Juliana Takitane

**Verificação do uso de anfetaminas (“rebite”) por
motoristas profissionais através da análise
toxicológica em urina**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa de: Fisiopatologia Experimental
Orientador: Prof. Dr. Mauricio Yonamine

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018, de 03 de outubro de 2011.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo
2014

Juliana Takitane

**Verificação do uso de anfetaminas (“rebite”) por
motoristas profissionais através da análise
toxicológica em urina**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa de: Fisiopatologia Experimental
Orientador: Prof. Dr. Mauricio Yonamine

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018, de 03 de outubro de 2011.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Takitane, Juliana

Verificação do uso de anfetaminas (“rebite”) por motoristas profissionais
através da análise toxicológica em urina / Juliana Takitane. -- São Paulo, 2014.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São
Paulo.

Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientador: Mauricio Yonamine.

Descritores: 1.Anfetaminas 2.Acidentes de trânsito 3.Cromatografia 4.Urina
5.Fadiga 6.Condução de veículo 7.Drogas ilícitas

USP/FM/DBD- 047/14

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao Professor Maurício Yonamine, por me guiar ao longo dessa caminhada. Exemplo de comprometimento com aquilo que faz e sempre presente quando precisei. Obrigada!

Aos meus pais, Luiz e Mariko, pelo amor incondicional.

Aos meus irmãos, Mariana e Roberto, pelo companheirismo e amizade de sempre, e para sempre.

À Professora Vilma Leyton, por ter sido “tudo e mais um pouco” em todos esses anos. Sempre me amparando e me acompanhando de perto a cada passo.

Ao Professor Daniel Romero Muñoz pelo apoio e incentivo às pesquisas desenvolvidas no Departamento de Medicina Legal, Ética Médica e Medicina Social e do Trabalho da FMUSP.

Às “irmãs” que escolhi e que não troco por nada. Lígia e Dani, chegar até aqui sem vocês ao meu lado não faria o menor sentido e não seria a mesma coisa. Dividimos tantas coisas, que só a gente sabe... Além de vocês duas, como não citar aquela que é tida como a “melhor ‘aquisição’ dos últimos tempos”, não é mesmo? Malu, seja bem vinda e fique para sempre!

Ao Henrique e à Jéssica, que me ajudaram muito (leia-se muito mesmo!) com a análise das amostras.

Ao Rafael, por ter me acompanhado desde o início e por ter participado de tudo, sempre com muita presteza e amizade.

Ao Tiago, que me recebeu inúmeras vezes e tirou minhas dúvidas mais banais, além de ter ajudado demais com a elaboração das ilustrações.

À Lorena, sempre muito solícita quando busquei ajuda.

Ao Marcelo, por dividir as angústias, dúvidas e conquistas durante o processo.

Aos colegas do Departamento de Polícia Rodoviária Federal (DPRF), por apoiar e viabilizar a coleta das amostras.

Aos funcionários e alunos de pós-graduação do Laboratório de Análises Toxicológicas (LAT).

Ao Lúcio, por compartilhar conhecimento e sua experiência com todos os alunos.

A todos os alunos que ao longo desses anos passaram pelo Laboratório de Toxicologia. Em especial, à Saskia, ao Júlio, ao Gabriel, à Joara, à Renata Ribeiro e à Renata Kobori.

Às secretárias do Departamento de Medicina Legal, Ética Médica e Medicina Social e do Trabalho: Branca, Paula, Dirce, Rô e Sol.

Ao “secretino” do Departamento, Valtair, que não mede esforços quando o assunto é ajudar.

A todos os funcionários, alunos de pós-graduação e médicos residentes do Departamento. Estejam certos que a experiência trocada com cada um serviu e servirá para o meu amadurecimento pessoal e profissional.

Aos professores responsáveis pelas disciplinas cursadas ao longo do Mestrado, em especial ao Prof. Maurício, ao Prof. Ernani Pinto Junior, à Profa. Helenice de Souza Spínosa e ao Prof. Heraldo Possolo de Souza.

Aos meus queridos amigos de Marília-SP, Camila, Mariana, Melina e Guilherme, por me darem ânimo quando precisei e por me alegrar, apesar da distância.

Aos professores da Med Fít: Osny, Washington e Alexandre. Vocês também têm parte nisso, pois foram as pessoas que me fizeram gostar de praticar esportes, o que foi essencial no decorrer deste trabalho. E ao grande amigo que fiz lá, Bruno, que sempre me anima e conforta.

Aos motoristas profissionais de caminhão, sujeitos de interesse deste estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro concedido (Processo nº 2011/02848-1).

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas em vigor no momento desta publicação:

- Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).
- Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.
- Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	
NORMALIZAÇÃO ADOTADA	
LISTA DE SIGLAS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DA LITERATURA	08
2.1 Anfetaminas	08
2.1.1 Análises toxicológicas para determinação de anfetaminas em amostras de urina.....	15
3. OBJETIVO E PLANO DE TRABALHO	20
4. MÉTODOS	23
4.1 Material.....	23
4.1.1 Reagentes.....	23
4.1.2 Soluções-padrão	23
4.1.3 Equipamentos e acessórios	24
4.1.4 Amostras.....	24
4.2 Métodos.....	26
4.2.1 Determinação de anfetamina, dietilpropiona e femproporex por HPLC-DAD	26
4.2.1.1 Preparação das amostras de urina para o desenvolvimento e validação do método	27
4.2.1.2 Validação do método analítico	27
4.2.1.2.1 Limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)	28
4.2.1.2.2 Linearidade	28
4.2.1.2.3 Precisão intraensaio e interensaio	29
4.2.1.2.4 Exatidão	30
4.2.1.2.5 Recuperação.....	30
4.2.1.3 Aplicação do método em amostras de urina de motoristas profissionais	31
5. RESULTADOS	33
5.1 Condições cromatográficas para a determinação de anfetamina, dietilpropiona e femproporex por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Arranjo de Diodos (HPLC-DAD).....	33
5.2 Cromatogramas característicos e espectros de absorbância da anfetamina, dietilpropiona e femproporex	34

5.3 Resultados da validação do método para determinação de anfetamina, dietilpropiona e femproporex em urina	36
5.3.1 Limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)	36
5.3.2 Linearidade	37
5.3.3 Precisão intraensaio e interensaio	37
5.3.4 Exatidão	38
5.3.5 Recuperação.....	39
5.4 Resultado da aplicação do método em amostras de urina.....	40
5.5 Perfil sociodemográfico dos participantes da pesquisa.....	47
6. DISCUSSÃO	53
7. CONCLUSÕES	66
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
ANEXOS	

LISTA DE SIGLAS

AN: Anfetamina
ANTT: Agência Nacional de Transportes Terrestres
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BDB: 3,4-benzodioxazol butamina
CE-DAD: do inglês, *Capillary Electrophoresis with Diode-array Detector* - Eletroforese Capilar com Detector de Arranjo de Diodos
CE-MS: do inglês, *Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry* - Eletroforese Capilar acoplada a Espectrômetro de Massas
CTB: Código de Trânsito Brasileiro
CV: Coeficiente de Variação
DMA: 2,5-dimetoxianfetamina
DOB: 4-bromo-2,5-dimetoxianfetamina
DOET: 2,5-dimetóxi-4-etilanfetamina
DOM: 2,5-dimetóxi-4-metilanfetamina
DPRF: Departamento de Polícia Rodoviária Federal
EME: do inglês, *Electromembrane Extraction*
FMUSP: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GC: do inglês, *Gas Chromatography* - Cromatografia Gasosa
GC-MS: do inglês, *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* - Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas
GC-NPD: do inglês, *Gas Chromatography with Nitrogen–Phosphorus Detector* - Cromatografia Gasosa com Detector de Nitrogênio e Fósforo
HMA: 4-hidroxi-3-metoxianfetamina
HMMA: 4-hidroxi-3-metoximetanfetamina
HPLC/LTQ-Orbitrap-MS: do inglês, *High Performance Liquid Chromatography with ion trap-Orbitrap Mass Spectrometry*
HPLC-DAD: do inglês, *High Performance Liquid Chromatography with Diode-array Detector*- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos
HPLC-UV: do inglês, *High Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detector*- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Ultravioleta
LAT/FCF/USP: Laboratório de Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo
LC-MS/MS: do inglês, *Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry* – Cromatografia Líquida acoplada a Espectrômetro de Massas
LLE: do inglês, *Liquid-liquid Extraction* - Extração líquido-líquido
LOD: do inglês, *Limit of Detection* – Limite de detecção
LOQ: do inglês, *Limit of Quantification* – Limite de quantificação

MA: Metanfetamina
MAO: Monoaminoxidase
MBDB: N-metil-1-(3,4-metilenodioxifenil)-2-butamina
MDA: 3,4-metilenodioxianfetamina
MDE: Metilenodioxietanfetamina
MDEA: 3,4-metilenodioxietilanfetamina
MDMA: 3,4-metilenodioximetanfetamina
MDPA: 3,4-metilenodioxipropilanfetamina
MMDA: 3-metóxi-4,5-metilenodioxianfetamina
MS: do inglês, *Mass Spectrometry* – Espectrometria de Massas
OMS: Organização Mundial da Saúde
PI: Padrão Interno
PIB: Produto Interno Bruto
PMA: 4-metoxianfetamina
RDC: Resolução da Diretoria Colegiada
SAMHSA: do inglês, *Substance Abuse and Mental Health Services Administration* - Agência de Serviços em Abuso de Substâncias e Saúde Mental dos Estados Unidos
SNC: Sistema Nervoso Central
SPE: do inglês, *Solid Phase-extraction* – Extração em fase sólida
SPME: do inglês, *Solid Phase Micro Extraction* – Micro extração em fase sólida
TDH: Transtorno do Déficit de Atenção com Hiperatividade/impulsividade
TFAA: do inglês, *Trifluoroacetic anhydride* – Anidrido trifluoroacético
TMA: 3,4,5-trimetoxianfetamina
UNODC: do inglês, *United Nations Office on Drugs and Crime* – Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime
UPLC-MS/MS: do inglês, *Ultra Performance Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry* – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrômetro de Massas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química das anfetaminas e os produtos de biotransformação.....	06
Figura 2 - β -fenetilamina e seus derivados (Adaptado de Oga <i>et al.</i> ¹⁴)	10
Figura 3 – Estrutura química da dietilpropiona	12
Figura 4 - Estrutura química do femproporex	13
Figura 5 – Cromatograma ilustrando a eluição dos analitos de interesse em três concentrações. PI = padrão interno (clorprenalina).....	34
Figura 6 – Eluição da dietilpropiona empregando-se comprimento de onda de 252nm	35
Figura 7 – Espectros de absorbância das substâncias analisadas	36
Figura 8 – Concordância entre o relato dos entrevistados e o resultado toxicológico (n=385)	41
Figura 9 – (A) Cromatograma obtido com a análise por HPLC-DAD de uma amostra de urina adicionada com anfetamina (1), dietilpropiona (2), femproporex (3) e padrão interno clorprenalina (4) em uma concentração de 1000 ng/mL. (B) amostra branco adicionada com padrão interno. (C) urina referente ao caso 3127, positiva para anfetamina na concentração 3440 ng/mL	44
Figura 10 – (A) Cromatograma obtido com a análise por HPLC-DAD de uma amostra de urina adicionada com anfetamina (1), dietilpropiona (2), femproporex (3) e padrão interno clorprenalina (4) em uma concentração de 1000 ng/mL. (B) amostra branco adicionada com padrão interno. (C) urina referente ao caso 3057, positiva para anfetamina e femproporex nas concentrações 6184 ng/mL e 4262 ng/mL, respectivamente	45
Figura 11 – (A) cromatograma obtido de amostra de urina adicionada com: anfetamina (1), anfetamina-d ₅ (2), dietilpropiona (3) e femproporex (4), na concentração de 250 ng/mL. (B) amostra branco adicionada com padrão interno deuterado. (C) urina referente à amostra de número 3092. Os íons usados para a geração do cromatograma foram: 118+123+193+100. Picos sobrepostos são íons comuns em alguns analitos	47
Figura 12 – Distribuição dos entrevistados de acordo com o grau de escolaridade (n=385).....	48

Figura 13 – Distribuição dos entrevistados de acordo com o regime de serviço (n=385).....	49
Figura 14 – Distribuição dos entrevistados de acordo com o tempo de serviço (n=385).....	49
Figura 15 – Hábito tabagista dos motoristas profissionais (n=385)	50
Figura 16 – Resposta dos motoristas quanto à percepção de dor ao dirigir, à prática de atividade física e ao consumo de álcool (n=385).....	51
Figura 17 – Estrutura química da clorprenalina (PI)	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Métodos analíticos utilizados nas análises de derivados anfetamínicos em amostras de urina	18
Tabela 2 - Valores de precisão intra e interensaios obtidos com a aplicação do método proposto em amostras de urina	38
Tabela 3 - Resultados do estudo de exatidão realizado em três dias consecutivos.....	39
Tabela 4 - Valores de recuperação obtidos com a aplicação do método proposto em amostras de urina.....	40
Tabela 5 – Resposta quanto ao uso de “rebite” e o consumo mais recente, dentre os casos positivos para anfetamina (n=10)	42
Tabela 6 – Resposta quanto ao uso de “rebite” e medicamento utilizado, dentre os casos positivos para anfetamina (n=10)	42
Tabela 7 – Concentração dos analitos encontrada na urina dos casos positivos (n=10)	46

RESUMO

No Brasil, estudos apontam aumento de quase 30% no número de acidentes de trânsito em rodovias federais de 2008 a 2010 sendo que, no último ano, os veículos de carga, especificamente, estiveram envolvidos em 88.963 acidentes. Relata-se que muitos motoristas profissionais têm estreitos prazos de entrega a serem cumpridos e, portanto, se veem obrigados a dirigir por longo período de tempo e/ou sem paradas para descanso. A fim de atingir tal objetivo, alguns motoristas acabam recorrendo ao uso de anfetaminas, estimulantes do SNC, popularmente conhecidas como “rebite”. Análises toxicológicas utilizadas para verificar o uso de drogas por motoristas de caminhão em estudos epidemiológicos, por exemplo, baseiam-se em testes de triagem utilizando imunoensaios, cujos resultados positivos são confirmados por técnicas de espectrometria de massas. Os testes disponíveis no mercado para a triagem detectam a presença de anfetamina, que pode ser proveniente da biotransformação de alguns medicamentos. Entretanto, motoristas de caminhão relatam também o uso dos anorexígenos Dualid[®] S, Inibex[®] S e Hipofagin[®] S, cujo princípio ativo é a dietilpropiona, que se biotransforma diretamente em fenilpropanolamina e, portanto, não é detectada pelos testes de triagem convencionais, o que pode gerar resultados falso-negativos e, assim, subestimar o número de casos positivos em uma pesquisa. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento e validação de um método para detecção de anfetamina, dietilpropiona e femproporex, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD) e a posterior aplicação deste método em amostras de urina coletadas de caminhoneiros. A extração líquido-líquido da urina (2,0 mL) foi realizada com éter etílico (4,0 mL) e a validação seguiu o guia do *United Nations Office on Drugs and Crime*. Os limites de detecção e quantificação encontrados foram 120 e 150 ng/mL respectivamente. O método mostrou-se preciso, com coeficientes de variação inferiores a 15% e a recuperação para os três analitos foi superior a 50%. A linearidade abrangeu a faixa de 150 ng/mL a 1000 ng/mL ($r^2 > 0,99$) e para a dietilpropiona e anfetamina foi utilizado o coeficiente de ponderação $1/y$ devido à heteroscedasticidade apresentada. Entre as amostras analisadas ($n=385$), nove foram positivas para anfetamina e uma, para femproporex e anfetamina. Através da aplicação de questionário, foi traçado também o perfil sociodemográfico dos entrevistados. O método desenvolvido se mostrou preciso e sensível, podendo assim ser utilizado em estudos epidemiológicos e testes em ambientes de trabalho para a análise de anfetamina, dietilpropiona e femproporex em urina.

