

EDINGER, C. Cadeia de custódia, rastreabilidade probatória. **Revista Brasileira de Ciências Criminais**, v. 120, P. 237-257, 2016.

EL MAHJOUB, A.; STAUB, C. Stability of benzodiazepines in whole blood samples stored at varying temperatures. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 23, n. 6, p. 1057-1063, 2000.

ELLEFSSEN, K. N.; DA COSTA, J. L.; CONCHEIRO, M.; ANIZAN, S.; BARNES, A. J.; PIRARD, S.; GORELICK, D. A. Cocaine and metabolite concentrations in DBS and venous blood after controlled intravenous cocaine administration. **Bioanalysis**, v. 7, n. 16, p. 2041-2056, 2015.

EMCDDA. OBSERVATÓRIO EUROPEU DA DROGA E DA TOXICODEPENDÊNCIA. **Relatório Europeu sobre Drogas 2017: Tendências e evoluções**. Luxemburgo: Serviço das Publicações da União Europeia, 2017.

FAWCETT, J. A.; KRAVITZ, H. M. Alprazolam: Pharmacokinetics, Clinical Efficacy, and Mechanism of Action. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 2, n. 5, p. 243–253, 1982.

FERREIRA, D. C. Benzodiazepinas – Contribuição para o estudo de preparações farmacêuticas. 1992. 277 f. Tese (Doutorado em Farmácia) - Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. Porto, Portugal, 1992.

FERRONE, V.; CARLUCCI, M.; COTELLESE, R.; RAIMONDI, P.; CICHELLA, A.; DI MARCO, L.; GENOVESE, S.; CARLUCCI, G. Development of a dried blood spot HPLC-PDA method for the analysis of linezolid and ciprofloxacin in hospital-acquired pneumonia patients. **Drug Test. Analysis**, v. 9, p. 1611–1619, 2017.

FIOCRUZ. Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas. **Tabela 06: Casos Registrados de Intoxicação Humana por Agente Tóxico e Circunstância. Brasil, 2015.** Manguinhos: Ministério da Saúde/ FIOCRUZ/ SINITOX, [s.d.]. Disponível em <https://sinitox.icict.fiocruz.br/dados-nacionais>. Acesso em 24 de janeiro de 2018.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (2016). FDA Executive Summary. In: Clinical Chemistry and Clinical Toxicology Devices Panel meeting on the Seeker system from Baebies, 2016. Disponível em <https://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/MedicalDevices/MedicalDevicesAdvisoryCommittee/ClinicalChemistryandClinicalToxicologyDevicesPanel/UCM515322.pdf>. Acessado em 16 de janeiro de 2017.

FULLER, D. C.; PISANA, P. A Preliminary Investigation into Retrospective Calculation of In-Vivo Drug Concentrations in Dried Crime Scene Blood. NORTH TEXAS HEALTH CARE SYSTEM, DALLAS, TX, U.S.A. Disponível em <http://forensictoxicologyconsultant.com/downloads/Retrospective%20Calculation%20of%20Drug%20Concentration%20in%20Dried%20Blood.pdf>. Acessado em 26 de abril de 2017.

GONZÁLEZ, M. A. M. G. Criterios cuantitativos em toxicologia forense. **Revista Espanhola de Medicina Legal**, v. 38, n. 2, p. 68-75, 2012.

HAGAN, A. S.; Jones, D. R.; AGARWAL, R. Use of Dried Plasma Spots for the Quantification of Iothalamate in Clinical Studies. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 8, n. 6, p. 909–914, 2013.

HEARD, K.; PALMER, R.; ZAHNISER, N. R. Mechanisms of acute cocaine toxicity. **The Open Pharmacology Journal**, v. 2, n. 9, p. 70-78, 2008.

HENION, J.; OLIVEIRA, R. V.; CHACE, D. H. Microsample analyses via DBS: challenges and opportunities. **Bioanalysis**, v. 5, n. 20, p. 2547–2565, 2013.

