UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Análise de canabinóides e cocaínicos em amostras de cabelo e sua
correlação com sintomas psiquiátricos

Marcela Nogueira Rabelo Alves

Ribeirão Preto

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Análise de canabinóides e cocaínicos em amostras de cabelo e sua
correlação com sintomas psiquiátricos

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientada: Marcela Nogueira Rabelo Alves

Orientador: Dr. Bruno Spinosa De Martinis

Ribeirão Preto

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Alves, Marcela Nogueira Rabelo

Análise de canabinóides e cocaínicos em amostras de cabelo e sua correlação com sintomas psiquiátricos. Ribeirão Preto, 2015.

149 p.: il.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: De Martinis, Bruno Spinosa.

1. Canabinóides. 2. Cocaínicos. 3. Análises em cabelo.
4. Transtornos psiquiátricos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome da aluna: Marcela Nogueira Rabelo Alves

Título do trabalho: Análise de canabinóides e cocaínicos em amostras de cabelo e sua correlação com sintomas psiquiátricos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientador: Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

À Deus, por iluminar todos os meus caminhos e não me deixar desistir nunca;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida;

Ao Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis, pela orientação durante todos esses anos de pós-graduação e por sua amizade e confiança;

Ao Prof. Dr. José Alexandre de Souza Crippa, pelo auxílio e colaboração durante todo o trabalho;

À Profa. Dra Flávia Osório de Lima, pelo carinho, apoio e disponibilidade no auxílio da realização do trabalho e da análise estatística;

Ao Prof. Dr. Luís Alberto Beraldo, por todos os conselhos durante o desenvolvimento deste trabalho;

À Profa. Dra. Maria Eugênia Queiróz, pelos valiosos conselhos no Exame de Qualificação;

À FCFRP, em especial, ao PPG em Toxicologia, pela contribuição na minha formação;

Aos amigos do laboratório: Dayanne, Fernanda Monedeiro, Lidiane, Laís, Fabiana, Mariana, Fabrício, Eduardo, Fernanda Furlan, Ricardo, Mércia, Bruno, Brenda e Caio, obrigada por todo o carinho, apoio, paciência, ajuda e convivência; Em especial, ao meu amigo Thiago, companheiro de coleta, amigo para todas as horas, e sua namorada Livia, que sempre me apoiaram e me incentivaram em todos os momentos;

Aos profissionais do CAPS AD de Ribeirão Preto, pela acolhida calorosa, por desempenharem brilhantemente, com muita dedicação e esforço, seu trabalho nessa luta pelo tratamento dos dependentes de drogas;

Aos voluntários atendidos no CAPS AD de Ribeirão Preto, por participarem da pesquisa com tanto entusiasmo;

Aos meus amigos Ana Paula, Fábio e Rafael, pelos conselhos e palavras amigas;

À minha prima Analina, meus amigos Mateus e Marlene, por me receberem e abrigarem em Ribeirão Preto com tanto carinho;

À minha família, que sempre me apoia e incentiva em todas as minhas escolhas;

À minha mãe Verônica, por ser meu exemplo de vida; meus irmãos, José Neto e Hugo, e ao meu pai, José Rabelo, que mesmo de longe, torcem muito pelo meu sucesso e pelas minhas conquistas;

Ao meu esposo, Rodrigo, pela amizade, carinho, compreensão e por todo amor;

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

RESUMO

ALVES, M. N. R. **Análise de canabinóides e cocaínicos em amostras de cabelo e sua correlação com sintomas psiquiátricos**. 2015. 149 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

O consumo dos diferentes tipos de drogas está associado a problemas sociais, econômicos e de saúde pública, em todas as regiões no mundo. Dentre os problemas de saúde pública, podemos destacar a alta prevalência de comorbidade entre o uso de drogas e os transtornos mentais. A *Cannabis*, a cocaína e o *crack* são as drogas ilícitas mais consumidas no Brasil. A utilização do cabelo como matriz biológica para determinação destas drogas permite avaliar o uso crônicos pelos indivíduos, uma vez que o cabelo é uma matriz estável, de fácil manipulação e a janela de detecção depende apenas do comprimento do cabelo. Entretanto, a análise em cabelo ainda representa um desafio analítico. Foram desenvolvidos dois métodos para a detecção das diferentes drogas no cabelo, com diferentes enfoques analíticos. O primeiro método (desenvolvido durante o estágio de doutorado sanduíche na Itália) identificou e quantificou cocaína e metabólitos usando a técnica de *column switching* e detecção por LC-MS/MS. O segundo método foi desenvolvido para determinação de canabinóides nas amostras de cabelo utilizando GC-MS. O diferencial deste método foi a utilização de um novo dispositivo de extração em fase sólida (as ponteiras DPX) para concentração e purificação do extrato, utilizando menor quantidade de solventes. A determinação dos canabinóides e cocaínicos foi realizada nas amostras de cabelo da população atendida no CAPS – AD de Ribeirão Preto, São Paulo. Além da coleta da amostra de cabelo, o sujeito foi submetido a uma entrevista, onde os seguintes instrumentos de avaliação foram aplicadas: Questionário sobre a saúde do Paciente 9, Inventário de fobia social, *Self Report Questionnaire*, Questionário de Ansiedade de Beck, Inventário de Depressão de Beck e Questionário sobre o uso da *Cannabis*, bem como um questionário elaborado pelo pesquisador para coleta de dados sociodemográficos, consumo de substâncias e dados sobre a amostra de cabelo, como comprimento, cor, tintura ou coloração. As amostras de cabelo foram analisadas e a média das concentrações de cada droga encontrada no cabelo foi correlacionada com os indicadores clínicos de transtorno mentais, obtidos através dos instrumentos de avaliação psiquiátrica. A maior prevalência de indicadores clínicos positivos para transtornos psiquiátricos entre a população estudada foi de transtornos mentais comuns, entre eles a ansiedade e depressão. A comparação da média de concentração de *Cannabis*, cocaína e crack no cabelo com os indicadores clínicos positivos para os transtornos não apresentou resultados estatisticamente significantes. Entretanto, podemos inferir que os sujeitos que apresentaram maior concentração média de *Cannabis* e cocaína no cabelo possuíam mais indicadores clínicos positivos para sintomas mentais comuns e depressão maior enquanto que os sujeitos usuários de *crack* possuíam mais indicadores clínicos positivos para sintomas ansiedade. Apesar de algumas limitações, podemos concluir que o estudo possibilitou estimar a prevalência da morbidade entre abuso de drogas ilícitas e transtornos psiquiátricos na população atendida no Centro de Atenção Psicossocial Álcool e drogas de Ribeirão Preto.

Palavras-chave: Canabinóides, cocaínicos, análise de cabelo, *column switching*, ponteiras DPX, LC-MS/MS, GC-MS, sintomas psiquiátricos.

ABSTRACT

ALVES, M. N. R. Analysis of cannabinoids and cocaine in hair samples and correlation with psychiatric symptoms. 2015. 149 f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Different kinds of drug use have been associated to social, economic and health public problems worldwide. Among the high prevalent public health problems is the comorbidity between drug abuse and psychiatric disorders. Cannabis, cocaine and crack are the most consumed illicit drugs in Brazil. Hair use as the biological matrix for the determination of these drugs allows to evaluate chronic use, once hair is a stable matrix, easy to manipulate and the window detection only depends on the size of the hair. However, hair analysis still represents an analytical challenge. It was developed two methods for the detection of the drugs in hair, with different analytical approach. The first method (developed during doctoral stage in Italy) had identified and quantified cocaine and metabolites using column switching technique and LC-MS/MS detection. The second method was developed for determination of cannabinoids in hair samples using GC-MS. Decontamination procedure was the same cited above. The differential of this method was the use of a new device in solid phase extraction (DPX tips) for the extracts concentration and purification, using less solvents volumes. Cannabinoids and cocaine analysis were performed in hair samples from people who were enrolled in the CAPS – AD of Ribeirão Preto, São Paulo. Besides hair collection, the individual was submitted to an interview, where it was applied the following evaluation scales: Patient health questionnaire - 9, Social phobia inventory, Self report questionnaire, Beck anxiety inventory, Beck depression inventory and *Cannabis* research questionnaire as well as a questionnaire made by the author to collect sociodemographic data, substance consume and hair data. Hair samples were analyzed and the concentrations were correlated with positive clinical factors of mental disorders obtained through evaluation scales. The highest prevalence of positive clinical indicators for psychiatric disorders among the population studied was of common mental disorders, including anxiety and depression. The comparison of the average concentration of Cannabis, cocaine and crack in the hair with the positive clinical indicators for the disorders did not show statistically significant results. However, we can infer that the subjects who had higher average concentration of Cannabis and cocaine in hair had showed positive indicators for common mental symptoms and major depression as well as the subjects who had higher average concentration of crack in hair had showed positive indicators for anxiety. Despite of some limitations, we can conclude that the study had allowed estimating the prevalence of morbidity among illicit drugs abuse and psychiatric disorders in the population enrolled in the psychosocial care center in Ribeirão Preto.

Keywords: Cannabinoids, cocaine, hair analysis, *column switching*, DPX tips, LC-MS/MS, GC-MS, psychiatric symptoms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Metabolismo do THC

Figura 2 - Produtos de biotransformação da cocaína

Figura 3 - (A) Desenho esquemático da parte interna da fibra capilar, mostrando as diferentes estruturas e constituintes (B) Mecanismos de incorporação de substâncias no cabelo

Figura 4 - Cromatograma dos analitos na concentração do LIQ

Figura 5 - Curva de calibração para cocaína

Figura 6 - Curva de calibração para a benzoilecgonina

Figura 7 - Curva de calibração para o cocaetileno

Figura 8 - Esquema da ponteira DPX

Figura 9 - Processo de segmentação do cabelo e as ponteiras DPX

Figura 10 - Processo de extração do cabelo usando a DPX

Figura 11 - Coleta da amostra de cabelo

Figura 12 - Testes imunoenzimáticos utilizados para *screening* de THC, COC e ANF nas amostras de urina

Figura 13 - Cromatograma contendo 25 ng de padrão dos analitos

Figura 14 - Cromatograma de uma amostra branco

Figura 15 - Curva de calibração para o CBD

Figura 16 - Curva de calibração para o THC

Figura 17 - Método de extração da *Cannabis* planta

Figura 18 - Concentração das drogas e metabólitos em função do tamanho do cabelo

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de *cut off* para as principais drogas no cabelo

Tabela 2 - Programação do gradiente de eluição e das válvulas de switching

Tabela 3 - Reações monitoradas, voltagem de fragmentação e energia de colisão

Tabela 4 - Valores de imprecisão e inexatidão intradia (n=5) e interdia (n=5)

Tabela 5 - Recuperação, efeito matriz e eficiência do processo dos analitos

Tabela 6 - Resultados das análises de cabelo reais e do programa de proficiência dos testes (*Proficiency Testing Program* - PTP) utilizando GC-MS e LC-LC-MS/MS

Tabela 7 - Íons de detecção e quantificação

Tabela 8 - Valores de concentração dos controles de qualidade (ng/mg) para o canabidiol (CBD) e o Δ^9 -THC

Tabela 9 - Gradiente de eluição dos analitos

Tabela 10 - Resultado do teste imunoenzimático das amostras de urina

Tabela 11 - Gradiente de eluição dos analitos

Tabela 12 - Características sociodemográficas da população estudada

Tabela 13 - Substâncias utilizadas que motivaram os sujeitos a procurar atendimento no CAPS – AD

Tabela 14 - Resultado da análise por LC-MS/MS para canabinóides e cocaínicos (ng/mg)

Tabela 15 - Classificação de cada analito de acordo com os valores de *cut off* recomendados pela SOHT

Tabela 16 - Concentrações mínima, máxima e média analitos (THC, COC, BE, EMA e CE) encontradas no cabelo

Tabela 17 - Comparação entre resultados do auto-relato, *screening* na urina e achados no cabelo para cada droga

Tabela 18 - Resultado da análise por LC-MS/MS para benzodiazepínicos e anfetaminícos

Tabela 19 - Achados de benzodiazepínicos no cabelo em função do sexo

Tabela 20 - Porcentagem de sujeitos com indicadores de transtornos psiquiátricos por escala e média de pontuação

Tabela 21 - Comparação da média de concentração de *Cannabis* encontrada no cabelo entre os grupos negativo e positivo gerados pelos indicadores das escalas

Tabela 22 - Comparação da média de concentração de Cocaína encontrada no cabelo entre os grupos negativo e positivo gerados pelos indicadores das escalas

Tabela 23 - Comparação da média de concentração de *Crack* encontrada no cabelo entre os grupos negativo e positivo gerados pelos indicadores das escalas

Tabela 24 - Correlação entre nível de sintomas e concentração média de *Cannabis*, cocaína e *crack* no cabelo

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UNDOC	United Nations Office on Drugs and Crime
Δ^9 – THC	Δ^9 – tetrahydrocannabinol
Δ^8 – THC	Δ^8 – tetrahydrocannabinol
CBN	Canabinol
CBD	Canabidiol
CYP 450	Citocromo P450
11-OH-THC	11-hidroxi- Δ^9 – tetrahydrocannabinol
COOH-THC	11-nor-9-carboxi- Δ^9 – tetrahydrocannabinol
COC	Cocaína
BE	Benzoilecgonina
EME	Éster metilecgonina
NCOC	Norcocaína
EMA	Éster MetilAnidroecgonina
CE	Cocaetileno
SOHT	Society of Hair Testing
LC-MS/MS	Liquid Chromatography - tandem Mass Spectrometry
GC – MS	Gas Chromatography - Mass Spectrometry
MSTFA	N-Metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida
SPE	Solid Phase Extraction
LLE	Liquid-liquid Extraction
DPX	Disposable Pipette Extraction
CQ	Controle de Qualidade
LIQ	Limite Inferior de Quantificação
CQA	Controle de Qualidade Alto
CQB	Controle de Qualidade Baixo
CQM	Controle de Qualidade Médio
CAPS – AD	Centro de Atenção Psicossocial Álcool e Drogas

SUMÁRIO

RESUMO.....	I
ABSTRACT	II
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABELAS	IV
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	VI
INTRODUÇÃO	1
1. Aspectos toxicológicos das drogas analisadas.....	1
1.1. <i>Cannabis sativa</i>	1
1.2. Cocaína.....	5
2. Cabelo: uma matriz alternativa/complementar para análise de drogas de abuso	9
CAPÍTULO 1	16
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COCAÍNA E METABÓLITOS EM CABELO USANDO A TÉCNICA DE <i>COLUMN SWITCHING</i> E LC-MS/MS.....	16
1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. Técnica de <i>Column Switching</i>	18
1.2. Análise por Cromatografia líquida acoplada em <i>tandem</i> espectrometria de massas (LC-MS/MS).....	19
2. OBJETIVO.....	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1. Preparo da amostra	20
3.2. Instrumentação analítica	21
3.3. Método GC-MS de referência	23
3.4. Validação do método	25
3.4.1. Seletividade	25
3.4.2. Limite de quantificação	25
3.4.3. Linearidade.....	25
3.4.4. Precisão e exatidão	25
3.4.5. Efeito matriz, eficiência do processo e recuperação da extração	26
3.4.6. <i>Carry over</i> e <i>cross-talk</i>	26
3.4.7. Estabilidade pós-processamento	26
3.4.8. Prova de aplicabilidade	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
CAPÍTULO 2	33
ANÁLISE DE CANABINÓIDES EM AMOSTRAS DE CABELO UTILIZANDO AS PONTEIRAS DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA MINIATURIZADAS (DPX) E GC-MS.....	33
1. INTRODUÇÃO	35

1.1. Técnica miniaturizada de extração: Disposable Pipette Extraction (DPX)	35
1.2. Análise por Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)	36
2. OBJETIVO.....	37
3. CASUÍSTICA E ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA	37
3.1. Local do estudo.....	38
3.2. Critérios de inclusão e exclusão da pesquisa	38
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1. Materiais.....	39
4.2. Equipamentos e acessórios	39
4.3. Preparação de soluções e reagentes	40
4.3.1. Preparação das soluções padrão de calibradores, controle de qualidade e padrão interno	40
4.3.2. Preparação dos reagentes.....	40
4.3.2.1. Preparação do tampão fosfato pH 9 (0,1 M).....	40
4.4. MÉTODO	40
4.4.1. Coleta de amostras de cabelo e urina	40
4.4.2. Método para detecção de canabinóides em cabelo	42
4.5. Parâmetros de validação	43
4.5.1. Linearidade.....	44
4.5.2. Precisão	44
4.5.3. Exatidão.....	45
4.5.4. Limite de quantificação	45
4.5.5. Recuperação.....	46
4.5.6. Especificidade.....	46
4.5.7. Seletividade	46
Devem ser analisadas, no mínimo, 6 amostras da matriz biológica de fontes distintas, na concentração do LIQ. Os valores dos resultados devem ser inferiores a 20%.	46
4.5.8. <i>Carry over</i>	47
4.5.9. Estabilidade	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1. Análise cromatográfica.....	47
5.2. Desenvolvimento e otimização do método	49
5.3. Validação do método	51
5.3.1. Linearidade e LIQ.....	51

5.4. Análise imunoenzimática das amostras de urina.....	53
CAPÍTULO 3.....	55
CORRELAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CANABINÓIDES E COCAÍNICOS ENCONTRADA NO CABELO COM INCIDÊNCIA DE SINTOMAS PSIQUIÁTRICOS	55
1. INTRODUÇÃO.....	57
1.1. Drogas de abuso e sintomas psiquiátricos	57
1.1.1. Canabinóides e sintomas psiquiátricos.....	59
1.1.2. Cocaínicos e sintomas psiquiátricos	61
1.2. Instrumentos ou escalas de avaliação psiquiátrica.....	62
2. OBJETIVOS	63
3. CASUÍSTICA	63
3.1. Entrevistas	64
3.2. Escalas de avaliação psiquiátrica e critérios de classificação	64
3.2.1. <i>Self Report Questionnaire</i> (SRQ).....	64
3.2.2. Inventário de Depressão de Beck (<i>Beck Depression Inventory</i> – BDI)	65
3.2.3. Questionário sobre a saúde do Paciente - 9 (<i>Patient Health Questionnaire</i> - PHQ-9)	66
3.2.4. Questionário de Ansiedade de Beck (<i>Beck Anxiety Inventory</i> – BAI).....	66
3.2.5. Inventário de Fobia Social (<i>Social Phobia Inventory</i> - SPIN)	66
3.2.6. Questionário sobre uso da <i>Cannabis</i> (<i>Cannabis Research Questionnaire</i> – CRQ)	67
3.2.7. Questionário da pesquisa.....	68
3.3. Análise estatística dos dados	68
4. MÉTODO	69
4.1. Análise de cabelo usando LC-MS/MS	69
4.2. Análise qualitativa da planta <i>Cannabis</i> sativa.....	70
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
5.1. Perfil sócio demográfico.....	71
5.2. Análise de canabinóides e cocaínicos das amostras de cabelo por LC-MS-MS	75
5.2.1. Análise de canabidiol em amostras de planta de <i>Cannabis</i> apreendidas em Ribeirão Preto	80
5.3. Análise das variáveis ligadas ao cabelo	83
5.4. Análise de benzodiazepínicos e anfetaminas no cabelo por LC-MS/MS	85
5.5. <i>Cannabis research questionnaire</i> (CRQ).....	86
5.6. Característica clínica da amostra.....	89
5.7. Comparação entre as concentrações médias de droga no cabelo e o resultado das escalas (Teste t de <i>Student</i>)	91

5.8. Correlação entre nível de sintomas e concentração das substâncias no cabelo	96
CONCLUSÕES	100
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103
APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	121
APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO DA PESQUISA	123
ANEXO 1 – ARTIGO	125
ANEXO 2 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DA FCFRP.....	133
ANEXO 3 – APROVAÇÃO DA COORDENAÇÃO DO CAPS - AD	134
ANEXO 4 - SELF-REPORTING QUESTIONNAIRE (SRQ).....	135
ANEXO 5 - INVENTÁRIO DE DEPRESSÃO DE BECK (BDI).....	136
ANEXO 6 - PATIENT HEALTH QUESTIONNAIRE (PHQ – 9).....	139
ANEXO 7 - QUESTIONÁRIO DE ANSIEDADE DE BECK (BAI)	140
ANEXO 8 - INVENTÁRIO DE FOBIA SOCIAL (SPIN)	141
ANEXO 9 - QUESTIONÁRIO SOBRE USO DE CANNABIS (CRQ)	142
ANEXO 10 – TABELA 14	145
ANEXO 11 – TABELA 18.....	148

INTRODUÇÃO

O Relatório Mundial sobre Drogas 2013, divulgado pelas Nações Unidas (UNODC) estima que entre 167 e 315 milhões de pessoas usaram drogas ilícitas em 2011. Esse número corresponde a 3,6-6,9 % da população adulta. Já o número de usuários dependentes de drogas, estimado em 2007 entre 18 e 38 milhões, com idade de 15-64 anos, permaneceu estável (UNODC, 2013).

O consumo dos diferentes tipos de drogas está associado a problemas sociais, econômicos e de saúde pública, em todas as regiões no mundo. A *Cannabis* continua a droga mais consumida no mundo, com 180,6 milhões de pessoas ou 3,9% da população com idade entre 15-64 anos. O uso da *Cannabis* na América do Sul é maior que a média mundial (5,7 %). O consumo de cocaína diminuiu nos países da América do Norte, Europa Ocidental e Central e em alguns países da América do Sul, enquanto que no Brasil e na Costa Rica, aumentou significativamente (UNODC, 2013).

Segundo dados do II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (II LENAD) obtidos em 2012, a proporção de indivíduos adultos que usaram, alguma vez na vida, *Cannabis*, cocaína e *crack* foi de 6,8%; 3,8% e 1,3%, respectivamente, representando 8 milhões; 5,1 milhões e 1,8 milhões de brasileiros adultos (LENAD, 2014).

1. Aspectos toxicológicos das drogas analisadas

1.1. *Cannabis sativa*

A *Cannabis sativa* tem sido utilizada há mais de 4000 anos, em razão dos efeitos eufóricos que ela provoca. Há 2700 anos, suas propriedades terapêuticas já eram reconhecidas na China, onde era utilizada no tratamento de dores, espasmos musculares, convulsões, epilepsia, asma e reumatismo. Origina vários produtos psicoativos como a maconha, haxixe, sinsemila entre outros (HUESTIS, 1999). A maconha é proveniente das folhas, caules e dos botões secos das flores da planta de *Cannabis sativa*. Já o haxixe é uma resina obtida dos botões das flores, enquanto que a sinsemila é obtida dos botões das flores femininas que não foram fertilizadas e que, por isso, não contém sementes (UNDOC, 2009).

O Δ^9 – Tetrahydrocannabinol (THC) é o principal composto psicoativo encontrado nas flores, folhas e resina da planta. O conteúdo de THC nos diversos produtos da *Cannabis* é resultado da utilização de diferentes partes da planta em sua produção. A potência do produto é medida pela concentração de THC (% THC/peso seco do produto). No início dos anos 90 nos Estados Unidos, a porcentagem média de THC na maconha, haxixe e no óleo de haxixe apreendidos era de 2,9%; 3,4% e 16,5%, respectivamente (HUESTIS, 1999).

A *Cannabis* contém mais de 421 componentes químicos, incluindo 70 compostos denominados canabinóides (ELSOHLY; SLADE, 2005). Durante a pirólise, mais de 2000 compostos são produzidos, representados por diferentes classes de compostos químicos, entre eles os compostos nitrogenados, hidrocarbonetos, terpenos e ácidos graxos simples (SHARMA et al., 2012).

Além do THC, os canabinóides mais encontrados na *Cannabis* são o Δ^8 – tetrahydrocannabinol (Δ^8 – THC), o canabinol (CBN), que apresentam menos efeitos psicoativos que o THC e o canabidiol (CBD), um importante canabinóide não-psychoativo, mas que apresenta inúmeras propriedades terapêuticas. O THC decompõe quando exposto ao ar, calor ou luz, e quando exposto à soluções ácidas, pode oxidar a CBN (HUESTIS, 2007).

A estrutura do THC foi elucidada em 1964 por Gaoni e Mechoulam, o que possibilitou avanços no estudo da farmacocinética. Contém uma estrutura tricíclica com 21 carbonos e é um óleo viscoso, volátil, insolúvel em água e de alta lipofilicidade ($pka = 10,6$).

O mecanismo de ação do THC pode ser explicado por duas hipóteses: a primeira sugere que o THC exerça seus efeitos através de interações não específicas com organelas e membranas celulares no cérebro (mecanismo de perturbação de membranas); a segunda sugere que o THC interage com receptores canabinóides específicos. É difícil estabelecer um mecanismo de ação único para o THC, uma vez que a análise molecular demonstrou que ele age em diferentes alvos intracelulares, incluindo os receptores de opióides e benzodiazepínicos, a via sintética das prostaglandinas e o metabolismo de proteínas e de ácidos nucleicos. As evidências dos diferentes e numerosos efeitos *in vivo* do THC contribuem para o embasamento da primeira hipótese do mecanismo de ação (SHARMA et al., 2012).

Os canabinóides exercem vários efeitos fisiológicos devido à interação específica com os receptores canabinóides (receptores CB) presentes no cérebro e na periferia. Os receptores CB1 foram descobertos em 1988 por Devane et al., e estão presentes no cérebro, predominantemente em regiões anatômicas associadas à cognição, memória, sistema de recompensa, percepção sensorial a dor, coordenação motora e função endócrina (SHARMA et al., 2012). Já os receptores CB2 foram descobertos em 1993 por Munro et al. e estão localizados nos tecidos periféricos, em locais como o baço, amígdalas, timo, mastócitos, células sanguíneas entre outros (SVIZENSKA et al., 2008).

O sistema endocanabinóide, além de ser composto pelos receptores canabinóides (CB1 e CB2), é composto pelos ligantes endógenos ou endocanabinóides e as enzimas responsáveis pela sua síntese e degradação. O primeiro endocanabinóide a ser identificado e o mais estudado é a anandamida (N – aracdonoleitolamida), que se liga a ambos receptores, mas apresenta maior afinidade ao receptor CB1. A liberação dos endocanabinóides está relacionada à manutenção da homeostase no organismo humano. Todas essas descobertas contribuem para o desenvolvimento de pesquisas com objetivo de identificar o papel fisiológico e patofisiológico do sistema endocanabinóide, bem como desenvolver compostos que possam modular suas habilidades regulatórias, quando administrado exogenamente, e consequentemente atuar como agentes farmacoterapêuticos (SVIZENSKA et al., 2008).

A *Cannabis* apresenta efeitos comportamentais e fisiológicos. Os efeitos comportamentais incluem sentimentos de euforia e relaxamento, percepção do tempo alterada, falta de concentração, prejuízos de aprendizado e memória e alteração do humor como as reações de pânico e paranoia (HUESTIS, 1999). Os efeitos fisiológicos podem ser alterações na frequência cardíaca e na pressão sanguínea diastólica, boca e garganta seca, aumento do apetite, vasodilatação e diminuição da frequência respiratória e alterações no sistema imune e endócrino (SHARMA et al., 2012).

A via de administração e a formulação da droga determinam sua taxa de absorção. A principal via de administração da *Cannabis* é a pulmonar (fumada), que possibilita uma rápida absorção após inalação e rápida distribuição da droga dos

pulmões para o cérebro. O THC atinge rapidamente a corrente sanguínea, sendo que aproximadamente 90% do THC circulam no plasma (97 – 99% ligado às proteínas plasmáticas) e os 10% restantes ligados às hemácias. Após a inalação, o THC é detectado no plasma segundos depois da primeira tragada, e o pico de concentração é atingido após 3 – 10 minutos. Entretanto, a biodisponibilidade do THC varia de acordo com a profundidade da inalação, duração da tragada, entre outros fatores (SHARMA et al., 2012).

Estima-se que aproximadamente 30% do THC sejam destruídos durante a pirólise. A biodisponibilidade da via pulmonar é de 2 a 56%, em razão da intra e intervariabilidade individual na prática de fumar a droga, que expõe o indivíduo a diferentes quantidades de droga. A absorção é mais lenta pela via oral e a biodisponibilidade é reduzida para 6 – 18%, devido à degradação da droga no estômago e ao metabolismo de primeira passagem. A absorção sistêmica do THC é relativamente mais lenta após ingestão oral, comparando-se com as vias de administração pulmonar e intranasal, resultando em uma concentração plasmática máxima após 1 – 2 horas. O THC penetra rapidamente nos tecidos adiposos e altamente vascularizados, incluindo o cérebro e os músculos, reduzindo assim a sua concentração no plasma. A meia-vida plasmática do THC para usuários esporádicos é de 1 – 3 dias e para usuários frequentes é de 5 – 13 dias (HUESTIS, 2007; SHARMA et al., 2012).

A hidroxilação do THC por enzimas hepáticas do citocromo P450 dá origem ao metabólito ativo 11-hidroxi- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (11-OH-THC). A concentração desse metabólito é menor que 10% comparada à do THC, quando a droga é fumada, e pode ser maior que 50% em relação ao THC quando a *Cannabis* é administrada oralmente. A oxidação do 11-OH-THC origina o metabólito inativo 11-nor-9-carboxi- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (COOH-THC), que é excretado na urina principalmente conjugado ao ácido glicurônico (Figura 1). Farmacologicamente, o 11-OH-THC apresenta perfil similar ao THC, enquanto que o COOH-THC não apresenta efeitos psicoativos. Uma grande quantidade de 11-OH-THC é formada após administração oral comparada à inalada, o que contribui para os efeitos gerais do THC no organismo (GROTENHERMEN, 2003).

Figura 1 - Metabolismo do THC (Traduzido de Jenkins, 2007)

A excreção do THC ocorre nas fezes (65%) e na urina (20%), num período de 5 dias (80 – 90%), como metabólitos hidroxilados e carboxilados. O principal metabólito conjugado ao ácido glicurônico encontrado na urina é o COOH-THC enquanto o 11-OH-THC é encontrado predominantemente nas fezes. Em razão da alta lipofilicidade do THC, ele é reabsorvido nos túbulos renais, diminuindo assim a excreção da droga na sua forma inalterada. A lenta liberação do THC dos compartimentos que armazenam gordura e a significativa circulação enterohepática contribuem para a longa meia-vida de excreção plasmática do THC, que é estimada entre 3 – 4 dias (HUESTIS, 1999, 2007).

1.2. Cocaína

A cocaína (COC) é um dos alcalóides presentes nas folhas de duas espécies do gênero *Erythroxylum*, vulgarmente denominado Coca: 1) a *E. novogranatense*, variedade trujillo, cultivada legalmente e cuja produção destina-se à indústria farmacêutica, na qual é utilizada como anestésico local, ou à indústria alimentícia, como constituinte de chás e 2) a *E. coca*, que é a principal fonte da produção ilícita. As folhas são convertidas em pasta de coca após a maceração, que constitui a forma para o tráfico e que é utilizada para produzir o cloridrato de cocaína. O

cloridrato de cocaína é obtido através do tratamento da pasta de coca purificada com ácido clorídrico, sendo auto-administrada por aspiração nasal, por via oral ou intravenosamente (CHASIN; SILVA, 2003).

A cocaína bloqueia os transportadores de dopamina, noradrenalina e serotonina presentes na membrana plasmática dos neurônios pré-sinápticos. Esses 3 neurotransmissores estão envolvidos em diferentes processos fisiológicos e, portanto, o bloqueio da função de um desses transportadores pela cocaína pode ser responsável pelas ações específicas dessa droga. A noradrenalina é responsável pelos efeitos adrenérgicos observados no uso da cocaína, como a midríase, vasoconstrição, hipertensão, taquicardia e taquipnéia. As alterações comportamentais parecem ser mediadas pela dopamina, além de efeitos como intensa euforia, aumento da excitação sexual e da autoconfiança. Os potenciais efeitos indesejáveis incluem paranoia, alucinações e disforia (ISENCHMID, 1999).

Após uma dose aguda de cocaína, as concentrações cerebrais de dopamina são elevadas rapidamente e, em seguida, reduzem a valores abaixo do normal. Em razão da inibição dos transportadores de dopamina na membrana dos neurônios pré-sinápticos, as concentrações extracelulares elevadas desse neurotransmissor resultam em estimulação crônica de seus receptores nos neurônios pós-sinápticos. A administração crônica da cocaína altera a concentração de transportadores de dopamina na região mesolímbica cerebral. Densidades elevadas *postmortem* desses transportadores foram observadas no cérebro de usuários de cocaína. A regulação positiva que a cocaína exerce nos sítios de ligação cerebral resulta na necessidade de doses adicionais para o usuário continuar experimentando os efeitos compensadores da droga (ISENCHMID, 1999).

A cocaína pode ser administrada intranasalmente (IN), intravenosamente (IV), oralmente ou fumada (via pulmonar). Entretanto, não é comum o uso por via oral, pois ocorre metabolização de primeira passagem no fígado, reduzindo assim a biodisponibilidade da droga e, conseqüentemente, os efeitos eufóricos da mesma no cérebro. A via intravenosa é a única via que disponibiliza 100% da droga. A biodisponibilidade das vias intranasal e pulmonar é variável. Porém, a facilidade de administração, a velocidade e a intensidade dos efeitos proporcionados, fazem delas as vias mais utilizadas. Acredita-se que a biodisponibilidade da via intranasal seja

dose dependente e varie de 25 a 94%. A capacidade que a cocaína possui de atingir o cérebro pela via intranasal é mais eficiente do que a via oral, porém, sua absorção é retardada em razão de sua ação vasoconstritora e da possibilidade de deglutição da mesma durante a inalação (ISENCHMID, 1999).

A via pulmonar da cocaína produz efeitos rápidos e intensos similares à intravenosa, refletindo a eficiência da forma de administração em liberar a droga no cérebro. Apesar disso, estudos indicam que a biodisponibilidade média da cocaína pela via pulmonar seja de apenas 57 a 70%. Variações interindividuais na técnica de fumar a droga, a temperatura e a natureza da cocaína fumada são fatores importantes no processo de absorção da mesma (ISENCHMID, 1999).

A meia-vida da cocaína varia de 45 a 90 minutos, sendo em média, 60 minutos. Pode haver um moderado aumento nesse tempo, à medida que a dose aumenta. A duração dos efeitos estimulantes da droga está relacionada à via de administração: quando o cloridrato de cocaína é administrado intravenosamente, os efeitos duram de 30 a 45 minutos; quando por via intranasal, os efeitos duram de 60 a 90 minutos e, por sua vez, os efeitos do *crack* (administração por via pulmonar) duram de 15 a 20 minutos (WILLS, 2002).

A cocaína é biotransformada primariamente a benzoilecgonina (BE), ao éster metilecgonina (EME) e norcocaína (NCOC) por diferentes mecanismos (Figura 2). Quando a cocaína é consumida pela via pulmonar (*crack*), ocorre formação do produto de pirólise denominado éster metilanidroecgonina (EMA). Se a cocaína é administrada juntamente com etanol, ocorre a transesterificação da cocaína formando o cocaetileno (CE). Estudos apontam que a COC é metabolizada a EME, via hidrólise enzimática, por pseudocolinesterases e esterases hepáticas e em BE por hidrólise espontânea em pH fisiológico e alcalino e por carboxilesterases hepáticas. Já a NCOC é originada pela metabolização hepática no CYP 450. Está presente em maior concentração em indivíduos que fazem uso concomitante de cocaína e álcool. Após isolamento e purificação de 2 tipos de esterases hepática humana, a partir de carboxilesterases não específicas, observou-se que uma delas, a metilesterase, catalisa a conversão de cocaína a benzoilecgonina e a transesterificação da cocaína em cocaetileno. Na ausência de etanol, esta enzima metaboliza exclusivamente a benzoilecgonina. Por outro lado, a transesterificação

da cocaína em cocaetilen, na presença do etanol, é até 3,5 vezes mais rápida do que a hidrólise em benzoilecgonina (ISENCHMID, 1999).

Figura 2 - Produtos de biotransformação da cocaína
(Traduzido de Jenkins, 2007)

Crack é o nome popular dado à forma de base livre da cocaína, que é processada a partir do cloridrato de cocaína, adicionando-se amônia ou bicarbonato de sódio e água, mistura submetida a aquecimento para remoção do ácido clorídrico. Em razão da via de administração do crack (pulmonar), os usuários são expostos aos seus efeitos em menos de 10 segundos, motivo que leva ao abuso dessa droga (ISENCHMID, 1999).

O éster metilanidroecgonina (EMA) é produzido somente no processo de pirólise da cocaína, não é formado metabolicamente e vem sendo utilizado como um marcador analítico para o uso do *crack*. A quantidade de éster formada é dependente da temperatura aplicada durante a queima do *crack*, sendo que 2 a 89% dessa quantidade podem alcançar os alvéolos pulmonares. Este produto de pirólise

é excretado pela urina, saliva e suor, indicando que quantidades significativas são absorvidas pela corrente sanguínea (TOENNES et al., 1999).

Para detectar e identificar a presença dessas drogas de abuso é necessário a escolha de uma matriz biológica ideal para esse propósito. Uma vez que o objetivo é avaliar a incidência de sintomas psiquiátricos numa população de usuários, optamos por utilizar uma matriz que possibilite determinar o consumo em um período de tempo maior. Considerando que o sangue e a urina (matrizes biológicas tradicionais) possibilitam a detecção de drogas em um intervalo de poucos dias (dependendo da frequência de uso), o cabelo mostra-se uma matriz ideal para avaliação do uso crônico, pois é possível identificar a presença da substância meses e até mesmo anos após seu consumo, dependendo do comprimento do cabelo.

2. Cabelo: uma matriz alternativa/complementar para análise de drogas de abuso

O cabelo é utilizado como matriz biológica para avaliar a exposição a substâncias tóxicas e/ou nocivas desde as décadas de 60 e 70. Análises de metais como arsênio, chumbo ou mercúrio eram realizadas utilizando a espectroscopia de absorção atômica. Entretanto, naquela época, os métodos analíticos não apresentavam sensibilidade suficiente para detecção de substâncias orgânicas como as drogas de abuso (KINTZ et al., 2013). Em 1979, Baumgartner et al. publicaram o primeiro trabalho sobre detecção de opióides em amostras de cabelo de usuários de heroína, utilizando radioimunoensaio.

Nos últimos anos, a utilização do cabelo como matriz biológica para análise de drogas de abuso tornou-se bastante popular, com potencial aplicação na Toxicologia Clínica, Ocupacional e, principalmente, na Toxicologia Forense.

O resultado da análise em cabelo pode mostrar um retrato cumulativo e retrospectivo de exposição prolongada a drogas (MUSSHOF; MADEA, 2007; JOSEPH JR. et al., 1999), uma vez que esses testes podem ser realizados até mesmo séculos após o crescimento do cabelo, em razão de sua natureza sólida e de grande durabilidade (PRAGST; BALIKOVA, 2006). A cocaína e um de seus metabólitos (benzoilecgonina), por exemplo, foram encontrados em cabelo de múmias chilenas, datadas de 2000 a.C. a 1500 a.C. (MUSSHOF et al., 2009).

O cabelo é uma matriz biológica complexa, constituído basicamente de proteínas (65 – 95% de queratina, essencialmente), água (15 – 35%), lipídeos (1 – 9%) e alguns minerais (0,25 – 0,95%). O fio de cabelo ou fibra capilar origina-se a partir de células hermeticamente ligadas inseridas num centro germinativo denominado matriz, que está localizada na base do folículo capilar (aproximadamente 3 a 5 mm abaixo da superfície da epiderme na pele). O número estimado de folículos capilares presentes em indivíduos adultos é de 5 milhões, sendo 1 milhão encontrado na cabeça (KINTZ et al., 2013).

O folículo capilar pode ser considerado um “órgão” miniaturizado. Isso porque as membranas das células da matriz e as membranas dos melanócitos estão expostas a circulação sanguínea, linfática e de fluidos extracelulares. À medida que essas células se movem em direção à superfície da pele, elas amadurecem, devido ao processo de queratinização (Figura 3 A). Nesse processo, que ocorre na zona de endurecimento, ocorre o preenchimento das células com proteínas fibrosas e perda do núcleo, tornando-se células mortas. Quando elas emergem na superfície da pele, são basicamente fibras constituídas de proteínas queratinizadas (POTSCH et al., 1997).

Figura 3 - (A) Desenho esquemático da parte interna da fibra capilar, mostrando as diferentes estruturas e constituintes (B) Mecanismos de incorporação de substâncias no cabelo. Modificado de Pragst e Balikova (2006). Ilustração produzida e gentilmente cedida por Juliana Ramos Martins.