Descritores: Anfetaminas, acidentes de trânsito, cromatografia, urina, fadiga, condução de veículo, drogas ilícitas

ABSTRACT

In Brazil, studies indicate an increase of approximately 30% in the number of traffic accidents on federal highways, from 2008 to 2010 and, in 2010, cargo vehicles, specifically, were involved in 88,963 accidents. In fact, many professional drivers have tight deadlines to be met and, therefore, are forced to drive for long periods of time and/or without rest stops. In order to achieve this goal, some drivers end up resorting to the use of amphetamines, CNS stimulants, popularly known in Brazil as "rebite". Toxicological analyses used to verify the use of drugs by truck drivers in epidemiological studies are based on immunoassays screening tests and positive results are confirmed by mass spectrometry techniques. The commercially available screening tests detect the presence of amphetamine, which can be derived from the biotransformation of some drugs. However, truck drivers also report the use of anorectic Dualid[®] S, Hipofagin[®] S and Inibex[®] S, whose active compound is diethylpropion, which metabolizes directly to phenylpropanolamine. Therefore it is not detected by conventional screening tests, which can generate false-negative results and underestimate the number of positive cases. Thus, the aim of this study was the development and validation of a method for the detection of amphetamine, diethylpropion and fenproporex by high performance liquid chromatography (HPLC-DAD) and the subsequent application of this method in urine samples collected from truck drivers. The liquid-liquid extraction of urine (2.0 mL) was carried out with diethyl ether (4.0 mL) and the validation was performed according to United Nations Office on Drugs and Crime guidelines. The limits of detection and quantification were 120 and 150 ng/mL, respectively. The method was precise, with coefficients of variation less than 15% and the recovery for the three analytes was greater than 50%. The linearity covered the range of 150 ng/mL to 1000 ng/mL ($r^2 > 0.99$) and for diethylpropion and amphetamine it was applied the weighting factor $1/y$ due to heteroscedasticity. Among the analyzed samples ($n=385$), nine were positive for amphetamine and one tested positive for fenproporex and amphetamine. Sociodemographic profile of the interviewees was obtained through the application of questionnaires. The developed method proved to be accurate and sensitive, and thus can be used in epidemiological studies and in workplace drug testing.

Descriptors: Amphetamines, traffic accidents, chromatography, urine, fatigue, automobile driving, illicit drugs

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Segundo dados do relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS) “*Global status report on road safety 2013: supporting a decade of action*”, publicado em 2013, aproximadamente 1 milhão e 240 mil pessoas morrem anualmente em todo o mundo em decorrência de acidentes em rodovias, sendo esta a oitava principal causa de morte na população geral e a primeira entre a população jovem, de 15 a 29 anos¹. Caso nenhuma medida seja tomada, até o ano de 2030 estima-se que essa classificação geral assuma a quinta posição. Ocorrências desse tipo deixam ainda de 20 a 50 milhões de vítimas não fatais e consomem cerca de 1-2% do Produto Interno Bruto (PIB) de países de baixa e média renda, incluindo-se neste grupo o Brasil. No âmbito financeiro, quando se leva em conta despesas para o atendimento médico-hospitalar e o impacto negativo na produtividade e, conseqüentemente, no processo de geração de renda, esses acidentes representam algo em torno de 100 bilhões de dólares ao ano¹.

No Brasil, entre os anos de 2008 a 2010, dados estatísticos apontam aumento de quase 30% no número de acidentes de trânsito em trechos policiados da malha rodoviária federal. Neste mesmo período, o número de vítimas fatais envolvidas nesses acidentes aumentou de 6.946 para 8.616, sendo que no último ano os veículos de carga, especificamente, estiveram envolvidos em 88.963 acidentes².

A frota nacional de veículos de transporte de cargas possui mais de 1 milhão e 900 mil caminhões, sendo o transporte rodoviário responsável pela

movimentação de mais de 60% de toda a carga que trafega no território nacional³. Isso demonstra que a economia brasileira é bastante dependente do transporte rodoviário, apesar das características físicas do país serem favoráveis à utilização de outros meios, como o ferroviário e o aquaviário (principalmente para o transporte de grande quantidade de cargas por longas distâncias)⁴.

O número exato de motoristas profissionais é desconhecido, porém dados da Agência Nacional de Transportes Terrestres (ANTT) apontam para a existência de quase 700 mil caminhoneiros autônomos ou cooperativados no Brasil⁵. O setor de transportes terrestres brasileiro é predominantemente masculino, sendo composto por mais de 93% de homens, os quais estão sujeitos a diversos estados patológicos como, por exemplo, estresse, transtornos mentais, surdez ocupacional, fadiga, irritabilidade, dores, desordens musculoesqueléticas, distúrbios do sono, doenças cardiovasculares, obesidade e problemas estomacais⁶⁻¹⁰. Os motivos que justificam tais achados são os mais variados como, por exemplo, longos períodos fora de casa, elevado percentual de assaltos durante o trabalho, noites mal dormidas, alimentação inadequada, poluição sonora excessiva, sedentarismo, condições ergonômicas do veículo, tráfego muitas vezes intenso, além de extensas jornadas de trabalho⁷⁻¹⁰.

O estresse advindo da profissão e, principalmente, a constante pressão a que esses profissionais estão submetidos podem levá-los a serem grandes consumidores de cigarros, bebidas alcoólicas e bebidas cafeinadas¹¹. Muitos têm prazos de entrega a serem cumpridos e, portanto, se veem obrigados a

dirigir por longos períodos e, muitas vezes, ininterruptos. A fim de atingir tal objetivo, alguns motoristas recorrem ao uso de substâncias psicoativas¹¹⁻¹³. Dentre essas substâncias citam-se as anfetaminas, popularmente conhecidas no meio como “rebite”, que são utilizadas para manter a vigília, uma vez que produzem acentuada estimulação no Sistema Nervoso Central (SNC) e aumentam o estado de alerta físico e mental¹⁴. Segundo dados do *United Nations Office on Drugs and Crime* (UNODC), os estimulantes tipo anfetamínicos, incluindo o *ecstasy* e, mais recentemente, destacando-se a metanfetamina, constituem o segundo grupo de substâncias ilícitas mais consumidas em todo o mundo, com uma estimativa de 13,9 a 54,8 milhões de usuários. As apreensões em nível mundial também requerem atenção: foram 144 toneladas em 2012, um aumento de 15% quando comparado ao ano de 2011¹⁵.

No Brasil, de acordo com um levantamento realizado em 2012 em todo o território nacional, envolvendo indivíduos acima de 18 anos, 2,7% dos entrevistados afirmaram já ter feito uso de estimulantes anfetamínicos (anorexígenos) alguma vez na vida¹⁶. Em outubro de 2011, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) suspendeu, por meio da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 52, a fabricação e comercialização dos inibidores de apetite do tipo anfetamínicos (dietilpropiona, também conhecida como anfepramona, femproporex e mazindol) por entender que os riscos associados ao uso desta terapia medicamentosa, somados à falta de comprovação de sua eficácia, não justificavam a manutenção de seus registros¹⁷.

Sabe-se que o consumo de anfetaminas por motoristas profissionais é mais elevado que o consumo na população em geral¹¹. A relação prejudicial entre o uso de substâncias psicoativas (administradas de forma isolada ou em associação) e direção veicular já foi descrita por alguns autores¹⁸⁻²². Apesar do uso de estimulantes, como é o caso das anfetaminas, poder melhorar as funções cognitivas relacionadas ao ato de dirigir como, por exemplo, atenção, funcionamento psicomotor, memória, além de elevar o desempenho de vigilância a um nível basal em participantes fadigados (privados de sono por 22 a 85 horas), estudos utilizando simuladores sugerem déficits na direção com o uso de estimulantes, tais como falhas ao desviar de obstáculos, excesso de velocidade, direção errática e tomada de condutas de risco²²⁻³⁰. Os efeitos residuais do uso de drogas também afetam a capacidade de conduzir, assim, a exemplo, a “ressaca” do álcool afeta os reflexos do condutor, enquanto que o efeito rebote da anfetamina causa depressão, sono, fadiga, além da degeneração dos neurônios responsáveis pela produção de serotonina^{31,32}.

Grande parte dos trabalhos brasileiros envolvendo o uso de anfetaminas e/ou outras drogas por motoristas profissionais utiliza como metodologia entrevistas ou questionários autoaplicados, podendo haver importante variação nos resultados obtidos¹⁰⁻¹². Com outra abordagem, análise feita em amostras de urina de motoristas de caminhão nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste do Brasil detectou a presença de anfetaminas em 4,8% dos casos³³. Outros estudos que utilizaram a mesma matriz biológica e que foram conduzidos em rodovias do estado de São Paulo, encontraram, 5,8% e 10,8% de casos positivos para anfetaminas^{13,34}.

No âmbito legal, o art. 306 do Código de Trânsito Brasileiro (CTB), alterado em 2012, estabelece punição de “detenção, de seis meses a três anos, multa e suspensão ou proibição de se obter a permissão ou a habilitação para dirigir veículo automotor” para aqueles que transgredirem o que o artigo traz em seu *caput* “Conduzir veículo automotor com capacidade psicomotora alterada em razão da influência de álcool ou de outra substância psicoativa que determine dependência: (...)”³⁵. Porém, o texto não deixa claro o que entende por “substância psicoativa que determine dependência” e, principalmente, não estabelece de que forma essa análise deverá ser conduzida.

As análises toxicológicas utilizadas para verificar o uso especificamente de drogas de abuso por motoristas profissionais, exceto o álcool, baseiam-se em testes de triagem utilizando imunoensaios, cujos resultados positivos são confirmados por técnicas mais específicas como a espectrometria de massas³⁶⁻³⁸.

Os testes disponíveis no mercado para a triagem de anfetaminas detectam a presença de anfetamina, produto de biotransformação da metanfetamina, do clobenzorex e do femproporex, e que posteriormente é biotransformada em fenilpropanolamina. Contudo, motoristas de caminhão têm relatado o uso dos anorexígenos Dualid[®] S, Inibex[®] S e Hipofagin[®] S para manter o estado de alerta e assim poder percorrer longos percursos. O princípio ativo de tais medicamentos é a dietilpropiona, que é biotransformada diretamente em fenilpropanolamina (Figura 1) e, portanto, não é detectada pelos testes de triagem disponíveis no mercado^{13,39}. Assim, torna-se necessário o estabelecimento de metodologias analíticas que sejam capazes

de detectar não somente os fármacos cujo produto de biotransformação é a anfetamina, mas também a dietilpropiona.

Figura 1 - Estrutura química das anfetaminas e os produtos de biotransformação

O objetivo do trabalho foi, portanto, desenvolver e validar um método para detecção de anfetamina, dietilpropiona e femproporex, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) em amostras de urina. Após esta etapa, o método foi aplicado em 385 amostras de urina de motoristas profissionais, sendo os casos positivos confirmados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS, do inglês *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*). Além disso, na ocasião da coleta das amostras, foi aplicado um questionário aos participantes e, por meio deste, foi traçado um perfil desses profissionais.

Revisão da Literatura

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Anfetaminas

A anfetamina foi sintetizada em 1887 por Lazar Edeleanu, porém sua atividade psicoestimulante só foi identificada em 1927 e nos anos 30 foi introduzida na terapêutica como descongestionante nasal. Entre 1935 e 1946 foi utilizada para uma série de indicações, incluindo tratamento para esquizofrenia, síndrome de hiperatividade em crianças, dependência de morfina, de nicotina e de cafeína, hipotensão, enjoos e soluços intensos^{14,40}. Durante a Segunda Guerra Mundial, a anfetamina foi amplamente usada pelos alemães e aliados para aumentar a vigília e a agressividade dos soldados em campos de batalhas e para diminuir a fadiga^{41,42}. Os japoneses a utilizavam não apenas em suas tropas, mas também em trabalhadores civis para aumentar a produtividade¹⁴. De uso militar, rapidamente tornou-se droga difundida por toda a sociedade. No meio esportivo, atletas começaram a utilizar anfetaminas em busca de suas propriedades ergogênicas. Estudantes e motoristas de caminhão começaram a utilizar para manter o estado de alerta por maior período de tempo e assim aumentar a capacidade de atenção, concentração e raciocínio⁴³.

O termo “anfetamínicos” refere-se ao grupo de substâncias composto pela anfetamina e seus derivados. Farmacologicamente atuam como aminas simpatomiméticas nos receptores α e β adrenérgicos, sendo potentes estimulantes do SNC e também periférico¹⁴. Agem promovendo a liberação direta dos neurotransmissores noradrenalina e dopamina na fenda sináptica,

além de inibir a recaptação e degradação enzimática dos mesmos por serem inibidores da monoaminoxidase, a MAO⁴².

O aumento da atividade psicomotora parece ser resultado do excesso de estimulação dos receptores dopaminérgicos no sistema mesolímbico (incluindo o núcleo *accumbens*), além da ação da noradrenalina nos receptores α -1, α -2, β -1, β -2 e β -3 presentes nos neurônios do neocórtex, tálamo, vasos e células gliais, todos acoplados à proteína G¹⁴. O comportamento estereotipado parece estar relacionado com a estimulação de neurônios dopaminérgicos existentes nos gânglios da base⁴⁰.