HIROTA, N.; ITO, K; IWATSUBO, T.; GREEN, C. E.; TYSON, C. A.; SHIMADA, N.; SUZUKI, H.; SUGIYAMA, Y. *In Vitro/In Vivo* Scaling of Alprazolam Metabolism by CYP3A4 and CYP3A5 in Humans. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v. 22, n. 2, p. 53–71, 2001.

HOOD, S. D.; NORMAN, A.; HINCE, D. A.; MELICHAR, J. K.; HULSE, G. K. Benzodiazepine dependence and its treatment with low dose flumazenil. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 77, n. 2, p. 285-294, 2012.

IRISH MEDICAL ORGANISATION (IMO). **Addiction And Dependency**. Dublin, 2015.

Disponível em:

http://www.drugs.ie/resourcesfiles/ResearchDocs/Ireland/2015/Addiction_and_Dependency_I_MO_Position_Paper.pdf, acessado em 07 de dezembro de 2017.

ISENSCHMID, D. S. Cocaine. In: LEVINE, B (Ed.). **Principles of forensic toxicology**. 3º ed. Washington, DC, EUA: AACCPress, 2010, cap. 16, p. 245-303.

ISENSCHMID, D. S.; LEVINE, B. S.; CAPLAN, Y. H. A comprehensive study of the stability of cocaine and its metabolites. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 13, p. 250-268. 1989.

ISHIKAWA, S.; HASHIDA, S.; HASHINAKA, K.; HIROTA, K.; KOJIMA, M.; SAITO, A.; TAKAMIZAWA, A.; SHINAGAWA, H.; OKA, S.; SHIMADA, K.; ISHIKAWA, E. Whole Saliva Dried on Filter Paper for Diagnosis of HIV-1 Infection by Detection of Antibody IgG to HIV-1 With Ultrasensitive Enzyme Immunoassay Using Recombinant Reverse Transcriptase as Antigen. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 10, n. 1, p. 35-41, 1996.

JANTOS, R.; VELDSTRA, J. L.; MATTERN, R.; BROOKHUIS, K. A.; SKOPP, G. Analysis of 3,4-methylenedioxymetamphetamine: whole blood versus dried blood spots. **Journal of analytical toxicology**, v. 35, n. 5, p. 269-73, 2011.

KEEVIL, B. G. Review - The analysis of dried blood spot samples using liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Clinical Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 110-118, 2011.

KERRIGAN, S. Sampling, Storage and Stability. In: MOFFAT, A. C.; OSSELTON, M. D.; WIDDOP, B. (Ed.). **Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material**. 4ª ed. Chicago. Pharmaceutical Press, 2011, cap. 28, p. 445-457.

KISZKA, M.; BUSZEWICZ, G.; MADRO, R. Stability of cocaine in blood and in other tissues. **Problems of forensic sciences, Zagadnien Nauk Sadowych**, v. 45, n. XLV, p. 16-35, 2000.

KLOTZ, U.; AVANT, G. R.; HOYUMPA, A.; SCHENKER, S.; WILKINSON, G. R. The effects of age and liver disease on the disposition and elimination of diazepam in adult man. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 55, n.2, p. 347-359, 1975.

KOLOCOURI, F.; DOTSIKAS, Y.; LOUKAS, Y. L. Dried plasma spots as an alternative sample collection technique for the quantitative LC-MS/MS determination of gabapentin. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 398, n. 3, p. 1339-1347, 2010.

KOSKI, A. Interpretation of postmortem toxicology results - Pharmacogenetics and Drug-Alcohol Interaction. 2005. 56 f. Academic Dissertation – University of Helsinki. Helsinki, Finland, 2005. Disponível em <http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/laa/oikeu/vk/koski/interpre.pdf>. Acessado em 15 de março de 2018.

KOSTER, R. A., BOTMA, R., GREJJDANUS, B., UGES, D. R. A., KOSTERINK, J. G. W., TOUW, D. J., ALFFENAAR, J. C. The performance of five different dried blood spot cards for the analysis of six immunosuppressants. **Bioanalysis**, v. 7, n. 10, p. 1225-1235, 2015.