A fibra capilar é constituída por três camadas: medula, córtex e cutícula (Figura 3 A). A medula é a camada mais interna da fibra, seguida do córtex, que representa a maior parte da fibra. Tanto na medula como no córtex podem ser encontrados pigmentos como a melanina. Por fim, a cutícula é a parte mais externa, que protege a fibra, formada por camadas sobrepostas de queratina (COOPER, 2012).

Os mecanismos precisos envolvidos na incorporação de drogas no cabelo ainda não estão esclarecidos. O modelo mais aceito assume que as drogas e seus metabólitos penetram no cabelo por difusão passiva, através dos capilares sanguíneos, para as células da matriz em crescimento na base do folículo capilar (Figura 3 A) (BALIKOVÀ, 2005). À medida que as células se alongam e envelhecem, elas morrem e coalescem, formando a fibra capilar com a droga incorporada na matriz (CONE, 1996). Se apenas o mecanismo de difusão passiva das drogas diretamente para a corrente sanguínea na base do folículo capilar fosse responsável pela incorporação no cabelo, a concentração dessas substâncias no cabelo seria proporcional à encontrada no sangue, no momento da síntese capilar. Entretanto, quando são analisados os diferentes perfis metabólicos no sangue e no cabelo, esse mecanismo sozinho falha em explicar esses perfis.

Portanto, outros possíveis mecanismos são propostos: difusão do suor (glândulas sudoríparas) ou da secreção sebácea para o cabelo e contaminação ambiental externa (figura 3B) (BALIKOVÀ, 2005). Admite-se que cada uma dessas vias contribua para incorporação de drogas no cabelo, mas não está claro ainda o quanto cada uma contribui para esse processo (COOPER, 2012).

A transferência de substâncias do suor ou sebo para o cabelo geralmente ocorre após a fibra emergir da superfície da pele. Ela pode ser explicada em razão das drogas e seus metabólitos estarem presentes em maior concentração e por mais tempo nessas secreções do que na corrente sanguínea (KINTZ et al., 2013).

A contaminação ambiental externa pode ocorrer quando o cabelo entra em contato com fumaça ou vapores provenientes de drogas que estão sendo fumadas (heroína, *crack* ou *Cannabis*) e manuseio direto ou contato com superfícies contaminadas com drogas e, em seguida, o contato das mãos com o cabelo (“mãos sujas”). Após esse contato, a substância se dissolve no suor, tornando

extremamente difícil a diferenciação entre a contaminação passiva e o consumo ativo da droga (BARROSO et al., 2011).

A incorporação de drogas no cabelo pode ser influenciada por diversos fatores, entre eles: a quantidade de melanina presente no cabelo (cor do cabelo), a lipofilicidade e a basicidade das substâncias analisadas. O pH dos melanócitos está entre 3 e 5 e a significativa afinidade da melanina pelas drogas básicas já foi demonstrada em vários experimentos (HENDERSON et al., 1998; KRONSTRAND et al., 1999; POTSCH et al., 1997). O segundo fator é a polaridade da substância mãe ou metabólito. Analitos mais polares entram no cabelo em menor quantidade do que os precursores lipofílicos. A basicidade da substância analisada é o terceiro fator importante. A matriz do cabelo ($\text{pH} < 5$) é mais ácida do que o sangue ($\text{pH} 7,4$), o que facilita a transferência de moléculas de caráter básico (BALIKOVÀ, 2005).

Vários pesquisadores já demonstraram que drogas de caráter básico, como a cocaína e as anfetaminas, se incorporam no cabelo em maior quantidade quando comparadas às drogas de caráter ácido ou neutro, como os canabinóides e benzodiazepínicos (BORGES et al., 2001; COOPER, 2012; JOSEPH et al., 1996; SCOTT; NAKAHARA, 2003).

A retenção e a estabilidade das drogas no cabelo podem ser afetadas por tratamentos cosméticos como descoloração, tinturas e permanentes (BALIKOVÀ, 2005). Os produtos usados para descoloração, clareamento, permanente, tintura ou relaxamento contém em sua formulação bases fortes, que podem causar danos, afetar a estabilidade ou a quantidade de droga presente na matriz capilar. Esses tratamentos, associados à contínua exposição aos fatores naturais, tais como luz solar, clima, poluição, entre outros, podem contribuir para um aumento no dano da cutícula capilar, o que pode reduzir de 50 a 80% da concentração inicial das drogas. (KINTZ et al., 2013).

O cabelo cresce numa taxa média de 0,35 mm/dia ou entre 1 e 1,5 cm/mês, dependendo da região anatômica, raça, sexo e idade da pessoa. Na população em geral, o cabelo cresce 1 cm/mês, o que significa que se o cabelo está a 3 cm do couro cabeludo, ele teria se formado aproximadamente 3 meses antes (MUSSHOFF; MADEA, 2007). Isso indica que a janela de detecção dos analitos é limitada pelo comprimento do cabelo.

Quando o folículo está produzindo cabelo, ele está na fase anágena. Nesta fase, ocorre um aumento da atividade metabólica e da divisão e crescimento celular. Após essa fase de ativo crescimento, o folículo passa por um período de transição de aproximadamente duas semanas, conhecido como fase catágena, durante a qual a divisão celular é interrompida, o fio capilar se torna queratinizado e o folículo começa a degenerar. Após essa fase, inicia-se a fase telógena, em que o folículo entra num período de repouso, por 10 semanas, durante o qual o crescimento do cabelo é interrompido. Fatores como raça, sexo, idade, estado de saúde, deficiências nutricionais e desordens genéticas podem influenciar a taxa de crescimento e a extensão do período de repouso da fibra capilar. No couro cabeludo de um adulto, aproximadamente 85% do cabelo está na fase de crescimento (anágena) enquanto que os outros 15% estão no período de repouso (telógena) (BALIKOVÁ, 2005; COOPER et al., 2012; KINTZ et al., 2013).

Quando o cabelo do couro cabeludo não for suficiente ou ausente para a realização de uma análise, o cabelo pode ser coletado de outras regiões anatômicas, como a região pubiana, braços, axilas ou face (barba). A taxa média de crescimento dos pelos das axilas, pubianos e da barba é, respectivamente: 0,40 mm/dia; 0,30 mm/dia e 0,27 mm/dia (KINTZ et al., 2013). Estudos relatam diferenças entre as concentrações das substâncias encontradas no cabelo da região pubiana ou das axilas com a do cabelo do couro cabeludo (HAN et al., 2005, 2011; LEE et al., 2011; MANGIN; KINTZ, 1993; OFFIDANI et al., 1993). Isso pode ser explicado em razão da maior secreção das glândulas sudoríparas e/ou sebáceas em algumas dessas regiões, assim como pela diferença de comprimento do cabelo e dos seus estágios de crescimento. Os pelos pubianos, por exemplo, podem sofrer contaminação pela urina, dependendo dos hábitos de higiene do indivíduo. Entretanto, estão menos expostos aos fatores naturais como a luz e o clima ou aos tratamentos cosméticos (LEE et al., 2011).

As vantagens práticas que levam a escolha do cabelo como matriz biológica, comparada às matrizes convencionais como sangue e urina são: facilidade na coleta, no transporte e no armazenamento, estabilidade da matriz, ampla janela de detecção (semanas, meses, anos), a não violação da privacidade do indivíduo e a dificuldade em adulterar a amostra (TOLEDO et al., 2003; WADA et al., 2010).

A Sociedade de Testes em Cabelo (Society of Hair Testing – SOHT) publica vários guias que tratam da análise de drogas de abuso e de *doping* em amostras de cabelo. Esses guias oferecem recomendações que variam desde a coleta, o preparo e o armazenamento da amostra até os procedimentos de análise. Além dessas informações, a SOHT recomenda a utilização de valores *cut off* (valor de corte) para classificar uma amostra de cabelo como positiva ou negativa para determinada substância, baseado em dados disponíveis na literatura sobre a concentração de drogas no cabelo de usuários ou pacientes. Os valores de *cut off* são divididos em valores de *screening*, que devem ser considerados na triagem das substâncias, e de confirmação, que deve ser considerado pelos métodos cromatográficos de confirmação. Os valores de *cut off* recomendados pela SOHT, para as principais drogas de abuso, estão descritos na tabela 1 (COOPER et al., 2012):

Tabela 1 - Valores de *cut off* para as principais drogas no cabelo

Grupo de analitos	<i>Screening</i>	Analitos e metabólitos	<i>Confirmação</i>
	<i>Cut off</i> (ng/mg)		<i>Cut off</i> (ng/mg)
Anfetaminas	0,2	Anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA	0,2
Canabinóides	0,1	THC	0,05
		COOH-THC	0,0002
Cocaína	0,5	Cocaína	0,5
		BE, EME, CE	0,05
Metadona	0,2	Metadona	0,2
		EDDP	0,05
Opiáceos	0,2	Morfina, codeína, 6- acetilmorfina	0,2

MDA = metilenodioxianfetamina; MDMA= metilenodioximetanfetamina; THC= Δ^9 -tetrahydrocannabinol; COOH-THC = carboxi- Δ^9 -tetrahydrocannabinol; BE = benzoilecgonina; EME = éster metilecgonina; CE = cocaetileno; EDDP = 2-etilideno-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolideno.

Como o ambiente é uma via de incorporação de drogas no cabelo, é importante diferenciar a exposição sistêmica, em que o indivíduo usa a droga, da exposição ambiental (exposição passiva), em que a superfície do cabelo está exposta a pó, poeira e fumaça, principalmente para drogas como a *Cannabis* e o *Crack*, com intuito de minimizar interpretações errôneas dos resultados. Portanto, é

fundamental a detecção de metabólitos relevantes e a utilização dos valores de *cut-off*, recomendados pela SOHT, para a apresentação/liberação dos resultados (TSANACLIS; WICKS, 2008).

Em alguns países da Europa e nos Estados Unidos, os testes em cabelo são usados para fornecer dados com valor médico-legal, em casos onde é necessário provar ou excluir a adicção do indivíduo, como nos programas de reabilitação, ambiente de trabalho, avaliação da abstinência a substâncias ilícitas e liberação da habilitação de motorista a dependentes de drogas, assim como em investigações criminais (mortes relacionadas ao uso de drogas, crimes de estupro e custódia de crianças) (BALIKOVÀ, 2005; COOPER et al., 2011; MONTAGNA et al., 2000; PICHINI et al., 2004; PATERSON et al., 2010; VOGLIARDI et al., 2015). Esses testes também são utilizados para verificar o histórico de uso/abuso de drogas de indivíduos (corroborar com os relatos dos usuários), para avaliar a exposição *In Utero* e para comparar com testes em urina (KINTZ et al., 2013).

Considerando a importância da utilização do cabelo como matriz biológica para detecção de longa exposição às drogas de abuso, foram desenvolvidos dois métodos de extração e detecção de drogas e seus principais metabólitos, utilizando técnicas analíticas diferentes e inovadoras: o primeiro, realizado durante o estágio de Doutorado Sanduíche na Universidade de Verona, na Itália, teve como objetivo analisar a presença de cocaínicos nas amostras de cabelo utilizando um preparo de amostra simples e a técnica de *Column Switching* aliada à detecção por Cromatografia em fase líquida acoplada em *tandem* espectrometria de massas (LC-MS/MS); o segundo, desenvolvido no Brasil, utilizou as inovadoras ponteiros de extração descartáveis (DPX), que são ponteiros com quantidade reduzida de fase extratora, para análise de canabinóides e detecção por Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS).

Esses estudos foram divididos em capítulos, com intuito de possibilitar uma melhor compreensão dos assuntos abordados. O capítulo 1 descreve o método desenvolvido para análise de cocaínicos durante o estágio de Doutorado Sanduíche na Itália. O capítulo 2 aborda o método desenvolvido para análise de canabinóides utilizando as ponteiros DPX. E por fim, o capítulo 3 aborda a correlação das

concentrações de *Cannabis*, cocaína e crack encontradas nas amostras de cabelo com os indicadores clínicos obtidos nos instrumentos de avaliação psiquiátrica.

CAPÍTULO 1
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE
MÉTODO PARA IDENTIFICAÇÃO E
QUANTIFICAÇÃO DE COCAÍNA E
METABÓLITOS EM CABELO USANDO A
TÉCNICA DE *COLUMN SWITCHING* E LC-
MS/MS

1. INTRODUÇÃO

1.1. Técnica de *Column Switching*

Considerando-se a complexidade da matriz capilar, em que as substâncias pesquisadas encontram-se geralmente em pequenas concentrações enquanto os componentes da matriz e as proteínas se encontram em maior quantidade, a injeção direta ou a injeção de grandes volumes de amostra deterioram o sistema cromatográfico, aumentam a pressão do sistema (*back pressure*) e contribuem para o surgimento do efeito matriz (SUENAMI et al., 2006). Além da redução da quantidade de amostra e do volume de injeção, outra forma de diminuir ou evitar os problemas acima é a utilização da técnica de *column switching*, em que uma pré-coluna de extração é acoplada a coluna analítica através de uma válvula de 6 ou de 10-portas. A amostra é injetada e passa primeiramente pela pré-coluna, que retém os analitos de interesse e permite a eluição dos demais componentes da amostra para a lixeira. Em seguida, a válvula de *switching* é acionada para conectar a pré-coluna à coluna analítica, onde ocorrerá a separação cromatográfica, e ao espectrômetro de massas, local em que se dá a detecção dos analitos (VEUTHEY et al., 2004).

A técnica de *column switching* aumenta a sensibilidade do método, pois evita a introdução de elevada quantidade de íons interferentes no MS, aumenta a seletividade, uma vez que é possível escolher uma pré-coluna e uma coluna analítica de tipos/fases diferentes e, por fim, reduz o tempo total de análise. Miki et al. (2003) utilizaram a técnica de *column switching* e LC-MS para determinação de metanfetamina e seus metabólitos em cabelo. As amostras de cabelo (10 mg) foram incubadas em banho aquoso a 50°C *overnight*, filtradas e um volume de 100 µl foi injetado no LC-MS. O método possibilitou a detecção sensível e precisa dos analitos aliado a um preparo de amostra simples.

Em 2007, Borrey et al. desenvolveram um método para determinação de testosterona em soro humano utilizando a técnica de *column switching* LC-MS/MS. Wagner et al. (2010) determinaram a presença de oxicodona e seus principais metabólitos em plasma humano utilizando *column switching* LC-MS/MS. Recentemente, o grupo de pesquisa do prof. Polettini aplicou a técnica de *column*

switching LC-MS/MS para determinação do 11-nor- Δ^9 -THC ácido em amostras de urina (ZANCHETTI et al., 2012).

1.2. Análise por Cromatografia líquida acoplada em *tandem* espectrometria de massas (LC-MS/MS)

A cromatografia líquida (LC) vem se apresentando como uma técnica alternativa mais simples em relação à cromatografia em fase gasosa, uma vez que não é necessário que a amostra seja derivatizada, termoestável ou volátil (LÓPEZ et al., 2010; PETERS, 2011).

Vários autores já relataram o uso da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) ou em *tandem* espectrometria de massas (MS-MS) na determinação da cocaína e seus metabólitos em cabelo (BUCELLI et al., 2009; Di CORCIA et al., 2012; HILL et al., 2008; HOELZLE et al., 2008; LÓPEZ et al., 2010; MILLER et al., 2008; MOORE et al., 2007; ROPERO-MILLER et al., 2012; SERGI et al., 2012). Em 2009, Huang et al. desenvolveram um método rápido e sensível para determinação simultânea de morfina, codeína, 6-acetilmorfina, cocaína e benzoilecgonina em cabelo, utilizando 20 mg de amostra. O cabelo foi pulverizado e incubado a 40°C por 4 h sob ultrasonificação para extração dos analitos. Em seguida, 50 µL do extrato foram injetados no sistema LC-MS/MS.

Favretto et al. (2011) desenvolveram e validaram um método de *screening* e quantificação de 28 drogas em cabelo, entre elas a cocaína. Seguindo a tendência em análises em cabelo de simplificação do preparo de amostra e redução da quantidade de amostra utilizada, os autores utilizaram 2,5 mg de amostra de cabelo e um procedimento de pulverização e extração simultâneo, que reduziu dramaticamente o tempo de preparo da amostra e extração de 18 h para 10 min. Entretanto, utilizaram cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (sistema LTQ - Orbitrap) para detecção dos analitos.

Lendoiro et al. (2012) desenvolveram um método para determinação de cocaína e outras 34 drogas lícitas e ilícitas em cabelo. Para o preparo da amostra (50 mg de cabelo), utilizaram tanto a extração líquido-líquido como a extração em fase sólida e injetaram 45 µL no LC-MS/MS.

2. OBJETIVO

O objetivo do estágio doutorado sanduíche realizado na Universidade de Verona (Itália), sob a supervisão do Prof. Dr. Aldo Poletti, foi desenvolver e validar um método rápido, de fácil preparo, utilizando uma pequena quantidade de amostra de cabelo (5 mg), para identificação e quantificação de cocaína e metabólitos usando a técnica de *column switching* LC-MS/MS.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Para a determinação dos analitos cocaína (COC), benzoilecgonina (BE) e cocaetileno (CE) nas amostras de cabelo, foram preparadas soluções nas seguintes concentrações: 20,0 ng/μl; 1,0 ng/μl e 0,1 ng/μl para COC e CE e 5,0 ng/μl; 0,25 ng/μl e 0,025 ng/μL para BE. As concentrações das soluções de padrão interno utilizada foram 0,5 ng/μL e 0,1 ng/μL para COC-d3 e BE-d3, respectivamente. Todas as soluções foram diluídas em metanol e armazenadas a 4°C. Os controles de qualidade (CQ) e calibradores foram preparados pela adição de diferentes quantidades dos analitos nas amostras de cabelo branco (sem a presença dos analitos de interesse). Os CQs foram preparados a 0,05 ng/mg; 0,20 ng/mg e 10,0 ng/mg para COC e CE e 0,012 ng/mg; 0,05 ng/mg e 2,5 ng/mg para BE.

As amostras de cabelo branco (cabelo que não contém os analitos pesquisados) utilizadas no estudo foram obtidas dos funcionários do laboratório, de seus familiares e de sujeitos anônimos que testaram negativo para todos os analitos usando o método GC-MS utilizado no laboratório. Para a validação do método, foram utilizadas amostras reais positivas e amostras provenientes de um programa de certificação externa (*Proficiency Testing Program* (PTP) - Arvecon GmbH, Walldorf, Germany).

3.1. Preparo da amostra

Primeiramente, as amostras de cabelo foram colocados em um tubo de vidro e descontaminadas com 1 mL de diclorometano (vórtex por 30 s), seguido por 1 mL de metanol (vórtex por 30 s). Os solventes foram removidos com pipeta Pasteur e o solvente resíduo foi removido por evaporação sob fluxo de nitrogênio baixo e

temperatura ambiente por 15 min. O cabelo foi cortado em pequenos segmentos (1-2 mm) e armazenado a temperatura ambiente até a análise.

Alíquotas de cabelo (aproximadamente 5 mg) foram colocadas em um tubo Eppendorf e fortificadas com uma solução de padrão interno deuterado, com a finalidade de obter uma concentração final de 1,0 ng/mg para COC-d3 e 0,2 ng/mg para BE-d3. Em seguida, 100 µL de HCl 0,1 M foi adicionado e, após breve agitação em vórtex e centrifugação, a amostra foi incubada *overnight* em banho a 45 °C.

Após incubação, uma rápida centrifugação foi feita para precipitar a amostra de cabelo retida na parede do tubo Eppendorf. Uma alíquota de 25 µL do sobrenadante foi colocada em um novo tubo, diluída (1:10) com água destilada e centrifugada a 10.000 rpm por 10 min. Em seguida, uma alíquota de 200 µL foi transferida para um *vial* e 10 µL foram injetados no sistema *column switching* LC-MS/MS.

3.2. Instrumentação analítica

O cromatógrafo líquido utilizado foi um HPLC Agilent modelo 1260 equipado com uma bomba binária e uma válvula de *switching* de 6 portas, controlada eletronicamente. A separação dos analitos é realizada em 2 passos: no primeiro passo, a pré-coluna (Eclipse XDB-C8), retém os compostos pesquisados e permite a eluição dos demais componentes da amostra para a lixeira. Após esse tempo, que deve ser otimizado para cada metodologia, a válvula de *switching* é acionada para conectar a pré-coluna à coluna 2 (Phenomenex Kinetex C18 100A), onde ocorrerá a separação cromatográfica, e ao espectrômetro de massas, em que se dá a detecção dos analitos. Os solventes utilizados na fase móvel são: solvente A – solução de acetato de amônio 5 mM e solvente B – acetonitrila. O fluxo utilizado foi de 0,4 mL/min e o volume de injeção de 10 µL. O tempo total de análise foi de 7 min. A Tabela 2 detalha o gradiente de eluição utilizado e os tempos de *switching* das válvulas.

Tabela 2 - Programação do gradiente de eluição e das válvulas de *switching*

Tempo (min)	Solvente B (%)	Válvula de switching do LC	Válvula de switching do MS
0,00	2	Coluna 1	Descarte
0,80	2	Coluna 1 + 2	Descarte
1,20	2	Coluna 1 + 2	Descarte
1,21	30	Coluna 1 + 2	MS
4,00	70	Coluna 1 + 2	MS
4,01	2	Coluna 1 + 2	MS
4,50	2	Coluna 1 + 2	Descarte
7,00	2	Coluna 1 + 2	Descarte

O espectrômetro de massas utilizado foi um triplo quadrupolo (Agilent 6460) equipado com uma fonte de *electrospray Jet Stream*[®], que opera em modo positivo, e com uma válvula de *switching* operada eletronicamente, que direciona o fluxo do cromatógrafo para a lixeira ou para o espectrômetro de massas. Os parâmetros estabelecidos para fonte do MS estão listados na Tabela 2, assim como as transições monitoradas. As transições foram monitoradas com ambos quadrupolos operando em resolução unitária.

Tabela 3 - Reações monitoradas, voltagem de fragmentação e energia de colisão

Analitos	Ion Precursor (m/z)	Ion Produto (m/z)	Voltagem de Fragmentação (V)	Energia de Colisão(V)
CE	318,2	196,2*	119	18
	318,2	82,2	119	30
COC-d3	307,2	185,1*	112	18
	307,2	85,1	112	30
COC	304,2	182,2*	112	18
	304,2	82,2	112	30
BE-d3	293,2	171,1*	112	18
	293,2	77,1	112	62
BE	290,1	168,1*	112	18
	290,1	77,1	112	62

*Transição utilizada para quantificação; CE = cocaetileno; COC-d3 = cocaína-d3; COC = cocaína; BE-d3 = benzoilecgonina-d3; BE = benzoilecgonina.

O software de aquisição dos dados (*Agilent MassHunter Workstation*) para triplo quadrupolo permitiu a operação automatizada do equipamento. Os critérios de identificação dos analitos utilizados foram estabelecidos pela Comissão da Comunidade Européia (*European Commission Decision 2002/657/EC*): desvio no tempo de retenção relativo menor ou igual a 1% e intensidade relativa do íon (área do pico) entre o íon qualitativo e o quantitativo de $\pm 20\%$ para os analitos nas amostras e nos controles de qualidade.

3.3. Método GC-MS de referência

As amostras reais e as de certificação externa também foram analisadas utilizando o método GC-MS de referência já utilizado no laboratório, com objetivo de verificar o desempenho do método *column switching* LC-MS/MS desenvolvido.

A descontaminação e a segmentação do cabelo foram realizadas conforme procedimento descrito anteriormente. Alíquotas de cabelo (aproximadamente 50 mg) foram adicionadas a 1 mL de HCl 0,1 M e, após breve agitação em vórtex e centrifugação, as amostras foram incubadas a 45°C *overnight*. Após atingir temperatura ambiente, 1 mL de tampão fosfato 0,1 M (pH 6) foi adicionado à mistura, seguido de KOH 1 M até atingir o pH final em torno de 6 - 7. Após centrifugação a 4000 rpm por 5 min, as amostras foram purificadas utilizando cartuchos de extração em fase sólida (Phenomenex Strata Screen C) previamente condicionados com 2 mL de metanol e 2 mL de tampão fosfato 0,1 M (pH 6). Após a lavagem dos cartuchos com 2 mL de água destilada e 5 mL de metanol, os analitos foram eluídos com 2 porções de 1 mL da solução de diclorometano/isopropanol/hidróxido de amônio (8:2:0,2), preparada diariamente.

Após evaporação do solvente, os extratos foram reconstituídos com 50 µL de N-Metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA) e derivatizados a 75°C por 15 min. A análise cromatográfica foi realizada utilizando um cromatógrafo em fase gasosa Agilent 7890 acoplado a um detector de massas Agilent 5975C equipado com amostrador automático (Agilent 7673 C). A separação cromatográfica ocorreu em uma coluna capilar DB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) a um fluxo constante de 1,6 mL/min de hélio. As injeções (1 µL) foram feitas em modo pulsado *splitless* (21 psi até 1 min) a 250°C. A programação de temperatura da coluna utilizada foi: 90°C (1 min) a 325°C a uma taxa de 45°C/min, seguido de 6 min a 325°C. Os seguintes íons foram monitorados: m/z 82,0; 182,2 (quantificação) e 303,3 para COC; m/z 85,0; 185,2 e 306,3 para COC-d3; m/z 82,0; 196,2 e 317,3 para CE (padrão interno utilizado foi COC-d3); m/z 240,2 (quantificação); 346,3 e 361,4 para BE-TMS; m/z 243,2 (quantificação); 349,3 e 364,4 para BE-d3-TMS.

A análise do CE foi realizada apenas qualitativamente (limite de detecção igual a 0,1 ng/mg). O tempo total de corrida foi de 16 min. O menor limite de quantificação foi de 0,1 ng/mg para a COC e 0,03 ng/mg para a BE.

3.4. Validação do método

Os seguintes parâmetros foram avaliados: seletividade, limite de quantificação, linearidade, precisão e exatidão, efeito matriz, eficiência do processo, recuperação da extração, *carry over*, *cross-talk* e estabilidade pós-processamento.

3.4.1. Seletividade

Nove amostras de cabelo branco foram analisadas para verificar a presença de potenciais interferentes ou efeito matriz adverso durante a fase inicial da validação.

3.4.2. Limite de quantificação

O limite inferior de quantificação (LIQ) foi estabelecido baseando-se nos valores de *cut-off* de confirmação proposto pela Sociedade de Testes em Cabelo (SOHT, 2004), após verificar os parâmetros de precisão e exatidão.

3.4.3. Linearidade

As curvas de calibração foram preparadas diariamente analisando-se amostras de cabelo branco fortificadas com 0,05; 0,20; 0,50; 2,0; 10,0 e 50,0 ng/mg de COC e CE, e 0,012; 0,05; 0,125; 0,50; 2,50 e 12,50 ng/mg de BE. A melhor curva de calibração foi estimada utilizando o *Curve-Fit Assistant software* disponível na lista de programas do cromatógrafo (Agilent MassHunter Workstation).

3.4.4. Precisão e exatidão

Estes parâmetros foram determinados utilizando os CQs. A precisão intradia foi avaliada analisando-se cinco replicatas de cada CQ, enquanto a precisão interdia foi avaliada pela análise dos CQs em cinco dias diferentes.

3.4.5. Efeito matriz, eficiência do processo e recuperação da extração

O efeito matriz (ME), a eficiência do processo (PE) e a recuperação da extração (RE) foram avaliados, em seis amostras de cabelo branco de diferentes origens, utilizando o método de adição pós-extração (MATUSZEWSKI et al., 2003) para dois CQs (0,20 ng/mg e 10,0 ng/mg para COC, CE e 0,05 ng/mg e 2,5 ng/mg para BE). As áreas absolutas dos picos obtidas com a adição pré-extração (A), adição pós-extração (B) e solução pura dos padrões (C) foram calculadas de acordo com as seguintes fórmulas: $RE = A/B \cdot 100$; $ME = B/C \cdot 100$ e $PE = ME \cdot RE / 100 = A/C$ (PETERS, 2006).

3.4.6. *Carry over* e *cross-talk*

O *carry over* foi avaliado pela injeção de uma amostra de cabelo branco imediatamente após o ponto mais alto da curva de calibração. *Cross-talk* entre a COC e BE e seus respectivos padrão interno deuterado foram avaliados pelas injeções separadas do padrão não-deuterado e deuterado dos analitos (quantidade absoluta de 4 ng) e pelas medidas de sinal da transição de quantificação do analito ausente.

3.4.7. Estabilidade pós-processamento

Foi avaliada pela reinjeção dos extratos após permanecerem 72 h no amostrador automático em temperatura ambiente.

3.4.8. Prova de aplicabilidade

O método foi aplicado a 23 amostras reais de cabelo. Os resultados obtidos por LC-LC-MS/MS foram comparados àqueles obtidos por GC-MS para as mesmas amostras.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O progressivo aumento no número de análises de cabelo para diferentes aplicações clínicas e forenses requer um método analítico eficiente e efetivo. A técnica de *column switching* LC-MS/MS oferece vantagens sobre a GC-MS como simplificação do preparo de amostras (exclusão dos passos de purificação e derivatização do extrato) e significativo aumento na rapidez de todo processo. Com exceção do passo de incubação *overnight*, que é idêntico para ambas as técnicas, o método LC-LC-MS/MS proposto é aproximadamente 4 vezes mais rápido que o método GC-MS de referência. A aplicação da *column switching* LC combinada à espectrometria de massas tem uma vantagem adicional de fácil configuração das condições de gradiente com objetivo de eluir os analitos com uma alta porcentagem de solvente orgânico. Isso afeta positivamente a eficiência de ionização dos analitos e a sensibilidade do método.

A adição de um segundo passo de cromatografia líquida provou ser necessária para evitar a grande quantidade de componentes e íons interferentes que pudessem prejudicar a ionização e detecção dos analitos. Entretanto, o uso de uma pré-coluna relativamente barata (C8; 12,5 mm x 2,1 mm x 5 µm) como coluna 1, também chamada *guard column*, permitiu o cumprimento deste requisito com limitado aumento no custo de análise e sem afetar a robustez e a resolução cromatográfica.

O gradiente de solventes foi estabelecido com intuito de obter o aprisionamento dos analitos na coluna 1, enquanto a maioria dos compostos interferentes eram enviados para lixeira, e de obter uma separação muito eficiente (observar a separação entre os picos de COC e CE na figura 4, apesar do tempo da corrida cromatográfica ser pequeno).

Figura 4 - Cromatograma dos analitos na concentração do LIQ

O método apresentou excelente linearidade na variação de 0,05 ng/mg – 50,0 ng/mg para COC ($\ln(y) = 0,16224 + 0,954721 \cdot \ln(x) + 0,007018 \cdot \ln(x)^2$; $R^2=0,9999993$) e para CE ($\ln(y) = 0,08737 + 0,974174 \cdot \ln(x) + 0,006013 \cdot \ln(x)^2$; $R^2=0,9999997$), e de 0,012 ng/mg - 12,5 ng/mg para BE ($y = 3,204692 \cdot x + 0,01553$; $R^2=0,999997$). As curvas de calibração estão apresentadas nas figuras 5, 6 e 7.

Figura 5 - Curva de calibração para cocaína

Figura 6 - Curva de calibração para a benzoilecgonina

Figura 7 - Curva de calibração para o cocaetileno

Os LIQs foram arbitrariamente estabelecidos a 0,05 ng/mg para COC e CE, e 0,012 ng/mg para BE. Esses valores representam um décimo e um quarto do valor do *cut-off* de confirmação recomendados pela SOHT para COC e BE, respectivamente. Imprecisão e inexatidão no LIQ foram menores que 20% para todos os analitos. A Tabela 4 mostra os valores de imprecisão e inexatidão do método nas concentrações dos LIQs, *cut-offs* e CQ de maior concentração. Em razão da elevada sensibilidade analítica, os valores de LIQ encontrados são 2 vezes menores que os utilizados no método GC-MS de referência, utilizando-se uma quantidade de amostra 10 vezes menores (5 mg ao invés de 50 mg).

Tabela 4 - Valores de imprecisão e inexatidão intra- (n=5) e interdia (n=5)

Analitos	CQs (ng/mg)	Imprecisão Intradia (CV%)	Inexatidão Intradia (%)	Imprecisão Interdia (CV%)	Inexatidão Interdia (%)
CE	0,05	4,2	112,1	10,0	95,9
	0,20	4,1	112,7	9,4	98,4
	10,0	7,1	100,0	4,0	97,6
COC	0,05	2,8	112,9	8,1	99,6
	0,20	3,9	108,9	9,9	95,4
	10,0	7,4	100,0	3,4	97,8
BE	0,012	4,7	107,0	8,3	101,0
	0,05	2,9	109,4	9,2	100,2
	2,50	5,9	100,0	3,3	98,7

O sinal detectado após análise de nove amostras de cabelo branco de diferentes origens nunca excedeu 10% do valor do LIQ para COC e CE e 20% para BE. Os resultados encontrados para eficiência do processo, recuperação e efeito matriz estão descritos na tabela 5. A supressão do íon foi observada apenas para o primeiro analito a ser eluído (BE), enquanto que para COC e CE foi observado aumento do íon.

Tabela 5 - Recuperação, efeito matriz e eficiência do processo dos analitos

Analitos	CQs (ng/mg)	Recuperação (%)	Efeito Matriz (%)	Eficiência do Processo (%)
CE	0,2	51±17	18±18	58±14
	10,0	56± 8	15± 5	65± 8
COC	0,2	53±18	14±17	59±14
	10,0	58±9	13± 9	65± 7
BE	0,05	56±23	- 6±19	52±21
	2,50	59±10	-10±15	52± 8

A diferença média entre as concentrações dos extratos reinjetados e as concentrações iniciais foi muito pequena, com tendência à redução para COC e CE ($-1,7 \pm 2,6\%$ e $-2,2 \pm 2,8\%$, respectivamente) e aumento para a BE ($2,0 \pm 3,9\%$). O *cross-talk* foi sempre inferior a 0,1% e o *carry over* foi 0,11% para COC, 0,07% para CE e 0,13% para BE. Apesar dos reduzidos valores de *carry over*, foi estabelecido no procedimento operacional padrão do laboratório que a análise de uma amostra desconhecida após uma amostra muito concentrada (por exemplo ≥ 50 ng/mg de cocaína), se a mesma apresentar resultado maior que o LIQ, ela deve ser reexaminada após uma amostra branca no final da sequência.

Os resultados obtidos utilizando os métodos de GC-MS e LC-LC-MS/MS estão descritos na tabela 6. Observou-se uma boa correlação entre o novo método e o método de referência: $y = 0,981 x + 0,3474$ ($R^2 = 0,991$) para COC e $y = 1,0017 x + 0,0651$ ($R^2 = 0,975$) para BE.

Esses resultados já foram publicados no periódico *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (Anexo 1).

Tabela 6 - Resultados das análises de cabelo reais e do programa de proficiência dos testes (*Proficiency Testing Program* - PTP) utilizando GC-MS e LC-LC-MS/MS

Amostras	GC-MS (ng/mg)			LC-LC-MS/MS (ng/mg)			Concentração de referência (ng/mg)		
	COC	BE	CE	COC	BE	CE	COC ^a	BE ^a	CE ^b
PTP 1	2,72	2,25	≤0,10	2,50	2,98	≤0,05	2,99	2,84	N.R.
PTP 2	1,73	1,38	≤0,10	1,36	1,51	≤0,05	N.D.	N.D.	N.R.
PTP 3	2,16	1,78	≤0,10	1,91	2,23	≤0,05	2,65	2,03	N.R.
PTP 4	1,45	2,08	≤0,10	1,15	2,42	≤0,05	1,85	2,38	N.R.
PTP 5	1,05	2,45	≤0,10	0,99	2,56	≤0,05	1,31	2,65	N.R.
1	0,07	0,06	≤0,10	0,05	0,05	≤0,05	-	-	-
2	0,78	0,07	≤0,10	0,75	0,06	≤0,05	-	-	-
3	1,98	0,19	≤0,10	2,25	0,36	≤0,05	-	-	-
4	2,99	1,74	Positivo	4,66	1,14	0,22	-	-	-
5	18,45	1,82	≤0,10	21,41	1,49	≤0,05	-	-	-
6 ^c	1,97	1,17	Positivo	1,44	0,70	0,13	-	-	-
7	0,45	0,07	≤0,10	0,43	0,10	≤0,05	-	-	-
8	0,21	0,06	≤0,10	0,18	0,03	≤0,05	-	-	-
9	0,30	0,02	≤0,10	0,29	0,04	≤0,05	-	-	-
10	4,93	0,41	Positivo	7,68	0,60	0,18	-	-	-
11	≤0,10	≤0,03	≤0,10	≤0,05	≤0,012	≤0,05	-	-	-
12	71,80	9,55	Positivo	68,67	9,52	0,99	-	-	-
13	8,42	0,77	Positivo	7,63	0,94	0,36	-	-	-
14	27,66	3,10	≤0,10	29,42	2,86	≤0,05	-	-	-
15	20,03	2,10	Positivo	23,46	2,40	0,57	-	-	-
16	4,97	0,53	≤0,10	4,60	0,78	≤0,05	-	-	-
17	9,79	1,72	≤0,10	7,58	2,40	0,06	-	-	-
18	1,85	0,54	Positivo	1,85	0,28	0,34	-	-	-

^a N.D., não disponível; ^b N.R., não reportado; ^c cabelo pubiano; PTP = programa de proficiência dos testes; COC = cocaína; BE = benzoilecgonina; CE = cocaetileno.

CAPÍTULO 2
ANÁLISE DE CANABINÓIDES EM AMOSTRAS
DE CABELO UTILIZANDO AS PONTEIRAS DE
EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA
MINIATURIZADAS (DPX) E GC-MS

1. Introdução

1.1. Técnica miniaturizada de extração: Disposable Pipette Extraction (DPX)

As técnicas de extração mais utilizadas para análise de drogas de abuso em amostras biológicas são líquido-líquido (LLE) e extração em fase sólida (SPE). Esses métodos consomem uma grande quantidade de solvente orgânico, que pode causar problemas ambientais e de saúde e requerem um tempo maior de preparo por parte do analista (KUMAZAWA et al., 2007). A nova tendência em química analítica é desenvolver métodos que propiciem a simplificação e miniaturização do preparo da amostra e o uso mínimo de solventes e volume de amostra (CHAVES, et al., 2009).

A extração utilizando ponteiras descartáveis (Disposable Pipette Extraction - DPX) é um novo dispositivo de extração em fase sólida que permite uma rápida extração dos analitos de uma solução aquosa, com uso mínimo de solventes (figura 8). Essa técnica miniaturizada de SPE consiste de uma fase sólida extratora dentro de uma ponteira. Ao aspirar a solução da amostra, a mesma se mistura com a fase sólida presente na ponteira, propiciando uma maior homogeneização e superfície de contato com a fase. As vantagens que as ponteiras DPX apresentam comparadas aos convencionais cartuchos de SPE são: ausência de condicionamento das ponteiras, conseqüentemente, o tempo de extração é menor, além de utilizarem quantidades menores de solventes no processo de lavagem e eluição da amostra (LAMBERT, 2009).

Figura 8 - Esquema da ponteira DPX
(Traduzido de <http://www.gerstel.com/en/dpx-scheme.htm>)

Anfetamina e metanfetamina foram determinadas em amostras de sangue total (HASEGAWA et al., 2007) e urina (KUMAZAWA et al., 2007) utilizando essa forma de extração. Brewer et al. (2008) determinaram alguns canabinóides e seus metabólitos em amostras de sangue total usando a DPX e análise por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas. Foster et al. (2008) analisaram benzodiazepínicos e opióides em amostras de urina e sangue, e barbitúricos e COOH-THC em amostras de urina utilizando a forma automatizada de extração com as ponteiras (FOSTER et al., 2013). Guan et al. (2010) utilizaram as ponteiras DPX para extração de pesticidas apolares e polares em frutas e vegetais. Apesar do crescente número de trabalhos utilizando este dispositivo, ainda não foram encontrados relatos na literatura de sua utilização para extração de drogas de abuso em amostras de cabelo.