Quimicamente, as anfetaminas apresentam a estrutura básica da β -fenetilamina, formada por um anel benzênico e uma cadeia lateral de etilamina. Sua estrutura permite substituições (R) no anel aromático, nos carbonos α e β e no grupo amino terminal originando muitos derivados (Figura 2). O isômero *l* (levoanfetamina) é discretamente mais potente na produção de efeitos periféricos, enquanto o isômero *d* (dextroanfetamina) é três ou quatro vezes mais potente na estimulação do SNC¹⁴. A *l*-anfetamina é conhecida como benzedrina e a *d*-anfetamina por dexedrina. Metanfetamina, fenmetrazina, metilfenidato e dietilpropiona produzem, em doses equivalentes, efeitos similares aos da anfetamina. Fenfluramina, fenilpropanolamina e mazindol são representantes com menores efeitos subjetivos, tendo, portanto, menor potencial de abuso¹⁴. Além de atividades farmacológicas distintas, os isômeros também apresentam diferenças nas propriedades farmacocinéticas. Assim, o isômero *d* é metabolizado mais rapidamente do que o isômero *l*: enquanto o primeiro possui meia vida de 11 a 13 horas, a do segundo é 39% maior⁴⁴.

Substância	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
Anfetamina	H	H	H	H	H	H	CH ₃
Clorfentermina	H	H	CH ₃	H	H	Cl	CH ₃
Dietilpropiona	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	H	O	H	H	CH ₃
Efedrina	H	CH ₃	H	OH	H	H	CH ₃
Fenfluramina	CH ₂ CH ₃	H	H	H	CF ₃	H	CH ₃
Fenilefrina	H	CH ₃	H	OH	OH	H	H
Feniprazina	H	NH ₂	H	H	H	H	CH ₃
Femproporex	CH ₂ CH ₂ CN	H	H	H	H	H	CH ₃
Fentermina	H	H	CH ₃	H	H	H	CH ₃
Metanfetamina	CH ₃	H	H	H	H	H	CH ₃

Figura 2 - β -fenetilamina e seus derivados (Adaptado de Oga *et al.*¹⁴)

A estrutura β -fenetilamina é crucial para a maioria de suas propriedades farmacológicas e bioquímicas. A natureza das substituições nas posições *m* (radical meta-dirigente) e *p* (radical orto-para-dirigente) do anel benzênico e no carbono β da cadeia lateral determina se um fármaco simpatomimético terá ação direta (substituições em pelo menos duas dessas posições) ou indireta (apenas uma ou nenhuma substituição nestas três posições) nos receptores adrenérgicos. Compostos de ação indireta, como por exemplo, anfetamina, metanfetamina e efedrina produzem efeitos simpáticos por liberarem

noradrenalina de suas vesículas de armazenamento nos neurônios adrenérgicos¹⁴.

As tentativas de diminuir os efeitos colaterais indesejáveis, bem como o potencial de abuso da anfetamina, levaram à produção de análogos com substituições no anel aromático e na cadeia lateral. A adição de grupos metóxi altera drasticamente o espectro de ação dos derivados anfetamínicos. A metoxilação progressiva do anel aromático praticamente abole a habilidade desses compostos de inibir a recaptação de neurotransmissores e de liberá-los de seus sítios de ligação. Assim, esses fármacos exercem seus efeitos característicos por interação direta com o receptor. A substituição de um grupo metóxi na posição *m* do anel aromático confere propriedades alucinógenas a esses compostos. Como exemplo de anfetamínicos alucinógenos pode-se citar a 2,5-dimetóxi-4-metilanfetamina (DOM), 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA), 2,5-dimetoxianfetamina (DMA), 3-metóxi-4,5-metilenodioxianfetamina (MMDA), 4-metoxianfetamina (PMA), 3,4,5-trimetoxianfetamina (TMA), 4-bromo-2,5-dimetoxianfetamina (DOB), 2,5-dimetóxi-4-etilanfetamina (DOET) e 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) popularmente conhecida como *ecstasy*¹⁴.

A dietilpropiona, também conhecida como anfepramona (Figura 3), apresenta-se na forma de um fino pó cristalino branco ou praticamente branco. Possui coeficiente de partição octanol/água igual a 3.04 e elevada solubilidade em água, etanol e clorofórmio, sendo praticamente insolúvel em éter. Esse fármaco apresenta em sua estrutura química um grupamento amina na forma terciária e um átomo de carbono quiral. A dietilpropiona era utilizada comercialmente como uma mistura racêmica nos medicamentos Dualid® S,

Inibex[®] S, Hipofagin[®] S e Moderine[®] e seus produtos de biotransformação são N-dietilaminopropiofenona, norefedrina (fenilpropanolamina) e ácido hipúrico⁴⁵.

Figura 3 – Estrutura química da dietilpropiona

O femproporex foi sintetizado em laboratórios franceses em 1965 e sua estrutura química é caracterizada por apenas uma substituição no anel benzênico e pela presença de um substituinte volumoso no grupamento amino sendo, portanto, uma amina secundária (Figura 4). Estas modificações diminuem a capacidade de criar dependência, mantendo o efeito anorexígeno. Em torno de 30% da dose ingerida de femproporex sofre biotransformação pré-sistêmica devido ao efeito de primeira passagem e à ação enzimática da flora intestinal. Um dos principais produtos de biotransformação produzidos por uma reação de N-dealquilação é a anfetamina⁴⁶.

Figura 4 - Estrutura química do femporex

Em baixas doses, a anfetamina aumenta a pressão arterial e causa relaxamento dos brônquios⁴². O metilfenidato, particularmente, é indicado no tratamento do Transtorno do Déficit de Atenção com Hiperatividade/Impulsividade (TDAH), que consiste em um padrão persistente de desatenção e/ou hiperatividade na infância⁴⁷. Outra indicação terapêutica dos anfetamínicos é na narcolepsia, distúrbio caracterizado por crises de sono, cataplexia (perda súbita do tônus muscular), paralisia do sono e pesadelos visuais e auditivos intensos, que podem persistir no estado de vigília. Em caráter recreacional, observa-se o abuso por conta do aumento do estado de alerta, da diminuição da fadiga, como anorexígeno e para o tratamento de casos moderados de depressão⁴⁴.

A via oral é a principal via de administração da anfetamina, a qual atravessa rapidamente as membranas biológicas devido à sua lipossolubilidade, sendo, portanto, rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal⁴². Após a administração de 10 a 15 mg, o pico de concentração plasmática ocorre em 1-2 horas, sendo que a absorção geralmente se completa em 4-6 horas. Sua eliminação é acentuadamente dependente do pH urinário. Em condições normais, aproximadamente 30% da dose ingerida é excretada inalterada na urina em questão de 24 horas e 90% é excretada após

3 a 4 dias. Em condições de acidez da urina, a quantidade de anfetamina eliminada por via renal aumenta para 74% em 24 horas, já com a alcalinização esse valor diminui para cerca de 1 a 4%. A redução da quantidade inalterada excretada em pH básico se deve ao fato de que, ocorrendo uma reabsorção renal da anfetamina neste pH, esta se torna mais disponível para ser biotransformada^{14,46}. A principal reação de biotransformação da anfetamina, que é produto de biotransformação da metanfetamina, femproporex, clobenzorex e selegilina, é a desaminação oxidativa, originando fenilacetona, a qual é então oxidada a ácido benzoico e conjugada à glicina para formar ácido hipúrico⁴⁵.

Os efeitos do uso das anfetaminas dependem de fatores individuais, padrão de consumo, além da quantidade ingerida. Alguns exemplos de efeitos imediatos observados após o consumo de doses baixas a moderadas incluem euforia, aumento da confiança e motivação, alucinações, irritabilidade, vigília, midríase, aumento da frequência cardiorrespiratória, sudorese, palpitações, diminuição do apetite, entre outros. Doses maiores podem intensificar os efeitos supracitados, além de provocar tremores, respiração irregular, perda de coordenação motora, comportamento violento ou agressivo, ataque súbito e coma. O uso de altas doses e de forma frequente pode levar à chamada “psicose anfetamínica”, caracterizada por delírios paranoicos, alucinações e comportamento agressivo, bizarro ou violento, que geralmente desaparecem poucos dias após a descontinuação do uso. À medida que os efeitos cessam, observam-se sintomas como irritabilidade, ansiedade, mudanças repentinas de humor, depressão, letargia, exaustão completa. Persistindo o uso, observam-se

efeitos a longo prazo que incluem desnutrição, distúrbios crônicos de sono, deficiência do sistema imunológico, problemas dentários, risco aumentado para ataque cardíaco, insuficiência renal e respiratória, rigidez muscular e dificuldade de concentração. Usuários frequentes de anfetaminas geralmente desenvolvem dependência e tolerância, a qual se caracteriza por necessidade de doses maiores para se obter os mesmos efeitos. Já a dependência observa-se quando há o sentimento de necessidade de consumo ou ainda quando determinadas funções fisiológicas passam a depender da substância⁴⁸.

2.1.1 Análises toxicológicas para determinação de anfetaminas em amostras de urina

A urina é a matriz biológica mais comumente utilizada para se testar o uso de drogas de abuso devido, principalmente, à facilidade de obtenção da amostra (coleta não invasiva), facilidade de manipulação para análise e possibilidade de se detectar a droga inalterada e/ou seu(s) principal(is) produto(s) de biotransformação mesmo alguns dias após o consumo⁴⁹. Os resultados dos testes dependem de fatores tais como o tempo decorrido entre o consumo da droga e a coleta da amostra e o pH da urina. Dietas que ocasionem mudanças no pH urinário podem alterar significativamente o padrão de excreção de certas drogas. Além deste conhecimento acerca da matriz biológica, é importante também que se tenha controle desde a coleta da amostra até o local onde será efetuada a análise, com o intuito de evitar, principalmente, a adulteração da mesma e/ou degradação do analito (cadeia de custódia)⁴⁴.

Para a pesquisa de drogas de abuso em amostras de urina, devem-se combinar métodos de triagem e confirmação que se baseiem em princípios físicos e químicos distintos uns dos outros⁴⁴. Assim, o emprego de imunoensaios para a triagem e a confirmação das amostras positivas por técnicas de cromatografia (líquida ou gasosa) acopladas à espectrometria de massas (MS, do inglês, *mass spectrometry*) são necessários neste caso⁵⁰.

Valores de *cutoff*, recomendados por entidades internacionais, são adotados como valores de referência de concentração dos fármacos/metabólitos em uma amostra biológica para categorização dos resultados como indicativo ou não do consumo da droga. A SAMHSA (*Substance Abuse and Mental Health Services Administration*), agência pertencente ao Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos, estabelece valores de *cutoff* para as anfetaminas de 500 ng/mL para os testes de triagem e 250 ng/mL para os testes de confirmação⁵¹. Os testes de triagem geralmente não fazem distinção entre substâncias relacionadas entre si ou entre o fármaco e seu(s) produto(s) de biotransformação, enquanto os testes confirmatórios são capazes de detectar e identificar cada um dos compostos isoladamente. Isso justifica a diferença observada para os valores de *cutoff* entre as técnicas.

Os testes por imunoensaio são sensíveis, podem ser automatizados e requerem um tratamento prévio mínimo das amostras⁴⁴. De maneira geral, são métodos que se baseiam no princípio de interação entre antígenos (as moléculas alvo) e anticorpos. Quando aplicado para testes de substâncias, a técnica de imunoensaio utiliza um anticorpo específico para o xenobiótico ou para a classe do fármaco a ser analisada⁵².

Uma desvantagem dos testes por imunoensaio é que são desenvolvidos para determinadas classes de medicamentos, como por exemplo, para a anfetamina. Porém no caso específico da dietilpropiona, que não é biotransformada em anfetamina (Figura 1), não há possibilidade de se detectar utilizando métodos de triagem com anticorpos monoclonais³⁹. Outra desvantagem é a possibilidade de reação cruzada com outras substâncias estruturalmente semelhantes, o que geraria resultados falsamente positivos⁴⁴.

Primando pela qualidade e confiabilidade das análises, as amostras, cujo resultado seja positivo na etapa de triagem, são submetidas à etapa de confirmação, empregando-se uma das técnicas consideradas como “padrão ouro”: cromatografia gasosa (GC) ou cromatografia líquida (LC) ambas acopladas a espectrômetro de massas⁵¹.

A análise cromatográfica de substâncias presentes em matrizes biológicas geralmente requer etapas de pré-tratamento da amostra, que visam separar os analitos de interesse de possíveis interferentes presentes na amostra, além de servir como etapa de concentração das substâncias a serem analisadas. O processo de extração a ser adotado depende não somente das propriedades físico-químicas e da concentração esperada do analito a ser recuperada, como também da natureza da matriz biológica escolhida e das condições particulares do laboratório onde serão feitas as análises. Para a determinação de anfetaminas em amostras de urina, as duas principais técnicas de extração descritas na literatura são a extração líquido-líquido (do inglês, *liquid-liquid extraction* - LLE) e a extração em fase sólida (do inglês, *solid phase extraction* – SPE) (Tabela 1)^{44,45,49}.