KOSTER, R. A.; VEENHOF, H.; BOTMA, R.; HOEKSTRA, A. T.; BERGER, S. P.; BAKKER, S. J.; ALFFENAAR, J. C.; TOUW, D. J. Dried blood spot validation of five

immunosuppressants, without hematocrit correction, on two LC-MS/MS systems. **Bioanalysis**, v. 9, n. 7, p. 553-563, 2017.

KRAVITZ, H. M.; FAWCETT, J.; NEWMAN, A. J. Alprazolam and depression: A review of risks and benefits. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 54, 78-84, 1993. Supplement 10, discussão 85.

KVASKOFF, D.; KO, P.; SIMILA, H. A; EYLES, D. W. Distribution of 25-hydroxyvitamin D₃ in dried blood spots and implications for its quantitation by tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 901, p. 47–52, 2012.

LA MARCA, G.; FABIO VILLANELLI, F; MALVAGIA, S.; OMBRONE, D.; FUNGHINI, S.; DE GAUDIO, M.; FALLANI, S.; CASSETTA, M. I.; NOVELLI, A.; CHIAPPINI, E.; DE MARTINO, M.; GALLI, L. Rapid and sensitive LC–MS/MS method for the analysis of antibiotic linezolid on dried blood spot. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 67–68, p. 86-91, 2012.

LENK, G.; HANSSON, J.; BECK, O.; ROXHED, N. The effect of drying on the homogeneity of DBS. **Bioanalysis**, v. 7, n. 16, p. 1977-1985, 2015.

LEVINE, B. Cocaine. In: LEVINE, B (Ed.). **Principles of forensic toxicology**. 3° ed. Washington, DC, EUA, AACCPress, 2010, cap. 1, p. 3-13.

LI, F.; PLOCH, S.; FAST, D.; MICHAEL, S. Perforated dried blood spot accurate microsampling: the concept and its applications in toxicokinetic sample collection. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 47, n. 5, p.655-667, 2012.

LIU, G.; JI, Q. C.; JEMAL, M.; TYMIAK, A. A.; ARNOLD, M. E. Approach To Evaluating Dried Blood Spot Sample Stability during Drying Process and Discovery of a Treated Card To Maintain Analyte Stability by Rapid On-Card pH Modification. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 23, p. 9033-9038, 2011.

LUSTHOF, K.; BOSMAN, I. The methylecgonine to cocaine ratio in blood samples and the effectiveness of preservation with 0.4% sodium fluoride. **Toxichem Krimtech**, v. 78, n. Special, p. 367-372, 2011.

MACEIRA, A. M., RIPOLL, C., COSIN-SALES, J., IGUAL, B., GAVILAN, M., SALAZAR, J., BELLOCH, V.; PENNELL, D. J. Long term effects of cocaine on the heart assessed by cardiovascular magnetic resonance at 3T. **Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance**, v. 16, n. 1, 2014.

MACKEY-BOJACK, S; KLOSS, J.; APPLE, F. Cocaine, Cocaine Metabolite, and Ethanol Concentrations in Postmortem Blood and Vitreous Humor. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 24, n. 1, p. 59-65, 2000.

MANDRIOLI, R; MERCOLINI, L; RAGGI, M. A. Benzodiazepine Metabolism: An Analytical Perspective. **Current Drug Metabolism**, v. 9, n. 8, p. 827-844, p. 2008.

MELO, P.; BASTOS, M. L.; TEIXEIRA, H. M. Benzodiazepine Stability in Postmortem Samples Stored at Different Temperatures. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 36, n. 1, p. 52-60, 2012.

MEYER, K. D., ZHANG, L. Short- and long-term adverse effects of cocaine abuse during pregnancy on the heart development. **Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease**, v.3, n. 1, p. 7–16, 2009.

MIZUNO, K.; KATOH, M.; OKUMURA, H.; NAKAGAWA, N.; NEGISHI, T.; HASHIZUME, T.; NAKAJIMA, M.; YOKOI, T. Metabolic Activation of Benzodiazepines by CYP3A4. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 37, n. 2, p. 345-351, 2009.