1.2. Análise por Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)

Diversas técnicas têm sido utilizadas para a detecção de variados analitos e seus metabólitos em amostras de cabelo, como por exemplo, a cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), cromatografia em fase líquida com ionização química a pressão atmosférica acoplada à espectrometria de massas (LC-APCI-MS), cromatografia em fase líquida com ionização por *electrospray* acoplada a espectrometria de massas (LC-ESI-MS) e cromatografia em fase líquida com detector de fluorescência (LC-FL). Porém, os métodos mais empregados são a cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) e a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS ou LC-MS/MS) (WADA et al., 2010).

A GC-MS permite a identificação dos analitos e seus metabólitos em concentrações muito pequenas, o que garante a confiabilidade e sensibilidade do método (CONE et al, 1994; CORDERO; PATERSON, 2007; GENTILI et al., 2004; JOSEPH Jr et al., 1999; KINTZ et al., 1995; MEROLA et al., 2010; MUSSHOFF et al., 2006; ROMANO et al., 2001; ROMOLO et al., 2003; SKENDER et al., 2002; SKOPP et al., 2007; SMITH; KIDWELL, 1996; TOLEDO et al., 2003). Entretanto, a detecção de canabinóides em cabelo é um desafio analítico, pois requer uma alta

sensibilidade, já que os analitos estão presentes em concentrações tão baixas quanto picogramas ou fentogramas por miligrama de cabelo (GROTENHERMEN, 2003).

Musshoff et al. (2002) utilizaram hidrólise alcalina e microextração em fase sólida para determinação de tetrahydrocannabinol, cannabinol e canabidiol em 10 mg cabelo, usando a GC-MS. Kim et al. (2005) determinaram os canabinóides (tetrahydrocannabinol, cannabinol e canabidiol) em 50 mg de cabelo utilizando extração líquido-líquido e a GC-MS. Em 2006, Musshoff et al. compararam os resultados das análises de opiáceos, cocaína, anfetaminas, metadona e canabinóides em cabelo e urina com o auto-relato do uso de drogas pelos pacientes.

A GC-MS é uma técnica de detecção bastante utilizada na determinação de canabinóides em cabelo. Por isso, utilizamos esta técnica com um dispositivo inovador de preparo de amostra: as ponteiros de extração descartáveis (DPX). Uma vez que a concentração de canabinóides no cabelo é pequena, as ponteiros DPX podem representar uma opção alternativa à utilização dos cartuchos de extração em fase sólida tradicionais.

2. OBJETIVO

Desenvolver e validar um método de extração utilizando as ponteiros DPX para análise de canabinóides em amostras de cabelo e detecção por GC-MS.

3. CASUÍSTICA E ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

A pesquisa em seres humanos tem o compromisso de resguardar a integridade de todos os envolvidos. Este resguardo envolve questões sobre a preservação da privacidade, a minimização de riscos e desconfortos, a busca de benefícios, a não discriminação e a proteção de grupos de pessoas vulneráveis. Entre as estratégias utilizadas com intuito de proteger os indivíduos estudados estão o termo de consentimento livre e esclarecido e a avaliação por Comitês de Ética em Pesquisa. A avaliação prévia dos projetos feita por um Comitê de Ética em Pesquisa visa assegurar que os aspectos éticos e metodológicos estejam adequados. O

processo de consentimento livre e esclarecido tem por objetivo permitir que a pessoa que está sendo convidada a participar de um projeto de pesquisa compreenda os procedimentos, riscos, desconfortos, benefícios e direitos envolvidos, visando permitir uma decisão autônoma (GOLDIM et al., 2003).

A pesquisa foi submetida à aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP/USP (Ofício nº 32/2012 de 17/05/12) (Anexo 2) e a coordenação do Sanatório Espírita São Vicente de Paula (Anexo 3), que é a entidade responsável pelo Centro de Atenção Psicossocial Álcool e Drogas (CAPS – AD), local onde ocorreu a coleta de dados e de amostras. As coletas se iniciaram no mês de maio (2012), após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP e da Coordenação do Sanatório Espírita São Vicente de Paula, e foram finalizadas no mês de setembro (2014), após a obtenção de 100 amostras.

3.1. Local do estudo

Os voluntários participantes da pesquisa eram atendidos pelo Centro de Atenção Psicossocial Álcool e Drogas (CAPS - AD) na cidade de Ribeirão Preto, São Paulo. O CAPS – AD foi criado no Sanatório Espírita São Vicente de Paula, em 1996, em parceria com a Prefeitura Municipal de Ribeirão Preto, em razão da necessidade de um serviço especializado e de referência em Saúde Mental na cidade de Ribeirão Preto. É conveniado ao Sistema Único de Saúde (SUS) e integra a rede de atendimento à saúde do município. Oferece atendimento especializado ambulatorial ou em regime de semi-internação para alcoolistas e/ou dependentes de drogas, maiores de 18 anos e de ambos os sexos. Possui uma equipe multidisciplinar, com atendimento médico-psiquiátrico, psicológico, de enfermagem, de assistência social e de terapia ocupacional.

3.2. Critérios de inclusão e exclusão da pesquisa

Os critérios de inclusão considerados foram: indivíduos de ambos os sexos, maiores de dezoito anos, alfabetizados, de qualquer nível sócio-econômico, usuários

de drogas ilícitas, que aceitassem participar do estudo, assinassem o Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE - Apêndice A) e respondessem às perguntas dos instrumentos de avaliação psiquiátrica. Eles ainda deveriam fornecer uma amostra de urina para realização de um teste rápido de triagem de drogas (cocaína/thc/anfetamina). Os critérios de exclusão foram: voluntários em estado de saúde grave, com risco de vida, confusão mental e que não tinham cabelo em quantidade suficiente para realização de uma coleta sem danos estéticos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

Os padrões analíticos certificados utilizados foram: tetrahydrocannabinol (THC), canabidiol (CBD) e tetrahydrocannabinol-d3 (THC – d3), todos obtidos da *Cerilliant* (EUA). Os reagentes utilizados foram: metanol, acetonitrila, diclorometano e acetato de etila da JT Baker (EUA); reagente N-metil-N-(trimetilsilil)-acetamida (MSTFA) da Sigma-Aldrich (EUA). Foram utilizadas ponteiras DPX, de fase reversa (RP) da Gerstel (EUA). Os testes imunoenzimáticos (*Rapid Drug Screen*) foram comprados da *American Bio Medical Corporation* (São Paulo).

4.2. Equipamentos e acessórios

Para a análise das amostras de cabelo, foi utilizado um cromatógrafo em fase gasosa GC 7890 acoplado a um espectrômetro de massas, modelo 5975C, ambos da empresa Agilent (EUA), com um amostrador automático Agilent 7693; Coluna capilar de sílica fundida DB – 5MS (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro x 0,25 µm de espessura de filme) da J & W Scientific (EUA); Cilindro de gás hélio 5.0 analítico da White Martins (Brasil); Seringas de injeção cromatográfica Hamilton (EUA). Centrífuga Universal 32 Hettich (Alemanha); Concentrador de Amostras Caliper *LifeScience Turbo Vap* LP (EUA); Banho seco TE – 021, Tecnal (Brasil); Agitador TE – 140, Tecnal (Brasil); Vórtex AP – 56 da Phoenix (Brasil); Deionizador de água *Simplicity* da Millipore (EUA) e Balança analítica BP211D da Sartorius (Alemanha).

As condições cromatográficas foram: temperatura do injetor igual a 270°C; o fluxo de gás hélio utilizado foi 1 mL/min e a rampa de aquecimento do forno iniciou em 90°C, com aquecimento a 25°C/min até 200°C e, por fim, aquecimento a 30°C/min até 300°C. As temperaturas do quadrupolo e da fonte foram iguais a 150°C e 230°C, respectivamente.

4.3. Preparação de soluções e reagentes

4.3.1. Preparação das soluções padrão de calibradores, controle de qualidade e padrão interno

Para preparação das soluções padrão de calibradores e controle de qualidade, ampolas dos padrões analíticos de THC e CBD, na concentração inicial de 1 mg/mL, foram diluídas para concentrações de 10 µg/mL, 1 µg/mL e 0,1 µg/mL em metanol. A solução de padrão interno (THC-d3) foi preparada na concentração de 1 µg/mL. Todas as soluções de padrão e padrão interno preparadas foram armazenadas na geladeira (2 – 8°C), em frascos com tampa rosqueável e envolvidos por papel alumínio, para proteção contra luz.

4.3.2. Preparação dos reagentes

4.3.2.1. Preparação do tampão fosfato pH 9 (0,1 M)

Preparou-se uma solução 0,1 M de fosfato de potássio monobásico (34 g KH_2PO_4 /litro água). Em seguida, o pH foi ajustado a 9,0 com uma solução 0,1 M de fosfato de sódio dibásico (35,5 g Na_2HPO_4 /L de água).

4.4. MÉTODO

4.4.1. Coleta de amostras de cabelo e urina

O cabelo dos voluntários usuários de drogas que frequentavam o CAPS – AD de Ribeirão Preto foi coletado da região posterior da cabeça, o mais próximo possível do couro cabeludo (Figura 9). Ele foi medido (cm), colocado em um envelope plástico, marcando-se a região proximal e distal do cabelo em relação ao couro cabeludo, identificado com o nome e número do voluntário e armazenado a

temperatura ambiente, em local seco e escuro, até o momento da descontaminação e preparo. As amostras que apresentavam comprimento superior a 6 cm, foram divididas em 2 ou mais porções, dependendo do tamanho do cabelo, e somente as 2 porções mais próximas ao couro cabeludo foram analisadas. Elas foram nomeadas porção proximal (primeiros 6 cm) e distal (demais 6 cm da porção proximal) ao couro cabeludo. Isso permitiu avaliar o consumo de drogas nos últimos 12 meses.

Figura 9 - Coleta da amostra de cabelo

As amostras de urina foram coletadas em tubo coletor universal de urina, e submetidas a um teste rápido de triagem para detecção de drogas (*Rapid Drug Screen* – figura 10). Esse teste avaliou a presença de THC, cocaína e anfetamina, de acordo com os valores de *cut off* estabelecidos pelo fabricante: 50 ng/mL, 300 ng/mL e 1000 ng/mL, respectivamente. Elas foram identificadas e armazenadas em freezer a -20°C , pois o teste foi realizado após a coleta de todas as amostras.

Figura 10 - Testes imunoenzimáticos utilizados para *screening* de THC, COC e ANF nas amostras de urina

4.4.2. Método para detecção de canabinóides em cabelo

O método foi desenvolvido para detecção dos principais canabinóides no cabelo: Δ^9 – tetrahydrocannabinol (Δ^9 - THC) e o canabidiol (CBD). Δ^9 – tetrahydrocannabinol-d3 (THC-d3) foi utilizado como padrão interno.

Inicialmente, foi realizado o processo de descontaminação das amostras de cabelo, conforme utilizado por Alves et al. (2013). As mesmas foram colocadas em um tubo de ensaio, onde adicionou-se 3 mL de diclorometano, seguido de agitação em vórtex por 30 s e descarte do solvente. Em seguida, adicionou-se 3 mL de metanol, agitação 30 s em vórtex, separação e armazenamento do solvente em freezer a -20°C , para posterior análise, se necessário diferenciar contaminação externa. Os tubos contendo apenas o cabelo foram colocados no evaporador de amostras por 15 min a 40°C , para total evaporação do solvente.

Em seguida, as amostras de cabelo foram segmentadas, utilizando uma tesoura sem ponta, em comprimentos inferiores a 2 mm, identificadas e armazenadas em *ependorf*, protegidas da luz e da umidade. A quantidade de 20 mg de cabelo foi pesada, colocada em um tubo cônico e adicionado hidróxido de sódio 1 M para hidrólise alcalina. A purificação e concentração do extrato foi realizada com as ponteiras de extração em fase sólida descartáveis DPX (figura 11). O padrão interno (THC-d3) foi utilizado na concentração de 1 ng/mg de cabelo.

Figura 11 - Processo de segmentação do cabelo e as ponteiras DPX

O processo de extração das amostras de cabelo está esquematizado no fluxograma da figura 12.

Figura 12 - Processo de extração do cabelo usando a DPX

4.5. Parâmetros de validação

A validação foi realizada de acordo com os parâmetros estabelecidos no Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, publicado na RDC 27 de 17/05/2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2012) bem como pelo publicado por Peters, Drummer e Musshoff (2007).

4.5.1. Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Na cromatografia, a curva analítica é construída plotando-se os valores de concentração do analito encontrado na amostra pela razão área do padrão/área do padrão interno.

4.5.2. Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma corrida. É determinada utilizando-se, no mínimo 4 concentrações dos controles de qualidade (LIQ, CQB, CQM e CQA), que estejam dentro do intervalo da curva de calibração, realizando-se 5 determinações por concentração. A ANVISA (RDC n. 27) recomenda que os controles de qualidade devem ser calculados seguindo os seguintes critérios:

- Controle de qualidade baixo (CQB): o analito deve ter concentração até 3 vezes o limite inferior de quantificação do método (LIQ);
- Controle de qualidade alto (CQA): o analito deve ter concentração entre 75 e 85% da maior concentração da curva de calibração;
- Controle de qualidade médio (CQM): o analito deve ter concentração próxima à média entre os limites inferior e superior de quantificação.

E ainda considera 2 níveis da precisão:

- *Precisão Intra-Ensaio*: é a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo, com o mesmo analista e mesma instrumentação.
- *Precisão Inter-Ensaio*: é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes.

Pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas, em que o limite inferior de

quantificação deve apresentar valores inferiores a 20% e os demais pontos valores inferiores a 15%. É calculado pela fórmula abaixo:

$$\text{DPR} = (\text{DP}/\text{CMD}) \times 100$$

Onde:

DPR: Desvio padrão relativo

DP: Desvio padrão

CMD: Concentração média determinada

4.5.3. Exatidão

É a proximidade dos resultados obtidos pela metodologia estudada em relação ao valor verdadeiro. É calculada pela fórmula:

$$\text{Exatidão} = (\text{CMD}/\text{CT}) \times 100$$

Onde:

CME: Concentração média experimental

CT: concentração teórica

O parâmetro da exatidão é validado utilizando-se no mínimo 3 corridas diferentes para as 4 concentrações (LIQ, CQB, CBM e CBA) ao longo da faixa de variação da curva de calibração, com no mínimo 5 determinações por concentração. Os valores de exatidão aceitos podem variar de 80 a 120% para o limite inferior de quantificação e de 85 a 115% para os demais pontos.

4.5.4. Limite de quantificação

O limite inferior de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão (até 20%) e exatidão (80 – 120%) aceitáveis, sob as condições experimentais estabelecidas. O limite superior de quantificação é a maior quantidade de analito que pode ser determinada com precisão de até 15% e exatidão entre 85 e 115%.

4.5.5. Recuperação

Mede a eficiência do método em extrair os analitos de uma matriz biológica dentro de um limite de variação. Porcentagens de recuperação do analito e do padrão interno próximas a 100% são desejáveis, embora admita-se valores menores, desde que a metodologia seja precisa, exata. É determinada comparando-se os resultados de quantificação de amostras que foram fortificadas posteriormente à extração, com os resultados de quantificação das amostras que foram fortificadas anteriormente à extração. O padrão interno é adicionado anteriormente à extração nas duas situações, de forma que os resultados de quantificação obtidos possam avaliar a capacidade do solvente de extrair os analitos quando comparados a uma situação que, teoricamente, equivale a 100% de eficiência de extração.

4.5.6. Especificidade

É a capacidade do método em detectar e quantificar com exatidão aceitável um analito em presença de outros componentes, como impurezas, produtos de decomposição, metabólitos, medicamentos e os próprios componentes da matriz biológica. O limite inferior de quantificação não deve estar fora do intervalo de 80-120% quando calculado na presença dos interferentes investigados.

4.5.7. Seletividade

Devem ser analisadas, no mínimo, 6 amostras da matriz biológica de fontes distintas, na concentração do LIQ. Os valores dos resultados devem ser inferiores a 20%.

4.5.8. Carry over

Avalia a influência de uma análise anterior no resultado da análise seguinte, devido à presença de resíduos que possam ficar retidos em componentes do cromatógrafo, como *liner*, injetor, coluna, seringa e detector.

4.5.9. Estabilidade

Permite avaliar a capacidade do analito em resistir às condições exigidas durante a análise em uma dada matriz biológica. A ANVISA recomenda a avaliação de 4 tipos de estabilidade: Estabilidade de curta duração, de longa duração, após ciclos de congelamento e descongelamento e pós-processamento.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise cromatográfica

O método cromatográfico foi desenvolvido a partir do utilizado por Pelicão et al. (2014) e Peres et al. (2014). A temperatura do injetor foi 270°C; o fluxo de gás hélio na coluna foi de 1 mL/min e a rampa de aquecimento da coluna partiu de 90° a 200°C, numa taxa de 25°/min, e alcançou 300°, numa taxa de 30°/min, com tempo de espera de 2 min nessa temperatura. O tempo total da corrida foi 9,73 min. A temperatura do quadrupolo é de 150°C e a da fonte é 230°C. O fator de ganho utilizado foi igual a 8. Nessas condições, obtiveram-se picos cromatográficos bem separados e resolvidos, como pode ser observado na figura 13, onde uma amostra contendo apenas o padrão puro dos analitos foi injetada.

Figura 13 - Cromatograma contendo 25 ng de padrão dos analitos

A figura 14 representa um cromatograma de uma amostra branco. A ANVISA define a amostra branco como uma amostra de matriz processada sem adição de analito e padrão interno (ANVISA, 2012). Essa análise é realizada para avaliar a presença de possíveis interferentes no mesmo tempo de retenção dos analitos estudados (efeito matriz).

Figura 14 - Cromatograma de uma amostra branco

Os íons utilizados para detecção e quantificação do CBD, THC-d3 e THC estão discriminados na tabela 7.

Tabela 7 - Íons de detecção e quantificação

Analitos	Íons de Identificação (m/z)	Íon de Quantificação (m/z)
CBD	301, 337	390
THC-d3	306, 389	374
THC	303, 386	371

CBD = canabidiol; THC-d3 = tetrahidrocanabinol deuterado; THC = tetrahidrocanabinol; m/z = razão massa/carga

5.2. Desenvolvimento e otimização do método

No cabelo, os principais analitos detectados são o Δ^9 - THC (maior proporção), seu metabólito carbóxi-THC (COOH-THC) e o canabidiol (CBD). A escolha dos analitos a serem pesquisados foi realizada a partir de injeções de padrão de THC, COOH-THC e CBD nas condições cromatográficas descritas acima. O sinal cromatográfico obtido para o era muito reduzido comparado ao sinal do THC e CBD. Isso levou a exclusão do COOH-THC do estudo, uma vez que a injeção de concentrações reduzidas desse analito resultava em sinal muito pequeno no cromatograma, e portanto, de difícil detecção. Outro motivo considerado foi o fato do COOH-THC apresentar uma concentração muito reduzida no cabelo, em razão da baixa incorporação desse metabólito na matriz capilar, devido a fatores como a lipofilicidade, à afinidade pela melanina e à permeabilidade da membrana celular (STAUB, 1999).

Após a determinação das condições para a análise cromatográfica e os analitos a serem detectados, iniciou-se os experimentos de preparo da amostra. Como o ambiente é uma via de contaminação externa do cabelo, é importante diferenciar a exposição sistêmica, em que o indivíduo usa a droga, da exposição ambiental (exposição passiva), em que a superfície do cabelo está exposta a pó, poeira e fumaça (principalmente no caso da *Cannabis*). A Sociedade de Testes em Cabelo (SOHT) recomenda a utilização de uma solução a base de água e um

solvente orgânico no processo de descontaminação (COOPER et al., 2011). Utilizou-se o procedimento de lavagem aprendido durante o Doutorado Sanduíche na Itália e já publicado (ALVES et al., 2013), que consiste em um procedimento simples, rápido, eficiente e amplamente utilizado.

O processo de digestão mais utilizado na literatura é a adição de uma solução básica, principalmente hidróxido de sódio, em diferentes molaridades. A solução básica adicionada ao cabelo é aquecida em diferentes temperaturas, o que possibilita a completa dissolução da fibra capilar. Esse procedimento foi escolhido em razão dos canabinóides serem estáveis a condições alcalinas (CIRIMELE et al., 1996; MOORE et al., 2001; MUSSHOF et al., 2002; UHL; SACHS, 2004; VOGLIARDI et al., 2015; WILKINS et al., 1995).

As condições de hidrólise (NaOH 1 M a 90°C/15 min) e derivatização foram escolhidas a partir de testes experimentais e de relatos na literatura (CIRIMELE et al., 1996; DULAURENT et al., 2014; EMÍDEO et al., 2010; GAMBELUNGHE et al., 2005; HAN et al., 2011; NADULSKI; PRAGST, 2007; STRANO-ROSSI et al., 1999).

A dificuldade em se trabalhar com uma quantidade pequena de fase extratora se dá quando há grande quantidade do analito na amostra, uma vez que a capacidade de extração da fase fica reduzida, diminuindo assim o rendimento quando comparado aos cartuchos tradicionais de extração. Entretanto, vale a pena ressaltar que a concentração dos canabinóides encontrada no cabelo é pequena, em razão das propriedades físico-químicas das moléculas, o que possibilitou a escolha das ponteiras DPX como dispositivo para a extração desses analitos sem comprometimento dos resultados da análise.

Os experimentos de extração inicial foram realizados a partir de procedimentos descritos em trabalhos indicados pelo fabricante das ponteiras (Gerstel). Os solventes de condicionamento, lavagem e eluição foram utilizados conforme experimentos de Foster et al. (2008 e 2013). Alternativamente foram testados outros solventes para o condicionamento das ponteiras como o metanol, ACN, água e tampão fosfato pH 6. Observou-se que a acetona era o solvente que mais interagiu com a fase extratora da ponteira, sendo também utilizado nos experimentos do fabricante das ponteiras. Para a lavagem, os solventes testados foram água e ACN em diferentes proporções (10%, 20% e 50%), somente ACN,

ácido acético e metanol e somente metanol. Quanto maior a proporção de acetonitrila na água, maior a eluição dos analitos na solução de lavagem, assim como na lavagem só com ACN, metanol e metanol + ácido acético.

Os solventes para eluição dos analitos foram escolhidos a partir de testes com metanol, acetona, hexano, hexano + acetato de etila (diferentes proporções), cloro-butano e o solvente escolhido, diclorometano. O solvente que melhor homogeneizava a fase extratora dentro da ponteira era a acetona. Entretanto, ela provocou o descolamento do filtro da ponteira, na maioria das amostras, fazendo com que a fase fosse eluída juntamente com o solvente. Os demais solventes apresentaram rendimentos de extração inferiores quando comparados ao diclorometano.

5.3. Validação do método

Apesar do esforço em obter uma extração limpa e com maior rendimento na recuperação dos analitos, não foi possível finalizar a determinação da totalidade dos parâmetros de validação preconizados pela ANVISA. Tal fato ocorreu devido problemas e atrasos na importação das ponteiras DPX, aliado aos problemas de funcionamentos dos equipamentos no laboratório, atrasando sobremaneira a finalização do processo de validação. Os parâmetros obtidos estão abaixo descritos e os demais serão finalizados após a defesa para publicação.

5.3.1. Linearidade e LIQ

Após a otimização da metodologia, foi construída uma curva de calibração para cada analito com 6 concentrações diferentes (expressa em ng de analito/mg de cabelo): 0,50; 1,25; 2,50; 5,0; 12,5 e 25 ng/mg para o CBD e 0,10; 0,50; 1,25; 2,50; 5,0 e 12,5 ng/mg para o THC . O limite inferior de quantificação (LIQ) e os controles de qualidade baixo, médio e alto (CQB, CQM e CQA) foram calculados e suas concentrações (ng/mg de cabelo) estão expressas na tabela 8:

Tabela 8 - Valores de concentração dos controles de qualidade (ng/mg) para o canabidiol (CBD) e o THC

Analitos	LIQ	CQB	CQM	CQA
CBD	0,5	1,5	12,5	20,0
THC	0,1	0,3	5,0	10,0

Apesar da ANVISA recomendar a utilização de um controle de qualidade de diluição, como a concentração dos analitos encontrada no cabelo é muito pequena, julgamos desnecessário o cálculo do mesmo. O padrão interno (THC-d3) foi utilizado na concentração de 1 ng/mg de cabelo para todas os pontos da curva de calibração, amostras e controles de qualidade. Na curva de calibração, aplicou-se métodos estatísticos de regressão linear e o fator de ponderação 1/x. As figuras 15 e 16 apresentam as curvas de calibração para o CBD e THC, respectivamente.

Figura 15 - Curva de calibração para o CBD

Figura 16 - Curva de calibração para o THC

Os experimentos para o cálculo dos demais parâmetros serão realizados assim que possível e apresentados na forma de publicação científica.

5.4. Análise imunoenzimática das amostras de urina

Os resultados obtidos para a triagem das amostras de urina estão descritos na tabela 10.

Tabela 10 - Resultado do teste imunoenzimático das amostras de urina

Nº	Resultado	Nº	Resultado	Nº	Resultado
1	THC	36	COC	71	COC
2	NEGATIVO	37	THC	72	THC
3	NEGATIVO	38	THC + COC	73	NEGATIVO
4	NEGATIVO	39	THC	74	NEGATIVO
5	THC + COC	40	NEGATIVO	75	THC + COC
6	NEGATIVO	41	THC	76	THC
7	NEGATIVO	42	THC + COC	77	SEM AMOSTRA
8	NEGATIVO	43	THC + COC	78	THC + COC
9	COC	44	THC + COC	79	SEM AMOSTRA
10	COC	45	NEGATIVO	80	THC
11	COC	46	THC + COC	81	SEM AMOSTRA
12	SEM AMOSTRA	47	THC	82	THC + COC
13	COC	48	THC + COC	83	SEM AMOSTRA
14	NEGATIVO	49	THC + COC	84	COC
15	THC	50	THC + COC	85	THC + COC
16	NEGATIVO	51	THC + COC	86	THC + COC
17	COC	52	COC	87	THC + COC
18	INSUFICIENTE	53	THC + COC	88	THC + COC
19	NEGATIVO	54	THC + COC	89	THC + COC
20	NEGATIVO	55	NEGATIVO	90	THC + COC
21	NEGATIVO	56	THC + COC	91	THC + COC
22	THC	57	THC + COC	92	THC
23	COC	58	THC + COC	93	THC
24	THC	59	THC + COC	94	THC + COC
25	THC + COC	60	NEGATIVO	95	THC + COC
26	NEGATIVO	61	THC	96	THC + COC
27	THC + COC	62	NEGATIVO	97	SEM AMOSTRA
28	THC + COC	63	THC	98	THC + COC
29	THC	64	COC	99	THC + COC
30	THC + COC	65	THC	100	THC + COC
31	NEGATIVO	66	NEGATIVO		
32	COC	67	NEGATIVO		
33	THC + COC	68	NEGATIVO		
34	THC	69	COC		
35	THC + COC	70	COC		

COC = cocaína; THC = tetrahydrocannabinol.

Como podemos observar na tabela 10, 7 indivíduos não forneceram amostra ou a mesma foi insuficiente para a realização do teste, por variadas razões (infecção urinária, mulheres menstruadas ou simplesmente se negaram a fornecer a amostra no final da entrevista). 23 voluntários apresentaram resultado negativo para triagem

das drogas; 18 apresentaram resultado positivo apenas para o THC; 14 apenas para cocaína e 38 para THC + COC. Pela triagem da amostra, já podemos observar que a população do estudo é usuária de múltiplas drogas. Dentre os usuários de cocaína, também estão considerados os usuários de crack. Nenhuma amostra foi positiva para anfetamina, mas no Questionário da pesquisa, muitos sujeitos reportaram já ter feito o uso da mesma. Esses resultados serão relacionados com os achados nas amostras de cabelo no capítulo 3.

CAPÍTULO 3
CORRELAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE
CANABINÓIDES E COCAÍNICOS ENCONTRADA
NO CABELO COM INCIDÊNCIA DE SINTOMAS
PSIQUIÁTRICOS

1. INTRODUÇÃO

1.1. Drogas de abuso e sintomas psiquiátricos

Muitos diagnósticos em medicina são baseados na combinação de sintomas, a duração destes e o limite acima do qual a síndrome é reconhecida como clinicamente relevante. Um indicador único não é suficiente para estabelecer um diagnóstico preciso, pois um sintoma raramente é exclusivo de uma doença específica. A psiquiatria é especialmente vulnerável a não-especificidade dos sintomas, além da ausência de testes biológicos sensíveis e específicos o suficiente para estabelecer um diagnóstico. A problemática do processo de diagnóstico aumenta quase exponencialmente quando transtornos devido ao uso de substâncias e síndromes psiquiátricas ocorrem concomitantemente (SCHUCKIT, 2006).

Pela definição do NIDA (2010), comorbidade é a “ocorrência de duas ou mais desordens ou doenças na mesma pessoa, simultaneamente ou sequencialmente”. A comorbidade implica também em interação entre ambas as doenças, sendo que uma afeta o curso e o prognóstico da outra. A comorbidade é um fenômeno multicausal, multidimensional e multifacetada em Medicina. Embora os estudos epidemiológicos apontem uma alta prevalência de comorbidade entre transtornos somáticos e psiquiátricos, ela ainda é subreconhecida e pouco tratada. Existem muitas questões sem resposta relacionadas à comorbidade como, por exemplo, a ligação entre os processos somáticos e psicológicos, quais fatores estão envolvidos na manifestação bidirecional e como tratar os transtornos envolvidos. Um conceito utilizado na interpretação do desenvolvimento da comorbidade de transtornos somáticos e psiquiátricos é a de substratos biológicos idênticos. A formação desses substratos é influenciada por fatores de risco, os quais dependem ou não do indivíduo (fatores estressores X fatores genéticos). Os efeitos dos fatores de risco e dos substratos biológicos são paralelos, mas um deles é o agente dominante (KOVACS, 2014).

Para explicar a comorbidade entre as desordens causadas pelo abuso de drogas e os distúrbios psiquiátricos, é necessário reconhecer que o abuso de drogas é também um distúrbio mental, caracterizado pela compulsão, pelo incontrolável desejo de consumo, busca e uso da droga, apesar das consequências devastadoras. Esse comportamento é resultado de vários fatores, dentre eles, as

alterações na estrutura e funções cerebrais, em algumas das mesmas áreas onde ocorrem as alterações responsáveis pelos distúrbios mentais, como a depressão, ansiedade ou esquizofrenia (NIDA, 2010).

A alta prevalência de comorbidade entre o uso de drogas e os transtornos mentais não significa que um é a causa do outro, mesmo quando um ocorre cronologicamente primeiro. É difícil estabelecer a causalidade ou a direção desse processo. O diagnóstico do transtorno mental pode não ocorrer até que os sintomas progridam a um nível específico (classificação DSM ou CID-10). Entretanto, sintomas subclínicos podem levar ao uso da droga e isso pode gerar confusão a respeito de qual transtorno começou inicialmente (NIDA, 2010).

Todos os cenários abaixo podem contribuir, em diferentes proporções, para explicar como e porque essa comorbidade comumente acontece (NIDA, 2010):

1. As drogas de abuso podem levar os usuários a experimentar um ou mais sintomas dos transtornos mentais. O elevado risco de psicose em usuários de *Cannabis* é uma evidência dessa possibilidade;
2. Os transtornos mentais podem levar ao abuso de droga. Os sujeitos com transtornos mentais graves, leves ou até mesmo subclínicos podem usar as drogas de abuso como forma de auto-medicação;
3. Fatores comuns como a sobreposição de fatores ambientais, como o estresse, traumas ou exposição precoce às drogas podem levar a adicção e ao desenvolvimento de transtornos mentais, particularmente nos sujeitos que apresentam vulnerabilidades genéticas.

A co-ocorrência de áreas do cérebro envolvidas em ambos os transtornos sugere que alterações cerebrais decorrentes de um podem afetar o outro. Por exemplo, o uso de drogas que precede o primeiro sintoma de um transtorno mental pode produzir alterações na função e estrutura do cérebro que ativa uma propensão de desenvolver o transtorno mental. Se o distúrbio mental se desenvolve primeiro, alterações associadas na atividade cerebral podem aumentar a vulnerabilidade ao abuso de drogas, pelo aumento dos seus efeitos positivos, redução da consciência dos efeitos negativos ou aliviando os efeitos desagradáveis associados ao transtorno mental ou a medicação utilizada para tratá-lo (NIDA, 2010).

A presença de distúrbios psiquiátricos pode comprometer a eficácia da intervenção terapêutica junto aos usuários de drogas. De acordo com Silveira e Jorge (1999), “independentemente dos transtornos associados serem anteriores ou posteriores à instalação da dependência às drogas, a detecção precoce desses quadros psicopatológicos contribui para uma maior eficácia terapêutica, além de diminuir os índices de recaída”.

No Brasil, o atendimento aos usuários de drogas está disponível a população gratuitamente através do Sistema Único de Saúde (SUS). O tratamento é oferecido em centros de atenção psicossocial (CAPS) especializados em álcool e drogas de abuso, clínicas privadas e hospitais especializados. Os pacientes são referenciados a estes diferentes centros de acordo com o grau de dependência (FALLER et al., 2014).

1.1.1. Canabinóides e sintomas psiquiátricos

A associação entre a *Cannabis sativa* e condições psicopatológicas existe desde a era antes de Cristo (ZUARDI et al., 2006). Entretanto, enquanto a relação entre uso de *Cannabis* e a psicose despertava demasiado interesse científico, a associação entre *Cannabis* e outros transtornos psiquiátricos, particularmente a ansiedade, eram pouco estudadas. Uma possível razão seria o fato de que pacientes com sintomas de ansiedade associados ao uso de *Cannabis* não atraem muita atenção do serviço clínico comparado àqueles que possuem sintomas psicóticos (CRIPPA et al., 2009).

A partir dos anos 60, o uso recreativo da *Cannabis* alastrou-se rapidamente nas faixas jovens da população em todo mundo Ocidental. Esse crescimento espantoso no consumo da planta, aliado ao aumento da sua importância social e do melhor conhecimento de sua composição química, contribuíram para o enorme aumento do interesse científico pela *Cannabis* a partir de 1965 (ZUARDI, 2008).

Após a identificação do Δ^9 -THC na década de 60 e da descoberta do sistema endocanabinóide na década de 90, ocorreu um crescimento no número de estudos que focavam no envolvimento desse sistema em algumas desordens psiquiátricas, tais como a esquizofrenia, o transtorno bipolar afetivo, a depressão maior e a

ansiedade. Vários estudos epidemiológicos indicam que pessoas com distúrbios mentais severos são mais propensas ao uso, abuso e dependência de substâncias psicoativas, especialmente a *Cannabis*, comparadas a população em geral. As taxas de prevalência de abuso de *Cannabis* são maiores que 10,1% em pessoas com esquizofrenia; 14,5% entre os pacientes com episódios maníacos; 4,1% na depressão maior; 4,3% nas desordens de pânico e 2,4% em pacientes com fobia. A associação entre abuso de *Cannabis* por pacientes com desordens psiquiátricas é reconhecida como um fator de risco independente para a ocorrência de episódios agudos de psicose, prejuízos cognitivos, distúrbios no comportamento, exacerbação de sintomas e eventos negativos no curso da doença (DIEHL et al., 2010).

A *Cannabis sativa* contém aproximadamente 70 componentes químicos que são únicos da planta e são denominados canabinóides (ELSOHLY; SLADE, 2005). O principal composto psicoativo é o Δ^9 – tetraidrocanabinol (Δ^9 - THC), dependendo da dose, pode produzir efeitos ansiogênicos e efeitos do tipo psicóticos, mesmo em indivíduos saudáveis. Contrariamente, o canabidiol (CBD), outro importante constituinte da *Cannabis*, parece apresentar propriedades antipsicóticas, ansiolíticas e atividade neuroprotetora em humanos (MORGAN et al., 2010, 2012). A razão entre os níveis de THC/CBD na planta varia bastante, em função de variáveis como condições climáticas e do solo, parte da planta que foi consumida (o caule possui maior concentração de CBD enquanto folhas e flores possuem mais THC) entre outros fatores (CRIPPA et al., 2009).

A *Cannabis* pode causar um episódio agudo e de curta duração de ansiedade nos usuários esporádicos, o qual freqüentemente é similar a um ataque de pânico. Quando administrada em altas doses, pode causar intensa sensação de medo e ansiedade. Aproximadamente 20-30% de seus usuários apresentam rápidas reações de ansiedade aguda após fumar a droga. Estes sintomas ocorrem usualmente em indivíduos que estão utilizando a droga pela primeira vez ou quando encaram situações novas ou estressantes (CRIPPA et al., 2009).

Além dos efeitos ansiogênicos e psicóticos causados pela *Cannabis*, sabe-se que ela pode aumentar a probabilidade do usuário desenvolver episódios de transtornos do humor (SANCHES; MARQUES, 2010). A depressão não tratada está associada a altas taxas de mortalidade e aumento no uso dos serviços de saúde,

sendo considerada um problema de saúde pública pouco reconhecido e subdiagnosticado (OSÓRIO et al., 2009).

Estudos sugerem que existe uma relação entre o uso de Cannabis e a incidência de psicose (MORGAN et al., 2010). Atualmente, não existe dúvida de que a intoxicação por *Cannabis sativa* provoque ou desencadeie episódios breves de sintomas psicóticos e que também promove exacerbação de curta duração ou recorrência de sintomas psicóticos pré-existentes. A psicose aguda induzida por *Cannabis* normalmente ocorre logo após o uso da droga e cursa com delírios persecutórios e de ciúmes, ansiedade, labilidade emocional, despersonalização e amnésia em relação ao episódio. Alucinações são raras, mas podem ocorrer quando se atinge elevados níveis plasmáticos. Em geral, os quadros remitem dentro de um dia, mas alguns casos podem durar mais tempo. A dúvida que ainda persiste é o quanto do uso de *Cannabis* pode provocar uma psicose específica diferente de outras psicoses ainda induzidas por drogas (HALLAK et al., 2008).

A razão entre os níveis de THC e CBD na planta varia bastante, em função de fatores como condições climáticas e do solo, parte da planta que foi consumida (o caule possui maior concentração de CBD enquanto folhas e flores possuem mais THC) entre outros (CRIPPA et al., 2009). Essa relação THC/CBD tem sido determinada em diferentes matrizes biológicas e utilizada em estudos que medem a incidência de distúrbios como a psicose, a depressão e a ansiedade (MORGAN et al., 2010, 2012; MORGAN; CURRAN, 2008).

1.1.2. Cocaínicos e sintomas psiquiátricos

A cocaína aumenta o estado de alerta, as sensações de bem-estar, competência e euforia, a energia e a atividade motora. Porém, podem acontecer também sensações indesejáveis para o usuário, como paranóia, ansiedade, inquietação, convulsão e arritmias nos casos de intoxicação aguda. Os sintomas de uso crônico incluem rinite, suor frio, tremores, comportamento violento, percepção distorcida e distúrbios psiquiátricos (ISENSCHMID, 1999).

A esquizofrenia é um transtorno psiquiátrico que afeta igualmente homens e mulheres. Entretanto, a prevalência da comorbidade desse transtorno com uso de

drogas é maior em indivíduos do sexo masculino. O uso concomitante de álcool e cocaína está associado a maior número de internações em hospitais psiquiátricos em esquizofrênicos. Usuários de cocaína que fazem uso abusivo de álcool apresentam maiores índices de psicose induzida pela cocaína, depressão, menor adesão ao tratamento e maior risco de suicídio (AZEVEDO et al., 2012).

1.2. Instrumentos ou escalas de avaliação psiquiátrica

Segundo relatório da Organização Mundial da Saúde, são necessárias mais pesquisas que avaliem os aspectos biológicos e psicossociais da saúde mental, com intuito de aumentar o entendimento das desordens mentais e desenvolver intervenções mais efetivas. Tais pesquisas devem ser realizadas em uma ampla base internacional para compreender as variações entre as comunidades e saber mais sobre os fatores que influenciam a causa, o curso e a evolução dos transtornos mentais. Esse tipo de investigação é uma necessidade urgente nos países em desenvolvimento, uma vez que os dados nesses países são escassos (WHO, 2001).

Os transtornos mentais representam aproximadamente 13% da sobrecarga de doenças no mundo. Nos centros de atendimento primário, de 25 a 50% dos pacientes que procuram atendimento têm pelo menos um transtorno psiquiátrico ou neurológico. A não detecção pode ocorrer em até 55% dos casos para diagnóstico de depressão e 77% para transtorno de ansiedade social, dentre a porcentagem acima (GONÇALVES et al., 2008).