Tabela 1 - Métodos analíticos utilizados nas análises de derivados anfetamínicos em amostras de urina

Referência	Analitos	Extração	Deteção
Varesio e Veuthley, 1995 ⁵³	MDMA, MDEA, MDA, AN, MA	SPE, LLE	CE-DAD
Thormann <i>et al.</i> , 1998 ⁵⁴	MDMA, MDA, HMMA	SPE	CE-DAD
Jurado <i>et al.</i> , 2000 ⁵⁵	MDMA, MDA, AN, MA	SPME	GC-MS
Geiser <i>et al.</i> , 2000 ⁵⁶	AN, MA, MDA, MDMA, MDEA, MBDB, MDPA	LLE	CE-MS
Pellegrini <i>et al.</i> , 2002 ⁵⁷	MDMA, MDEA, MDA, MBDB, AN, MA	LLE	GC-MS
Costa <i>et al.</i> , 2004 ⁵⁸	MDMA, MDEA, MDA	LLE	HPLC-UV
Jenkins <i>et al.</i> , 2004 ⁵⁹	MDMA, MDA, HMMA	SPE	LC-MS, LC-UV, GC-NPD
Schönberg <i>et al.</i> , 2006 ⁶⁰	AN, MDA, MDMA, MA	SPE	HPLC-DAD
Pirnay <i>et al.</i> , 2006 ⁶¹	MDEA, MDMA, HMA, MDA, HMMA	SPE	GC-MS
Concheiro <i>et al.</i> , 2007 ⁶²	AN, MA, MDMA, MDA	SPE	LC-MS/MS
Miranda-G <i>et al.</i> , 2007 ⁶³	AN, MA, HMA	LLE	GC-MS
Namera <i>et al.</i> , 2008 ⁶⁴	AN, MA, MDMA, MDA	SPE	HPLC-DAD
Ellison <i>et al.</i> , 2009 ⁶⁵	AN, MA, MDMA	SPE	GC-MS
Fernández <i>et al.</i> , 2009 ⁶⁶	AN, MA, MDA, MDMA	SPE	LC-MS/MS
Jemionek <i>et al.</i> , 2009 ⁶⁷	AN, MA	LLE	GC-MS
Fernández <i>et al.</i> , 2010 ⁶⁸	AN, MDA, MDEA, MDMA, MA, PMA	LLE	UPLC-MS/MS
Lee <i>et al.</i> , 2011 ⁶⁹	AN, MA, MDA, MDMA, MDEA	SPE	GC-MS
Seidi <i>et al.</i> , 2011 ⁷⁰	AN, MA, MDMA, MDEA, MBDB	EME	HPLC-DAD
Li <i>et al.</i> , 2013 ⁷¹	AN, MA, BDB, MBDB, MDA, MDE, MDMA, MDPA	SPE	HPLC/LTQ-Orbitrap-MS
Lin <i>et al.</i> , 2013 ⁷²	AN, MDMA	SPE	LC-MS/MS

Objetivo e plano de trabalho

3. OBJETIVO E PLANO DE TRABALHO

O objetivo do trabalho foi o desenvolvimento de um método analítico de triagem para a detecção de anfetaminas (anfetamina, femproporex e dietilpropiona) em amostras de urina por HPLC-DAD e posterior aplicação deste método a amostras de motoristas profissionais de caminhão que trafegavam em rodovias do estado de São Paulo. Para que esse objetivo fosse alcançado, o seguinte plano de trabalho foi seguido:

- Pesquisa bibliográfica referente às técnicas de detecção/determinação das anfetaminas;
- Desenvolvimento e otimização de método por HPLC-DAD, utilizando-se a técnica de extração líquido-líquido para o preparo das amostras;
- Validação do método analítico, avaliando-se parâmetros como limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), linearidade, exatidão, precisão intra e interensaio e recuperação seguindo os parâmetros estabelecidos pelo UNODC;
- Aplicação do método em 385 amostras de urina coletadas de motoristas profissionais de caminhão em diferentes edições do projeto “Comandos de Saúde nas Rodovias”, no ano de 2013, promovido pelo Departamento de Polícia Rodoviária Federal (DPRF) em parceria com o SEST SENAT;
- Confirmação dos casos positivos por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (GC-MS);

- Caracterização do perfil sociodemográfico dos motoristas profissionais de caminhão doadores das amostras e interpretação dos resultados.

Métodos

4. MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Reagentes

Acetonitrila grau HPLC, metanol grau HPLC, cloreto de sódio, éter etílico, sulfato de sódio anidro, ácido orto-fosfórico 85%, hidróxido de potássio e ácido clorídrico foram obtidos da Merck® (Darmstadt, Germany). Trietilamina foi obtida da Sigma-Aldrich® (Steinheim, Germany).

4.1.2 Soluções-padrão

Padrões de anfetamina, femproporex, dietilpropiona e clorprenalina (padrão interno) foram obtidos da Cerilliant Corporation® (Round Rock, Texas, EUA) na concentração de 1 mg/mL em metanol.

Soluções-padrão de trabalho foram preparadas nas concentrações de 200 µg/mL, 100 µg/mL e 20 µg/mL, para cada padrão, obtidas pela diluição em metanol das soluções-padrão estoque com auxílio de pipetas e balões volumétricos.

4.1.3 Equipamentos e acessórios

Equipamento de cromatografia em fase líquida de alta eficiência da Shimadzu[®], composto por uma bomba quaternária modelo LC-20AT, detector SPD-M20A de DAD, degaseificador DGU-20As, central de controle CBM-20A, injetor automático de amostras SIL-20AC e forno CTO-10AS VP. A aquisição e a análise dos dados foram realizadas através do *software* LCsolution;

Equipamento de cromatografia em fase gasosa modelo GC 2010 acoplado a espectrômetro de massas quadrupolo modelo QP 2010, ambos da Shimadzu[®];

Centrífuga refrigerada modelo Spin VI, Incibrás[®];

Concentrador de nitrogênio, Tecnal[®];

Aagitador de tubos tipo “vórtex”, Phoenix[®].

4.1.4 Amostras

As amostras biológicas (urina) de motoristas profissionais que trafegavam em rodovias do Estado de São Paulo e que foram submetidas ao método desenvolvido e validado foram coletadas, a saber:

	Município	Número de amostras	Data da coleta
Rodovia Fernão Dias (Km 48)	Atibaia	140	10/04/2013
Rodovia Régis Bittencourt (Km 439)	Registro	159	15/05/2013
Rodovia Presidente Dutra (Km 78)	Roseira	91	14/08/2013

Nas três ocasiões, os motoristas foram abordados por Policiais Rodoviários Federais, das 09h00 às 15h00, de acordo com o tamanho dos veículos e do espaço disponível para o estacionamento dos mesmos à margem das rodovias e convidados a participar do projeto “Comandos de Saúde nas Rodovias”. Trata-se de uma parceria entre o Departamento de Polícia Rodoviária Federal (DPRF) e o SEST SENAT que, desde 2006, mobiliza diversas unidades em blitzes educativas nas estradas, onde os motoristas são orientados sobre bons hábitos de saúde por profissionais. As campanhas são voltadas aos trabalhadores de empresas de transporte rodoviário e transportadores autônomos. Ao serem atendidos por educadores e médicos, eles passam por aferições para detectar fatores de risco à saúde como, por exemplo, hipertensão, obesidade, estresse e sonolência. Ao final dos exames, o motorista é encaminhado para uma orientação médica. Além dos atendimentos médicos, os profissionais do SEST SENAT e do DPRF promovem atividades de recreação, para entretenimento e educação dos motoristas durante a parada. Neste período, são realizadas ações sociais como ginástica laboral, massagens corporais, palestras e exibição de vídeos sobre temas relacionados à saúde, com distribuição de preservativos e materiais informativos sobre Doenças Sexualmente Transmissíveis (DSTs)⁷³.

Os caminhoneiros foram informados e convidados também a participar deste projeto. Aqueles que aceitaram, após assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo A), responderam o questionário (Anexo B) e voluntariamente doaram amostra de urina, que foi coletada em frascos de polietileno e mantidas sob refrigeração em caixas térmicas por no máximo seis horas antes de serem armazenadas no freezer a -20°C do Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Medicina da USP.

Interessante ressaltar que, apesar da proibição por parte da ANVISA, já descrita anteriormente, com relação à fabricação e ao comércio de medicamentos contendo os princípios ativos em estudo, os motoristas profissionais continuaram relatando que ainda é possível encontrar tais medicamentos à venda.

O projeto tem aprovação da Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq) nº 0093/09 (Anexo C).

4.2 Métodos

4.2.1 Determinação de anfetamina, dietilpropiona e femproporex por HPLC-DAD

Um método foi desenvolvido e validado para a determinação de anfetamina, dietilpropiona (anfepramona) e femproporex por HPLC-DAD. A clorprenalina foi utilizada como padrão interno.

4.2.1.1 Preparação das amostras de urina para o desenvolvimento e validação do método

Em um tubo plástico de 10,0 mL contendo 1,0 g de NaCl foram adicionados 2,0 mL de urina, à temperatura ambiente e previamente homogeneizada. Foram adicionados padrões de anfetamina, femproporex e dietilpropiona e o padrão interno (80 µL de uma solução de 20 µg/mL) antes da extração. Para tornar o meio básico para extração, 200 µL de KOH 5M foram acrescentados em cada tubo. Os analitos foram extraídos através da adição de 4,0 mL de éter etílico (10 minutos de agitação seguido de 10 minutos de centrifugação a 2000 rpm). O sobrenadante foi então transferido para um béquer de 10 mL contendo sulfato de sódio anidro e, posteriormente, para um frasco cônico no qual foram acrescentados 15 µL de HCl 0,1 M e então evaporado sob fluxo de nitrogênio à temperatura ambiente. O produto obtido foi ressuspensionado com 100 µL da fase móvel utilizada no HPLC e 20 µL foram injetados no sistema cromatográfico.

4.2.1.2 Validação do método analítico

A validação do método proposto foi realizada estabelecendo-se os valores de limite de detecção e quantificação, linearidade, exatidão, precisão intra e interensaio e recuperação segundo o guia do UNODC⁷⁴.

4.2.1.2.1 Limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)

LOD é a menor concentração de um analito que pode ser detectada e identificada com um determinado grau de certeza. O LOD também é definido como a menor concentração que pode ser distinguida do sinal-ruído com certo grau de confiança. Existem vários métodos para estimar o LOD, todos os quais dependem da análise de branco de amostras e da análise da relação sinal-ruído. O método utilizado neste trabalho foi o cálculo do sinal-ruído, ou seja, 3 vezes o sinal ruído para o LOD e 10 vezes o sinal ruído para o LOQ⁷⁴.

4.2.1.2.2 Linearidade

Linearidade é a capacidade de um método analítico demonstrar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado⁷⁵. O estudo de linearidade foi realizado pela análise de amostra de urina branca, ou seja, proveniente de doador que sabidamente não havia feito uso de quaisquer substâncias pesquisadas, adicionada dos padrões e submetida ao método em sextuplicata nas seguintes concentrações de anfetamina, dietilpropiona e femproporex: 150, 200, 400, 600, 800 e 1000 ng/mL.

Para avaliar a homoscedasticidade ou heteroscedasticidade dos desvios da curva de calibração utilizou-se o teste F, que analisa a variância entre as médias. Para esse teste, a variância dos desvios-padrão do menor e do maior ponto da curva de calibração foi utilizada. A homoscedasticidade é verificada

quando a distribuição dos erros entre as médias é menor ou igual ao fator F teórico. Quando a distribuição dos erros for maior que o valor do F teórico, é confirmada então a existência de heteroscedasticidade do conjunto. Nesse caso, a regressão linear ponderada é recomendada e alguns fatores de peso ($1/x$; $1/x^2$; $1/x^{1/2}$; $1/y$; $1/y^2$; $1/y^{1/2}$) são avaliados. Utiliza-se então esta relação para estimar os desvios-padrão referentes a cada ponto da curva. Os coeficientes de ponderação são utilizados para a construção da curva de calibração.

4.2.1.2.3 Precisão intraensaio e interensaio

Precisão pode ser definida como a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra⁷⁵. As precisões intra e interensaio foram determinadas indiretamente pelo cálculo de imprecisão através da determinação do coeficiente de variação do método (CV). O estudo foi conduzido analisando-se amostra de urina branca adicionada dos padrões contendo as seguintes concentrações de anfetamina, dietilpropiona e femproporex: 250, 500 e 750 ng/mL. As análises foram realizadas em sextuplicata para cada concentração e feitas em três dias diferentes e consecutivos.

4.2.1.2.4 Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência⁷⁵. Foi determinada utilizando-se três concentrações (250, 500 e 750ng/mL), em sextuplicata, em uma mesma corrida analítica e em corridas diferentes. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, sendo que o desvio não deve exceder 15%, exceto para o ponto baixo da curva, para o qual se admite desvios menores ou iguais a 20%.

4.2.1.2.5 Recuperação

A recuperação pode ser definida como a eficiência de extração de um método analítico, expressa como a porcentagem da quantidade conhecida de um analito, obtida da comparação dos resultados analíticos de amostras branco acrescidas de padrão e submetidas ao processo de extração, com os resultados analíticos de soluções padrão não extraídas⁷⁵.

Para o estudo de recuperação do método, dois grupos de amostras de urina, nas mesmas concentrações de 250, 500 e 750 ng/mL, foram analisados. No primeiro grupo, padrões de anfetamina, femproporex, dietilpropiona e clorprenalina (PI) foram adicionados às amostras, as quais foram submetidas à extração conforme procedimento 4.2.2.2 em seis replicatas para cada concentração. No segundo grupo, consistindo também de seis replicatas para

cada concentração, padrões de anfetamina, femproporex e dietilpropiona foram adicionados somente após a extração, sendo apenas o padrão interno adicionado antes. A recuperação absoluta foi avaliada pela área relativa média obtida no segundo grupo em relação à área relativa média obtida no primeiro.

4.2.1.3 Aplicação do método em amostras de urina de motoristas profissionais

Para a pesquisa das anfetaminas nas amostras cuja coleta foi descrita no item 4.1.4 procedeu-se a extração dos analitos conforme apresentado no item 4.2.1.1, adicionando-se apenas a clorprenalina (PI) nas amostras desconhecidas e na urina branca (ou seja, matriz proveniente de doador que certamente não fez uso de quaisquer substâncias pesquisadas) na concentração final de 800 ng/mL. Para cada conjunto de amostras extraídas, foi construída uma curva com três pontos, a saber: 150, 600 e 1000 ng/mL, para quantificação das amostras que viessem a ser positivas. As condições cromatográficas estão descritas no item 4.2.1.

As amostras que apresentaram resultado positivo na etapa de triagem foram confirmadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS), segundo metodologia descrita em literatura⁷⁶.

Resultados

5. RESULTADOS

Serão apresentados inicialmente as condições cromatográficas estabelecidas e os cromatogramas e espectr`os característicos dos analitos em estudo, empregando tais condições. A seguir, os resultados da validação do método desenvolvido e, por fim, os resultados obtidos com a aplicação do método em amostras de urina, cuja coleta está descrita no item 4.1.4, bem como o perfil dos doadores dessas amostras.

5.1 Condições cromatográficas para a determinação de anfetamina, dietilpropiona e femproporex por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Arranjo de Diodos (HPLC-DAD)

- Coluna Luna C18 (2) 250mm x 4,6mm ID, 5µm (Phenomenex, Torrance, CA) com uma pré-coluna C18 4,0mm x 3,0mm (Phenomenex, Torrance, CA);
- Comprimento de onda da leitura: 210 nm para anfetamina e femproporex e 252 nm para dietilpropiona;
- Temperatura do forno da coluna: 20°C;
- Tempo de corrida: 17 minutos;
- Volume de injeção: 20 µL;
- Fluxo: 1,0 mL/min;
- Modo de eluição isocrático: 87% (A) e 13% (B)
- Fase móvel: (A) ácido fosfórico 0,025% + tampão de trietilamina pH=3,4 (34:66 v/v) e (B) acetonitrila grau HPLC.

A solução tampão de trietilamina pH=3,4 foi preparada pela mistura de 10,0 mL de trietilamina PA, 9,0mL de ácido fosfórico PA e água Milli-Q q.s.p. 1000 mL.