MOFFAT, A. C.; OSSELTON, M. D.; WIDDOP, B. (Ed.). **Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material**. 4^a ed. Chicago. Pharmaceutical Press, 2011, PARTE 2 - MONOGRAFIAS p. 1152-1155.

NALOTO, D. C. C.; LOPES, F. C.; BARBERATO-FILHO, S.; LOPES, L. C.; DEL FIOL, F. S.; BERGAMASCHI, C. C. Prescrição de benzodiazepínicos para adultos e idosos de um ambulatório de saúde mental. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 21, n. 4, p. 1267-1276, 2016.

NESTLER, E. J. The Neurobiology of Cocaine Addiction. **Science & Practice Perspectives**, v. 3, n. 1, p. 4–10, 2005.

NIDA. US Department of Health & Human Services. National Institute on Drug Abuse. **National Overdose Deaths**. 2016a. Disponível em <https://www.drugabuse.gov/related-topics/trends-statistics/overdose-death-rates>. Acessado em 11 de dezembro de 2017.

NIDA. US Department of Health & Human Services. National Institute on Drug Abuse. **Cocaine**. 2016b. Disponível em <https://d14rmgtrwzf5a.cloudfront.net/sites/default/files/1141-cocaine.pdf>. Acessado em 20 de maio de 2018.

NIROGI, R.; KANDIKERE, V.; KOMARNENI, P.; ALETI, R.; PADALA, N.; KALAIKADHIBAN, I.; BHYRAPUNENI, G.; MUDDANA, N. Exploring dried blood spot sampling technique for simultaneous quantification of antiretrovirals: lamivudine, stavudine and nevirapine in a rodent pharmacokinetic study. **Biomedical Chromatography**, v. 26, n. 12, p. 1472-1481, 2012.

OFFICE ON WOMEN'S HEALTH. U.S. Department of Health & Human Services. **Date rape drugs**. Washington. (Última atualização 28ABR17). Disponível em <https://www.womenshealth.gov/a-z-topics/date-rape-drugs>. Acessado em 02 de abril de 2018.

PAGE-SHARP, M.; COWARD, J.; MOORE, B. R.; SALMAN, S.; MARSHALL, L., DAVIS, T. M. E., BATTY, K. T., MANNING, L. Penicillin Dried Blood Spot Assay for Use in Patients Receiving Intramuscular Benzathine Penicillin G and Other Penicillin Preparations To Prevent Rheumatic Fever. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 8, 2017.

PARRA, M. A. S.; PABON, J. P. R.; MEESTERS, R. J. W. Bioanalytical evaluation of dried plasma spot microsampling methodologies in pharmacokinetic studies applying Acetaminophen as model drug. **Journal of Applied Bioanalysis**, v. 2, n. 1, p. 25-37, 2016.

PRADO, G. Prova penal e sistema de controles epistêmicos: a quebra da cadeia de custódia das provas obtidas por métodos ocultos. 1^a ed. São Paulo. Marcial Pons, 2014, cap. IV, p. 77-86.

QURAISHI, R.; JAIN, R.; AMBEKAR, A. The Use of Dried Blood Spot Samples in Screening Drugs of Abuse. **Pharmacology & Pharmacy**, v. 4, n. 2, p. 152-159, 2013.

RELLO, L.; LAPEÑA, A. C.; ARAMENDÍA, M.; BELARRA, M. A.; RESANO, M. A dried urine spot test to simultaneously monitor Mo and Ti levels using solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 81, p. 11–19, 2013.

REN, X; PAEHLER, T; ZIMMER, M; GUO, Z.; ZANE, P.; EMMONS, G. T. Impact of various factors on radioactivity distribution in different DBS papers. **Bioanalysis**, v. 2, n. 8, p.1469-1475, 2010.