Diante desse contexto, a utilização de instrumentos de rastreamento psiquiátricos, que sejam de fácil aplicação e baixo custo são uma alternativa viável e de grande relevância para o emprego em larga escala na prática clínica e principalmente nos estudos de epidemiologia psiquiátrica. Esses instrumentos de rastreamento não necessitam que o aplicador seja um profissional da área médica ou psiquiátrica, podendo ser treinado de forma individual e com custo reduzido. Os instrumentos de rastreamento configuram-se uma valiosa ferramenta para estudos de prevalência psiquiátrica, estudos estes de grande necessidade e importância para o nosso país (GONÇALVES et al., 2008).

É aconselhável a utilização de versões do instrumento devidamente validadas em culturas diferentes, ao invés de desenvolver um novo em cada país que realizar

o mesmo tipo de investigação. Entretanto, é importante a tradução e adaptação cultural do instrumento, que deve buscar equivalências em relação ao original como a semântica, a técnica, o conteúdo e os critérios e conceitos (DUARTE; BORDIN, 2000).

2. OBJETIVOS

Os objetivos principais do trabalho foram:

- Identificar e quantificar a presença de canabinóides e cocaínicos nas amostras de cabelo;
- Relacionar as concentrações das drogas encontradas no cabelo com os indicadores positivos para os sintomas psiquiátricos apontados pelos instrumentos de avaliação;

Os objetivos específicos foram:

- Estimar a porcentagem de THC e CBD presente em amostras de planta de *Cannabis*;
- Traçar o perfil dos sujeitos que buscam atendimento no CAPS – AD de Ribeirão Preto;
- Traçar o perfil dos usuários de *Cannabis* atendidos no CAPS – AD de Ribeirão Preto;
- Estimar a prevalência de transtornos de ansiedade e depressão na população estudada, através das escalas de rastreamento para transtornos psiquiátricos.

3. CASUÍSTICA

O número total de sujeitos entrevistados foi igual a 100. Os critérios de inclusão e exclusão, bem como o local do estudo já foram citados na Casuística do capítulo 2.

3.1. Entrevistas

Os sujeitos da pesquisa foram recrutados após o primeiro atendimento individual (triagem) realizado pelo profissional de enfermagem ou psicologia, ou após participarem do grupo de acolhimento, para aqueles sujeitos que não estavam matriculados no programa do CAPS – AD. Já para aqueles que estavam em regime de semi-internação no CAPS, o recrutamento foi realizado durante as atividades terapêuticas. As entrevistas não comprometiam a rotina do serviço bem como não atrapalhavam a participação dos sujeitos nas atividades do programa. Elas foram realizadas pelo próprio pesquisador, face-a-face. Após esclarecimento sobre os objetivos da pesquisa, o sujeito era convidado a participar do estudo. Caso aceitasse participar, era conduzido a um local reservado (uma sala cedida pelos funcionários do CAPS – AD), onde assinava o TCLE e respondia as perguntas dos instrumentos de avaliação psiquiátrica feitas pelo entrevistador. Cada entrevista durava entre 45 a 90 min, dependendo do voluntário. Ao final, o entrevistado fornecia uma amostra de cabelo e urina.

3.2. Escalas de avaliação psiquiátrica e critérios de classificação

As seguintes escalas foram utilizadas na pesquisa para a avaliação dos sintomas psiquiátricos: *Self Report Questionnaire* (HARDING et al. 1980, 1983), Inventário de Depressão de Beck (BECK et al., 1961), *Patient Health Questionnaire 9* (KROENKE; SPITZER; WILLIAMS, 2001), Questionário de Ansiedade de Beck (BECK et al., 1988), *Social Phobia Inventory* (CONNOR et al., 2000) e *Cannabis Research Questionnaire* (THOMAS, 1996), bem como um questionário elaborado pelo pesquisador para coleta de dados sociodemográficos, consumo de substâncias e dados sobre a amostra de cabelo. A seguir, será apresentada a composição de cada escala.

3.2.1. *Self Report Questionnaire* (SRQ)

O SRQ foi elaborado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) com intuito de avaliar os distúrbios mentais comuns nos países em desenvolvimento. São considerados transtornos mentais comuns, a ansiedade, a depressão e os transtornos somatoformes (RISAL, 2011). Caracterizam-se por sintomas não-

psicóticos como insônia, fadiga, irritabilidade, esquecimento, dificuldade de concentração e queixas somáticas (COSTA; LUDERMIR, 2005).

É um questionário auto-aplicável com escala dicotômica (sim/não), que apresenta 24 itens, sendo que os primeiros possibilitam a detecção de distúrbios não-psicóticos, enquanto os quatro últimos permitem o *screening* de distúrbios psicóticos como alucinações, delírio paranoide e confusão mental (SANTOS et al., 2009, 2010). Utilizou-se a versão CRQ-20, em que apenas os 20 primeiros itens são avaliados. A nota de corte utilizada para este instrumento foi 7, como sugere o estudo de Santos et al. (2010). O instrumento ainda pode ser dividido em quatro subitens que compõem dimensões específicas, identificadas como: fator I – humor ansioso e depressivo; fator II – decréscimo de energia; fator III – sintomas somáticos e fator IV – pensamento depressivo (SANTOS et al., 2009). Esse instrumento foi validado por Mari e Williams (1986) e por Santos et al (2009) (Anexo 4).

3.2.2. Inventário de Depressão de Beck (*Beck Depression Inventory* – BDI)

O BDI foi proposto por Beck et al. em 1961, para medir sintomas de depressão (BECK et al., 1961). É uma escala auto-aplicável, que possui 21 itens que correspondem a categorias de sintomas e atitudes, com quatro afirmações cada um, refletindo um grau crescente de gravidade de depressão (de 0 a 3). Os itens foram escolhidos para avaliar a intensidade da depressão e não para selecionar um tipo particular de depressão. Os 21 sintomas e atitudes são: humor, pessimismo, sensação de incapacidade, falta de satisfação, sentimento de culpa, sensação de punição, auto-antipatia, auto-acusação, desejo suicida, choro, irritabilidade, retraimento social, indecisão, distorção da imagem corporal, inibição no trabalho, distúrbios do sono, fadigabilidade, perda de apetite, perda de peso, preocupações somáticas e perda da libido. O intervalo de valor de corte utilizado foi de 0 a 11 para sintomatologia mínima, 12 a 19 para leve, 20 a 35 para moderada e 36 a 63 para grave (BECK; STEER; GARBIN, 1988). No presente estudo, serão considerados como indicadores clínicos positivos para depressão, os correspondentes à classificação de gravidade moderada e severa. Gorenstein et al. (2011) traduziram e Gomes-Oliveira et al. (2012) validaram esse questionário no Brasil (Anexo 5).

3.2.3. Questionário sobre a saúde do Paciente - 9 (*Patient Health Questionnaire - PHQ-9*)

O PHQ-9 é uma escala para rastrear sinais e sintomas da depressão maior desenvolvida para serviços de cuidados primários à saúde. Possibilita avaliar os sinais e sintomas relatados pelo paciente nas últimas 2 semanas (OSÓRIO et al., 2009). Consiste de 9 itens, sendo que o escore de frequência para cada item varia de 0 a 3, onde 0 significa nenhuma vez, 1 vários dias, 2 mais da metade dos dias e 3 quase todos os dias. A pontuação é construída por meio da somatória dos escores, sendo a pontuação máxima igual a 27. O valor de corte (*cut off*) utilizado para o indicador positivo de sinais e sintomas de depressão maior foi escore igual ou maior que 10, de acordo com estudo realizado por Osório et al. (2009). Utilizou-se a versão traduzida para o português pela Pfizer (Copyright © 2005 Pfizer Inc., New York, NY) e a validação no Brasil foi realizada por Osório et al. (2009) (Anexo 6).

3.2.4. Questionário de Ansiedade de Beck (*Beck Anxiety Inventory – BAI*)

O BAI também foi proposto por Beck et al. em 1988, com objetivo de discriminar de forma confiável sintomas de ansiedade de sintomas depressivos, para fins clínicos e de pesquisa (BECK et al., 1988). Essa escala apresenta 21 itens que avaliam, durante a última semana, a frequência com que os sintomas incomodaram o indivíduo. Cada item possui um escore de frequência que varia de 0 (nada) a 3 (muito forte) e o escore de classificação varia de 0 a 10 para sintomatologia mínima, 11 a 19 para leve, 20 a 30 para moderada e 31 a 63 para grave (OSÓRIO; CRIPPA; LOUREIRO, 2011). No presente estudo, serão considerados como indicadores clínicos positivos para ansiedade, os correspondentes à classificação de gravidade moderada e severa. Foi traduzida e adaptada para o português por Cunha (2001) (Anexo 7).

3.2.5. Inventário de Fobia Social (*Social Phobia Inventory - SPIN*)

O SPIN é um instrumento auto-aplicável utilizado para avaliação simples e rápida das dimensões que definem o Transtorno de Ansiedade Social (TAS): o

medo, a evitação das situações e os sintomas de desconforto fisiológico (sintomas somáticos). O transtorno de ansiedade social é um subtipo de ansiedade e é definido como “um medo acentuado e persistente de situações sociais e de desempenho, as quais o indivíduo enfrenta com grande sofrimento e/ou evita, levando a um consequente prejuízo no seu funcionamento acadêmico, social ou ocupacional” (VILETE et al., 2006). O TAS pode preceder outros sintomas psiquiátricos sendo comum a presença de morbidades como ansiedade, depressão, abuso de drogas, transtornos alimentares e ideação suicida, principalmente em pacientes diagnosticados com TAS generalizado (BURATO, 2009).

O SPIN (Anexo 4) possui 17 itens que representam os problemas que podem ter incomodado o entrevistado na última semana. O escore de frequência para cada item varia de 0 a 4, sendo 0 nada, 1 um pouco, 2 moderadamente, 3 bastante e 4 extremamente. O escore máximo total é de 68 pontos e a pontuação igual ou maior que 19 foram consideradas como indicativo de transtorno de ansiedade, de acordo com o estudo de Osório, Crippa e Loureiro (2009), que traduziram e adaptaram para o português esse instrumento (Anexo 8).

3.2.6. Questionário sobre uso da *Cannabis* (*Cannabis Research Questionnaire – CRQ*)

O CRQ foi desenvolvido por Thomas (1996) para estimar a prevalência de problemas associados ao uso da *Cannabis* em uma população geral. É um questionário auto-aplicável, composto por 25 questões, que apresenta uma parte introdutória, onde devem ser preenchidas informações demográficas e sobre histórico e frequência de uso da *Cannabis*. Em seguida, as outras questões abordam efeitos na saúde física e mental, problemas em controlar a quantidade e a frequência de uso, problema social e nos relacionamentos e opiniões adversas expressas pelas outras pessoas em relação ao uso da *Cannabis* pelo indivíduo. O instrumento ainda não foi validado no Brasil, mas foi utilizado com intuito de gerar um panorama sobre os problemas relacionados ao uso da *Cannabis* na população estudada (Anexo 9).

3.2.7. Questionário da pesquisa

Além desses instrumentos, também foi aplicado um questionário elaborado pelo próprio pesquisador para coleta de dados sociodemográficos, consumo de *Cannabis*, cocaína/*crack* e medicamentos e questões relacionadas ao cabelo, composto por 26 itens (Apêndice B). A cor dos sujeitos foi determinada pelo entrevistador. O estado civil foi reportado agrupando-se os viúvos, separados ou desquitados como solteiros e os amasiados como casados. Para escolaridade, os indivíduos foram agrupados tendo completado ou não o ensino relatado, enquanto que para o estado laboral, os sujeitos afastados do emprego ou aposentados, foram classificados como inativos.

3.3. Análise estatística dos dados

A análise estatística foi realizada a partir da construção de um banco de dados no programa estatístico *Statistical Package for the Social Science* (SPSS) na versão 13.0. Medidas de tendência central (média e mediana) e de dispersão (desvio padrão, valor mínimo e máximo) foram utilizadas para a estatística descritiva dos dados.

Os testes paramétricos utilizados foram o teste t de *Student* e a correlação de Pearson. O teste t de *Student* é utilizado para comparar duas médias provenientes de amostras independentes, que tenham distribuição normal e variâncias iguais (CALLEGARI-JACQUES, 2003). O teste t foi usado para comparar as concentrações médias de *Cannabis*, cocaína e *crack* encontradas no cabelo com os resultados obtidos nas escalas de avaliação psiquiátrica.

O coeficiente de correlação de Pearson (r) é uma medida da intensidade de associação existente entre duas variáveis quantitativas. Pode variar de -1 a $+1$. Valores negativos de r indicam uma correlação do tipo inversa, isto é, quando x aumenta, y em média diminui e vice-versa. Já os valores positivos para r ocorrem quando a correlação é direta, ou seja, x e y variam no mesmo sentido (CALLEGARI-JACQUES, 2003). O teste de correlação de Pearson foi utilizado para demonstrar a

associação entre a concentração de drogas encontradas no cabelo e os indicadores de sintomas psiquiátricos apresentados pelas escalas de avaliação.

Os resultados foram considerados estatisticamente significantes, quando p apresentava valor menor ou igual a 0,05 (5%).

4. MÉTODO

4.1. Análise de cabelo usando LC-MS/MS

A programação inicial era enviar parte das amostras de cabelo para análise de cocaínicos na Itália (5 mg) e a outra parte seria utilizada para análise de canabinóides utilizando o método com a DPX no próprio laboratório. Entretanto, não foi possível a realização de nenhuma das opções. Considerando que a validação do método com a DPX para análise de canabinóides ainda está em desenvolvimento e o custo para envio das amostras para o Laboratório na Itália seria demasiadamente alto comparado ao custo de realizar as análises no Brasil, optou-se por enviar as amostras de cabelo a um laboratório privado especializado em análises em cabelo na cidade de São Paulo (Chromatox[®] Laboratórios). As 100 amostras de cabelo foram enviadas ao Chromatox, já descontaminadas, de acordo com o procedimento descrito por Alves et al. (2013) e pesadas (10 mg). O método utilizado neste laboratório foi validado de acordo com a ISO 17025 e consistia de desintegração da matriz (10 mg), purificação em coluna de fase sólida e injeção em cromatografia em fase líquida acoplada à espectrometria de massas (Agilent: HPLC 1260, triplo quadrupolo Agilent 6420 - coluna Agilent Poroshell 120 SB C18 4.6 x 50 mm (2,7 μ m)). A fase móvel utilizada foi (A) Acetato de amônio 5 mM e 0,01% ácido fórmico e (B) Metanol com 0,01% de ácido fórmico. O tempo total da corrida foi de 11 min. O gradiente de eluição está descrito na tabela 11:

Tabela 11 - Gradiente de eluição dos analitos

Tempo (min)	A (%)	B (%)	Fluxo (ml/min)
0	55	45	0,4
5	5	95	0,4
8	5	95	0,4
8,1	55	45	0,4

Para os canabinóides, foi determinada a concentração de Δ^9 – tetraidrocanabinol (THC), canabinol (CBN) e canabidiol (CBD) enquanto que para os cocaínicos, determinaram-se as concentrações de cocaína (COC); benzoilecgonina (BE) e norcocaína (NCOC), metabólitos da cocaína; éster metilanidroecgonina (EMA), metabólito que permite identificar/diferenciar o uso do *Crack* e do cocaetilenol (CE), produto de biotransformação que indica uso concomitante de cocaína e etanol. Além desses compostos, também foram identificadas a presença de outras substâncias como anfetamina, metanfetamina, metilenodioximetanfetamina (MDMA ou ecstasy) e heroína; benzodiazepínicos (alprazolam, clonazepam, diazepam, lorazepam, nitrazepam, oxazepam e temazepam) e alguns opióides (morfina e codeína).

4.2. Análise qualitativa da planta *Cannabis sativa*

A análise qualitativa de 50 amostras da planta *Cannabis sativa*, apreendidas pela polícia na região de Ribeirão Preto, foi realizada com intuito de avaliar o teor de Δ^9 - THC e CBD presente nas amostras da planta que são comercializadas e consumidas na região. Os extratos foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Exames de Entorpecentes do Núcleo de Perícias Criminalísticas de Ribeirão Preto - SP. O método foi desenvolvido a partir do descrito por Swift et al. (2013) e esquematizado no fluxograma da figura 17.

Figura 17. Método de extração da *Cannabis* planta

O THC-d3 foi utilizado como padrão interno (100 ng). A quantificação foi realizada no laboratório da profa. Dra. Maria Eugênia Queiróz Nasur no departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP – USP), em razão de problemas no equipamento do nosso laboratório. As análises foram realizadas em um GC-MS da Shimadzu (GC - MS QP 2010 Plus). Utilizou-se uma coluna capilar de sílica fundida DB – 5MS (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro x 0,25 µm de espessura de filme). As condições cromatográficas foram as mesmas utilizadas nos experimentos com a DPX. Os pontos da curva de calibração variaram de 20 ng/mL a 2500 ng/mL. As amostras foram quantificadas utilizando o programa Microsoft Excel 2010.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Perfil sócio-demográfico

A faixa etária dos sujeitos incluídos na pesquisa, que buscavam atendimento no CAPS – AD de Ribeirão Preto, variou entre 18 anos e 52 anos, com média de 31

anos. A tabela 12 apresenta os valores, como frequência absoluta, de informações sobre o sexo, cor, estado civil, escolaridade e estado laboral da população estudada.

Tabela 12 - Características sócio-demográficas da população estudada

Características	N (nº sujeitos)
Faixa etária	
18 a 24 anos	23
25 a 34 anos	40
35 anos	37
Sexo	
Masculino	80
Feminino	20
Cor	
Branco	52
Negro	48
Estado civil	
Solteiro	80
Casado	20
Escolaridade	
Ensino fundamental	52
Ensino médio	43
Ensino superior	5
Estado laboral	
Ativo	21
Inativo	79

Dentre os sujeitos do sexo feminino, 14 eram solteiras e 6 casadas; 7 possuíam escolaridade até o ensino fundamental, 11 até o ensino médio e 2 com ensino superior; 13 de cor branca e 7 negras e 3 estavam trabalhando e 17 estavam desempregadas. Dentre os sujeitos do sexo masculino, 66 eram solteiros e 18 casados; 45 possuíam o ensino fundamental, 32 o ensino médio e 3 o ensino superior; 39 de cor branca e 41 de cor negra e 62 sujeitos estavam inativos (desempregados ou em trabalhos temporários) enquanto 18 estavam empregados. A partir desses dados, podemos inferir que o perfil médio dos usuários que procuram atendimento no CAPS – AD é de sujeitos do sexo masculino, branco, solteiro, de baixa escolaridade e desempregado.

Com relação ao sexo, os resultados apresentados estão em acordo com o último Relatório Mundial sobre Drogas, apresentado pelas Nações Unidas (UNDOC, 2014), em que a quantidade de homens que fizeram uso de algum tipo de droga ilícita é de 2 a 3 vezes superior ao de mulheres. E de acordo com o Relatório apresentado em 2012, a razão entre homens e mulheres em tratamento para abuso de *Cannabis* e cocaína na Europa é de 4:1, razão esta também encontrada no estudo. Esse fato pode ser explicado pela escassez de serviços de tratamento e apoio a mulheres usuárias de drogas, bem como pelo preconceito enfrentado por essas mulheres, o que dificulta ainda mais a busca pelo tratamento (UNDOC, 2012).

Comparando os demais dados da tabela 12 com os apresentados para região Sudeste no II Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil, realizado pelo CEBRID em 2005, obtêm-se resultados semelhantes entre os estudos (CARLINI et al., 2006). Nesse levantamento, ocorre predominância de indivíduos caucasóides (60,5%) comparados aos mulatos, negros, asiáticos e índios. A predominância dos sujeitos caucasianos também acontece em razão da porcentagem da população de cor branca na região Sudeste e Sul ser maior que nas demais regiões, de acordo com o último censo do IBGE (IBGE, 2010). Se considerarmos também como solteiros os indivíduos viúvos, desquitados ou separados (54,2%), a porcentagem de sujeitos solteiros é superior ao de casados (45,8%). Em relação à escolaridade, 52,2% dos sujeitos possuem ensino fundamental; 32,1% possuem ensino médio e 15,8% possuem ensino superior.

A taxa de desemprego média no país registrada em 2013 foi de 5,4% e em 2014 foi igual a 4,9% (MARTINS, 2014). Esses valores são bem menores do que os apresentados pelos sujeitos da pesquisa (79%), indicando a gravidade dos problemas relacionados ao uso de drogas de abuso, incluindo a pobreza e o círculo vicioso de desemprego-busca por emprego entre os usuários de drogas (FALLER et al., 2014).

Os dados sóciodemográficos obtidos também estão em acordo com um estudo realizado com adolescentes e jovens adultos matriculados num CAPS – AD em Feira de Santana, Bahia. Constatou-se que, para a população de jovens adultos, a maioria era composta por sujeitos do sexo masculino (88,8%), solteiro (81,9%), com escolaridade entre o ensino fundamental (57,7%) e médio (42,3%) e quase

metade da amostra apresentava sintomas psíquicos relacionados ao uso das substâncias psicoativas (49,4%) (SILVA et al., 2014).

A tabela 13 indica o tipo de droga de abuso utilizada e suas associações, classificadas pelos sujeitos como o motivo que os levaram a buscar atendimento no CAPS – AD.

Tabela 13 - Substâncias utilizadas que motivaram os sujeitos a procurar atendimento no CAPS - AD

Droga utilizada	Nº sujeitos
Cocaína	15
Crack	05
<i>Cannabis</i>	02
Álcool + cocaína	13
Álcool + crack	02
Álcool + <i>Cannabis</i>	01
Cocaína + crack	05
Cocaína + <i>Cannabis</i>	13
Crack + <i>Cannabis</i>	03
Cocaína + crack + <i>Cannabis</i>	08
Álcool + cocaína + <i>Cannabis</i>	11
Álcool + crack + <i>Cannabis</i>	03
Álcool + cocaína + crack	04
Álcool + cocaína + crack + <i>Cannabis</i>	15

No geral, 56 sujeitos reportaram fazer uso da *Cannabis* (THC), 84 de cocaína e 45 de *crack*. O número de usuários que consomem mais de uma droga concomitantemente é superior àqueles que consomem apenas uma droga. De acordo com o relatório publicado pela UNODC (2014), a definição de usuário polidrogas é “o uso de duas ou mais substâncias ao mesmo tempo ou sequencialmente”. Portanto, podemos classificar a população estudada como usuária de várias drogas. Além disso, a mesma se encaixa no modelo em que diferentes substâncias são utilizadas juntas para ter um efeito cumulativo ou complementar, como é o caso de usuários de *Cannabis* e cocaína/*crack*, que geralmente combinam o uso dessas drogas com álcool.

O uso de álcool foi relatado por 71 sujeitos. Ele está associado ao uso de múltiplas drogas, entre elas a cocaína e o crack, tanto em contextos recreativos como no uso intenso dessas substâncias. Geralmente é a primeira droga com efeitos psicoativos e de alteração do comportamento que os jovens consomem. A euforia inicial produzida pelo etanol é um importante facilitador (“gatilho”) para a utilização de outras drogas como a cocaína (AZEVEDO et al., 2012).

Um estudo multicêntrico envolvendo cinco centros de pesquisa especializados, em quatro capitais brasileiras, avaliou as características dos usuários de álcool e drogas que procuram tratamento no SUS, com foco para o grau de dependência e a droga que motivou o sujeito a procurar atendimento. O álcool foi a droga de maior prevalência em todos os locais do estudo, seguido da cocaína/*crack* e da *Cannabis* (FALLER et al., 2014). Esses dados estão em acordo com os dados apresentados acima, em que a cocaína representa a droga mais reportada como o motivo que levam os sujeitos a procurarem atendimento nos centros especializados, desconsiderando a porcentagem de etanol. Uma possível explicação para a quantidade de sujeitos que reportaram uso de álcool ser inferior ao de cocaína no nosso estudo, é que foram incluídos apenas os sujeitos que faziam uso de pelo menos uma droga ilícita.

5.2. Análise de canabinóides e cocaínicos das amostras de cabelo por LC-MS-MS

O resultado das concentrações de canabinóides, cocaínicos e seus metabólitos (ng/mg) encontradas no cabelo está descrito na Tabela 14 (Anexo 10). Essa tabela apresenta todos os valores de concentrações (ng/mg) das substâncias encontradas no cabelo dos sujeitos da pesquisa. A SOHT recomenda a utilização de alguns critérios para classificação da amostra, com intuito de avaliar possível contaminação passiva: determinação de metabólitos das drogas pesquisadas, valores de *cut off* e cálculo da razão metabólito/droga mãe para a cocaína (SOHT, 1997). Todos os critérios foram avaliados, com exceção da análise do metabólito carbóxi-THC para o THC, pois não foi possível a detecção do mesmo com o método utilizado.

As amostras foram classificadas de acordo com os valores de *cut off* estabelecidos pela SOHT (Tabela 15): positivo, se concentração $\geq 0,05$ ng/mg para THC, CBD, BE, EMA e CE. Para COC, positivo se concentração $\geq 0,5$ ng/mg. Todos os resultados para as amostras de cocaína se enquadraram no critério em que a razão de BE/COC $> 0,05$. Esse valor deve ser calculado, uma vez que pode ocorrer formação de BE por hidrólise da COC durante o processo de extração (MONTAGNA, et al., 2000).

Tabela 15 - Classificação de cada analito de acordo com os valores de *cut off* recomendados pela SOHT (2012)

	Canabinóides				Cocaínicos			
	THC	CBD	CBN	COC	BE	EMA	CE	NCOC
Positivo	22	0	17	95	99	31	91	88
Negativo	78	100	83	05	01	69	09	12

THC = tetrahydrocannabinol; CBD = canabidiol; CBN = cannabinol; COC = cocaína; BE = benzoilecgonina; EMA = éster metilandroecgonina; CE = cocaetilo; NCOC = norcocaína

A presença do metabólito BE nas amostras de cabelo indica que 99% das amostras foram positivas para a cocaína, com exceção da amostra número 74, que não apresentou nenhuma droga no cabelo. De acordo com o relato do indivíduo, ele estava há 120 dias sem usar cocaína, e o tamanho do cabelo analisado foi de 3 cm. No estudo realizado por Felli et al. (2005), a cocaína diminuiu em 32% da concentração inicial em aproximadamente três meses após interrupção do consumo da droga e após 9 meses, não foi detectada nenhuma concentração. Esse resultado negativo realça a importância da variabilidade interindividual (diferenças metabólicas) na detecção das drogas no cabelo.

Os analitos CBN e NCOC foram calculados e reportados pelo laboratório que fez as análises no cabelo, mas como eles não possuem relevância para discussão do trabalho, não serão mais citados. A presença do metabólito CE indica que o sujeito fez uso concomitante de cocaína e etanol e o produto de biotransformação EMA, caracteriza/distingue o consumo de crack. Dentre os resultados positivos, as concentrações mínima, máxima e média foram reportadas na tabela 16.

Tabela 16 - Concentrações mínima, máxima e média dos analitos (THC, COC, BE, EMA e CE) encontradas no cabelo

Analitos	Concentração (ng/mg)		
	Mínima	Máxima	Média
THC	0,05	0,60	0,23
COC	0,50	162,10	22,40
BE	0,10	58,30	6,46
EMA	0,30	12,60	2,22
CE	0,10	7,30	0,82

THC = tetrahydrocannabinol; COC = cocaína; BE = benzoilecgonina;
EMA = éster metilanidroecgonina; CE = cocaetileno

Os valores de concentrações encontrados para o THC apresentam similaridades com os encontrados em outros estudos como, por exemplo, Cirimele et al. (1996), em que o THC variou de 0,1 – 0,29 ng/mg (média 0,15 ng/mg); Strano-Rossi e Chiarotti (1999) que variou de 0,1 – 0,7 ng/mg ou de Jurado et al. (1995), que variou de 0,06 – 7,63 ng/mg, com média de 0,5 ng/mg. É difícil comparar valores de concentrações para os canabinóides entre os estudos, uma vez que o teor de THC na planta de *Cannabis* depende de fatores genéticos, do cultivo como clima, solo e da idade da planta (TSUMURA et al., 2012).

A concentração de COC variou de 0,5 – 216,5 ng/mg (média de 12,9 ng/mg); a BE variou de 0,1 – 33,7 ng/mg (média de 3,7 ng/mg); o EMA variou de 0,2 – 2,4 ng/mg (média de 0,6 ng/mg) e CE variou de 0,1 a 10,3 ng/mg (média 1,6 ng/mg) segundo estudo de Kintz et al. (1995); 0,2 – 3080 ng/mg (média 170 ng/mg) para COC, 0 – 45 ng/mg (média 7,3 ng/mg) para EMA e 0 – 54 ng/mg (média 6,4 ng/mg) para CE em Cognard et al. (2005); 0,07 – 71,80 ng/mg para COC e 0,02 – 9,55 para BE em Alves et al. (2013).

Além da variabilidade de concentrações estar ligada ao teor dos analitos na droga “bruta” consumida, outras explicações podem ser apontadas: o estudo não é controlado, ou seja, a droga não é fornecida ao sujeito, logo não é possível controlar a pureza da substância utilizada, a quantidade e a frequência de uso. Além disso, devemos considerar a grande variabilidade interindividual na incorporação das drogas no cabelo (BARROSO et al., 2011), a influência de tratamentos cosméticos

como descolorantes e tinturas e as práticas de higiene do indivíduo (FELLI et al., 2005). Somando-se a esses fatores, o fato da população do estudo ser composta apenas por usuários de drogas e não ser um estudo controlado, não é possível traçar uma relação quantitativa entre a quantidade de droga consumida e a concentração no cabelo.

A tabela 17 apresenta uma comparação entre o auto-relato dos sujeitos e os resultados obtidos nas análises envolvendo as amostras biológicas urina e cabelo.

Tabela 17 - Comparação entre resultados do auto-relato, *screening* na urina e achados no cabelo para cada droga

	Relato I*	Relato II**	Urina	Relato III***	Cabelo
THC	96	62	56	68	22
Cocaína	100	90	52	99	99
Crack	50	39	-	50	31

*Alguma vez na vida; **Últimos 30 dias; ***Últimos 6 meses.

Observou-se no auto-relato que praticamente todos os sujeitos fizeram uso de *Cannabis* (THC) ou cocaína alguma vez na vida. De acordo com a tabela 17, mais de 50% dos sujeitos fizeram uso das drogas no último mês. O auto-relato do uso das substâncias nos últimos 30 dias apresentou concordância com os resultados do *screening* da urina obtidos para o THC. Isso pode ser explicado em razão dos canabinóides serem detectados por até semanas na urina de usuários crônicos (HUESTIS, 1999). Entretanto, para a cocaína, o relato foi muito superior ao exame de *screening* na urina. A janela de detecção da cocaína na urina é de até 3 dias, para uma dose única e de 7 – 16 dias para uso crônico (ISENSCHMID, 1999).

O exame de *screening* da urina não detecta o metabólito que diferencia o uso de cocaína e *crack*. Por isso, ele não pode ser considerado para identificar usuários de *crack*. O auto-relato do consumo nos últimos 6 meses também apresentou resultados maiores que as concentrações encontradas no cabelo para todas as drogas.

Esses resultados podem ser explicados em razão da população e local do estudo. Uma vez que o CAPS – AD é um local onde as pessoas buscam atendimento/tratamento para a dependência química, o relato das substâncias utilizadas é essencial para garantir uma vaga no serviço. E quanto maior a gravidade do caso, maior a urgência do serviço em atender o indivíduo. Isso pode levar o sujeito a “superestimar” o uso da droga com intuito de conseguir uma vaga para a semi-internação no CAPS ou um encaminhamento para alguma clínica de dependentes químicos.

Ledgerwood et al. (2008) conduziram um estudo cujos objetivos eram examinar o grau de concordância entre o auto-relato e a análise em cabelo em uma comunidade masculina de meia-idade (veteranos da Guerra do Vietnã) e identificar possíveis fatores responsáveis pelas discrepâncias entre o auto-relato e o teste em cabelo. Eles foram questionados sobre o uso de drogas de abuso e a análise no cabelo (613 amostras) buscou identificar as seguintes drogas utilizando GC-MS: *Cannabis*, cocaína, opiáceos, fenciclidina e metanfetamina. O histórico de distúrbios psiquiátricos também foi avaliado baseado nos critérios do DSM-IV, incluindo estresse pós-traumático, depressão e personalidade antissocial. Os resultados apontaram, salvo as limitações do estudo, concordância entre o auto-relato e a análise no cabelo. Especificamente para a cocaína, os testes parecem oferecer uma avaliação mais precisa do que o auto-relato e menor para as demais drogas. As variáveis que podem contribuir para as discrepâncias entre o auto-relato e os testes em cabelo encontrados para a cocaína, estatisticamente significantes, foram: idade, tratamento para dependência em regime de internação e ausência de sintomas de personalidade antissocial. Os indivíduos que apresentavam indicadores de personalidade antissocial apresentaram maior consistência no auto-relato comparado aos que não apresentavam o distúrbio.

A maioria dos estudos epidemiológicos avalia a prevalência do uso de drogas através do relato do sujeito. A imprecisão do relato pode subestimar essa prevalência, gerando dados incorretos sobre a real situação do uso de drogas em uma população, e isso pode, conseqüentemente, induzir a tomada de decisões equivocadas pelos serviços de tratamentos e prevenção do uso de drogas (LEDGERWOOD et al., 2008).

A incorporação de ensaios biológicos, entre eles os testes em cabelo, aliado ao relato dos usuários nos levantamentos epidemiológicos de prevalência de drogas seria uma forma de corroborar estes relatos, com objetivo de diminuir a imprecisão desses estudos. Isso poderia colaborar para a geração de políticas públicas de combate às drogas mais eficientes, uma vez que o panorama da situação seria mais fidedigno à realidade. Entretanto, isso certamente elevaria os custos para confecção do estudo. Os trabalhos encontrados na literatura que relatam esse tipo de associação estão focados em amostras populacionais especializadas, em contextos limitados, como presos em penitenciárias (FEUCHT et al., 1994; MIECZKOWSKI et al., 1991), dependentes em programas de tratamento de drogas (MAGURA et al., 1992) ou pacientes obstétricos (KLINE et al., 1997).

5.2.1. Análise de canabidiol em amostras de planta de *Cannabis* apreendidas em Ribeirão Preto

Como pode ser observado na tabela acima, não foram encontrados resultados positivos na análise do cabelo dos sujeitos para o canabidiol. Isso nos levou a um estudo paralelo que foi analisar qualitativamente a proporção de CBD/ Δ^9 - THC em 50 amostras de *Cannabis* planta, apreendidas pela polícia na região de Ribeirão Preto/SP. Os resultados da proporção de CBD/ Δ^9 - THC variaram de 0 a 0,019, com média de $0,003 \pm 0,002$. Dentre as 50 amostras de *Cannabis* planta, analisou-se qualitativamente o teor de Δ^9 - THC e CBD em 12 dessas amostras. O teor de Δ^9 - THC variou de 3,04 a 7,92% enquanto o de CBD variou de 0 a 0,3% (esse é o valor da composição percentual em relação ao peso seco da planta).

No Brasil, o único estudo encontrado que determinou a potência de alguns canabinóides em amostras de *Cannabis sativa* (12 amostras) foi publicado por Takahashi, Zuardi e Karniol em 1977. Eles encontraram que o teor de Δ^9 - THC variou de 0,90 a 6,85% enquanto o de CBD variou de 0 a 0,16%. Comparando com os resultados acima, observa-se um aumento tanto no teor de Δ^9 - THC como no de CBD ao longo dos anos.

O valor nulo encontrado para o CBD nas amostras de cabelo pode ser explicado pelo estudo acima. A concentração desse analito nas amostras de

Cannabis comercializada na região de Ribeirão Preto apresenta teores praticamente nulos. Portanto, a concentração de CBD que atinge a corrente sanguínea quando a *Cannabis* é fumada pode ser muito pequena, e consequentemente, não conseguir ser incorporada no cabelo. Além disso, o teor de canabinóides depende da parte da planta utilizada (10-12% nas flores com pistilo; 1 - 2% nas folhas; 0,1 – 0,3% nos talos; < 0,03% nas raízes – UNDOC, 2009).

Isso também pode ser explicado pelo fato do desenho do estudo não permitir que o teor de THC e CBD sejam previamente determinados. Como o estudo qualitativo acima revelou, a concentração de CBD nas amostras de *Cannabis* comercializadas nas ruas de Ribeirão Preto apresenta concentrações nulas ou muito pequenas. Consequentemente, os sujeitos estão fumando *Cannabis* sem teor de CBD ou um teor praticamente insignificante, o que pode aumentar os efeitos deletérios desta droga.

Com a crescente discussão sobre o uso do Canabidiol no Brasil e a recente reclassificação da ANVISA, em que o CBD deixa de ser uma substância proscrita e passar a ser substância controlada, enquadrada na lista C1 da portaria 344, esses achados no cabelo sugerem que novas pesquisas devem ser realizadas para determinação do teor de THC e CBD presentes na *Cannabis* comercializada no nosso país, uma vez que os estudos que tratam esse assunto são escassos.

Mehmedic et al. (2010) relataram que o teor de THC na planta de *Cannabis* aumentou de 3,4% em 1993 para 8,8% no ano de 2008, enquanto o teor de CBD variou de 0,3 para 0,4% no mesmo período. Esse estudo foi realizado a partir da análise de 46211 amostras de planta apreendidas pela polícia nos Estados Unidos. Um levantamento realizado no Japão, para estimar a potência da *Cannabis* em 1115 plantas apreendidas em diferentes regiões, revelou que a média do teor de THC é de 8,3%. Já o CBD foi encontrado somente em 86 plantas e apresentou um teor médio de 2% (TSUMURA et al., 2012). Já um estudo realizado na Austrália, avaliou o conteúdo de canabinóides presentes em 206 amostras de planta *Cannabis* apreendidas pela polícia tanto em áreas de cultivo como de usuários nas ruas. A porcentagem de THC encontrada variou de 0,08 – 11,98%, com média de 2,52% e mediana de 1,45% e para o CBD variou de 0 – 2,69%, com média de 0,04% e mediana igual a zero (SWIFT et al., 2013). Os valores encontrados para o teor de

THC nas amostras de planta *Cannabis* comercializadas na região de Ribeirão Preto estão em acordo com o encontrado nos Estados Unidos, Japão e Austrália.

Uma vez que o canabidiol usado para fins terapêuticos no nosso país é em forma de extrato, estudos para determinação do teor desses canabinóides na *Cannabis* são de extrema importância.

O uso de *Cannabis* que apresenta alto teor de THC comparado ao de CBD está relacionado a aumento no risco de dependência (MORGAN et al., 2010) e no risco de desenvolver sintomas psicóticos (Di FORTI et al., 2009; SCHUBART et al., 2011). O estudo realizado por Morgan e Curran (2008), utilizando análises em cabelo para determinar a concentração de THC e CBD, observou que o grupo que apresentava somente THC no cabelo apresentou maiores níveis de alucinações e ilusões do que os que possuíam THC + CBD e o grupo que não possuía canabinóides no cabelo. O estudo sugeriu que a utilização de linhagens diferentes de *Cannabis* que apresentassem maior conteúdo de CBD poderia proteger contra os efeitos do tipo psicóticos induzidos pelo THC isoladamente.

Um outro estudo realizado por Morgan et al. (2012) replicou os resultados obtidos em 2008 (MORGAN; CURRAN, 2008), em que o grupo de indivíduos que possuíam CBD no cabelo, comparado ao grupo que não possuía CBD no cabelo, apresentou menos sintomas do tipo-psicóticos. Esse efeito era restrito aos usuários recreacionais com alta concentração de THC no cabelo. Outro achado importante desse estudo foi que a alta concentração de THC no cabelo também foi associada a maiores níveis de depressão e ansiedade, independente da concentração de CBD.

O objetivo inicial do trabalho era analisar as concentrações dos canabinóides no cabelo e dividir em grupos com diferentes composições dos canabinóides (THC e CBD), semelhante ao estudo de Morgan e Curran (2008). Em seguida, esses grupos seriam comparados e correlacionados aos indicadores de sintomas psiquiátricos avaliados nas escalas. Como o resultado do CBD foi zero para todas as amostras, tivemos que relacionar apenas a concentração do THC e sofisticá-lo com a análise da planta *Cannabis* apreendidas pela polícia na região de Ribeirão Preto. Entretanto, relacionamos também a concentração de cocaína e crack, drogas mais consumidas que a *Cannabis* na população estudada, com as escalas de avaliação.