5.2 Cromatogramas característicos e espectros de absorvância da anfetamina, dietilpropiona e femproporex

A Figura 5 ilustra o perfil cromatográfico obtido com a análise de uma amostra de urina, por HPLC-DAD, adicionada de anfetamina, dietilpropiona e femproporex e submetida ao método proposto.

Figura 5 – Cromatograma ilustrando a eluição dos analitos de interesse em três concentrações. PI = padrão interno (clorprenalina)

A Figura 6 apresenta o cromatograma com o novo comprimento de onda adotado para a detecção da dietilpropiona.

Figura 6 – Eluição da dietilpropiona empregando-se comprimento de onda de 252nm

A Figura 7 mostra os espectros de absorvância dos três analitos pesquisados e da clorprenalina, utilizada como PI.

Figura 7 – Espectros de absorbância das substâncias analisadas

5.3 Resultados da validação do método para determinação de anfetamina, dietilpropiona e femproporex em urina

5.3.1 Limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) dos analitos obtidos com o método proposto para determinação de anfetamina, dietilpropiona e femproporex em amostras de urina foram de 120 e 150ng/mL, respectivamente.

5.3.2 Linearidade

O método de regressão linear convencional poderia resultar em grandes erros especialmente em concentrações próximas ao limite de quantificação. Aplicando-se fatores de peso ($1/x$; $1/x^2$; $1/x^{1/2}$; $1/y$; $1/y^2$; $1/y^{1/2}$), verificou-se que a soma da porcentagem de erro relativo (% RE) em toda a faixa de concentração era menor quando aplicado o peso $1/y$ para anfetamina e dietilpropiona. Já o femproporex se mostrou homoscedástico. Os coeficientes de correlação para os três analitos foram acima de 0,99. As equações lineares e coeficientes de correlação obtidos foram: anfetamina: $y=0,001589x - 0,00018$; $r^2 = 0,999$, femproporex: $y=0,0011x + 0,0081$; $r^2 = 0,998$ e dietilpropiona: $y=0,001954x + 0,014042$; $r^2 = 0,999$, onde y e x representam a relação entre a razão de áreas dos picos (analito/padrão interno) e as concentrações de calibradores, respectivamente.

5.3.3 Precisão intraensaio e interensaio

Os resultados de precisão intraensaio e interensaio obtidos para a determinação de anfetamina, dietilpropiona e femproporex em amostras de urina são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores de precisão intra e interensaios obtidos com a aplicação do método proposto em amostras de urina

Precisão Intraensaio (%)				Precisão Interensaio (%)		
Analitos	CQ1	CQ2	CQ3	CQ1	CQ2	CQ3
ANFETAMINA	2,9	2,2	2,0	5,2	7,8	4,5
DIETILPROPIONA	3,6	10,5	5,0	4,3	11,2	5,5
FEMPROPOREX	6,2	5,0	3,4	6,9	10,5	4,9

CQ1 – 250ng/mL, CQ2 – 500ng/mL e CQ3 – 750ng/mL

5.3.4 Exatidão

Os resultados do estudo de exatidão, realizado em três dias consecutivos, estão demonstrados na Tabela 3.

Tabela 3 - Resultados do estudo de exatidão realizado em três dias consecutivos

		Anfetamina	Dietilpropiona	Femproporex
1º dia (%)	CQ1	104	92	111
	CQ2	90	89	89
	CQ3	98	98	96
2º dia (%)	CQ1	85	82	82
	CQ2	88	87	87
	CQ3	98	94	95
3º dia (%)	CQ1	87	86	93
	CQ2	94	91	110
	CQ3	97	101	99

CQ1 – 250ng/mL, CQ2 – 500ng/mL e CQ3 – 750ng/mL

5.3.5 Recuperação

Os valores de recuperação obtidos para a determinação de anfetamina, dietilpropiona e femproporex em amostras de urina são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Valores de recuperação obtidos com a aplicação do método proposto em amostras de urina

Recuperação (%)			
Analitos	CQ1	CQ2	CQ3
ANFETAMINA	57,7	57,3	82,6
DIETILPROPIONA	57,9	52,8	57,8
FEMPROPOREX	62,3	73,3	60,7

CQ1 – 250ng/mL, CQ2 – 500ng/mL e CQ3 – 750ng/mL

5.4 Resultado da aplicação do método em amostras de urina

Embora a pesquisa estivesse inserida dentro de um projeto que envolve o Departamento de Polícia Rodoviária Federal, o que poderia vir a intimidar o participante por se tratar de um projeto que engloba o uso de drogas e, a participação do motorista tivesse sido totalmente voluntária, a taxa de recusa foi de apenas 0,5% (n=2). Assim, do total de 392 motoristas abordados, 390 amostras foram coletadas. Destas, cinco não puderam ser submetidas ao método desenvolvido, pois a quantidade de urina fornecida foi suficiente apenas para o imunoensaio e a eventual confirmação dos casos positivos por GC-MS, através dos quais se pesquisaram anfetamina, cocaína e benzoilecgonina e THC-COOH, procedimento rotineiramente adotado no Laboratório de Toxicologia da FMUSP e, portanto, imprescindível. Com relação às anfetaminas, foi possível se fazer uma comparação entre os resultados

obtidos pelo imunoensaio utilizado pelo Laboratório de Toxicologia e aqueles obtidos com o uso da metodologia desenvolvida. As amostras, à medida que eram coletadas, foram armazenadas em freezer a -20°C até o momento da análise.

A Figura 8 relaciona o número de casos positivos para anfetamina, dietilpropiona e/ou femproporex com o relato dos motoristas profissionais quanto ao uso de “rebite” em “algum momento da vida” no período que antecedeu a entrevista.

Figura 8 – Concordância entre o relato dos entrevistados e o resultado toxicológico (n=385)

A Tabela 5 mostra, dentre os casos positivos, quando se deu o último consumo da anfetamina, no caso de uma resposta afirmativa para o uso “em algum momento da vida”.

Tabela 5 – Resposta quanto ao uso de “rebite” e o consumo mais recente, dentre os casos positivos para anfetamina (n=10)

	Amostra	Usa ou já usou “rebite”?	Última vez
1	2888	Sim, uso	Há 1 semana
2	3055	Sim, uso	Há 1 dia
3	3057	Não, nunca usei	NA*
4	3074	Já usei	Há 3 meses
5	3085	Não, nunca usei	NA*
6	3092	Sim, uso	Há 2 semanas
7	3127	Sim, uso	Há 1 semana
8	3143	Já usei	Há 4 meses
9	3180	Já usei	Há 1 ano
10	3187	Já usei	Há 2 meses

(*) NA = não se aplica

A Tabela 6 apresenta, também dentre os casos positivos, qual o medicamento normalmente consumido pelos entrevistados.

Tabela 6 – Resposta quanto ao uso de “rebite” e medicamento utilizado, dentre os casos positivos para anfetamina (n=10)

	Amostra	Usa ou já usou “rebite”?	Qual?
1	2888	Sim, uso	Não soube responder
2	3055	Sim, uso	Manipulado
3	3057	Não, nunca usei	NA*
4	3074	Já usei	Desobesi-M [®]
5	3085	Não, nunca usei	NA*
6	3092	Sim, uso	Desobesi-M [®]
7	3127	Sim, uso	Dualid [®] S
8	3143	Já usei	Manipulado
9	3180	Já usei	Lipomax [®] /Desobesi-M [®]
10	3187	Já usei	Desobesi-M [®]

(*) NA = não se aplica

As principais fontes de obtenção destas substâncias, segundo relato dos próprios motoristas, foram em postos de abastecimento de combustível localizados à beira das estradas e também com outros motoristas, que repassam aos colegas.

Em todos os casos positivos ($n=10$), detectou-se a presença de anfetamina. A Figura 9 se refere ao cromatograma da amostra 3127, a qual ilustra os demais casos positivos. Apenas a amostra 3057 foi também positiva para femproporex (Figura 10). Todas as amostras ($n=385$) foram negativas para dietilpropiona.

Figura 9 – (A) Cromatograma obtido com a análise por HPLC-DAD de uma amostra de urina adicionada com anfetamina (1), dietilpropiona (2), femproporex (3) e padrão interno clorprenalina (4) em uma concentração de 1000 ng/mL. (B) amostra branco adicionada com padrão interno. (C) urina referente ao caso 3127, positiva para anfetamina na concentração 3440 ng/mL

Figura 10 – (A) Cromatograma obtido com a análise por HPLC-DAD de uma amostra de urina adicionada com anfetamina (1), dietilpropiona (2), femproporex (3) e padrão interno clorprenalina (4) em uma concentração de 1000 ng/mL. (B) amostra branco adicionada com padrão interno. (C) urina referente ao caso 3057, positiva para anfetamina e femproporex nas concentrações 6184 ng/mL e 4262 ng/mL, respectivamente

Todas as amostras positivas na etapa de triagem por HPLC-DAD foram quantificadas. O resultado está apresentado na Tabela 7.

Tabela 7 – Concentração dos analitos encontrada na urina dos casos positivos (n=10)

	Amostra	Concentração (ng/mL)
1	2888	753
2	3055	809
3	3057	6184 (Anfetamina) 4262 (Femproporex)
4	3074	1146
5	3085	3657
6	3092	2147
7	3127	3440
8	3143	557
9	3180	2555
10	3187	462

Duas amostras (3143 e 3187) que foram consideradas negativas para anfetamina no teste de triagem por imunoensaio realizado rotineiramente pelo Laboratório de Toxicologia da FMUSP apresentaram resultado positivo para esta substância por HPLC-DAD.

Conforme mencionado anteriormente, foi realizada a confirmação dos casos positivos por GC-MS, segundo recomenda a literatura e seguindo método já publicado^{37,51}. Houve concordância para os dez casos. A Figura 11 ilustra um dos casos confirmados, com o cromatograma característico.

Figura 11 – (A) cromatograma obtido de amostra de urina adicionada com: anfetamina (1), anfetamina- d_5 (2), dietilpropiona (3) e femproporex (4), na concentração de 250 ng/mL. (B) amostra branco adicionada com padrão interno deuterado. (C) urina referente à amostra de número 3092. Os íons usados para a geração do cromatograma foram: 118+123+193+100. Picos sobrepostos são íons comuns em alguns analitos

5.5 Perfil sociodemográfico dos participantes da pesquisa

Todos os motoristas profissionais cujas amostras de urina vieram a fazer parte deste estudo ($n=385$) eram do sexo masculino, com idade média de 41,1 anos (21,0 – 76,0). A maioria (68,1%) declarou-se casada e também da cor (ou raça) branca (69,1%).

A Figura 12 mostra a distribuição dos participantes segundo o grau de escolaridade informado.

Figura 12 – Distribuição dos entrevistados de acordo com o grau de escolaridade (n=385)

(*) 1ª a 4ª série corresponde atualmente ao período do 2º ao 5º ano

(**) 5ª a 8ª série corresponde atualmente ao período do 6º ao 9º ano

A Figura 13 mostra a distribuição dos motoristas conforme o tipo de serviço prestado: se contratado por alguma empresa ou se trabalha de forma autônoma.

Figura 13 – Distribuição dos entrevistados de acordo com o regime de serviço (n=385)

A Figura 14 apresenta a distribuição dos entrevistados com relação ao tempo de serviço na condição de motorista profissional de caminhão.

Figura 14 – Distribuição dos entrevistados de acordo com o tempo de serviço (n=385)

Quando questionados sobre o consumo de outras drogas que não as anfetaminas, 86,8% dos motoristas profissionais (n=334) afirmaram nunca ter feito uso, enquanto 12,2% disseram que já fizeram uso pelo menos uma vez na vida (n=47). Três deles ainda relataram que fazem uso e um não forneceu resposta.

A Figura 15 mostra a resposta dos participantes quanto ao hábito tabagista. Dentre aqueles que se declararam fumantes, a média de cigarros consumidos por dia foi de 16 (1 – 60).

Figura 15 – Hábito tabagista dos motoristas profissionais (n=385)

Com relação a problemas de saúde, 28,8% dos motoristas (n=111) relataram sofrer de alguma comorbidade, dentre as quais citam-se pressão alta, diabetes, triglicérides e/ou colesterol elevados e estresse, sendo que 14 deles afirmaram ainda possuir mais de um sintoma.

Dados sobre a percepção de dor ao dirigir, bem como a prática de atividade física regular e o consumo de bebidas alcoólicas estão apresentados na Figura 16.

Figura 16 – Resposta dos motoristas quanto à percepção de dor ao dirigir, à prática de atividade física e ao consumo de álcool (n=385)

Dentre os que referiram dor, os principais locais citados foram: mãos, ombros, regiões cervical e lombar da coluna vertebral, braço, antebraço, joelhos, pernas e pés, havendo ainda relatos de duas ou mais partes do corpo. Quanto à prática de atividade física, conduta adotada por menos da metade dos entrevistados (44,9%), as mais citadas foram: corrida/caminhada ou futebol aos finais de semana. Com relação ao consumo de bebidas alcoólicas, a cerveja aos finais de semana, tendo como principal local de consumo a própria residência dos participantes, foram os mais relatados.

Díscussão

6. DISCUSSÃO

Os acidentes em rodovias, sem dúvida, constituem sério problema para as vítimas e familiares e também para os governantes, não apenas em virtude das inúmeras vidas que são ceifadas, como também por conta de todos os desdobramentos de ordem econômica e social que acarretam. Em se tratando de um grupo especial de condutores, os motoristas de caminhão, sabe-se que são profissionais cujo estilo de vida e condições de trabalho frequentemente os levam a doenças como obesidade, hipertensão, desordens musculoesqueléticas, distúrbios do sono, entre outras, além de estimular o consumo acentuado de bebidas cafeinadas, estimulantes e os potencialmente perigosos anfetamínicos⁷⁻¹³.

Esta última classe de substâncias refere-se ao grupo composto pela anfetamina e seus derivados, conhecidos entre os motoristas profissionais como “rebite” e tidos como potentes estimulantes do SNC. Os perigos relacionados ao uso dessas substâncias dizem respeito tanto ao comportamento de risco que o motorista adota e a autoconfiança aumentada, o que o leva a situações de risco, como também à fadiga e sonolência observadas após a cessação desses efeitos estimulatórios, o que deixa o condutor ainda mais suscetível a desdobramentos negativos no trânsito³¹.

É importante, portanto, que se tenha controle e conhecimento acerca do uso desses anfetamínicos por parte dos motoristas profissionais não somente pelas empresas que os contratam, mas também pelos responsáveis por

garantir a segurança no trânsito nas rodovias e que esses resultados se transformem em leis para a melhoria de todo o sistema.