RESTREPO, C. S.; CARRILLO, J. A.; MARTÍNEZ, S.; OJEDA, P.; RIVERA, A. L.; HATTA, A. Pulmonary Complications from Cocaine and Cocaine-based Substances: Imaging Manifestations. **Radiographics**, v. 27, n. 4, p. 941-956, 2007.

RIEZZO, I.; FIORE, C.; DE CARLO, D.; PASCALE, N.; NERI, M.; TURILLAZZI, E.; FINESCHI, V. Side Effects of Cocaine Abuse: Multiorgan Toxicity and Pathological Consequences. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 33, 2012.

ROBERTSON, M. D.; DRUMMER, O. H. Stability of nitrobenzodiazepines in postmortem blood. **Journal Forensic Science**, v. 43, n. 1, p. 5-8, 1998.

RODRIGUES, F. R. Drogas estimulantes do sistema nervoso central. In: PASSAGLI, M. F. **Toxicologia Forense. Teoria e Prática**. 4º ed. Campinas: Millennium Editora, 2013. cap. 5, p. 133-191.

RODRIGUEZ-AUAD, J. P.; ROJAS-MONTES, OTHON; MALDONADO-RODRIGUEZ, A.; ALVAREZ-MUÑOZ, M. T.; TORRES-IBARRA, O. R.; VAZQUEZ-ROSALES, G.; LIRA, R. Use of Dried Plasma Spots for HIV-1 Viral Load Determination and Drug Resistance Genotyping in Mexican Patients. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

SÃO PAULO (Estado). Decreto 48.009, de 11 de agosto de 2003. Dispõe sobre o detalhamento das atribuições das unidades que especifica do Instituto de Criminalística e do Instituto Médico-Legal ambos da Superintendência da Polícia Técnico-Científica, da Secretaria da Segurança Pública, e dá providências correlatas. **Diário Oficial do Estado de São Paulo**, São Paulo, 11 ago. 2003. Disponível em: <<http://www.al.sp.gov.br/repositorio/legislacao/decreto/2003/decreto-48009-11.08.2003.html>>. Acesso em 19 de agosto de 2014.

SÃO PAULO (Estado). Portaria do Diretor Técnico de Departamento do Instituto Médico Legal, de 04 de julho de 2012. Dispõe sobre normas e procedimentos para envio de materiais biológicos para análise ao Núcleo de Toxicologia Forense. **Diário Oficial do Estado de São Paulo**, São Paulo, 07 jul. 2012. Caderno 1, p. 11.

SAUSSEREAU, E.; LACROIX, C.; GAULIER, J. M.; GOULLE, J. P. On-line liquid chromatography/tandem mass spectrometry simultaneous determination of opiates, cocaine and amphetamines in dried blood spots. **Journal of Chromatography B**, v. 885-886, p. 1– 7, 2012.

SCHIFFER, J. M.; MANIATIS, P.; GARZA, I; STEWARD-CLARK, E; KORMAN, L. T.; PITTMAN, P. R.; MEI, J. V.; QUINN, C. P. Quantitative assessment of anthrax vaccine immunogenicity using the dried blood spot matrix. **Biologicals**, v. 41, n. 2, p. 98-103, 2013.

SCHINDLER, C. W.; GOLDBERG, S. R. Accelerating cocaine metabolism as an approach to the treatment of cocaine abuse and toxicity. **Future Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 2, p. 163-175, 2012.

SILVA, T. O.; IGUTI, A. M. Prescrição e dispensação de medicamentos psicotrópicos em uma Unidade Básica de Saúde antes da informatização da dispensação de município de grande porte do Estado de São Paulo. In: CONGRESSO VIRTUAL BRASILEIRO - GESTÃO, EDUCAÇÃO E PROMOÇÃO DA SAÚDE, I. Congresso Virtual. 2012. Disponível em <http://www.convibra.com.br/artigo.asp?ev=24&id=4293>; acessado em 25 de janeiro de 2018.

SIMÕES, S. S.; AJENJO, A. C.; DIAS, M. J. Dried blood spots combined to an UPLC–MS/MS method for the simultaneous determination of drugs of abuse in forensic toxicology. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 634-644, 2018.

SKOPP, G. Preanalytic aspects in postmortem toxicology. **Forensic Science International**, v. 142, n. 2-3, p. 75–100, 2004.

SKOPP, G.; POTSCH, L.; KONIG, I.; MATTERN, R. A preliminary study on the stability of benzodiazepines in blood and plasma stored at 4°C. **International Journal of Legal Medicine**, v. 111, n. 1, p. 1-5, 1998.

STICKLE, D. F.; RAWLINSON, N. J.; LANDMARK, J. D. Increased perimeter red cell concentration in filter paper bloodspot samples is consistent with constant-load size exclusion chromatography occurring during application. **Clinica Chimica Acta**, v. 401, n. 1-2, p. 42–45, 2009.

STOVE, C. P.; INGELS, A. S.; DE KESEL, P. M.; LAMBERT, W. E. Dried blood spots in toxicology: from the cradle to the grave? **Critical Reviews in Toxicology**, v. 42, n.3, p. 230–243, 2012.

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

SZATKOWSKA, P.; KOBĄ, M.; KOŚLIŃSKI, P.; WANDAS, J.; BĄCZEK, T. Analytical methods for determination of benzodiazepines. A short review. **Central European Journal of Chemistry**, v. 12, n. 10, p. 994-1007, 2014.

TAN, K. R.; RUDOLPH, U.; LÜSCHER, C. Hooked on benzodiazepines: GABAA receptor subtypes and addiction. **Trends in neurosciences**, v. 34, n. 4, p. 188-197, 2011.

TANIGUCHI, C.; GUENGERICH, F.P. Metabolismo dos fármacos, cap. 4. Disponível em: <http://www.ufpi.br/subsiteFiles/lapnex/arquivos/files/Metabolismo%20dos%20farmacos.pdf>. s.n.t. Acesso em: 25 Mar 2018.

TIMMERMAN, P.; WHITE, S.; COBB, Z.; DE VRIES, R.; THOMAS, E.; VAN BAAR, B. Update of the EBF recommendation for the use of DBS in regulated bioanalysis integrating the conclusions from the EBF DBS-microsampling consortium. **Bioanalysis**, v. 5, n. 17, p. 2129–2136, 2013.

TOENNES, S. W.; KAUERT, G. F. Importance of Vacutainer Selection in Forensic Toxicological Analysis of Drugs of Abuse. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 25, n. 5, p. 339-343, 2001.

TRAWIŃSKI, J.; SKIBIŃSKI, R. Studies on photodegradation process of psychotropic drugs: a review. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 24, n. 2, 1152–1199, 2017.

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. Illicit drug markets: situation and trends. In: _____. **World Drug Report, 2016**. Viena, 2016. cap. 1, p. 174.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO. Centro Brasileiro de Informação sobre Drogas Psicotrópicas. **II Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país: 2005**. São Paulo: UNIFESP/CEBRID, 2006. 473p.

VENTON, B. J.; SEIPEL, A. T.; PHILLIPS, P. E. M.; WETSEL, W. C.; GITLER, D.; GREENGARD, P.; AUGUSTINE, G. J.; WIGHTMAN, R. M. Cocaine Increases Dopamine Release by Mobilization of a Synapsin-Dependent Reserve Pool. **The Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 12, p. 3206–3209, 2006.

VERSTER, J. C.; VOLKERTS, E. R. Clinical Pharmacology, Clinical Efficacy, and Behavioral Toxicity of Alprazolam: A Review of the Literature. **CNS Drug Reviews**, v. 10, n. 1, p. 45–76, 2004.

VONMOOS, M., HULKA, L. M., PRELLER, K. H., MINDER, F., BAUMGARTNER, M. R., & QUEDNOW, B. B. Cognitive Impairment in Cocaine Users is Drug-Induced but Partially Reversible: Evidence from a Longitudinal Study. **Neuropsychopharmacology**, v. 39, n.9, p. 2200–2210, 2014

WAGNER, M.; TONOLI, D.; VARESIO, E.; HOPFGARTNER, G. The use of mass spectrometry to analyze dried blood spots. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 35, n. 3, p. 361-438, 2014.

WAGNER, M.; VARESIO, E.; HOPFGARTNER, G. A novel tube-based format for dried blood spots integrating sample collection and sample preparation. **Chimia**, v. 66, n. ½, p. 65, 2012.

WARNER, A; NORMAN, A. B. Mechanisms of Cocaine Hydrolysis and Metabolism In Vitro and In Vivo: A Clarification. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 22, n. 3, p. 266-270, 2000.

WEST, C. E.; ROWLAND, S. J. Aqueous phototransformation of diazepam and related human metabolites under simulated sunlight. **Environmental Science Technology**; v. 46, n. 9, p. 4749-4756, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. How do psychoactive drugs impair driving? In: _____. **Drug use and road safety: a policy brief**. Geneva: WHO, 2016. cap. 3, p. 3.

ROSTING, C. **Dried Blood Spots in Liquid Chromatography Mass Spectrometry based Protein Analysis**. 2017. 71p. Thesis (Doctor of Philosophy) - Department of Pharmaceutical Chemistry School of Pharmacy - University of Oslo. Norway. 2017.

PORTER, J. N. **The Effects of Chronic Cocaine Self-Administration on Cognition and Brain Metabolism. 2012. 134p.** Thesis (Doctor of Philosophy) - School of Medicine - University of Pittsburgh. Pittsburgh. 2012.

YONAMINE, M. **A saliva como espécime biológico para monitorar o uso de álcool, anfetamina, metanfetamina, cocaína e maconha por motoristas profissionais.** 2004. 139f. Tese (Doutorado em Toxicologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2004.

YOSHIOKA, S.; STELLA, V. J. Chemical Stability of Drug Substances. In: _____. **Stability of Drugs and Dosage Forms.** New York: Kluwer Academic Publishers. 2002. cap. 2, p. 3-135.

YOUHNOVSKI, N.; BERGERON, A.; FURTADO, M.; GAROFOLO, F. Pre-cut dried blood spot (PCDBS): an alternative to dried blood spot (DBS) technique to overcome hematocrit impact. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 25, n. 19, p. 2951-2958, 2011.

ZACARIA, R.; ALLEN, K. J.; KOPLIN, J. J.; ROCHE, P.; GREAVES, R. F. Advantages and challenges of dried blood spot analysis by mass spectrometry across the total testing process. *The Journal of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, v. 27, n. 4, p. 288-317, 2016.

ZAITSU, K.; MIKI, A.; KATAGI, M., TSUCHIHASHI, H. Long-term stability of various drugs and metabolites in urine, and preventive measures against their decomposition with special attention to filtration sterilization. **Forensic Science International**, v. 174, n. 2-3, p. 189-196, 2008.

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Estudo da estabilidade de novas substâncias psicoativas (NPS) em amostras de sangue seco em papel (DBS), e sua aplicação na Toxicologia Forense

Pesquisador: Kelly Francisco da Cunha

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 58452716.2.0000.5404

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.548.496

Apresentação do Projeto:

Parecer de apreciação de emenda 1 (um).

Justificativa da Emenda:

Adição de pesquisadora Cintia Rosa ao projeto de pesquisa, para estudo de mais analitos de interesse para a toxicologia forense.

Objetivo da Pesquisa:

Nada é alterado do projeto original.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Nada é alterado do projeto original.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto original aprovado em 17 de Outubro de 2016.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apenas o documento PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_929592_E1.pdf de 02/03/2018 14:07:59 foi apresentado com a inserção da nova pesquisadora e justificativa da emenda.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Emenda 1 (um) aprovada.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.063-867
 UF: SP Município: CAMPINAS
 Telefone: (19)3521-8036 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

Continuação do Parecer: 3.548.490

Considerações Finais a critério do CEP:

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delimitada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante .
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido e enviar notificação ao CEP junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.
- Relatórios parciais e final, em formulário próprio do CEP, devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_929592_E1.pdf	02/03/2018 14:07:59		Aceito
Outros	Carta_resposta_CEP_JLC.pdf	05/10/2016 18:29:18	Kelly Francisco da Cunha	Aceito
Outros	Cadastro_do_Orientador.pdf	05/10/2016 18:00:32	Kelly Francisco da Cunha	Aceito
Outros	AtestadoMatricula.pdf	08/08/2016 07:53:13	Kelly Francisco da Cunha	Aceito
Outros	concordancia_SPTC_transferencia_UNI CAMP_200dpi.pdf	18/05/2016 18:50:57	Kelly Francisco da Cunha	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_Kelly_Cunha.pdf	18/05/2016 18:00:04	Kelly Francisco da Cunha	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_DBS_PLATAFORMA_BRASIL.pdf	17/05/2016 22:14:13	Kelly Francisco da Cunha	Aceito

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
 Bairro: São Geraldo CEP: 13.083-887
 UF: SP Município: CAMPINAS
 Telefone: (19)3521-8036 Fax: (19)3521-7167 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS
---	--------------------------------------	--

Continuação do Parecer: 2.548.498

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 17 de Março de 2018

Assinado por:
Maria Fernanda Ribeiro Bittar
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126			
Bairro: Barão Geraldo		CEP: 13.063-887	
UF: SP	Município: CAMPINAS		
Telefone: (19)3521-8035	Fax: (19)3521-7187	E-mail: cep@fcm.unicamp.br	

ANEXO B - Aprovação da Comissão Científica da Superintendência da Polícia Técnico-Científica

SECRETARIA DA SEGURANÇA PÚBLICA
SUPERINTENDÊNCIA DA POLÍCIA TÉCNICO-CIENTÍFICA
INSTITUTO MÉDICO LEGAL
CENTRO DE EXAMES ANÁLISES E PESQUISAS - NÚCLEO DE TOXICOLOGIA FORENSE

REFERÊNCIA: SPTC 3350/14

INTERESSADO: Dr. José Luiz da Costa – Perito Criminal – NTF- IML

ASSUNTO: Solicita avaliação do projeto de pesquisa *"Estudo de estabilidade de fármacos, drogas de abuso e praguicidas em amostras de sangue em seco em papel"*.

DESPACHO: DESP NTF-CEAP- IML nº. 38/2015

Ao Dr. José Luiz da Costa,

Encaminhe-se o presente expediente ao interessado para ciência do **Despacho 724/2015/ATS/SPTC-SSP**, o qual informa que a Comissão Científica da Superintendência da Polícia Técnico-Científica foi favorável a realização da pesquisa na Instituição, e para atendimento às solicitações contidas no item "2" do mesmo Despacho.

Após, restitua-se Diretoria Técnica Departamental do Instituto Médico Legal.

N.T.F. IML, 30 de abril de 2015.

Dr. Victor A. P. Gianvecchio
Diretor Técnico de Serviço
Núcleo de Toxicologia Forense – IML/SP

CURRÍCULO

DADOS PESSOAIS

Nome: Cíntia Rosa

Local e data de nascimento: São Paulo, SP, em 19 de janeiro de 1985.

EDUCAÇÃO

Escola Estadual Prudente de Moraes. Ensino Fundamental, 1992-1995.

Escola Estadual João Kopke. Ensino Fundamental, 1996-1997.

Escola Municipal de Ensino Fundamental Brigadeiro Henrique Raymundo Dyot Fontenelle. Ensino Fundamental, 1998-1999.

Escola Técnica Estadual Basilides de Godoy. Ensino Médio, 2000-2002.

Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas (São Paulo, SP), 2006-2012. Ensino Superior: Farmácia e Bioquímica.

Universidade de São Paulo, Instituto de Química (São Paulo, SP), 2014. Mestrado.

OCUPAÇÃO

Perita Criminal da Superintendência da Polícia Técnico-Científica do Estado de São Paulo, início em 2013 até o presente. Desde julho de 2018 atuando junto ao Núcleo de Toxicologia Forense (NTF).