5.3. Análise das variáveis ligadas ao cabelo

O tamanho do cabelo foi medido para todas as amostras e variou entre 1 e 54 cm, sendo que a maioria (70% das amostras) apresentou comprimento entre 1,5 e 6 cm. Para os sujeitos que apresentavam comprimento do cabelo superior a 6 cm, a amostra foi dividida em segmentos de 6 cm, e foram analisados os dois segmentos próximos ao couro cabeludo, o que permitiu avaliar o consumo das drogas nos últimos 12 meses. A figura 18 mostra a concentração das drogas encontradas no cabelo em função do tamanho do segmento analisado. Observa-se a predominância de todas as drogas e metabólitos no segmento de 1,5 – 6 cm, já que a maioria das amostras de cabelo coletadas apresentava esse comprimento.

Figura 18 - Concentração das drogas e metabólitos em função do tamanho do cabelo

Com relação à cor do cabelo, 34 sujeitos possuíam o cabelo castanho e 66 possuíam o cabelo preto. O número de pessoas que relataram ter mudado a cor do cabelo foi de 13 pessoas. A resposta positiva quanto à mudança da cor foi considerada se houvesse visível alteração da cor do cabelo coletado. Avaliando-se os casos positivos, 100% dos sujeitos não haviam alterado a cor do cabelo para o THC, enquanto que para a COC foram 87% dos sujeitos (82 casos). Não foram realizadas análises estatísticas para avaliar a influência da cor do cabelo e a

concentração das drogas, pois o número amostral era muito pequeno e praticamente não houve variação na cor do cabelo (cabelos com grande quantidade de melanina).

A cor é uma informação importante para os testes em cabelo, pois existe uma hipótese de que algumas drogas demonstram afinidades à diferentes tipos de cabelos, baseado nos subtipos de melanina presente nos mesmos, com o cabelo escuro demonstrando maior afinidade que o cabelo claro. Isso poderia tornar a análise em cabelo “racialmente” tendenciosa, uma vez que o fenótipo racial está ligado à cor do cabelo (JOSEPH et al. 1996).

Entretanto, vários estudos apresentaram resultados conflitantes ou indefinidos para explicar a hipótese da ligação à melanina, muitos deles ligados à cocaína e opiáceos (LEDERGWOOD et al., 2008). De acordo com o estudo de Nakahara et al. (1999), numerosos fatores podem influenciar a ligação das drogas à melanina, entre eles o pH, a presença ou ausência de grupos funcionais com configuração molecular específica das drogas analisadas e a presença da eumelanina. Ele sugere também que o caráter ácido ou básico da droga pode ser o fator mais importante na incorporação no cabelo (MIECZKOWSKI, 2003).

De acordo com Mieczkowski (2003), muitos estudos não conseguiram embasar a teoria da ligação à melanina, pois utilizaram um número amostral muito pequeno (de 5 – 30 sujeitos). Entretanto, Hoffman (1999) não conseguiu identificar o efeito cor do cabelo ou “raça” na análise de canabinóides e cocaínicos no cabelo de 1800 sujeitos. Mieczkowski (2003) analisou 3678 sujeitos para avaliar a hipótese de que a cor do cabelo teria algum efeito na concentração de carboxi-THC no cabelo dos sujeitos usuários de *Cannabis* e não obteve nenhum resultado estatisticamente significativo.

Outro fator que pode interferir na concentração das drogas é a contínua exposição do cabelo aos fatores naturais, como luz solar, clima e poluição. Isso pode levar a uma redução da concentração de drogas presente na fibra capilar, devido ao dano causado na cutícula (pode reduzir de 50 a 80% da concentração inicial das drogas) (KINTZ et al., 2013).

A retenção e a estabilidade das drogas no cabelo também podem ser afetadas por tratamentos cosméticos como descoloração, tinturas e permanentes.

Os produtos usados para descoloração, clareamento, permanente, tintura ou relaxamento contém em sua formulação bases fortes, que podem causar danos, afetar a estabilidade ou a quantidade de droga presente na matriz capilar (BALIKOVÀ, 2005).

5.4. Análise de benzodiazepínicos e anfetaminas no cabelo por LC-MS/MS

A Tabela 18 (Anexo 11) apresenta apenas os resultados positivos para os demais analitos pesquisados nas amostras de cabelo (benzodiazepínicos e anfetaminícos). Obteve-se 60 casos positivos para benzodiazepínicos, um para MDMA (ecstasy) e um para metanfetamina (MET). Os dois casos positivos para metanfetamina e ecstasy não relataram o consumo dessas drogas durante a entrevista. O sujeito n. 60, que corresponde ao resultado positivo para MDMA, também apresentou concentrações de THC e cocaína no cabelo, enquanto o sujeito n. 99 (positivo para MET) apresentou apenas concentração de cocaína. Isso reforça o perfil de usuários de várias drogas da população estudada.

O número de sujeitos que reportaram o uso de medicamentos psicotrópicos durante a entrevista foi igual a 53. Constatou-se que o número encontrado na análise do cabelo foi maior do que o relatado no questionário. Isso reforça a importância da utilização de testes com amostras biológicas para corroborar informações fornecidas pelos indivíduos. A tabela 19 apresenta o número de sujeitos que apresentaram resultado positivo na análise do cabelo (benzodiazepínicos, barbitúricos e opióides) em função do sexo.

Tabela 19 – Achados de benzodiazepínicos no cabelo em função do sexo

Uso de benzodiazepínicos					
	Não	% total	Sim	% total	Total
Feminino	7	35	13	65	20
Masculino	33	41,25	47	58,75	80

O número de sujeitos que fazem uso de medicamentos psicotrópicos foi maior que o encontrado no estudo realizado pelo Cebrid (4,8% para sexo masculino e 7,4% para sexo feminino) (Carlini et al., 2006). Isso pode ser explicado em razão do CAPS – AD ser um local onde as pessoas buscam atendimento e tratamento para o uso de drogas, enquanto que naquele estudo se trata de uma amostra populacional. Observa-se ainda que o consumo deste tipo de medicamento é maior na população de sexo feminino em ambos os estudos.

5.5. *Cannabis research questionnaire* (CRQ)

O CRQ foi aplicado com objetivo de estimar a prevalência de problemas associados ao uso da *Cannabis* na população estudada. Dos 100 sujeitos entrevistados, 91 responderam o CRQ enquanto 9 se negaram a responder o questionário, alegando não fazer mais uso da *Cannabis* ou nunca ter usado a droga. Entre os 91 sujeitos que responderam o questionário, 16 eram do sexo feminino e 75 do sexo masculino. A idade do primeiro uso da *Cannabis* variou de 7 a 35 anos (média de 15 anos).

Com relação à frequência de uso da *Cannabis*, 3,3% relataram ter usado menos que 10 vezes; 1,1% relataram entre 10 – 15 vezes; 5,5% entre 15 – 50 vezes e 90,1% relataram ter usado mais que 50 vezes. Em relação à data do último uso, 7,9% relataram ter feito uso no dia da entrevista; 40,3% nos últimos sete dias; 23,6% nos últimos 30 dias; 12,4% no último ano e 15,7% fizeram uso há mais de 1 ano. No total, 71,9% dos sujeitos fizeram uso nos últimos 30 dias. No estudo realizado por Thomas (1996), 36% dos sujeitos fizeram uso nesse mesmo período. Ele ressalta que existe uma tendência dos usuários de drogas em entender os problemas e exacerbar os benefícios da droga com objetivo de justificar o uso contínuo da substância. Uma vez que o nosso estudo foi realizado num local de tratamento para usuários de drogas, isso pode justificar o valor superior (71,9%) relatado comparado ao estudo de Thomas (36%).

O número de cigarros de *Cannabis* utilizados por dia variou de 0,5 a 16 (média $3 \pm 3,2$ cigarros), sendo que 12,6% dos sujeitos reportaram o uso de 0,5 cigarro/dia; 75,9% entre 1 e 5 cigarros/dia e 11,5% relataram uso de mais de 5

cigarros/dia. Esse dado não é muito preciso e dificulta a comparação com outros estudos, uma vez que o tamanho dos cigarros não são padronizados, ou seja, não sabe-se a quantidade exata de droga presente nos cigarros utilizados.

Considerando a saúde física, 54,9% dos sujeitos relataram que o uso da *Cannabis* não prejudica sua saúde. Os problemas de saúde específicos relacionados ao uso da *Cannabis* avaliados no questionário foram: bronquite crônica (33% dos sujeitos), diarreia ou náusea (14,3% dos sujeitos) e dores de cabeça (29,7% dos sujeitos). Isto mostra uma dissociação entre a percepção do indivíduo de risco da *Cannabis* para a saúde e o real potencial danoso para a saúde física dos usuários. Quanto aos problemas ligados à saúde mental, 50,5% dos sujeitos reportaram já ter sofrido perda de memória após o uso da *Cannabis*; 33% relataram ter se sentido apavorado ou estado de pânico enquanto 34,1% relataram ter tido experiências estranhas, tais como ouvir vozes ou se sentir perseguido (sintoma psicótico).

Além de problemas de saúde física e mental, também foram avaliados problemas relacionados à inabilidade do sujeito em controlar a quantidade ou a frequência de uso da *Cannabis* utilizando sete questões. Falhas em restringir voluntariamente a quantidade de *Cannabis* utilizada foi reportado por 68,1% dos sujeitos; 48,4% relataram ser incapaz de interromper o uso quando quisessem; 80,2% fizeram uso da droga mesmo sabendo dos problemas que ela poderia causar; 44,6% já se sentiu incapaz de controlar a quantidade de droga; 36,3% se sentiu incapaz de realizar suas responsabilidades do dia a dia devido ao uso da *Cannabis*; 57,1% tinha o hábito de usar a droga como primeira tarefa do dia pela manhã e 62,6% reportaram irritabilidade ou inquietude se não fosse possível usar a droga. De acordo com as respostas para cada um desses sete itens, os sujeitos foram divididos em dois grupos: dependentes e não-dependentes. O valor de *cut off* considerado foi o mesmo adotado por Thomas (1996), que foi escore maior igual a 3 para os casos positivos. A maioria dos sujeitos (69,2%) foi classificada como dependentes, enquanto 30,8% não-dependentes.

Os problemas sociais e nos relacionamentos foram menos frequentes que os problemas de saúde física e os relacionados ao controle e frequência de uso. O problema mais comum foi negligenciar atividades que eram consideradas

importantes ou prazerosas devido ao uso da *Cannabis* (37,4%). Os demais problemas foram: financeiros (28,6%), perda de amigos (36,3%), problemas no emprego (22%), envolvimento em brigas (24,2%) e incidentes no trânsito (12,1%).

As quatro últimas questões do CRQ são direcionadas ao usuário regular da *Cannabis*. Elas abordam a opinião do próprio usuário quanto ao consumo da *Cannabis*, a opinião de outras pessoas (familiares e não-familiares) e o sentimento de culpa pelo uso da droga. Do total de 91 sujeitos, 59 (65%) responderam a última parte do questionário, por fazerem uso regular da droga. Mais da metade dos sujeitos (54,2%) sentem-se culpados pelo uso da *Cannabis* e seus efeitos e 39% acha que usa a droga em grande quantidade. A opinião adversa foi mais comum de pessoas fora da família (32,2%), que acreditam que se o sujeito usar mais a droga isso será bom pra ele, enquanto entre os familiares, o resultado foi de 15,3%. Os entrevistados relataram que geralmente fazem uso de outras drogas. Como a *Cannabis* não é considerada como uma droga de abuso por muitos deles, uma hipótese seria de que o aumento do consumo dessa droga seria uma forma de diminuir o consumo das outras substâncias, e consequentemente, reduzir o estado de dependência do indivíduo.

Todos os resultados obtidos no presente estudo são maiores que os reportados pelo estudo de Thomas (1996), idealizador deste questionário. Isso pode ser explicado em razão de que naquele trabalho avaliou-se o uso da *Cannabis* em uma população geral ($n = 528$ sujeitos), em que o questionário foi postado no correio, e o sujeito poderia ou não responder ao questionário. Já o presente estudo avaliou uma população usuária de droga, com um número amostral menor ($n = 100$), em um local onde o sujeito busca tratamento para a dependência e o pesquisador realizou a aplicação do questionário.

Além disso, usuários de grande quantidade de *Cannabis* tendem a usar frequentemente outras drogas de abuso, como pode ser observado na tabela 13. Isso pode atuar como fator confundidor, uma vez que muitos sintomas podem ser atribuídos ao uso da *Cannabis* quando na verdade eles são causados pelo uso de outras substâncias isoladamente ou em conjunto com a *Cannabis*.

Considerando as limitações do estudo, podemos inferir que o perfil médio dos usuários de *Cannabis* que buscam atendimento no CAPS – AD é de indivíduos do

sexo masculino, que tiveram o primeiro contato com a droga aos 15 anos, em média. São usuários crônicos (usaram mais que 50 vezes e nos últimos sete dias) e aproximadamente um terço apresentou bronquite crônica e dores de cabeça como problemas de saúde decorrentes do uso da droga. Metade dos usuários apresentou perda de memória sob influência da droga e um terço dos usuários já tiveram um episódio de ansiedade aguda ou ataque do pânico bem como um sintoma psicótico.

Apesar da percepção da população em geral de que a *Cannabis* é a droga ilícita que representa menor “perigo”, entre 2003 e 2012, a proporção de admissão em clínicas para tratamento do uso dessa droga aumentou na Europa Ocidental e Central (de 19 para 25%), na Europa Oriental (de 8 para 15%), na América Latina e Caribe (de 24 para 40%) e na Oceania (de 30 para 46%) (UNDOC, 2014). No Brasil, a cocaína e o crack são as principais drogas que levam os indivíduos a procurarem tratamento em locais especializados, apesar da *Cannabis* ser a substância ilícita com maior prevalência na população brasileira (DUALIBI et al., 2008).

É importante desmitificar a não periculosidade da *Cannabis* e conscientizar as pessoas a procurarem tratamento, uma vez que alguns autores a consideram uma “porta de entrada” para outras drogas mais perigosas como a cocaína e o crack. Um estudo neozelandês acompanhou 1265 crianças até os 21 anos de idade. Os resultados apontaram que 70% tinham usado *Cannabis* e 26% tinham utilizado outra droga ilícita (medicamentos psicotrópicos, solventes, opiáceos, cocaína, halucinógenos e extratos de plantas) aos 21 anos. Dos que usaram outras drogas, 99% haviam utilizado a *Cannabis* anteriormente. Os usuários mais frequentes de *Cannabis* (usaram mais que 50 vezes no ano) apresentavam 140 vezes mais chance de usar outras drogas do que os não-usuários (FERGUSON; HORWOOD, 2000).

5.6. Característica clínica da amostra

A tabela 20 apresenta a avaliação da presença de indicadores de transtornos psiquiátricos na população estudada por meio das escalas aplicadas, incluindo média de pontuação e desvio padrão.

Tabela 20 - Porcentagem de sujeitos com indicadores de transtornos psiquiátricos por escala e média de pontuação

Escala	Negativo (%)	Positivo (%)	Média de pontuação (desvio padrão)
SRQ ^a	17,2	82,8	10,49 (4,46)
PHQ – 9 ^b	23,2	76,8	14,78 (7,06)
BDI ^c	33,3	66,7	26,42 (12,78)
BAI ^d	49,5	50,5	22,79 (14,37)
SPIN ^e	44,3	55,7	24,65 (16,63)

^a n = 87; ^b n = 99; ^c n = 84; ^d n = 99; ^e n = 79.

Como pode ser observado, a maioria dos sujeitos apresentou resultado positivo para todas as escalas de avaliação psiquiátrica. O SRQ foi a escala que apresentou maior porcentagem, sendo que 82,8% dos sujeitos apresentaram indicadores clínicos positivos de distúrbios mentais comuns; 76,8% dos sujeitos apresentaram sinais e sintomas de depressão maior no PHQ – 9; 66,7 e 50,5% dos sujeitos apresentaram indicadores clínicos de depressão (BDI) e de ansiedade (BAI), respectivamente; e por fim, 55,7% dos entrevistados apresentam indicadores de transtorno de ansiedade social.

A alta prevalência de distúrbios mentais comuns (ansiedade, depressão e transtornos somatoformes) apontada pelo SRQ na população estudada pode ser resultado do ambiente desestruturado e estressante em que vivem os usuários de drogas. De acordo com Vieira et al. (2010), o conceito que os usuários têm sobre as drogas é de algo negativo, desorganizador de suas vidas, que acarreta o afastamento de familiares, da religião, de amigos e perda de bens materiais. Diante dessa situação, os usuários de drogas vivem em constante estresse, que é conhecido como um fator de risco para variados transtornos mentais (NIDA, 2010). De acordo com Costa e Ludermir (2005), os transtornos mentais comuns estão associados a eventos produtores de estresse, com baixo apoio social e com variáveis relativa às condições de vida e trabalho, tais como baixa escolaridade, condições precárias de moradia, baixa renda, desemprego e informalidade nas relações de trabalho. Todos esses fatores foram encontrados na população do estudo. Ainda de acordo com Manwell et al. (2004), os efeitos psicossociais como a

pobreza, a estigmatização e o isolamento, associados ao uso de drogas, podem levar ao desenvolvimento de sintomas depressivos.

De acordo com Silveira e Jorge (1999), a maioria dos estudos de comorbidade psiquiátrica considera que os diagnósticos mais freqüentemente associados à dependência as drogas são os transtornos depressivos. Isso foi corroborado pelo estudo, pois as maiores porcentagens de indicadores positivos, desconsiderando os distúrbios mentais comuns, foram encontradas para os transtornos depressivos, classificados pelo PHQ – 9 (76,8%) e pelo BDI (66,7%).

Um estudo realizado com 50 dependentes de drogas que procuraram assistência no Programa de Orientação e Atendimento a Dependentes (Proad) do Departamento de Psiquiatria da Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina mostrou que 44% dos sujeitos preencheram critérios diagnósticos para transtornos depressivos alguma vez na vida, enquanto que em 32%, o transtorno depressivo estava presente por ocasião da entrevista. Para 58% foram atribuídos outros diagnósticos psiquiátricos que não transtornos depressivos, sendo que 54% apresentavam esses diagnósticos por ocasião da entrevista e 4% apresentavam apenas diagnóstico pregresso de transtorno psiquiátrico não-depressivo. Entre os 58% diagnosticados com transtornos não-depressivos, os transtornos mais freqüentemente encontrados foram: fobias (14%), pânico (10%), transtorno obsessivo-compulsivo (10%), transtorno de ansiedade generalizada (8%) e esquizofrenia (8%) (SILVEIRA; JORGE, 1999).

5.7. Comparação entre as concentrações médias de droga no cabelo e o resultado das escalas (Teste t de *Student*)

As tabelas 21, 22 e 23 apresentam a comparação das médias de concentrações de *Cannabis*, cocaína e *crack* encontradas no cabelo entre os grupos de sujeitos que apresentaram indicadores negativos e positivos para as escalas de avaliação psiquiátrica, respectivamente.

Tabela 21 - Comparação da média de concentração de *Cannabis* encontrada no cabelo entre os grupos negativo e positivo gerados pelos indicadores das escalas

Escalas	Negativo Média (DP*)	Positivo Média (DP)	Estatística
SRQ	0,04 (0,09)	0,06 (0,13)	t = - 0,47 (p = 0,63)
PHQ – 9	0,08 (0,10)	0,14 (0,18)	t = - 0,98 (p = 0,32)
BDI	0,06 (0,16)	0,06 (0,12)	t = 0,13 (p = 0,89)
BAI	0,06 (0,12)	0,05 (0,13)	t = 0,11 (p = 0,90)
SPIN	0,11 (0,15)	0,17 (0,19)	t = - 0,92 (p = 0,36)

(Teste t de *Student*) DP = desvio padrão; t = teste t *Student*; p = probabilidade de significância

Pode ser observado na tabela 21, que a média das concentrações de *Cannabis* encontradas no cabelo para o grupo que apresentou indicadores positivos para sintomas mentais comuns (SRQ), depressão maior (PHQ – 9) e transtorno de ansiedade social (SPIN) foi maior comparada ao grupo dos que não apresentaram esses indicadores. Apesar dos resultados não serem estatisticamente significantes (valor de p foi maior que 0,05), podemos inferir que os sujeitos que possuíam os indicadores para os distúrbios acima (depressão e transtorno de ansiedade social) apresentaram maior concentração média de *Cannabis* no cabelo.

Esse resultado é corroborado por um estudo realizado por Morgan et al. (2012), em que um total de 120 usuários de *Cannabis* foram classificados em grupos com ou sem CBD e com alta ou baixa concentração de THC, a partir de análises em cabelo. Foram avaliadas medidas de sintomas do tipo psicóticos, memória, ansiedade e depressão. Os resultados apontaram um maior índice de depressão e ansiedade no grupo de usuários que apresentavam maior concentração de THC no cabelo.

Estudos apontam que a depressão é comum em sujeitos que fazem uso da *Cannabis*, particularmente naqueles que iniciaram o uso enquanto jovens (infância ou adolescência). Há grandes evidências de que a *Cannabis* pode levar ao desenvolvimento da depressão, ao contrário da hipótese de que ela seria usada como automedicação, para aliviar os sintomas da depressão. O aparecimento de

sintomas mais severos da depressão está relacionado ao uso de grande quantidade de *Cannabis*, ou seja, é dose-dependente (DEGENHARDT et al. 2003).

A prevalência de sujeitos com indicadores para depressão apontada no II Lenad (2014) mostrou que 25% da população em geral apresenta estes indicadores. Entre os usuários de *Cannabis*, a prevalência total é de 29,7%, sendo 25% nos homens e 65,8% nas mulheres. Já para a cocaína, a prevalência total é de 42,3%, sendo 37% para os homens e 65,8% para mulheres.

Usuários freqüentes de *Cannabis* parecem apresentar maiores níveis de ansiedade quando comparado a não usuários, sendo que esta ansiedade não necessariamente se constitui em um transtorno. Num estudo realizado pelo *National Comorbidity Survey* (NCS), nos Estados Unidos, verificou-se que a possibilidade de diagnóstico de um transtorno de ansiedade ou do humor, tanto no último mês quanto ao longo da vida, era aproximadamente duas vezes maior nos sujeitos com dependência de *Cannabis* (entre 6,9 e 29%). Observou-se também que grande parte desses sujeitos desenvolveu transtornos de ansiedade antes dos primeiros sintomas de dependência da *Cannabis*, sugerindo que a maconha poderia estar sendo utilizada na automedicação da ansiedade (CRIPPA; ZUARDI, 2008).

Diante desse cenário, duas teorias podem ser elaboradas para relacionar o uso da *Cannabis* e sintomas de ansiedade: ou o uso de *Cannabis* pode provocar transtornos de ansiedade aguda, ou sujeitos com altos níveis de ansiedade ou com transtornos de ansiedade usam a *Cannabis* como forma de “automedicação”. É paradoxal que indivíduos relatem redução da ansiedade como motivação para uso da *Cannabis* e, ao mesmo tempo, os sintomas adversos mais comuns em usuários da droga sejam reações agudas de ansiedade. Este fato se deve a observação de que os efeitos da *Cannabis* sobre a ansiedade parecem ser dose-dependentes, em que baixas doses apresentam propriedades ansiolíticas e doses mais altas ansiogênicas. Além disso, como foi descrito anteriormente, a *Cannabis* apresenta uma combinação de diferentes canabinóides, que podem ter efeitos distintos e nem todos podem causar prejuízos à saúde mental (CRIPPA; ZUARDI, 2008).

Vários fatores têm sido sugeridos para explicar essa comorbidade entre o uso da *Cannabis* e os transtornos de ansiedade (vulnerabilidade individual e genética, traços de personalidade, sexo, frequência de uso, quantidade e dose consumida,

proporções e concentrações do canabinóides, história de episódio anterior, estado de abstinência, ambiente e contexto de uso). Entretanto, não foi possível estabelecer conclusões definitivas, sendo necessário e oportuno o desenvolvimento de outros estudos que busquem uma maior compreensão dos mecanismos sociais, neurobiológicos e outros fatores confundidores (CRIPPA; ZUARDI, 2008).

Tabela 22 - Comparação da média de concentração de Cocaína encontrada no cabelo entre os grupos negativo e positivo gerados pelos indicadores das escalas

Escalas	Negativo Média (DP)	Positivo Média (DP)	Estatística
SRQ	15,06 (12,88)	22,67 (31,01)	t = - 0,99 (p = 0,32)
PHQ – 9	18,21 (24,98)	22,32 (29,96)	t = - 0,59 (p = 0,55)
BDI	27,13 (37,36)	21,46 (26,45)	t = 0,79 (p = 0,42)
BAI	17,32 (26,53)	25,34 (30,62)	t = - 1,39 (p = 0,16)
SPIN	26,28 (34,39)	22,66 (28,92)	t = 0,50 (p = 0,61)

(Teste t de *Student*) DP = desvio padrão; t = teste t Student; p = probabilidade de significância

Para a cocaína, observou-se que as escalas SRQ, PHQ – 9 e BAI apresentaram concentrações médias maiores no grupo com indicadores clínicos positivos comparados ao grupo negativo. Apesar dos dados não serem estatisticamente significantes (valor de p foi maior que 0,05), podemos inferir que os sujeitos que possuíam indicadores clínicos para distúrbios mentais comuns, depressão maior e ansiedade apresentavam maiores concentrações médias de cocaína no cabelo. Já para os indicadores clínicos de sintomas depressivos (BDI) e transtorno de ansiedade social (SPIN), a relação foi inversa, ou seja, observou-se uma maior concentração no grupo negativo, ou seja, nos sujeitos que não apresentavam indicadores clínicos para os distúrbios.

Tabela 23 - Comparação da média de concentração de *Crack* encontrada no cabelo entre os grupos negativo e positivo gerados pelos indicadores das escalas

Escalas	Negativo Média (DP)	Positivo Média (DP)	Estatística
SRQ	0,54 (0,69)	0,72 (1,82)	t = - 0,40 (p = 0,68)
PHQ – 9	1,0 (2,60)	0,60 (1,29)	t = 0,99 (p = 0,32)
BDI	1,13 (2,66)	0,53 (1,14)	t = 1,44 (p = 0,15)
BAI	0,52 (1,14)	0,86 (2,08)	t = - 1,02 (p = 0,31)
SPIN	1,08 (2,39)	0,61 (1,23)	t = 1,13 (p = 0,26)

(Teste t de *Student*) DP = desvio padrão; t = teste t *Student*; p = probabilidade de significância

Nos usuários de *crack*, a concentração média no cabelo foi maior apenas para os grupos que apresentavam indicadores clínicos para distúrbios mentais comuns (SRQ) e ansiedade (BAI). As demais escalas apresentaram concentrações maiores no grupo que não possuía indicador clínico de sintoma. Podemos inferir, apesar dos dados não serem estatisticamente significantes (valor de p foi maior que 0,05), que os sujeitos que possuíam indicadores clínicos para distúrbios mentais comuns e ansiedade apresentavam maiores concentrações médias de crack no cabelo.

Pode-se considerar que toda a população estudada era composta por usuários de cocaína. De acordo com Duailibi et al. (2008), os transtornos depressivos e de ansiedade são as comorbidades psiquiátricas mais frequentemente observadas nos usuários de cocaína/crack em estudos brasileiros, o que também foi observado neste estudo. Um estudo realizado em Porto Alegre, com 50 pacientes internados, encontrou significativa correlação entre sintomas de ansiedade e depressão e gravidade da dependência. A presença da comorbidade aumenta a severidade de ambos os transtornos. Outro estudo realizado no Sul do Brasil, com pacientes hospitalizados para tratamento de abuso de cocaína, revelou uma prevalência de 77,8% de indicadores para depressão e 40% para ansiedade, comparados ao grupo controle de não-usuários. A escala utilizada foi o SCL-90R (*Symptom Check List – 90 Revised*), uma escala composta por 90 questões que avaliam os sintomas psiquiátricos apresentados na semana anterior à coleta de

dados. Eles encontraram uma correlação significativa entre a severidade de dependência a cocaína e os escores do SCL-90R para depressão, ou seja, sujeitos com alta dependência à cocaína apresentavam maiores escores para depressão comparado aos sujeitos com menor dependência (KESSLER et al., 2008).

Estudo realizado em um CAPS – AD em Sergipe, em que a população estudada apresentou perfil sócio-demográfico muito semelhante à deste estudo, mostrou que o transtorno depressivo maior e de ansiedade generalizada também foram os distúrbios psiquiátricos mais observados na população. O estudo ainda observou uma correlação significativa (p menor que 0,05) entre a dependência de cocaína e/ou crack com a presença de transtornos de depressão maior, obsessivo-compulsivo, síndrome psicótica e ansiedade generalizada (ANDRADE, 2014).

Um estudo observacional realizado na Espanha, com dados de 4102 pacientes que foram admitidos em 6 comunidades terapêuticas entre 2004 e 2012, relacionou os dados de diagnóstico do uso de drogas com sintomas psiquiátricos. Os resultados mostraram que o grupo de usuários de álcool + *Cannabis* + cocaína obtiveram maiores taxas de transtornos psicóticos, de humor e ansiedade (CALDERÓN et al., 2015).

5.8. Correlação entre nível de sintomas e concentração das substâncias no cabelo

A tabela 24 apresenta os resultados da correlação entre os indicadores clínicos positivos de cada escala com a concentração média no cabelo para cada droga.

Tabela 24 - Correlação entre nível de sintomas e concentração de *Cannabis*, cocaína e *crack* no cabelo

Escala	Concentração no cabelo		
	<i>Cannabis</i>	Cocaína	<i>Crack</i>
SRQ	$r = 0$ ($p = 0,99$)	$r = 0,01$ ($p = 0,45$)	$r = -0,08$ ($p = 0,40$)
PHQ – 9	$r = 0,16$ ($p = 0,30$)	$r = 0,18$ ($p = 0,06$)	$r = 0,02$ ($p = 0,85$)
BDI	$r = 0,10$ ($p = 0,52$)	$r = 0,02$ ($p = 0,81$)	$r = -0,03$ ($p = 0,73$)
BAI	$r = -0,02$ ($p = 0,90$)	$r = 0,07$ ($p = 0,48$)	$r = 0,02$ ($p = 0,84$)
SPIN	$r = 0,19$ ($p = 0,29$)	$r = -0,11$ ($p = 0,32$)	$r = -0,11$ ($p = 0,30$)

r = coeficiente de correlação de Pearson; p = probabilidade de significância

Os resultados obtidos da correlação entre o nível de sintomas e a concentração de *Cannabis*, cocaína e *crack* no cabelo não foram estatisticamente significativos (valor de p maior que 0,05), ou seja, o aumento da concentração das drogas no cabelo não aumenta a quantidade de indicadores clínicos positivos obtidos a partir das escalas. Como podem ser observado na tabela 24, os valores do coeficiente de correlação de Pearson (r) variaram de $-0,11$ a $+0,19$, indicando que houve uma correlação praticamente nula.

Esse resultado pode ser explicado em razão dos testes em cabelo avaliarem o consumo crônico das substâncias e fornecerem dados de um consumo realizado a, no mínimo, um mês anterior à entrevista, dependendo do comprimento do cabelo. Já as escalas avaliavam os sintomas que os sujeitos apresentavam na última semana (SPIN, BDI e BAI) ou nas duas últimas semanas (PHQ – 9). O sujeito pode ter experienciado sintomas mais graves semanas antes da entrevista, o que pode explicar os resultados elevados das concentrações das drogas no cabelo, em razão do maior consumo das substâncias. Entretanto, a partir do momento que o sujeito é matriculado no CAPS – AD, ele tem acesso às atividades terapêuticas, reduzindo assim os sintomas provocados pela droga, e consequentemente, os sintomas reportados nas entrevistas.

Outra possível explicação seria o fato de que não foi realizada uma análise segmental do cabelo, ou seja, não foi avaliada a concentração da droga em cada centímetro (que corresponderia a um mês) do cabelo. Como a população fazia uso crônico de drogas, considerou-se que o consumo seria igual em todo o comprimento do cabelo. Isso representa uma limitação importante do estudo.

A associação entre testes analíticos com matrizes biológicas e escalas de avaliação psiquiátrica vem ganhando espaço na psiquiatria, mas ainda é pequena a quantidade de artigos que relatam esse procedimento. Em 2008, Morgan e col. analisaram amostras de cabelo para examinar os níveis de THC e CBD em usuários de *Cannabis*, e relacionar esses níveis com indicadores de tendência à psicose e delírio. A análise do cabelo permitiu a divisão da amostra em 3 grupos: grupo que não continha os canabinóides, grupo que apresentava somente THC e grupo THC + CBD. Os resultados mostraram que o grupo que só possuía THC apresentou maiores níveis de experiências não-usuais (análogo a alucinações e delírios) comparado aos outros grupos. Esses achados sugeriram que a utilização de *Cannabis* com maior conteúdo de CBD poderia proteger contra os efeitos do tipo psicóticos induzidos pelo THC isolado (MORGAN et al., 2008).

O grupo de pesquisa de Morgan realizou outro estudo envolvendo outras matrizes biológicas e escalas de avaliação psiquiátricas. Eles analisaram amostras de saliva e urina em um estudo cujo objetivo era testar a hipótese de que o canabidiol poderia neutralizar alguns dos efeitos de reforço do THC. Os usuários de *Cannabis* foram testados em duas ocasiões (dia livre da droga e dia sob influência da droga), separadas por aproximadamente sete dias, para avaliar sintomas psicotomiméticos e de memória. Além da própria *Cannabis* fumada, também foi analisada uma amostra de saliva para avaliar a presença de canabinóides, e uma amostra de urina para verificar a abstinência a outras drogas e a presença de metabólitos do THC (MORGAN et al., 2010).

A utilização dos testes analíticos associados aos instrumentos de rastreamento ou diagnóstico psiquiátrico contribui para a confecção de estudos mais precisos, uma vez que permite um refinamento na seleção dos participantes, gerando grupos de usuários específicos de uma substância, além de possibilitar a análise dos diferentes componentes das substâncias utilizadas.

Algumas considerações devem ser tomadas na interpretação dos dados em razão das limitações do estudo:

- Não foi realizada uma análise segmental do cabelo, ou seja, as amostras de cabelo não foram divididas em segmentos de 1 em 1 cm para avaliar a

presença das substância nos segmentos. Isso possibilitaria estimar o consumo mensal das substâncias pelos sujeitos;

- As escalas utilizadas são para rastreamento de sintomas psiquiátricos e não diagnóstico;
- Pode haver sobreposição de sintomas clínicos e psiquiátricos e isso pode levar a conclusões errôneas quanto ao aspecto avaliado;
- Os resultados não podem ser extrapolados para a população em geral, já que o estudo foi realizado em uma população específica de usuários de drogas (CAPS – AD);
- Os sujeitos eram usuários de múltiplas drogas, o que impossibilitava a separação entre grupos de uso de substância específica;
- O tamanho da amostra, considerando as diferenças na estratificação por diferentes drogas, pode ter levado a erro do tipo I.

CONCLUSÕES

A alta sensibilidade na detecção e o estabelecimento de um sistema de column switching de fácil utilização permitiu a injeção de pequeno volume de amostra (10 µl) de um extrato de cocaína e metabólitos no espectrômetro de massas (MS-MS) sem afetar significativamente a ionização dos analitos e o desempenho do sistema. O método apresentou excelente sensibilidade e seletividade para os testes confirmatórios de cocaína e metabólitos em cabelo, utilizando apenas uma pequena quantidade da amostra (5 mg). Apresentou também boa correlação entre os resultados das análises obtidas com o método GC-MS de referência.

Os resultados preliminares sugerem que as ponteiras DPX são uma alternativa viável aos cartuchos de extração em fase sólida convencionais para análise de canabinóides em amostras de cabelo, uma vez que os canabinóides encontram-se em pequenas concentrações nessa matriz biológica.

Esse estudo possibilitou reconhecer as principais drogas consumidas pela população atendida no CAPS – AD, na cidade de Ribeirão Preto, bem como estimar a prevalência de comorbidades psiquiátricas apontadas pelos indicadores clínicos das escalas de avaliação psiquiátrica.

Em relação às informações sociodemográficas, a população estudada foi caracterizada como composta em sua maioria por sujeitos do sexo masculino, entre 18 e 52 anos (média de idade de 31 anos), brancos, solteiros, com ensino fundamental ou médio e desempregados ou empregados no mercado informal. Fazem uso de múltiplas drogas, principalmente álcool, *Cannabis*, cocaína e crack. Mais da metade dos sujeitos fazem uso de medicamentos psicotrópicos, principalmente, benzodiazepínicos.

A análise do cabelo mostrou que 22% dos sujeitos apresentaram resultados positivos para *Cannabis*; 99% para a cocaína e 31% para o crack, demonstrando a prevalência do consumo de cocaína entre os usuários de droga que buscam atendimento na rede pública de saúde no país.

O estudo do teor de THC e CBD presente nas amostras de *Cannabis* planta apreendidas pela polícia na região de Ribeirão Preto revelou um aumento da concentração desses canabinóides ao longo dos anos. Entretanto, a concentração

de CBD é muito pequena ou até mesmo nula na *Cannabis* consumida na região de Ribeirão Preto. Portanto, mais estudos devem ser realizados para analisar o teor de THC e CBD na *Cannabis* comercializada no nosso país, uma vez que o número de amostras analisadas foi muito reduzido.

O perfil dos usuários de *Cannabis* que buscam atendimento no CAPS – AD, obtidos através do *Cannabis Research Questionnaire*, foi de indivíduos do sexo masculino, que tiveram o primeiro contato com a droga aos 15 anos, em média. São usuários crônicos (usaram mais que 50 vezes e nos últimos 7 dias) e aproximadamente um terço apresentou bronquite crônica e dores de cabeça como problemas de saúde decorrentes do uso da droga. Metade dos usuários apresentou perda de memória sob influência da droga e um terço dos usuários já tiveram um episódio de ansiedade aguda, ataque do pânico ou sintoma psicótico.

A prevalência de indicadores clínicos positivos para transtornos psiquiátricos entre a população usuária de drogas do CAPS – AD foi de transtornos mentais comuns, entre eles a ansiedade e depressão. A comparação da média de concentração de *Cannabis*, cocaína e crack no cabelo com os indicadores clínicos positivos para os transtornos não apresentou resultados estatisticamente significantes. Entretanto, podemos inferir que os sujeitos que apresentaram indicadores positivos para sintomas mentais comuns (SRQ), depressão maior (PHQ – 9) e transtorno de ansiedade social (SPIN) apresentaram maior concentração média de *Cannabis* no cabelo. Para a cocaína, podemos inferir que os sujeitos que possuíam indicadores clínicos para distúrbios mentais comuns (SRQ), depressão maior (PHQ – 9) e ansiedade (BAI) apresentaram maiores concentrações médias de cocaína no cabelo. E para o crack, os sujeitos que possuíam indicadores clínicos para distúrbios mentais comuns (SRQ) e ansiedade (BAI) apresentaram maiores concentrações médias de crack no cabelo.

Os resultados obtidos a partir da correlação entre o nível de sintomas e a concentração de *Cannabis*, cocaína e crack no cabelo não foram estatisticamente significativos, ou seja, o aumento da concentração das drogas no cabelo não aumenta a quantidade de indicadores clínicos positivos para os sintomas psiquiátricos.

Apesar das variadas limitações do estudo, podemos concluir que ele possibilitou estimar a prevalência da morbidade entre abuso de drogas ilícitas e sintomas psiquiátricos na população atendida num centro de atenção psicossocial.

Futuros estudos com um número amostral maior, diferentes populações (estudo clínico e não clínico) em diferentes estratos socioeconômicos, que avaliem o grau de pureza ou o teor dos componentes das substâncias utilizadas e estudos longitudinais se fazem necessários, para que políticas públicas mais eficazes e específicas sejam criadas na tentativa de auxiliar na melhora da qualidade de vida dessa população.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. RESOLUÇÃO RDC N.º 27, DE 17 DE MAIO DE 2012. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/564310004b60537e891f9baf8fdded4db/RDC+27+12+Valida%C3%A7%C3%A3o+de+M%C3%A9todos+Bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 05 fevereiro 2011.

ALVES, M.N.R.; ZANCHETTI, G.; PICCINOTTI, A.; TAMENI, S.; De MARTINIS, B.S.; POLETTINI, A. Determination of cocaine and metabolites in hair by column-switching LC-MS-MS analysis. **Anal Bioanal Chem**, v. 405, p. 6299–6306, 2013.