Tendo em vista tal carência de dados com pesquisas que envolvam amostras biológicas e, principalmente, a não detecção da dietilpropiona, princípio ativo dos medicamentos Dualid[®] S, Inibex[®] S e Hipofagin[®] S pelos testes de triagem por imunoensaio, decidiu-se desenvolver e validar um método de triagem que empregasse a extração líquido-líquido e a análise por HPLC-DAD para a detecção de anfetamina, dietilpropiona e femproporex em amostras de urina e aplicá-lo em amostras coletadas de motoristas profissionais de caminhão.

A princípio foi realizado o levantamento de informações na literatura que reportassem a pesquisa de derivados anfetamínicos e que tivessem feito uso das mesmas técnicas e/ou técnicas semelhantes às aquelas que se pretendia utilizar. Diante disso, inúmeros testes foram feitos variando-se uma gama de parâmetros, a saber: composição e fluxo da fase móvel, pH da solução tampão, modo de eluição isocrático ou por gradiente, diferenças no gradiente entre os solventes, temperatura do forno, tempo de corrida e leituras em diferentes comprimentos de onda (λ) levando-se em conta a intensidade dos picos. Por fim, as condições descritas no item 4.2.1, que incluem o emprego de ácido fosfórico 0,025%, solução tampão de trietilamina pH=3,4 e acetonitrila grau HPLC como fases móveis e que foram adaptadas de dados reportados em literatura⁴⁶, permitiram a detecção da anfetamina, dietilpropiona e femproporex, como pretendido.

A escolha de se fazer a leitura da dietilpropiona em um comprimento de onda de 252 nm, ao contrário dos demais analitos que foram analisados a 210 nm, como mostram as Figuras 5 e 6, se deve ao fato de que houve ganho de sensibilidade considerável para a dietilpropiona, considerando o aumento da absorbância observado. Outra consideração a ser feita diz respeito ao padrão interno utilizado. Sabe-se que este é caracterizado por ser uma substância com características físico-químicas semelhantes às do(s) analito(s) de interesse, não estar presente na amostra, não coeluir com as demais substâncias, ser estável e não reativo quimicamente. O cloridrato de bupropiona, inicialmente testado como padrão interno, é um antidepressivo e começou a ser frequentemente prescrito a pacientes que desejam parar de fumar⁷⁷. Uma vez que existe a possibilidade de estar presente na urina, não poderia mais ser utilizado como PI nas análises. Sendo assim, optou-se pela clorprenalina, que apresenta estrutura química semelhante a dos analitos de interesse (Figura 17), além de não fazer parte da composição de quaisquer medicamentos comercializados no Brasil.

Figura 17 – Estrutura química da clorprenalina (PI)

As três substâncias pesquisadas são classificadas como bases fracas. Assim, em pH 3,4 todas elas se encontram na forma ionizada (protonada), mais hidrofílica e polar, sendo fortemente atraídas pelos grupamentos silanóis inativos da fase estacionária de uma coluna de fase reversa. O uso de trietilamina na composição da fase móvel minimiza este problema, uma vez que ela funciona como um competidor dinâmico pelos sítios silanóis da coluna, evitando assim um tempo de retenção muito prolongado e a formação de picos assimétricos^{46,78}.

A extração líquido-líquido, como já citado anteriormente, é um método clássico e já bastante discutido na literatura⁷⁹⁻⁸¹. Trata-se de um método que há algum tempo é utilizado na rotina do Laboratório de Toxicologia da FMUSP para os casos que requerem confirmação por GC-MS. Portanto, a adaptação para o HPLC envolveu a modificação de algumas etapas: antes de se proceder à evaporação do solvente orgânico com fluxo de N₂, adicionou-se 15 µL de HCl 0,1M com o intuito de reduzir o risco de perda por evaporação das anfetaminas. Além disso, na detecção por GC-MS emprega-se uma etapa conhecida como derivatização, na qual os chamados agentes derivatizantes (no caso das anfetaminas, utiliza-se o anidrido trifluoroacético – TFAA) são adicionados após a evaporação do solvente orgânico com o intuito de melhorar as condições cromatográficas e aumentar a sensibilidade da técnica através, por exemplo, do aumento da volatilidade do analito, da eliminação de grupos funcionais ativos que possam causar interações indesejadas com componentes cromatográficos, resultando na perda de picos ou no chamado “efeito cauda”, ou ainda através do uso de agentes quirais que permitam alcançar uma boa

resolução até mesmo para enantiômeros. Na detecção por HPLC, esta etapa do processo de extração é suprimida e após a evaporação do solvente orgânico, a amostra já se encontra pronta para ser ressuspensa com a fase móvel e injetada no equipamento.

Em 2010, a SAMHSA, órgão ligado ao Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos, publicou um manual para programas de teste de drogas em ambientes de trabalho, no qual estabelece valores de *cutoff* para as anfetaminas de 500 ng/mL e 250 ng/mL para os testes de triagem e confirmação, respectivamente⁵¹. Os imunoensaios comercializados no Brasil, empregados na etapa de triagem em estudos epidemiológicos, por exemplo, ainda se baseiam em valor de *cutoff* antigo, de 1000 ng/mL. Apesar do método aqui proposto ter sido desenvolvido com o intuito de ser um teste de triagem, conseguiu-se estabelecer limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) abaixo, inclusive, do *cutoff* para os testes confirmatórios, com grau de confiança requerido, de 120 ng/mL e 150 ng/mL, respectivamente.

Para o estudo da linearidade foi avaliada uma faixa de trabalho que variou de 150 ng/mL a 1000 ng/mL. O fenômeno da heteroscedasticidade (calculado através da distribuição F) estava presente para anfetamina e dietilpropiona. Assim, métodos de regressão linear ordinária poderiam resultar em grandes erros no cálculo das concentrações das anfetaminas, principalmente para os valores mais baixos. Por esta razão, foi atribuído o coeficiente de ponderação $1/y$, o qual apresentou a menor soma dos erros, para ambas as substâncias. Tanto a precisão intraensaio como a interensaio

produziram resultados adequados para métodos cromatográficos, obtendo-se valores de coeficientes de variação menores que 15%.

A exatidão, tida como o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência, variou dentro do intervalo aceitável, obtendo-se 15% de variação máxima tanto para o controle baixo (250 ng/mL), como também para os controles médio (500 ng/mL) e alto (750 ng/mL). No estudo de recuperação, foi avaliada a quantidade de analito que se consegue extrair através da comparação de amostras submetidas ao processo de extração com amostras cujos padrões (à exceção do padrão interno) só foram adicionados ao final do processo. A recuperação das anfetaminas, de modo geral, ficou acima de 50%, valor considerado aceitável.

A garantia de total sigilo acerca dos resultados certamente foi um fator de extrema relevância para que a taxa de recusa fosse de apenas 0,5%. Os dois entrevistados que se recusaram a participar alegaram falta de tempo. Os pesquisadores não identificaram, nestes casos, qualquer alteração comportamental em virtude do uso de substâncias psicoativas que pudesse justificar a recusa. As amostras coletadas foram armazenadas em freezer a -20°C. Estudos de estabilidade ao longo do tempo demonstraram que as anfetaminas, quando acondicionadas de forma semelhante à aplicada neste caso, são estáveis quimicamente⁸²⁻⁸⁵.

O método de triagem por HPLC-DAD desenvolvido foi aplicado em 385 amostras de urina de motoristas profissionais de caminhão que trafegaram em três rodovias do estado de São Paulo no ano de 2013. Do total de amostras analisadas, 2,6% (n=10) foram positivas para pelo menos um dos analitos

pesquisados. Destas, nove foram positivas apenas para anfetamina, uma para anfetamina e femproporex e nenhuma para dietilpropiona. Acredita-se que os casos positivos para anfetamina sejam provenientes do consumo do femproporex, o qual apresenta esta substância como principal metabólito. Já o caso em que também se detectou femproporex pode ser atribuído a um consumo recente da droga, o que justificaria o achado da droga inalterada na urina^{86,87}. Não se pode afirmar qual teria sido o padrão de consumo neste caso, uma vez que o doador da amostra negou que já tivesse feito uso de “rebite” em qualquer momento da vida. A não detecção de casos positivos para dietilpropiona possivelmente reflete o próprio padrão de consumo de medicamentos com outros princípios ativos que não a dietilpropiona, sendo que novos estudos, com amostragem ainda maior, são sugeridos. Assim, a exemplo, conforme apresentado na Tabela 6, apenas um motorista profissional cuja análise da amostra de urina foi positiva para anfetamina relatou o consumo do medicamento Dualid[®] S.

O resultado encontrado foi, em linhas gerais, inferior ao reportado por outros autores que também analisaram amostras de urina de caminhoneiros no Brasil^{13,33,34}. Tal diferença pode ser atribuída às diferentes regiões e rodovias em que as amostras foram coletadas, o que implica em percursos que podem variar de alguns minutos a até dias de viagem. Além disso, foi citado anteriormente que a coleta de todas as amostras se deu no ano de 2013, ou seja, mais de um ano após a publicação da Resolução da Anvisa que proíbe a fabricação e comercialização dos inibidores de apetite do tipo anfetamínicos (dietilpropiona, femproporex e mazindol)¹⁷. Tal decréscimo poderia ser então

reflexo desta proibição, embora haja constatação acerca da continuidade do uso⁸⁸. Uma vez que se obteve o relato de que ainda é possível encontrar à venda medicamentos cujos princípios ativos sejam as substâncias estudadas, apesar de sua produção ter sido proibida, seria de extrema importância que fosse realizada análise acerca da composição desses, para que sejam verificados possíveis casos de adulteração do produto. Atualmente, tramita na Câmara dos Deputados um Projeto de Lei da Câmara (nº2431/2011) que pretende vetar a Resolução. De acordo com o seu relator, em vez da proibição deveriam ser adotados critérios mais rigorosos com relação à venda daqueles medicamentos, como já ocorre com os antibióticos, por exemplo⁸⁹.

Com relação ao relato dos entrevistados acerca do uso dos “rebites”, apenas um motorista de caminhão cuja amostra de urina foi positiva para anfetamina declarou realmente ter feito esse uso dentro do período de tempo em que a substância pode ser detectada na urina (até cinco dias após o consumo)⁴⁵. Além disso, 20% dentre os casos positivos negaram o consumo em qualquer momento da vida. A negativa pode ser advinda do receio de repreensão, porém há de se notar que 16,3% dos participantes não se sentiram intimidados em dizer que já fizeram uso ou ainda o faz, embora o resultado toxicológico tenha sido negativo (Figura 8). Seja como for, os achados são de fato divergentes entre os diferentes meios utilizados para o levantamento de informação, seja por relato ou análise toxicológica de urina, embora ambas as ferramentas sejam de grande importância e confiáveis em seus resultados³⁴.

A anfetamina e seus derivados são rapidamente absorvidos após administração por via oral. Em condições normais de pH, cerca de 30% da

dose é excretada inalterada na urina em 24 horas e dentro de três a quatro dias, 90% da dose consumida é eliminada⁴⁵. De posse desta informação, é curioso notar que, conforme apresentado na Tabela 5, dos dez casos positivos, apenas um afirmou ter feito uso de “rebite” pela última vez em período de tempo, em teoria, realmente passível de detecção na urina.

O anorexígeno Desobesi-M[®], cujo princípio ativo é o femproporex, foi o medicamento mais citado entre os casos cuja análise toxicológica foi positiva (Tabela 6). Não se obteve relato do uso de medicamentos cujo princípio ativo fosse o metilfenidato. Tais medicamentos são comercializados no Brasil com os nomes comerciais de Ritalina[®] e Concerta[®] e são prescritos a pacientes portadores do Transtorno do Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH). O seu uso indiscriminado já foi descrito entre estudantes universitários, porém não foi verificado o abuso por parte de motoristas profissionais com a finalidade de manter a vigília⁹⁰.

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica de maior sensibilidade quando comparada ao imunoensaio, por exemplo, o que permite a detecção de concentrações mais baixas. Dessa forma, duas amostras (3143 e 3187) que haviam sido apontadas como negativas para anfetaminas através do imunoensaio realizado pelo Laboratório de Toxicologia da FMUSP foram consideradas positivas quando analisadas por HPLC-DAD. Neste caso, as concentrações de anfetamina foram de 462 e 557ng/mL, o que corresponde a valores que são quase a metade do *cutoff* estabelecido para o imunoensaio, que é de 1000ng/mL, de acordo com o fabricante. Os resultados fornecidos pelo Laboratório de Toxicologia permitiram ainda identificar que não houve uso

concomitante entre anfetamina e cocaína ou anfetamina e cannabis. Todas as amostras cujo teste de triagem foi positivo foram de fato confirmadas como tal por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas, como sugere a literatura⁵¹.

No que diz respeito ao perfil sociodemográfico desses profissionais, notou-se que se tratava de um universo exclusivamente masculino, com idade média de 41,1 anos, composto em sua maioria por indivíduos casados ou em união estável e que se autodeclararam da cor/raça branca. Tais características condizem com aquilo que já fora apresentado por outros trabalhos que lidaram com esta mesma classe de profissionais^{7,10,11}.

A Figura 12 traz o grau de escolaridade dos participantes. Nota-se que mais da metade dos entrevistados (60,5%) não concluíram o 2º grau. Com relação ao tipo de serviço prestado, a maioria (69,6%) se encontrava contratado por alguma empresa na ocasião da coleta dos dados. Tal quadro pode ser fruto de uma busca desses profissionais por uma estabilidade maior que esse tipo de serviço oferece, quando comparado àqueles que optam por trabalhar de forma autônoma e, assim, passam a depender da oferta ou não de cargas, podendo chegar a passar dias parados em postos ou outros locais que gerenciam essa demanda até que surja algum carregamento.

Interessante ressaltar que, dos 334 entrevistados que afirmaram nunca ter feito uso de outras drogas, cinco apresentaram resultado toxicológico positivo para o uso de cocaína e um para maconha. A etapa de triagem desses testes foi feita por imunoensaio e a confirmação dos casos positivos, por GC-MS.

Tanto o tabagismo como a ingestão de bebida alcoólica já foram citados como estratégias adotadas para o enfrentamento das situações de estresse em estudo com motoristas de caminhão⁷. Um participante afirmou consumir cerca de 60 cigarros em um único dia. Em um primeiro momento, tais condutas podem de fato aliviar a tensão, porém com o passar do tempo, podem trazer consequências deletérias para a saúde desses profissionais.