ANDRADE, J.D.S. **Prevalência da comorbidade psiquiátrica em dependentes de droga de abuso atendidos nos Centros de atenção psicossocial álcool e drogas do estado de Sergipe**. 2014. 106 f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) - Sergipe: Universidade Federal de Sergipe, 2014.

AZEVEDO, R.C.S.; OLIVEIRA, K.D.; SILVA, L.F.A.L.; KOLLER, K.; MARQUES, A.C.P.R.; RIBEIRO, M.; LARANJEIRA, R.R.; ANDRADA, N.C. Abuso e Dependência de Múltiplas Drogas. Projeto Diretrizes. Associação Médica Brasileira, 2012. Disponível em: <http://www.projetodiretrizes.org.br/diretrizes11/abuso_e_depend%C3%Aancia_de_multiplas_drogas.pdf> Acesso em: 20 abril 2015.

BALIKOVÁ, M. Hair analysis for drugs of abuse. Plausability of interpretation. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, v. 149, n. 2, p. 199-207, 2005.

BARROSO, M.; GALLARDO, E.; VIEIRA, D.N.; LÓPEZ-RIVADULLA, M.; QUEIROZ, J.A. Hair: a complementary source of bioanalytical information in forensic toxicology. **Bioanalysis**, v. 3, n. 1, p. 67-79, 2011.

BECK, A.T.; WARD, C.H.; MENDELSON, M.; MOCK, J.E.; ERBAUGH, J.K. An inventory for measuring depression. **Arch Gen Psychiatry**, v. 4, p. 561-571, 1961.

BECK, A.T.; EPSTEIN, N.; BROWN, G.; STEER, R.A. An inventory for measuring clinical anxiety: psychometric properties. **J Consult Clin Psychol**, v. 56, n. 6, Dec, p. 893-897, 1988.

BECK, A.T.; STEER, R.A.; GARBIN, M.G. Psychometric properties of the Beck depression inventory: twenty-five years of evaluation. **Clin Psychol Rev**, v. 8, p. 77-100, 1988.

BORGES, C.R.; ROBERTS, J.C.; WILKINS, D.G.; ROLLINS, D.E. Relationship of melanin degradation products to actual melanin content: application to human hair. **Anal Biochem**, v. 290, n. 1, p. 116-25, 2001.

BORREY, D.; MOERMAN, E.; COCKX, A.; ENGELRELST, V.; LANGLOIS, M.R. Column-switching LC-MS/MS analysis for quantitative determination of testosterone in human serum. **Clin Chim Acta**, v. 382, Jul, p. 134-7, 2007.

BREWER, W.E.; ELLISON, S.T.; MORGAN, S.L.; FOSTER, F.; WHITECAVAGE, J.A. Automated extraction, derivatization and GC/MS determination of tetrahydrocannabinol and metabolites in whole blood using Disposable Pipette Extraction. Application note, Gerstel, 2008.

BUCELLI, F.; FRATINI, A.; BAVAZZANO, P.; COMODO, N. Quantification of drugs of abuse and some stimulants in hair samples by liquid chromatography–electrospray ionization ion trap mass spectrometry. **J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci**, v. 877, n. 31, p. 3931–3936, 2009.

BURATO, K.R.S.S. Transtorno de ansiedade social: comportamento de segurança e evitação. 2009. Dissertação (Mestrado em Saúde Mental) - Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, Ribeirão Preto, 2009.

CALDERÓN, D.F.; FERNANDEZ, F.; CURADO, S.R.; GARCIA, A.V.; LOZANO, O.M. Profiles of substance use disorders in patients of therapeutic communities: Link to social, medical and psychiatric characteristics. **Drug and Alcohol Depend**, n. 149, v. 31–39, 2015.

CALLEGARI-JACQUES, S.M. **Bioestatística: princípios e aplicações**. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2003. 300 p.

CARLINI, E.A. VI Levantamento Nacional sobre o Consumo de Drogas Psicotrópicas entre Estudantes do Ensino Fundamental e Médio das Redes Pública e Privada de Ensino nas 27 Capitais Brasileiras – 2010. São Paulo: CEBRID - Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas: UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo 2010. SENAD - Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas, Brasília – SENAD, 2010.

CARLINI, E.A. et al. II Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país, 2005. São Paulo: CEBRID - Centro Brasileiro de Informação sobre Drogas Psicotrópicas: UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo, 2006.

CHASIN, A.A.M.; SILVA, E.S. Estimulantes do Sistema Nervoso Central. In: OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2003. Cap. 4.3, p.239-257.

CHAVES, A.R.; CHIERICATO Jr, G.; QUEIROZ, M.E.C. Solid-phase microextraction using poly(pyrrole) filme and liquid chromatography with UV detection for analysis of antidepressants in plasma samples. **J Chromatogr B**, v. 877, p. 587-593, 2009.

CIRIMELE, V.; SACHS, H.; KINTZ, P.; MANGIN, P. Testing Human Hair for Cannabis. III. Rapid Screening Procedure for the Simultaneous Identification of Ag-Tetrahydrocannabinol, Cannabinol, and Cannabidiol. **J Anal Toxicol**, v. 20, Jan/Feb, 1996.

COGNARD, E.; RUDAZ, S.; BOUCHONNET, S.; STAUB, C. Analysis of cocaine and three of its metabolites in hair by gas chromatography-mass spectrometry using ion-trap detection for CI/MS/MS. **J Chromatogr B**, v. 826, p. 17–25, 2005.

CONE, E.J. Mechanisms of drug incorporation into hair. **Ther Drug Monitoring**, v. 18, n. 4, p. 438-443, 1996.

CONE, E.J.; HILLSGROVE, M.; DARWIN, W.D. Simultaneous measurement of cocaine, cocaethylene, their metabolites and “crack” pyrolysis products by gas chromatography-mass spectrometry. **Clin Chem**, v. 40, n. 7, p. 1299-1305, 1994.

CONNOR, K.M.; DAVIDSON, J.R.; CHURCHILL, L.E.; SHERWOOD, A.; FOA, E.; WEISLER, R.H. Psychometric properties of the Social Phobia Inventory (SPIN). New self-rating scale. **Br J Psychiatry**, v.176, Apr, p. 379-86, 2000.

COOPER, G.A.; KRONSTRAND, R.; KINTZ, P. Testing SoHT. Society of Hair Testing guidelines for drug testing in hair. **Forensic Sci Int**, v. 218, p. 20-4, 2011.

CORDERO, R.; PATERSON, S. Simultaneous quantification of opiates, amphetamines, cocaine and metabolites and diazepam and metabolite in a single hair sample using GC-MS. **J Chromatogr B**, v. 850, p 423-431, 2007.

COSTA, A.G.; LUDERMIR, A. B. Transtornos mentais comuns e apoio social: estudo em comunidade rural da Zona da Mata de Pernambuco, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 21, n. 1, p. 73-79, Feb. 2005.

CRIPPA, J.A.; ZUARDI, A.W.; MARTÍN-SANTOS, R.; BHATTACHARYYA, Z.; ATAKAN, Z.; McGUIRE, P.; FUSAR-POLI, P. Cannabis and anxiety: a critical review of the evidence. **Hum Psychopharmacol Clin Exp**, v. 24, p. 515-523, 2009.

CRIPPA, J.A.S.; ZUARDI, A.W. Cannabis e ansiedade. In: ZUARDI et al. **Cannabis e saúde mental: uma revisão sobre a droga de abuso e o medicamento**. São Paulo, 2008, cap 8, p. 135-143.

CUNHA, J.A. **Manual da versão em português das Escalas Beck**. São Paulo: Casa do Psicólogo, 2001.

DEGENHARDT, L.; HALL, W.; LYNSKEY, M. Exploring the association between cannabis use and depression. **Addiction**, v. 98, n. 11, Nov, p. 1493-504, 2003.

DEVANE, W.A.; DYSARZ, F.A.I.I.I.; JOHNSON, M.R.; MELVIN, L.S.; HOWLETT, A.C. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. **Mol Pharmacol**, v. 34, p. 605–613, 1988.

Di CORCIA, D.; D'URSO, F.; GERACE, E.; SALOMONE, A.; VINCENT, M. Simultaneous determination in hair of multiclass drugs of abuse (including THC) by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **J Chromatogr B**, v. 899, p. 154-159, 2012.

DIEHL, A.; CORDEIRO, D.C.; LARANJEIRA, R. Abuso de cannabis em pacientes com transtornos psiquiátricos: atualização para uma antiga evidência. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 32, p. 41-45, Maio, 2010.

DI FORTI, M.; MORGAN, C.; DAZZAN, P.; PARIANTE, C.; MONDELLI, V.; MARQUES, T.R.; HANDLEY, R.; LUZI, S.; RUSSO, M.; PAPARELLI, A.; BUTT, A.; STILO, S.A.; WIFFEN, B.; POWELL, J.; MURRAY, R.M. High-potency cannabis and the risk of psychosis. **Br J Psychiatry**, v. 195, p. 488–491, 2009.

DUALIBI, L.B.; RIBEIRO, M.; LARANJEIRA, R. Profile of cocaine and crack users in Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v. 24, supl. 4, p. 545-557, 2008.

DUARTE, C.S.; BORDIN, I.A.S. Instrumentos de avaliação. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 22, Dec, 2000.

DULAURENT, S.; GAULIER, J.M.; IMBERT, L.; MORLA, A.; LACHATRE, G. Simultaneous determination of D9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol, cannabinol and 11-nor-D9-

tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in hair using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Forensic Sci Int**, v. 236, p. 151–156, 2014.

ELSOHLY, M.A.; SLADE, D. Chemical constituents of marijuana: The complex mixture of natural cannabinoids. **Life Sci**, v. 78, p. 539-548, 2005.

EMÍDIO, E.S.; PRATA, V.M.; SANTANA, F.J; DÓREA, H.S. Hollow fiberbased liquid phase microextraction with factorial design optimization and gas chromatography-tandem mass spectrometry for determination of cannabinoids in human hair, **J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci**, v. 878, n. 24, p. 2175–2183, 2010.

FALLER, S.; PEUKER, A.C.; SORDI, A.; STOLF, A.; SOUZA-FORMIGONI, M.L.; CRUZ, M.S.; BRASILIANO, S.; PECHANSKY, F.; KESSLER, F. Who seeks public treatment for substance abuse in Brazil? Results of a multicenter study involving four Brazilian state capitals. **Trends Psychiatry Psychother**, v. 36, n. 4, p. 193-202, 2014.

FAVRETTO, D.; VOGLIARDI, S.; STOCCHERO, G.; NALESSO, A.; TUCCI, M.; FERRARA, S.D. High performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry and micropulverized extraction for the quantification of amphetamines, cocaine, opioids, benzodiazepines, antidepressants and hallucinogens in 2.5 mg hair samples. **J Chromatogr A**, v. 1218, n. 38, p. 6583–6595, 2011.

FELLI, M.; MARTELLO, S.; MARSILI, R.; CHIAROTTI, M. Disappearance of cocaine from human hair after abstinence. **Forensic Sci Int**, v. 154, p. 96–98, 2005.

FERGUSON, D.M.; HORWOOD, L.J. Does cannabis use encourage other forms of illicit drug use? **Addiction**, v. 95, n. 4, p. 505–520, 2000.

FEUCHT, T.E.; STEPHENS, R.C.; WALKER, M.L. Drug use among juvenile arrestees: a comparison of self-report, urinalysis and hair assay. **J Drug Issues**, v. 24, p. 99-116, 1994.

FOSTER, F.D.; CABRICES, O.G.; STUFF, J.R.; PFANNKUCH, E.A.; BREWER, W.E. Determination of Barbiturates and 11-Nor-9-carboxy- 9 -THC in Urine using Automated Disposable Pipette Extraction (DPX) and LC/MS/MS. Application note 1, Gerstel, 2013.

FOSTER, F.; PFANNKUCH, E.P.; STUFF, J.R.; WHITECAVAGE, J.A. Analysis of Drugs and Metabolites in Blood and Urine using Automated Disposable Pipette Extraction. Application note 11, Gerstel, 2008.

GAMBELUNGHE, C.; ROSSI, R.; FERRANTI, C.; ROSSI, R.; BACCI, M. Hair analysis by GC/MS/MS to verify abuse of drugs. **J Appl Toxicol**, v. 25, n. 3, May-Jun, p. 205-11, 2005.

GAONI, Y.; MECOULAM, R. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. **J Am Chem Soc**, v. 86, n. 8, p. 1646–1647, 1964.

GENTILI, S.; CORNETTA, M.; MACCHIA, T. Rapid screening procedure based on headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for the detection of many recreational drugs in hair. **J Chromatogr B**, v. 801, p. 289-296, 2004.

GOLDIM, J.R.; PITHAN, C.F.; OLIVEIRA, J.G. O processo de consentimento livre e esclarecido em pesquisa: uma nova abordagem. **Rev Ass Med Bras**, v. 49, n. 4, p. 372-374, 2003.

GOMES-OLIVEIRA, M.H.; GORENSTEIN, C.; NETO, F.L.; ANDRADE, L.H.; WANG, Y.P. Validation of the Brazilian Portuguese version of the Beck Depression Inventory-II in a community sample. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 34, n. 4, Dez, p. 389-394, 2012.

GONÇALVES, D.M.; STEIN A.T.; KAPCZINSKI, F. Avaliação de desempenho do Self-Reporting Questionnaire como instrumento de rastreamento psiquiátrico: um estudo comparativo com o Structured Clinical Interview for DSM-IV-TR. **Cad. Saúde Pública**, v. 24, n. 2, Fev, p. 380-390, 2008.

GORENSTEIN, C.; WANG, Y.P.; ARGIMON, I.L.; WERLANG, B.S.G. **Manual do Inventário de depressão de Beck - BDI-II**. Beck AT, Steer RA, Brown GK, editors. São Paulo: Editora Casa do Psicólogo. 2011.

GROTENHERMEN, F. Clinical Pharmacokinetics of Cannabinoids. **Journal of Cannabis Therapeutics**, v. 3, n. 1, 2003.

GUAN, H.; BREWER, W.E.; GARRIS, T.S.; MORGAN, S.L. Disposable pipette extraction for the analysis of pesticides in fruit and vegetables using gas chromatography/mass spectrometry. **J Chromatogr A**, v.1217, p. 1867–1874, 2010.

HALLAK, J.E.C.; BRESSAN, R.A.; CRIPPA, J.A.S.; ZUARDI, A.W. Cannabis e psicose. In: ZUARDI et al. **Cannabis e saúde mental: uma revisão sobre a droga de abuso e o medicamento**. São Paulo, 2008, cap 10, p. 159-177.

HAN, E.; PARK, Y.; KIM, E.; IN, S.; YANG, W.; LEE, S.; CHOI, H.; LEE, S.; CHUNG, H.; SONG, J.M. Simultaneous analysis of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy-Tetrahydrocannabinol

in hair without different sample preparation and derivatization by gas chromatography–tandem mass spectrometry. **J Pharm Biomed Anal**, v. 55, p. 1096–1103, 2011.

HAN, E.Y.; YANG, W.Y.; LEE, J.S.; PARK, Y.H.; KIM, E.M.; LIM, M. Correlation of methamphetamine results and concentrations between head, axillary, and pubic hair. **Forensic Sci Int**, v. 147, n. 1, p. 21-4, 2005.

HARDING, T.W.; ARANGO, M.V.; BALTAZAR, J.; CLIMENT, C.E.; IBRAHIM, H.H.A.; IGNACIO, L.L.; MURTHY, R.S.; WIG, N.N. Mental disorders in primary health care: a study of their frequency and diagnosis in four developing countries. **Psychol Med**, v. 10, p. 231-241, 1980.

HARDING, T.W.; CLIMENT, C.E.; DIOP, M.; IBRAHIM, H.H.A.; MURTHY, R. S.; SULEIMAN, M.A.; WIG, N.N. The W.H.O. Collaborative Study on Strategies for Extending Mental Health Care, II: the development of new research methods. **Am J Psychiatry**, v. 140, p. 1470-1480, 1983.

HASEGAWA, C; KUMAZAWA, T.;PEN-LEE, X.; MARUMO, A.; SHINMEN E.; SENO, H.; SATO, K. Pipette tip solid-phase extraction and gas chromatography – mass spectrometry for the determination of methamphetamine and amphetamine in human whole blood, **Anal Bioanal Chem**, v. 389, p. 563-570, 2007.

HELZER, J.E.; ROBINS, L.N.; McEVOY, L.T.; SPITZNAGEL, E.L.; STOLTZMAN, R.K.; FARMER, A.; BROCKINGTON, I.F. A comparison of clinical and diagnostic interview schedule diagnoses. Physician reexamination of lay-interviewed cases in the general population. **Arch Gen Psychiatry**, v.42, p. 657-666, 1985.

HENDERSON, G.L.; HARKEY, M.R.; ZHOU, C. Incorporation of isotopically labeled cocaine into human hair. Race as a factor. **J Anal Toxicol**, v. 22, p. 156-165, 1998.

HILL, V.; CAIRNS, T.; SCHAFFER, M. Hair analysis for cocaine: factors in laboratory contamination studies and their relevance to proficiency sample preparation and hair testing practices. **Forensic Sci Int**, v. 176, n. 1, p. 23–33, 2008.

HOELZLE, C.; SCHEUFLER, F.; UHL, M.; SACHS, H.; THIEME, D. Application of discriminant analysis to differentiate between incorporation of cocaine and its congeners into hair and contamination. **Forensic Sci Int**, v. 176, n.1, p. 13–18, 2008.

HOFFMAN, B.H. Analysis of race effects on drug-test results. **J Occup Environm Med**, v. 41, p. 612-614, 1999.

HUESTIS, M.A. Marijuana. In: LEVINE, B. **Principles of Forensic Toxicology**. USA, 1999. Cap. 14, p. 246-264.

HUESTIS, M.A. Human Cannabinoid Pharmacokinetics. **Chem Biodivers**, v. 4, n. 8, Aug, p. 1770–1804, 2007.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores sociais municipais: uma análise dos resultados do universo do Censo Demográfico 2010. 2010. Disponível em: < <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv54598.pdf> > Acesso em: 20 abril, 2015.

ISENCHMID, D.S. Cocaine. In: LEVINE, B. **Principles of Forensic Toxicology**. USA, 1999. Cap. 13, p. 221-245.

JENKINS, A.J. Pharmacokinetics of specific drugs. In: KARCH, S.B. **Pharmacokinetics and pharmacodynamics of abused drugs**. CRC Press: USA, 2007. Cap. 4, p. 25-64.

JOSEPH JR, R.E.; HOLD, K.M.; WILKINS, D.G.; ROLLINS, D.E.; CONE, E.J. Drug testing with alternative matrices II. Mechanisms of cocaine and codeine deposition in hair. **J Anal Toxicol**, v. 23, Oct, 1999.

JOSEPH, R.; TSUNG-PING, S.; CONE, E. In vitro binding studies of drugs to hair: influence of melanin and lipids on cocaine binding to Caucasoid and Africoid hair. **J Anal Toxicol**, v. 20, p. 338-344, 1996.

JURADO, C.; GIMENEZ, M.P.; MENENDEZ, M.; REPETTO, M. Simultaneous quantification of opiates, cocaine and cannabinoids in hair. **Forensic Sci Int**, v. 70, p. 165-174, 1995.

KESSLER, F.; WOODY, G.; DE BONI, R.; VON DIEMEN, L.; BENZANO, D.; FALLER, S.; PECHANISKY, F. Evaluation of psychiatric symptoms in cocaine users in the Brazilian public health system: need for data and structure. **Public Health**, v. 122, n. 12, Dec, p. 1349-1355, 2008.

KIM, J.Y.; SUH, S.I.; IN, K.M.; PAENG, K.; CHUNG, B.C. Simultaneous determination of cannabidiol, cannabinol, and Δ^9 -tetrahydrocannabinol in human hair by gas chromatography-mass spectrometry. **Arch Pharm Res**, v. 28, n. 9, p. 1086-1091, 2005.

KINTZ, P. et al. Alternative specimens. In: Negrusz, A.; Cooper, G. **Clarke's Analytical Forensic Toxicology**. 2nd ed. London: Pharmaceutical Press, 2013. cap. 6. p. 154-187.

KINTZ, P.; CIRIMELE, V.; SENGLER, C.; MANGIN, P. Testing human hair and urine for anhydroecgonine methyl ester, a pyrolysis product of cocaine. **J Anal Toxicol**, v. 19, Oct, 1995.

KLINE, J.; NG, S.K.; SCHITTINI, M.; LEVIN, B.; SUSSER, M. Cocaine use during pregnancy: sensitive detection by hair assay. **Am J Public Health**, v.87, p. 352-358, 1997.

KOVACS, G. Comorbidity - mind and body interconnection based on the new findings. **Neuropsychopharmacol Hung**, v. 16, n. 4, p. 169-80, 2014.

KROENKE, K.; SPITZER, R.L.; WILLIAMS, J.B.W. The PHQ-9: Validity of a brief depression severity measure. **J Gen Intern Med**, v. 16, p. 606–613, 2001.

KRONSTRAND, R.; FÖRSTBERG-PETERSON, S.; KÅGEDAL, B.; AHLNER, J.; LARSON, G. Codeine concentration in hair after oral administration is dependent on melanin content. **Clin Chem**, v. 45, n. 9, p. 1485-94, 1999.

KUMAZAWA, T.; HASEGAWA, C.; PEN-LEE, X.; HARA, K.; SENO, H.; SUZUKI, O.; SATO, K. Simultaneous determination of methamphetamine and amphetamine in human urine using pipette tip solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **J Pharmac and Biomed Analysis**, v. 44, p. 602-607, 2007.

LAMBERT, S. Disposable pipette tip extraction – leaner, greener sample preparation. **Chromatogr**, June, 2009.

II LEVANTAMENTO NACIONAL DE ÁLCOOL E DROGAS (LENAD) – 2012. Ronaldo Laranjeira (Supervisão) [et al.], São Paulo: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas de Álcool e Outras Drogas (INPAD), UNIFESP. 2014.

LEDGERWOOD, D.M.; GOLDBERGER, B.A.; RISK, N.K.; LEWIS, C.E.; PRICE, R.K. Comparison between self-report and hair analysis of illicit drug use in a community sample of middle-age men. **Addict Behav**, v. 33, n.9, Sep, p. 1131–1139, 2008.

LEE, S.; HAN, E.; IN, S.; CHOI, H.; CHUNG, H.; CHUNG, K.H. Analysis of pubic hair as an alternative specimen to scalp hair: A contamination issue. *Forensic Sci Int*, v. 206, p. 19-21, 2011.

LENDOIRO, E.; QUINTELA, O.; de CASTRO, A.; CRUZ, A.; LÓPEZ-RIVADULLA, M.; CONCEIRO, M. Target screening and confirmation of 35 licit and illicit drugs and metabolites in hair by LC-MSMS. **Forensic Sci Int**, v. 217, p. 207–215, 2012.

LÓPEZ, P.; MARTELLO, S.; BERMEJO, A.M.; DE VINCENZI, E.; TABERNERO, M.J.; CHIAROTTI, M. Validation of ELISA screening and LC-MS/MS confirmation methods for cocaine in hair after simple extraction. **Anal Bioanal Chem**, v. 397, n. 4, p. 1539–1548, 2010.

MAGURA, S.; FREEMAN, R.; SIDDIQI, Q.; LIPTON, D.S. The validity of hair analysis for detecting cocaine and heroin use among addicts. **Int J Addictions**, v.27, p. 54-69, 1992.

MANGIN, P.; KINTZ, P. Variability of opiates concentrations in human hair according to their anatomical origin - head, axillary and pubic regions. **Forensic Sci Int**, v. 63, p. 77-83, 1993.

MANWELL, L.B.; CZABALA, J. C.; IGNACZAK, M.; MUNDT, M. P. Correlates of depression among heavy drinkers in Polish primary care clinics. **Int J Psychiatry Med**, v. 34, p. 165-78, 2004.

MARI, J.J.; WILLIAMS, P. A Validity Study of a Psychiatric Screening Questionnaire (SRQ-20) in Primary Care in the city of Sao Paulo. **Br J Psychiatry**, v. 148, p. 23-26, Jan, 1986.

MARTINS, D. Taxa de desemprego atinge minima histórica em 2014, aponta IBGE. Disponível em: <http://www.valor.com.br/brasil/3883962/taxa-de-desemprego-atinge-minima-historica-em-2014-aponta-ibge>. Acesso em: 26 abril 2014.

MATUSZEWSKI, B.K.; CONSTANZER, M.L.; CHAVEZ-ENG, C.M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. **Anal Chem**, v. 75, n. 13, p. 3019–3030, 2003.

MEHMEDIC, Z.; CHANDRA, S.; SLADE, D.; DENHAM, H.; FOSTER, S.; PATEL, A.S.; ROSS, S.A. KHAN, I.A.; ELSOHL, M.A. Potency trends of Δ^9 -THC and other cannabinoids in confiscated cannabis preparations from 1993 to 2008. **J Forensic Sci**, v. 55, n.5, Sep, p. 1209-17, 2010.

MEROLA, G.; GENTILI, S.; TAGLIARO, F.; MACCHIA, T. Determination of different recreational drugs in hair by HS-SPME and GC/MS. **Anal Bioanal Chem**, v. 397, p. 2987-2995, 2010.

MIECZKOWSKI, T. Assessing the potential of a “color effect” for hair analysis of 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol: analysis of a large sample of hair specimens. **Life Sci**, v. 74, p. 463-469, 2003.

MIECZKOWSKI, T.; BARZELAY, D.; GROPPER, B.; WISH, E. Concordance of three measures of cocaine use in an arrestee population: hair, urine, and self-report. **J Psychoactive Drugs**, v. 23, p. 241-249, 1991.

MIKI, A.; KATAGI, M.; TSUCHIHASHI, H. Determination of methamphetamine and its metabolites incorporated in hair by column-switching liquid chromatography-mass spectrometry. **J Anal Toxicol**, v. 27, n. 2, Mar, p. 95-102, 2003.

MILLER, E.I.; WYLIE, F.M.; OLIVE, J.S.S. Simultaneous detection and quantification of amphetamines, diazepam and its metabolites, cocaine and its metabolites, and opiates in hair by LC-ESI-MSMS using a single extraction method. **J Anal Toxicol**, v. 32, p. 457–469, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Ministério da Saúde lança Campanha nacional sobre crack. Disponível em <<http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias>>. Acesso em: 10 novembro 2009.

MONTAGNA, M.; STRAMESI, C.; VIGNALI, C.; GROPPI, A.; POLETTINI, A. Simultaneous hair testing for opiates, cocaine, and metabolites by GC-MS: a survey of applicants for driving licenses with a history of drug use. **Forensic Sci Int**, v. 107, p. 157-167, 2000.

MOORE, C.; COULTER, C.; CROMPTON, K. Determination of cocaine, benzoylecgonine, cocaethylene and norcocaine in human hair using solid-phase extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. **J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci**, v. 859, n. 2, p. 208–212, 2007.

MOORE, C.; GUZALDO, F.; DONAHUE, T. The determination of 11-nor-delta9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid (THC-COOH) in hair using negative ion gas chromatography-mass spectrometry and high-volume injection. **J Anal Toxicol**, v. 25, n. 7, Oct, p. 555-8, 2001.

MORGAN, C.J.; GARDENER, C.; SCHAFER, G.; SWAN, S.; DEMARCHI, C.; FREEMAN, T.P.; WARRINGTON, P.; RUPASINGHE, I.; RAMOUTAR, A.; TAN, N.; WINGHAM, G.; LEWIS, S.; CURRAN, H.V. Sub-chronic impact of cannabinoids in street cannabis on

cognition, psychotic-like symptoms and psychological well-being. **Psychol Med**, v. 42, n. 2, Feb, p. 391-400, 2012.

MORGAN, C.J.A.; CURRAN, H.V. Effects of cannabidiol on schizophrenia-like symptoms in people who use cannabis. **B J Psychiatry**, v. 192, p. 306-07, 2008.

MORGAN, C.J.A.; FREEMAN, T.P.; SCHAFER, G.L.; CURRAN, H.V. Cannabidiol attenuates the appetitive effects of d9-tetrahydrocannabinol in humans smoking their chosen cannabis. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, p. 1879-1885, 2010.

MUNRO, S.; THOMAS, K.L.; ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nature**, v. 365, p. 61-65, 1993.

MUSSHOFF, F.; ROSENDAHL, W.; MADEA, B. Determination of nicotine in hair samples of pre-Columbian mummies. **Forensic Sci Int**, v. 185, p. 84-88, 2009.

MUSSHOFF, F.; MADEA, B. Analytical pitfalls in hair testing. **Anal Bioanal Chem**, v. 388, p. 1475-1494, 2007.

MUSSHOFF, F.; DRIEVER, F.; LACHENMEIER, K.; LACHENMEIER, D.W.; BANGER, M.; MADEA, B. Results of hair analyses for drugs of abuse and comparison with self-reports and urine tests. **Forensic Sci Int**, v. 156, p. 118-123, 2006.

MUSSHOFF, F.; JUNKER, H.P.; LACHENMEIER, D.W.; LARS, K.; MADEA, B. Fully automated determination of cannabinoids in hair samples using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **J Anal Toxicol**, v. 26, p. 554-560, 2002.

NADULSKI, T.; PRAGST, F. Simple and sensitive determination of 9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and cannabinol in hair by combined silylation, headspace solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **J Chromatogr B**, v. 846, p. 78-85, 2007.

NIDA, National Institute on Drug Abuse. Comorbidity: Addiction and Other Mental Illnesses. Research report series 2010. Disponível em: <<http://www.drugabuse.gov/publications/research-reports/comorbidity-addiction-other-mental-illnesses/letter-director>>. Acesso dia 25 de abril 2015.

OFFIDANI, C.; ROSSI, S.S.; CHIAROTTI, M. Drug distribution in the head - axillary and pubic hair of chronic addicts. **Forensic Sci Int**, v. 67, p. 105-108, 1993.

OSÓRIO, F.L.; CRIPPA, J.A.S.; LOUREIRO, S.R. Further psychometric study of the Beck Anxiety Inventory including factorial analysis and social anxiety disorder screening. **Int J Psychiatry Clin Pract**, v. 15, n. 4, Nov, p. 255-262, 2011.

OSÓRIO, F.L.; CRIPPA, J.A.S.; LOUREIRO, S.R. Cross-cultural validation of the Brazilian Portuguese version of the Social Phobia Inventory (SPIN): study of the items and internal consistency. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 31, n. 1, p. 25-29, 2009.

OSÓRIO, F.L.; MENDES, A.M.; CRIPPA, J.A.S.; LOUREIRO, S.R. Study of the Discriminative Validity of the PHQ-9 and PHQ-2 in a Sample of Brazilian Women in the Context of Primary Health Care. **Perspectives in Psychiatric Care**, v. 45, n. 3, July, 2009.

PATERSON, S.; LEE, S.; CORDERO, R. Analysis of hair after contamination with blood containing cocaine and blood containing benzoylecgonine. **Forensic Sci Int**, v. 30, Jan, p. 94-6, 2010.

PICHINI, S.; VENTURA, M.; PUJADAS, M.; VENTURA, R.; PELLEGRINI, M.; ZUCCARO, P.; PACIFICI, R.; De La TORRE, R. HAIRVEQ: an external quality control scheme for drugs of abuse analysis in hair. **Forensic Sci Int**, v. 29, Oct, p. 109-15, 2004.

PELIÇÃO, F.S.; PERES, M.D.; PISSINATE, J.F.; De MARTINIS, B.S. A One-Step Extraction Procedure for the Screening of Cocaine, Amphetamines and Cannabinoids in Postmortem Blood Samples. **J Anal Toxicol**, v. 38, p. 341-348, 2014.

PERES, M. D.; PELIÇÃO, F.S.; CALEFFI, B.; De MARTINIS, B.S. Simultaneous Quantification of Cocaine, Amphetamines, Opiates and Cannabinoids in Vitreous Humor. **J Anal Toxicol**, v. 38, n. 1, p. 39-45, Jan-Feb, 2014.

PETERS, F.T. Recent advances of liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry in clinical and forensic toxicology. **Clin Biochem**, v. 44, p. 54-65, 2011.

PETERS, F.T.; DRUMMER, O.H.; MUSSHOF, F. Validation of new methods. **Forensic Sci Int**, v. 165, p. 216-224, 2007.

PETERS, F.T. Method validation using LC-MS. In: Poletini, A. **Application of LC-MS in toxicology**. London, Cap. 4, p. 71-95, 2006.

PÖTSCH, L.; SKOPP, G.; MOELLER, M.R. Biochemical approach on the conservation of drug molecules during hair fiber formation. **Forensic Sci Int**, v. 84, p. 25-35, 1997.

PRAGST, F.; BALIKOVA, M.A. State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. **Clin Chim Acta**, v. 370, p. 17-49, 2006.

RISAL, A. Common mental disorders. **Kathmandu Univ Med J**, v. 35, n. 3, p. 213-217, 2011.

ROMANO, G.; BARBERA, N.; LOMBARDO, I. Hair testing for drugs of abuse: evaluation of external cocaine contamination and risk of false positive. **Forensic Sci Int**, v. 123, p. 119-129, 2001.

ROMOLO, F.S.; ROTOLO, M.C.; PALMI, I.; PACIFICI, R.; LOPEZ, A. Optimized conditions for simultaneous determination of opiates, cocaine and benzoylecgonine in hair samples by GC-MS. **Forensic Sci Int**, v. 138, p. 17-26, 2003.

ROPERO-MILLER, J.D.; HUESTIS, M.A.; STOUT, P.R. Cocaine analytes in human hair: evaluation of concentration ratios in different cocaine sources, drug-user populations and surface-contaminated specimens. **J Anal Toxicol**, v. 36, n. 6, p. 390-398, 2012.

SANCHES, R.F.; MARQUES, J.M.A. Cannabis e humor. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 32, n. 2, jun, 2010.

SANTOS, K.O.B.; ARAÚJO, T.M.; OLIVEIRA, N.F. Estrutura fatorial e consistência interna do Self-Reporting Questionnaire (SRQ-20) em população urbana. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 1, p. 214-222, Jan, 2009.

SANTOS, K.O.B.; ARAÚJO, T.M.; PINHO, P.S.; SILVA, A.C.C. Avaliação de um instrumento de mensuração de morbidade psíquica: Estudo de validação do self-reporting questionnaire (SRQ-20). **Revista Baiana de Saúde Pública**, v.34, n.3, p.544-560, Jul/set, 2010.

SCHAFFER, M.; HILL, V.; CAIRNS, T. Hair analysis for cocaine: the requirement for effective wash procedures and effects of drug concentration and hair porosity in contamination and decontamination. **J Anal Toxicol**, v. 29, July/august, 2005.

SCHUBART, C.D.; SOMMER, I.E.C.; WILLEMIJN, A.; GOETGEBUER, R.L.; KAHN, R.S.; BOKS, M.P.M. Cannabis with high cannabidiol content is associated with fewer psychotic experiences. **Schizophr Res**, v. 130, Aug, p. 216-21, 2011.

SCHUCKIT, M.A. Comorbidity between substance use disorders and psychiatric conditions. **Addiction**, v. 101, suppl 1, p. 76-88, 2006.

SCOTT, K.S.; NAKAHARA, Y. A study into the rate of incorporation of eight benzodiazepines into rat hair. **Forensic Sci Int**, v. 133, p. 47-56, 2003.

SERGI, M.; NAPOLETANO, S.; MONTESANO, C.; IOFRIDA, R.; CURINI, R.; COMPAGNONE, D. Pressurized-liquid extraction for determination of illicit drugs in hair by LC-MS-MS. **Anal Bioanal Chem**, v. 405, p. 725-735, 2012.

SHARMA, P.; MURTHY, P.; BHARATH, M.M.S. Chemistry, Metabolism, and Toxicology of Cannabis: Clinical Implications. **Iran J Psychiatry**, v. 7, n. 4, p. 149-156, 2012.

SILVA, C.C.; COSTA, M.C.O.; CARVALHO, R.C.; AMARAL, M.T.R.; CRUZ, N.L.A.; SILVA, M.R. Iniciação e consumo de substâncias psicoativas entre adolescentes e adultos jovens de Centro de Atenção Psicossocial Antidrogas/CAPS-AD. **Ciênc saúde coletiva**, v.19, n.3, p. 737-745, 2014.

SILVEIRA, D.X.; JORGE, M.R. Co-morbidade psiquiátrica em dependentes de substâncias psicoativas: resultados preliminares. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 21, n. 3, Set, p. 145-151, 1999.

SKENDER, L.; KARACIC, V.; BRCIC, I.; BAGARIC, A. Quantitative determination of amphetamines, cocaine and opiates in human hair by gas chromatography/mass spectrometry. **Forensic Sci Int**, v. 125, p. 120-126, 2002.

SKOPP, G.; STROHBECK-KUEHNER, P.; MANN, K.; HERMANN, D. Deposition of cannabinoids in hair after long-term use of cannabis **Forensic Sci Int**, v. 170, p. 46-50, 2007.

SMITH, F.P.; KIDWELL, D.A. Cocaine in hair, saliva, skin, swabs and urine of cocaine users children. **Forensic Sci Int**, v. 83, p. 179-189, 1996.

SOCIETY OF HAIR TESTING (SOHT). Recommendations for hair testing in forensic cases. **Forensic Sci Int**, v. 145, p. 83-84, 2004.

SOCIETY OF HAIR TESTING (SOHT). Society of Hair Testing. **Forensic Sci Int**, v. 84, p. 3-6, 1997.

SOUZA, I.C.W.; CANDIDO, C.F.G. Diagnóstico psicológico e terapia cognitiva: considerações atuais. **Revista brasileira de terapias cognitivas**, v. 5, n. 2, 2010.

STAUB, C. Chromatographic procedures for determination of cannabinoids in biological samples, with special attention to blood and alternative matrices like hair, saliva, sweat and meconium. **J Chromatogr B Biomed Sci Appl**, v. 15, Oct, p. 119-26, 1999.

STRANO-ROSSI, S.; CHIAROTTI, M. Solid-phase microextraction for cannabinoids analysis in hair and its possible application to other drugs. **J Anal Toxicol**, v. 23, Jan/Feb, 1999.

SUENAMI, K.; WAH LIM, L.; TAKEUCHI, T.; SASAJIMA, Y.; SATO, K.; TAKEKOSHI, Y.; KANNO, S. Direct determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs by column-switching LC-MS. **J Sep Sci**, v. 29, n. 18, p. 2725-32, 2006.

SVIZENSKA, I.; DUBOVY, P.; SULCOVÁ, A. Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures — A short review. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 90, n. 4, Oct, p. 501-11, 2008.

SWIFT, W.; WONG, A.; LI, K.M.; JONATHON, C.A.; MCGREGOR, I.S. Analysis of Cannabis Seizures in NSW, Australia: Cannabis Potency and Cannabinoid Profile. **PLoS One**, v. 8, July, 2013.

TAKAHASHI, R.N.; ZUARDI, A.W.; KARNIOL, I.G. Composição química e importância dos diversos constituintes na atividade farmacológica de amostras de *Cannabis sativa* brasileiras. **Rev Bras Pesquisas Med Biol**, v. 10, n. 6, p. 379-385, 1977.

TOENNES, W.S.; FANDIÑO, A.S.; KAUERT, G. Gas chromatographic-mass spectrometric detection of anhydroecgonine methyl ester (methylecgonidine) in human serum as evidence of recent smoking of crack. **J Chromatogr B**, v. 735, p. 127-132, 1999.

TOLEDO, F.C.P.; YONAMINE, M.; MOREAU, R.L.M.; SILVA, O.A. Determination of cocaine, benzoylecgonine and cocaethylene in human hair by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **J Chromatogr B**, v. 798, p. 361-365, 2003.

TSANACLIS, L.; WICKS, J.F.C. Differentiation between drug use and environmental contamination when testing for drugs in hair. **Forensic Sci Int**, v. 176, p. 19-22, 2008.

TSUMURA, Y.; AOKI, R.; TOKIEDA, Y.; AKUTSU, M.; KAWASE, Y.; KATAOKA, T.; TAKAGI, T.; MIZUNO, T.; FUKADA, M.; FUJII, H.; KURAHASHI, K. A survey of the potency of Japanese illicit cannabis in fiscal year 2010. **Forensic Sci Int**, n. 221, p. 77-83, 2012.