Estudos envolvendo motoristas profissionais frequentemente apontam a ocorrência de determinadas patologias em parcela expressiva dos participantes^{7,8,10,13}. Diabetes, estresse, hipertensão, triglicérides e/ou colesterol elevados foram observados na população estudada e, nesta ocasião, todos os motoristas receberam orientação médica.

As condições ergonômicas dos veículos levam os motoristas profissionais a serem 3,9 vezes mais suscetíveis a desordens músculo-esqueléticas quando comparados a outros servidores públicos⁹¹. Quase 30% dos participantes referiram sentir algum incômodo ao dirigir. Apesar de terem consciência quanto a importância de se realizar atividades físicas regularmente, muitos alegaram que a falta de tempo os impede de fazê-las.

Em 30 de abril de 2012, foi publicada a Lei 12.619, que ficou conhecida como “Lei do Descanso” e tem como objetivo principal a implementação de novas regras sobre a jornada de trabalho de motoristas profissionais. A norma determina, por exemplo, que os motoristas têm direito a repouso de 11 horas por dia, além do descanso de 30 minutos a cada quatro horas ininterruptas de direção⁹². Atualmente, tramita na Câmara dos Deputados um Projeto de Lei da Câmara (nº41/2014) que pretende revogar alguns pontos da Lei 12.619/2012,

os quais não serão aqui pormenorizados⁹³. Estudos futuros envolvendo essa classe profissional serão de grande valia para se estabelecer o real impacto dessa regulamentação sobre, por exemplo, o número de acidentes provocados pelo cansaço dos motoristas com sobrecarga de trabalho.

Conclusões

7. CONCLUSÕES

A detecção de anfetamina, femproporex e dietilpropiona em amostra de urina se mostrou viável com o emprego da extração líquido-líquido e HPLC-DAD.

As condições cromatográficas estabelecidas foram adequadas e possibilitaram uma boa resolução dos picos de interesse, sem a presença de interferentes. O método atendeu ao que é preconizado por entidade internacional no que diz respeito aos parâmetros de validação de metodologias analíticas.

Os resultados das análises de amostras de urina coletadas de motoristas profissionais demonstraram que de fato há o uso de anfetaminas por membros da categoria, embora não se tenha detectado o uso de medicamentos cujo princípio ativo seja a dietilpropiona.

Referências bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. *Global status report on road safety 2013: supporting a decade of action*. Luxemburgo: WHO; 2013.
2. Acidentes de trânsito e ações de enfrentamento ao crime [Anuário Estatístico das Rodovias Federais – Internet]. Brasília(DF): Ministério dos Transportes e Ministério da Justiça; 2010. [citado jun 2012]. Disponível em: <http://www.dnit.gov.br/rodovias/operacoes-rodoviaras/estatisticas-deacidentes/anuario-2010.pdf>
3. Boletim Estatístico CNT 2009. Brasília (DF): Confederação Nacional do Transporte; 2009. [citado 2010 jan]. Disponível em: <http://www.cnt.org.br/Imagens%20CNT/PDFs%20CNT/Boletim%20Estat%C3%ADstico/BoletimEstatistico.2009.pdf>
4. Confederação Nacional do Transporte (CNT). *Plano CNT de Transporte e Logística 2011*. Brasília: CNT; 2011.
5. Tedesco GMI, Villela TMA, Granemann SR, Fortes JAAS. Mercado de transporte rodoviário de cargas no Brasil. *Revista ANTT*. 2011;3(2). Disponível em: http://appweb2.antt.gov.br/revistaantt/ed5/_asp/ArtigosCientificos-MercadoDeTransporte.asp#
6. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios -PNAD 2009. Brasil. Síntese de Indicadores. Brasília; 2010.
7. Cavagioni LC, Pierin AMG, Batista KM, Bianchi ERF, Costa ALS. Agravos à saúde, hipertensão arterial e predisposição ao estresse em motoristas de caminhão. *Rev Esc Enferm USP*. 2009;43(Esp 2):1267-71.
8. Neri M, Soares WL, Soares C. Condições de saúde no setor de transporte rodoviário de cargas e de passageiros: um estudo baseado na Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios. *Cad Saúde Pública*. 2005;21(4):1107-23.
9. Cavagioni LC, Pierin AMG. Hipertensão arterial e obesidade em motoristas profissionais de transporte de cargas. *Acta Paul Enferm*. 2010;23(4):455-60.
10. Penteado RZ, Gonçalves CGO, Costa DD, Marques JM. Trabalho e Saúde em Motoristas de Caminhão no Interior de São Paulo. *Saúde Soc São Paulo*. 2008;17(4):35-45.
11. Knauth DR, Leal AF, Pilecco FB, Seffner F, Teixeira AMFB. Manter-se acordado: a vulnerabilidade dos caminhoneiros no Rio Grande do Sul. *Rev Saúde Pública*. 2012;46(5):886-93.

12. Nascimento EC, Nascimento E, Silva JP. Uso de álcool e anfetaminas entre caminhoneiros de estrada. *Rev Saúde Pública*. 2007;41(2):290-3.
13. Leyton V, Sinagawa DM, Oliveira KCBG, Schmitz W, Andreuccetti G, De Martinis B, Yonamine M, Muñoz DR. Amphetamine, cocaine and cannabinoids use among truck drivers on the roads in the State of Sao Paulo, Brazil. *Forensic Sci Int*. 2012;215:25-7.
14. Oga S, Camargo MMA, Batistuzzo JAO. Fundamentos de toxicologia. 3ª ed. São Paulo: Atheneu; 2008.
15. United Nations Office on Drugs and Crime. *World Drug Report 2014*. Vienna:UNODC;2014.
16. Laranjeira R (Supervisão). II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (LENAD) – 2012. São Paulo: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas de Álcool e Outras Drogas (INPAD), UNIFESP. 2014.
17. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação – RDC nº 52, 6 de outubro de 2011. [citado ago 2012]. Disponível em: http://www.asfarma.com.br/index.php?option=com_content&view=article&id=617%3Ardc-522011&Itemid=50
18. Longo MC, Hunter CE, Lokan RJ, White JM, White MA. The prevalence of alcohol, cannabinoids, benzodiazepines and stimulants amongst injured drivers and their role in driver culpability. Part II: The relationship between drug prevalence and drug concentration, and driver culpability. *Accid Anal Prev*. 2000;32:623-32.
19. Drummer OH, Gerostamoulos J, Batziris H, Chu M, Caplehorn JRM, Robertson MD, Swann P. The incidence of drugs in drivers killed in Australian road traffic crashes. *Forensic Sci Int*. 2003;134:154-62.
20. Drummer OH, Gerostamoulos J, Batziris H, Chu M, Caplehorn J, Robertson MD, Swann P. The involvement of drugs in drivers of motor vehicles killed in Australian road traffic crashes. *Accid Anal Prev*. 2004;36:239-48.
21. Penning R, Veldstra JL, Daamen AP, Olivier B, Verster JC. Drugs of abuse, driving and traffic safety. *Current Drug Abuse Reviews*. 2010;3:23-32.
22. Gates J, Dubois S, Mullen N, Weaver B, Bédard M. The influence of stimulants on truck driver crash responsibility in fatal crashes. *Forensic Sci Int*. 2013;228:15-20.
23. Koelega HS. Stimulant drugs and vigilance performance: a review. *Psychopharmacology*. 1993;111:1–16.

24. Silber BY, Croft RJ, Papafotiou K, Stough C. The acute effects of D-amphetamine and methamphetamine on attention and psychomotor performance. *Psychopharmacology*. 2006;187:154-69.
25. Killgore WD, Rupp TL, Grugle NL, Reichardt RM, Lipizzi EL, Balkin TJ. Effects of dextroamphetamine, caffeine and modafinil on psychomotor vigilance test performance after 44 h of continuous wakefulness. *J. Sleep Res*. 2008;17:309-21.
26. Ramsey CS, Werchan PM, Isdahl WM, Fischer J, Gibbons JA. Acceleration tolerance at night with acute fatigue and stimulants. *Aviat. Space Environ. Med*. 2008;79:769-73.
27. Wesensten NJ, Killgore WD, Balkin TJ. Performance and alertness effects of caffeine, dextroamphetamine, and modafinil during sleep deprivation. *J. Sleep Res*. 2005;14:255-66.
28. Logan BK. Methamphetamine and driving impairment. *J. Forensic Sci*. 1996;41:457-64.
29. Logan BK, Fligner CL, Haddix T. Cause and manner of death in fatalities involving methamphetamine. *J. Forensic Sci*. 1998;43:28–34.
30. Silber BY, Papafotiou K, Croft RJ, Ogden E, Swann P, Stough C. The effects of dexamphetamine on simulated driving performance. *Psychopharmacology*. 2005;179:536-43.
31. Ponce JC, Leyton V. Drogas ilícitas e trânsito: problema pouco discutido no Brasil. *Rev Psiquiatr Clín*. 2008;35:65-9.
32. Rozestraten RJA. *Psicologia do trânsito: conceitos e processos básicos*. São Paulo: Ed. EPU-EDUSP, 1988.
33. Silva OA, Greve JMD, Yonamine M, Leyton V. Drug use by truck drivers in Brazil. *Drugs Educ Prev Policy*. 2003;10(2):135-9.
34. Takitane J, Oliveira LG, Endo LG, Oliveira KCBG, Muñoz DR, Yonamine M, Leyton V. Uso de anfetaminas por motoristas de caminhão em rodovias do estado de São Paulo: um risco à ocorrência de acidentes de trânsito? *Cienc Saude Colet*. 2013;18(5):1247-54.
35. BRASIL. Lei nº 9.503, de 23 de setembro de 1997. Institui o Código de Trânsito Brasileiro. Diário Oficial da União. 24 set 1997.
36. Gustafson RA, Moolchan ET, Barnes A, Levine B, Huestis MA. Validated method for the simultaneous determination of D9tetrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxy-

- THC- and 11-nor-9-carboxy-THC in human plasma using solid phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry with positive chemical ionization. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2003;793(1):145-154.
37. Scheidweiler KB, Huestis MA. A validated gas chromatographic–electron impact ionization mass spectrometric method for methylenedioxymethamphetamine (MDMA), methamphetamine and metabolites in oral fluid. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2006;835 (1–2):90–9.
38. Yonamine M, Silva OA. Confirmation of cocaine exposure by gas chromatography–mass spectrometry of urine extracts after methylation of benzoylecgonine. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2002;773(1):83–7.
39. Souza DZ, Boehl PO, Comiran E, Prusch DS, Zancanaro I, Fuentefria AM, *et al.* Which Amphetamine-Type Stimulants Can Be Detected by Oral Fluid Immunoassays *Therapeutic Drug Monitoring.* 2012;34(1):98-109.
40. Julien RM. *A primer of drug action: a concise, nontechnical guide to the actions, uses and side effects of psychoactive drugs.* 8a ed. New York: W.H. Freeman. 1997:54.
41. Hernandez IL, Fernandez PL. *Anfetaminas.* In: Lorenzo P, Ladero JM, Leza JC, Lizasoain I. *Drogodependencias.* Madri: Panamericana.1998:149-56.
42. Drummer OH, Odell M. *The forensic pharmacology of drugs of abuse.* London: Arnold, 2001. 462p.
43. Yonamine M. *A saliva como espécime biológico para monitorar o uso de álcool, anfetamina, metanfetamina, cocaína e maconha por motoristas profissionais* [tese]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 2004.
44. Siegel JA, Saukko PJ, Houck MM. *Encyclopedia of Forensic Sciences.* Academic Press, 2013. 2250p.
45. Moffat AC, Osselton MD, Widdop B. *Clarke's analysis of drugs and poisons.* 4ª edição. London: Pharmaceutical Press, 2011. 2609 p.
46. Franck MC. *Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para caracterização e quantificação de derivados anfetamínicos* [tese].Porto Alegre: Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2008.
47. Pastura G, Mattos P. Efeitos colaterais do metilfenidato. *Rev Psiq Clín.* 2004;31(2):100-4.
48. Australian Drug Foundation. *How Drugs Affect You: Amphetamines.* 2013. [citado Ago 2013]. Disponível em: <http://www.druginfo.adf.org.au/drug-facts/amphetamines>

49. Gjerde H, Oiestad EL, Christophersen AS. Using biological samples in epidemiological research on drugs of abuse. *Norsk Epidemiologi*. 2011;21(1):5-14.
50. Chaturvedi AK, Liu RH. Substance misuse – Urine analysis. In: Payne-James J, ed. *Encyclopedia of Forensic and Legal Medicine*, Oxford:Elsevier, 2005:171-83.
51. Substance Abuse and Mental Health Services Administration (SAMHSA). *Medical Review Officer Manual for Federal Agency Workplace Drug Testing Programs*. Department of Health and Human Services, Federal Register;2010.
52. Fukushima AR, Barreto ER, Fernandes ML, Ferrari J, França W, Marçal H, *et al*. Aplicação de imunoensaios para análise de fármacos e drogas de abuso em sangue total, com finalidade forense. *Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade*. 2009;2(1):49-61.
53. Varesio E, Veuthey JL. Chiral separation of amphetamines by high-performance capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*. 1995;717:219-28.
54. Thormann W, Aebi Y, Lanz M, CASLAVSKA J. Capillary electrophoresis in clinical toxicology. *Forensic Sci Int*. 1998;92:157-83.
55. Jurado C, Giménez MP, Soriano T, Menéndez M, Repetto M. Rapid analysis of amphetamine, methamphetamine, MDA, and MDMA in urine using solid-phase microextraction, direct on-fiber derivatization, and analysis by CG-MS. *J Anal Toxicol*. 2000;24:11-6.
56. Geiser L, Cherkaoui S, Veuthey JL. Simultaneous analysis of some amphetamine derivatives in urine by non aqueous capillary electrophoresis coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2000;895(1-2):111-21.
57. Pellegrini M, Rosati F, Pacifici R, Zuccaro R, Romolo FS, Lopez A. Rapid screening method for determination of Ecstasy and amphetamines in urine samples using gas chromatography-chemical ionisation mass spectrometry. *J. Chromatogr., B: Anal Technol. Biomed Life Sci*. 2002;769(2):243-51.
58. Costa JL, Chasin AAM. Determination of MDMA, MDEA and MDA in urine by highperformance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B*. 2004;811:41-5.
59. Jenkins KM, Young MS, Mallet CR, Elian AA. Mixed-Mode Solid-Phase Extraction Procedures for the Determination of MDMA and Metabolites in Urine Using LC-MS, LC-UV, or GC-NPD. *J Anal Toxicol*. 2004;28:50-8.
60. Schönberg L, Grobosch T, Lampe D, Kloft A. New screening method for basic compounds in urine by on-line extraction–high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *J Chromatogr A*. 2006;1134:177-85.