UHL, M.; SACHS, H. Cannabinoids in hair: strategy to prove marijuana/hashish consumption. **Forensic Sci Int**, v.29, Oct, p. 143-7, 2004.

UNODC, United Nations Office on Drug and Crime. **Recommended methods for the identification and analysis of Cannabis and Cannabis products**. Viena, 2009.

UNODC, United Nations Office on Drug and Crime. **World Drug Report**. New York, 2012.

UNODC, United Nations Office on Drug and Crime. **World Drug Report**. New York, 2013.

UNODC, United Nations Office on Drug and Crime. **World Drug Report**. New York, 2014.

VEUTHEY, J.L.; SOUVERAIN, S.; RUDAZ, S. Column-switching procedures for the fast analysis of drugs in biologic samples. **Ther Drug Monit**, v. 26, n. 2, p.161-6, 2004.

VIEIRA, J.K.S.; CARVALHO, R.N.; AZEVEDO, E.B.; SILVA, P.M.C.; FILHA, M.O.F. Concepção sobre drogas: relatos dos usuários do CAPS-ad, de Campina Grande, PB. **Rev. Eletrônica Saúde Mental Álcool Drog**, v. 6, n. 2, Ago, 2010.

VILETE, L.; FIGUEIRA, I.; COUTINHO, E. Adaptação transcultural para o português do Social Phobia Inventory (SPIN) para utilização entre estudantes adolescentes. **Rev Psiquiatr RS**, v. 28, n. 1, jan/abr, p. 40-48, 2006.

VOGLIARDI, S.; TUCCI, M.; STOCCHERO, G.; FERRARA, S.D.; FAVRETTO, D. Sample preparation methods for determination of drugs of abuse in hair samples: A review. **Anal Chim Acta**, v. 857, p. 1-27, 2015.

ZANCHETTI, G; FLORIS, I; PICCINOTTI, A; TAMENI, S; POLETTINI, A. Rapid and robust confirmation and quantification of 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid (THC-COOH) in urine by column switching LC-MS-MS analysis. **J Mass Spectrom**, v. 47, n.1, p. 124-130, 2012.

ZUARDI, A.W. Aspectos históricos da Cannabis na medicina e em saúde mental. In: ZUARDI et al. **Cannabis e saúde mental: uma revisão sobre a droga de abuso e o medicamento**. São Paulo, 2008, cap 1, p. 3-16.

ZUARDI, A.W.; CRIPPA, J.A.; HALLAK, J.; MOREIRA, F.; GUIMARÃES, F. Cannabidiol, a *Cannabis sativa* constituent, as an antipsychotic drug. **Braz J Med Biol Res**, v. 39, n. 4, p. 421-429, 2006.

WADA, M.; IKEDA, R.; KURODA, N.; NAKASHIMA, K. Analytical methods for abused drugs in hair and their applications. **Anal Bioanal Chem**, v. 397, p. 1039-1067, 2010.

WAGNER, M.; BOURGOGNE, E.; VARESI, E.; HOPFGARTNER, G. Quantitation of polar analytes using column-switching: application to oxycodone and three metabolites in human plasma. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 1, Mar, p. 637-644, 2010.

WELCH, M.J.; SNIEGOSKI, L.T.; ALLGOOD, C.C.; HABRAM, M. Hair analysis for drugs of abuse: evaluation of analytical methods, environmental issues and development of reference materials. **J Anal Toxicol**, v. 17, Nov/Dec, 1993.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. The World health report 2001: Mental health - new understanding, new hope. Switerzland, 2001.

WILKINS, D.; HAUGHEY, H.; CONE, E.; HUESTIS, M.; FOLTZ, R.; ROLLINS, D. Quantitative analysis of THC, 11-OH-THC, and THCCOOH in human hair by negative ion chemical ionization mass spectrometry. **J Anal Toxicol**, v.19, n.6, Oct, p. 483-91, 1995.

WILLS, S. **Drugs of abuse**. 3 ed. Cambridge: The Pharmaceutical Press, 2002. Cap. 5, p. 48-60.

Apêndice A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TÍTULO DA PESQUISA: “Drogas de abuso em amostras de cabelo de voluntários atendidos no CAPS-AD de Ribeirão Preto e sua correlação com sintomas de ansiedade, depressão e psicose”.

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:

Marcela Nogueira Rabelo Alves, tel (16) 3602-0471, marcelausp76@usp.br

Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis, martinis@fmrp.usp.br

Prof. Dr. José Alexandre de Souza Crippa, jcrippa@fmrp.usp.br

PROMOTORES DA PESQUISA

Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP

Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP

Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

Você está sendo convidado para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte da pesquisa, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é dos pesquisadores responsáveis. Você é livre para não querer participar ou desistir da pesquisa a qualquer momento que desejar. Caso mude de idéia, você não será prejudicado e **o atendimento dado a você no CAPS-AD será o mesmo se você participar ou não da pesquisa**. Você tem direito a perguntar o que quiser durante a pesquisa. Você não pagará nada e também não receberá nenhum dinheiro ou benefício adicional.

MOTIVO DA PESQUISA

O objetivo dessa pesquisa é desenvolver um método de análise e detecção de drogas ilícitas como a cocaína, crack e maconha em cabelo. Esses resultados serão correlacionados com os questionários que você irá responder sobre sintomas de ansiedade, depressão e psicose. Esses sintomas podem surgir por razões diversas, entretanto, o uso de drogas pode intensificar ou mascarar esses efeitos. O uso de drogas como a cocaína, por exemplo, aumenta o estado de alerta, as sensações de bem-estar e euforia. Porém, podem acontecer também sensações indesejáveis para o usuário, como paranóia, ansiedade, inquietação, convulsão. Os sintomas de uso prolongado incluem suor frio, tremores, comportamento violento e distúrbios psiquiátricos.

O uso de anfetaminas provoca batimento acelerado do coração, dilatação da pupila e, em casos de overdose, convulsões e alterações do comportamento. O uso da maconha pode causar ansiedade naquelas pessoas que usam de vez em quando. Em altas doses, a maconha pode causar intensa sensação de medo e ansiedade. Com doses ainda maiores, ataques de pânico e fobia podem ocorrer. Por isso, é importante observar se os sintomas que o paciente apresenta são devido ao consumo de drogas ou são ligados a uma doença psiquiátrica.

PROCEDIMENTOS DA PESQUISA

Se você concordar em participar da pesquisa, será coletada uma amostra de cabelo da sua cabeça, bem próximo à nuca, uma amostra de urina e você será convidado a

responder alguns questionários. O cabelo será analisado para verificar a presença de maconha, cocaína e crack, e a urina será utilizada para realização de um teste rápido para triagem das mesmas drogas citadas acima.

RISCOS E/OU DESCONFORTOS

A coleta do cabelo não trará nenhum desconforto ou risco para você, o único desconforto possível, será a retirada de alguns fios de cabelo próximos à nuca, sem causar danos estéticos. A coleta da urina também não trará nenhum desconforto ou risco para você. Será fornecido o frasco para você mesmo coletar sua urina.

BENEFÍCIOS

Caso seja detectado algum transtorno psiquiátrico, você será encaminhado para tratamento específico no CAPS-AD.

CONFIDENCIALIDADE

Os seus dados são confidenciais. Você será identificado por um número. As informações obtidas na entrevista e o resultado da análise sobre a presença ou ausência das substâncias nas amostras de cabelo e urina serão mantidas em segredo. Você não será identificado em nenhum trabalho que possa resultar dessa pesquisa.

PROBLEMAS OU PERGUNTAS

Se você tiver alguma pergunta ou qualquer dúvida sobre essa pesquisa, entre em contato com **Marcela Nogueira Rabelo Alves** ou **Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis** ou **Prof. Dr. José Alexandre de Souza Crippa** pelos telefones: (16) 3602-0471. Em caso de dúvida você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP, tel (16) 3602-4213.

ASSINATURAS

Se tiver lido o consentimento livre e esclarecido, tiver entendido a Informação e concordar voluntariamente em participar desse estudo, por favor, assine abaixo:

_____	_____	_____
Nome do voluntário	Assinatura do voluntário	Data

_____	_____	_____
Nome da testemunha	Assinatura da testemunha	Data

Eu expliquei o propósito desse estudo ao voluntário. Estou certo de que ele entendeu o propósito, os procedimentos, riscos e benefícios desse estudo.

Nome do pesquisador: _____

Assinatura: _____ Data: _____

Apêndice B – Questionário da pesquisa

1. NOME: _____

2. IDADE: _____

3. SEXO

() MASCULINO () FEMININO

4. ESCOLARIDADE

() 1º grau incompleto () 1º grau completo () 2º grau incompleto
() 2º grau completo () 3º grau incompleto () 3º grau completo

5. ESTADO CIVIL:

() Solteiro () Casado/Amaziado () Viúvo () Divorciado

7. ESTADO LABORAL:

() Desempregado () Empregado

8. Motivo de procurar o serviço (CAPS-AD):

9. COR DO CABELO:

10. Você já mudou a cor do seu cabelo alguma vez:

() SIM () NÃO

11. Quando isso aconteceu?

12. Você usou algum tipo de tintura, descolorante ou permanente?

13. Quando foi a última vez que você cortou o cabelo?

14. Você já usou maconha alguma vez na vida?

() SIM () NÃO

15. Quando foi a última vez que você usou maconha?

16. Com que frequência você usava/usa a maconha?

17. Que quantidade de maconha você usava/usa?

18. Você fica ou já ficou próximo a pessoas fumando maconha?

19. Você já usou cocaína alguma vez na vida?

() SIM

() NÃO

20. Qual a forma de uso?

() cheirou

() fumou

() injetou

() outra forma: _____

21. Quando foi a última vez que você usou cocaína?

22. Com que frequência você usava/usa cocaína?

23. Que quantidade de cocaína você usava/usa cocaína?

24. Você usou alguma bebida alcoólica enquanto usava cocaína?

25. Você fica ou já ficou próximo de pessoas fumando crack?

26. Você utiliza algum medicamento? Se sim, qual?

RESEARCH PAPER

Determination of cocaine and metabolites in hair by column-switching LC-MS-MS analysis

Marcela Nogueira Rabelo Alves · Gabriele Zanchetti ·
Alberto Piccinotti · Silvia Tameni ·
Bruno Spinosa De Martinis · Aldo Poletti

Received: 19 March 2013 / Revised: 1 May 2013 / Accepted: 4 May 2013 / Published online: 24 May 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract A method for rapid, selective, and robust determination of cocaine (CO) and metabolites in 5-mg hair samples was developed and fully validated using a column-switching liquid chromatography–tandem mass spectrometry system (LC-MS-MS). Hair samples were decontaminated, segmented, incubated overnight in diluted HCl, and centrifuged, and the diluted (1:10 with distilled water) extracts were analyzed in positive ionization mode monitoring two reactions per analyte. Quantifier transitions were: m/z 304.2→182.2 for CO, m/z 290.1→168.1 for benzoylecgonine (BE), and m/z 318.2→196.2 for cocaethylene (CE). The lower limit of quantification (LLOQ) was set at 0.05 ng/mg for CO and CE, and 0.012 ng/mg for BE. Imprecision and inaccuracy at LLOQ were lower than 20 % for all analytes. Linearity ranged between 0.05 and 50.0 ng/mg for CO and CE and 0.012 and 12.50 ng/mg for BE. Selectivity, matrix effect, process efficiency, recovery, carryover, cross talk, and autosampler stability were also evaluated during validation. Eighteen real hair samples and five samples from a commercial

proficiency testing program were comparatively examined with the proposed multidimensional chromatography coupled with tandem mass spectrometry procedure and our reference gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) method. Compared with our reference GC-MS method, column-switching technique and the high sensitivity of the tandem mass spectrometry detection system allowed to significantly reduce sample amount ($\times 10$) with increased sensitivity ($\times 2$) and sample throughput ($\times 4$), to simplify sample preparation, and to avoid that interfering compounds and ions impaired the ionization and detection of the analytes and deteriorate the performance of the ion source.

Keywords Column switching · LC-MS-MS · Hair testing · Cocaine and metabolites · Drugs of abuse

Introduction

According to the United Nations Office on Drugs and Crime [1], about 230 million people (5 % of the world's adult population) have used an illicit drug at least once in 2010. Global cocaine (CO) use in the same year was estimated to 13–19.5 million people between 15 and 64 years old. CO and other illicit drugs are responsible for the death of around 0.2 million people each year. They are also responsible for losses in economic and social development and for contributing to crime, instability, insecurity, and dissemination of many diseases. These figures account for the continuous pressure towards the development of efficient and effective diagnostic tools for assessing recent and past exposure to drugs.

Hair analysis is routinely applied in forensic science, occupational medicine and clinical toxicology for determination of past exposure to drugs of abuse, pharmaceuticals, environmental contaminants, and doping agents [2, 3]. In

M. N. R. Alves
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto,
Universidade de São Paulo, Av. do Café,
Ribeirão Preto 14040-903 São Paulo, Brazil

G. Zanchetti · A. Piccinotti · S. Tameni
Synlab Italia Srl, Via Orzinuovi,
111-25125, Brescia, Italy

B. S. De Martinis
Departamento de Química, Faculdade de Filosofia Ciências e
Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av.
Bandeirantes, 3900,
Ribeirão Preto 14040-901 São Paulo, Brazil

A. Poletti (✉)
Department of Public Health and Community Medicine,
University of Verona, P.le Scuro 10,
37134, Verona, Italy
e-mail: aldo.poletti@univr.it

Italy, as in many other European countries, hair testing for drugs of abuse is accepted in different forensic settings, e.g., for helping in cases of drugs of abuse-related deaths, rape and other cases of criminal responsibility [4], children custody, evaluation of abstinence from illicit drugs [5], and for assessing driving fitness [6, 7].

The analysis of CO and metabolites in hair can provide a long history of use or abuse because, when the drug is incorporated into hair, a stable complex is formed that entraps the analyte in the hair matrix [8, 9]. CO extraction has been referred to as the most time-consuming step in hair analysis [10] because of this stability. Moreover, hair shows many advantages compared with traditional substrates, such as blood and urine: easy and noninvasive collection, matrix stability, easy transportation, and storage [11, 12].

Gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) has been widely used to identify and quantify CO and metabolites in hair [10, 12–14]. However, liquid chromatography (LC) is a straightforward alternative technique to GC since it does not require derivatization nor thermal stability and volatility of analytes [15].

Many authors have been reporting LC coupled to mass spectrometry (LC-MS) or tandem mass spectrometry (MS-MS) to determine CO and metabolites in hair [16–24]. In 2009, Huang et al. [25] developed a fast and sensitive method for simultaneous determination of morphine, codeine, 6-acetylmorphine, CO, and benzoylecgonine (BE), using 20 mg of hair sample. Hair was pulverized and incubated at 40 °C for 4 h in methanol under ultrasonification for analytes extraction. Then, a 50- μ l aliquot was injected into the liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) system.

Favretto et al. [26] developed and validated a simultaneous method for screening and quantification of 28 drugs in hair samples. According to the tendency towards simplification of sample preparation and reduction of sample size, the authors have used only 2.5 mg of hair and a pulverizing/extraction procedure that dramatically reduced sample preparation and extraction time from 18 h to less than 10 min. However, they used LC coupled with high-resolution mass spectrometry at a nominal resolution of 60,000, with concomitant in-source collisional experiments (in source CID).

Lendoiro et al. [27] developed and fully validated a LC-MS-MS method using 50 mg of hair for identification and quantification of 35 licit and illicit drugs and metabolites, including CO and its main metabolite, BE. However, they adopted a somewhat complex sample preparation, consisting of overnight incubation in acetonitrile, liquid–liquid extraction (hexane/ethyl acetate at pH 9), followed by solid-phase extraction (polymeric reversed-phase cartridges, and a 45- μ l aliquot was injected in the LC-MS-MS.

Considering the complexity of hair matrix, direct or high sample volume injections of the extract may result in a rapid increase in back pressure of the chromatographic system, deterioration of column performance, and matrix effect [28]. An efficient strategy for avoiding such problems is the use of column-switching (or coupled-column) technique, where a pre-column is coupled to the analytical column using a 6- or 10-port switching valve. Column-switching technique increases method sensitivity because it prevents the introduction of high amount of interfering ions into the MS source. In addition, it enables a rapid setup of chromatographic conditions so that the analyte is eluted from the chromatographic system with a high percentage of organic modifier [29]. It also increases the selectivity due to the possibility to choose a different type of pre-column from the analytical column and allows reducing time to perform the analysis [30].

Borrey et al. [31] have developed a column-switching LC-MS-MS method for quantitative determination of testosterone in human serum. Wagner et al. [32] have used column-switching LC-MS-MS for determination of oxycodone and its main metabolites in human plasma, and Miki et al. [33] for determination of methamphetamine and metabolites in hair. Recently, our group applied column-switching MS-MS to the high throughput and robust determination of 11-nor- Δ 9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in urine [34]. The aim of this study was to develop and validate a fast method for the selective quantification of CO and metabolites using a small amount of hair sample (5.0 mg) in a column-switching LC-MS-MS system.

Experimental

Chemical and reagents

Ammonium acetate, methanol, acetonitrile, and acetic acid, all LC-MS grade, and *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA) were purchased from Sigma Aldrich (Milan, Italy). Strata C solid-phase extraction cartridges (mixed-mode cationic and reversed-phase) for GC-MS analyses were obtained from Phenomenex (Castelmaggiore, Bologna, Italy). CO, BE, and cocaethylene (CE), as well as the internal standards cocaine-d3 (CO-d3) and benzoylecgonine-d3 (BE-d3), were obtained from LGC Standards (Milan, Italy) as 1 mg/ml methanol solutions. Combined working solutions of the three analytes at 20.0, 1.0, and 0.1 ng/ μ l for CO and CE and 5.0, 0.25, and 0.025 ng/ μ l for BE, respectively, were prepared. A combined solution of internal standards (0.5 and 0.1 ng/ μ l for CO-d3 and BE-d3, respectively) was similarly prepared. All the solutions were diluted in methanol and stored at 4 °C. Calibrators and quality controls (QC) were prepared by addition of different amounts of CO, BE, and CE standards to blank hair samples. QC

samples were prepared at 0.05 ng/mg CO, CE, and 0.012 ng/mg BE; 0.20 ng/mg CO, CE, and 0.05 ng/mg BE; and 10.0 ng/mg CO, CE, and 2.5 ng/mg BE levels.

Hair samples

Blank hair obtained from laboratory personnel and relatives, as well as anonymous specimens testing negative for all analytes by GC-MS were used throughout the study. Real-positive samples, as well as samples from a Proficiency Testing Program (Arvecon GmbH, Walldorf, Germany) were also used for method validation purposes.

Sample preparation

At first, intact hair samples were placed in a glass tube and decontaminated with 1 ml dichloromethane followed by 1 ml methanol. After solvent addition and vortex mixing (30 s), the solvent was removed with a Pasteur pipette. After the second washing, solvent residues were removed from hair under a mild nitrogen stream at room temperature for 15 min. Hair was then cut with scissors into small pieces (1–2 mm segments) and stored at room temperature until analysis.

Hair aliquots (5 mg, approximately) were placed in an Eppendorf tube and spiked with the deuterated internal standards solution, in order to obtain a final concentration of 1 ng/mg (CO-d3) and 0.2 ng/mg (BE-d3). Then, 100 μ l of 0.1 M HCl was added and, after a brief vortex mixing and centrifugation, the sample was incubated overnight in a water bath at 45 °C. After incubation, a rapid centrifugation (2,000 $\times$ g, 1 min) was performed to precipitate the hair at the bottom of the Eppendorf tube. A 25- μ l aliquot of the supernatant was placed in a new Eppendorf tube, diluted (1:10) with distilled water, and centrifuged at 4,500 $\times$ g for 10 min. Then, a 200- μ l aliquot was transferred into a HPLC autosampler vial and 10 μ l were injected into the column-switching LC-MS-MS system.

Instrumental analysis

Column-switching LC analyses were carried out using an Agilent 1260 HPLC system equipped with a vacuum degasser, a binary pump, an autosampler operated at room temperature, a column oven set at 35 °C and fitted with an electronically controlled six-port switching valve. Chromatographic separation was carried out using an Agilent (Waldbronn, Germany) Eclipse XDB-C8 (12.5 mm $\times$ 2.1 mm $\times$ 5 μ m) as column 1 and a Phenomenex (Torrance, USA) Kinetex C18 100A (50 mm $\times$ 2.1 mm $\times$ 2.6 μ m) as column 2. Solvent A was 5.0 mM ammonium acetate solution and solvent B was acetonitrile. The gradient and switching valves program are shown in Table 1.

Table 1 Gradient and switching valves program

Time (min)	Solvent B (%)	LC switching valve	MS switching valve
0.00	2	Column 1	Waste
0.80	2	Column 1+2	Waste
1.20	2	Column 1+2	Waste
1.21	30	Column 1+2	MS
4.00	70	Column 1+2	MS
4.01	2	Column 1+2	MS
4.50	2	Column 1+2	Waste
7.00	2	Column 1+2	Waste

The flow rate was at 0.4 ml/min and total run time, including post-run equilibration, was 7.0 min.

An Agilent 6460 triple quadrupole mass spectrometer equipped with a Jet Stream electrospray ion source operating in positive-ion mode was used as detection system. The source parameters were: source temperature, 325 °C; source gas flow, 10 l/min; sheath gas temperature, 400 °C; sheath gas flow, 12 l/min; nebulizer pressure, 50 psi; capillary voltage, 4,000 V; and nozzle voltage, 0 V. The transitions were monitored with both quadrupoles operated at unit resolution. Transitions, collision energy and fragmentor voltage are described in Table 2. For all transitions, dwell time was set at 50 ms.

Instrument control and data acquisition and processing were performed using an Agilent MassHunter workstation (B.04.00 version). Identification criteria were: deviation in relative retention time of 1 % or less and relative ion intensity (peak areas) between qualifier and quantifier of ± 20 % for the analytes in sample and in quality control.

Table 2 Monitored reactions, fragmentor voltage, and collision energy for cocaine (CO) and its deuterated standard (CO-d3), cocaethylene (CE), benzoylecgonine (BE), and its deuterated standard (BE-d3)

Analytes	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Fragmentor voltage (V)	Collision energy (V)
CO	304.2	182.2 ^a	112	18
		82.2	112	30
CO-d3	307.2	185.1 ^a	112	18
		85.1	112	30
CE	318.2	196.2 ^a	119	18
		82.2	119	30
BE	290.1	168.1 ^a	112	18
		77.1	112	62
BE-d3	293.2	171.1 ^a	112	18
		77.1	112	62

^aQuantifier transition

GC-MS reference method

Real and PTP samples were also submitted to the reference GC-MS procedure used in the laboratory in order to verify the performance of the column-switching LC-MS-MS method. Hair decontamination and segmentation were performed as described earlier. Aliquots of washed and segmented hair (50 mg, approximately) were added with 1 ml 0.1 M HCl and, after a brief vortex mixing and centrifugation, samples were incubated overnight in a water bath at 45 °C. After cooling at room temperature, 1 ml of phosphate buffer of 0.1 M at pH 6 followed by 1 M KOH were added to the mixture in order to obtain a final pH around 6–7. After centrifugation at 2,000×g for 5 min, samples were passed through a Phenomenex Strata Screen C cartridges previously conditioned with 2 ml methanol and 2 ml phosphate buffer of 0.1 M at pH 6. After washing with 2-ml distilled water followed by 3 ml 0.1 M HCl and 5 ml methanol, analytes were eluted twice with 1 ml of a dichloromethane/isopropanol (8:2) mixture containing 2 % (v/v) ammonium hydroxide. After solvent evaporation under nitrogen stream, extracts were reconstituted with 50 µl MSTFA and derivatized at 75 °C for 15 min in order to obtain the trimethylsilyl (TMS) derivative of BE. GC-MS analyses were performed using an Agilent 7890 gas chromatograph coupled to an Agilent 5975C mass selective detector equipped with a 7673C autosampler. Chromatographic separation was carried out on a J&W capillary column (30 m×0.25 mm×0.25 µm) at constant flow (1.6 ml/min) of helium. Injections (1 µl) were performed in pulsed splitless mode (21 psi until 1 min) at 250 °C. Column temperature program was: from 90 (1 min) to 325 °C at 45 °C/min followed by 6 min at 325 °C. GC-MS interface was set at 300 °C, MS EI source at 230 °C, and MS quadrupole at 150 °C. The following ions were monitored: m/z 82.0, 182.2 (quantifier), and 303.3 for CO; m/z 85.0, 185.2 (quantifier), and 306.3 for CO-d3; m/z 82.0, 196.2 (quantifier), and 317.3 for CE (ISTD, CO-d3); m/z 240.2 (quantifier), 346.3, and 361.4 for BE-TMS; and m/z 243.2 (quantifier), 349.3, and 364.4 for BE-d3-TMS. CE analysis was performed only qualitatively (0.1 ng/mg). The total run time, including column equilibration, was 16 min. Identification criteria were: deviation in relative retention times of 0.5 % or less and relative ion intensities (peak areas) between each qualifier and quantifier of ± 20 % for analytes in sample and quality control. The lower limits of quantification (LLOQ) were: 0.1 ng/mg for CO and 0.03 ng/mg for BE.

Method validation

Selectivity, limit of quantification, linearity, accuracy, precision, matrix effects, process and recovery efficiency, carryover, cross talk, and autosampler stability were evaluated.

Selectivity

Nine blank hair samples were analyzed for verifying potential interferences or adverse matrix effects during early validation phase.

Limit of quantification

The LLOQ was arbitrarily established at 0.05 ng/mg of CO and CE, and 0.012 ng/mg of BE, corresponding to one tenth and one fourth of the confirmation cut-offs proposed by the Society for Hair Testing [35], respectively, after verifying intra- and interday precision and accuracy.

Linearity

Calibration curves were prepared daily by analyzing blank hair samples spiked with 0.05, 0.20, 0.50, 2.0, 10.0, and 50.0 ng/mg CO and CE and 0.012, 0.05, 0.125, 0.50, 2.50, and 12.50 ng/mg BE. The best fitting calibration curve was estimated using the Curve-Fit Assistant software available in the Agilent MassHunter workstation.

Accuracy and precision

These were determined on QCs. Intraday precision was assessed by analyzing five replicates of each QC, while interday precision was evaluated by analyzing QC samples on five different days.

Matrix effects, process efficiency and recovery extraction

Matrix effects (ME), process efficiency (PE), and recovery extraction (RE) were evaluated using the post-extraction addition method [36, 37] at two levels (0.20 ng/mg CO, CE, and 0.05 ng/mg BE; 10.0 ng/mg CO, CE, and 2.5 ng/mg BE) on six blank hair samples of different origin. Absolute peak areas obtained for the pre-extraction addition (A), post-extraction addition (B), and pure standard solution (C) were calculated according to the following formulas: $RE = A/B \times 100$; $ME = B/C \times 100$; and $PE = ME \times RE / 100 = A/C$ [38].

Carryover and cross talk

Carryover was assessed by injecting a blank hair sample immediately after the highest point of the calibration curve. Cross talk between CO or BE and the respective deuterated internal standard were evaluated by separate injections of nondeuterated and deuterated standard (absolute amount, 4 ng) and by measuring the signal of the quantifier transition of the missing analyte.

Fig. 1 Example mass chromatograms obtained for a blank (*left*), LLOQ (*center*), and from sample 8 of Table 5 (*right*). Transitions: *A* *m/z* 318.2→82.2 (CE), *B* *m/z* 318.2→196.2 (CE), *C* *m/z* 307.2→85.1 (CO-*d*3), *D* *m/z* 307.2→185.1 (CO-*d*3), *E* *m/z* 304.2→82.2 (CO), *F* *m/z* 304.2→182.2 (CO), *G* *m/z* 293.2→77.1 (BE-*d*3), *H* *m/z* 293.2→171.1 (BE-*d*3), *I* *m/z* 290.1→77.1 (BE), and *J* *m/z* 290.1→168.1 (BE)

Autosampler stability

It was evaluated by re-injecting extracts after standing 72 h in autosampler set at room temperature.

Proof of applicability

The method was applied to 23 authentic hair samples. The results obtained by multidimensional chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-LC-MS-MS) analysis were compared with those obtained by GC-MS for the same samples.

Results and discussion

The progressive increase in the number of requests for hair analysis for drugs of abuse in different clinical and forensic applications requires efficient and effective analytical methods. To this respect, column-switching LC-MS-MS

offers many advantages over GC-MS as, in addition to its higher versatility, it allows to simplify sample preparation (no purification and derivatization of the extract required) and to significantly increase the sample throughput. Excluding the overnight incubation step, which is identical for both, the proposed LC-LC-MS-MS method provides a sample throughput approximately four times higher than our reference GC-MS method. The application of column-switching LC in combination with tandem mass spectrometry has the further advantage of an easy setup of gradient conditions in order to obtain the elution of analytes at a high percentage of organic solvent, thus positively affecting analytes' ionization efficiency and method sensitivity.

The addition of a second LC step proved to be necessary in order to avoid the high amount of matrix compounds and ions to interfere with ionization and detection of analytes. However, the use of a relatively cheap guard column (C8, 12.5 mm×2.1 mm×5 μm) as column 1 allowed accomplishing this task with a very limited increase in cost of analysis and without affecting robustness and chromatographic resolution. The very

Table 3 Intra- (*n*=5) and interday (*n*=5) imprecision and inaccuracy results for cocaine (CO), cocaethylene (CE), and benzoylecgonine (BE) in hair

Analytes	QC concentration (ng/mg)	Intraday imprecision (CV%)	Intraday inaccuracy (%)	Interday imprecision (CV%)	Interday inaccuracy (%)
CO	0.05	2.8	112.9	8.1	99.6
	0.20	3.9	108.9	9.9	95.4
	10.0	7.4	100.0	3.4	97.8
CE	0.05	4.2	112.1	10.0	95.9
	0.20	4.1	112.7	9.4	98.4
	10.0	7.1	100.0	4.0	97.6
BE	0.012	4.7	107.0	8.3	101.0
	0.05	2.9	109.4	9.2	100.2
	2.50	5.9	100.0	3.3	98.7

Table 4 Recovery, matrix effect, and process efficiency results for cocaine (CO), cocaethylene (CE), and benzoylecgonine (BE) in hair

Analytes	QC samples (ng/mg)	Recovery (%)	Matrix effect (%)	Process efficiency (%)
CO	0.2	53±18	14±17	59±14
	10.0	58±9	13±9	65±7
CE	0.2	51±17	18±18	58±14
	10.0	56±8	15±5	65±8
BE	0.05	56±23	-6±19	52±21
	2.50	59±10	-10±15	52±8

low back pressure of the guard column also accounted for a very limited increase in overall system back pressure when injector, column 1, column 2, and MS are online, never exceeding 350 bar.

The solvent gradient was set in order to obtain the trapping of analytes in the guard column—while most inference compounds are sent to the waste—and a very efficient separation (see the base-peak separation of CO and CE, despite the short chromatographic run, in Fig. 1). Robustness of analysis was also ensured by the use of the two switching valves available with the instrumental apparatus (one in the column oven and

one in the mass spectrometer) under full electronic control of the MassHunter software, providing excellent reproducibility of retention times.

The method exhibited excellent linearity of calibration in the range 0.05–50 ng/mg for CO ($\ln(y)=0.16224+0.954721 \times \ln(x)+0.007018 \times \ln(x)^2$; $R^2=0.999993$) and CE ($\ln(y)=0.08737+0.974174 \times \ln(x)+0.006013 \times \ln(x)^2$; $R^2=0.999997$) and in the range 0.012–12.5 ng/mg for BE ($y=3.204692 \times x+0.01553$; $R^2=0.999997$).

The LLOQs were arbitrarily set at 0.05 ng/mg for CO and CE and 0.012 ng/mg for BE. Imprecision and inaccuracy at LLOQ were lower than 20 % for all analytes. Table 3 shows imprecision and inaccuracy of the method at the LLOQs, cut-offs, and high-range concentration. The very high analytical sensitivity permitted to easily reach LLOQs two times lower than our reference GC-MS method while using a ten times lower sample amount (5 mg instead of 50 mg).

The signal detected after analysis of nine blank samples of different origins did never exceed 10 % of LLOQ for CO and CE and 20 % of LLOQ for BE.

The overall PE, recovery and matrix effect are shown in Table 4. Ion suppression was observed only for the early eluting analyte BE, whereas in the case of CO and CE ion enhancement was observed for most of the tested blanks.

Table 5 GC-MS and LC-LC-MS-MS results for real and Proficiency Testing Program (PTP) hair samples (cocaine (CO), benzoylecgonine (BE), cocethylene (CE))

Concentrations below LLOQ or above the higher level of the calibration curve are reported if sample amount submitted to analysis enabled to extend quantification beyond these limits

NR not reported

^aPubic hair

Samples	GC-MS (ng/mg)			LC-LC-MS-MS (ng/mg)			Reference Concentrations (ng/mg)		
	CO	BE	CE	CO	BE	CE	CO	BE	CE
PTP 1	2.72	2.25	≤0.10	2.50	2.98	≤0.05	2.99	2.84	NR
PTP 2	1.73	1.38	≤0.10	1.36	1.51	≤0.05	1.62	1.55	NR
PTP 3	2.16	1.78	≤0.10	1.91	2.23	≤0.05	2.65	2.03	NR
PTP 4	1.45	2.08	≤0.10	1.15	2.42	≤0.05	1.85	2.38	NR
PTP 5	1.05	2.45	≤0.10	0.99	2.56	≤0.05	1.31	2.65	NR
1	0.07	0.06	≤0.10	0.05	0.05	≤0.05	—	—	—
2	0.78	0.07	≤0.10	0.75	0.06	≤0.05	—	—	—
3	1.98	0.19	≤0.10	2.25	0.36	≤0.05	—	—	—
4	2.99	1.74	Positive	4.66	1.14	0.22	—	—	—
5	18.45	1.82	≤0.10	21.41	1.49	≤0.05	—	—	—
6 ^a	1.97	1.17	Positive	1.44	0.70	0.13	—	—	—
7	0.45	0.07	≤0.10	0.43	0.10	≤0.05	—	—	—
8	0.21	0.06	≤0.10	0.18	0.03	≤0.05	—	—	—
9	0.30	0.02	≤0.10	0.29	0.04	≤0.05	—	—	—
10	4.93	0.41	Positive	7.68	0.60	0.18	—	—	—
11	≤0.10	≤0.03	≤0.10	≤0.05	≤0.012	≤0.05	—	—	—
12	71.80	9.55	Positive	68.67	9.52	0.99	—	—	—
13	8.42	0.77	Positive	7.63	0.94	0.36	—	—	—
14	27.66	3.10	≤0.10	29.42	2.86	≤0.05	—	—	—
15	20.03	2.10	Positive	23.46	2.40	0.57	—	—	—
16	4.97	0.53	≤0.10	4.60	0.78	≤0.05	—	—	—
17	9.79	1.72	≤0.10	7.58	2.40	0.06	—	—	—
18	1.85	0.54	Positive	1.85	0.28	0.34	—	—	—

Concentrations of reinjected extracts measured after standing for 72 h in the autosampler at room temperature showed that the average difference from initial concentrations was very limited, with a trend towards a decrease for CO and CE (-1.7 ± 2.6 and -2.2 ± 2.8 %, respectively) and towards an increase for BE (2.0 ± 3.9 %).

Cross talk was always lower than 0.1 % and carryover was 0.11 % for CO, 0.07 % for CE, and 0.13 % for BE, thus suggesting that whenever highly concentrated samples are analyzed (e.g., ≥ 50 ng/mg of CO), the immediately following sample, if testing above LLOQ, should be re-examined after a blank at the end of the sequence, as established in our standard operating procedure.

Results obtained from GC-MS and LC-LC-MS-MS methods on selected samples analyzed with both methods are shown in Table 5. Good correlation between the new and the reference method was observed: $y = 0.981x + 0.3474$ ($R^2 = 0.991$) for CO and $y = 1.0017x + 0.0651$ ($R^2 = 0.975$) for BE. In addition, all proficiency testing samples were quantified within the acceptance range.

Conclusions

The use of a column-switching technique coupled to a high sensitivity detection system have allowed to significantly reduce sample amount ($\times 10$) as compared with our reference GC-MS method, to simplify sample preparation, as well as the injection of a small volume of sample extract (10 μ l) in the mass spectrometer (MS-MS) without significantly affecting analytes ionization and overall system performance. The method has shown excellent sensitivity and selectivity for the determination of CO and metabolites in hair. It has also shown a good correlation with the results obtained with the GC-MS reference method.

References

- United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC) (2012) World Drug Report 2012. United Nations, New York
- Boumba VA, Ziavrou KS, Vougiouklakis T (2006) Hair as a biological indicator of drug use, drug abuse or chronic exposure to environmental toxicants. *Int J Toxicol* 25(3):143–163
- Polettini A, Cone EJ, Gorelick DA, Huestis MA (2012) Incorporation of methamphetamine and amphetamine in human hair following controlled oral methamphetamine administration. *Anal Chim Acta* 726:35–43
- United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC) (2011) Guidelines for the forensic analysis of drug facilitated sexual assault and other criminal acts. United Nations, New York
- Kazanga I, Tameni S, Piccinotti A, Floris I, Zanchetti G, Polettini A (2012) Prevalence of drug abuse among workers: strengths and pitfalls of the recent Italian Workplace Drug Testing (WDT) legislation. *Forensic Sci Int* 215(1–3):46–50
- Pichini S, Ventura M, Pujadas M, Ventura R, Pellegrini M, Zuccaro P, Pacifici R, de La Torre R (2004) HAIRVEQ: an external quality control scheme for drugs of abuse analysis in hair. *Forensic Sci Int* 145(2–3):109–115
- Bertaso A, Pascali JP, Liotta E, Polettini A (2011) Assessment of fitness to drive in correlation with narcotic and psychotropic drug use. Epidemiologic study in Verona. *G Ital Med Lav Ergon* 33(2):125–133
- Jurado C (2007) Hair analysis for cocaine. In: Kintz P (ed) *Analytical and practical aspects of drug testing in hair*. CRC Press, Boca Raton
- Hegstad S, Khiabani HZ, Kristoffersen L, Kunøe N, Lobmaier PP, Christophersen AS (2008) Drug screening of hair by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 32(5):364–372
- Barroso M, Dias M, Vieira DN, Queiroz JA, López-Rivadulla M (2008) Development and validation of an analytical method for the simultaneous determination of cocaine and its main metabolite, benzoylecgonine, in human hair by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 22(20):3320–3326
- Wada M, Ikeda R, Kuroda N, Nakashima K (2010) Analytical methods for abused drugs in hair and their applications. *Anal Bioanal Chem* 397(3):1039–1067
- de Toledo FCP, Yonamine M, de Moraes Moreau RL, Silva OA (2003) Determination of cocaine, benzoylecgonine and cocaethylene in human hair by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 798(2):361–365
- Skender L, Karacic V, Breic I, Bagaric A (2002) Quantitative determination of amphetamines, cocaine and opiates in human hair by gas chromatography/mass spectrometry. *Forensic Sci Int* 125:120–126
- Gouveia CA, Oliveira A, Pinho S, Vasconcelos C, Carvalho F, Moreira RF, Dinis-Oliveira RJ (2012) Simultaneous quantification of morphine and cocaine in hair samples from drug addicts by GC-ESI/MS. *Biomed Chromatogr* 26(8):1041–1047
- Polettini A (ed) (2006) *Application of LC-MS in toxicology*. Pharmaceutical Press, London
- Moore C, Coulter C, Crompton K (2007) Determination of cocaine, benzoylecgonine, cocaethylene and norcocaine in human hair using solid-phase extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 859(2):208–212
- Hill V, Cairns T, Schaffer M (2008) Hair analysis for cocaine: factors in laboratory contamination studies and their relevance to proficiency sample preparation and hair testing practices. *Forensic Sci Int* 176(1):23–33
- Hoelzle C, Scheufler F, Uhl M, Sachs H, Thieme D (2008) Application of discriminant analysis to differentiate between incorporation of cocaine and its congeners into hair and contamination. *Forensic Sci Int* 176(1):13–18
- Miller EI, Wylie FM, Olive JSS (2008) Simultaneous detection and quantification of amphetamines, diazepam and its metabolites, cocaine and its metabolites, and opiates in hair by LC-ESI-MS-MS using a single extraction method. *J Anal Toxicol* 32:457–469
- Bucelli F, Fratini A, Bavazzano P, Comodo N (2009) Quantification of drugs of abuse and some stimulants in hair samples by liquid chromatography–electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 877(31):3931–3936
- López P, Martello S, Bermejo AM, de Vincenzi E, Tabernero MJ, Chiarotti M (2010) Validation of ELISA screening and LC-MS/MS confirmation methods for cocaine in hair after simple extraction. *Anal Bioanal Chem* 397(4):1539–1548
- Di Corcia D, D’Urso F, Gerace E, Salomone A, Vincenti M (2012) Simultaneous determination in hair of multiclass drugs of abuse (including THC) by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 899:154–159

23. Ropero-Miller JD, Huestis MA, Stout PR (2012) Cocaine analytes in human hair: evaluation of concentration ratios in different cocaine sources, drug-user populations and surface-contaminated specimens. *J Anal Toxicol* 36(6):390–398
24. Sergi M, Napoletano S, Montesano C, Iofrida R, Curini R, Compagnone D (2012) Pressurized-liquid extraction for determination of illicit drugs in hair by LC-MS-MS. *Anal Bioanal Chem* 405:725–735
25. Huang D, Liu C, Huang M, Chien C (2009) Simultaneous determination of morphine, codeine, 6-acetylmorphine, cocaine and benzoylecgonine in hair by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 23(7):957–962
26. Favretto D, Vogliardi S, Stocchero G, Nalesso A, Tucci M, Ferrara SD (2011) High performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry and micropulverized extraction for the quantification of amphetamines, cocaine, opioids, benzodiazepines, antidepressants and hallucinogens in 2.5 mg hair samples. *J Chromatogr A* 1218(38):6583–6595
27. Lendoiro E, Quintela O, de Castro A, Cruz A, López-Rivadulla M, Concheiro M (2012) Target screening and confirmation of 35 licit and illicit drugs and metabolites in hair by LC-MS/MS. *Forensic Sci Int* 217(1–3):207–215
28. Suenami K, Wah Lim L, Takeuchi T, Sasajima Y, Sato K, Takekoshi Y, Kanno S (2006) Direct determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs by column-switching LC-MS. *J Sep Sci* 29(18):2725–2732
29. Morini L, Politi L, Zucchella A, Poletti A (2007) Ethyl glucuronide and ethyl sulphate determination in serum by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta* 376(1–2):213–219
30. Veuthey J, Souverain S, Rudaz S (2004) Column-switching procedures for the fast analysis of drugs in biologic samples. *Ther Drug Monit* 26(2):161–166
31. Borrey D, Moerman E, Cockx A, Engelrelst V, Langlois MR (2007) Column-switching LC-MS/MS analysis for quantitative determination of testosterone in human serum. *Clin Chim Acta* 382(1–2):134–137
32. Wagner M, Bourgogne E, Varesio E, Hopfgartner G (2010) Quantitation of polar analytes using column-switching: application to oxycodone and three metabolites in human plasma. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 878(7–8):637–644
33. Miki A, Katagi M, Tsuchihashi H (2003) Determination of methamphetamine and its metabolites incorporated in hair by column-switching liquid chromatography-mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 27(2):95–102
34. Zanchetti G, Floris I, Piccinotti A, Tameni S, Poletti A (2012) Rapid and robust confirmation and quantification of 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid (THC-COOH) in urine by column switching LC-MS-MS analysis. *J Mass Spectrom* 47(1):124–130
35. Society of Hair Testing (SOHT) (2004) Recommendations for hair testing in forensic cases. *Forensic Sci Int* 145(2–3):83–84
36. Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM (2003) Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal Chem* 75(13):3019–3030
37. Peters FT (2006) Method validation using LC-MS. In: Poletti A (ed) *Application of LC-MS in toxicology*. Pharmaceutical Press, London
38. Peters FT (2011) Recent advances of liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry in clinical and forensic toxicology. *Clin Biochem* 44(1):54–65

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Of. CEP/FCFRP nº. 032/2012
kms

Ribeirão Preto, 17 de maio de 2012.

À pós-graduanda
Marcela Nogueira Rabelo Alves
Orientador: Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis
FFCLRP/USP

Prezada Pós-graduanda,

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP aprovou, em sua 101ª Sessão Ordinária, realizada em 17/05/2012, o projeto de pesquisa intitulado **"DROGAS DE ABUSO EM AMOSTRAS DE CABELO DE VOLUNTÁRIOS ATENDIDOS NO CAPS-AD DE RIBEIRÃO PRETO E SUA CORRELAÇÃO COM SINTOMAS DE ANSIEDADE, DEPRESSÃO E PSICOSE"** apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo CEP/FCFRP nº. 249.

Informamos que conforme Carta Circular 003/2011 da CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa), o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso e também o pesquisador responsável deverão rubricar todas as páginas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE, apondo sua assinatura na última página do referido Termo. Ainda, de acordo com a Resolução 196/96, item IV.2, letra d, *"o TCLE deverá ser elaborado em duas vias, sendo uma retida pelo sujeito da pesquisa ou por seu representante legal e uma arquivada pelo pesquisador"*.

Em atendimento à Resolução 196/96, lembramos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa e a publicação de seu resultado, para acompanhamento, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe.

Atenciosamente,

PROF.ª. DR.ª. MARIA REGINA TORQUETTI
Coordenadora do CEP/FCFRP

Anexo 3 - Aprovação da Coordenação do CAPS-AD

Sanatório Espírita Vicente de Paulo

Reconhecido de Utilidade Pública Municipal: Lei 877 de 30-10-1959
Estadual: Lei 6636 de 04-01-1962 Federal: Decreto: 62134 de 17-01-1968
CGC 55.991.954/0001-03

CAPS-ad II

CENTRO DE ATENÇÃO PSICOSSOCIAL PARA ÁLCOOL E OUTRAS DROGAS
Rua Pará, 1310 - Ipiranga, Ribeirão Preto/SP - CEP: 14060-440
Fone: (16) 3615-3336 / Fax: (16) 3622-2376 e-mail: capsadrp@hotmail.com

AUTORIZAÇÃO

O Sanatório Espírita Vicente de Paulo vem, através desta, manifestar sua aprovação da realização do Projeto de Pesquisa a ser desenvolvido pelo aluno **Marcela Nogueira Rabelo Alves**, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; sob orientação do Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martins, da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Departamento de Química), no Centro de Atenção Psicossocial para álcool e outras drogas (CAPS ad II); uma vez que é de interesse de nossa instituição contribuir para o desenvolvimento de estudos e pesquisas que venham elevar o conhecimento na área em questão.

Sendo o que nos cabe para o momento.

Ribeirão Preto, 14 de setembro de 2011

Gisela Pires de Oliveira Marchini
Coordenadora do CAPS ad II

Anexo 4 - Self-Reporting Questionnaire (SRQ)

Questionário (Self-Reporting Questionnaire - SRQ)

O(A) SR(A). PODERIA POR FAVOR RESPONDER ÀS SEGUINTE PERGUNTAS A RESPEITO DA SUA SAÚDE:

01- Tem dores de cabeça freqüentes?.	1- Sim	2- Não	
02- Tem falta de apetite?.	1- Sim	2- Não	
03- Dorme mal?	1- Sim	2- Não	
04- Assusta-se com facilidade?	1- Sim	2- Não	
05- Tem tremores de mão?	1- Sim	2- Não	
06- Sente-se nervoso(a), tenso(a) ou preocupado(a)	1- Sim	2- Não	
07- Tem má digestão?	1- Sim	2- Não	
08- Tem dificuldade de pensar com clareza?	1- Sim	2- Não	
09- Tem se sentido triste ultimamente?	1- Sim	2- Não	
10- Tem chorado mais do que de costume?	1- Sim	2- Não	
11- Encontra dificuldades para realizar com satisfação suas atividades diárias?	1- Sim	2- Não	
12- Tem dificuldades para tomar decisões?	1- Sim	2- Não	
13- Tem dificuldades no serviço (seu trabalho é penoso, causa sofrimento)?	1- Sim	2- Não	
14- É incapaz de desempenhar um papel útil em sua vida?	1- Sim	2- Não	
15- Tem perdido o interesse pelas coisas?	1- Sim	2- Não	
16- Você se sente uma pessoa inútil, sem préstimo?	1- Sim	2- Não	
17- Tem tido idéias de acabar com a vida	1- Sim	2- Não	
18- Sente-se cansado(a) o tempo todo?	1- Sim	2- Não	
19- Tem sensações desagradáveis no estômago?	1- Sim	2- Não	
20- Você se cansa com facilidade?	1- Sim	2- Não	

A - Total de sim |__||__|

21- Sente que tem alguém que de alguma maneira quer lhe fazer mal?	1- Sim	2- Não	
22- Você é alguém muito mais importante do que a maioria das pessoas pensa?	1- Sim	2- Não	
23- Tem notado alguma interferência ou outro problema estranho c/ seu pensamento?	1- Sim	2- Não	
24- Ouve vozes que não sabe de onde vêm, ou que outras pessoas não podem ouvir?	1- Sim	2- Não	

B - Total de sim |__||__|

Anexo 5 - Inventário de Depressão de Beck (BDI)

Inventário de depressão de Beck

Este questionário consiste em 21 grupos de afirmações. Depois de ler cuidadosamente cada grupo, faça um círculo em torno do número (0, 1, 2 ou 3) diante da afirmação, em cada grupo, que descreve melhor a maneira como você tem se sentido nesta semana, incluindo hoje. Se várias afirmações num grupo parecerem se aplicar igualmente bem, faça um círculo em cada uma. Tome o cuidado de ler todas as afirmações, em cada grupo, antes de fazer a sua escolha.

- 1.**
 - 0 Não me sinto triste.
 - 1 Eu me sinto triste.
 - 2 Estou sempre triste e não consigo sair disso.
 - 3 Estou tão triste ou infeliz que não consigo suportar.

- 2.**
 - 0 Não estou especialmente desanimado quanto ao futuro.
 - 1 Eu me sinto desanimado quanto ao futuro.
 - 2 Acho que nada tenho a esperar.
 - 3 Acho o futuro sem esperança e tenho a impressão de que as coisas não podem melhorar.

- 3.**
 - 0 Não me sinto um fracasso.
 - 1 Acho que fracassei mais do que uma pessoa comum.
 - 2 Quando olho para trás, na minha vida, tudo o que posso ver é um monte de fracassos.
 - 3 Acho que, como pessoa, sou um completo fracasso.

- 4.**
 - 0 Tenho tanto prazer em tudo como antes.
 - 1 Não sinto mais prazer nas coisas como antes.
 - 2 Não encontro um prazer real em mais nada.
 - 3 Estou insatisfeito ou aborrecido com tudo.

- 5.**
 - 0 Não me sinto especialmente culpado.
 - 1 Eu me sinto culpado às vezes.
 - 2 Eu me sinto culpado na maior parte do tempo.
 - 3 Eu me sinto sempre culpado.

- 6.**
 - 0 Não acho que esteja sendo punido.
 - 1 Acho que posso ser punido.
 - 2 Creio que vou ser punido.
 - 3 Acho que estou sendo punido.

- 7.**
 - 0 Não me sinto decepcionado comigo mesmo.
 - 1 Estou decepcionado comigo mesmo.
 - 2 Estou enojado de mim.
 - 3 Eu me odeio.

- 8.**
 - 0 Não me sinto de qualquer modo pior que os outros.
 - 1 Sou crítico em relação a mim devido a minhas fraquezas ou meus erros.
 - 2 Eu me culpo sempre por minhas falhas.
 - 3 Eu me culpo por tudo de mal que acontece.

- 9.**
 - 0 Não tenho quaisquer idéias de me matar.
 - 1 Tenho idéias de me matar, mas não as executaria.

- 2 Gostaria de me matar.
- 3 Eu me mataria se tivesse oportunidade.

- 10.**
- 0 Não choro mais que o habitual.
 - 1 Choro mais agora do que costumava.
 - 2 Agora, choro o tempo todo.
 - 3 Costumava ser capaz de chorar, mas agora não consigo mesmo que o queira.

- 11.**
- 0 Não sou mais irritado agora do que já fui.
 - 1 Fico molestado ou irritado mais facilmente do que costumava.
 - 2 Atualmente me sinto irritado o tempo todo.
 - 3 Absolutamente não me irrita com as coisas que costumavam irritar-me.

- 12.**
- 0 Não perdi o interesse nas outras pessoas.
 - 1 Interesse-me menos do que costumava pelas outras pessoas.
 - 2 Perdi a maior parte do meu interesse nas outras pessoas.
 - 3 Perdi todo o meu interesse nas outras pessoas.

- 13.**
- 0 Tomo decisões mais ou menos tão bem como em outra época.
 - 1 Adio minhas decisões mais do que costumava.
 - 2 Tenho maior dificuldade em tomar decisões do que antes.
 - 3 Não consigo mais tomar decisões.

- 14.**
- 0 Não sinto que minha aparência seja pior do que costumava ser.
 - 1 Preocupo-me por estar parecendo velho ou sem atrativos.
 - 2 Sinto que há mudanças permanentes em minha aparência que me fazem parecer sem atrativos.
 - 3 Considero-me feio.

- 15.**
- 0 Posso trabalhar mais ou menos tão bem quanto antes.
 - 1 Preciso de um esforço extra para começar qualquer coisa.
 - 2 Tenho de me esforçar muito até fazer qualquer coisa.
 - 3 Não consigo fazer nenhum trabalho.

- 16.**
- 0 Durmo tão bem quanto de hábito.
 - 1 Não durmo tão bem quanto costumava.
 - 2 Acordo uma ou duas horas mais cedo do que de hábito e tenho dificuldade para voltar a dormir.
 - 3 Acordo várias horas mais cedo do que costumava e tenho dificuldade para voltar a dormir.

- 17.**
- 0 Não fico mais cansado que de hábito.
 - 1 Fico cansado com mais facilidade do que costumava.
 - 2 Sinto-me cansado ao fazer quase qualquer coisa.
 - 3 Estou cansado demais para fazer qualquer coisa.

- 18.**
- 0 Meu apetite não está pior do que de hábito.
 - 1 Meu apetite não é tão bom quanto costumava ser.
 - 2 Meu apetite está muito pior agora.
 - 3 Não tenho mais nenhum apetite.

- 19.**
- 0 Não perdi muito peso, se é que perdi algum ultimamente.
 - 1 Perdi mais de 2,5 Kg.
 - 2 Perdi mais de 5,0 Kg.
 - 3 Perdi mais de 7,5 Kg.

Estou deliberadamente tentando perder peso, comendo menos: Sim () Não ()

20.

0 Não me preocupo mais que o de hábito com minha saúde.

1 Preocupo-me com problemas físicos como dores e aflições ou perturbações no estômago ou prisão de ventre.

2 Estou muito preocupado com problemas físicos e é difícil pensar em outra coisa que não isso.

3 Estou tão preocupado com meus problemas físicos que não consigo pensar em outra coisa.

21.

0 Não tenho observado qualquer mudança recente em meu interesse sexual.

1 Estou menos interessado por sexo que costumava.

2 Estou bem menos interessado em sexo atualmente.

3 Perdi completamente o interesse por sexo.

Beck, A.T.; Ward, C.H.; Mendelson, M.; Mock, J. & Erbaugh, G. An Inventory for Measuring Depression. *Archives of General Psychiatry* 4:53-63, 1961.

Gorenstein, C. & Andrade, L. Validation of a Portuguese version of the Beck Depression Inventory and the State-Trait Anxiety Inventory in Brazilian Subjects. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 29:453-457, 1996.

Anexo 6 - Patient Health Questionnaire (PHQ – 9)

QUESTIONÁRIO SOBRE SAÚDE DO PACIENTE (PHQ-9)

Nome: _____ Data: ____/____/____

<i>Esta seção é para uso exclusivo do pesquisador.</i>				
Os dados foram coletados? Não ☐ (porquê não)				
Se sim, os dados foram coletados no dia da visita ☐ ou numa data específica: ____/____/____				
Comentários:				
Somente o paciente (sujeito) deve responder este questionário.				
Durante as <u>últimas 2 semanas</u> , com que frequência você foi incomodado/a por <u>qualquer um dos problemas abaixo</u> ?	Nenhu- ma vez	Vários dias	Mais da metade dos dias	Quase todos os dias
1. Pouco interesse ou pouco prazer em fazer as coisas	0	1	2	3
2. Se sentir "para baixo", deprimido/a ou sem perspectiva	0	1	2	3
3. Dificuldade para pegar no sono ou permanecer dormindo, ou dormir mais do que de costume	0	1	2	3
4. Se sentir cansado/a ou com pouca energia	0	1	2	3
5. Falta de apetite ou comendo demais	0	1	2	3
6. Se sentir mal consigo mesmo/a — ou achar que você é um fracasso ou que decepcionou sua família ou você mesmo/a	0	1	2	3
7. Dificuldade para se concentrar nas coisas, como ler o jornal ou ver televisão	0	1	2	3
8. Lentidão para se movimentar ou falar, a ponto das outras pessoas perceberem? Ou o oposto – estar tão agitado/a ou irrequieto/a que você fica andando de um lado para o outro muito mais do que de costume	0	1	2	3
9. Pensar em se ferir de alguma maneira ou que seria melhor estar morto/a	0	1	2	3
SCORING PARA USO DO PESQUISADOR ____ 0 ____ + ____ + ____ + ____ =Total Score: ____				
Se você assinalou <u>qualquer</u> um dos problemas, indique o grau de <u>dificuldade</u> que os mesmos lhe causaram para realizar seu trabalho, tomar conta das coisas em casa ou para se relacionar com as pessoas?				
Nenhuma dificuldade ☐	Alguma dificuldade ☐	Muita dificuldade ☐	Extrema dificuldade ☐	
Copyright © 2005 Pfizer Inc. Todos os direitos reservados. Reproduzido sob permissão. EPI0905.PHQ9P				

Anexo 7 - Questionário de Ansiedade de Beck (BAI)

QUESTIONÁRIO DE ANSIEDADE DE BECK

Nome: _____ Data: ____/____/____

Abaixo, está uma lista de sintomas comuns de ansiedade. Por favor, leia cuidadosamente cada item da lista. Indique **quanto** você foi incomodado, por cada um dos sintomas listados à esquerda, durante a **última semana, inclusive hoje**, marcando um X no grau de incômodo correspondente a uma das caselas das colunas à direita.

Nº	Sintomas	Quanto foi incomodado			
		Nada 0	Fraco 1	Moderadamente 2	Muito forte 3
		Não incomodou nada	Incomodou- me um pouco	Foi muito desagradável, mas consegui aguentar	Quase não consegui aguentar
1	Dormência ou formigamento				
2	Calores				
3	Pernas bambas				
4	Incapaz de relaxar				
5	Medo do pior acontecer				
6	Tonteira ou cabeça leve				
7	Coração batendo forte ou acelerado				
8	Inquieto(a)				
9	Aterrorizado(a)				
10	Nervoso(a)				
11	Sensação de sufocamento				
12	Mãos tremendo				
13	Trêmulo(a)				
14	Medo de perder o controle				
15	Dificuldade de respirar				
16	Medo de morrer				
17	Assustado(a)				
18	Indigestão ou desconforto no abdômen				
19	Desmaio				
20	Face ruborizada				
21	Suores (não devido a calor)				
Total:					

Anexo 8 - Inventário de Fobia Social (SPIN)

INVENTÁRIO DE FOBIA SOCIAL (SPIN)					
Por favor, indique quanto os seguintes problemas incomodaram você durante a última semana. Marque somente um item para cada problema, e verifique se respondeu a todos os itens.
nada	um pouco	moderadamente	bastante	extremamente
	0	1	2	3	4
1. Tenho medo de autoridades	☐	☐	☐	☐	☐
2. Incomodo-me por ficar vermelho na frente das pessoas	☐	☐	☐	☐	☐
3. Festas e eventos sociais me assustam	☐	☐	☐	☐	☐
4. Evito falar com pessoas que não conheço	☐	☐	☐	☐	☐
5. Fico muito assustado ao ser criticado	☐	☐	☐	☐	☐
6. Evito fazer coisas ou falar com certas pessoas por medo de ficar envergonhado	☐	☐	☐	☐	☐
7. Transpirar na frente das pessoas me incomoda	☐	☐	☐	☐	☐
8. Evito ir a festas	☐	☐	☐	☐	☐
9. Evito atividades nas quais sou o centro das atenções	☐	☐	☐	☐	☐
10. Conversar com estranhos me assusta	☐	☐	☐	☐	☐
11. Evito falar para uma platéia ou dar discursos (ex. apresentações em sala de aula)	☐	☐	☐	☐	☐
12. Faço qualquer coisa para não ser criticado	☐	☐	☐	☐	☐
13. Sentir palpitações cardíacas me incomoda quando estou no meio de outras pessoas	☐	☐	☐	☐	☐
14. Tenho receio de fazer coisas quando posso estar sendo observado	☐	☐	☐	☐	☐
15. Ficar envergonhado ou parecer bobo são meus maiores temores	☐	☐	☐	☐	☐
16. Evito falar com qualquer autoridade	☐	☐	☐	☐	☐
17. Tremer ou estremecer na frente das outras pessoas me angustia	☐	☐	☐	☐	☐

COPYRIGHT Jonathan Davidson (1995)
 Tradução e adaptação para o Português:
 Crippa JAS, Graeff FG, Zuardi AW,
 Hetem LA, Busatto GF, Loureiro SR (2003).
 Diagramação: Marcelo Mazza (2004).

Anexo 9 - Questionário sobre uso de Cannabis (CRQ)

QUESTIONÁRIO SOBRE USO DE CANNABIS

(Cannabis Research Questionnaire)

POR FAVOR, responda as seguintes questões:

Nome: _____ Data: ____/____/____

Idade: _____

Sexo: ☐ Masculino ☐ Feminino

1. Quantas vezes você já usou maconha em sua vida?

☐ Menos que 10 vezes ☐ Entre 10 e 15 vezes ☐ Entre 15 e 50 vezes ☐ Mais que 50 vezes

2. Quando foi a última vez que você usou a maconha? _____

3. Se você já foi um usuário diário, quantos cigarros de maconha você costumava fumar no dia?

4. Quantos anos você tinha quando começou a fumar maconha? _____

5. Você alguma vez já se sentiu apavorado ou em estado de pânico após ter usado maconha quando não havia motivo para sentir medo?

☐ sim ☐ não

6. Após ter usado maconha, você já teve experiências estranhas ou desagradáveis tais como ouvir vozes ou estar convencido de que alguém está tentando te fazer mal ou está te perseguindo?

☐ sim ☐ não

7. Você acha que o uso da maconha está prejudicando a sua saúde física? (Você já se sentiu indisposto?)

☐ sim ☐ não

8. Você adquiriu bronquite crônica (tosse todos os dias) devido ao uso de maconha?

☐ sim ☐ não

9. Você desenvolveu diarreia ou náusea crônica (sente-se doente ou está ficando doente mais vezes) devido ao uso da maconha?

☐ sim ☐ não

10. Você tem dores de cabeça resultantes do uso da maconha?

☐ sim ☐ não

11. Você já sofreu perda de memória ou teve apagões por um período de tempo que você estava sob efeito da maconha? Não responda que sim, se você tiver ingerido álcool ou usado outro tipo de droga ao mesmo tempo).

☐ sim ☐ não

12. Você já se sentiu inquieto, irritado ou rabugento porque não foi possível utilizar a maconha?

☐ sim ☐ não

13. Você já foi incapaz de parar de usar maconha quando você quis?

() sim () não

14. Alguma vez você já usou maconha mesmo sabendo que poderia causar problemas para você? Por exemplo, causar problemas em seus relacionamentos com outras pessoas, custar mais dinheiro do que você tem, afetar a sua saúde ou seu bem-estar mental.

() sim () não

15. Você já tentou voluntariamente restringir a quantidade de maconha que você usa, por exemplo, prometendo a si mesmo que você usará apenas nos finais de semana ou com amigos?

() sim () não

16. Você tem o hábito de usar maconha como a primeira tarefa do dia pela manhã? (Somente responda sim se você já fez isso pelo menos 3 vezes).

() sim () não

17. Você já foi incapaz de realizar suas responsabilidades usuais devido ao uso da maconha?

() sim () não

18. Você já se sentiu incapaz de controlar a quantidade de maconha que você usa?

() sim () não

19. Você já se sentiu preso enquanto estava sob efeito da maconha por alguma coisa que você não teria feito se você não estivesse sob efeito dessa droga? (Não inclua prisão por posse de drogas e não responda sim se você estava bêbado ou sob influência de outras drogas ao mesmo tempo).

() sim () não

20. Você já foi parado por algum incidente no trânsito que ocorreu quando você estava sob influência da maconha?

() sim () não

21. Você já teve problemas no trabalho ou perdeu o emprego devido ao uso da maconha?

() sim () não

22. Você já se envolveu em uma briga enquanto estava sob efeito da maconha? (Não responda que sim se você estava bêbado ou sob influência de outras drogas ao mesmo tempo).

() sim () não

23. Você já perdeu algum amigo pelo fato de usar maconha?

() sim () não

24. Você já gastou mais do que podia pagar ou esteve em sérios problemas financeiros devido ao uso da maconha?

() sim () não

25. Você já desistiu ou deixou de fazer algumas atividades as quais você gostava de fazer ou pensava que era importante devido ao seu uso de maconha?

() sim () não

APENAS RESPONDA ESSAS ÚLTIMAS PERGUNTAS SE VOCÊ FOR USUÁRIO REGULAR DA MACONHA

26. Você acha que usa maconha em grande quantidade?

() sim () não

27. Alguém na sua família ou seu marido/esposa pensa que se você usar mais maconha, isso será bom para você?

() sim () não

28. Alguém fora da sua família ou namorado(a) pensa que se você usar mais maconha, isso será bom para você?

() sim () não

29. Você já se sentiu culpado sobre seu uso da maconha devido aos efeitos que ela causa na sua vida?

() sim () não

Referência:

Thomas, Huw. A community survey of adverse effects of cannabis use. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 42, p.201-207, 1996.

Anexo 10 – Tabela 14

Tabela 14 - Resultado da análise por LC-MS/MS para canabinóides e cocaínicos (ng/mg)

Nº Sujeito	CBD	CBN	THC	EMA	COC	BE	CE	NCOC
1	0,00	0,14	0,40	0,0	10,2	4,9	0,3	0,1
2	0,00	0,00	0,00	0,0	0,3	0,1	0,0	0,0
3	0,00	0,00	0,00	0,0	9,7	2,3	0,7	0,2
4	0,00	0,00	0,00	0,0	0,6	0,2	0,3	0,0
5	0,00	0,10	0,14	0,0	4,1	1,9	1,4	0,1
6	0,00	0,00	0,01	0,0	10,5	5,5	1,4	0,6
7	0,00	0,00	0,00	0,0	2,5	0,9	0,2	0,1
8	0,00	0,00	0,00	0,0	10,4	3,1	2,1	0,3
9	0,00	0,00	0,00	0,0	14,6	3,9	0,1	0,5
10	0,00	0,00	0,00	1,6	31,8	13,8	2,4	0,1
11	0,00	0,00	0,01	0,0	13,1	6,6	0,0	0,3
12	0,00	0,00	0,00	0,0	6,3	1,5	0,1	0,1
13	0,00	0,00	0,02	0,0	17,5	5,3	0,1	0,5
14 prox	0,00	0,00	0,01	0,0	5,0	1,8	0,4	0,2
14 distal	0,00	0,01	0,01	0,5	7,5	2,1	0,4	0,3
15	0,00	0,02	0,05	0,0	4,7	2,2	0,1	0,1
16	0,00	0,00	0,00	0,0	1,4	0,4	0,1	0,1
17 prox	0,00	0,00	0,00	2,2	33,6	20,4	0,0	0,8
17 distal	0,00	0,00	0,00	2,2	34,8	21,9	0,0	0,5
18	0,00	0,00	0,00	0,0	1,9	0,5	0,0	0,1
19	0,00	0,00	0,00	0,0	28,8	9,3	3,6	0,2
20	0,00	0,00	0,00	0,0	2,7	1,6	0,4	0,1
21	0,00	0,00	0,00	0,0	0,4	0,2	0,0	0,0
22	0,00	0,35	0,60	0,0	10,0	2,0	0,9	0,7
23	0,00	0,02	0,04	1,5	46,3	5,9	5,3	0,5
24	0,00	0,00	0,00	0,0	0,5	0,2	0,1	0,1
25	0,00	0,00	0,03	0,0	11,3	2,8	0,3	0,3
26	0,00	0,00	0,00	1,5	22,4	6,2	0,1	0,5
27	0,00	0,04	0,07	0,0	6,3	1,2	0,5	0,1
28	0,00	0,01	0,00	0,0	14,1	3,8	0,1	0,5
29	0,00	0,08	0,10	1,5	22,5	6,7	0,0	1,2
30	0,00	0,13	0,24	2,3	49,8	12,7	0,1	0,4
31 prox	0,00	0,00	0,00	0,0	15,1	7,9	0,1	0,5
31 distal	0,00	0,00	0,00	0,0	13,4	10,1	0,1	0,3
32	0,00	0,00	0,00	12,6	119,2	50,1	0,2	1,9
33	0,00	0,00	0,00	6,2	143,8	58,3	0,2	1,5
34	0,00	0,00	0,01	1,4	44,3	11,4	0,6	0,6
35	0,00	0,01	0,04	0,0	14,0	6,5	0,6	0,2
36	0,00	0,00	0,00	0,0	15,3	5,6	5,0	0,4
37	0,00	0,11	0,15	0,0	0,2	0,1	0,0	0,0
38	0,00	0,00	0,03	2,0	39,3	14,0	0,1	1,3

Continua

Nº Sujeito	CBD	CBN	THC	EMA	COC	BE	CE	NCOC
39	0,00	0,00	0,00	0,0	9,7	2,7	0,1	0,7
40	0,00	0,00	0,00	0,9	19,2	7,6	0,0	0,4
41	0,00	0,00	0,00	0,0	5,2	1,9	0,1	0,1
42	0,00	0,00	0,00	0,0	1,8	0,9	0,5	0,1
43	0,00	0,00	0,00	0,0	2,0	0,7	1,0	0,1
44	0,00	0,15	0,26	3,8	51,6	17,7	0,1	0,6
45	0,00	0,00	0,00	0,0	1,5	0,7	0,1	0,1
46	0,00	0,00	0,00	2,3	87,2	23,0	5,6	0,8
47	0,00	0,00	0,00	0,0	5,5	1,1	0,8	0,0
48	0,00	0,00	0,03	0,0	12,7	4,1	0,2	0,3
49	0,00	0,03	0,07	2,0	26,6	9,0	1,1	0,5
50	0,00	0,00	0,04	0,0	4,1	1,4	0,4	0,1
51	0,00	0,00	0,01	7,0	162,1	50,9	1,9	2,3
52	0,00	0,00	0,00	0,0	1,9	0,7	0,9	0,1
53	0,00	0,03	0,04	0,0	6,9	1,6	0,1	0,2
54	0,00	0,00	0,00	0,0	14,7	4,0	2,2	0,2
55	0,00	0,00	0,00	0,6	16,6	2,8	1,6	0,3
56	0,00	0,00	0,00	0,0	6,5	1,9	2,1	0,1
57	0,00	0,41	0,52	1,7	45,0	11,5	0,1	0,4
58	0,00	0,00	0,00	0,0	5,3	1,2	0,6	0,2
59	0,00	0,35	0,60	0,0	4,7	0,9	0,8	0,1
60	0,00	0,06	0,04	0,6	8,7	3,1	0,2	0,4
61	0,00	0,03	0,05	0,0	4,0	2,5	0,1	0,2
62	0,00	0,01	0,00	1,5	16,1	6,8	0,1	0,2
63	0,00	0,00	0,00	0,0	10,3	4,3	0,6	0,3
64	0,00	0,00	0,00	1,4	6,1	3,0	0,1	0,1
65	0,00	0,02	0,01	1,1	32,1	6,4	1,6	0,3
66	0,00	0,00	0,00	0,0	0,6	0,2	0,1	0,1
67	0,00	0,00	0,00	0,0	0,5	0,1	0,2	0,0
68	0,00	0,00	0,00	1,3	26,7	7,2	0,5	0,3
69	0,00	0,02	0,00	0,0	0,6	0,3	0,1	0,0
70	0,00	0,00	0,00	0,0	11,4	3,4	0,8	0,2
71	0,00	0,00	0,00	0,0	1,3	0,4	0,3	0,1
72	0,00	0,35	0,35	1,3	27,1	18,4	0,1	0,4
73	0,00	0,00	0,00	0,0	5,0	0,8	0,2	0,0
74	0,00	0,00	0,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
75	0,00	0,08	0,04	0,0	2,3	1,1	0,2	0,1
76	0,00	0,13	0,23	0,0	0,3	0,1	0,2	0,0
77	0,00	0,40	0,50	0,0	27,3	5,3	0,2	0,5
78	0,00	0,09	0,07	0,0	18,1	2,8	2,3	0,2
79 prox	0,00	0,00	0,00	0,0	70,3	28,1	0,7	2,2
79 distal	0,00	0,00	0,00	1,0	43,0	25,4	0,4	1,0
80	0,00	0,00	0,09	1,1	41,9	12,4	0,1	0,5
81 prox	0,00	0,00	0,00	0,0	10,8	3,6	0,1	0,2

Continuação

Conclusão

Nº Sujeito	CBD	CBN	THC	EMA	COC	BE	CE	NCOC
81 distal	0,00	0,00	0,00	0,0	16,1	3,2	0,1	0,1
82	0,00	0,10	0,09	1,1	45,8	11,8	0,2	0,8
83	0,00	0,06	0,02	1,3	34,3	5,9	0,2	0,3
84	0,00	0,00	0,00	2,5	70,1	15,3	0,1	0,4
85	0,00	0,05	0,21	0,0	21,3	3,2	0,9	0,4
86	0,00	0,00	0,08	0,0	13,8	7,3	0,2	0,4
87	0,00	0,00	0,10	1,3	68,6	8,4	7,3	0,3
88	0,00	0,00	0,00	0,0	20,9	7,7	0,1	0,2
89 prox	0,00	0,03	0,04	0,0	17,0	6,5	0,5	0,3
89 distal	0,00	0,02	0,04	0,0	3,7	1,3	0,2	0,1
90 prox	0,00	0,00	0,00	0,3	12,1	2,9	0,1	0,2
90 distal	0,00	0,00	0,00	0,0	6,7	1,8	0,1	0,2
91	0,00	0,00	0,00	2,0	50,7	9,8	2,5	0,6
92	0,00	0,00	0,00	0,0	0,5	0,1	0,2	0,0
93 prox	0,00	0,00	0,00	0,0	2,1	1,0	0,5	0,1
93 distal	0,00	0,00	0,00	0,0	2,7	1,8	0,4	0,1
94	0,00	0,03	0,04	0,0	9,4	1,9	0,6	0,2
95	0,00	0,00	0,01	0,0	30,2	5,7	0,1	0,2
96	0,00	0,00	0,00	0,0	19,7	2,7	0,9	0,2
97	0,00	0,00	0,00	0,0	0,6	0,1	0,2	0,1
98 prox	0,00	0,00	0,00	0,0	0,7	0,1	0,2	0,0
98 distal	0,00	0,00	0,00	0,0	0,8	0,1	0,1	0,0
99 prox	0,00	0,00	0,00	0,0	37,9	5,9	1,3	0,4
99 distal	0,00	0,00	0,00	0,7	46,9	6,1	1,0	0,3
100	0,00	0,00	0,00	1,1	77,3	5,0	2,6	0,6

¹Prox. = Proximal (6 cm próximos a raiz do cabelo); ²Distal = Maior que 6 cm; CBD = canabidiol; CBN = canabinol; THC = tetrahydrocanabinol;; EMA = éster metilanidroecgonina; COC = cocaína; BE = benzoilecgonina; CE = cocaetileno e NCOC = norcocaína.

Anexo 11 – Tabela 18

Tabela 18 - Resultado da análise por LC-MS/MS para benzodiazepínicos e anfetaminícos (ng/mg)

Nº amostra	Clonazepam	Diazepam	Lorazepam	MDMA	MET	Midazolam	Nordiaz	Oxaz
1	0,00	0,28	0,00	0,0	0,0	0,00	0,22	0,00
2	0,00	0,28	0,00	0,0	0,0	0,00	0,70	0,00
4	0,04	0,62	0,00	0,0	0,0	0,00	1,61	0,00
5	0,00	0,02	0,00	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00
7	0,00	7,83	0,00	0,0	0,0	0,00	0,35	0,00
16	0,00	0,02	0,00	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00
18	0,00	0,63	0,00	0,0	0,0	0,00	1,57	0,00
21	0,00	0,16	0,00	0,0	0,0	0,00	0,18	0,00
22	0,00	0,01	0,00	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00
23	0,00	0,14	0,00	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00
24	0,00	0,60	0,00	0,0	0,0	0,00	1,37	0,00
27	0,00	0,05	0,00	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00
28	0,00	0,01	0,00	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00
29	0,00	0,02	0,00	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00
31 prox	0,07	0,00	0,00	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00
33	0,00	0,01	0,00	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00
35	0,00	0,13	0,00	0,0	0,0	0,00	0,13	0,00
36	0,00	0,23	0,00	0,0	0,0	0,00	0,14	0,00
38	0,00	0,26	0,00	0,0	0,0	0,00	0,33	0,00
40	0,00	0,03	0,00	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00
42	0,00	0,01	0,00	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00
44	0,00	0,02	0,00	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00
45	0,17	0,00	0,00	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00
48	0,04	0,00	0,00	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00
49	0,05	0,00	0,00	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00
50	0,00	0,01	0,00	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00
52	0,00	0,01	0,00	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00
59	0,00	0,12	0,00	0,0	0,0	0,00	0,19	0,00
60	0,00	0,00	0,00	0,4	0,0	0,00	0,00	0,00
61	0,00	0,01	0,00	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00
62	0,00	0,02	0,00	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00
63	0,00	0,06	0,00	0,0	0,0	0,00	0,11	0,00
65	0,01	0,00	0,00	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00
69	0,00	0,02	0,00	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00
70	0,00	0,17	0,00	0,0	0,0	0,00	0,27	0,00
71	0,00	0,56	0,00	0,0	0,0	0,00	0,56	0,00
72	0,00	5,13	0,00	0,0	0,0	0,00	0,57	0,00
73	0,00	0,22	0,00	0,0	0,0	0,00	0,35	0,00
74	0,00	0,10	0,00	0,0	0,0	0,00	0,22	0,00

Continua

Nº amostra	Clonazepam	Diazepam	Lorazepam	MDMA	MET	Midazolam	Nordiaz	Oxaz
75	0,00	0,05	0,00	0,0	0,0	0,00	0,06	0,00
79 prox	0,18	0,02	0,00	0,0	0,0	0,00	0,03	0,00
81 prox	0,16	0,03	0,00	0,0	0,0	0,00	0,06	0,00
82	0,00	0,25	0,00	0,0	0,0	0,00	0,56	0,00
83	0,00	0,03	0,00	0,0	0,0	0,00	0,00	0,02
84	0,00	0,15	0,00	0,0	0,0	0,00	0,08	0,03
85	0,00	0,03	0,00	0,0	0,0	0,00	0,00	0,03
86	0,00	0,00	0,00	0,0	0,0	0,00	0,00	0,03
87	0,00	0,00	0,00	0,0	0,0	0,00	0,00	0,03
88	0,05	0,00	0,00	0,0	0,0	0,00	0,00	0,02
89 prox	0,04	0,02	0,00	0,0	0,0	0,00	0,00	0,02
90 prox	0,00	0,00	0,00	0,0	0,0	0,00	0,00	0,02
92	0,00	0,02	0,00	0,0	0,0	0,00	0,00	0,03
93 prox	0,00	0,00	0,00	0,0	0,0	0,00	0,00	0,03
94	0,00	0,11	0,00	0,0	0,0	0,00	0,22	0,03
95	0,00	0,01	0,00	0,0	0,0	0,05	0,00	0,03
96	0,00	0,14	0,00	0,0	0,0	0,00	0,13	0,03
97	0,00	0,15	0,00	0,0	0,0	0,00	0,14	0,04
98 prox	0,00	0,00	0,00	0,0	0,0	0,00	0,00	0,03
99 prox	0,17	0,01	0,00	0,0	0,1	0,00	0,00	0,07
100	0,00	0,01	0,00	0,0	0,0	0,00	0,00	0,03

Prox = proximal; MDMA= Metilenodioximetanfetamina; MET =Metanfetamina; NORDIAZ = Nordiazepam e OXAZ = Oxazepam.