61. Pirnay SO, Abraham TT, Huestis MA. Sensitive Gas Chromatography-Mass Spectrometry Method for Simultaneous Measurement of MDEA, MDMA, and Metabolites HMA, MDA, and HMMA in Human Urine. *Clin Chem*. 2006;52(9):1728-34.
62. Concheiro M, de Castro A, Quintela O, Cruz A, López-Rivadulla M. Determination of Illicit Drugs and their Metabolites in Human Urine by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Including Relative Ion Intensity Criterion. *J Anal Toxicol*. 2007;31:573-80.
63. Miranda-G E, Sordo M, Salazar AM, Contreras C, Bautista L, Garcia AER, Ostrosky-Wegman P. Determination of Amphetamine, Methamphetamine, and Hydroxyamphetamine Derivatives in Urine by Gas Chromatography-Mass Spectrometry and Its Relation to CYP2D6 Phenotype of Drug Users. *J Anal Toxicol*. 2007;31:31-6.
64. Namera A, Nakamoto A, Nishida M, Saito T, Kishiyama I, Miyazaki S, et al. Extraction of amphetamines and methylenedioxyamphetamines from urine using a monolithic silica disk-packed spin column and high-performance liquid chromatography–diode array detection. *J Chromatogr A*. 2008;1208:71-5.
65. Ellison ST, Brewer WE, Morgan SL. Comprehensive Analysis of Drugs of Abuse in Urine Using Disposable Pipette Extraction. *J Anal Toxicol*. 2009;33:356-65.
66. Fernández MMR, Wille SMR, Samyn N, Wood M, Rivadulla ML, Boeck GD. High-throughput analysis of amphetamines in blood and urine with online solid-phase extraction-liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol*. 2009;33:578-87.
67. Jemionek JF, Addison J, Past MR. Low Concentrations of Methamphetamine Detectable in Urine in the Presence of High Concentrations of Amphetamine. *J Anal Toxicol*. 2009;33:170-3.
68. Fernández MMR, Wille SMR, di Fazio V, Gosselin M, Samyn N. Analysis of amphetamines and metabolites in urine with ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B*. 2010;878:1616-22.
69. Lee HH, Lee JF, Lin SY, Chen PH, Chen BH. Simultaneous Determination of HFBA-Derivatized Amphetamines and Ketamines in Urine by Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *J Anal Toxicol*. 2011;35:162-9.
70. Seidi S, Yamini Y, Baheri T, Feizbakhsh R. Electrokinetic extraction on artificial liquid membranes of amphetamine-type stimulants from urine samples followed by high performance liquid chromatography analysis. *J Chromatogr A*. 2011;1218:3958-65.
71. Li X, Shen B, Jiang Z, Huang Y, Zhuo X. Rapid screening of drugs of abuse in human urine by high-performance liquid chromatography coupled with high resolution

and high mass accuracy hybrid linear ion trap-Orbitrap mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2013;1302:95– 104.

72. Lin HR, Choi KI, Lin TC, Hu A. Simultaneous quantification of amphetamine, opiates, ketamine and relative metabolites in urine for confirmatory analysis by liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J Chromatogr B*. 2013;929:133-41.

73. Serviço Social do Transporte e Serviço Nacional de Aprendizagem do Transporte [homepage na internet]. Comandos de Saúde nas Rodovias [acesso em out 2013]. Disponível em: <http://www.sestsenat.org.br/Paginas/Comandos-de-Saude.aspx>

74. United Nations Office on Drugs and Crime. *Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens: A commitment to quality and continuous improvement*. Vienna:UNODC;2009.

75. BRASIL. Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Institui o “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. Diário Oficial da União. 2 jun 2003.

76. Pfleger K, Maurer HH, Weber A. Mass spectral and GC data of drogas, poisons, pesticides, pollutants, and their metabolites. 2a ed. Weinheim, New York: VCH. 1992. part. 1;7-13.

77. Casey ER, Scott MG, Tang S, Mullins ME. Frequency of False Positive Amphetamine Screens due to Bupropion Using the Syva Emit II Immunoassay. *J Med Toxicol*. 2011;7:105-8.

78. Lindsay S. High Performance Liquid Chromatography: analytical chemistry by open learning. London: ACOL Thames Polytechnic, 1992. 337p.

79. Hampel G. *Determinação de anfetaminas em sangue e urina* [monografia]. Novo Hamburgo: Instituto de Ciências da Saúde, Centro Universitário Feevale; 2009.

80. Sebben VC. *Análise de efedrinas e anfetamina em urina empregando SPE e SPME por CG/EM/EM* [tese]. Porto Alegre: Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2007.

81. Bulcão R, Garcia SC, Limberger RP, Baierle M, Arbo MD, Chasin AAM, et al. *Designer drugs: aspectos analíticos e biológicos*. *Quim Nova* [online]. 2012;35(1) [citado mai 2012]. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422012000100027>.

82. Dugan S, Bogema S. Stability of Drugs of Abuse in Urine Samples Stored at -20°C. *J Anal Toxicol*. 1994;18(7):391-6.

83. Jiménez C, de la Torre R, Ventura M, Segura J, Ventura R. Stability studies of amphetamine and ephedrine derivatives in urine. *J Chromatogr B*. 2006;843:84-93.

84. Sebben VC, Sebben I, Cattaneo R, Hoffmeister C, Limberger RP. Estabilidade dos metabólitos da cocaína, maconha e anfetaminas em urina por EMIT. *Química Hoje*. 2007;7:9-11.
85. Gonzales E, Ng G, Pesce A, West C, West R, Mikel C, *et al*. Stability of pain-related medications, metabolites, and illicit substances in urine. *Clin Chim Acta*. 2013;416:80-5.
86. Cody JT, Valtier S. Detection of Amphetamine Following Administration of Fenproporex. *J Anal Toxicol*. 1996;20:425-31.
87. Cody JT, Valtier S, Stillman S. Amphetamine and Fenproporex Levels Following Multidose Administration of Fenproporex. *J Anal Toxicol*. 1999;23:187-94.
88. Oliveira LG, Endo LG, Sinagawa DM, Yonamine M, Muñoz DR, Leyton V. A continuidade do uso de anfetaminas por motoristas de caminhão no Estado de São Paulo, Brasil, a despeito da proibição de sua produção, prescrição e uso. *Cad Saúde Pública*. 2013;29(9):1903-9.
89. BRASIL. Projeto de Lei nº 2431/2011, de 29 de novembro de 2011. Proíbe a Agência Nacional de Vigilância Sanitária de vetar a produção e comercialização dos anorexígenos: sibutramina, anfepramona, femproporex e mazindol. Disponível em: <http://www.camara.gov.br/proposicoesWeb/fichadetramitacao?idProposicao=522126>
90. Finger G, Silva ER, Falavigna A. Uso de metilfenidato entre estudantes de medicina: revisão sistemática. *Rev. Assoc. Med. Bras*. 2013;59(3):285-9.
91. Kompier MAJ, Marcelissen FHG. Handboek werkstress: systematische aanpak voor de bedrijfspraktijk. Amsterdam:NIA; 1990.
92. BRASIL. Lei nº. 12.619, de 30 de abril de 2012. Dispõe sobre o exercício da profissão de motorista; altera a Consolidação das Leis do Trabalho - CLT, aprovada pelo Decreto-Lei nº 5.452, de 1º de maio de 1943, e as Leis nºs 9.503, de 23 de setembro de 1997, 10.233, de 5 de junho de 2001, 11.079, de 30 de dezembro de 2004, e 12.023, de 27 de agosto de 2009, para regular e disciplinar a jornada de trabalho e o tempo de direção do motorista profissional; e dá outras providências. Diário Oficial da União 2 mai 2012; 5.
93. BRASIL. Projeto de Lei nº 41/2014, de 08 de maio de 2014. Dispõe sobre o exercício da profissão de motorista; altera a Consolidação das Leis do Trabalho - CLT, aprovada pelo Decreto-Lei nº 5.452, de 1º de maio de 1943, e as Leis nºs 9.503, de 23 de setembro de 1997 - Código de Trânsito Brasileiro, e 11.442, de 5 de janeiro de 2007 (empresas e transportadores autônomos de carga), para disciplinar a jornada de trabalho e o tempo de direção do motorista profissional; altera a Lei nº 7.408, de 25 de novembro de 1985; revoga dispositivos da Lei nº 12.619, de 30 de abril de 2012; e dá outras providências. Disponível em: http://www.senado.gov.br/atividade/materia/detalhes.asp?p_cod_mate=117498

ANEXOS

Anexo A (frente)

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Departamento de Medicina Legal, Ética Médica e Medicina Social e do Trabalho

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA

Nome:.....
Documento de Identidade: Sexo: () M () F
Data de nascimento: ____/____/____
Endereço:Nº: Apt:.....
Bairro: Cidade:
CEP: Telefone: (.....)

II – DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:

Uso de substâncias psicoativas por motoristas profissionais

PESQUISADORA: Profa. Dra. Vilma Leyton

CARGO/FUNÇÃO: Professora Doutora

INSCRIÇÃO NO CONSELHO REGIONAL Nº 6.108

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Medicina Legal, Ética Médica e Medicina Social e do Trabalho

2.AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA

Sem Risco () Risco Mínimo (x) Risco Médio ()
Risco Baixo () Risco Alto ()

3. DURAÇÃO DA PESQUISA: 12 meses

III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO SUJEITO DA PESQUISA SOBRE A PESQUISA

1. Justificativa e os objetivos da pesquisa; 2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos; 3. desconfortos e riscos esperados; 4. benefícios que poderão ser obtidos.

1. Esta pesquisa está sendo feita para avaliar o quanto os motoristas profissionais têm utilizado substância psicoativas, principalmente os “rebites”, e

Anexo A (verso)

explicar os riscos que essas substâncias podem acometer ao motorista e à sociedade como um todo.

2. O senhor (a) deverá responder a um questionário.
 3. Será coletada uma amostra de urina.
 4. O senhor (a) não será identificado (a).
 5. Estamos coletando apenas informações sobre sua profissão e saúde (dados obtidos do questionário)
 6. Mesmo que seu exame toxicológico seja positivo, o senhor (a) não será identificado (a) de forma nenhuma.
 7. Não há desconfortos para a coleta de urina e os riscos dessa pesquisa são mínimos.
 8. Os benefícios deste tipo de pesquisa é ajudar a implantar políticas para um trânsito mais seguro.
-

IV. ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

1. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre os procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas. O principal pesquisador é a Profa Dra. Vilma Leyton, que pode ser encontrado no endereço: Av. Dr. Arnaldo, 455 – Cerqueira César, São Paulo – SP, tel: (11) 3061-8414. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 255 – 5º andar – tel: (11) 3069-6442, ramais 16,17,18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.

2. Liberdade de retirar o seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo.

3. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.

V. CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

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

_____, ____ de _____ de _____

Assinatura do sujeito da pesquisa

Assinatura do pesquisador

Anexo B

PLANILHA DE COLETA DE DADOS

IDENTIFICAÇÃO	
Número de Controle Laboratorial: _____ Entrevistador: _____	
Participante: () Aceitou participar () Recusou participar, motivo: _____	
Idade: _____ Sexo: Feminino () Masculino ()	
Naturalidade (Cidade/UF): _____ / _____	
Estado civil: Solteiro () Casado () Viúvo () Divorciado () Amasiado ()	
Etnia: Branca () Negro () Amarelo () Pardo ()	
Escolaridade: Nunca estudou () 2º grau () Outro: _____ 1º a 4º série () 2º Grau Incompleto () 5º a 8º série () Superior () Curso técnico () Superior Incompleto ()	
Tempo de Profissão: _____ anos	
Serviço: Contratado () Autônomo () Aposentado ()	
Modelo do caminhão: _____ Ano do caminhão: _____ Percurso (Cidade/UF) Distância: _____ km Origem: _____ / _____ Destino: _____ / _____ Tempo de descanso: _____ h / noite _____ h	Horas totais da viagem: _____ h Horas viajadas (até agora): _____ h Dirige direto quantas horas _____ h Nº de ocupantes no veículo: _____ Tipo de carga: _____ Carga ida e volta () Sim () Não
INFORMAÇÕES SOBRE A SAÚDE	
Pressão alta () Diabete () Estresse () Outro () Nenhum () DORES Lombar () Cervical () Ombro () Joelho () Outro () Atividade física Sim () Não () Frequência: _____ vez/semana Tempo _____ h/dia	
Medicamentos: Sim () Não () Qual? _____ Motivo: _____	
Faz uso de bebidas alcoólicas?	Sim () Não () Local de consumo? Casa () Bar () Outro: _____ Frequência nos últimos 12 meses (vezes por semana): () diariamente () 1 vez por semana () 2-3 vezes por semana () 4-5 vezes por semana Tipo de bebida: Cerveja () Destilados () Vinho () Outros: _____
Fumante?	Sim () Ex-fumante () Não () Tempo de uso: _____ Quantidade de cigarros por dia: _____
Usa rebite?	Sim () Já usei () Não () Qual? _____ Frequência (vezes por semana): () diariamente () 1 vez por semana () 2-3 vezes por semana () 4-5 vezes por semana Quando foi a última vez? _____ Onde adquiriu? () Posto de gasolina () Amigos () Outros _____ Motivo para uso? () Manter acordado () Outro motivo _____
Usa outro tipo de droga? Maconha () Crack () Cocaína () Outras ()	Uso () Nunca () Já usei () Frequência (vezes por semana): () diariamente () 1 vez por semana () 2-3 vezes por semana () 4-5 vezes por semana Quando foi a última vez? _____
Outras informações relevantes: _____	

Anexo C

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Ao

Departamento de Medicina Legal, Ética Médica, Medicina Social e do Trabalho

O Coordenador da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa-CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU ad-referendum** em 15.08.11 a execução do subprojeto intitulado **"VERIFICAÇÃO DO USO DE ANFETAMINAS ("REBITE") POR MOTORISTAS PROFISSIONAIS ATRAVÉS DA ANÁLISE TOXICOLÓGICA EM URINA"**, que será dissertação de mestrado da aluna **JULIANA TAKITANE**, pela **ÁREA DE FISIOPATOLOGIA EXPERIMENTAL**, tendo como orientador o **PROF. DR. MAURICIO YONAMINE**.

O referido projeto faz parte do **Protocolo de Pesquisa nº 0093/09**, intitulado **"USO DE SUBSTÂNCIAS PSICOATIVAS POR MOTORISTAS PROFISSIONAIS"**, aprovado por esta CAPPesq em 25.03.09, que tem como pesquisadora responsável a **DRA. VILMA LEYTON**.

CAPPesq, 15 de Agosto de 2011.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq