UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Humor vítreo: uma alternativa para investigação de drogas de abuso
postmortem

Mariana Dadalto Peres

Ribeirão Preto

2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Humor vítreo: uma alternativa para investigação de drogas de abuso
postmortem

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

Área de Concentração: Toxicologia

Orientada: Mariana Dadalto Peres

Orientador: Prof. Dr. Bruno Spínosa De
Martinis

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia em 27/02/2015. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2014

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.

Peres, Mariana Dadalto

Humor vítreo: uma alternativa para investigação de drogas de abuso *post-mortem*. Ribeirão Preto, 2014.

176 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. Humor vítreo. 2. Amostra alternativa. 3. Drogas de abuso. 4. Mortes violentas.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Mariana Dadalto Peres

Título do trabalho; Humor vítreo: uma alternativa para investigação de drogas de abuso *postmortem*

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: _____

Aos meus pais, Cristina e Eduardo (*i.m*).

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis, pela confiança, incentivo e apoio ao meu trabalho.

À Profa. Dra. Ester Miyuki Nakamura-Palacios, a pessoa que me ensinou a dar os primeiros passos na ciência.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo pela oportunidade de realização do curso de doutorado

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão das bolsas de doutorado direto e de estágio no exterior e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Ao Departamento Médico Legal de Vitória - ES que permitiu a coleta das amostras.

Ao Laboratório de Toxicologia do DML e os Peritos Graça, Josidéia, Fabrício, Daniela e Jauber que colocaram o laboratório à disposição e ajudaram com insumos sempre que necessário.

Ao Instituto Norueguês de Saúde Pública que me recebeu durante o doutorado sanduíche e que tornou possível a realização do capítulo VI deste trabalho. Em especial à Vigdis, Ase Marit, Elisabeth, Hallvard, Hilde e Elin.

Aos professores Mauricio Yonamine, Regina Helena Queiroz e Jesus Antônio Velho pelas sugestões durante a minha banca de qualificação.

Aos colegas do Laboratório de Análises Toxicológicas Forenses com quem convivi os quatro anos de doutorado: Aline, Luiza, Marcela, Lidiane, Dayanne, Thiago, Laís, Fernanda Monedeiro, Ricardo, Fernanda Bernardi, Fabiana, Eduardo, Bruno Caleffi, Brenda, Fabrício.

Aos amigos que fiz em Ribeirão Preto: Bárbara, Fernanda, Gabriela, Kariane, Lucas, Tamara, Talita e Tarsila.

À minha mãe, Cristina, pelo exemplo e incentivo. Aos meus irmãos Gabriela e Carlos Eduardo e à minha família que souberam entender os momentos de ausência.

Ao meu marido, Alexandre, pelo apoio e paciência.

RESUMO

PERES, M.D. **Humor vítreo: uma alternativa para investigação de drogas de abuso *postmortem***. 2014. 171f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

O humor vítreo (HV) é um gel aquoso, transparente e incolor, situado entre o cristalino e a retina. Ele pode ser uma ferramenta para determinação de drogas de abuso, sobretudo quando é impossível fazer a determinação em sangue devido à sua ausência ou sua deterioração, por exemplo em casos de exsanguinação, embalsamento e carbonização. As drogas e seus metabólitos passam para o HV por difusão passiva e, de modo geral, a concentração dos analitos no HV é similar às concentrações obtidas no sangue. A cocaína e a benzoilecgonina são facilmente detectadas na matriz. Por outro lado, a difusão da morfina é bem limitada. O maior interesse do estudo de opioides é a análise de 6-acetilmorfina, que pode diferenciar o uso de heroína e morfina. O delta-9-tetrahidrocanabinol é uma molécula muito polar e fortemente ligada a proteínas plasmáticas, o que limita a sua difusão para o HV. Entre as anfetaminas, a metilenodioximetanfetamina e a metanfetamina são as moléculas mais estudadas no HV. Foi desenvolvido e validado um método utilizando GC-MS para análise simultânea de cocaína, anfetaminas, opioides, canabinoides e respectivos metabólitos em HV. Os analitos de interesse foram extraídos do HV utilizando extração em fase sólida e analisadas por GC-MS, utilizando o modo de aquisição SIM. A faixa de linearidade foi de 10 a 1000 ng/mL para todos os analitos, com exceção do éster de metilanidroecgonina (10 a 750 ng/mL). A exatidão variou de 95,6 a 104,0%, a precisão inter-ensaio variou de 1,2 a 10,0% e a precisão intra-ensaio foi menor que 10,4% para todos os analitos. O limite de quantificação para todas as drogas foi de 10 ng/mL e a recuperação variou de 70,4 a 100,1% para compostos básicos e neutros, entretanto os compostos ácidos apresentaram baixa recuperação - menor que 40%. A dosagem de etanol foi realizada por GC-FID e extração por *headspace*. Os métodos validados foram aplicados em 250 amostras de HV coletadas de vítimas de morte violentas nos anos de 2011 e 2012 que foram necropsiadas no Departamento Médico Legal de Vitória - ES. A maioria das vítimas era do sexo masculino (85,4%) e a causa mais comum de morte foi homicídio (46,2%), destes, 89,5% foram mortos por disparo de arma de fogo. Os acidentes de trânsito corresponderam a 44,1%; suicídio, 2,4%; e outras mortes totalizaram 7,2% das amostras. Substâncias psicoativas (álcool e drogas) foram positivas em 60,4% dos casos. Em 23,2% das amostras foi quantificada cocaína e/ou seu metabólito, e em um terço destes foi identificado o uso de *crack*. O álcool estava presente em 19,2% dos casos e a associação entre cocaína e álcool em 12,8% dos casos. Outras drogas incluíram anfetaminas (13 casos) e codeína (1 caso). Quando comparadas as concentrações das drogas pesquisadas no sangue e HV, a anfetamina e metanfetamina mostraram boa correlação entre as duas matrizes. A 6-acetilmorfina encontrada no HV foi utilizada para demonstrar o uso de heroína, uma vez que as concentrações foram mais altas do que no sangue. Entretanto, o HV não pode ser utilizado como amostra alternativa para detecção de canabinoides.

Palavras-chave: humor vítreo, amostra alternativa, drogas de abuso, mortes violentas

ABSTRACT

PERES, M.D. **Vitreous humor: an alternative drug investigation in *postmortem* samples.** 2014. 171f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Vitreous humor is the aqueous gel located between the lens and retina. Vitreous humor is a useful alternative postmortem matrix for the detection of drugs, particularly in death investigations where postmortem blood is not available or is of limited quality or quantity (e.g. after hemorrhagic shock, burns, embalming or decomposition processes). Drugs and their metabolites enter the vitreous humor by passive diffusion from blood across the blood-vitreous barrier. Vitreous humor concentrations are often similar to the drug concentrations in the circulation blood. Cocaine and benzoylecgonine are easily detected in this matrix. On the other hand, morphine diffusion is limited. The interest in opiates is due to 6-acetylmorphine, which is stable in vitreous humor and can confirm heroin abuse. Drugs that are highly protein-bound, such as THC, achieve lower vitreous humor concentrations as only the free fraction can cross the blood-vitreous barrier. Methamphetamine and methylenedioxymethamphetamine are also detected in vitreous humor. A GC-MS method for simultaneous analysis of cocaine, amphetamines, opiates, cannabinoids and its metabolites in vitreous humor was developed and fully validated. Vitreous humor samples were extracted using solid phase extraction and analyzed by GC-MS in SIM mode. For all analytes the linearity ranged from 10 to 1000 ng/mL, excepted for androecgonine methylester which ranged from 10 to 750 ng/mL. Inter-assay imprecision ranged from 1.2 to 10.0% and intra-assay imprecision was less than 10.4% for all analytes at all QC concentrations. Accuracy ranged from 95.6 to 104.0% and recoveries ranging from 70.4 – 100.1% for basic and neutral compounds, the acids compounds had poor recovery (less than 40%). The limits of detection were up to 1.0 ng/mL. Ethanol was quantified by headspace extraction and GC-FID. The validated methodology was applied to 250 vitreous humor samples collected from violent death victims between 2011 and 2012 in the Departamento Médico Legal de Vitória - ES. Most of the victims were male (85.4%) and the most common cause of death was homicide (46.2%), in which 89.5 occurred by firearm shot. Traffic accident represented 44.1%, suicide 2.4% and other deaths 7.2%. Psychoactive substances (alcohol and/or drugs of abuse) were positive in 60.4% of the cases. Cocaine was quantified in 23.2% of the samples and one third was positive for crack cocaine. Ethanol was present in 19.2% of the cases and the association between cocaine and alcohol in 12.8%. Other drugs included amphetamines (13 cases) and codeine (1 case). When comparing the drug concentrations in blood and vitreous humor, amphetamine and methamphetamine showed a good correlation. 6-acetylmorphine in vitreous humor can demonstrate heroine abuse and its concentration is higher in vitreous humor than in blood. However, vitreous humor is not a good matrix for the detection of cannabinoids.

Keywords: vitreous humor, alternative matrix, drugs of abuse, violent deaths.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Metabolismo da cocaína. Adaptado de (Klaassen, 2001).	9
Figura 2 - Metabolismo do THC. Adaptado de (Klaassen, 2001).	11
Figura 3 - Metabolismo da heroína e morfina. Adaptado de (Klaassen, 2001).	15
Figura 4 - Metabolismo da codeína. Adaptado de (Klaassen, 2001).	15
Figura 5 - Anatomia básica do olho. (http://www.oftalmo.epm.br/)	19
Figura 6 - Amostra de humor vítreo.	20
Figura 7 - Fluxograma do procedimento de preparação das amostras.	37
Figura 8 - Cromatograma obtido de uma amostra de humor vítreo fortificada com todos os analitos pesquisados em uma concentração de 100 ng/mL.	47
Figura 9 - Gráficos de desejabilidade.	49
Figura 10 - Amostra de humor vítreo “branca”.	51
Figura 11 - Curva de calibração da anfetamina e metanfetamina.	53
Figura 12 - Curva de calibração do éster de metilandroecgonina e metilandroecgonina.	53
Figura 13 - Curva de calibração da metilandroecgonina e metilandroecgonina.	53
Figura 14 - Curva de calibração da metadona e cocaína.	54
Figura 15 - Curva de calibração do cocaetilo e benzoilecgonina.	54
Figura 16 - Curva de calibração do tetrahydrocannabinol e dihidrocodeína.	54
Figura 17 - Curva de calibração da codeína e morfina.	55
Figura 18 - Curva de calibração da 6-acetilmorfina e carboxi-tetrahydrocannabinol.	55
Figura 19 - Cromatograma obtido após análise da amostra 83, positiva para codeína (157,37 ng/mL).	59
Figura 20 - Cromatograma obtido após análise da amostra 95, positiva para MDMA (541,39 ng/mL) e MDA (29,05 ng/mL).	60
Figura 21 - Cromatograma obtido após análise da amostra 174, positiva para cocaína (1923,82 ng/mL), cocaetilo (169,23 ng/mL) e benzoilecgonina (1586,00 ng/mL).	60
Figura 22 - Amostra de humor vítreo “branca” adicionada de padrão interno e analisada por GC-FID.	70
Figura 23 - Amostra de humor vítreo fortificada com 20 dg/L de etanol e analisada por GC-FID.	70
Figura 24 - Amostra de humor vítreo positiva para etanol (28,4 dg/L).	71
Figura 25 - Curva de calibração do etanol	72

Figura 28 - Distribuições dos casos em relação ao tipo de morte (esquerda); distribuição dos acidentes de trânsito em relação ao veículo (direita).	81
Figura 32 - Distribuição das concentrações de benzoilecgonina (C) e éster de metilanidroecgonina (D).	83
Figura 33 - Análise de regressão linear da concentração de anfetamina (A) e metanfetamina (B) no humor vítreo e sangue periférico.	117
Figura 34 - Análise de regressão linear da concentração de morfina (A) e codeína (B) no humor vítreo e sangue periférico.	120
Figura 35 - Análise de regressão linear da concentração de morfina-3-glicuronídeo (A) e morfina-6-glicuronídeo (B) no humor vítreo e sangue periférico.	121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Prevalência do uso de drogas (%) em diferentes populações.....	7
Tabela 2 - Procedimentos para análise toxicológica forense em humor vítreo.	27
Tabela 3 - Programação de temperatura da coluna do GC-MS	38
Tabela 4 - Íons de quantificação, identificação e tempo de retenção dos analitos....	39
Tabela 5 - Lista de interferentes analisados no parâmetro de especificidade.....	41
Tabela 6 - Valores de limite de detecção e limite de quantificação dos analitos estudados em amostras de HV.	50
Tabela 7 - Faixa de linearidade e coeficiente de determinação (R^2) das drogas e metabólitos analisados.	52
Tabela 8 - Valores de recuperação obtidos para os analitos pesquisados.	56
Tabela 9 - Valores de precisão da quantificação dos analitos por GC/MS em amostras de humor vítreo.	57
Tabela 10 - Valores de exatidão da quantificação dos analitos por GC/MS em amostras de humor vítreo.	58
Tabela 11 - Correspondência entre os resultados obtidos em amostras de sangue e de HV.	61
Tabela 12 - Valores de precisão e exatidão da quantificação de etanol em humor vítreo por GC-FID.....	72
Tabela 16 - Uso de substâncias psicoativas em cada tipo de morte.....	81
Tabela 13 - Valor máximo e mínimo, média e desvio padrão das concentrações de cocaína, cocaetileno, benzoilecgonina e EMA.	83
Tabela 14 - Concentrações de benzoilecgonina na presença e na ausência de etanol.	84
Tabela 15 - Valor máximo e mínimo, média e desvio padrão das concentrações de anfetamina, MDMA, MDA e MDEA.	84
Tabela 17 - Relação entre as variáveis sexo, faixa etária, local e tipo de acidente, e o uso de álcool e drogas	86
Tabela 18 - Relação entre os dados demográficos e o uso de álcool e drogas.	87
Tabela 19 - Limite de quantificação para análise de anfetaminas por LC-MS/MS.	95
Tabela 20 - Tabela de gradiente de fase móvel utilizado na análise de anfetaminas por UPLC-MS/MS.....	96
Tabela 21 - Lista de transições, voltagem do cone, energia de colisão e <i>dwell time</i> para análise de anfetamina por LC-MS/MS.	97

Tabela 22 - Limite de quantificação para análise de opioides e cocaína por LC-MS/MS.	100
Tabela 23 - Tabela de gradiente de fase móvel utilizado na análise de opioides e cocaína por UPLC-MS/MS.	101
Tabela 24 - Lista de transições, voltagem do cone, energia de colisão e <i>dwell</i> time para análise de anfetamina por LC-MS/MS.	102
Tabela 25 - Limite de quantificação da análise de medicamentos por LC-MS/MS..	104
Tabela 26 - Tabela de gradiente de fase móvel utilizado na análise de medicamentos por UPLC-MS/MS.....	105
Tabela 27 - Transições MRM, tempo de retenção e padrão interno dos medicamentos analisado por UPLC-MS/MS.	106
Tabela 28 - Concentrações dos controles de qualidade para análise de medicamentos por UPLC-MS/MS.....	108
Tabela 29 - Valores de efeito matriz (%) obtidos no sangue periférico e no humor vítreo na análise de medicamentos por LC-MS/MS.	111
Tabela 30 - Resultados de recuperação (%) obtidos no sangue periférico e humor vítreo na análise de medicamentos por LC-MS/MS.	112
Tabela 31 - Valores de precisão intra-ensaio (%) calculada para amostras de sangue periférico e humor vítreo.	113
Tabela 32 - Resultados de precisão inter-ensaio (%) calculada para amostras de sangue periférico e humor vítreo.....	114
Tabela 33 - Valores de exatidão (% do valor teórico) calculada para amostras de sangue periférico e humor vítreo.....	114
Tabela 34 - Casos envolvendo as classes de drogas estudadas.....	115
Tabela 35 - Concentrações ($\mu\text{Mol/mL}$) de anfetamina e metanfetamina obtidas em amostras de sangue periférico e humor vítreo.	116
Tabela 36 - Relação entre as concentrações ($\mu\text{Mol/mL}$) de codeína e morfina para determinação do uso de heroína.....	118
Tabela 37 - Concentrações ($\mu\text{Mol/mL}$) de morfina e 6-acetilmorfina obtidas no sangue periférico e humor vítreo.	119
Tabela 38 – Concentrações ($\mu\text{Mol/mL}$) de morfina-3-glicuronídeo e morfina-6-glicuronídeo obtidas no sangue periférico e humor vítreo.	120
Tabela 39 - Concentrações ($\mu\text{Mol/mL}$) de codeína e codeína-6-glicuronídeo obtidas no sangue periférico e humor vítreo.....	121

Tabela 40 – Concentração ($\mu\text{Mol/mL}$) de oxicodona no sangue periférico e humor vítreo.	122
Tabela 41 – Concentrações ($\mu\text{Mol/mL}$) de benzoilecgonina e cocaína no caso 24.	124
Tabela 42 - Concentrações ($\mu\text{Mol/mL}$) de THC e CBD obtidas em amostras de sangue periférico e humor vítreo.	124
Tabela 43 - Concentrações ($\mu\text{Mol/mL}$) de nortriptilina e amitriptilina obtidas no sangue periférico e humor vítreo.	125
Tabela 44 - Concentrações ($\mu\text{Mol/mL}$) de metoprolol, tramadol e venlafaxina obtidas no sangue periférico e humor vítreo.	126
Tabela 45 - Concentrações ($\mu\text{Mol/mL}$) de mirtazapina, quetiapina e citalopram obtidas no sangue periférico e humor vítreo.	127
Tabela 46 - Concentrações ($\mu\text{Mol/mL}$) de setralina, levomepromazina e alimemazina obtidas no sangue periférico e humor vítreo	127
Tabela 47 - Circunstâncias da morte e concentrações obtidas no humor vítreo.	145

LISTA DE ABREVIATURAS

ANF	Anfetamina
MET	Metanfetamina
MDMA	N-metil-3,4-metilenodioximetanfetamina
MDA	3,4-metilenodioxianfetamina
MDEA	N-etil-3,4-metilenodioxietilanfetamina
ANF D11	Anfetamina D11
MET D14	Metanfetamina D14
MDMA D5	Metilenodioximetanfetamina D5
COC	Cocaína
CE	Cocaetileno
BE	Benzoilecgonina
EMA	Éster de metilanidroecgonina
COC D3	Cocaína D3
BE D3	Benzoilecgonina D3
MOR	Morfina
METAD	Metadona
6-AM	6-Acetil morfina
COD	Codeína
DIHID	Dihidrocodeína
MOR D3	Morfina D3
THC	Delta-9-tetrahidrocanabinol
COOHTHC	11-nor-9-carboxi-tetrahidrocanabinol
COOHTHC D3	11-nor-9-carboxi-tetrahidrocanabinol D3
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
DML – ES	Departamento Médico Legal do Espírito Santo
MSTFA	N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
UNODC	United Nations Office Drugs and Crime
CQ	Controle de qualidade

Ng	Nanograma
ml	Mililitro
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
CV	Coeficiente de variação
DPR	Desvio padrao relative
SPE	Extração em fase sólida
GC-FID	Cromatografia gasosa com detector de ionização de chamas
HV	Humor vítreo
UPLC	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
CBD	Canabidiol
ESI	Ionização por Eletrospray
PAF	Projétil de Arma de Fogo
ATS	Estimulantes semelhantes à anfetamina
NPS	Novas substâncias psicoativas
SENAD	Secretaria Nacional de Políticas de Drogas

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
PREFÁCIO	1
CAPÍTULO I	3
1. USO DE DROGAS NO BRASIL E NO MUNDO	4
2. ASPECTOS TOXICOLÓGICOS DAS DROGAS PESQUISADAS	8
2.1 Cocaína.....	8
2.2 Maconha	10
2.3 Anfetaminas	12
2.4 Opioides.....	14
3. MATRIZES BIOLÓGICAS UTILIZADAS NA TOXICOLOGIA FORENSE	16
3.1 Matrizes convencionais.....	16
3.2 Matrizes alternativas	16
3.2.1. Humor vítreo	19
4. ANÁLISE DE DROGAS NO HUMOR VÍTREO.....	21
4.1 Cocaína.....	22
4.2 Anfetaminas	23
4.3 Opioides.....	24
4.4 Canabinoides	25
4.5 Outras drogas	25
CAPÍTULO II	27
1. OBJETIVO GERAL.....	28

1.1	Capítulo III:.....	28
1.2	Capítulo IV:	28
1.3	Capítulo V:	28
1.4	Capítulo VI:	28
2.	ASPECTOS ÉTICOS	29
	CAPÍTULO III	30
1.	INTRODUÇÃO	32
2.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
2.1	Reagentes e soluções.....	34
2.1.1	Preparo de soluções	34
2.2	Equipamentos e acessórios	35
2.3	Procedimento de extração e derivatização da amostra	36
2.4	Condições cromatográficas.....	38
2.5	Análise de dados.....	39
2.6	Planejamento experimental para otimização do procedimento de derivatização	40
2.7	Validação do método	40
2.7.1	Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)	41
2.7.2	Seletividade e Especificidade	41
2.7.3	Linearidade	42
2.7.4	Recuperação	42
2.7.5	Precisão e exatidão	43
2.7.6	Estabilidade	44
2.7.7	<i>Carryover</i>	45
2.8	Amostras de humor vítreo	45
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
3.1	Análise cromatográfica.....	47

3.2 Otimização do procedimento de extração	47
3.3 Otimização do procedimento de derivatização	48
3.4 Validação do método	49
3.4.1 Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ)	50
3.4.2 Seletividade e Especificidade	50
3.4.3 Linearidade	51
3.4.4 Recuperação	55
3.4.5 Precisão e exatidão	56
3.4.6 Estabilidade	58
3.4.7 <i>Carryover</i>	59
3.5 Amostras de humor vítreo	59
CAPÍTULO IV	63
1. INTRODUÇÃO	65
2. MATERIAIS E MÉTODOS	67
2.1 Reagentes e soluções	67
2.1.1 Preparo de soluções	67
2.2 Equipamentos e acessórios	67
2.3 Análise de etanol por GC-FID	67
2.4 Validação do método	68
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
3.1 Análise cromatográfica	70
4.2 Validação	71
CAPÍTULO V	73
1. INTRODUÇÃO	75
1.1 Uso de drogas e acidente de trânsito	75
1.2 Uso de drogas e homicídios	76
2. MATERIAIS E MÉTODOS	78

RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	80
3.1 Mortes violentas	80
3.2 Uso de álcool	81
3.3 Uso de drogas	82
3.3.1 Cocaína	83
3.3.2 Anfetamina.....	84
3.3.3 Opioides.....	85
3.4 Relação entre acidente de trânsito e substâncias psicoativas	85
3.5 Relação entre homicídios e substâncias psicoativas	86
CAPÍTULO VI	89
1. INTRODUÇÃO	91
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	93
2.1 Reagentes e soluções.....	93
2.2 Coleta das amostras	94
2.3 Triagem.....	94
2.4 Análises dos dados	94
2.5 Análise estatística	95
2.6 Análise de anfetaminas.....	95
2.6.1 Preparação da amostra	95
2.6.2 Análise cromatográfica	96
2.7 Análise de opioides e cocaína.....	100
2.7.1 Preparação da amostra	100
2.7.2 Análise cromatográfica	101
2.8 Análise de canabinoides	103
2.8.1 Preparação da amostra	103
2.8.2 Análise cromatográfica	103

2.9 Análise de medicamentos	103
2.9.1 Preparação da amostra	104
2.9.2 Análise cromatográfica	105
2.9.3 Validação Parcial	107
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	111
3.1 Validação parcial do método para quantificação de medicamentos.....	111
3.1.1 Efeito matriz.....	111
3.1.2 Recuperação	112
3.1.3 Precisão e exatidão	113
3.2 Amostras de necropsia	115
3.2.1 Anfetaminas.....	116
3.2.2 Opioides e cocaína	117
3.2.3 Canabinoides.....	124
3.2.4 Medicamentos	125
CAPÍTULO VII.....	128
REFERÊNCIAS.....	130
APÊNDICE 1	145
ANEXO 1.....	151

PREFÁCIO

O objetivo deste trabalho é verificar a viabilidade do uso do humor vítreo como amostra alternativa nas análises toxicológicas forenses. No primeiro capítulo é feita uma revisão bibliográfica das substâncias pesquisadas no trabalho (anfetaminas, cocaína, maconha e opioides); do padrão de uso de drogas de abuso no Brasil e no Mundo; das matrizes biológicas mais utilizadas na toxicologia forense; e do humor vítreo, detalhando estudos que relatam a utilização desta amostra para pesquisa de substâncias de interesse forense.

No trabalho é descrito o método desenvolvido e validado para análise de cocaína, canabinoides, anfetaminas e opioides. Este método realiza a análise simultânea das quatro classes de drogas e utiliza um mililitro da amostra de humor vítreo, o que é uma vantagem, já que o volume disponível é sempre limitado (no máximo quatro mililitros). Um método para determinação da concentração de etanol em humor vítreo também é descrito.

Os métodos descritos e validados foram aplicados em 250 amostras de humor vítreo de vítimas de mortes violentas. Com os resultados toxicológicos foi possível construir um perfil demográfico e relacionar fatores como idade, sexo e tipo de morte com o uso de álcool e drogas.

Por fim são mostrados resultados da comparação em amostras de sangue e de humor vítreo das concentrações de opioides, medicamentos, canabinoides e anfetaminas. Estes resultados possibilitam verificar uma tendência entre essas relações que futuramente podem ser utilizadas para interpretar resultados obtidos no humor vítreo.

CAPÍTULO I

**O humor vítreo como amostra
alternativa nas análises toxicológicas
forenses**

O uso e dependência de drogas de abuso é um importante problema de saúde pública. O uso de drogas afeta a sociedade reduzindo a saúde física e mental do usuário, atrapalhando o convívio familiar e social e aumentando a criminalidade. Doenças contagiosas como HIV/AIDS, hepatite B e C e tuberculose também estão associadas com o uso de substâncias psicoativas (Sindelar e Fiellin, 2001).

1. USO DE DROGAS NO BRASIL E NO MUNDO

O uso de drogas é uma realidade preocupante e um problema mundial de saúde pública. Segundo o relatório mais recente do Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crimes (UNODC), 167 a 315 milhões de pessoas (3,6 a 6,9% da população) entre 15 e 64 anos usaram alguma droga no ano de 2010, o que representa um aumento de 18% desde 2008. No nível mundial, o consumo de *cannabis* e opioides aumentou entre 2009 e 2011, enquanto o de cocaína e anfetaminas diminuiu. No Brasil, entretanto, houve um aumento significativo do uso de cocaína (Unodc, 2013).

Em um levantamento realizado em 108 cidades brasileiras no ano de 2005, 22,8% da população de faixa etária entre 12 e 65 anos disse já ter feito uso de qualquer substância psicotrópica (exceto álcool e tabaco) pelo menos uma vez na vida. O uso na vida de tabaco e álcool chega a 44 e 74,6% dos entrevistados, respectivamente (Carlini, 2006).

O VI Levantamento sobre uso de drogas entre estudantes do ensino fundamental e médio das capitais brasileiras entrevistou mais de 50 mil estudantes. Destes, 25,5% afirmaram ter feito uso de substâncias psicotrópicas (exceto álcool e cigarro) alguma vez na vida, 10,6% fizeram uso no ano anterior e 5,5% no mês anterior à pesquisa. Embora a maioria que referiu uso de drogas tenha mais de 16 anos, houve relatos entre estudantes de 10 a 12 anos. O uso de álcool foi descrito por 42,4% dos estudantes e de cigarro por 9,6% (Carlini, 2010).

Uma pesquisa realizada entre universitários das 27 capitais brasileiras mostrou que a prevalência de uso de drogas é ainda maior nesta população, 25,9% afirmou ter usado substâncias ilícitas no mês anterior à pesquisa, 35,8% no ano anterior e

48,7% alguma vez na vida. Em relação ao consumo de álcool, 60,5% disse ter bebido no mês anterior, 72,0% no ano anterior e 86,2% alguma vez na vida (Brasil, 2010).

São fatores que influenciam no tipo de droga utilizada globalmente: o tipo de consumidor; a disponibilidade, o tipo, a qualidade e o preço do produto; e como este produto é comercializado (Pomara *et al.*, 2012).

A *cannabis* é a substância mais utilizada no mundo, 3,9% da população mundial entre 15 e 64 anos faz uso de *cannabis* regularmente, o que corresponde a 180,6 milhões de pessoas. Na América do Sul esta porcentagem é ainda maior, 5,7% da população (Unodc, 2013). Entre estudantes brasileiros universitários, 9,1% afirmou uso no mês anterior à pesquisa e 13,8% no ano anterior (Brasil, 2010). Enquanto que 3,7% dos estudantes do ensino fundamental e médio, afirmaram uso de *cannabis* no ano anterior ao levantamento. Em Vitória - ES, este número foi um pouco menor, 3,1% (Carlini, 2010).

A América do Sul é a região produtora de cocaína, o que leva a um menor preço da droga e conseqüentemente aumento no consumo. Cerca de 1,3% da população adulta do continente consome cocaína, valor maior do que a média global. O Brasil, por fazer fronteira com os três maiores países produtores (Bolívia, Colômbia e Peru) é uma rota de tráfico de cocaína para Europa. Dados do relatório do UNODC mostram que mais que 1,0% da população brasileira utiliza cocaína.

Estudantes universitários brasileiros tem uma maior prevalência do consumo de cocaína do que a população em geral, 1,8% afirma ter feito uso de cocaína no mês anterior à pesquisa e 0,2% consumiu *crack* (Brasil, 2010).

O uso de cocaína também é comum entre jovens menores de 18 anos, sendo que 1,8% dos estudantes afirmaram ter utilizado cocaína no ano anterior ao levantamento. Em Vitória, 2,1% afirmaram uso de cocaína e 0,2% de cocaína na forma de *crack*. Houve um aumento do uso de cocaína entre estudantes em relação ao levantamento anterior (Carlini, 2010).

A estatística em relação ao consumo de anfetaminas se divide em três tipos: anfetaminas; estimulantes similares à anfetamina (ATS, *amphetamine type stimulants*),

e *ecstasy*. O consumo de ATS aumentou no mundo em relação ao ano anterior. Cerca de 0,7% da população (33,8 milhões de pessoas) utilizam estes estimulantes. Na América do Sul, o ATS é utilizado por cerca de 0,5% da população, e o *ecstasy* por 0,2% (Unodc, 2013). No Brasil, 1,7% dos estudantes de ensino fundamental e médio relatam uso de anfetamina no ano anterior e 1,3% uso de *ecstasy* alguma vez na vida (Carlini, 2010). Entre os estudantes universitários, 1,9% afirmaram uso de *ecstasy* no último mês e 8,7% afirmaram consumo de algum ATS no mês anterior (Brasil, 2010).

Os opioides são utilizados por 0,4% da população mundial, principalmente a heroína e o ópio. As áreas de maior consumo são o Sudoeste e Centro da Ásia, o Leste Europeu e a América do Norte. Na América do Sul, a porcentagem de usuários de opioides é menor, 0,3% da população (Unodc, 2013). Este é o mesmo número de estudantes do ensino fundamental e médio que relataram uso de opioides alguma vez na vida (Carlini, 2010). No levantamento entre estudantes universitários, 0,2% afirmou ter utilizado heroína alguma vez na vida (Brasil, 2010).

Além destas quatro classes de drogas, há um avanço no consumo das Novas Substâncias Psicoativas (NPS, *new psychoactive substances*), que são substâncias psicoativas ainda não proscritas ou que imitam o efeito das proscritas. Em meados de 2012 havia 251 novas substâncias, que é um número maior do que as controladas. No Brasil as apreensões de NPS em 2013 se limitaram à mefedrona e DMMA (fenetilamina) (UNODC, 2013). A tabela 1 apresenta a prevalência do uso de drogas na população mundial, da América do Sul e no Brasil.

Tabela 1 – Prevalência do uso de drogas (%) em diferentes populações.

Substâncias	Mundo ^a	América do Sul ^a	Brasil ^b			Estudantes Universitários ^c			Ensino fundamental e médio ^d		
			Na vida	No ano	No mês	Na vida	No ano	No mês	Na vida	No ano	No mês
Álcool	*	*	74,6	49,8	38,3	86,2	72	60,5	60,5	42,4	21,1
Tabaco	*	*	44	19,2	18,4	46,7	27,8	21,6	16,9	9,6	5,5
<i>Cannabis</i>	3,9	5,7	8,8	2,6	1,9	26,1	13,8	9,1	5,7	3,7	2
Cocaína	0,5	1,3	2,9	0,7	0,4	7,7	3	1,8	2,5	1,8	1
<i>Crack</i>	*	*	0,7	0,1	0,1	1,2	0,2	0,2	0,6	0,4	0,3
<i>Ecstasy</i>	0,4	0,1	*	*	*	7,5	3,1	1,9	1,3	0	0
ATS	0,7	0,5	3,2	0,7	0,3	13,8	10,5	8,7	2,2	1,7	0,9
Opioides	0,7	0,3	3,3	0,9	0,5	8,4	4,9	2,7	0,9	0	0
Solventes/Inalantes	*	*	6,1	2,1	1,3	20,4	6,5	2,9	8,7	5,2	2,2
Ansiolíticos	*	*	5,6	2,1	1,3	12,4	8,4	5,8	5,3	2,6	1,3
Drogas sintéticas	*	*	*	*	*	2,2	1,1	0,8	*	*	*

* Dados não informados. ^a(Unodc, 2013); ^b(Carlini, 2006); ^c(Brasil, 2010); ^d(Carlini, 2010)

2. ASPECTOS TOXICOLÓGICOS DAS DROGAS PESQUISADAS

2.1 Cocaína

A cocaína é um dos alcaloides das folhas da *Erythroxylum coca*, arbusto que cresce nas regiões andinas, principalmente no Peru e na Colômbia. Historicamente, os indígenas dessa região mastigavam a folha da coca a milhares de anos. A cocaína foi isolada quimicamente em 1860 e começou a ser utilizada em medicamentos, bebidas e “tônicos” na Europa e América do Norte. Sigmund Freud inicialmente acreditava que o uso de cocaína poderia curar doenças médicas e psicológicas (Johanson e Fischman, 1989).

As folhas são convertidas em pasta de coca após a maceração, que é posteriormente utilizada para produção do cloridrato de cocaína ou da base alcaloidal, o *crack* (Loper, 1989). O cloridrato de cocaína é vendido como um pó branco cristalino, solúvel em água e adulterado com diversos ingredientes. Alguns açúcares, como lactose, manitol, são utilizados como diluentes para aumentar o volume do produto final. E vários fármacos são comumente utilizados para adulterar a droga, por exemplo: benzocaína, fenacetina, cafeína, lidocaína, levamisol, hidroxizina, diltiazem (Johanson e Fischman, 1989).

A molécula da cocaína possui alta hidrofiliabilidade e também lipofiliabilidade, de modo que, atravessa qualquer membrana mucosa e atravessa facilmente a barreira hematoencefálica. As formas mais comuns de auto-administração são a intranasal e a intravenosa do sal de cocaína e pelo ato de fumar a base livre, o *crack*. Nos últimos anos, houve algumas alterações nos padrões de uso da cocaína quanto à via de administração: mudou de intranasal e/ou intravenosa, para a via respiratória, por meio do ato de fumar (Chasin e Salvadori, 1996).

As razões para esta mudança estão embasadas no alto potencial de abuso do *crack*, na qual os efeitos prazerosos ocorrem mais rápidos e mais intensamente quando comparados à via intranasal, 6-8 s versus 3-5 min (Pomara *et al.*, 2012). Além de alcançarem o pico plasmático mais rapidamente, a concentração máxima atingida também é maior (Cone, 1995).

A biotransformação da cocaína ocorre principalmente por ação de três esterases: pseudocolinesterase, carboxilesterase-1 humana (hCE-1) e

carboxilesterase-2 humana (hCE-2). A cocaína é hidrolisada pela hCE-1 em benzoilecgonina, o principal metabólito excretado pela urina. As pseudocolinesterases e hCE-2 formam a ecgonina metil éster. Na presença de etanol, a hCE-1 catalisa a transesterificação da cocaína em cocaetilenos, um metabólito tóxico, que posteriormente é hidrolisado formando benzoilecgonina e ecgonina metil éster. (Inaba, Stewart e Kalow, 1978; Barnett, Hawks e Resnick, 1981; Jatlow, 1988; Zhang e Foltz, 1990; Cone, 1995; Maurer, Sauer e Theobald, 2006). A Figura 1 apresenta os principais metabólitos da cocaína.

Figura 1 - Metabolismo da cocaína. Adaptado de (Klaassen, 2001).

Quando a cocaína na base livre é fumada, forma-se um produto de pirólise, o éster de metilanidroecgonina. Desta forma, o éster funciona como marcador específico para o consumo de cocaína como base livre (o *crack*) (Oyler *et al.*, 1996).

A cocaína é um estimulante que produz a maioria dos efeitos farmacológicos por inibição da recaptação da dopamina, norepinefrina e serotonina nos terminais pré-sinápticos. Como consequência, há a potencialização dos efeitos estimulantes desses neurotransmissores, tanto no sistema nervoso central como no periférico (Benowitz, 1993). Os efeitos agudos incluem euforia, aumento no nível de alerta, diminuição do apetite e aumento da energia; além de efeitos cardiovasculares como taquicardia, vasoconstrição, midríase e hipertermia (Bortolotti *et al.*, 2012; Johanson e Fischman, 1989).

Os efeitos crônicos dependem da dose, modo de consumo e da adição do usuário. As complicações mais comuns são: doenças cardiovasculares, como arritmia, infarto agudo do miocárdio ou morte súbita; doenças cerebrovasculares, por exemplo, derrame isquêmico ou hemorrágico; doenças respiratórias, principalmente em usuários de *crack*; e doenças renais (Pomara *et al.*, 2012; Johanson e Fischman, 1989).

2.2 Maconha

As flores e folhas da planta *Cannabis sativa* secretam uma resina que contém mais de 60 compostos psicoativos chamados canabinoides. Este termo se refere aos compostos C21 presentes na planta, seus produtos de transformação e análogos relacionados. A quantidade de canabinoides varia dependendo do clima, solo, cultivo e tipo de planta (Adams e Martin, 1996).

O delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) foi isolado pela primeira vez em 1960 por Mechoulam e colaboradores, que foi mais tarde descrito como o principal responsável pelas propriedades psicoativas da planta (Gaoni e Mechoulam, 1964).

A complexidade na composição química da planta pode causar efeitos diferentes. O THC é encontrado na *cannabis* como uma mistura de ácidos carboxílicos que são descarboxilados facilmente com o aquecimento. O THC é decomposto quando exposto ao ar, calor ou luz, formando o canabinol (CBN), um canabinoide muito menos potente (Huestis, 2007).

A maconha é usada principalmente fumada. Por meio desta via de administração, o THC é rapidamente absorvido nos pulmões e transportado até o cérebro, contribuindo para o potencial de abuso da maconha. Os efeitos prazerosos e de reforço positivo são produzidos quase que imediatamente após a exposição do sistema nervoso central à droga. O pico de concentração do THC é levemente menor após a droga ser fumada, comparando com a administração intravenosa (Huestis, 2007).

A concentração de THC no plasma diminui rapidamente após ser inalado devido à rápida distribuição para os tecidos e metabolismo hepático. A molécula de

THC é muito lipofílica e é inicialmente distribuída para os tecidos mais perfundidos, como pulmão, coração, cérebro e fígado. No fígado, o THC é metabolizado em 11-hidroxi-tetrahidrocanabinol (11-OH-THC), que é farmacologicamente ativo. Em seguida, por oxidação, há a formação do 9-carboxi-tetrahidrocanabinol (COOH-THC), conforme Figura 2. A concentração de COOH-THC aumenta gradativamente e o pico plasmático ocorre aproximadamente duas horas após absorção. A eliminação dos metabólitos hidroxilados e carboxilados acontece principalmente nas fezes (11-OH-THC) e na urina (COOH-THC conjugado) (Maurer, Sauer e Theobald, 2006; Huestis, 2007).

Figura 2 - Metabolismo do THC. Adaptado de (Klaassen, 2001).

Os canabinoides produzem uma gama de efeitos farmacológicos e comportamentais que envolvem vários substratos cerebrais mediante ligação com receptores endocanabinoides (CB_1). Estes receptores estão distribuídos no córtex cerebral, áreas límbicas (hipocampo e amígdala), gânglios basais, cerebelo e tálamo, o que explica os efeitos do canabinoides na memória e cognição. A baixa concentração de receptores nas áreas cerebrais responsáveis pelo controle das

funções cardiovasculares e respiratórias é consistente com a baixa letalidade da *cannabis* (Gaoni e Mechoulam, 1964; Ashton, 2001).

O principal efeito buscado por usuários recreativos de *cannabis* é a euforia, cujas sensações incluem a diminuição da ansiedade, alerta, depressão, tensão e o aumento da sociabilidade, relaxamento e sonolência. Entretanto, a maconha pode causar mudanças repentinas no humor, incluindo ansiedade severa, pânico, paranoia e psicose. Além da euforia, usuários podem experimentar efeitos na percepção (cores mais brilhantes, músicas mais vívidas); diminuição na capacidade cognitiva e psicomotora; e diminuição na capacidade de dirigir (Hollister, 1998; Ashton, 2001).

Além dos efeitos já descritos, os canabinoides produzem alguns efeitos sistêmicos. No sistema cardiovascular, há um aumento nos batimentos cardíacos; vasodilatação, incluindo da conjuntiva, que consiste em um sinal característico do uso de *cannabis*; podendo ocorrer também hipotensão postural e desmaios. O cigarro de maconha possui os mesmos constituintes do cigarro (exceto a nicotina) e, portanto, os efeitos no sistema respiratórios são similares, por exemplo, irritação brônquica, promotores de tumores e carcinogênicos. O uso crônico de maconha está associado à bronquite e enfisema (Ashton, 2001).

2.3 Anfetaminas

A anfetamina começou a ser utilizada clinicamente em 1920 para o tratamento de asma e como descongestionante nasal. Durante a Segunda Guerra Mundial, o seu uso foi disseminado, usado como estimulante e para tratamento de outras condições médicas. Em 1970, o uso de anfetamina foi proibido nos EUA, diminuindo o consumo. Entretanto, em 1980, começou a produção das “*designers*” anfetaminas, sendo a mais conhecida a 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) (Greene, Kerr e Braitberg, 2008).

Anfetamina é um psicoestimulante comumente utilizado para tratar algumas doenças como déficit de atenção, narcolepsia e obesidade. Os compostos anfetamínicos possuem estrutura derivada da β -feniletilamina. As substituições na estrutura química produzem diferentes efeitos clínicos. Considera-se como anfetamínicos o grupo de substâncias composto pela anfetamina e seus derivados,

são eles: metanfetamina, 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA), 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA, ecstasy) e 3,4 metilenodioxietilanfetamina (MDEA) (Wills, 2002).

A anfetamina e o MDMA são usualmente consumidos via oral, a metanfetamina, além da via oral, também pode ser consumida via intravenosa, inalada e fumada. Estes compostos têm baixa ligação com as proteínas plasmáticas, o que favorece a difusão no plasma (Chasin e Salvadori, 1996).

Os principais alvos da anfetamina ao nível molecular são os transportadores neuronais de dopamina e os transportadores vesiculares de monoaminas. A ação da anfetamina nesses transportadores facilita a liberação das monoaminas, principalmente a dopamina, das vesículas pré-sinápticas. Também pode ocorrer estimulação direta dos receptores pós-sinápticos. O aumento da dopamina no SNC, principalmente no sistema mesolímbico, resulta no aumento da atividade psicomotora observada nos casos de intoxicação por anfetaminas (Fleckenstein *et al.*, 2007; Greene, Kerr e Braitberg, 2008).

Os efeitos clínicos causados pelo uso de anfetaminas são principalmente simpatomiméticos e podem ocorrer por modulação no sistema nervoso central e periférico. Os efeitos periféricos incluem taquicardia, taquipneia, diaforese, hipertensão, hipertermia, midríase, hiper-reflexia e tremor. Os efeitos centrais são mais variados, podendo ocorrer hipervigilância, agitação, paranoia, alucinações, desinibição, convulsão e coma (Fleckenstein *et al.*, 2007).

As principais vias de metabolismo das anfetaminas são: hidroxilação aromática, hidroxilação alifática, N-desalquilação, desaminação oxidativa, N-oxidação e conjugação do nitrogênio. A reação de N-desalquilação da metanfetamina a converte em anfetamina. O femproporex também é metabolizado formando anfetamina (Musshoff, 2000).

O metabolismo do MDMA, MDEA e MDA ocorre principalmente por duas vias mediadas por enzimas CYP: O-desmetilação formando derivados di-hidroxil (catecóis) e seguidos por metilação de um dos grupos hidroxil; e degradação sucessiva da cadeia lateral formando metabólitos N-dealquil e deaminoxil (Kraemer e Maurer, 2002)

2.4 Opioides

Os opiáceos são substâncias naturais contidas no ópio, um produto natural obtido da planta *Papaver somniferum*. São exemplos de opiáceos: a morfina, codeína, papaverina, narcotina. Opioides são substâncias sintéticas que apresentam efeitos semelhantes ao ópio, como a metadona, pentazocina, propoxifeno (De Oliveira e Camargo, 1996)

A heroína é um produto semissintético derivado da morfina, entretanto, a droga é vendida como uma mistura complexa de diferentes alcaloides do ópio e subprodutos sintéticos, incluindo morfina, 6-acetilmorfina (6-AM), codeína, 6-acetilcodeína, noscapina e papaverina. Do mesmo modo, são encontrados diversos adulterantes e diluentes (Barroso *et al.*, 2011)

A morfina é usada clinicamente para sedação pré-anestésica e alívio da dor visceral e dor intensa. Após uma rápida absorção, a morfina é rapidamente distribuída para fígado, rins, pulmões, baço, tireoide e adrenal. A codeína é utilizada como analgésico e antitussígeno. Utilizada via oral, é bem absorvida pelo trato gastrointestinal (Klaassen, 2001).

A heroína é usualmente auto administrada por via intravenosa, mas também pode ser usada via intramuscular, sorvida ou fumada. Devida sua alta lipossolubilidade, a heroína é bem absorvida por todas as vias (nasal, retal, pulmonar ou mucosa), atingindo rapidamente o SNC (Klaassen, 2001).

A intoxicação aguda por opioides provoca depressão respiratória por ação direta nos centros respiratórios no tronco cerebral. Ocorre também depressão do centro vasomotor causando hipotensão. Os sinais sugestivos de intoxicação por opioides são pupilar puntiformes, respiração deprimida e coma (Klaassen, 2001).

Os opioides se ligam seletivamente aos receptores μ e seus efeitos dependem da expressão desse receptor nos diversos tecidos (Dichiara e North, 1992).

A heroína é metabolizada rapidamente em 6-AM e morfina por enzimas hCE-1 e hCE-2 no fígado e pseudocolinesterases no plasma. A morfina, seja a administrada ou a proveniente da heroína, é metabolizada principalmente pela UDP-glicuronosiltransferase (UGT) formando o metabólito inativo morfina-3-glicuronideo

(M3G) e morfina-6-glicuronídeo (M6G), que possui efeitos analgésicos equivalentes à morfina. Finalmente, a morfina é N-desmetilada por enzimas hepáticas, como mostrado na Figura 3 (Glare e Walsh, 1991; Maurer, Sauer e Theobald, 2006).

Figura 3 - Metabolismo da heroína e morfina. Adaptado de (Klaassen, 2001).

A codeína pode ser conjugada formando codeína-6-glicuronídeo (C6G). Porém é principalmente metabolizada em morfina por O-desalquilação, que posteriormente segue a mesma via metabólica da morfina (Figura 4). O mesmo acontece com a dihidrocodeína, etilmorfina, hidrocodona e oxicodona (Maurer, Sauer e Theobald, 2006).

Figura 4 - Metabolismo da codeína. Adaptado de (Klaassen, 2001).

3. MATRIZES BIOLÓGICAS UTILIZADAS NA TOXICOLOGIA FORENSE

Toxicologia forense é a área de estudo e aplicação da toxicologia com os propósitos da lei. A função do toxicologista forense é realizar análises químicas para detectar a presença de substâncias exógenas, quantificá-las e relacionar a concentração com a toxicidade da substância (Negrusz e Jickells, 2008). Para a realização das análises toxicológicas é indispensável a obtenção de amostras biológicas, como o sangue, urina, e vísceras.

A escolha da matriz a ser utilizada deve ser feita tendo em mente o objetivo da análise, os aspectos físico-químicos das substâncias analisadas e as condições de conservação da amostra. Por exemplo, para determinar se o indivíduo estava sob influência de álcool e drogas no momento de um acidente de trânsito a amostra de escolha é o sangue. Por outro lado, para uma análise crônica e temporal, pode-se utilizar o cabelo como amostra de escolha.

3.1 Matrizes convencionais

A urina é uma das matrizes com o menor número de interferentes endógenos e altas concentrações de metabólitos. Desta forma, a urina é a matriz de escolha para triagem e identificação drogas. Entretanto, na maioria dos casos, não é possível fazer uma correlação dos resultados obtidos com os efeitos no organismo (Costa, 2008). Por outro lado, o sangue é a amostra de escolha para a quantificação dos analitos sendo possível realizar as correlações entre dose e efeito (Maurer, 1992).

3.2 Matrizes alternativas

O uso de matrizes alternativas na toxicologia foi descrito pela primeira vez em 1979, quando o cabelo foi utilizado para análise de exposição crônica. Estas matrizes estão sendo utilizadas em diversas áreas da toxicologia, por exemplo, na toxicologia forense, clínica e ocupacional. Os avanços nas áreas de preparo de amostra e as técnicas analíticas, principalmente as cromatográficas e espectrométricas, foram fundamentais para o aumento no uso dessas matrizes (Gallardo e Queiroz, 2008).

Algumas matrizes alternativas utilizadas incluem o fluido oral, o cabelo, o suor, o meconio e o HV. As principais vantagens são a coleta não invasiva, coleta assistida (o que dificulta a adulteração) e a maior janela de detecção para algumas drogas. As principais desvantagens são a baixa concentração, que requer técnicas com maior sensibilidade e, principalmente, a falta de estudos que permitam interpretar e correlacionar a concentração obtida e os efeitos no organismo (Gallardo e Queiroz, 2008).

O fluido oral pode ser utilizado como matriz para determinar o uso de drogas por motoristas, testes em ambientes ocupacionais, monitoramento terapêutico, monitorizar pacientes em clínicas de tratamento para uso de drogas; e em estudos farmacocinéticos e epidemiológicos (Lillsunde, 2008).

O fluido oral é uma mistura da saliva, produzida pelas glândulas salivares, com outros componentes que podem estar presentes na cavidade oral, como células mucosas e restos alimentares (Schramm, Smith e Craig, 1993). Substâncias de baixo massa molecular são transportadas do sangue para a saliva pelo processo de ultrafiltração. Porém, a difusão passiva é a forma mais comum para as drogas serem incorporadas no fluido oral. A passagem das drogas para o fluido oral ocorre através das membranas celulares, esta é limitada para moléculas de alto massa molecular e restrita para drogas ionizadas ou ligadas à proteínas plasmáticas (Drummer, 2005).

O pH do fluido oral varia geralmente de 6,2 a 7,4. Drogas de natureza básica, por exemplo, anfetaminas e opioides, comumente estão presentes em concentrações mais altas no fluido oral do que no sangue. Por outro lado, substâncias de natureza ácida, por exemplo, alguns benzodiazepínicos, estão em menor concentração do que no sangue (Drummer, 2008).

A coleta de fluido oral pode ser feita de forma não estimulada, na qual o fluido oral escorre diretamente da boca para um recipiente de coleta. Ou de forma estimulada utilizando a língua, bochecha e lábios. Também pode se dar por estímulos externos, como mastigação de parafina ou gomas, gotejamento de limão ou ácido cítrico sobre a língua. Depois de produzida, a saliva pode ser succionada, absorvida ou coletada com o auxílio de um *swab* (Bazzarella, 2010).

O suor pode ser usado como ferramenta para monitoramento de usuários de drogas de abuso em tratamento em clínicas de reabilitação. O suor é coletado com um adesivo numerado que é afixado na pele e pode ser retirado até uma semana depois, possibilitando uma coleta continuada e de difícil adulteração. As drogas e seus metabólitos são transferidos do sangue para as glândulas sudoríparas por difusão passiva e também pode haver migração transdérmica (De Martinis, 2008).

O suor possui algumas vantagens em relação ao sangue e à urina, por exemplo, a coleta não-invasiva e assistida. Além disso, o adesivo é de difícil adulteração e, por ficar aderido à pele por até sete dias, é um registro cumulativo da exposição da droga, sendo assim, uma maior janela de detecção. Por outro lado, há algumas desvantagens, principalmente a falta de informações para interpretar os valores obtidos, devido à grande variação inter-indivíduo de produção de suor. Além da baixa concentração e pequeno volume de amostra (De Martinis, 2008).

O mecônio é a primeira excreção intestinal do neonato. A formação do mecônio é iniciada por volta da 12ª semana de gestação. As substâncias psicoativas atravessam a barreira placentária, são metabolizadas pelo feto e excretadas no líquido amniótico. A formação do mecônio ocorre quando o feto deglute o líquido amniótico. Ele pode ser utilizado para a identificação da exposição às drogas *in-útero*. As vantagens do mecônio são a fácil coleta e a grande janela de detecção, a incorporação das substâncias é realizada da 12ª até a 40ª semana. (Alves, 2010).

O cabelo pode ser utilizado na toxicologia clínica, forense e ocupacional. As drogas passam por difusão passiva até as células em crescimento na base do folículo capilar, de forma que as substâncias são incorporadas ao cabelo à medida que as células se alongam e envelhecem (De Martinis *et al.*, 2012).

O cabelo cresce em média um centímetro por mês, desta forma é possível fazer uma análise temporal do uso de alguma substância separando a amostra em frações. As vantagens do cabelo incluem a fácil coleta, transporte e armazenamento; a estabilidade da matriz e a ampla janela de detecção, já que fica limitada somente pelo comprimento capilar (De Martinis *et al.*, 2012).

3.2.1. Humor vítreo

O olho humano pode ser dividido em segmento anterior, que inclui a córnea, o humor aquoso, a íris, a retina, e o corpo ciliar; e segmento posterior, que compreende o HV, a retina, a coróide, a esclera e o nervo óptico, conforme Figura 5 (Henderer e Rapuano, 2012).

Figura 5 - Anatomia básica do olho. (<http://www.oftalmo.epm.br/>)

O humor vítreo (HV) é um gel aquoso, transparente e incolor (Figura 6), que preenche a cavidade posterior do olho. Está situado entre a retina e o cristalino e representa 90% do volume do olho (Bishop, 2000; Whikehart, 2004). É produzido por células da retina e composto por mais de 95% de água. O HV não é vascularizado e contém poucas células (Levine, 2008). Possui baixo teor de proteínas, menor que o da urina (Brunet e Mura, 2012). O pH do HV varia entre 7,0 a 7,8 (Scott e Oliver, 2001).

O HV possui uma matriz polimérica formada basicamente de colágeno e ácido hialurônico. As fibras colágenas, predominantemente dispostas em paralelo, são responsáveis pela sustentação da rede fibrilar. (Bos *et al.*, 2001; Gelse, Poschl e Aigner, 2003). Devido a esta rede de colágenos, o HV é bastante viscoso, cerca de duas a quatro vezes mais viscoso que a água (Guyton e Hall, 2006).

Devido à sua localização isolada, o HV resiste às mudanças de decomposição que ocorrem mais rapidamente em outros fluidos biológicos e é menos susceptível à contaminação bacteriana (Fucci *et al.*, 2006; Chronister, Gund e Goldberger, 2008).

As drogas e seus metabólitos passam do sangue para o HV por difusão passiva através da barreira entre o sangue e a retina. Esta barreira é composta de epitélio ciliar, epitélio pigmentar da retina e vasos sanguíneos (Druid, 2006). A existência da barreira entre a retina e o sangue limita a difusão de certos xenobióticos (Lin e Lin, 2005; Brunet *et al.*, 2010; Brunet e Mura, 2012).

A razão entre a concentração do analito no sangue e no HV no equilíbrio depende: da solubilidade da substância no HV; da sua lipossolubilidade; da porcentagem da substância ligada a proteínas plasmáticas; do pKa do analito; e do pH do sangue e do HV (Lin *et al.*, 1997).

O uso do HV como matriz alternativa possui várias vantagens, dentre elas: fácil coleta; possibilidade de ser adaptado para métodos analíticos utilizados em matrizes mais complexas; boa estabilidade química; menor preparo da amostra e maior proteção contra modificações *postmortem*. As maiores desvantagens são: o volume limitado de amostra, de 2 a 2,5 mL em cada olho, e a baixa quantidade de estudos que permitam a interpretação e correlação dos resultados obtidos no HV com o sangue (Levine, 2008).

Figura 6 - Amostra de humor vítreo.

A localização do HV em um compartimento isolado e a proteção da estrutura óssea do globo ocular o protegem de putrefação. A ausência de enzimas, principalmente de esterases, também permite uma melhor estabilidade dos compostos no HV durante o período *postmortem*. Desta forma, esta matriz pode fornecer informações importantes em casos nos quais outras amostras biológicas convencionais sofreram mudanças químicas no intervalo *postmortem* (Dinis-Oliveira *et al.*, 2010; Brunet e Mura, 2012).

A análise toxicológica em matrizes *postmortem* é limitada por fatores de amostragem e processamento da amostra. Por exemplo: putrefação, autólise, invasão bacteriana, homogeneização e complexidade da matriz e dificuldade de obter amostra representativa (Margalho *et al.*, 2011). O HV está menos susceptível à essa limitação podendo ser uma alternativa nos casos de corpos carbonizados, embalsamados, em processo de decomposição e choques hemorrágicos, em que não há sangue nem urina (Levine, 2008). Entretanto ele não deve ser um substituto para as matrizes convencionais, mas ser utilizado como uma matriz complementar que fornece informações adicionais e valiosas para a investigação.

4. ANÁLISE DE DROGAS NO HUMOR VÍTREO

Como consequência do controle do uso de drogas, há um interesse crescente no desenvolvimento de métodos analíticos específicos para detectar drogas e metabólitos em amostras biológicas. Os resultados do laboratório devem ser rápidos, sensíveis e específicos para uma correta determinação dessas substâncias em diferentes matrizes.

A quantificação de substâncias tóxicas ou de uso médico-legal do HV pode ser muito útil na toxicologia forense, principalmente quando é impossível fazer a determinação em amostras sanguíneas devido à ausência ou deterioração do sangue.

A análise de amostras de HV foi relatada pela primeira vez para a determinação do intervalo *postmortem* nos anos 1960s (Brunet e Mura, 2012). A concentração de algumas substâncias, como o potássio e a hipoxantina, aumenta linearmente no HV após a morte. Utilizando equações de regressão é possível estimar o intervalo

postmortem com certa precisão (Stephens e Richards, 1987; James, Hoadley e Sampson, 1997)

A análise de etanol no HV é uma prática frequente na toxicologia. É utilizada para confirmação da ingestão de etanol, uma vez que, diferentemente das amostras de sangue, a formação endógena é bem reduzida (Winek e Esposito, 1981; Fernandez *et al.*, 1989; Caplan e Levine, 1990; Chao e Lo, 1993).

Poucos estudos foram realizados utilizando o HV para análise de drogas de abuso, talvez pela dificuldade de interpretação dos resultados, sendo atualmente um importante campo de estudo em toxicologia forense (Teixeira *et al.*, 2004; Brunet e Mura, 2012).

4.1 Cocaína

A cocaína e a benzoilecgonina são facilmente detectadas no HV. As concentrações de cocaína no HV são geralmente parecidas com a do sangue, entretanto a concentração de benzoilecgonina costuma ser menor no HV. Esta é mais hidrofílica do que a cocaína e, por isso, possui maior dificuldade para atravessar a barreira que separa o HV do sangue (Levine, 2008).

Mackey-Bojack, Kloss e Apple (2000) quantificaram cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno e etanol em sangue e HV em 62 casos. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa da concentração de cocaína, cocaetileno e etanol no sangue e no HV. Contudo houve diferença significativa para a benzoilecgonina, sendo que a concentração da droga no HV foi menor do que no sangue. Resultados semelhantes foram encontrados por Antonides, Kiely e Marinetti (2007).

Duer, Spitz e Mcfarland (2006) realizaram a análise de cocaína e metabólitos (éster de metilecgonina, benzoilecgonina, norcocaína, cocaetileno e éster de etilecgonina) em sangue periférico, sangue cardíaco, HV e urina, com objetivo de verificar se há uma relação entre estas matrizes. Houve uma forte correlação entre a concentração total de cocaína (soma das concentrações da cocaína e todos os metabólitos) no sangue e no HV.

Um estudo feito para determinação de cocaína e metabólitos em bile e HV por CG-FID encontrou uma correlação muito fraca entre estas duas matrizes. Dos 40 casos analisados, em 26 havia cocaína ou algum metabólito no HV, em 21 delas havia cocaína, benzoilecgonina e éster de metilecgonina. Outras drogas também foram detectadas no HV: opioides (20 casos), benzodiazepínicos (8 casos) e etanol (9 casos) (Fernández *et al.*, 2006)

Outro estudo realizou a análise de cocaína e opioides em HV utilizando extração assistida por micro-ondas e HPLC. Foi realizada a análise em amostras positivas na triagem por sangue e, de 15 casos, sete foram positivos para cocaína, 11 para benzoilecgonina e um para cocaetileno. O limite de quantificação utilizado neste estudo foi alto, 100 ng/mL (Fernández *et al.*, 2011)

Fernández *et al.* (2012) realizaram a análise em 15 amostras de HV de indivíduos que morreram de overdose de cocaína e/ou opioides. A análise foi feita utilizando extração em fase sólida e HPLC-PAD. O consumo de cocaína foi demonstrado em 14 casos, benzoilecgonina foi detectada em 13 casos. A concentração média foi de $1,20 \pm 1,91 \mu\text{g/mL}$, os valores variaram de 0,10 a 6,84 $\mu\text{g/mL}$, que correspondem ao nível tóxico ou letal. A cocaína foi encontrada em três casos, sendo que em um a benzoilecgonina não foi detectada.

4.2 Anfetaminas

As anfetaminas são uma classe de amostras pouco estudadas no HV. Clauwaert *et al.* (2000) utilizaram HPLC com detector de fluorescência para detecção de MDMA, MDEA e MDA em HV, sangue total, plasma e urina. Posteriormente, este método foi utilizado para estudos toxicocinéticos em coelhos (De Letter *et al.*, 2000; De Letter *et al.*, 2002; De Letter *et al.*, 2004; De Letter *et al.*, 2010).

Ishikawa (2011) desenvolveu um método para análise de metilenodioxido derivados (MDMA, MDA e MDEA) em HV. Após a aplicação do método em 12 vítimas de acidente de trânsito, foi detectado MDMA em uma das amostras.

4.3 Opioides

Os opioides são as substâncias mais estudadas no HV. A janela de detecção do 6-AM no sangue e na urina depende da dose utilizada, via de administração e frequência do uso de heroína. A meia-vida da 6-AM é pequena (10-20 min), indicando que a janela de detecção no sangue é de uma a duas horas após a administração. Entretanto, no HV a 6-AM é encontrada por mais tempo, inclusive em casos em que as amostras de sangue foram negativas. Desta forma, o HV pode ser uma amostra de escolha para diferenciação no consumo de heroína (Stefanidou *et al.*, 2010).

A presença de morfina não indica qual opioide foi consumido, sendo necessária a diferenciação de mortes relacionadas com heroína de outras fatalidades envolvendo opioides. A relação entre as concentrações de codeína e morfina no HV e no sangue pode indicar se o indivíduo consumiu heroína. Quando esta relação for menor que 1, a morfina é resultante do metabolismo da heroína. Por outro lado, quando a relação for maior que 1, a morfina é resultado do consumo da codeína (Lin *et al.*, 1997). Porém, um método definitivo para atingir este objetivo é a detecção de heroína, o metabólito 6-acetilmorfina (6-AM) ou ambos.

Pragst *et al.* (1999) analisaram a 6-AM e morfina em HV e líquido para evidenciar a administração de heroína em fatalidades relacionadas com opioides. No HV, a 6-AM foi positiva em 75% dos casos (média de 17 ng/mL). A concentração de morfina foi 45% menor no HV do que no sangue, provavelmente pela distribuição incompleta da droga em um período curto antes da morte (período entre a injeção da droga e da morte menor que 30 minutos) e pela ligação da morfina a proteínas plasmáticas, que diminui o equilíbrio com o HV.

Antonides, Kiely e Marinetti (2007) relataram a análise de oxicodona, morfina, codeína, 6-AM e hidrocodona no HV; e tentaram fazer uma correlação com as concentrações no sangue. As concentrações de oxicodona, hidrocodona e 6-AM foram maiores no HV e as concentrações de morfina e codeína variaram bastante. As concentrações maiores no HV podem sugerir que a janela de detecção para esses compostos seja maior nesta matriz.

Kovatsi *et al.* (2011) determinaram as concentrações de codeína, morfina e 6-AM utilizando extração com DPX (*disposable pipette extraction*) e GC-NPD.

4.4 Canabinoides

O THC e COOH-THC são moléculas muito polares e fortemente ligada a proteínas plasmáticas, o que limita a sua difusão para o HV. Desta forma, o HV não é a melhor matriz para análise do consumo de maconha (Negrusz e Jickells, 2008)

Lin e Lin (2005) analisaram o COOH-THC no sangue e HV de 50 vítimas fatais de acidente de trânsito. A concentração no HV foi menor que 0,01 mg/L em todos os casos. No sangue, a concentração variou de 0,01 a 0,33 mg/L.

Em outro estudo, foram analisadas 30 amostras de HV cujo sangue foi positivo na triagem para canabinoides (*cutoff* de 50 ng/mL). Destas, apenas uma amostra foi positiva, com concentração de COOH-THC de 2 ng/mL, o limite de detecção (Jenkins e Oblock, 2008).

Em modelos animais, a má difusão dos canabinoides para o HV é evidente. Após a injeção de 50 a 200 µg/kg de THC em 20 porcos, a concentração foi inferior a 2 ng/mL em todos eles (Brunet *et al.*, 2010).

4.5 Outras drogas

Scott e Oliver (2001) quantificaram temazepam, diazepam e desmetildiazepam em HV e sangue em 17 casos. Em todos os casos a concentração no HV foi menor do que no sangue.

Teixeira *et al.* (2004) analisaram diazepam e seu principal metabólito desmetildiazepam em plasma e HV. O estudo demonstrou que o HV pode ser uma matriz para quantificação de diazepam na ausência de sangue. No equilíbrio (entre uma e duas horas), a concentração dos analitos no HV é cerca de 10 vezes menor do que a no plasma.

O etilglucuronídeo (EtG) é um metabólito do etanol usado como indicador do seu consumo. O EtG pode ser detectado no HV, apesar da baixa correlação com sangue (Keten, Tumer e Balseven-Odabasi, 2009).

Meprobanato é um derivado do carbamato prescrito como ansiolítico, mas com potencial de abuso. Também é um metabólito ativo do carisoprodol. Quando

comparadas as concentrações de meprobanato no sangue e no HV em 117 casos, foi possível observar uma correlação entre elas. Esta boa correlação é provavelmente devido ao baixo massa molecular e a pequena ligação do meprobanato A proteínas plasmáticas. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as concentrações obtidas no olho direito e no olho esquerdo (Bevalot *et al.*, 2011).

A análise de HV pode ser usada para triagem qualitativa de drogas como complemento aos resultados obtidos na urina. Em amostras de HV é possível detectar mais drogas inalteradas, enquanto na urina, há um maior número de metabólitos (Pelander, Ristimaa e Ojanperä, 2010).

Costa *et al.* (2014) triaram anfetaminas; cocaína e metabólitos; e opioides em HV utilizando eletroforese capilar com detector de *diodo array* (CE-DAD). Todas as amostras positivas (8 amostras) foram confirmadas por LC-MS/MS. A Tabela 2 apresenta os analitos pesquisados no humor vítreo.

Tabela 2 - Procedimentos para análise toxicológica forense em humor vítreo.

Substâncias pesquisadas	Método de extração	Separação e detecção	Referência
Heroína, 6-AM, morfina	L-L	GC-MS	(Guillot, Lefebvre e Weber, 1997)
Codeína, morfina, 6-AM	L-L	GC-MS	(Lin <i>et al.</i> , 1997)
6-acetilmorfina	SPE	GC-MS	(Pragst <i>et al.</i> , 1999)
Cocaína, cocaetileno, benzoilecgonina	SPE	GC-MS	(Mackey-Bojack, Kloss e Apple, 2000)
MDMA, MDA, MDEA	L-L	HPLC-MS	(Clauwaert <i>et al.</i> , 2000)
Diazepam, temazepam, desmetildiazepam	Fluido supercrítico	HPLC-UV	(Scott e Oliver, 2001)
Benzoilecgonina		CEDIA	(Chronister, Walrath e Goldberger, 2001)
Cocaína, benzoilecgonina, éster de metilecgonina, ecgonina		LC-MS/MS	(Duer, Spitz e Mcfarland, 2006)
Cocaína, benzoilecgonina, éster de metilecgonina	SPE	GC-FID	(Fernández <i>et al.</i> , 2006)
Oxicodona, morfina, codeína, 6-AM, hidrocodona, cocaína, benzoilecgonina	SPE	GC-MS	(Antonides, Kiely e Marinetti, 2007)
Fenilciclídina	SPE	GC-MS	(Cox <i>et al.</i> , 2007)
LSD, nor-LSD, iso-LSD, 2-oxo-hidroxi-LSD	L-L	HPLC-MS	(Favretto <i>et al.</i> , 2007)
Morfina		CEDIA	(Chronister, Gund e Goldberger, 2008)

Fenilciclídina	L-L	GC-NPD	(Jenkins e Oblock, 2008)
THC, COOH-THC, 11-OH-THC	SPE	GC-MS	
Etilglicuronídeo	L-L	HPLC-MS	(Keten, Tumer e Balseven-Odabasi, 2009)
Triagem (70 compostos)	SPE	HLPC-TOFMS	(Pelander, Ristimaa e Ojanperä, 2010)
Hidromorfina, hidromorfina-glicuronídeo	SPE	UPLC-MS	(Meatherall, Lee e Phillips, 2011)
Morfina, codeína, 6-AM	DPX	GC-NPD	(Kovatsi <i>et al.</i> , 2011)
MDMA, MDA, MDEA	L-L	GC-MS	(Ishikawa, 2011)
Morfina, codeína, cocaína, benzoilecgonina, éster de metilecgonina	SPE	GC-MS	(Margalho <i>et al.</i> , 2011)
Meprobanato	L-L	GC-MS	(Bevalot <i>et al.</i> , 2011)
Morfina, 6-AM, codeína, cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno, metadona, EDDP	<i>Microwave-assisted extraction</i>	GC-MS	(Fernández <i>et al.</i> , 2011)
Morfina, 6-AM, codeína, cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno, metadona, EDDP	SPE	HPLC-DAD	(Fernández <i>et al.</i> , 2012)
Morfina, codeína, 6-AM	SPE	GC-MS	(Sanches <i>et al.</i> , 2012)

Anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA, L-L MDEA, ketamina, cocaína, cocaetileno, lidocaína, morfina, 6-AM, heroína	CE-DAD	(Costa <i>et al.</i> , 2014)
Cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno, EMA, SPE anfetamina, metanfetamina, MDMA, MDEA, MDA, codeína, 6-AM, morfina, dihidromorfina, THC, COOH-THC	GC-MS	(Peres <i>et al.</i> , 2014)

CAPÍTULO II

Objetivos e aspectos éticos

1. OBJETIVO GERAL

Determinar se o humor vítreo pode ser utilizado como amostra biológica alternativa na análise de drogas de abuso.

1.1 Capítulo III:

- Desenvolver um método rápido e sensível para quantificação simultânea de anfetaminas, cocaína, opioides e canabinoides em humor vítreo.
- Validar o método para análise de drogas de abuso.
- Analisar as amostras de humor vítreo coletadas no DML de Vitória - ES quanto à concentração de anfetaminas, cocaína, opioides, canabinoides, seus produtos e metabólitos.

1.2 Capítulo IV:

- Validar um método para análise de etanol em humor vítreo.
- Analisar as amostras de humor vítreo coletadas no DML de Vitória - ES quanto à concentração de etanol.

1.3 Capítulo V:

- Construir o perfil demográfico das vítimas de mortes violentas ocorridas no Espírito Santo.
- Relacionar os achados toxicológicos em amostras de humor vítreo com o perfil das mortes violentas.

1.4 Capítulo VI:

- Quantificar diferentes drogas e fármacos em sangue periférico e humor vítreo;
- Estabelecer se há uma relação entre as concentrações obtidas nas matrizes estudadas;
- Estabelecer se as concentrações calculadas no humor vítreo podem ser utilizadas para interpretar as concentrações no momento da morte.

2. ASPECTOS ÉTICOS

Atendendo à Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, este projeto foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP Ribeirão Preto. Processo CEP-FFCLRP 577/2011-2001.1.1625.59.0 (ANEXO 1).

CAPÍTULO III

**Análise simultânea de cocaína,
anfetaminas, opioides e canabinoides
no humor vítreo**

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de um procedimento de triagem eficiente é muito importante para casos forenses, consistindo em uma base para excluir o envolvimento de drogas e outras substâncias tóxicas no caso em estudo ou detectar essas substâncias se presentes (Drummer e Gerostamoulos, 2002).

A triagem de drogas utilizando GC-MS fornece boa separação e seletividade. Com a utilização de um método de *Full Scan* é possível detectar um grande número de compostos. Entretanto, para análise de alguns analitos por cromatografia em fase gasosa é necessária a derivatização, que é uma etapa demorada (Maurer, 2004). A utilização do LC-MS/MS é atualmente muito utilizada na toxicologia forense, porém é ainda um equipamento caro, que não está disponível na maioria dos laboratórios brasileiros.

Os laboratórios forenses precisam de métodos analíticos rápidos e sensíveis para determinação de diversas substâncias em matrizes biológicas. Devido ao volume limitado de humor vítreo (de 2 a 2,5 mL por olho) o método deve ser capaz de detectar e quantificar vários compostos simultaneamente em uma única análise. A análise simultânea de cocaína, anfetaminas, opioides e canabinoides é uma alternativa.

MATERIAIS E MÉTODOS

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Reagentes e soluções

As drogas ilícitas e metabólitos estudados foram os seguintes: anfetamina (ANF); metanfetamina (MET); N-metil-3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA); 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA); N-etil-3,4-metilenodioxietilamfetamina (MDEA); cocaína (COC); cocaetileno (CE); benzoilecognina (BE); éster de metilanidroecgonina (EMA); morfina (MOR); metadona (METAD); 6-acetilmorfina (6-AM); codeína (COD); dihidrocodeína (DIHID); delta-9-tetrahydrocannabinol (THC); e 11-nor-9-carboxi-tetrahydrocannabinol (COOHTHC). A anfetamina-D₁₁ (ANF D₁₁); metanfetamina-D₁₄ (MET D₁₄); N-metil-3,4-metilenodioximetanfetamina-D₅ (MDMA D₅); cocaína-D₃ (COC D₃); benzoilecognina-D₃ (BE D₃); morfina-D₃ (MOR D₃); e 11-nor-9-carboxi-THC-D₃ (COOH-THC D₃) foram utilizados como padrão interno deuterados. Todos os padrões certificados foram fornecidos pela Cerilliant (Round Rock, TX, USA) em soluções de acetonitrila ou metanol nas concentrações de 1 mg/mL ou 100 µg/mL. O reagente de silição N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA) foi adquirido da Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA) em recipientes de 1 mL.

Metanol, acetonitrila, acetona, clorofórmio e diclorometano foram obtidos da JT Baker (Phillipsburg, NJ, EUA); isopropanol e hidróxido de amônio foram providenciados da Mallinckrodt (Paris, KY, EUA); acetato de etila foi fornecido pela Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA). Todos os solventes e reagentes são grau HPLC. Bicarbonato de sódio e carbonato de sódio anidro foram comprados da Synth (Diadema, SP, Brasil) e o ácido acético glacial PA foi obtido da Merck (Rio de Janeiro, RJ, Brasil)

2.1.1 Preparo de soluções

Soluções padrão de calibradores e padrões internos

Foram preparadas soluções de padrões com todos os analitos estudados nas concentrações de 1,0 e 10,0 µg/mL. Para isso, 100 µL de cada ampola de 1 mg/mL dos analitos foi transferido para um balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com acetonitrila, originando a solução de 10 µg/mL. Em seguida, 1 mL dessa solução foi transferido para outro balão volumétrico de 10 mL originando a solução de 1 µg/mL.

As soluções de padrão interno foram preparadas na concentração de 10 µg/mL. Desta forma, 1 mL de cada ampola de padrão interno foi transferido para um balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com acetonitrila.

Todas as soluções de padrão e padrão interno foram armazenadas na geladeira, em frascos de vidro com tampa rosqueável e envolvidos por papel alumínio.

Tampão carbonato/bicarbonato pH 9,0

Para o preparo do tampão carbonato/bicarbonato pH 9 foi utilizada uma solução saturada de bicarbonato de sódio (60 g/L de água), que em seguida foi ajustada para pH 9,0 utilizando carbonato de sódio anidro.

Ácido Acético 0,01 M

Primeiramente foi preparada uma solução de ácido acético aquoso a 1,0 M (solução estoque), pipetando 5,75 mL de ácido acético glacial em um balão volumétrico de 100 mL que foi completado com água deionizada. A solução de ácido acético 0,01 M foi preparada diluindo a solução estoque em 100 vezes.

Solução de acetona:clorofórmio (1:1, v/v)

A solução de eluição ácida (solução A) foi preparada diariamente medindo volumes iguais de acetona e clorofórmio, de acordo com o volume a ser utilizado no dia.

Solução de diclorometano:isopropanol:hidróxido de amônio (78:20:2, v/v)

A solução de eluição básica e neutra (solução B) foi preparada diariamente utilizando 78% de diclorometano, 20% de isopropanol e 2% de hidróxido de amônio, de acordo com o volume a ser utilizado no dia. Após o preparo da solução, esta foi colocada no ultrasson por cinco minutos.

2.2 Equipamentos e acessórios

As análises de drogas no humor vítreo (HV) foram realizadas por GC-MS utilizando o equipamento de cromatografia em fase gasosa Agilent 7890A, equipado com amostrador automático Agilent 7693, no qual foram utilizadas seringas de injeção cromatográfica de 1 mL (Hamilton, Nevada, USA) e interfaceado com detector seletivo de massas Agilent 5975C (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA). A separação

cromatográfica foi realizada utilizando coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (30 m x 250 µm x 0,25 µm de espessura de filme) e hélio com grau de pureza analítica 5.0 (White Martins, SP, Brasil) como gás de arraste.

Os procedimentos de extração em fase sólida foram realizados em cartuchos de fase mista (polímero hidrofílico e trocador catiônico) Trace-B 355, de 35 mg/3 mL (SPEware, CA, EUA), com auxílio de um suporte para extração de pressão positiva de 48 posições Cerex 48 Pressure Processor (SPEware, CA EUA). As amostras foram evaporadas à secura utilizando Caliper LifeScience Turbo Vap (LP, EUA) e a reação de derivatização ocorreu no banho seco TE- 021 (Tecnal, Brasil).

O preparo da amostra e de soluções foi realizado com auxílio de centrífuga Universal 32 (Hettich, Alemanha), vórtex AP - 56 (Phoenix, Brasil), deionizador de água Simplicity (Millipore, EUA), balança analítica PB211D (Sartorius, Alemanha) e pHmêtro digital DM-20 (Digimed, Santo Amaro, Brasil).

2.3 Procedimento de extração e derivatização da amostra

As amostras foram submetidas a procedimento de extração em fase sólida (SPE), com objetivo de isolar os analitos de interesse do HV e concentrá-los. Antes da extração, as amostras de HV foram centrifugadas por 5 minutos a 2500 rpm (1048 x g). Um mililitro de tampão carbonato (pH 9,0) e 400 ng/mL dos padrões internos deuterados foram adicionados a 1 mL do sobrenadante das amostras. Os analitos foram isolados do HV utilizando cartuchos Trace B 335, que foram previamente condicionados com 1 mL de acetato de etila, seguido de 1 mL de metanol e 1 mL de água deionizada. A amostra foi aplicada na coluna utilizando o *manifold* de pressão positiva, posteriormente o cartucho foi lavado com 1 mL de ácido acético 0,01 M e seco por 5 min em fluxo máximo. Os analitos foram eluídos em duas etapas: os compostos ácidos foram eluídos com 2 mL de uma solução acetona/clorofórmio (1:1, v/v), a segunda fração foi eluída com 2 mL de uma solução recém preparada de diclorometano/isopropanol/hidróxido de amônio (78:20:2, v/v/v). Entre as duas eluições os cartuchos de extração foram lavados com 1 mL de metanol. A primeira fração foi evaporada a 35°C em fluxo de nitrogênio e o resíduo foi misturado com a segunda fração, que foi evaporada em seguida. O extrato foi reconstituído com 40 µL de acetonitrila e derivatizado pela adição de 40 µL de MSTFA a uma temperatura de 90°C, por 40 minutos (Figura 7).

Figura 7 - Fluxograma do procedimento de preparação das amostras.

2.4 Condições cromatográficas

Após completada a derivatização, foi realizada a injeção automática de 1 µL da amostra no cromatógrafo em fase gasosa acoplado ao espectrômetro de massas (GC-MS).

A amostra foi injetada no modo *splitless*, com temperatura do injetor de 280°C, e o fluxo de hélio mantido constante em 1,0 mL/min. A rampa de temperatura do forno da coluna foi programada para iniciar a 90°C, permanecendo por 2 minutos, em seguida aumentar até 220°C a uma taxa de 10°C/min e então a temperatura se eleva até 290°C a uma taxa de 20°C/min, permanecendo nesta temperatura por 4 minutos (Tabela 3). O tempo total de corrida é de 22,5 minutos. A interface do GC-MS está ajustada para trabalhar a uma temperatura de 280°C, o quadrupolo em 150°C e a fonte de ionização em 230°C.

Tabela 3 - Programação de temperatura da coluna do GC-MS

Temperatura	Taxa de aquecimento	Hold	Tempo de corrida
90°C	-	2 min	2 min
220°C	10°C/min	-	15 min
290°C	20°C/min	4 min	22.5 min

Os cromatogramas foram primeiramente adquiridos no modo *Full Scan* (FS), os tempos de retenção identificados pelos íons quantificadores e qualificadores e a partir daí, o método SIM (Single Ion Monitoring) foi construído, respeitando o tempo de 1 segundo entre o último pico de um grupo e o início do outro; um mínimo de 10 *scans* por pico; e o *dwell time* máximo de 50. Os íons quantificadores e qualificadores de cada analito são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Íons de quantificação, identificação e tempo de retenção dos analitos.

Analito	Íon Quantificador (m/z)	Íons Qualificadores (m/z)	Tempo de Retenção (min)	Padrão Interno
Anfetamina D ₁₁	120	98	7,495	
Anfetamina	116	91, 192	7,593	ANF D ₁₁
Metanfetamina D ₁₄	137	98	8,552	
Metanfetamina	130	91, 206	8,669	MET D ₁₄
Éster de Metilanidroecgonina	152	166, 181	8,951	COC D ₃
Metilenodioxianfetamina	116	91, 236	11,780	MDMA D ₅
Metilenodioximetanfetamina D ₅	135	255	12,637	
Metilenodioximetanfetamina	130	100, 250	12,685	MDMA D ₅
Metilenodioxietilanfetamina	144	135, 264	13,713	MDMA D ₅
Cocaína D ₃	185	85	17,306	
Cocaína	182	82, 303	17,316	COC D ₃
Metadona	296	85, 281	17,418	MOR D ₃
Cocaetileno	196	82, 318	17,647	COC D ₃
Benzoilecgonina D ₃	243	85	17,696	
Benzoilecgonina	240	82, 361	17,708	BE D ₃
Tetrahydrocanabinol	386	315, 371	18,085	COOHTHC D ₃
Dihidrocodeína	373	236, 282	18,318	MOR D ₃
Codeína	371	178, 196	18,669	MOR D ₃
Morfina D ₃	239	432	18,917	
Morfina	236	196, 429	18,922	MOR D ₃
6-Acetilmorfina	399	287, 340	19,282	MOR D ₃
11-nor-9-Carboxi-tetrahydrocanabinol D ₃	476	374	20,110	
11-nor-9-Carboxi-tetrahydrocanabinol	473	371, 488	20,130	COOHTHC D ₃

2.5 Análise de dados

Os analitos foram identificados comparando o tempo de retenção ($\pm 2\%$) e a abundância relativa dos íons qualificadores ($\pm 20\%$) com os calibradores analisados na mesma corrida. A quantificação foi baseada na relação entre a área do pico do íon quantificador do analito com a do seu padrão interno correspondente.

As curvas de calibração foram construídas utilizando regressão linear e fator de ponderação 1/x para todos os analitos. Em cada dia de análise foi feita uma curva de calibração com padrões nas concentrações de 10, 50, 100, 400, 750 e 1000 ng/mL.

2.6 Planejamento experimental para otimização do procedimento de derivatização

O estudo de otimização foi realizado usando a metodologia de superfície de resposta. Essa metodologia permite a otimização simultânea de diferentes níveis das variáveis e é possível observar o efeito da interação entre elas (Lewis, Mathieu e Phan-Tan-Luu, 1999).

As condições de silição (volume do MSTFA, temperatura e tempo da reação) foram simultaneamente avaliadas utilizando Box-Behnken (Design Expert 8.7.0.1 Trial - Statease, MN, USA). O Box-Behnken permite a otimização dos três fatores em apenas 15 experimentos, realizados em ordem randomizada. Todas as variáveis foram testadas em três diferentes níveis: 20, 30 e 40 µL de MSTFA (volume final de 80 µL); 60, 75 e 90°C; e 20, 40 e 60 minutos. Posteriormente, as condições ótimas foram selecionadas utilizando a função de desejabilidade (*desirability*), validada por triplicata com intervalo de confiança de 95%.

2.7 Validação do método

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determina que para validação de um método analítico, os seguintes parâmetros devem ser avaliados: especificidade e seletividade; limite de detecção (LOD); limite de quantificação (LOQ); linearidade; precisão; exatidão; recuperação; estabilidade e *carryover*.

Os procedimentos e critérios utilizados no trabalho foram baseados no guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos da ANVISA, resolução 899/2003 (Saúde, 2003), no guia de validação de métodos analíticos e calibração de equipamentos usados para teste de drogas ilícitas apreendidas e materiais biológicos (Crime, 2009) e no artigo de Peters *et al*, 2007.

Para a validação, amostras de controle de qualidade (CQ) foram preparadas fortificando água deionizada (substituindo HV “branco”) nas concentrações de 15, 400 e 750 ng/mL (CQ1, CQ2 e CQ3, respectivamente).

2.7.1 Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

O limite de detecção é a menor concentração capaz de gerar um resultado positivo. O limite inferior de quantificação é a menor concentração na qual os analitos podem ser detectados e quantificados com precisão e exatidão adequados.

Para determinação do LOD e LOQ, amostras fortificadas foram analisadas em concentrações decrescentes. O LOD foi definido como a menor concentração obtida com uma relação sinal/ruído de pelo menos 3. LOQ deveria fornecer uma relação sinal/ruído de pelo menos 10, com precisão e exatidão de no máximo $\pm 20\%$. O LOD e LOQ também deveriam satisfazer os critérios de qualificação (tempo de retenção de $\pm 2\%$ e porcentagem dos ions qualificadores $\pm 20\%$ em relação aos controles da mesma corrida) e fornecer picos com formato gaussiano. Uma amostra fortificada na concentração do LOQ foi incluída na curva de calibração.

2.7.2 Seletividade e Especificidade

É a capacidade do método em detectar e quantificar inequivocamente e com exatidão aceitável os analitos de interesse na presença de outros componentes que são esperados em uma amostra real, tais como impurezas, produtos de decomposição, metabólitos, medicamentos e os próprios componentes da matriz.

A seletividade e especificidade foram determinadas pela avaliação de dez amostras de HV “brancas” (sem a adição de padrões) e amostras “brancas” fortificadas individualmente com 1000 ng/mL de 23 possíveis interferentes (Tabela 5). As amostras de HV brancas foram obtidas de casos do SVOI (Serviço de Verificação de Óbito do Interior) sem histórico de uso de drogas, que foi confirmado pela análise utilizando método descrito.

Tabela 5 - Lista de interferentes analisados no parâmetro de especificidade.

Ácido Acetilsalicílico	Cotinina	Fluoxetina	Paroxetina
Alprazolam	Diazepam	Lidocaína	Pseudoefedrina
Cafeína	Diclofenaco de Sódio	Lorazepam	Sertralina
Canabidiol	Dipirona	Metoclorpramida	Sulfato Ferroso
Clomipramina	Efedrina	Nicotina	Tramadol
Clonazepam	Fenilefrina	Norfluoxetina	

A área dos picos com tempo de retenção iguais aos analitos do método foi comparada com o LOQ. Resultados falso-positivos com concentrações inferiores ao LOQ foram rejeitados como possíveis interferentes.

2.7.3 Linearidade

É a capacidade que o método deve possuir de produzir picos cromatográficos com áreas diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra analisada dentro de um intervalo especificado. Este parâmetro é avaliado por meio da injeção de amostras em concentrações crescentes para se obter um gráfico cujos pontos são determinados correlacionando cada concentração com o valor obtido na razão entre a área do íon de quantificação do padrão do analito sobre a área do íon de quantificação do padrão interno. Em seguida é feita a regressão linear, a fim de observar se o intervalo de concentrações dos compostos apresenta disposição linear na reta; este é calculado pelo R^2 (coeficiente de determinação linear).

A linearidade foi avaliada por meio da análise em quintuplicata de amostras “brancas” fortificadas com todos os analitos nas concentrações de 10, 15, 30, 60, 100, 250, 500, 750 e 1000 ng/mL. As curvas de calibração foram obtidas plotando a relação da área do pico (analito/padrão interno) e as concentrações. A linearidade, expressa como coeficiente de determinação (R^2), é considerada aceitável se obtido um valor de R^2 maior ou igual a 0,99.

2.7.4 Recuperação

A recuperação avalia a capacidade de metodologia de extrair o analito da amostra biológica. Recuperações próximas a 100% são desejáveis, embora se admita valores de recuperações menores desde que a metodologia seja precisa e exata e apresente limites de detecção e quantificação apropriados para as análises propostas.

A recuperação foi determinada analisando amostras "brancas" fortificadas nas concentrações de 15, 400 e 750 ng/mL (CQ1, CQ2 e CQ3, respectivamente) antes da extração e um segundo lote fortificado após a extração, porém antes da evaporação. Ambos os lotes foram realizados em sete replicatas e o padrão interno foi adicionado antes da extração. A recuperação foi calculada comparando os resultados de quantificação de amostras que foram fortificadas com os analitos antes da extração, com os resultados de quantificação das amostras cuja adição dos analitos ocorreu após a extração.

2.7.5 Precisão e exatidão

A precisão representa o grau de repetibilidade entre os resultados de análises individuais, quando o procedimento é aplicado diversas vezes numa mesma amostra homogênea, em condições idênticas de ensaio.

Precisão Intra-ensaio: é a concordância entre os resultados obtidos em análises dentro de um curto período de tempo, com o mesmo analista e mesma instrumentação.

Precisão Inter-ensaio (Precisão Intermediária): é a concordância entre os resultados obtidos pelo mesmo laboratório em dias diferentes, com analista diferente e/ou equipamentos diferentes.

A precisão é expressa como Desvio Padrão Relativo (DPR), não admitindo valores superiores a 15%, exceto para o limite de quantificação, para o qual se admite valores menores ou iguais a 20%. O DPR pode ser calculado segundo a fórmula abaixo:

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

Onde:

DPR = Desvio Padrão Relativo

DP = Desvio Padrão

CMD = Concentração Média Determinada

A exatidão é a proximidade obtida entre o resultado da análise em relação a um valor verdadeiro. Os valores de concentração obtidos para os controles de qualidade não devem originar resultados abaixo de 85% ou acima de 115%, exceto para o limite inferior de quantificação, que permite que sejam aceitos valores entre 80% e 120%.

A exatidão é calculada pela fórmula:

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

Onde:

CT: Concentração Teórica

CMD: Concentração Média Determinada

Os ensaios de precisão e exatidão foram realizados analisando replicadas de amostras "brancas" fortificadas com 15, 400 e 750 ng/mL dos analitos de interesse e 400 ng/mL de padrão interno. A precisão inter-ensaio foi determinada em três dias diferentes ($n_{\text{total}} = 15$). A precisão intra-ensaio foi calculada pela determinação da concentração de dez replicadas realizadas no mesmo dia. A exatidão foi determinada comparando as concentrações obtidas em quinze análises e expressas como porcentagem da concentração teórica.

2.7.6 Estabilidade

Permite estimar a propriedade que o analito e o método apresentam de resistir a condições normalmente exigidas durante a análise. Devem ser avaliadas as seguintes estabilidades:

Estabilidade de curta duração: Avalia o tempo em que o composto pode resistir à temperatura à qual normalmente está exposto sobre a bancada de análise.

Estabilidade de longa duração: Avalia o tempo em que o analito pode permanecer em uma matriz biológica quando congelada a -20°C .

Estabilidade de congelamento e descongelamento: Avalia a capacidade do composto de resistir à degradação quando submetido a 3 ciclos de congelamento e descongelamento.

Estabilidade pós-processamento: Avalia o tempo em que os extratos podem ser analisados após processamento das amostras.

O ensaio de estabilidade foi realizado utilizando três amostras de HV fortificadas com 50 ng/mL dos analitos de interesse. As condições de armazenagem foram: temperatura ambiente por 24 h (estabilidade de curta duração), três ciclos de congelamento e descongelamento (estabilidade de congelamento e descongelamento), -20°C por sete e trinta dias (estabilidade de longa duração). O padrão interno foi adicionado após o período de armazenamento. Foi calculada também a estabilidade de pós-processamento, re-injetando amostras de controle de

qualidade 48 e 72 h após o preparo. As concentrações obtidas foram comparadas com as concentrações dos controles de qualidade fortificados no mesmo dia.

2.7.7 Carryover

O parâmetro *carryover* avalia a influência de uma análise anterior no resultado na análise seguinte, devido a contaminação por resíduos que podem permanecer retidos em alguns componentes do cromatógrafo, como *liner*, injetor, coluna, seringa e detector.

O carryover foi determinado analisando três amostras “brancas” após o ponto da curva de calibração de maior concentração.

2.8 Amostras de humor vítreo

As amostras de HV foram obtidas por punção direta no globo ocular. Cerca de 2 a 4 mL de HV foram coletados em tubos de tampa cinza contendo 2% de fluoreto de sódio e congeladas a -20°C até a análise. Devido a dificuldade na obtenção de amostras de HV sabidamente “brancas” (sem a presença de nenhum dos analitos de interesse) e o fato de que o HV é constituído de 95-99% de água, água deionizada foi utilizada como HV “branco” durante os procedimentos de validação, exceto para determinação da seletividade e especificidade. A utilização de água deionizada se mostrou equivalente a de HV e já foi reportada anteriormente (Sanches, Seulin, Leyton, Paranhos, Pasqualucci, Munoz, *et al.*, 2012).

As amostras foram coletadas por médicos legistas do Departamento Médico Legal de Vitória - ES (DML) no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2012. Os critérios de inclusão foram: vítimas de mortes violentas, de ambos os sexos. E os critérios de exclusão: vítimas de mortes naturais, causa da morte indeterminada, internações em hospitais previamente à morte, e doadores de córneas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise cromatográfica

Todos os analitos foram extraídos da matriz e separados com sucesso empregando o método desenvolvido e validado. Os picos dos íons possuem formato gaussiano. A Figura 8 apresenta a análise cromatográfica de uma amostra de HV fortificada com uma mistura de todos os analitos na concentração de 100 ng/mL.

Figura 8 - Cromatograma obtido de uma amostra de humor vítreo fortificada com todos os analitos pesquisados em uma concentração de 100 ng/mL.

3.2 Otimização do procedimento de extração

A extração proporcionou extratos limpos, com boa recuperação e resultados reprodutíveis. O cartucho utilizado no trabalho é de modo misto, que combina um polímero hidrofílico com trocador catiônico, isso permite que seja possível extrair, ao mesmo tempo, drogas básicas, ácidas e neutras (Franke e De Zeeuw, 1998; Drummer, 1999).

O procedimento de extração foi otimizado para obter uma boa recuperação para todos os analitos, que possuem propriedades físico-químicas distintas, e minimizar os potenciais interferentes.

Inicialmente foi verificado o efeito do pH da amostra na retenção dos analitos investigados. Alíquotas de água deionizada foram fortificadas com 50 ng/mL de ANF, MET, COC, BE, METAD, COD, THC e COOHTHC, foi adicionado 1 mL de tampão pH 6, 7 ou 9, e em seguida, as amostras foram extraídas como descrito anteriormente. A diminuição do pH reduz a recuperação dos opioides (representados pela codeína e metadona) e das anfetaminas, esse fenômeno pode ser explicado pela protonação desses compostos que possuem valor de pKa alto (8,2 - 9,9). A protonação torna esses analitos muito polares para serem retidos na fase. No pH 9,0 observou-se a melhor recuperação para todos os analitos, este resultado está de acordo com o descrito por (Gonzalez-Marino *et al.*, 2010).

Após o ajuste do pH, foram considerados diferentes volumes dos solventes de eluição. Os volumes testados foram 2, 3 e 4 mL de cada solvente. Não houve diferença estatisticamente significativa (ANOVA de duas vias seguido de Bonferroni), sendo escolhido o menor volume de eluição. A coluna de extração empregada possui micropartículas do sorbente (200 Å), o que propicia um menor volume deste, sendo assim, menos solvente é necessário para extração.

3.3 Otimização do procedimento de derivatização

O MSTFA foi capaz de derivatizar todos os compostos. A silição aumenta a volatilidade, a estabilidade térmica e melhora as características dos espectros dos analitos.

A condição ótima de derivatização foi selecionada utilizando a função de desejabilidade, calculada levando em consideração somente os compostos derivatizados (excluiu-se a cocaína, cocaetileno e EMA). Os valores ótimos previstos por essa função foram 40 µL de MSTFA, 90°C e 55 minutos (Figura 9). Entretanto, para reduzir o tempo gasto no processo foi realizada análise estatística (ANOVA de 2 vias seguida de Bonferroni) usando 30, 35, 40, 45 e 55 min. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos após a derivatização em 40 e 55 min, desta forma o tempo mais curto (40 min) foi selecionado.

Figura 9 - Gráficos de desejabilidade.

3.4 Validação do método

A confiabilidade dos achados analíticos é extremamente importante na toxicologia forense e é um pré-requisito para a correta interpretação dos resultados. Resultados não confiáveis podem não só ser contestados no tribunal como causar

consequências legais injustificadas (Peters e Maurer, 2002). A seguir estão descritos os resultados obtidos após a validação.

3.4.1 Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ)

Os limites de detecção variaram entre os analitos. A anfetamina, metanfetamina, EMA, MDA, MDEA, metadona, dihidrocodeína e 6-acetilmorfina tiveram LOD de 1 ng/mL, e os outros analitos, 2 ng/mL. O limite de quantificação foi o mesmo para todos os analitos estudados, 10 ng/mL. Os resultados, sumarizados na Tabela 6, são adequados para o objetivo proposto do trabalho.

Tabela 6 - Valores de limite de detecção e limite de quantificação dos analitos estudados em amostras de HV.

Analitos	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
Anfetamina	1,0	10,0
Metanfetamina	1,0	10,0
EMA	1,0	10,0
MDA	1,0	10,0
MDMA	2,0	10,0
MDEA	1,0	10,0
Metadona	1,0	10,0
Cocaína	2,0	10,0
Cocaetileno	2,0	10,0
Benzoilecgonina	2,0	10,0
THC	2,0	10,0
Dihidrocodeína	1,0	10,0
Codeína	2,0	10,0
Morfina	2,0	10,0
6-AM	1,0	10,0
COOHTHC	2,0	10,0

3.4.2 Seletividade e Especificidade

As análises das amostras de HV “branco”, sem a adição de padrões, não apresentaram nenhum pico interferente. A Figura 10 mostra o cromatograma obtido

pela análise de uma amostra de HV sem a presença dos analitos e adicionadas de padrão interno.

Figura 10 - Amostra de humor vítreo “branca”.

Nenhum dos 23 potenciais interferentes exógenos fortificados a 1000 ng/mL apresentou picos que pudessem ser identificados como analitos de interesse ou prejudicaram a quantificação destes. Para avaliar a especificidade foram usados padrões de interferentes que podem estar presentes nas amostras reais, por exemplo, a nicotina e cotinina no caso de fumantes, e outros medicamentos que estavam disponíveis no laboratório.

3.4.3 Linearidade

A Tabela 7 resume os resultados dos experimentos de linearidade. As curvas de calibração foram lineares entre 10 e 1000 ng/mL para todos os analitos, exceto o EMA, cuja curva foi linear de 10 a 750 ng/mL. Todos os coeficientes de determinação foram superiores a 0,99. As Figuras 11 a 18 apresentam as curvas de calibração de todos os analitos envolvidos.

Tabela 7 - Faixa de linearidade e coeficiente de determinação (R^2) das drogas e metabólitos analisados.

Analito	Coeficiente de Determinação (R^2)	de Faixa de linearidade (ng/mL)	Equação de regressão linear
ANF	0,9985	10-1000	$y=0,0048x - 0,0182$
MET	0,9967	10-1000	$y=0,0079x - 0,0852$
EMA	0,9919	10-750	$y=0,0166x + 0,2247$
MDA	0,9990	10-1000	$y=0,0426x + 0,1422$
MDMA	0,9977	10-1000	$y=0,0041x - 0,0217$
MDEA	0,9984	10-1000	$y=0,0051x - 0,07$
METAD	0,9985	10-1000	$y=0,0055x + 0,1653$
COC	0,9965	10-1000	$y=0,0031x - 0,0286$
CE	0,9961	10-1000	$y=0,0041x - 0,0515$
BE	0,9997	10-1000	$y= 0,004x + 0,0128$
THC	0,9974	10-1000	$y=0,002x + 0,5393$
DIHID	0,9969	10-1000	$y=0,0007x + 0,0124$
COD	0,9997	10-1000	$y=0,0026x + 0,0377$
MOR	0,9983	10-1000	$y=0,0026x + 0,0603$
6-AM	0,9980	10-1000	$y=0,0048x + 0,0577$
COOHTHC	0,9956	10-1000	$y=0,0005x + 0,0035$

Figura 11 - Curva de calibração da anfetamina e metanfetamina.

Figura 12 - Curva de calibração do éster de metilanidroecgonina e metinoelodioxianfetamina.

Figura 13 - Curva de calibração da metilenodioximetanfetamina e metilenodioxietilanfetamina.

Figura 14 - Curva de calibração da metadona e cocaína.

Figura 15 - Curva de calibração do cocaetileno e benzoilecgonina.

Figura 16 - Curva de calibração do tetrahydrocannabinol e dihidrocodeína.

Figura 17 - Curva de calibração da codeína e morfina.

Figura 18 - Curva de calibração da 6-acetilmorfina e carboxi-tetrahydrocannabinol.

3.4.4 Recuperação

A recuperação foi determinada em três concentrações da faixa de trabalho. A recuperação absoluta, obtida após extração em fase sólida, nos três níveis não demonstrou dependência da concentração.

Os resultados variaram de acordo com os analitos (Tabela 8) para anfetamina, metanfetamina, MDMA, MDEA, benzoilecgonina e metadona, a recuperação média foi maior que 90%; para morfina, 6-AM, codeína, dihidrocodeína, cocaína, cocaetileno, EMA e MDA a recuperação foi maior que 70% e menor que 90%. Os canabinoides, especialmente o THC, apresentaram baixa recuperação, entretanto suficiente para determinar quantitativamente esses compostos no LOQ.

Tabela 8 - Valores de recuperação obtidos para os analitos pesquisados.

Analitos	Recuperação (%)			
	15 ng/ mL	400 ng/mL	750 ng/ mL	Média
ANF	85,4	89,4	96,4	90,4
MET	81,9	90,8	97,9	90,2
EMA	83,7	78,0	72,3	78,0
MDA	94,2	85,5	89,0	89,6
MDMA	94,7	89,4	95,0	93,0
MDEA	91,5	88,4	95,7	91,8
METAD	86,9	91,8	93,3	90,6
COC	77,5	83,6	85,1	82,1
CE	80,7	86,4	100,1	89,0
BE	94,3	100,1	98,5	97,7
THC	36,9	24,5	17,8	26,4
DIHID	86,5	81,9	75,8	81,4
COD	96,5	82,3	78,6	85,8
MOR	76,3	70,4	69,5	72,1
6-AM	74,4	70,9	68,0	71,1
COOH-THC	61,0	62,1	59,9	61,0

3.4.5 Precisão e exatidão

Os resultados de precisão inter e intra-ensaio, e exatidão foram menores que os limites estabelecidos nas legislações e guias internacionais (Saúde, 2003; Peters, Drummer e Musshoff, 2007; UNODC, 2009). A precisão inter-ensaio (Tabela 9) variou de 1,1% (COOHTHC) a 10,0% (6-AM). E os valores da precisão intra-ensaio variaram de 0,9% (THC) a 10,3% (EMA). A exatidão (Tabela 10), calculada como porcentagem da concentração teórica, variou de 95,6 a 104,0%.

Tabela 9 - Valores de precisão da quantificação dos analitos por GC/MS em amostras de humor vítreo.

Analito	Precisão intra-ensaio (%DPR, n = 10)			Precisão inter-ensaio (%DPR, n = 15)		
	15	400	750	15	400	750
	ng/ mL	ng/mL	ng/ mL	ng/ mL	ng/mL	ng/ mL
ANF	7,3	2,8	5,1	6,4	2,4	2,6
MET	3,9	2,5	1,5	5,0	2,6	6,0
EMA	10,3	5,5	5,3	8,7	6,7	6,3
MDA	4,4	4,0	8,7	2,9	9,5	4,6
MDMA	1,4	3,4	2,3	2,4	4,7	4,5
MDEA	2,2	1,7	1,4	4,0	2,2	1,7
METAD	5,2	5,9	5,4	3,2	3,1	4,2
COC	1,5	2,8	1,5	2,5	2,1	1,9
CE	2,8	3,7	5,5	5,0	7,0	5,9
BE	1,7	2,0	4,3	5,1	3,0	1,2
THC	4,0	1,4	0,9	4,9	3,5	1,3
DIHID	2,0	3,2	2,2	4,5	2,9	2,6
COD	7,8	3,4	2,3	7,3	4,9	2,5
MOR	9,2	2,8	1,6	7,6	2,6	2,1
6AM	3,3	2,2	3,6	10,0	2,7	2,7
COOHTHC	6,8	4,5	1,2	5,2	1,9	1,1

Tabela 10 - Valores de exatidão da quantificação dos analitos por GC/MS em amostras de humor vítreo.

Analito	Exatidão (% teórico, n = 15)		
	15 ng/ mL	400 ng/mL	750 ng/ mL
ANF	97,2	99,2	100,1
MET	97,3	98,7	101,9
EMA	101,0	101,2	102,7
MDA	99,6	100,5	101,2
MDMA	100,0	95,6	100,7
MDEA	104,6	99,3	101,6
METAD	100,5	97,9	98,2
COC	101,9	98,4	101,1
CE	101,7	95,8	98,2
BE	101,9	98,6	100,5
THC	97,1	97,6	99,9
DIHID	97,6	98,5	99,2
COD	104,0	98,7	99,7
MOR	102,0	97,6	99,5
6AM	103,1	98,9	100,2
COOHTHC	100,1	100,1	100,2

3.4.6 Estabilidade

Os experimentos de estabilidade em temperatura ambiente por 24h, três ciclos de congelamento e descongelamento, armazenamento a -20°C por sete e trinta dias e estabilidade pós processamento não mostraram degradação nas amostras. A diferença nas concentrações obtidas após o período de armazenamento foram menores que 15%.

(Holmgren *et al.*, 2004) analisaram a concentrações de 46 substâncias no HV após um ano de armazenamento a -20°C. Não foram observadas mudanças nas concentrações que pudessem afetar a interpretação dos casos forenses.

A hidrólise não enzimática da cocaína pode ser diminuída ou eliminada pela acidificação da amostra, armazenamento a 4°C e uso de fluoreto de sódio (NaF) como

inibidor enzimático (Warner e Norman, 2000). A adição de NaF e armazenamento das amostras congeladas também aumentaram a estabilidade do 6-AM (Rees *et al.*, 2012).

3.4.7 Carryover

Não foi observado *carryover* no método. Nenhum pico dos analitos de interesse foi observado na amostra “branca” analisada imediatamente após a injeção do ponto da curva de maior concentração.

3.5 Amostras de humor vítreo

As Figuras 19 a 21 mostram os resultados obtidos para as amostras 83 (positivo para codeína); 95 (positivo para MDMA e MDA); e 174 (positivo para EMA, cocaína, cocaetileno e benzoilecgonina).

Figura 19 - Cromatograma obtido após análise da amostra 83, positiva para codeína (157,37 ng/mL).

Figura 20 - Cromatograma obtido após análise da amostra 95, positiva para MDMA (541,39 ng/mL) e MDA (29,05 ng/mL).

Figura 21 - Cromatograma obtido após análise da amostra 174, positiva para cocaína (1923,82 ng/mL), cocaetileno (169,23 ng/mL) e benzoilecgonina (1586,00 ng/mL).

O método validado foi aplicado a dez amostras de HV obtidas de indivíduos cujas amostras de sangue foram positivas na triagem de drogas de abuso. Os resultados estão demonstrados na Tabela 11.

Tabela 11 - Correspondência entre os resultados obtidos em amostras de sangue e de HV.

Caso	Triagem sanguínea	Resultado no humor vítreo	Concentração no humor vítreo (ng/mL)
1	Cocaína	Cocaína	267,64
	Éster metilecgonina	Benzoilecgonina	142,66
	Cocaetileno	Cocaetileno	115,32
2	Cocaína	Cocaína	103,03
	Benzoilecgonina	Benzoilecgonina	12,99
	Cocaetileno	Cocaetileno	48,45
3	Cocaína	Cocaína	213,08
	Benzoilecgonina	Benzoilecgonina	136,6
	Cocaetileno	-	-
	EMA*	EMA	37,05
4	Cocaína	Cocaína	187,11
	Benzoilecgonina	Benzoilecgonina	144,81
	-	Cocaetileno	
	EMA*	-	33,97
5	Cocaína	Cocaína	30,81
	Benzoilecgonina	Benzoilecgonina	11,47
6	Cocaína	Cocaína	283,97
	Benzoilecgonina	Benzoilecgonina	27,89
	Cocaetileno	Cocaetileno	92,65
7	Cocaína	Cocaína	223,21
	Benzoilecgonina	Benzoilecgonina	460,98
	Cocaetileno	Cocaetileno	41,41
8	THC	-	-
	COOHTHC	-	-
9	THC	-	-
	COOHTHC	-	-
10	Anfetamina	Anfetamina	24,31
	COOHTHC	-	-

* Abaixo do limite de quantificação

Em sete casos, foram detectados cocaína e seus metabólitos. Em todas as amostras positivas para cocaína na triagem sanguínea foi detectada a benzoilecgonina. O cocaetileno, metabólito formado quando há ingestão de álcool juntamente com cocaína foi detectado em cinco dos sete casos. E o éster de metilanidroecgonina, produto formado com a pirólise da cocaína, também foi quantificado em um dos casos, de forma que é possível comprovar o uso do *crack*. Em um caso também foi observada a presença de anfetamina.

Três amostras foram positivas para THC e COOHTHC no sangue, entretanto não foram detectados no HV. Isto pode ser explicado pela forte ligação do THC à proteínas plasmáticas dificultando a difusão para o HV. Outros autores também reportaram o mesmo resultado (Lin e Lin, 2005; Jenkins e Oblock, 2008) .

CAPÍTULO IV

Análise de etanol em amostras de humor vítreo

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A análise da alcoolemia é um dos exames mais realizados nos laboratórios de toxicologia forense. No Brasil, a coleta de sangue para quantificação de etanol é obrigatória em casos de acidente de trânsito (Brasil, 2008).

O humor vítreo (HV) é considerado vantajoso para análise de etanol por ser menos susceptível à contaminação microbiana. Estão presentes no organismo humano várias bactérias e fungos que podem produzir etanol utilizando a glicose como substrato (Oneal e Poklis, 1996). A produção de álcool *postmortem* depende da espécie do micro-organismo, o intervalo *postmortem*, temperatura, condições ambientais e trauma no corpo. Esta produção dificulta a interpretação dos resultados obtidos (Honey *et al.*, 2005).

A utilização do HV para análise de etanol possui algumas vantagens: a matriz é simples; a coleta é fácil; a localização diminui o risco de contaminação por difusão do etanol do sistema digestivo após a morte; as concentrações de etanol no HV atingem o equilíbrio rapidamente com o sangue; e o menor risco de produção endógena de etanol (De Martinis *et al.*, 2006).

MATERIAIS E MÉTODOS

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Reagentes e soluções

Etanol grau HPLC, usado como calibrador, foi obtido da JTBaker (Phillipsburg, NJ, EUA); isobutanol PA, usado como padrão interno, foi fornecido pela Merck (Darmstadt, Alemanha) e o cloreto de sódio usado para produzir o efeito de *salting out* foi obtido da Synth (Diadema, SP, Brazil).

2.1.1 Preparo de soluções

Padrão interno (isobutanol)

A solução de padrão interno foi preparada dissolvendo 1g de cloreto de sódio e 300µL de isobutanol em 1 L de água deionizada. A solução foi armazenada sob refrigeração por no máximo 30 dias.

Soluções padrão de calibradores

Uma solução estoque de 100 dg/L foi preparada utilizando 0,628 mL de etanol em 50 mL de água deionizada. A partir da solução estoque foram preparadas soluções de 1,0; 2,0; 5,0; 8,0; 10,0; 20,0; e 30,0 dg/L utilizando 0,1; 0,2; 0,5; 0,8; 1,0; 2,0; e 3,0 mL da solução estoque em 10 mL de água deionizada, respectivamente.

2.2 Equipamentos e acessórios

As análises de etanol em HV foram realizadas por GC-FID utilizando o cromatógrafo em fase gasosa Agilent GC 7890 A (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA) equipado com detector de ionização de chama (FID) e coluna capilar de sílica fundida Carbowax (30 m x 0,25 mm I.D., de espessura 0,25 µm) da Chrompack. A extração em *headspace* foi realizada utilizando o amostrador automático GC Sampler 80 (Agilent Technologies, EUA). Os gases de hidrogênio, nitrogênio e ar sintético foram obtidos da White Martins (SP, Brasil).

2.3 Análise de etanol por GC-FID

O procedimento de análise de álcool em HV foi realizado baseado no método descrito por (De Martinis *et al.*, 2006). Em frascos de *headspace* de 20 mL foram adicionados 100 µL de HV e 500 µL de padrão interno. Os frascos foram incubados a 90°C por 10 min antes da injeção com agitação constante de 250 rpm a cada 5 segundos.

A injeção de 400 µL foi realizada no método *split* (razão 1:10), a temperatura do injetor foi ajustada em 250°C e o fluxo da coluna 1,0 mL/min. A temperatura inicial da coluna estava programada para 50°C por 2 min e aumentada até 200°C a uma taxa de 20°C/min. O tempo total da análise foi de 9,5 min. A temperatura do detector estava ajustada para 300°C.

2.4 Validação do método

O método foi validado de acordo com o descrito na seção 2.7 do capítulo III. Foram usados como controle de qualidade amostras de água deionizada fortificadas com 2,0; 10,0 e 20,0 dg/L de etanol (CQ1, CQ2 e CQ3 respectivamente).

Para determinação do LOD e LOQ amostras fortificadas foram analisadas em concentrações decrescentes. O LOD foi definido como a menor concentração obtida com uma relação sinal/ruído de pelo menos 3 e o LOQ com relação sinal/ruído de pelo menos 10. O parâmetro de seletividade e especificidade foram determinados pela avaliação de três amostras de HV “brancas” (sem a adição de etanol). O parâmetro de linearidade foi avaliado analisando em quintuplicata amostras de água fortificadas com 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0; e 30,0 dg/L de etanol. Os ensaios de precisão e exatidão foram realizados analisando replicadas de amostras dos três controles de qualidade. A precisão inter-ensaio foi definida em três dias diferentes ($n_{\text{total}} = 15$), a precisão intra-ensaio foi calculada pela determinação da concentração de dez replicadas realizadas no mesmo lote. A exatidão foi determinada comparando as concentrações obtidas em quinze análises e expressas como porcentagem da concentração teórica.

Estabilidade foi definida utilizando três amostras de HV fortificadas com os três controles de qualidade mantidos a temperatura ambiente e três controles mantidos na geladeira por 24h. As concentrações obtidas foram comparadas com amostras fortificadas no mesmo dia. E o *carryover* foi verificado analisando três amostras brancas após o maior ponto da curva de calibração (30 dg/L).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise cromatográfica

O etanol e o padrão interno foram extraídos do HV e separados com sucesso utilizando este método. As Figuras 22 a 24 mostram uma amostra de HV “branca”, uma amostra fortificada com 2,0 dg/L de etanol e uma amostra de HV positiva, respectivamente.

Figura 22 - Amostra de humor vítreo “branca” adicionada de padrão interno e analisada por GC-FID.

Figura 23 - Amostra de humor vítreo fortificada com 20 dg/L de etanol e analisada por GC-FID.

Figura 24 - Amostra de humor vítreo positiva para etanol (28,4 dg/L).

4.2 Validação

Os limites inferior de detecção e quantificação foram estabelecidos em 1,0 dg/L de álcool. A precisão e exatidão obtidas no LOQ foram 3,7 e 9,2% respectivamente. Este valor estava apropriado para os objetivos do estudo, já que o valor de tolerância vigente na época era de 2,0 dg/L, de acordo com a lei 11.705/08. (Brasil). O artigo 306 do Código de Trânsito Brasileiro (CBT) que trata da condução de veículos sob influência de substâncias psicoativas foi novamente alterado no final de 2012 e o limite mínimo de álcool no sangue para fins de penas administrativas passou a ser 0,0 dg/L (Brasil).

Análises de amostras de HV “brancas”, sem a presença de etanol, não apresentaram picos com o mesmo tempo de retenção que o etanol ou o padrão interno. O método foi linear entre 1,0 e 30 dg/L, o coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,9982 e a equação da reta $y = 0,2334x + 0,0117$. A curva de calibração está apresentada na Figura 27.

Figura 25 - Curva de calibração do etanol

Os valores de precisão e exatidão do etanol analisados por CG-FID estão apresentados na Tabela 12. Nenhum resultado excedeu 10,5%.

Tabela 12 - Valores de precisão e exatidão da quantificação de etanol em humor vítreo por GC-FID.

Controle de Qualidade	Precisão intra-dia (%DPR) n=10	Precisão inter-dia (%DPR) n=15	Exatidão (% teórico) n=15
2,0 dg/L (CQ1)	3,9	4,8	105,7
10,0 dg/L (CQ2)	7,1	5,3	107,7
20,0 dg/L (CQ3)	6,1	4,9	110,5

As amostras de HV fortificadas com etanol foram estáveis nas condições testadas, as variações ocorridas foram menores que a precisão e exatidão obtidas no método, que também não apresentou *carryover*.

CAPÍTULO V

Relação entre o consumo de drogas e as mortes violentas

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Uso de drogas e acidente de trânsito

O acidente de trânsito é a segunda causa de morte entre pessoas de 15 a 29 anos no mundo. Anualmente, morrem 1,2 milhões de pessoas vítimas deste tipo de acidente (Unodc, 2013). O consumo de substâncias psicoativas, tanto medicamentos (sedativos, ansiolíticos, hipnóticos, antidepressivos, anti-histamínicos) quanto drogas ilícitas (anfetamina, cocaína, *cannabis*, opioides) pode prejudicar a habilidade de direção (Walsh *et al.*, 2008). Teoricamente, todos os compostos psicoativos, dependendo da dose, podem afetar a performance psicomotora do indivíduo, resultando em acidentes (Walsh *et al.*, 2004).

A influência do álcool nos acidentes já foi demonstrada por análise toxicológica, simulador e estudos de direção. Motoristas sob influência de álcool possuem problemas na concentração, coordenação, atenção dividida e tempo de reação. O álcool também está relacionado com mudanças no comportamento para assumir riscos, tomar decisões e planejamento da rota (Kelly, Darke e Ross, 2004).

O THC diminui a cognição, função psicomotora e habilidade de direção de forma proporcional com a dose. Concentrações de THC maiores que 300 µg/kg estão relacionadas com o mesmo efeito do que concentrações de alcoolemia iguais ou maiores a 5,0 dg/L. Motoristas com doses altas de THC no sangue têm risco de três a sete vezes maior de causar acidentes do que motoristas que não utilizaram álcool ou drogas (Ramaekers *et al.*, 2004)

Na Europa, 1,9% dos motoristas testaram positivo para alguma substância psicoativa, sendo que 1,3% dos motoristas consumiu THC, 0,4% cocaína, 0,08% anfetamina e 0,07% opioides (Peden, 2004). No Brasil, esta porcentagem é maior. Um estudo com 3398 motoristas brasileiros mostrou que 4,6% estavam sob o efeito de substâncias psicotrópicas, destes 39% haviam usado cocaína, 32% *cannabis*, 16% anfetaminas e 14% benzodiazepínicos (Pechansky, Duarte e De Boni, 2010).

Uma pesquisa com condutores brasileiros mostrou que 18% afirmaram ter dirigido sob o efeito do álcool, 12% após ingerir mais de 5 doses de álcool. Além da direção sob efeito do álcool, 27% afirmaram ter pegado carona com motorista embriagado (Brasil, 2010).

1.2 Uso de drogas e homicídios

De acordo com a teoria tripartite de Goldstein, o uso de drogas e a violência parecem estar relacionadas de três maneiras: psicofarmacologicamente, economia compulsiva e violência sistemática (Goldstein, 1985).

O modelo psicofarmacológico sugere que alguns indivíduos ao ingerirem drogas estimulantes, por exemplo a cocaína, se tornam excitados, irracionais e podem exibir comportamento violento. O modelo econômico sugere que o usuário de droga comete um crime para sustentar a adição. A violência sistemática é derivada da interação entre o sistema de distribuição de drogas e os usuários (Goldstein, 1985).

Exemplos de violência sistemática incluem homicídios devido à disputa de território de tráfico; retaliação pela venda de drogas "ruins"; o uso de ameaça e violência para reforçar as regras entre organizações de tráfico de drogas; brigas entre usuários por droga ou pela parafernália para seu uso; confrontos com a polícia; e eliminação de informantes (Goldstein, 1985).

A maconha é a droga mais utilizada no Brasil (Brasil, 2010). Porém, devido as suas propriedades farmacológicas e pela violência gerada pelo tráfico de drogas, é mais provável que a cocaína esteja presente entre os casos de homicídios do que a maconha (Boles e Miotto, 2003; Darke, Duflou e Torok, 2009)

No Espírito Santo ocorreram 1654 casos de homicídio em 2012. De acordo com dados oficiais, 70% deles aconteceu na Região Metropolitana de Vitória. As cidades de Serra, Cariacica, Vitória e Vila Velha (todas da região metropolitana) possuem uma das taxas de homicídio mais altas do Brasil. Na lista das 30 cidades com mais homicídios no Brasil em 2006, essas cidades ocupam o 18º, 23º, 26º e 30º lugar, respectivamente (Waiselfisz, 2012).

A caracterização dos fatores de risco para mortes violentas e o entendimento entre o uso de drogas e homicídios é fundamental para o desenvolvimento de políticas de prevenção efetivas.

MATERIAIS E MÉTODOS

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Um total de 250 amostras foram coletadas por médicos legistas do Departamento Médico Legal de Vitória - ES (DML) no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2012. Os critérios de inclusão foram: vítimas de mortes violentas, de ambos os sexos. E os critérios de exclusão: vítimas de mortes naturais, causa da morte indeterminada, internações em hospitais previamente à morte, e doadores de córneas.

Todas as amostras de HV foram submetidas aos métodos para determinação de drogas e álcool descritos nos capítulos anteriores. Os dados demográficos (idade, sexo e tipo de morte) foram obtidos dos laudos cadavéricos do DML.

A análise estatística e a representação gráfica dos resultados foram realizados utilizando o pacote estatístico SPSS Statistics 17.0 e Microsoft Excel 2010. A significância estatística foi analisada utilizando tabelas com duas variáveis e teste qui-quadrado. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos, provavelmente devido à pequena amostragem. Por esta razão, serão mostrados neste trabalho somente os resultados descritivos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Mortes violentas

Foram coletadas 250 amostras no período de dois anos. Destas, 85,4% foram do gênero masculino. A maioria dos casos era de jovens (46% entre 18 e 30 anos), a média de idade foi de $32,83 \pm 14,41$ anos. A Figura 26 mostra a distribuição das faixas etárias.

Figura 26 - Distribuição das faixas etárias.

A maioria das mortes ficou concentrada em quatro cidades da Região Metropolitana da Grande Vitória (Figura 27), quase um terço das amostras foram provenientes do município da Serra.

Figura 27 - Distribuição das cidades onde ocorreram as mortes

Os acidentes de trânsito corresponderam a 44,1% dos casos, sendo que 55% destes foram vítimas fatais de acidentes com automóveis (Figura 28). É importante ressaltar que não foi possível fazer a distinção entre motoristas e passageiros.

A grande maioria (89,5%) dos homicídios foi causada por projétil de arma de fogo (PAF), 7,9% das mortes foi causada por arma branca, e 2,7% por enforcamento ou espancamento.

Figura 26 - Distribuições dos casos em relação ao tipo de morte (esquerda); distribuição dos acidentes de trânsito em relação ao veículo (direita).

O uso de alguma substância psicoativa analisada neste estudo (álcool, cocaína, anfetamina e/ou opioides) foi confirmado em 151 casos (60,4%). A Tabela 16 apresenta, em número de casos, o uso destas substâncias nos diferentes tipos de morte.

Tabela 13 - Uso de substâncias psicoativas em cada tipo de morte.

Tipo de morte	Uso de substância psicoativa	
	Sim	Não
Acidente de Trânsito	55 (50,5%)	54 (49,5%)
Homicídio	80 (70,2%)	34 (29,8%)
Suicídio	3 (42,9)	4 (57,1%)
Outras	10 (58,8%)	7 (41,2%)
Total	148 (59%)	103 (41,0%)

3.2 Uso de álcool

Das 250 amostras estudadas, 83 (33,2%) foram positivas para o uso de álcool. As concentrações variaram de 2,0 dg/L a valores acima do limite de quantificação (30 dg/L), conforme apresentado na Figura 29. Considerando somente os casos positivos,

a maioria (22,9%) foi concentrada entre 11 e 20 dg/L. Concentrações acima de 35 dg/L podem levar a casos de completa inconsciência e coma (Dubowski, 1980).

Figura 29 - Distribuição da concentração de etanol.

3.3 Uso de drogas

Nas amostras estudadas, 103 casos (41,2%) foram positivos para cocaína, anfetamina e/ou opioides. Os resultados de todas as amostras positivas estão apresentados no Apêndice 1. Na maioria das amostras positivas (88,3%, 91 casos) foi quantificada cocaína ou um de seus metabólitos (Figura 30).

Figura 30 - Distribuição das classes de drogas.

A associação entre álcool e drogas foi bastante comum, principalmente a associação de álcool e cocaína, que ocorreu em 32 casos.

3.3.1 Cocaína

As concentrações médias, máximas e mínimas da cocaína, cocaetileno, benzoilecgonina e éster de metilanidroecgonina estão descritas na Tabela 13. A distribuição das concentrações das quatro substâncias pode ser observada nas Figuras 31 e 32.

Tabela 14 - Valor máximo e mínimo, média e desvio padrão das concentrações de cocaína, cocaetileno, benzoilecgonina e EMA.

Analito	N	Mínimo	Máximo	Média	Mediana	Desvio Padrão
Cocaína	79	11,6 ng/mL	1923,92 ng/mL	302,95 ng/mL		363,96 ng/mL
Cocaetileno	43	<10 ng/mL	470,68 ng/mL	74,99 ng/mL		111,21 ng/mL
Benzoilecgonina	87	<10 ng/mL	2132,71 ng/mL	403,97 ng/mL		448,56 ng/mL
EMA	28	<10 ng/mL	1106,61 ng/mL	179,74 ng/mL		221,59 ng/mL

Figura 31 - Distribuição das concentrações de cocaína (A) e cocaetileno (B).

Figura 32 - Distribuição das concentrações de benzoilecgonina (C) e éster de metilanidroecgonina (D).

No caso 194 foi encontrada a maior concentração de benzoilecgonina (2132,71 ng/mL), neste caso também foi possível observar a presença de cocaína, cocaetileno e EMA.

Foram comparadas as concentrações de benzoilecgonina entre os casos com consumo de álcool e àqueles sem a presença de cocaetileno. A concentração de benzoilecgonina foi maior nos casos de ausência de etanol (Tabela 14).

Tabela 15 - Concentrações de benzoilecgonina na presença e na ausência de etanol.

Uso de etanol	Concentração mínima	Concentração máxima	Média	Desvio Padrão
Positivo	<10 ng/mL	2132,71 ng/mL	428,21 ng/mL	485,97 ng/mL
Negativo	<10 ng/mL	1586,00 ng/mL	383,94 ng/mL	431,99 ng/mL

A concentração de benzoilecgonina é maior na ausência do etanol, possivelmente porque não há formação de cocaetileno, e as esterases que formam o cocaetileno no fígado parecem ser as mesmas que formam a benzoilecgonina (Mackey-Bojack, Kloss e Apple, 2000).

3.3.2 Anfetamina

Em 9 amostras pode-se observar o consumo de anfetaminas (anfetamina, MDMA, MDA e MDEA). As concentrações encontradas podem ser observadas na Tabela 15.

Tabela 16 - Valor máximo e mínimo, média e desvio padrão das concentrações de anfetamina, MDMA, MDA e MDEA.

Analito	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
Anfetamina	2	24,31 ng/mL	78,92 ng/mL	51,61 ng/mL	38,61 ng/mL
MDMA	3	<10 ng/mL	541,39 ng/mL	182,92 ng/mL	310,44 ng/mL
MDA	6	19,09 ng/mL	577,44 ng/mL	124,73 ng/mL	222,38 ng/mL
MDEA	1	<10 ng/mL	<10 ng/mL		

De Letter *et al.* (2004) pesquisaram as concentrações de MDMA e MDA em diversas amostras, inclusive HV, em um caso de overdose. A concentração

encontrada de MDMA foi de 361 ng/mL e de MDA de 15 ng/mL. No caso 95, cuja causa da morte foi declarada como homicídio, a concentração de MDMA foi maior do que a encontrada no caso descrito por De Letter.

3.3.3 Opioides

Os opioides só foram quantificados em uma amostra decorrente de um caso de afogamento. A concentração de codeína determinada foi de 157,37 ng/mL. Como não havia traços de 6-acetilmorfina ou de morfina, pode-se inferir que houve a ingestão de codeína e excluindo-se a utilização de heroína.

3.4 Relação entre acidente de trânsito e substâncias psicoativas

A relação entre uso de álcool e drogas e acidentes de trânsito já é bem conhecida (Longo *et al.*, 2000a; b; Hingson e Winter, 2003; Drummer *et al.*, 2004; Movig *et al.*, 2004). Entre as amostras do estudo, a metade (50,45%) das pessoas que morrem em decorrência de acidente de trânsito (motoristas, passageiros e atropelados) consumiram álcool, cocaína e/ou anfetaminas no período que antecedeu a morte.

A substância mais encontrada nas amostras foi o álcool, em 41 dos 109 casos analisados (37,61%), seguida pela cocaína, em 24 casos (22,01%), e anfetamina em 4 casos (3,66%). Em apenas 4 casos foi possível determinar, a partir da detecção do EMA, o uso de cocaína na forma de *crack*.

A Tabela 17 mostra a relação entre as diferentes variáveis e o uso de álcool e drogas. Apesar das amostras masculinas serem maioria neste trabalho, as mulheres apresentaram maior positividade para o uso de álcool e drogas.

A faixa etária com maior número de casos positivos para cocaína e anfetamina foram os jovens de 18 a 30 anos, entretanto a maior relação entre casos positivos foi na faixa etária de 31 a 40 anos. Já para o álcool, a maior porcentagem de casos positivos foi entre 41 e 50 anos.

Nos casos de atropelamento, 42,86% usaram drogas no período anterior ao acidente e mais de 70% usaram álcool. Este resultado foi bem maior do que o encontrado em um trabalho anterior realizado no DML com vítimas de atropelamento.

O trabalho em questão constatou que cerca de 40% das vítimas estavam sob o efeito do álcool (De Paula *et al.*, 2009).

Tabela 17 - Relação entre as variáveis sexo, faixa etária, local e tipo de acidente, e o uso de álcool e drogas

	Uso de Álcool				Uso de drogas		
	N	Sim	Não	% positivos	Sim	Não	% positivos
Sexo							
Masculino	92	34	56	37,7	23	69	25,0
Feminino	17	7	8	46,6	5	12	29,4
Faixa Etária							
< 18	3	1	2	33,3	0	3	
18-30	43	14	27	34,1	12	31	27,9
31-40	27	10	17	37,0	10	17	37,0
41-50	17	10	6	62,5	4	13	23,5
51-60	7	3	3	50,0	1	6	14,2
> 61	11	2	9	18,1	1	10	9,0
Local							
Vitória	8	3	5	37,5	0	8	
Vila Velha	8	2	6	25,0	3	5	37,5
Serra	24	8	15	34,7	5	19	20,8
Cariacica	13	7	6	53,8	3	10	23,0
Outros	55	20	32	38,4	17	38	30,9
Tipo de Acidente							
Automóvel	60	18	38	32,14	15	45	25,00
Moto	40	17	23	42,50	9	31	22,50
Atropelamento	7	5	2	71,43	3	4	42,86
Outros	2	1	1	50,00	1	1	50,00

3.5 Relação entre homicídios e substâncias psicoativas

Dos 114 casos de homicídio estudados, 54,4% de todos os casos foram positivos para cocaína e 5,3% para anfetamina. O uso de *crack* foi constatado em

40,3% dos casos positivos para cocaína, o que corresponde a 21,9% de todos os casos. O uso de álcool foi constatado em 31,8% das amostras. A Tabela 18 mostra a relação entre as diferentes variáveis e o uso de álcool e drogas.

Tabela 18 - Relação entre os dados demográficos e o uso de álcool e drogas.

	Uso de Álcool				Uso de drogas		
	N	Sim	Não	% Positivo	Sim	Não	% Positivo
Sexo							
Masculino	100	31	63	31,0	61	39	61,0
Feminino	14	3	10	21,4	5	9	35,7
Faixa Etária							
< 18	14	1	11	7,1	7	7	50,0
18-30	61	17	42	27,9	37	24	60,7
31-40	23	10	11	43,5	13	10	56,5
41-50	12	5	7	41,7	7	5	58,3
51-60	2	1	1	50,0	1	1	50,0
Local							
Vitória	10	2	7	20,0	7	3	70,0
Vila Velha	19	7	10	36,8	12	7	63,2
Serra	35	9	23	25,7	21	14	60,0
Cariacica	37	10	26	27,0	22	15	59,5
Outros	13	6	7	46,2	4	9	30,8
Tipo de Homicídio							
PAF	102	30	66	29,4	58	44	56,9
Arma branca	9	3	6	33,3	6	3	66,7
Outros	3	1	1	33,3	2	1	66,7

A porcentagem de casos positivos para o uso de drogas foi maior do que a média nos homens (61%), entre jovens de 18 a 30 anos (60,7%) e na cidade de Vitória (70%). Em relação ao uso do álcool, assim como nos acidentes de trânsito, os casos positivos se concentraram em pessoas acima de 30 anos. A positividade de álcool foi maior no interior do que nas cidades da Região Metropolitana.

Uma meta-análise publicada em 2009 forneceu dados sobre o uso de drogas em vítima de homicídios em diferentes países (Kuhns *et al.*, 2009). Este trabalho examinou pesquisas realizadas nos Estados Unidos (diversos estados), Estocolmo, Newfoundland, Oslo e Copenhague. Em média, 11% das vítimas de homicídio haviam consumido cocaína, uma taxa menor que a encontrada neste trabalho (11% vs. 54,4%). O resultado deste trabalho também é superior a encontrada por qualquer estudo da meta análise (Hanzlick e Gowitt, 1991; Clark, 1996; Darke, Duflou e Torok, 2009; Kuhns e Maguire, 2012; Sheehan *et al.*, 2013).

Inquéritos de 35 homicídios ocorridos na Região Metropolitana de Vitória em 2012 mostram o mesmo perfil demográfico apresentado no trabalho. Nos homicídios investigados, todas as vítimas eram homens, com média de idade de 26,31 anos, de forma que os jovens (18-30 anos) corresponderam a 57,1% das vítimas. Em 88,6% dos homicídios investigados foi utilizada arma de fogo (Meira e Dadalto, 2013).

Ao investigar as causas dos homicídios, foi descoberto que 54,3% estavam relacionadas com drogas, por exemplo, disputas por pontos de drogas, brigas entre gangues rivais e dívidas de tráfico que não foram pagas. Esses casos são exemplos clássicos da teoria tripartite de Goldstein de violência sistemática (Goldstein, 1985).

Em 2012, 82,1% das mortes de jovens no Brasil foram atribuídas a causas externas (Waiselfisz, 2012). Os crimes relacionados ao tráfico de drogas são responsáveis por grande parte desses números. Esses jovens costumam ser de baixa renda, residentes da periferia e negros. Uma possível explicação para este fenômeno é que grande parte deles não estudam e são cooptados por traficantes de drogas antes de serem alcançados por políticas públicas preventivas (Rodrigues e Dadalto, 2013).

CAPÍTULO VI

**Comparação das concentrações de
drogas de abuso e medicamentos no
humor vítreo e sangue periférico**

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Em casos de necropsia, é essencial determinar se o indivíduo consumiu drogas antes da morte, e se há implicações destes compostos na causa da morte ou na cadeia de eventos que a desencadeou (Druid e Holmgren, 1998; Skopp, 2004; Linnet, 2012).

Nos casos em que o sangue é coletado, a interpretação *postmortem* pode estar cercada de incertezas. Vários fatores podem levar a uma concentração não necessariamente representativa. Por exemplo, a redistribuição *postmortem*; a formação reversa dos metabólitos em seus compostos de origem, formação endógena; e degradação (Skopp, 2010). Ainda, tentativas de ressuscitação; grau de decomposição; e o tempo entre a morte e a coleta da amostra podem influenciar esses resultados (Skopp, 2004; Saar *et al.*, 2012). Esses processos podem começar logo após a morte e podem ocorrer em diferentes proporções (Gerostamoulos *et al.*, 2012).

Em alguns casos não é possível coletar amostras de sangue. Nesses casos são coletadas outras amostras disponíveis. Entretanto, devido ao limitado número de estudos comparando concentrações em diferentes matrizes, a interpretação dos resultados é difícil. Analisando a concentração das drogas em diferentes matrizes alternativas pode contribuir para um melhor entendimento das concentrações *ante-mortem*.

MATERIAIS E MÉTODOS

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Reagentes e soluções

No método de quantificação das anfetaminas foram usados os seguintes padrões certificados: anfetamina (ANF); metanfetamina (MET); N-metil-3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA); 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA); N-etil-3,4-metilenodioxietilanfetamina (MDEA); efedrina; pseudoefedrina; norepinefrina; norpseudoepinefrina; catinona, para-metoxianfetamina (PMA), para-metoxi-N-metilanfetamina (PMMA); 4-bromo-2,5-dimetoxifenetilamina (2-C-B); meta-clorofenilpiperazina (mCPP); metilenodioxipirovalerom (MDPV); meticatinona; mefedrona. Como padrão interno foram utilizados compostos com carbono 13 no anel benzênico, foram eles: $^{13}\text{C}_6$ - anfetamina, $^{13}\text{C}_6$ -metanfetamina, $^{13}\text{C}_6$ -MDMA, $^{13}\text{C}_6$ -MDA, $^{13}\text{C}_6$ -MDEA, $^{13}\text{C}_6$ -PMA, $^{13}\text{C}_6$ -PMMA e $^{13}\text{C}_6$ -2C-B.

Para quantificação dos opioides e cocaína os padrões utilizados foram: morfina-3-glicuronídeo (M-3-G); morfina-6-glicuronídeo (M-6-G); 6-acetilmorfina (6-AM); codeína (COD); etilmorfina; oxicodona; benzoilecgonina (BE); cocaína (COC); codeína-6-glicuronídeo (C-6-G); etilmorfina-6-glicuronídeo (E-6-G); morfina- d_6 ; morfina-3-glicuronídeo- d_6 ; 6-acetilmorfina- d_6 ; codeína- d_6 ; oxicodona- d_6 ; benzoilecgonina- d_8 ; e cocaína- d_3 .

Padrões de nortriptilina; trimipramina; miaserina; citalopram; paroxetina; sertralina; venlafaxina; levomepromazina; quetiapina; tramadol; alimemazina; metoprolol; cetobemidona; citalopram- d_6 ; miaserina- d_3 ; nortriptilina- d_3 ; amitriptilina- d_3 ; setralina- d_3 ; e trimipramina- d_3 ; foram empregados no método de quantificação de medicamentos. E para quantificação dos canabinoides foram utilizados delta-9-tetrahydrocannabinol (THC); canabidiol (CBD); e delta-9-tetrahydrocannabinol- d_3 (THC- D_3).

Os padrões certificados foram obtidos de diferentes fornecedores: Cerilliant (Round Rock, TX, USA), Lipomed (Arlesheim, Suíça), Sigma Aldrich (St.Louis, MO), Alltech (Grace Davison, Deerfield, IL), RBI (Natick, MA), NMD (Oslo, Noruega), Synthélabo (Malvern, PA) *Council of Europe* (Paris, França) e Chiron (Trondheim, Noruega) em soluções de acetonitrila ou metanol nas concentrações de 1 mg/mL ou 100 $\mu\text{g/mL}$.

Metanol grau HPLC foi comprado da Lab-scan (Dublin, Irlanda); heptano, formato de amônio, hexano acetonitrila e acetato de etila da Merck (Whitehouse Station, NJ).

2.2 Coleta das amostras

As amostras foram coletadas de autópsias por médicos legistas no Departamento de Patologia Forense da Divisão de Medicina Forense e Pesquisa em Drogas de Abuso do Instituto Norueguês de Saúde Pública (NIPH).

As matrizes usadas no estudo foram: sangue periférico (SP), coletado da veia femoral e humor vítreo (HV), coletado de ambos os olhos. Todas as amostras foram conservadas a -4°C até o momento da análise.

2.3 Triagem

Todos os casos que havia as duas matrizes, realizou-se triagem em sangue periférico para drogas e álcool. O método de triagem utiliza extração sólido-líquido e UPLC-MS-MS para identificar as principais drogas prescritas e proscritas, além dos principais metabólitos (Oiestad *et al.*, 2011).

Caso amostra de sangue periférico fosse positiva para cocaína, anfetaminas, opioides, canabinoides, ou medicamentos básicos; a quantificação era realizada nas duas matrizes utilizando os métodos de quantificação do NIPH descritos a seguir.

2.4 Análises dos dados

Os analitos foram identificados comparando o tempo de retenção ($\pm 2\%$) e a abundância relativa dos íons qualificadores ($\pm 20\%$) dos calibradores em amostra de sangue periférico realizados na mesma corrida. De acordo com o guia de validação do Grupo de Trabalho Científico de Toxicologia Forense (SWGTOX), o uso de calibradores com da mesma matriz analisada é indicado porém não é obrigatório. Independente da matriz na qual o calibrador for preparada, o laboratório deve demonstrar precisão e exatidão aceitáveis para controles preparados em todas as matrizes utilizadas no método (Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology, 2013). (Antonides, Kiely e Marinetti, 2007) demonstraram não haver diferença significativa que impeça a utilização de calibradores em sangue para quantificação de amostras de HV.

2.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada para substâncias detectadas em pelo menos cinco amostras. A média, desvio padrão, concentração mínima e máxima e o coeficiente de correlação de Pearson foram calculados utilizando o pacote estatístico GraphPad Prism 6.0. A análise de regressão linear e a razão humor vítreo/sangue periférico foram realizadas utilizando o editor de planilhas Excel. Todos os cálculos foram realizados utilizando a concentração no HV em relação ao sangue periférico.

2.6 Análise de anfetaminas

Este método foi utilizado para quantificar os seguintes compostos: anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA, MDEA, efedrina, pseudoefedrina, norepinefrina, norpseudoepinefrina, catinona, PMA, PMMA, 2-CB, mCPP, MDPV, meticatinona e mefedrona.

2.6.1 Preparação da amostra

Em tubos de 5 mL foram adicionados 100 µL da amostra e 2,5 µM de padrão interno ($^{13}\text{C}_6$ - anfetamina, $^{13}\text{C}_6$ -metanfetamina, $^{13}\text{C}_6$ -MDMA, $^{13}\text{C}_6$ -MDA, $^{13}\text{C}_6$ -MDEA, $^{13}\text{C}_6$ -PMA, $^{13}\text{C}_6$ -PMMA e $^{13}\text{C}_6$ -2C-B.). Os tubos foram agitados no vórtex e o volume transferido para placas de 96 poços, na qual foi adicionado 750 µL de solução de acetonitrila: metanol (85:15, v/v) e colocados no vórtex novamente. O passo seguinte foi centrifugar a placa a 3000 rpm por 10 minutos e transferir o sobrenadante para placas com filtro Captiva Lipid ND 96-well filter plates (Agilent Technologies, NY, USA) que foi seca usando vácuo. As amostras foram reconstituídas com 300 µL de acetonitrila: metanol (85:15, v/v) e 2 µL foi injetado. Os limites de quantificação estão apresentados na Tabela 19.

Tabela 19 - Limite de quantificação para análise de anfetaminas por LC-MS/MS.

Analito	Limite de quantificação (µMol/mL)
Anfetamina	0,20
Metanfetamina	0,20
MDMA	0,20
MDA	0,20
MDEA	0,20
PMA	0,05

PMMA	0,05
MCP	0,05
2 CB	0,05
MDPV	0,05
Efedrina	0,30
Pseudoefedrina	0,50
Norefedrina	0,50
Norpseudoefedrina	0,50
Catinona	0,30
Meticatinona	0,30
Mefedrona	0,03

2.6.2 Análise cromatográfica

A separação dos compostos foi realizada utilizando o módulo Acquity UPLC (Waters Corp., Milford, MA, USA). A Acquity UPLC BEH C₁₈ (2,1 mm x 50 mm, 1,7 µm) foi utilizada como coluna, acoplada a pré-coluna Acquity UPLC BEH C₁₈ Vanguard (2,1 mm x 5 mm, 1,7 µm), ambas da Waters (Wexford, Irlanda). Tampão formato de amônio 5 mM (pH 10,2) foi utilizado como fase móvel A e metanol como fase móvel B em um fluxo constante de 0,4 mL/min, conforme gradiente mostrado na Tabela 20.

Tabela 20 - Tabela de gradiente de fase móvel utilizado na análise de anfetaminas por UPLC-MS/MS.

Tempo (min)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)
0,00	95	5
0,15	95	5
0,30	70	30
2,00	60	40
3,00	50	50
4,20	2	98
5,20	2	98
5,40	95	5

A temperatura da coluna foi mantida a 60°C e 2 µL da amostra foi injetado utilizando *loop* parcial de 10 µL. A solução de 5% de metanol em água Milli-Q foi utilizada como solvente de lavagem fraco e 90% de metanol em água Milli-Q como solvente de lavagem forte. A temperatura do amostrador automático foi mantida a 10°C.

O espectrômetro de massas acoplado à fonte de ionização por *electrospray* (ESI) Xevo TQ tandem (Waters. Milford, USA) foi utilizado em todas as análises. A detecção por ESI-MS/MS foi realizada utilizando o método de monitoramento de múltiplas reações (MRM) com ionização positiva. As transições monitoradas estão apresentadas na Tabela 21, em negrito estão as transições utilizadas para quantificação. Os compostos foram identificados comparando os tempos de retenção das transições das amostras com os valores correspondentes dos controles de qualidade.

Tabela 21 - Lista de transições, voltagem do cone, energia de colisão e *dwell* time para análise de anfetamina por LC-MS/MS.

Analito	Tempo (min)	Transições MRM (m/z)	Voltagem do cone (V)	Energia de colisão (eV)	Dwell time (s)
		(ES+)			
Norefedrina	1,1 – 1,6	152,11>117,07	15	20	0,05
		152,11>134,10	15	10	
Norpseudoefedrina	1,1 – 1,6	152,11>117,07	15	20	0,05
		152,11>134,10	15	10	
Catinona	1,3 – 1,8	150,09>105,03	20	20	0,03
		150,09>132,08	20	15	
Efedrina	1,5 – 2,1	166,12>117,07	20	20	0,02
		166,12>148,11	20	10	
Pseudoefedrina	1,5 – 2,1	166,12>117,07	20	20	0,02

Capítulo VI. Comparação das concentrações de drogas de abuso e medicamentos no humor vítreo e sangue periférico.

		166,12>148,11	20	20	
Metacatinona	1,8 – 2,3	164,11>105,03	20	20	0,01
		164,11>131,07	20	20	
		164,11>146,10	20	10	
MDA	1,9 – 2,4	180,10>133,07	15	15	0,015
		180,10>135,04	15	15	
		180,10>163,08	15	10	
¹³ C ₆ MDA	1,9 – 2,4	186,12>139,09	15	15	0,015
		186,12>141,06	15	15	
Anfetamina	2,0 - 2,5	136,11>91,05	15	15	0,02
		136,11>119,09	15	10	
¹³ C ₆ anfetamina	2,0 – 2,5	142,13>97,07	15	15	0,02
		142,13>125,11	15	10	
PMA	2,0 – 2,5	166,12>121,07	15	20	0,015
		166,12>149,10	15	10	
¹³ C ₆ PMA	2,0 – 2,5	172,14>127,09	15	20	0,015
		172,14>155,12	15	10	
MDMA	2,3 – 2,9	194,12>133,07	20	20	
		194,12>135,04	20	20	
		194,12>163,08	20	15	
¹³ C ₆ MDMA	2,3 – 2,9	200,14>139,09	20	20	0,02
		200,14>169,10	20	15	
PMMA	2,4 – 3,1	180,14>121,07	20	20	0,01

Capítulo VI. Comparação das concentrações de drogas de abuso e medicamentos no humor vítreo e sangue periférico.

		180,14>149,10	20	10	
¹³ C ₆ PMMA	2,4 – 3,1	186,16>127,09	20	20	0,01
		186,16>155,12	20	10	
Metanfetamina	2,6 – 3,1	150,13>91,05	20	15	0,02
		150,13>119,09	20	10	
¹³ C ₆ metanfetamina	2,6 – 3,1	156,15>97,07	20	15	0,02
		156,15>125,11	20	10	
Mefedrona	2,6 – 3,2	178,12>119,09	20	20	0,015
		178,12>145,09	20	20	
		178,12>160,11	20	10	
2C-B	2,8 – 3,3	260,03>134,00	15	25	0,015
		260,03>243,00	15	15	
¹³ C ₆ 2C-B	2,8 – 3,3	266,05>249,02	15	15	0,015
¹³ C ₆ ²⁶² 2C-B	2,8 – 3,3	268,05>251,02	20	15	0,015
mCPP	2,9 – 3,5	197,08>119,07	30	25	0,02
		197,08>154,04	30	20	
MDEA	3,0 – 3,5	208,13>133,07	20	20	0,02
		208,13>163,08	20	15	
¹³ C ₆ MDEA	3,0 – 3,5	214,15>139,09	20	20	0,02
		214,15>169,10	20	15	
MDPV	3,7 – 5,0	276,16>126,13	35	25	0,05
		276,16>175,08	35	20	
		276,16>205,09	35	15	

2.7 Análise de opioides e cocaína

Os opioides e cocaína foram analisados seguindo a metodologia descrita por (Berg *et al.*, 2009; Karinen *et al.*, 2009). Este método foi utilizado para quantificar os seguintes compostos: morfina, morfina-3-glicuronídeo, morfina-6-glicuronídeo, 6-AM, codeína, etilmorfina, oxicodona, codeína-6-glicuronídeo, etilmorfina-6-glicuronídeo, benzoilecgonina e cocaína.

2.7.1 Preparação da amostra

Em tubos de plástico de 5 mL foram adicionados 100 µL de amostra, 0,5 µM de padrão interno (morfina-d₆, M-3-G-d₆; 6-AM-d₆; codeína-d₆; oxicodona-d₆; benzoilecgonina-d₃; e cocaína-d₃) e os tubos foram agitados. Foi adicionada 750 µL de solução de acetonitrila: metanol (85:15, v/v) gelada e em seguida os tubos foram novamente agitados por 1 min. As amostras foram centrifugadas por 2 min a 4500 rpm (3900 x g) numa temperatura de 4°C e o sobrenadante transferido para placa de filtros Captiva 96. As amostras passaram pela placa utilizando vácuo e o extrato foi seco em fluxo de nitrogênio por aproximadamente 12 min. O resíduo (200-300 µL) foi transferido para o frasco de injeção e 2 µL da amostra foi injetado utilizando *loop* parcial de 10 µL. Os limites de quantificação estão apresentados na Tabela 22.

Tabela 22 - Limite de quantificação para análise de opioides e cocaína por LC-MS/MS.

Analito	Limite de quantificação (µMol/mL)
6-Acetil morfina	0,03
Morfina	0,03
Morfina-3-glicuronídeo	0,05
Morfina-6-glicuronídeo	0,05
Codeína	0,03
Etil morfina	0,10
Oxicodona	0,05
Benzoilecgonina	0,20
Cocaína	0,05
Codeína-6-glicuronídeo	0,20
Etil morfina-6-glicuronídeo	0,20

2.7.2 Análise cromatográfica

A cromatografia líquida foi realizada no módulo Acquity UPLC (Waters Corp., Milford, MA, USA). A Acquity UPLC BEH C₁₈ (2,1 mm x 50 mm, 1,7 µm) foi utilizada como coluna, acoplada a pré-coluna Acquity UPLC BEH C₁₈ Vanguard (2,1 mm x 5 mm, 1,7 µm), ambas da Waters (Wexford, Irlanda), mantidas a 60°C. Tampão formato de amônio 5 mM (pH 10,2) foi utilizado como fase móvel A e metanol como fase móvel B em um fluxo constante de 0,4 mL/min, conforme gradiente mostrado na tabela 23. O tempo total da corrida foi de 7 minutos.

Tabela 23 - Tabela de gradiente de fase móvel utilizado na análise de opioides e cocaína por UPLC-MS/MS.

Tempo (min)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)
0,00	95,0	5,0
0,15	95,0	5,0
0,30	70,0	30,0
2,70	50,0	50,0
3,80	10,0	90,0
4,70	10,0	90,0
4,80	2,0	98,0
6,30	2,0	98,0
6,50	95,0	5,0

A solução de 5% de metanol em água Milli-Q foi utilizada como solvente de lavagem fraco e 90% de metanol em água Milli-Q como solvente de lavagem forte. A temperatura do amostrador automático foi mantida a 10°C.

O espectrômetro de massas acoplado à fonte de ionização por *electrospray* (ESI) Xevo TQ tandem (Waters. Milford, USA) foi utilizado em todas as análises. A detecção por ESI-MS/MS foi realizada utilizando o método de monitoramento de múltiplas reações (MRM) com ionização positiva. As transições monitoradas estão apresentadas na Tabela 24, em negrito estão as transições utilizadas para quantificação. Os compostos foram identificados comparando os tempos de retenção das transições das amostras com os valores correspondentes dos controles de qualidade.

Capítulo VI. Comparação das concentrações de drogas de abuso e medicamentos no humor vítreo e sangue periférico.

Tabela 24 - Lista de transições, voltagem do cone, energia de colisão e *dwell time* para análise de anfetamina por LC-MS/MS.

Analito	Tempo (min)	Transições MRM (m/z) (ES+)	Voltagem do cone (V)	Energia de colisão (eV)	<i>Dwell time</i> (s)
Morfina-3,6-glicuronídeo	0,5-1,5	462,18>268,13	45	25	0,02
		462,18>286,14	45	25	
Morfina-3,6-glicuronídeo-d ₆	0,5-1,5	465,19>271,15	45	25	0,02
		465,19>289,16	45	25	
Benzoilecgonina	0,8-1,8	290,14>150,09	25	25	0,02
		290,14>168,10	25	20	
Benzoilecgonina-d ₈	0,8-1,8	298,19>153,11	25	25	0,02
		298,19>171,12	25	20	
Morfina	1,1-2,1	286,14>185,10	40	25	0,02
		286,14>201,06	40	25	
		286,14>209,06	40	25	
Morfina-d ₆	1,1-2,1	292,18>201,06	40	25	0,02
		292,18>209,06	40	25	
Codeína-6-glicuronídeo	1,1-2,1	476,19>282,15	50	30	0,02
		476,19>300,16	50	30	
Etilmorfina-6-glicuronídeo	1,6-2,6	490,21>296,17	50	30	0,02
		490,21>315,18	50	30	
6-AM	1,8-2,75	328,15>193,07	40	30	0,02
		328,15>211,08	40	25	
		328,15>268,13	40	25	
6-AM-d ₆	1,8-2,75	334,19>211,08	40	25	0,02
		334,19>217,15	40	25	
Codeína	2,1-3,1	300,16>199,08	40	30	0,02
		300,16>215,07	40	25	
		300,16>225,09	40	25	
Codeína-d ₆	2,1-3,1	306,20>218,09	40	25	0,02
		306,20>228,11	40	25	
Oxicodona	2,5-3,5	316,15>241,09	25	30	0,02
		316,15>298,14	25	20	
Oxicodona-d ₆	2,5-3,5	322,19>247,12	25	30	0,02
		322,19>304,18	25	20	
Etilmorfina	2,75-3,7	314,18>229,20	40	25	0,02
		314,18>257,12	40	25	
Cocaína	3,1-4,3	304,15>150,09	30	25	0,02
		304,15>182,12	30	20	
Cocaína -d ₃	3,1-4,3	307,17>153,11	30	25	0,02
		307,17>185,14	30	20	

2.8 Análise de canabinoides

A análise de canabinoides, realizada por GC-MS conforme descrito por (Christophersen, 1986), foi utilizada para quantificar THC e canabidiol (CBD).

2.8.1 Preparação da amostra

Em tubos de vidro silanizados de 15 mL foram adicionados 0,5 mL da amostra, 0,09 μ M padrão interno (THC-D3) e 2 mL de hexano. Os tubos foram agitados em mesa agitadora por 10 min e, após centrifugação (10 min, 2500 rpm, 6°C), a fase orgânica foi transferida para tubos de vidro de 5 mL. O extrato foi evaporado até completa secura em fluxo de nitrogênio por aproximadamente 8 min e os tubos reconstituídos com 40 μ L de BSTFA: Acetonitrila (1:2, v/v). Os tubos foram tampados, agitados e colocados em banho seco a 60°C por 40 minutos para derivatização. A mistura foi evaporada em fluxo de nitrogênio, o resíduo dissolvido em 35 μ L de acetato de butila e transferido para os frascos de injeção. O limite de quantificação é de 0,002 μ Mol para os dois compostos.

2.8.2 Análise cromatográfica

A análise cromatográfica foi realizada por GC-MS utilizando o cromatógrafo gasoso 7890A acoplado com espectrômetro de massas 5975C Agilent Technologies e amostrador automático HP 7673 (Hewlett Packard, USA).

O injetor estava a 250°C e 2 μ L da amostra foi injetado em modo splitless. A separação foi alcançada na coluna CP-Sil 5 CB *low bleed* (12,5 m; 0,255 mm i.d; 0,4 μ m) da Varian com fluxo de hélio de 0,8 mL/min. O forno estava ajustado para iniciar em 120°C por 1 min e aumentar até 320°C em uma taxa de 30°C/min, permanecendo nessa temperatura por 3 min. Tempo total da corrida de 10,667 min.

A interface do GC-MS estava ajustada para trabalhar a uma temperatura de 280°C, o quadrupolo em 150°C e a fonte do MS em 230°C. As amostras foram adquiridas no método SIM. Os íons monitorados foram os seguintes: THC (**386**, 371,303), CBD (**390**, 337, 301) e THC-D3 (**389**, 374).

2.9 Análise de medicamentos

Para análise dos medicamentos foram incluídos os seguintes compostos: amitriptilina e seu metabólito nortriptilina, trimipramina, miaserina, mirtazapina, citalopram, paroxetina, sertralina, venlafaxina, levomepromazina, quetiapina,

cetobemidona, tramadol, alimemazina e metoprolol. As análises foram realizadas de acordo com o método descrito por (Amundsen *et al.*, 2013).

2.9.1 Preparação da amostra

Em tubos de plástico de 5 mL foram adicionados 100 µL da amostra, 50 µL de água Milli-Q, 50 µL da solução de padrão interno (citalopram-d₆, mianserina-d₃, nortriptilina-d₃, amitriptilina-d₃, setralina-d₃, trimipramina-d₃), 75 µL de tampão borato saturado (pH 11,0) e 1,2 mL de uma solução de acetato de etila: heptano (80:20, v/v). Os tubos foram colocados no vórtex por 1 min e posteriormente na mesa agitadora por 10 min e centrifugados a 4500 rpm por 10 min a 4°C. 750 µL da fase orgânica foi transferida para tubos de vidro de 5 mL e submetidos à completa evaporação do solvente em fluxo de nitrogênio. O resíduo foi reconstituído com 900 µL de uma solução 25:75 de acetonitrila: tampão de acetato de amônio 5 mM (pH 5,0) e 300 µL transferidos para o frasco de injeção. Os limites de quantificação estão apresentados na Tabela 25.

Tabela 25 - Limite de quantificação da análise de medicamentos por LC-MS/MS.

Analito	Limite de quantificação (µMol/mL)
Cetobemidona	0,05
Metoprolol	0,50
Mirtazapina	0,05
Quetiapina	0,10
Tramadol	0,20
Paroxetina	0,05
Citalopram	0,10
Venlafaxina	0,20
Mianserina	0,10
Nortriptilina	0,10
Amitriptilina	0,20
Sertralina	0,05
Levomepromazina	0,10
Alimemazina	0,05
Trimipramina	0,10

2.9.2 Análise cromatográfica

Para separação dos compostos foi utilizado o módulo Acquity UPLC (Waters Corp., Milford, MA, USA). A Acquity UPLC BEH C₁₈ (2,1 mm x 100 mm, 1,7 µm) foi utilizada como coluna, acoplada a pré-coluna Acquity UPLC BEH C₁₈ Vanguard (2,1 mm x 5 mm, 1,7 µm), ambas da Waters (Wexford, Irlanda). Tampão formato de amônio 5 mM (pH 10,2) foi utilizado como fase móvel A e acetonitrila como fase móvel B em um fluxo de 0,5 mL/min conforme gradiente mostrado na Tabela 26.

A temperatura da coluna foi mantida a 65°C e 3 µL da amostra foi injetado utilizando *loop* parcial. A solução de acetonitrila: água Milli-Q (10:90, v/v) foi utilizada como solvente de lavagem fraco e acetonitrila: metanol: propanol: água (25:25:25:25, v/v) como solvente de lavagem forte. A temperatura do amostrador automático foi mantida a 10°C. O ciclo total do método foi de 8 min.

Tabela 26 - Tabela de gradiente de fase móvel utilizado na análise de medicamentos por UPLC-MS/MS.

Tempo (min)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)
0,00	90	10
0,51	60	40
3,50	27	63
5,50	10	90
5,51	2	98
7,00	90	10
8,00	90	10

O Xevo TQ tandem espectrômetro de massas acoplado à fonte de ionização por *electrospray* (ESI) fornecido pela Waters (Milford, USA) foi utilizado em todas as análises. A detecção por ESI-MS/MS foi realizada utilizando o método de monitoramento de múltiplas reações (MRM) com ionização positiva. Para todos os compostos foram monitoradas duas transições e para os padrões internos uma, conforme mostrado na Tabela 27. Os compostos foram identificados comparando os tempos de retenção das transições das amostras com os valores correspondentes dos controles de qualidade.

Tabela 27 - Transições MRM, tempo de retenção e padrão interno dos medicamentos analisado por UPLC-MS/MS.

Analito	Tempo (min)	Transições MRM (m/z)	Voltagem do cone (V)	Energia de colisão (eV)	Dwell time (s)
Cetobemidona	1,00 - 2,00	248,1> 230,1	36	20	0,047
		248,2> 190,2		32	
Metoprolol	1,00 - 2,00	268,1> 133,0	32	26	0,047
		268,1> 191,0		18	
Mirtazapina	2,00 - 2,45	266,2> 209,0	26	20	0,047
		266,2> 195,1		24	
Quetiapina	2,00 - 2,45	384,0> 221,0	36	36	0,047
		384,0> 253,0		22	
Citalopram-d ₆	2,45 - 3,10	331,1> 262,0	34	20	0,017
Citalopram	2,45 - 3,10	325,1> 262,0	34	20	0,017
		325,1> 234,0		30	
Venlafaxina	2,45 - 3,10	278,2> 260,0	34	12	0,017
		278,2> 121,0		26	
Paroxetina	2,45 - 3,10	330,2 > 192,2	36	20	0,017
		330,2 > 151,0		22	
Tramadol	2,45 - 3,10	264,2> 58,0	20	14	0,017
		264,2> 246,2		12	
Miaserina-d ₃	3,10 - 3,50	268,2>208,2	36	20	0,03

Capítulo VI. Comparação das concentrações de drogas de abuso e medicamentos no humor vítreo e sangue periférico.

Miaserina	3,10 - 3,50	265,2> 208,2	36	20	0,03
		265,2> 70,1		20	
Nortriptilina-d ₃	3,10 - 3,50	267,1> 233,0	26	14	0,03
Nortriptilina	3,10 - 3,50	264,1> 233,0	26	14	0,03
		264,1> 191,0		22	
Alimemazina	3,90 - 4,25	299,2> 180,0	30	40	0,017
		299,2> 212,1		22	
Amitriptilina-d ₃	3,90 - 4,25	281,1> 233,0	36	16	0,017
Amitriptilina	3,90 - 4,25	278,1> 233,0	36	16	0,017
		278,1> 117,0		24	
Levomepromazina	3,90 - 4,25	329,1> 242,0	40	58	0,017
		329,1> 166,9		24	
Sertralina-d ₃	3,90 - 4,25	309,2> 275,0	18	12	0,017
Sertralina	3,90 - 4,25	306,2> 275,0	18	26	
		306,2> 159,0		12	0,017
Trimipramina-d ₃	4,25 - 4,50	298,2> 208,0	30	26	0,063
Trimipramina	4,25 - 4,50	295,2> 193,0	30	42	0,063
		295,2> 208,0		26	

2.9 .3 Validação Parcial

Para avaliar a *performance* do método em HV foi realizada a validação parcial do método, utilizando dois controles de qualidade, conforme a Tabela 28.

Tabela 28 - Concentrações dos controles de qualidade para análise de medicamentos por UPLC-MS/MS.

Analito	CQ baixo (µMol/mL)	CQ alto (µMol/mL)
Cetobemidona	0,05	3,00
Metoprolol	0,40	24,00
Mirtazapina	0,05	3,00
Quetiapina	0,10	6,00
Tramadol	0,20	12,00
Paroxetina	0,05	3,00
Citalopram	0,10	6,00
Venlafaxina	0,20	12,00
Mianserina	0,10	6,00
Nortriptilina	0,10	6,00
Amitriptilina	0,20	12,00
Sertralina	0,05	3,00
Levomepromazina	0,10	6,00
Alimemazina	0,05	3,00
Trimipramina	0,10	6,00

A precisão e exatidão foram determinadas analisando amostras em replicatas fortificadas com todos os analitos nas concentrações do CQ baixo e CQ alto. A precisão inter-ensaio foi realizada em três dias diferentes ($n_{\text{total}} = 15$). Precisão intra-ensaio foi calculada pela determinação de dez replicatas de um mesmo lote. Os dados foram avaliados calculando o desvio padrão relativo (DPR). A exatidão foi definida comparando as concentrações obtidas nas quinze corridas com o valor teórico, e expressas como porcentagem da concentração teórica.

A recuperação foi avaliada em cinco replicatas nos dois níveis de concentração. O cálculo foi realizado comparando a concentração obtida quando os compostos foram adicionados antes e depois da extração, mas antes da evaporação.

O efeito de matriz (ME) foi testado usando amostras brancas de cinco autopsias diferentes. Foram preparados dois lotes, o lote A era composto de cinco extratos de amostras brancas nos quais os analitos foram adicionados depois da extração. O lote

B consistia em cinco replicatas da solução de reconstituição fortificadas com os compostos de interesse. O padrão interno foi adicionado antes da evaporação.

O efeito matriz foi calculado dividindo as concentrações obtidas das amostras fortificadas após a extração (A) com as obtidas na solução de reconstituição (B): $ME = (A/B) \times 100\%$. Valores acima de 100% indicam aumento do sinal analítico e valores menores que 100% supressão do íon. O efeito matriz é aceitável entre 75 e 125%, quando utilizado o padrão interno deuterado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Validação parcial do método para quantificação de medicamentos

3.1.1 Efeito matriz

A matriz biológica pode conter substâncias exógenas ou endógenas, como proteínas, lipídios, carboidratos e sais. Esses compostos podem influenciar o processo de ionização, o que é chamado de efeito matriz.

O efeito matriz pode tanto aumentar quanto suprimir a resposta no espectrômetro de massas. A diminuição da resposta é devido à competição entre os componentes da matriz e o analito na ionização por *electrospray*. O que resulta em um menor grau de ionização e menor resposta.

O uso de padrão interno deuterado pode corrigir o efeito matriz. Isto porque a mudança na resposta afeta tanto o analito quanto o seu análogo deuterado virtualmente do mesmo jeito.

O efeito matriz foi menor que 20% para todas as drogas, exceto sertralina, levomepromazina, e alimemazina, as quais demonstraram aumento do sinal analítico, como mostrado na Tabela 29. O aumento na ionização ocorreu tanto no sangue periférico quanto no HV, mostrando que não houve diferença entre essas matrizes.

Tabela 29 - Valores de efeito matriz (%) obtidos no sangue periférico e no humor vítreo na análise de medicamentos por LC-MS/MS.

Analito	Sangue periférico		Humor vítreo	
	CQ Baixo	CQ Alto	CQ Baixo	CQ Alto
Cetobemidona	88,5	96,1	89,9	121,6
Metoprolol	83,4	103,5	83,9	138,1
Mirtazapina	100,1	102,7	105,0	112,3
Quetiapina	103,9	100,0	107,7	104,6
Tramadol	94,7	101,3	97,0	119,9
Paroxetina	109,6	95,8	114,9	87,1
Citalopram	97,3	101,5	100,7	101,4
Venlafaxina	94,0	104,4	93,3	120,5

Capítulo VI. Comparação das concentrações de drogas de abuso e medicamentos no humor vítreo e sangue periférico.

Mianserina	105,7	104,2	108,7	106,9
Nortriptilina	110,9	87,7	116,6	92,2
Amitriptilina	114,0	102,5	118,8	106,1
Sertralina	149,5	107,2	146,3	105,3
Levomepromazina	200,8	91,4	265,5	94,5
Alimemazina	160,1	91,0	206,7	90,5
Trimipramina	116,4	101,6	118,8	103,1

3.1.2 Recuperação

A tabela 30 mostra os resultados obtidos para o parâmetro de recuperação. A maioria dos resultados de recuperação variou entre 50 e 70%, com resultados similares nas duas matrizes. Estes valores são considerados aceitáveis, principalmente considerando que a extração é líquido-líquido, já que os valores de precisão e exatidão estão conforme as recomendações internacionais para validação de métodos ($\pm 15\%$).

Tabela 30 - Resultados de recuperação (%) obtidos no sangue periférico e humor vítreo na análise de medicamentos por LC-MS/MS.

Analito	Sangue periférico		Humor vítreo	
	CQ Baixo	CQ Alto	CQ Baixo	CQ Alto
Cetobemidona	60	69	56	96
Metoprolol	59	75	57	104
Mirtazapina	54	65	57	64
Quetiapina	48	65	49	62
Tramadol	59	69	59	84
Paroxetina	53	63	58	55
Citalopram	58	63	57	63
Venlafaxina	60	65	59	77
Mianserina	53	67	55	67
Nortriptilina	52	62	54	62
Amitriptilina	51	66	54	66
Sertralina	45	58	52	59
Levomepromazina	57	73	49	73

Capítulo VI. Comparação das concentrações de drogas de abuso e medicamentos no humor vítreo e sangue periférico.

Alimemazina	61	72	52	72
Trimipramina	48	67	53	67

3.1.3 Precisão e exatidão

As Tabelas 31, 32 e 33 apresentam os resultados de precisão intra e inter-ensaio e exatidão. Os valores de precisão e exatidão obtidos estão de acordo com os guias de validação internacionais.

Tabela 31 - Valores de precisão intra-ensaio (%) calculada para amostras de sangue periférico e humor vítreo.

Analito	Sangue periférico		Humor Vítreo	
	CQ Baixo	CQ Alto	CQ Baixo	CQ Alto
Cetobemidona	6,1	2,9	3,7	4,1
Metoprolol	6,2	5,2	6,1	8,7
Mirtazapina	4,8	6,9	4,3	5,5
Quetiapina	3,1	3,6	2,8	4,9
Tramadol	3,9	3,5	2,3	4,1
Paroxetina	7,2	6,7	5,3	5,5
Citalopram	3,9	1,9	3,6	3,3
Venlafaxina	4,3	4,9	2,9	5,2
Mianserina	2,6	2,9	2,0	2,0
Nortriptilina	2,1	2,0	2,3	2,3
Amitriptilina	3,4	3,0	2,2	2,0
Sertralina	2,9	1,5	6,1	3,6
Levomepromazina	14,2	11,8	9,8	3,7
Alimemazina	15,4	13,8	7,8	6,3
Trimipramina	2,5	2,8	2,1	4,5

Capítulo VI. Comparação das concentrações de drogas de abuso e medicamentos no humor vítreo e sangue periférico.

Tabela 32 - Resultados de precisão inter-ensaio (%) calculada para amostras de sangue periférico e humor vítreo.

Analito	Sangue periférico		Humor vítreo	
	CQ Baixo	CQ Alto	CQ Baixo	CQ Alto
Cetobemidona	6,5	10,3	5,6	8,5
Metoprolol	10,5	10,0	10,0	6,8
Mirtazapina	5,4	9,9	11,9	4,1
Quetiapina	3,1	8,3	10,9	3,6
Tramadol	8,4	8,7	3,7	3,5
Paroxetina	8,6	7,5	4,3	8,3
Citalopram	9,2	8,4	3,4	2,6
Venlafaxina	9,8	9,2	4,2	3,4
Mianserina	3,6	8,1	4,2	2,1
Nortriptilina	5,7	7,1	5,4	2,4
Amitriptilina	4,1	8,6	4,2	1,7
Sertralina	3,1	8,4	3,0	4,2
Levomepromazina	16,8	9,3	5,9	6,1
Alimemazina	13,0	8,0	7,5	5,6
Trimipramina	5,2	7,0	3,6	3,4

Tabela 33 - Valores de exatidão (% do valor teórico) calculada para amostras de sangue periférico e humor vítreo.

Analito	Sangue periférico		Humor vítreo	
	CQ Baixo	CQ Alto	CQ Baixo	CQ Alto
Cetobemidona	104	96	93	104
Metoprolol	89	70	81	74
Mirtazapina	107	105	112	97
Quetiapina	104	103	103	99
Tramadol	114	97	111	95
Paroxetina	125	118	129	110
Citalopram	105	81	105	80
Venlafaxina	111	83	110	83
Mianserina	99	94	104	91
Nortriptilina	100	90	104	87

Amitriptilina	91	86	93	83
Sertralina	111	107	115	102
Levomepromazina	91	120	112	110
Alimemazina	96	94	115	90
Trimipramina	98	89	101	83

3.2 Amostras de necropsia

Foram coletadas 50 amostras durante a necropsia, destas, 33 amostras foram positivas para algum dos analitos pesquisados. Em 17 casos houve a detecção de mais de uma das classes de drogas estudadas, conforme pode ser observado na Tabela 34.

Tabela 34 - Casos envolvendo as classes de drogas estudadas

Caso	Classe de drogas	Caso	Classe de drogas
1	Opioides, medicamentos	18	Opioides
2	Opioides, medicamentos	19	Opioides, medicamentos
3	Anfetaminas, opioides	20	Anfetaminas
4	Anfetaminas, canabinoides	21	Opioides, canabinoides
5	Anfetaminas	22	Opioides, medicamentos
6	Opioides	23	Anfetaminas, opioides
7	Canabinoides	24	Anfetaminas, opioides, canabinoides
8	Canabinoides	25	Medicamentos
9	Anfetaminas, opioides, canabinoides	26	Medicamentos
10	Medicamentos	27	Opioides, medicamentos
11	Canabinoides	28	Opioides
12	Anfetaminas, opioides, medicamentos	29	Medicamentos
13	Medicamentos	30	Anfetaminas, medicamentos
14	Opioides	31	Anfetaminas, medicamentos
15	Opioides, canabinoides	32	Medicamentos
16	Opioides	33	Medicamentos
17	Anfetaminas, opioides, medicamentos		

3.2.1 Anfetaminas

Onze amostras foram positivas para anfetaminas. Em dez casos foi detectada a anfetamina, destes, nove também foram positivos para metanfetamina. No caso 24 foi detectado no sangue o mCPP, uma droga sintética. Entretanto a análise não foi realizada no HV pelo volume insuficiente de amostra. As concentrações de cada matriz estão apresentadas na Tabela 35.

A média das concentrações de anfetamina e metanfetamina encontradas no sangue periférico foi menor do que no HV. Porém, o coeficiente de correlação de Pearson foi maior do que 0,99 para as duas substâncias. (Holmgren *et al.*, 2004) também encontraram concentrações de anfetamina maiores no HV do que no sangue, apesar desta diferença não ter sido significativa.

Em um estudo de redistribuição do MDMA em ratos, foi determinado um modelo farmacocinético bicompartimental. O equilíbrio entre o plasma e o HV foi obtido entre 30 e 120 minutos. A relação entre concentração no HV e no plasma em 30 minutos foi menor que 1. Já em 120 e 240 minutos esta relação foi maior que 1. Indicando uma pequena acumulação de MDMA no compartimento do HV após o equilíbrio. Ao analisar as concentrações *antemortem* e *postmortem* de MDMA no HV estes valores ficaram estáveis. Indicando que o HV pode ser representativo para valores *antemortem* (De Letter *et al.*, 2000)

Tabela 35 - Concentrações ($\mu\text{Mol/mL}$) de anfetamina e metanfetamina obtidas em amostras de sangue periférico e humor vítreo.

Caso	ANFETAMINA		METANFETAMINA	
	Sangue Periférico	Humor Vítreo	Sangue Periférico	Humor Vítreo
3	0,69	1,15	2,05	3,51
4	0,38	0,45	1,14	1,83
5	6,27	9,50	ND	ND
9	Positivo	Positivo	Positivo	0,28
12	1,81	2,59	7,78	11,21
17	Positivo	ND	0,49	Positivo
20	ND	Positivo	0,14	0,50

Capítulo VI. Comparação das concentrações de drogas de abuso e medicamentos no humor vítreo e sangue periférico.

23	0,06	0,10	0,16	0,31
30	2,11	2,92	21,27	32,39
31	0,32	0,48	0,23	0,35
N	7	7	8	8
Média	1,663	2,456	4,158	6,298
Desvio Padrão	2,176	3,292	7,373	11,17
				0,28 -
Intervalo	0,06 - 6,27	0,10 - 9,50	0,14 - 21,27	32,39
Razão HV/ Sangue periférico		1,477		1,515
Coeficiente de correlação de Pearson		0,9992		0,9997

Positivo: Abaixo do limite de quantificação; ND: Não detectado; NR: Não realizado.

Figura 28 - Análise de regressão linear da concentração de anfetamina (A) e metanfetamina (B) no humor vítreo e sangue periférico.

3.2.2 Opioides e cocaína

Os opioides foram as substâncias mais analisadas neste trabalho, 18 amostras foram positivas para pelo menos um opioide. As Tabelas 37 a 41 resumem os resultados obtidos.

Na amostra 22 foi detectado etilmorfina e etilmorfina-6-glicuronídeo nas duas matrizes, contudo as concentrações foram menores do que o limite de quantificação. Em três casos houve o consumo e detecção de oxicodona. Em somente uma amostra (amostra 24) foi possível detectar cocaína e benzoilecgonina.

A relação codeína/morfina (COD/MOR) menor que 1 indica o consumo de heroína, por outro lado, quando a relação é maior que 1, há o indício de consumo de

codeína (Lin *et al.*, 1997). A Tabela 36 mostra as relações entre as concentrações de codeína e morfina para todos os casos quantificados para as duas substâncias.

Tabela 36 - Relação entre as concentrações ($\mu\text{Mol/mL}$) de codeína e morfina para determinação do uso de heroína.

Caso	COD/MOR Sangue periférico	COD/MOR Humor vítreo	6-AM (HV)
3	0,11 (<1)	0,33 (<1)	0,06
9	0,07 (<1)	0,15 (<1)	0,18
13	0,09 (<1)	0,54 (<1)	0,13
17	0,50 (<1)	1,88 (HV >1)	ND
18	ND	0,35 (<1)	0,01
21	ND	0,26 (<1)	0,02
22	11,10 (>1)	27,31 (>1)	ND
23	0,09 (<1)	0,29 (<1)	0,15
24	0,06 (<1)	NR	NR

COD/MOR: relação entre a concentração de codeína e morfina; 6-AM (HV): concentração de 6-acetilmorfina no humor vítreo; ND: não detectado; NR: não realizado.

Na maioria dos casos COD/MOR foi menor que 1, indicando o uso de heroína. Nesses casos também houve a detecção de 6-AM no HV, desta forma não há dúvida sobre o consumo de heroína. No caso 22, a relação COD/MOR foi maior que 1 no sangue e no humor vítreo e 6-AM não foi identificado, podendo afirmar que houve consumo de codeína.

No caso 17 a relação COD/MOR só foi maior que 1 no HV foi e não houve detecção de 6-AM. Analisando somente a concentração no sangue, este caso seria determinado como uso de heroína. Porém os resultados obtidos no humor vítreo mostram um resultado diferente, no qual não foi detectado 6-AM. Mostrando a importância do HV para análise toxicológica forense.

Capítulo VI. Comparação das concentrações de drogas de abuso e medicamentos no humor vítreo e sangue periférico.

Tabela 37 - Concentrações ($\mu\text{Mol/mL}$) de morfina e 6-acetilmorfina obtidas no sangue periférico e humor vítreo.

Caso	MORFINA		6-ACETILMORFINA	
	Sangue Periférico	Humor Vítreo	Sangue Periférico	Humor Vítreo
1	0,080	0,110	ND	Positivo
2	0,031	0,064	ND	Positivo
3	0,420	0,320	Positivo	0,063
6	0,460	0,155		
9	0,870	0,240	Positivo	0,176
12	0,235	0,205		
13	0,738	0,129	0,027	0,129
15	3,673	0,626		
17	0,321	0,164		
18	0,071	0,040	0,001	0,010
21	0,034	0,107	ND	0,016
22	0,157	0,186		
23	0,873	0,361	ND	0,153
24	1,650	NR	0,076	NR
N	14	13	3	6
Média	0,6866	0,2082	0,03467	0,09117
Desvio				
Padrão	0,9712	0,1560	0,03808	0,07139
	0,031 -			0,010 -
Mínimo	3,673	0,040 - 0,626	0,001 - 0,076	0,176
Razão HV/ Sangue				
periférico		0,303		2,630
Coeficiente de				
correlação de Pearson		0,8897		

Positivo: Abaixo do limite de quantificação; ND: Não detectado; NR: Não realizado.

Capítulo VI. Comparação das concentrações de drogas de abuso e medicamentos no humor vítreo e sangue periférico.

Figura 29 - Análise de regressão linear da concentração de morfina (A) e codeína (B) no humor vítreo e sangue periférico.

Tabela 38 – Concentrações ($\mu\text{Mol/mL}$) de morfina-3-glicuronídeo e morfina-6-glicuronídeo obtidas no sangue periférico e humor vítreo.

Caso	MORFINA-3-GLICURONÍDEO		MORFINA-6-GLICURONÍDEO	
	Sangue Periférico	Humor Vítreo	Sangue Periférico	Humor Vítreo
1	0,186	0,114	Positivo	Positivo
2	0,053	Positivo	ND	ND
3	0,428	0,727	0,090	0,150
6	0,141	0,293	Positivo	0,057
9	0,099	Positivo	Positivo	ND
12	2,016	1,560	0,431	0,339
13	0,350	0,320	Positivo	Positivo
15	12,410	3,931	6,319	0,701
17	0,616	0,305	0,055	0,051
18	0,259	Positivo	0,058	0,006
21	0,079	0,144	Positivo	Positivo
22	0,310	0,178	0,086	0,051
23	0,406	0,300	Positivo	Positivo
24	2,717	NR	0,448	NR
N	14	10	7	7
Média	1,434	0,7872	1,070	0,194

Capítulo VI. Comparação das concentrações de drogas de abuso e medicamentos no humor vítreo e sangue periférico.

Desvio Padrão	3,255	1,186	2,321	0,250
Intervalo	0,053 - 12,410	0,114 - 3,931	0,055 - 6,319	0,006 - 0,701
Razão HV/ Sangue periférico		0,549		0,181
Coeficiente de correlação de Pearson		0,9713		0,9160

Positivo: Abaixo do limite de quantificação; ND: Não detectado; NR: Não realizado.

Figura 30 - Análise de regressão linear da concentração de morfina-3-glicuronídeo (A) e morfina-6-glicuronídeo (B) no humor vítreo e sangue periférico.

Tabela 39 - Concentrações ($\mu\text{Mol/mL}$) de codeína e codeína-6-glicuronídeo obtidas no sangue periférico e humor vítreo.

Caso	CODEÍNA		CODEÍNA-6-GLICURONÍDEO	
	Sangue Periférico	Humor Vítreo	Sangue Periférico	Humor Vítreo
1	ND	Positivo	Positivo	Positivo
2	ND	Positivo	Positivo	Positivo
3	0,046	0,104	Positivo	Positivo
9	0,060	0,036	Positivo	ND
12			Positivo	Positivo

Capítulo VI. Comparação das concentrações de drogas de abuso e medicamentos no humor vítreo e sangue periférico.

13	0,066	0,070		
15	ND	Positivo		
17	0,159	0,308	Positivo	Positivo
18	ND	0,014	Positivo	Positivo
19	0,643	0,580	Positivo	Positivo
21	ND	0,028		
22	1,743	5,079	1,722	1,195
23	0,079	0,103		
24	0,106	NR	Positivo	NR
N	8	9		
Média	0,3628	0,7024		
Desvio Padrão	0,5918	1,651		
Intervalo	0,046 - 1,743	0,014 - 5,079		
Razão HV/ Sangue periférico		1,936		
Coefficiente de correlação de Pearson		0,9694		

Positivo: Abaixo do limite de quantificação; ND: Não detectado; NR: Não realizado.

Tabela 40 – Concentração ($\mu\text{Mol/mL}$) de oxicodona no sangue periférico e humor vítreo.

Caso	Sangue Periférico	Humor Vítreo
16	0,695	0,865
27	0,056	0,419
28	0,131	0,087

Positivo: Abaixo do limite de quantificação; ND: Não detectado; NR: Não realizado.

As concentrações de morfina no HV foram menores do que no sangue periférico, enquanto as concentrações de codeína foram maiores. Provavelmente, a concentração de codeína no HV é maior pela falta de enzimas que metabolizam codeína em morfina. Em ambos os compostos, houve boa correlação entre HV e sangue ($r_{\text{morfina}} = 0,8897$, $r_{\text{codeína}} = 0,96$).

Antonides, Kiely e Marinetti (2007) relatam a análise de oxicodona, morfina, codeína, 6-AM e hidrocodona no HV; e tentam fazer uma correlação com as concentrações no sangue. As concentrações de oxicodona, hidrocodona e 6-AM foram maiores no HV e as concentrações de morfina e codeína variaram bastante. As concentrações maiores no HV podem sugerir que a janela de detecção para esses compostos seja maior nesta matriz.

A concentração no HV depende do tempo entre a ingestão da substância e a morte. As concentrações tendem a serem menores do que no sangue se não tiver ocorrido o equilíbrio. O tempo para atingir o equilíbrio depende principalmente da ligação com proteínas, a lipofilicidade e hidrofiliabilidade do composto (Scott e Oliver, 2001; Holmgren *et al.*, 2004).

3.2.2.8 Cocaína e benzoilecgonina

A concentração de cocaína costuma ser maior no HV do que no sangue. Por outro lado, a concentração de benzoilecgonina costuma ser maior no sangue (Antonides, Kiely e Marinetti, 2007).

A análise de regressão linear realizada por Mackey-Bojack, Kloss e Apple (2000) mostrou uma relação linear entre a cocaína ($r = 0,854$) e benzoilecgonina ($r = 0,763$) no sangue e no HV, esta correlação foi pequena para o cocaetileno ($r = 0,433$). Devido ao pequeno número de casos de cocaína neste trabalho não foi possível fazer qualquer relação.

Em 20 casos, as concentrações de cocaína foram analisadas em sangue, bile e HV por radioimunoensaio. Houve uma boa correlação entre sangue e HV ($r = 0,71$). A razão entre as concentrações foi de 1,03 (Fernández *et al.*, 2006). (Duer, Spitz e Mcfarland, 2006; Fernández *et al.*, 2006) também encontraram uma forte correlação entre o sangue periférico e HV ($r = 0,9387$), e sangue cardíaco e HV ($r = 0,8825$),

apesar de menor. Esta alta correlação pode indicar que a cocaína e seus metabólitos são distribuídos rapidamente entre o sangue periférico, sangue cardíaco e HV. Em 8 minutos após a administração ou 3 minutos após a morte, as concentrações de cocaína no HV e sangue periférico foram comparáveis em estudos com porcos (Mckinney *et al.*, 1995).

Tabela 41 – Concentrações ($\mu\text{Mol/mL}$) de benzoilecgonina e cocaína no caso 24.

Analito	Sangue	Humor
	Periférico	Vítreo
Benzoilecgonina	4,025	NR
Cocaína	0,1311	NR

Positivo: Abaixo do limite de quantificação; ND: Não detectado; NR: Não realizado.

3.2.3 Canabinoides

Oito amostras foram positivas para THC e CBD. Os resultados estão apresentados na tabela 42

Não foi detectado THC ou CBD no HV. Devido à alta polaridade e alta ligação às proteínas plasmáticas esses compostos não são difundidos para o HV. Resultados similares foram descritos por outros autores (Lin e Lin, 2005; Jenkins e Oblock, 2008; Peres *et al.*, 2014).

Tabela 42 - Concentrações ($\mu\text{Mol/mL}$) de THC e CBD obtidas em amostras de sangue periférico e humor vítreo.

Caso	Δ^9 -tetrahydrocannabinol		Canabidiol	
	Sangue Periférico	Humor Vítreo	Sangue Periférico	Humor Vítreo
4	Positivo	ND	Positivo	ND
7	0,0426	ND	Positivo	ND
8	0,0026	ND	Positivo	ND
9	0,0240	ND	0,0090	ND
11	0,0510	ND	0,0160	ND
15	0,0204	ND	0,0041	ND

Capítulo VI. Comparação das concentrações de drogas de abuso e medicamentos no humor vítreo e sangue periférico.

21	0,0304	ND	0,0100	ND
24	0,0079	NR	0,0090	NR
N	7	0	5	0
Média	0,02556	—	0,00962	—
Desvio Padrão	0,01746	—	0,00425	—
Intervalo	0,0026 - 0,0510	—	0,0041 - 0,0160	—

Positivo: Abaixo do limite de quantificação; ND: Não detectado; NR: Não realizado.

3.2.4 Medicamentos

Miaserina foi detectada nas duas matrizes da amostra 25, porém a concentração foi abaixo do limite de quantificação. Não houve nenhum caso positivo de cetobemidona e paroxetina. No caso 29 foi detectado trimipramina no sangue periférico, porém não foi realizada análise de HV.

As concentrações de amitriptilina e nortriptilina no HV foram menores do que no sangue periférico, de forma que em alguns casos não foi possível sua detecção. O coeficiente de correlação entre as matrizes para as duas substâncias não pode ser calculado.

No estudo de (Holmgren *et al.*, 2004) as concentrações de tramadol foram maiores no HV do que no sangue, apesar desta diferença não ter sido significativa. Por outro lado, as concentrações de alimemazina, amitriptilina, nortriptilina, citalopram, cetobemidona, miaserina, mirtazapina e venlafaxina foram menores.

Tabela 43 - Concentrações ($\mu\text{Mol/mL}$) de nortriptilina e amitriptilina obtidas no sangue periférico e humor vítreo.

Caso	NORTRIPTILINA		AMITRIPTILINA	
	Sangue Periférico	Humor Vítreo	Sangue Periférico	Humor Vítreo
1	Positivo	ND	Positivo	Positivo
17	0,94	Positivo	0,57	ND

Capítulo VI. Comparação das concentrações de drogas de abuso e medicamentos no humor vítreo e sangue periférico.

19	0,95	0,12	5,74	0,54
27	0,46	Positivo	1,23	Positivo
31	2,34	0,62	4,33	1,24
N	4	2	4	2
Média	1,173	0,370	2,968	0,890
Desvio				
Padrão	0,811	0,354	2,470	0,495
Intervalo	0,460 - 2,340	0,120 - 0,620	0,570 - 5,740	0,540 - 1,240
Razão HV/ Sangue periférico		0,315		0,300

Positivo: Abaixo do limite de quantificação; ND: Não detectado; NR: Não realizado.

Tabela 44 - Concentrações ($\mu\text{Mol/mL}$) de metoprolol, tramadol e venlafaxina obtidas no sangue periférico e humor vítreo.

Caso	METOPROLOL		TRAMADOL		VENLAFAXINA	
	Sangue Periférico	Humor Vítreo	Sangue Periférico	Humor Vítreo	Sangue Periférico	Humor Vítreo
10	0,76	1,20			15,83	14,54
13			6,73	6,18		
19					21,64	9,22
25	9,26	Positivo				
26			5,86	4,63		
31			0,15	0,27		

Positivo: Abaixo do limite de quantificação; ND: Não detectado; NR: Não realizado.

Tabela 45 - Concentrações ($\mu\text{Mol/mL}$) de mirtazapina, quetiapina e citalopram obtidas no sangue periférico e humor vítreo.

Caso	MIRTAZAPINA		QUETIAPINA		CITALOPRAM	
	Sangue Periférico	Humor Vítreo	Sangue Periférico	Humor Vítreo	Sangue Periférico	Humor Vítreo
2			0,25	Positivo		
19					1,89	0,78
22	1,07	0,53	1,07	0,53		
27	0,58	0,15	0,58	0,15	0,83	0,61
32					0,77	0,65

Positivo: Abaixo do limite de quantificação; ND: Não detectado; NR: Não realizado.

Tabela 46 - Concentrações ($\mu\text{Mol/mL}$) de setralina, levomepromazina e alimemazina obtidas no sangue periférico e humor vítreo

Caso	SERTRALINA		LEVOMEPRMAZINA		ALIMEMAZINA	
	Sangue Periférico	Humor Vítreo	Sangue Periférico	Humor Vítreo	Sangue Periférico	Humor Vítreo
2					0,65	0,05
10					0,16	Positivo
13	0,69	Positivo	0,41	Positivo		
14					Positivo	ND
30					0,11	Positivo
33	5,19	0,07				

CAPÍTULO VII

Conclusões

Pela primeira vez foi descrito um método de GC-MS que quantifica simultaneamente em HV as principais drogas recreacionais. A metodologia desenvolvida mostrou ser eficiente e sensível para identificação e quantificação de dezesseis analitos em uma única corrida cromatográfica.

A análise de amostras coletadas no DML mostrou que os métodos utilizados são sensíveis o bastante para determinar todas as drogas normalmente encontradas no HV.

O uso de álcool continua sendo um grande problema em relação aos acidentes de trânsito. Porém, também é alta a prevalência de cocaína nas amostras dos motoristas. Provavelmente, se fosse possível quantificar os componentes da maconha no HV, a porcentagem de vítimas fatais de acidente de trânsito que utilizaram alguma substância psicoativa seria maior.

Os resultados apresentados mostram alta prevalência de substâncias psicoativas, especialmente cocaína, em vítimas de homicídio. E mais pronunciadamente entre jovens. Estes dados questionam a habilidade do Estado de controlar o crime e aumentar a demanda de segurança pública da população. Especialmente, se considerarmos a alta probabilidade destes casos estarem relacionados com o tráfico e uso de drogas.

A validação parcial dos fármacos básicos mostrou resultados similares para o HV comparando com o sangue femoral. Desta forma a quantificação pode ser feita utilizando curvas de calibração com sangue periférico.

Foi possível mostrar algumas tendências para interpretação das concentrações de anfetaminas e metanfetaminas e re-afirmar a importância do HV na análise de casos envolvendo opioides. Contudo, mais estudos são necessários. Também será necessário considerar o intervalo *postmortem* para melhor conclusão dos dados.

REFERÊNCIAS

ADAMS, I. B.; MARTIN, B. R. Cannabis: Pharmacology and toxicology in animals and humans. **Addiction**, v. 91, n. 11, p. 1585-1614, Nov 1996. ISSN 0965-2140. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1996VU38900002 >.

ALVES, M. N. R. **Desenvolvimento e validação de metodologia para a análise de cocaína, derivados e metabólitos em amostras de meconio, utilizando a cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas**. 2010. 76 (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

AMUNDSEN, I. et al. Quantitative determination of fifteen basic pharmaceuticals in ante- and post-mortem whole blood by high pH mobile phase reversed phase ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 927, p. 112-123, May 2013. ISSN 1570-0232. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000318668000010 >.

ANTONIDES, H. M.; KIELY, E. R.; MARINETTI, L. J. Vitreous fluid quantification of opiates, cocaine, and benzoylecgonine: Comparison of calibration curves in both blood and vitreous matrices with corresponding concentrations in blood. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 31, n. 8, p. 469-476, Oct 2007. ISSN 0146-4760. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000250318600007 >.

ASHTON, C. H. Pharmacology and effects of cannabis: a brief review. **British Journal of Psychiatry**, v. 178, p. 101-106, Feb 2001. ISSN 0007-1250. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000166887500003 >.

BARNETT, G.; HAWKS, R.; RESNICK, R. COCAINE PHARMACOKINETICS IN HUMANS. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 3, n. 2-3, p. 353-366, 1981 1981. ISSN 0378-8741. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1981LN67700015 >.

BARROSO, M. et al. Bioanalytical procedures and recent developments in the determination of opiates/opioids in human biological samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 400, n. 6, p. 1665-1690, Jun 2011. ISSN 1618-2642. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000290570200019 >.

BAZZARELLA, R. B. **Desenvolvimento de metodologia analítica para a investigação de anfetaminas em amostras de saliva, empregando cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas**. 2010. (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

BENOWITZ, N. L. CLINICAL-PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY OF COCAINE. **Pharmacology & Toxicology**, v. 72, n. 1, p. 3-12, Jan 1993. ISSN 0901-9928. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1993KN49700001 >.

BERG, T. et al. Determination of opiates and cocaine in urine by high pH mobile phase reversed phase UPLC-MS/MS. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 877, n. 4, p. 421-432, Feb 2009. ISSN 1570-0232. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000263190900010 >.

BEVALOT, F. et al. Interpretation of drug concentrations in an alternative matrix: the case of meprobamate in vitreous humor. **International Journal of Legal Medicine**, v. 125, n. 3, p. 463-468, May 2011. ISSN 0937-9827. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000289615500019 >.

BISHOP, P. N. Structural macromolecules and supramolecular organisation of the vitreous gel. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 19, n. 3, p. 323-344, May 2000. ISSN 1350-9462. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000085964500004 >.

BOLES, S. M.; MIOTTO, K. Substance abuse and violence - A review of the literature. **Aggression and Violent Behavior**, v. 8, n. 2, p. 155-174, Mar-Apr 2003. ISSN 1359-1789. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000181803600003 >.

BORTOLOTTI, F. et al. Toxicokinetics of Cocaine and Metabolites: The Forensic Toxicological Approach. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 33, p. 5658-5663, Nov 2012. ISSN 0929-8673. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000311152700009 >.

BOS, K. J. et al. Collagen fibril organisation in mammalian vitreous by freeze etch/rotary shadowing electron microscopy. **Micron**, v. 32, n. 3, p. 301-306, Apr 2001. ISSN 0968-4328. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000165247000008 >.

BRASIL. **Lei nº 12.760 de 20 de dezembro de 2012.**

_____. **Lei nº 11705, de 19 de junho de 2008.**

BRASIL, P. D. R. S. N. D. P. S. D. **I Levantamento Nacional sobre o Uso de Álcool, Tabaco e Outras Drogas entre Universitários das 27 Capitais Brasileiras.** Brasília, p.284. 2010

BRUNET, B. et al. Postmortem redistribution of THC in the pig. **International Journal of Legal Medicine**, v. 124, n. 6, p. 543-549, Nov 2010. ISSN 0937-9827. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000282826800004 >.

BRUNET, B.; MURA, P. L'humeur vitrée en toxicologie médico-légale: revue de la littérature et applications **Annales de Toxicologie Analytique**, v. 24, n. 1, p. 6, 2012.

CAPLAN, Y. H.; LEVINE, B. VITREOUS-HUMOR IN THE EVALUATION OF POSTMORTEM BLOOD ETHANOL CONCENTRATIONS. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 14, n. 5, p. 305-307, Sep-Oct 1990. ISSN 0146-4760. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1990DY61300011 >.

CARLINI, E. **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. , 2010.

CARLINI, E. A. **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, 2006.

CHAO, T. C.; LO, D. S. Relationship between postmortem blood and vitreous humor ethanol levels. **Am J Forensic Med Pathol**, v. 14, n. 4, p. 303-8, Dec 1993. ISSN 0195-7910. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8116588> >.

CHASIN, A.; SALVADORI, M. Estimulante do Sistema Nervoso Central. In: OGA, S. (Ed.). **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Ateneu, 1996.

CHRISTOPHERSEN, A. S. TETRAHYDROCANNABINOL STABILITY IN WHOLE-BLOOD - PLASTIC VERSUS GLASS CONTAINERS. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 10, n. 4, p. 129-131, Jul-Aug 1986. ISSN 0146-4760. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1986D211000001 >.

CHRONISTER, C. W.; GUND, A. L.; GOLDBERGER, B. A. Rapid detection of opioids in vitreous humor by enzyme immunoassay. **J Anal Toxicol**, v. 32, n. 8, p. 601-4, Oct 2008. ISSN 0146-4760. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19007509> >.

CHRONISTER, C. W.; WALRATH, J. C.; GOLDBERGER, B. A. Rapid detection of benzoylecgonine in vitreous humor by enzyme immunoassay. **J Anal Toxicol**, v. 25, n. 7, p. 621-4, Oct 2001. ISSN 0146-4760. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11599611> >.

CLARK, T. **Prevalence of drugs and alcohol in autopsied homicide cases in St. John Parish, Louisiana.**: The Journal of the Louisiana State Medical Society. 148: 257-259 p. 1996.

CLAUWAERT, K. M. et al. Determination of the designer drugs 3, 4-methylenedioxymethamphetamine, 3,4-methylenedioxyethylamphetamine, and 3,4-methylenedioxyamphetamine with HPLC and fluorescence detection in whole blood, serum, vitreous humor, and urine. **Clin Chem**, v. 46, n. 12, p. 1968-77, Dec 2000. ISSN 0009-9147. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11106329> >.

CONE, E. J. PHARMACOKINETICS AND PHARMACODYNAMICS OF COCAINE. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 19, n. 6, p. 459-478, Oct 1995. ISSN 0146-4760. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1995RX54800016 >.

COSTA, J. L. Características das amostras convencionais e não-convencionais. In: MOREAU, R. L. D. M. e SIQUEIRA, M. E. P. B. (Ed.). **Toxicologia Analítica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p.40-45.

COSTA, J. L. et al. Development of a method for the analysis of drugs of abuse in vitreous humor by capillary electrophoresis with diode array detection (CE-DAD). **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 945,

Referências

p. 84-91, Jan 15 2014. ISSN 1570-0232; 1873-376X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000330147700012 >.

COX, D. et al. Distribution of phencyclidine into vitreous humor. **J Anal Toxicol**, v. 31, n. 8, p. 537-9, Oct 2007. ISSN 0146-4760. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17988470> >.

CRIME, U. N. O. O. D. A. **Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens**. SECTION, L. A. S.: UNITED NATIONS PUBLICATIONS 2009.

DARKE, S.; DUFLOU, J.; TOROK, M. Drugs and violent death: comparative toxicology of homicide and non-substance toxicity suicide victims. **Addiction**, v. 104, n. 6, p. 1000-5, Jun 2009. ISSN 1360-0443. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19466923> >.

DE LETTER, E. A. et al. Interpretation of a 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) blood level: discussion by means of a distribution study in two fatalities. **Forensic Science International**, v. 141, n. 2-3, p. 85-90, May 10 2004. ISSN 0379-0738. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000220891300003 >.

_____. Post-mortem redistribution of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy") in the rabbit Part I - experimental approach after in vivo intravenous infusion. **International Journal of Legal Medicine**, v. 116, n. 4, p. 216-224, Aug 2002. ISSN 0937-9827. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000177709300004 >.

_____. Is vitreous humour useful for the interpretation of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) blood levels? Experimental approach with rabbits. **International Journal of Legal Medicine**, v. 114, n. 1-2, p. 29-35, Dec 2000. ISSN 0937-9827. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000166055400006 >.

_____. Post-Mortem (Re)Distribution of 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "Ecstasy"): Human and Animal Data. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 11, n. 5, p. 453-459, Aug 2010. ISSN 1389-2010. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000280473800006 >.

DE MARTINIS, B. S. Sweat as an Alternative Matrix for Amphetamines and Methylenedioxy Derivatives Analysis. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 4, n. 4, p. 274-278, Nov 2008. ISSN 1573-4129. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000261893400008 >.

DE MARTINIS, B. S. et al. Alcohol distribution in post-mortem fluids. **Human & Experimental Toxicology**, v. 25, n. 11, p. 625-626, Nov 2006. ISSN 0960-3271. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000243012000002 >.

_____. Amostras biológicas alternativas para análises toxicológicas. In: BRUNI, A. T.; VELHO, J. A., et al (Ed.). **Fundamentos de química forense - Uma análise prática da química que soluciona crimes**. Campinas: Millenium editora, 2012. p.306-316.

DE OLIVEIRA, G. H.; CAMARGO, M. M. D. A. **Opiáceos e Opióides**. In: OGA, S.; CAMARGO, M. M. D. A., *et al* (Ed.). **Fundamentos de Toxicologia**. 3ª edição. São Paulo: Ateneu Editora, 1996. p.243-253.

DE PAULA, D. et al. **Alcoolemia nas vítimas fatais de atropelamento do estado do Espírito Santo, Brasil**. V Encontro Regional de Toxicologia Forense da América Latina TIAFT. Porto Alegre 2009.

DICHIARA, G.; NORTH, R. A. NEUROBIOLOGY OF OPIATE ABUSE. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 13, n. 5, p. 185-193, May 1992. ISSN 0165-6147. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1992HT39300005 >.

DINIS-OLIVEIRA, R. J. et al. Collection of biological samples in forensic toxicology. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 20, n. 7, p. 363-414, Sep 2010. ISSN 1537-6516. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000282061300002 >.

DRUID, H. **Post-Mortem Toxicology**. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 2006.

DRUID, H.; HOLMGREN, P. Compilations of therapeutic, toxic, and fatal concentrations of drugs. **Journal of Toxicology-Clinical Toxicology**, v. 36, n. 1-2, p. 133-134, 1998 1998. ISSN 0731-3810. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000072850200029 >.

DRUMMER, O. H. Chromatographic screening techniques in systematic toxicological analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 733, n. 1-2, p. 27-45, Oct 15 1999. ISSN 0378-4347. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000083471200003 >.

_____. Review: Pharmacokinetics of illicit drugs in oral fluid. **Forensic Science International**, v. 150, n. 2-3, p. 133-142, Jun 10 2005. ISSN 0379-0738. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000230124200003 >.

_____. Introduction and review of collection techniques and applications of drug testing of oral fluid. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 30, n. 2, p. 203-206, Apr 2008. ISSN 0163-4356. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000254901500011 >.

DRUMMER, O. H.; GEROSTAMOULOS, J. Postmortem drug analysis: Analytical and toxicological aspects. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 24, n. 2, p. 199-209, Apr 2002. ISSN 0163-4356. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000174510500002 >.

DRUMMER, O. H. et al. The involvement of drugs in drivers of motor vehicles killed in Australian road traffic crashes. **Accident Analysis and Prevention**, v. 36, n. 2, p. 239-248, Mar 2004. ISSN 0001-4575. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000188824200010 >.

DUBOWSKI, K. M. ALCOHOL DETERMINATION IN THE CLINICAL LABORATORY. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 74, n. 5, p. 747-750, 1980 1980. ISSN 0002-9173. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1980KR49100034 >.

DUER, W. C.; SPITZ, D. J.; MCFARLAND, S. Relationships between concentrations of cocaine and its hydrolysates in peripheral blood, heart blood, vitreous humor and urine. **J Forensic Sci**, v. 51, n. 2, p. 421-5, Mar 2006. ISSN 0022-1198. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16566784> >.

FAVRETTO, D. et al. LC-ESI-MS/MS on an ion trap for the determination of LSD, iso-LSD, nor-LSD and 2-oxo-3-hydroxy-LSD in blood, urine and vitreous humor. **Int J Legal Med**, v. 121, n. 4, p. 259-65, Jul 2007. ISSN 0937-9827. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16496170> >.

FERNANDEZ, P. et al. A COMPARATIVE PHARMACOKINETIC STUDY OF ETHANOL IN THE BLOOD, VITREOUS-HUMOR AND AQUEOUS-HUMOR OF RABBITS. **Forensic Science International**, v. 41, n. 1-2, p. 61-65, Apr-May 1989. ISSN 0379-0738. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1989AC05600008 >.

FERNÁNDEZ, P. et al. GC-FID determination of cocaine and its metabolites in human bile and vitreous humor. **J Appl Toxicol**, v. 26, n. 3, p. 253-7, 2006 May-Jun 2006. ISSN 0260-437X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16389661> >.

_____. A rapid analytical method based on microwave-assisted extraction for the determination of drugs of abuse in vitreous humor. **Anal Bioanal Chem**, v. 401, n. 7, p. 2177-86, Oct 2011. ISSN 1618-2650. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21822971> >.

_____. Chromatographic determination of drugs of abuse in vitreous humor using solid-phase extraction. **J Appl Toxicol**, Feb 2012. ISSN 1099-1263. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22337121> >.

FLECKENSTEIN, A. E. et al. New insights into the mechanism of action of amphetamines. In: (Ed.). **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. Palo Alto: Annual Reviews, v.47, 2007. p.681-698. (Annual Review of Pharmacology and Toxicology). ISBN 0362-1642

978-0-8243-0446-1.

FRANKE, J. P.; DE ZEEUW, R. A. Solid-phase extraction procedures in systematic toxicological analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 713, n. 1, p. 51-59, Aug 21 1998. ISSN 0378-4347. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000075144600004 >.

FUCCI, N. et al. An evaluation of the Cozart RapiScan system as an on-site screening tool for drugs of abuse in a non-conventional biological matrix: vitreous humor. **Forensic Sci Int**, v. 156, n. 2-3, p. 102-5, Jan 2006. ISSN 0379-0738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16410159> >.

GALLARDO, E.; QUEIROZ, J. A. The role of alternative specimens in toxicological analysis. **Biomedical Chromatography**, v. 22, n. 8, p. 795-821, Aug 2008. ISSN 0269-3879. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000258541700001 >.

GAONI, Y.; MECHOULAM, R. ISOLATION, STRUCTURE, AND PARTIAL SYNTHESIS OF AN ACTIVE CONSTITUENT OF HASHISH. **Journal of the American Chemical Society**, v. 86, n. 8, p. 1646-+, 1964 1964. ISSN 0002-7863. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A19643141B00015 >.

GELSE, K.; POSCHL, E.; AIGNER, T. Collagens - structure, function, and biosynthesis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 12, p. 1531-1546, Nov 28 2003. ISSN 0169-409X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000186813500002 >.

GEROSTAMOULOS, D. et al. The effect of the postmortem interval on the redistribution of drugs: a comparison of mortuary admission and autopsy blood specimens. **Forensic Science Medicine and Pathology**, v. 8, n. 4, p. 373-379, Dec 2012. ISSN 1547-769X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000309869300005 >.

GLARE, P. A.; WALSH, T. D. CLINICAL PHARMACOKINETICS OF MORPHINE. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 13, n. 1, p. 1-23, Jan 1991. ISSN 0163-4356. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1991EZ96100001 >.

GOLDSTEIN, P. The drugs/violence nexus: a tripartite conceptual framework. . **Journal of Drugs Issues**, v. 39, p. 17, 1985.

GONZALEZ-MARINO, I. et al. Determination of drugs of abuse in water by solid-phase extraction, derivatisation and gas chromatography-ion trap-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 11, p. 1748-1760, Mar 12 2010. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000275353800004 >.

GREENE, S. L.; KERR, F.; BRAITBERG, G. Review article: Amphetamines and related drugs of abuse. **Emergency Medicine Australasia**, v. 20, n. 5, p. 391-402, Oct 2008.

GUILLOT, J. G.; LEFEBVRE, M.; WEBER, J. P. Determination of heroin, 6-acetylmorphine, and morphine in biological fluids using their propionyl derivatives with ion trap GC-MS. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 21, n. 2, p. 127-133, Mar-Apr 1997. ISSN 0146-4760. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1997WP40900005 >.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

HANZLICK, R.; GOWITT, G. T. COCAINE METABOLITE DETECTION IN HOMICIDE VICTIMS. **Jama-Journal of the American Medical Association**, v. 265, n. 6, p. 760-761, Feb 13 1991. ISSN 0098-7484. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1991EW47900030 >.

HENDERER, J. D.; RAPUANO, C. J. Farmacologia ocular. In: (Ed.). **As bases farmacológicas da terapêutica - Goodman & Gilman**: Mc Graw Hill, v.12^a ed., 2012.

Referências

HINGSON, R.; WINTER, M. Epidemiology and consequences of drinking and driving. **Alcohol Research & Health**, v. 27, n. 1, p. 63-78, 2003. ISSN 0090-838X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000223800300006 >.

HOLLISTER, L. E. Health aspects of cannabis: revisited. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 1, n. 1, p. 71-80, Jul 1998. ISSN 1461-1457. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000084351300010 >.

HOLMGREN, P. et al. Stability of drugs in stored postmortem femoral blood and vitreous humor. **J Forensic Sci**, v. 49, n. 4, p. 820-5, Jul 2004. ISSN 0022-1198. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15317202> >.

HONEY, D. et al. Comparative alcohol concentrations in blood and vitreous fluid with illustrative case studies. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 29, n. 5, p. 365-369, Jul-Aug 2005. ISSN 0146-4760. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000231079300014 >.

HUESTIS, M. A. Human cannabinoid pharmacokinetics. **Chemistry & Biodiversity**, v. 4, n. 8, p. 1770-1804, 2007 2007. ISSN 1612-1872. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000249317800010 >.

INABA, T.; STEWART, D. J.; KALOW, W. METABOLISM OF COCAINE IN MAN. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 23, n. 5, p. 547-552, 1978 1978. ISSN 0009-9236. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1978EZ60000010 >.

ISHIKAWA, A. A. **Desenvolvimento de metodologia analítica para a investigação de metilenodioxí derivados em amostras de humor vítreo em vítimas fatais de acidentes de trânsito**. 2011. 67 (Mestrado). Mestrado, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

JAMES, R. A.; HOADLEY, P. A.; SAMPSON, B. G. Determination of postmortem interval by sampling vitreous humour. **American Journal of Forensic Medicine and Pathology**, v. 18, n. 2, p. 158-162, Jun 1997. ISSN 0195-7910. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1997XC76800010 >.

JATLOW, P. COCAINE - ANALYSIS, PHARMACOKINETICS, AND METABOLIC DISPOSITION. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 61, n. 2, p. 105-113, Mar-Apr 1988. ISSN 0044-0086. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1988N669700002 >.

JENKINS, A. J.; OBLOCK, J. Phencyclidine and cannabinoids in vitreous humor. **Leg Med (Tokyo)**, v. 10, n. 4, p. 201-3, Jul 2008. ISSN 1873-4162. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18294895> >.

JOHANSON, C. E.; FISCHMAN, M. W. THE PHARMACOLOGY OF COCAINE RELATED TO ITS ABUSE. **Pharmacological Reviews**, v. 41, n. 1, p. 3-52, Mar 1989. ISSN 0031-6997. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1989AU32500002 >.

Referências

KARINEN, R. et al. Determination of Heroin and Its Main Metabolites in Small Sample Volumes of Whole Blood and Brain Tissue by Reversed-Phase Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 33, n. 7, p. 345-350, Sep 2009. ISSN 0146-4760. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000269362600001 >.

KELLY, E.; DARKE, S.; ROSS, J. A review of drug use and driving: epidemiology, impairment, risk factors and risk perceptions. **Drug and Alcohol Review**, v. 23, n. 3, p. 319-344, Sep 2004. ISSN 0959-5236. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000223537900010 >.

KETEN, A.; TUMER, A. R.; BALSEVEN-ODABASI, A. Measurement of ethyl glucuronide in vitreous humor with liquid chromatography-mass spectrometry. **Forensic Science International**, v. 193, n. 1-3, p. 101-105, Dec 15 2009. ISSN 0379-0738. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000272967900015 >.

KLAASSEN, C. D. **Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons**. New York: McGraw-Hill, 2001.

KOVATSI, L. et al. Disposable pipette extraction for gas chromatographic determination of codeine, morphine, and 6-monoacetylmorphine in vitreous humor. **J Sep Sci**, v. 34, n. 14, p. 1716-21, Jul 2011. ISSN 1615-9314. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21604369> >.

KRAEMER, T.; MAURER, H. H. Toxicokinetics of amphetamines: Metabolism and toxicokinetic data of designer drugs, amphetamine, methamphetamine, and their N-alkyl derivatives. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 24, n. 2, p. 277-289, Apr 2002. ISSN 0163-4356. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000174510500009 >.

KUHNS, J. B.; MAGUIRE, E. R. Drug and alcohol use by homicide victims in Trinidad and Tobago, 2001-2007. **Forensic Science Medicine and Pathology**, v. 8, n. 3, p. 243-251, Sep 2012. ISSN 1547-769X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000306682200005 >.

KUHNS, J. B. et al. A meta-analysis of marijuana, cocaine and opiate toxicology study findings among homicide victims. **Addiction**, v. 104, n. 7, p. 1122-31, Jul 2009. ISSN 1360-0443. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19438418> >.

LEVINE, B. S. J., REBECCA A. Drugs-of-Abuse Testing in Vitreous Humor. In: JENKINS, A. J. C., YALE H. (Ed.). **Drug Testing in Alternate Biological Specimens**: Humana Press, 2008 cap. 7, p.117-130. ISBN 978-1-58829-709-9.

LEWIS, A. G.; MATHIEU, D.; PHAN-TAN-LUU, R. **Pharmaceutical Experimental Design**. Marcel Dekker, Inc., 1999. ISBN 0-8247-9860-0.

LILLSUNDE, P. Analytical techniques for drug detection in oral fluid. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 30, n. 2, p. 181-187, Apr 2008. ISSN 0163-4356. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000254901500008 >.

Referências

LIN, D. L. et al. Distribution of codeine, morphine, and 6-acetylmorphine in vitreous humor. **J Anal Toxicol**, v. 21, n. 4, p. 258-61, 1997 Jul-Aug 1997. ISSN 0146-4760. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9248941> >.

LIN, D. L.; LIN, R. L. Distribution of 11-Nor-9-carboxy-Delta(9)-tetrahydrocannabinol in traffic fatality cases. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 29, n. 1, p. 58-61, Jan-Feb 2005. ISSN 0146-4760. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000226348400009 >.

LINNET, K. Postmortem drug concentration intervals for the non-intoxicated state - A review. **Journal of Forensic and Legal Medicine**, v. 19, n. 5, p. 245-249, Jul 2012. ISSN 1752-928X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000305272700001 >.

LONGO, M. C. et al. The prevalence of alcohol, cannabinoids, benzodiazepines and stimulants amongst injured drivers and their role in driver culpability - Part I: the prevalence of drug use in drivers, and characteristics of the drug-positive group. **Accident Analysis and Prevention**, v. 32, n. 5, p. 613-622, Sep 2000a. ISSN 0001-4575. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000088077900001 >.

_____. The prevalence of alcohol, cannabinoids, benzodiazepines and stimulants amongst injured drivers and their role in driver culpability - Part II: The relationship between drug prevalence and drug concentration, and driver culpability. **Accident Analysis and Prevention**, v. 32, n. 5, p. 623-632, Sep 2000b. ISSN 0001-4575. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000088077900002 >.

LOPER, K. A. CLINICAL TOXICOLOGY OF COCAINE. **Medical Toxicology and Adverse Drug Experience**, v. 4, n. 3, p. 174-185, May-Jun 1989. ISSN 0112-5966. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1989U837200003 >.

MACKEY-BOJACK, S.; KLOSS, J.; APPLE, F. Cocaine, cocaine metabolite, and ethanol concentrations in postmortem blood and vitreous humor. **J Anal Toxicol**, v. 24, n. 1, p. 59-65, 2000 Jan-Feb 2000. ISSN 0146-4760. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10654571> >.

MARGALHO, C. et al. Illicit drugs in alternative biological specimens: a case report. **J Forensic Leg Med**, v. 18, n. 3, p. 132-5, Apr 2011. ISSN 1878-7487. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21420652> >.

MAURER, H. H. Position of chromatographic techniques in screening for detection of drugs or poisons in clinical and forensic toxicology and/or doping control. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 42, n. 11, p. 1310-1324, 2004 2004. ISSN 1434-6621. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000225438100010 >.

MAURER, H. H.; SAUER, C.; THEOBALD, D. S. Toxicokinetics of drugs of abuse: Current knowledge of the isoenzymes involved in the human metabolism of tetrahydrocannabinol, cocaine, heroin, morphine, and codeine. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 28, n. 3, p. 447-453, Jun 2006. ISSN 0163-4356. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000238211400027 >.

Referências

MCKINNEY, P. E. et al. Vitreous humor cocaine and metabolite concentrations: do postmortem specimens reflect blood levels at the time of death? **J Forensic Sci**, v. 40, n. 1, p. 102-7, Jan 1995. ISSN 0022-1198. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7876790> >.

MEATHERALL, R.; LEE, C.; PHILLIPS, S. Accidental Death from Hydromorphone Ingestion. **Journal of Forensic Sciences**, v. 56, p. S271-S274, Jan 2011. ISSN 0022-1198. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000285840200049 >.

MEIRA, G. T.; DADALTO, M. C. **Novos olhares sobre os migrantes nacionais e imigrantes internacionais: os inquéritos policiais na RMGV 2013**

MOVIG, K. L. L. et al. Psychoactive substance use and the risk of motor vehicle accidents. **Accident Analysis and Prevention**, v. 36, n. 4, p. 631-636, Jul 2004. ISSN 0001-4575. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000221675600017 >.

MUSSHOFF, F. Illegal or legitimate use? Precursor compounds to amphetamine and methamphetamine. **Drug Metabolism Reviews**, v. 32, n. 1, p. 15-44, 2000 2000. ISSN 0360-2532. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000085334600002 >.

NEGRUSZ, A.; JICKELLS, S. **Clarke's Analytical Forensic Toxicology**. London: Pharmaceutical Press, 2008.

OIESTAD, E. L. et al. Drug Screening of Whole Blood by Ultra-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 35, n. 5, p. 280-293, Jun 2011. ISSN 0146-4760. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000290837500005 >.

ONEAL, C. L.; POKLIS, A. Postmortem production of ethanol and factors that influence interpretation - A critical review. **American Journal of Forensic Medicine and Pathology**, v. 17, n. 1, p. 8-20, Mar 1996. ISSN 0195-7910. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1996TW07200002 >.

PECHANSKY, F.; DUARTE, P.; DE BONI, R. **Uso de bebidas alcoólicas e outras drogas nas rodovias brasileiras e outros estudos** Porto Alegre: Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas 2010.

PEDEN, M. **World Report on Traffic Injury Prevention**. Geneva. 2004

PELANDER, A.; RISTIMAA, J.; OJANPERÄ, I. Vitreous humor as an alternative matrix for comprehensive drug screening in postmortem toxicology by liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry. **J Anal Toxicol**, v. 34, n. 6, p. 312-8, 2010 Jul-Aug 2010. ISSN 1945-2403. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20663283> >.

PERES, M. D. et al. Simultaneous Quantification of Cocaine, Amphetamines, Opiates and Cannabinoids in Vitreous Humor. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 38, n. 1, p. 39-45,

Referências

Jan-Feb 2014. ISSN 0146-4760; 1945-2403. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000330446000006 >.

PETERS, F. T.; DRUMMER, O. H.; MUSSHOFF, F. Validation of new methods. **Forensic Science International**, v. 165, n. 2-3, p. 216-224, Jan 2007. ISSN 0379-0738. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000244156100020 >.

PETERS, F. T.; MAURER, H. H. Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology - A review. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 7, n. 11, p. 441-449, Nov 2002. ISSN 0949-1775. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000179781300003 >.

POMARA, C. et al. Data Available on the Extent of Cocaine Use and Dependence: Biochemistry, Pharmacologic Effects and Global Burden of Disease of Cocaine Abusers. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 33, p. 5647-5657, Nov 2012. ISSN 0929-8673. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000311152700008 >.

PRAGST, F. et al. Detection of 6-acetylmorphine in vitreous humor and cerebrospinal fluid--comparison with urinary analysis for proving heroin administration in opiate fatalities. **J Anal Toxicol**, v. 23, n. 3, p. 168-72, 1999 May-Jun 1999. ISSN 0146-4760. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10369325> >.

RAMAEKERS, J. G. et al. Dose related risk of motor vehicle crashes after cannabis use. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 73, n. 2, p. 109-119, Feb 2004. ISSN 0376-8716. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000188508500001 >.

REES, K. A. et al. The effect of sodium fluoride preservative and storage temperature on the stability of cocaine in horse blood, sheep vitreous and deer muscle. **Forensic Science International**, v. 217, n. 1-3, p. 182-188, Apr 2012. ISSN 0379-0738. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000303209700034 >.

RODRIGUES, M.; DADALTO, M. **Subjetividade, violência e Juventude. Congresso Internacional de Investigadores sobre Juventud**. Havana: entro de Estudios sobre la Juventud. 1: 9 p. 2013.

SAAR, E. et al. The time-dependant post-mortem redistribution of antipsychotic drugs. **Forensic Science International**, v. 222, n. 1-3, p. 223-227, Oct 10 2012. ISSN 0379-0738. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000308690600037 >.

SANCHES, L. R. et al. Determination of opiates in whole blood and vitreous humor: a study of the matrix effect and an experimental design to optimize conditions for the enzymatic hydrolysis of glucuronides. **J Anal Toxicol**, v. 36, n. 3, p. 162-70, Apr 2012. ISSN 1945-2403 (Electronic)

0146-4760 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22417831> >.

_____. Determination of opiates in whole blood and vitreous humor: a study of the matrix effect and an experimental design to optimize conditions for the enzymatic hydrolysis of glucuronides. **J Anal Toxicol**, v. 36, n. 3, p. 162-70, Apr 2012. ISSN 1945-2403. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22417831> >.

SAÚDE, B. M. D. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos 2003.**

SCHRAMM, W.; SMITH, R. H.; CRAIG, P. A. METHODS OF SIMPLIFIED SALIVA COLLECTION FOR THE MEASUREMENT OF DRUGS OF ABUSE, THERAPEUTIC DRUGS, AND OTHER MOLECULES. **Saliva as a Diagnostic Fluid**, v. 694, p. 311-313, 1993. ISSN 0077-8923. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1993BZ06S00039 >.

Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 37, n. 7, p. 452-474, Sep 2013. ISSN 0146-4760. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000322954300010 >.

SCOTT, K.; OLIVER, J. The use of vitreous humor as an alternative to whole blood for the analysis of benzodiazepines. **Journal Forensic Science**, v. 46, n. 3, p. 4, 2001.

SHEEHAN, C. M. et al. Gender differences in the presence of drugs in violent deaths. **Addiction**, v. 108, n. 3, p. 547-555, Mar 2013. ISSN 0965-2140. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000315182900020 >.

SINDELAR, J. L.; FIELLIN, D. A. Innovations in treatment for drug abuse: Solutions to a public health problem. **Annual Review of Public Health**, v. 22, p. 249-272, 2001. ISSN 0163-7525. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000168649000016 >.

SKOPP, G. Preanalytic aspects in postmortem toxicology. **Forensic Science International**, v. 142, n. 2-3, p. 75-100, Jun 10 2004. ISSN 0379-0738. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000222148000002 >.

_____. Postmortem toxicology. **Forensic Science Medicine and Pathology**, v. 6, n. 4, p. 314-325, Dec 2010. ISSN 1547-769X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000281948600013 >.

STEFANIDOU, M. et al. Biomarkers of opiate use. **International Journal of Clinical Practice**, v. 64, n. 12, p. 1712-1718, Nov 2010. ISSN 1368-5031. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000283080900020 >.

STEPHENS, R. J.; RICHARDS, R. G. VITREOUS-HUMOR CHEMISTRY - THE USE OF POTASSIUM CONCENTRATION FOR THE PREDICTION OF THE POSTMORTEM INTERVAL. **Journal of Forensic Sciences**, v. 32, n. 2, p. 503-509, Mar 1987. ISSN 0022-1198. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1987G369700025 >.

Referências

TEIXEIRA, H. M. et al. Vitreous humour as a complementary sample to blood for the detection/confirmation of diazepam: ante-mortem and post-mortem studies in an animal model. **Human & Experimental Toxicology**, v. 23, n. 12, p. 571-577, Dec 2004. ISSN 0960-3271. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000225887400004 >.

UNODC, U. N. O. O. D. A. C. **World Drug Report 2013**. Vienna. 2013

WASELFISZ, J. **Mapa da Violência 2012. Os novos padrões da violência homicida no Brasil**. São Paulo: Instituto Sangari, 2012.

WALSH, J. M. et al. Guidelines for research on drugged driving. **Addiction**, v. 103, n. 8, p. 1258-1268, Aug 2008. ISSN 0965-2140. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000257692800003 >.

WALSH, M. et al. Drug and Driving. **Traffic Injury Prevention**, v. 5, n. 3, p. 241-253, 2004.

WARNER, A.; NORMAN, A. B. Mechanisms of cocaine hydrolysis and metabolism in vitro and in vivo: A clarification. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 22, n. 3, p. 266-270, Jun 2000. ISSN 0163-4356. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000087274200005 >.

WHIKEHART, D. R. **Biochemistry of the Eye**. Boston: Butterworth-Heinemann, 2004. ISBN 0750671521.

WILLS, S. **Drugs of Abuse**. Cambridge: The Pharmaceutical Press, 2002.

WINEK, C. L.; ESPOSITO, F. M. COMPARATIVE-STUDY OF ETHANOL LEVELS IN BLOOD VERSUS BONE-MARROW, VITREOUS-HUMOR, BILE AND URINE. **Forensic Science International**, v. 17, n. 1, p. 27-36, 1981 1981. ISSN 0379-0738. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1981LG83000006 >.

ZHANG, J. Y.; FOLTZ, R. L. COCAINE METABOLISM IN MAN - IDENTIFICATION OF 4 PREVIOUSLY UNREPORTED COCAINE METABOLITES IN HUMAN URINE. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 14, n. 4, p. 201-205, Jul-Aug 1990. ISSN 0146-4760. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1990DQ15100001 >.

Apêndice

APÊNDICE 1

Tabela 47 - Circunstâncias da morte e concentrações obtidas no humor vítreo.

CASO	ANO	IDADE	SEXO	LOCAL	TIPO	ETANOL	COC	CE	BE	EMA	OUTROS
9	2011	22	M	Anchieta	ACT	NEG	267,64	115,32	142,66		
13	2011	33	F	Cariacica	ACT	15,2	1577,21		1419,97	68,57	
16	2011	30	M	Ibitirama	ACT	NEG	17,48		< 10,0		
18	2011	39	F	D. Martins	ACT	NEG					MDMA (<10,0); MDEA (<10,0)
19	2011	42	F	Serra	ACT	14,3	103,03	48,45	12,99		
20	2011	24	M	Vila Velha	ACT	NEG	183,74	73,45	17,29		
30	2011	21	M	Vila Velha	ACT	NEG	213,08		138,60	37,05	
36	2011	23	M	Cariacica	ACT	NEG			27,21		
40	2011	44	M	Viana	ACT	22,1					MDA (34,65)
41	2011	29	M	Cariacica	ACT	6,7	187,11	33,97	144,81		
44	2011	52	M	Guarapari	ACT	NEG	28,41		< 10,0		
54	2011	49	M	Fundão	ACT	9,4	283,97	92,65	81,11		
56	2011	38	M	Ibiraçu	ACT	NEG	12,33	11,27	7,66		
57	2011	34	M	Viana	ACT	17,2	223,21	41,41	460,98		
65	2011	39	M	Viana	ACT	NEG	171,53	85,44	291,98		
66	2011	31	M	Guarapari	ACT	20,8		16,58			

Apêndice

CASO	ANO	IDADE	SEXO	LOCAL	TIPO	ETANOL	COC	CE	BE	EMA	OUTROS
68	2011	28	M	Serra	ACT	19,7	139,02	60,07	64,78		
73	2012	19	M	Viana	HOM	11,0	787,25	242,45	716,12	142,19	
74	2012	25	M	Serra	HOM	NEG	545,40	< 10,0	545,56	98,54	
76	2012	49	M	Serra	HOM	NEG	30,18	20,44	531,86		
81	2012	17	M	Cariacica	HOM	NEG	42,16	< 10,0	14,69		
83	2012	84	M	Vila Velha	AFO	NEG					COD (157,37)
84	2012	42	M	Vitória	HOM	NEG	573,40		997,96	105,14	
85	2012	23	M	Cariacica	HOM	NEG	20,93		92,30	9,70	
87	2012	34	M	João Neiva	ACT	7,7	374,83		652,48	26,92	
89	2012	23	M	Aracruz	ACT	20,2	94,41	56,10	131,54		
90	2012	16	M	Cariacica	HOM	NEG	30,15		57,15		
91	2012	29	M	Serra	ACT	NEG			42,88		
93	2012	32	M	Serra	HOM	28,3	492,38	410,00	585,25	122,68	
											MDMA(541,39);
95	2012	18	M	Vila Velha	HOM	NEG					MDA (29,05)
97	2012	42	M	Vitória	HOM	3,4	237,02	15,98	56,54		
98	2012	52	F	Vitória	SUI	NEG			42,66		
99	2012	14	M	Serra	HOM	NEG	28,43		24,85		
101	2012	25	M	Vila Velha	HOM	NEG	319,57		1007,27	87,20	
102	2012	25	F	Serra	HOM	NEG	13,41	11,42	19,10		

Apêndice

CASO	ANO	IDADE	SEXO	LOCAL	TIPO	ETANOL	COC	CE	BE	EMA	OUTROS
107	2012	24	M	Vila Velha	HOM	NR	403,29		1230,65	91,73	
109	2012	23	M	Viana	SUI	19,8	153,56	74,25	363,61		
112	2012	17	M	Cariacica	HOM	NEG	740,39		682,50	292,20	
113	2012	26	F	Cariacica	HOM	NEG	692,31	51,44	35,32	413,65	
115	2012	20	M	Cariacica	HOM	14,0	396,98	64,60	689,74	206,49	
116	2012	21	M	Cariacica	HOM	NEG	214,74		309,26	113,52	
118	2012	22	F	Cariacica	HOM	11,2	38,54		125,39		
120	2012	28	M	Serra	HOM	1,7	365,05	18,87	1199,44	137,53	
121	2012	24	M	Vitória	HOM	NEG	18,08		40,38		
122	2012	34	M	Serra	HOM	NR	521,27		695,39	1106,61	
123	2012	33	M	Vila Velha	HOM	NEG	466,44	13,31	90,86	111,45	
124	2012	28	M	Cariacica	HOM	NEG	513,38		479,22	156,26	
125	2012	30	M	Aracruz	HOM	29,2	28,53	17,37	49,86		
126	2012	25	M	Serra	HOM	NR		19,56	16,59		
128	2012	38	M	Cariacica	HOM	NEG			94,37		
131	2012	31	M	Serra	HOM	NEG	17,15		89,97		
136	2012	99	F	Serra	HOM	NEG	649,51		31,14	308,43	MDA (65,06)
137	2012	26	M	Serra	HOM	NEG	493,79		162,42	474,98	
138	2012	47	M	Vila Velha	HOM	7,5	23,47	5,39	40,50		
147	2012	22	M	Serra	HOM	NEG	34,93		331,57		

Apêndice

CASO	ANO	IDADE	SEXO	LOCAL	TIPO	ETANOL	COC	CE	BE	EMA	OUTROS
148	2012	33	M	Serra	HOM	24,9			82,57		
152	2012	17	M	Serra	HOM	NEG			99,18		
157	2012	33	M	Serra	HOM	NEG	441,71		1254,93		
159	2012	18	F	Vila Velha	HOM	NEG	55,63		13,22		
160	2012	49	M	Vila Velha	HOM	14,1	80,59	35,32	228,69		
161	2012	23	M	Cariacica	HOM	NEG	256,70				
167	2012	24	M	Anchieta	ACT	NR	11,60		245,88		
168	2012	19	M	Cariacica	HOM	NEG			20,02		
169	2012	33	M	Serra	HOM	NEG	80,59	35,32	228,69		
170	2012	31	M	Serra	HOM	26,4	96,48	41,01	286,52		
174	2012	38	F	Vila Velha	HOM	NEG	1923,92	169,23	1586,00		
175	2012	18	M	Cariacica	HOM	NEG	183,69		392,32		
176	2012	38	M	Cariacica	HOM	NR	455,46	133,18	385,84		
180	2012	23	M	Cariacica	HOM	NEG	227,21		339,25		
185	2012	26	M	Guarapari	HOM	NEG	483,74		257,30	43,90	
186	2012	34	M	Guarapari	ACT	11,2	155,32	30,99	860,31		
190	2012	20	M	Cariacica	HOM	NEG	182,08		919,04		
191	2012	22	M	Cariacica	HOM	NEG			257,03		
192	2012	21	M	Vitória	HOM	NEG	66,68		881,43		
193	2012	40	M	Serra	AFO	NEG					ANF (78,92)

Apêndice

CASO	ANO	IDADE	SEXO	LOCAL	TIPO	ETANOL	COC	CE	BE	EMA	OUTROS
194	2012	37	M	Cariacica	HOM	4,5	1547,73	433,76	2132,71	33,44	
195	2012	29	M	Cariacica	HOM	13,4	575,54	470,68	923,59	74,25	
198	2012	27	F	Serra	ACT	NEG					MDA (19,09)
199	2012	45	M	Cariacica	HOM	NEG	128,39		1340,77		
201	2012	30	M	Guarapari	HOM	16,0	55,83		546,65		
203	2012	19	M	Vitória	HOM	NEG	24,95		425,75		
205	2012	27	M	Vitória	HOM	NEG	430,00		666,94	20,43	
207	2012	21	M	Serra	HOM	NEG	143,59		1004,96		
208	2012	17	M	Cariacica	HOM	3,0	347,60		646,52		
210	2012	27	F	Guarapari	ACT	3,0					ANF (24,31)
218	2012	24	M	Serra	HOM	NEG	389,44		1139,03	31,90	
219	2012	44	M	Vila Velha	ACT	8,2	146,19	32,08	187,99		
220	2012	52	M	Vila Velha	HOM	18,4	105,30	78,48	174,44		
225	2012	30	M	Cariacica	HOM	28,4	49,07	18,11	158,27		
226	2012	22	M	Serra	HOM	8,6	127,69	47,64	< 10,0		
228	2012	30	M	Vila Velha	HOM	NEG					MDA (577,44)
231	2012	34	M	Viana	ACT	NEG	1248,49	17,86	1212,71	431,11	
237	2012	43	M	Vila Velha	HOM	NEG	246,94		254,12	169,92	
239	2012	39	M	Serra	ACT	NEG	30,09	24,62	15,17		
242	2012	20	M	Serra	HOM	18,8	30,23	18,65	18,47		

Apêndice

CASO	ANO	IDADE	SEXO	LOCAL	TIPO	ETANOL	COC	CE	BE	EMA	OUTROS
243	2012	34	M	Vitória	HOM	7,7	173,24	28,38	222,78		
247	2012	47	M	Vitória	Queda	NEG					MDMA (<10,0); MDA (23,09)
249	2012	17	M	Vila Velha	HOM	NEG	662,93	< 10,0	626,02	117,10	

ACT: acidente de trânsito; HOM: homicídio; AFO: afogamento; SUI: suicídio; NEG: negativo; NR: não realizado.

ANEXO 1.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

"Campus" de Ribeirão Preto

Of.CETP/FFCLRP-USP/072I-jsl

Ribeirão Preto, 10 de junho de 2011.

Prezado Pesquisador,

Comunicamos a V. Sa. que o trabalho intitulado "HUMOR VÍTREO: UMA ALTERNATIVA PARA INVESTIGAÇÃO DE DROGAS DE ABUSO POST-MORTEM" foi reanalisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FFCLRP-USP, em sua 96ª Reunião, realizada em 09.06.11, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, de acordo com o Processo CEP-FFCLRP nº 577/2011 - 2011.1.1265.59.0.

Informamos, também, que este Comitê deliberou solicitar a V. Sa. a apresentação de Relatório parcial e final, destacando as circunstâncias da coleta de material biológico e eventos não previstos no projeto inicial.

Atenciosamente,

Prof.ª Dr.ª ANA RAQUEL LUCATO CIANFLONE
Coordenadora

Ilustríssimo Senhor
Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis
Departamento de Química da FFCLRP - USP

Com cópia para a orientanda:
Mariana Dadalto Peres
Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa da FFCLRP
Fone: (16) 3602-4681
Fax: (16) 3633-2660 (direto) ou 3633-5015
Avenida Bandeirantes, 3900 - bloco 1 - 14040-901 - Ribeirão Preto - SP - Brasil
Homepage: <http://www.ffcrlp.usp.br> - e-mail: coetp@ffcrlp.usp.br

ARTIGOS PUBLICADOS

Brazilian Journal of Forensic Sciences, Medical Law and Bioethics

Journal homepage: www.ipebj.com.br/forensicjournal

Caracterização dos Infratores e Vítimas das Ocorrências de Trânsito no Interior Paulista

Characterization of Infractors and Victims the Occurrences of Traffic Accidents in Paulista Town

Marina Sbicca Pires¹, Mariana Dadalto Peres²,
Bruno Spinosa de Martinis³, Rafael Eduardo Pereira⁴

¹ Centro Universitário Barão de Mauá, R. Ramos de Azevedo, 423, Ribeirão Preto, SP, Brasil

² Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas,
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo,
Av. Bandeirantes, 3900, CEP 14040-901, Ribeirão Preto, SP, Brasil

³ Departamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto,
Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, CEP 14040-901, Ribeirão Preto, SP, Brasil

⁴ Instituto Paulista de Estudos Bioéticos e Jurídicos,
Av. Senador César Vergueiro, 505, sl. 16, Ribeirão Preto, SP, Brasil

Received 26 March 2012

Resumo. Os problemas decorrentes do consumo de bebidas alcoólicas entre motoristas são considerados um grande problema de saúde pública principalmente nos países em desenvolvimento. O etanol é considerado uma droga psicotrópica por atuar no sistema nervoso central (SNC), prejudicando a coordenação e a habilidade de motoristas que o ingere. O ato de beber e dirigir aumenta os riscos de envolvimento em ocorrências de trânsito, provocando muitas vezes mortes prematuras e incapacitação de indivíduos na vida produtiva, com isso gerando custos diretos e indiretos excessivos para o governo e para a sociedade. Baseado nessas informações, o trabalho em questão teve como objetivo a realização de um estudo estatístico transversal, retrospectivo, descritivo e comparativo da prevalência de álcool entre os indivíduos envolvidos em infrações e acidentes de trânsito, ocorridos nas regiões atendidas pelo NPML de Araraquara, entre os anos de 2005 e 2007, bem como a caracterização das ocorrências. Quando analisados os dados, observamos uma prevalência de indivíduos do sexo masculino, com idade entre 36 e

55 anos apresentarem alcoolemia positiva, quanto às ocorrências de trânsito se concentraram no domingo, período noturno e no mês de setembro. Portanto, o estudo comprova que o ato de beber e dirigir, somado à negligência e imprudência, resulta nas inúmeras infrações e acidentes de trânsito registrados em todo o mundo.

Palavras-chave: Acidentes de trânsito, infrações de trânsito, bebidas alcoólicas, alcoolemia, vítimas do trânsito, beber e dirigir.

Abstract. The problems associated with consumption of alcohol among drivers are considered a major public health problem mostly in developing countries. Ethanol is a type of drug that affects the central nervous system (CNS) and impairs driving skills and co-ordination, increasing risk of deaths and injuries derived from crashes and road traffic. Consumption of alcoholic beverages is implicated with premature deaths, injuries and damages caused by motor vehicle crashes, which result in high costs to government and society. Based on that, the work in question was aimed at carrying out a transversal, retrospective, descriptive and comparative study of the prevalence of alcohol use among individuals involved in violations and traffic accidents that occurred in the regions accommodate by NPML Araraquara, among years 2005 and 2007, and the characterization of these events. The results revealed a prevalence of positive blood alcohol among males aged between 36-55 years old. And the traffic accidents occurred mainly on sunday nights and in september. Therefore, this study shows that drinking and drive plus negligence and imprudence, results in numerous infractions and traffic accidents around the world.

Keywords: Traffic accidents, offender traffic, alcoholic beverages, alcoholemia, victim's traffic, drinking and driving.

1. Introdução

O consumo de bebidas alcoólicas entre condutores de veículos motorizados vem sendo considerado um grande problema de saúde pública mundial¹. Por atuar no sistema nervoso central (SNC), o álcool é considerado uma droga psicotrópica, a qual proporciona aos motoristas prejuízos na habilidade e na coordenação motora, aumentando os riscos de envolvimento em infrações e acidentes de trânsito, na qual muitas vezes resulta em morte e em danos a comunidade^{1,2,3,4}.

Dados fornecidos pelo Ministério da Saúde (MS)⁵, em publicação de 2007, revelaram que no trânsito brasileiro ocorrem anualmente 350 mil acidentes com vítimas, sendo 35 mil vítimas fatais e 315 mil feridos. E que a região sudeste

apresenta a maior proporcionalidade de mortes por acidentes de trânsito quando comparada às outras regiões, representando 41% dos casos totalizados no país, sendo que os municípios com mais de 500.000 habitantes apresentam o maior número de mortes, 32%. Estes acidentes de trânsito causam um impacto sobre a saúde da população, na diminuição da qualidade e expectativa de vida, gerando altos custos sociais com cuidados em saúde, previdência, absenteísmo ao trabalho e a escola, além dos prejuízos materiais⁵.

Os acidentes de trânsito geram perdas anuais de R\$ 30 bilhões de reais, sendo estimado o custo de um único acidente com vítima não fatal da ordem de R\$17.460,00, valor esse que sobe para R\$ 144.478,00 quando há morte⁶.

Mediante a complexidade do problema, o objetivo do presente estudo foi estimar a prevalência de alcoolemia dos infratores e/ou vítimas das ocorrências de trânsito, bem como caracterizá-las. Para com isso, fornecer as autoridades competentes, subsídios no auxílio da implantação e no desenvolvimento de políticas de prevenção contra as infrações e acidentes de trânsito.

2. Material E Método

2.1 Delineamento do trabalho

O estudo baseou-se na análise estatística transversal, retrospectiva, descritiva e comparativa dos indivíduos vivos e mortos, maiores de 18 anos de idade que tenham se envolvido em infrações e acidentes de trânsito, como motorista ou como passageiro, ou ainda, como pedestre ou ciclista, entre os anos de 2005 e 2007, e que estão digitalizados em um banco de dados alimentado via programa Microsoft Access versão 2000, do Instituto Médico Legal(IML)/Centro de Exames, Análises e Pesquisas (CEAP) de Ribeirão Preto.

As amostras de sangue dos infratores e vítimas de ocorrências de trânsito, provenientes das Equipes de Jaboticabal, São Carlos e do Núcleo de Perícias Médico Legais de Araraquara, que juntos atendem mais de 31 cidades e distritos no interior paulista, foram recebidas e analisadas no Laboratório de Toxicologia Forense do Centro de Medicina Legal (CEMEL)/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP)-USP e do IML/ CEAP de Ribeirão Preto.

2.2 Detecção da alcoolemia

Todas as amostras de sangue utilizadas para a análise da concentração de álcool

foram acondicionadas em tubos de 4mL contendo fluoreto ou oxalato de sódio e EDTA, e devidamente identificadas e acondicionadas imediatamente após sua chegada ao laboratório em refrigeradores a 4°C até o momento da análise. Essas análises foram realizadas em duplicata, através do método de cromatografia em fase gasosa com técnica de *headspace*⁷.

2.3 Análise dos dados

Para determinação da prevalência, definiu-se alcoolemia positiva em indivíduos com concentração de álcool no sangue acima de 0,60 g/L, limite máximo permitido pelo Conselho Nacional de Trânsito (CONTRAN) no período do estudo.

A categoria N/C (não consta) presente em algumas variáveis foi transformada em valores perdidos no banco de dados, e em seguida realizamos o estudo descritivo dos achados coletados, através da análise exploratória de dados (AED). A partir dos resultados verificados na análise descritiva dos dados, todas as variáveis, sexo, faixa etária, estado civil, etnia (cor da pele), categorias de ocorrências de trânsito, sub-regiões, mês da ocorrência, período da ocorrência, dias da semana da ocorrência e ano da ocorrência foram analisadas individualmente utilizando o aplicativo SPSS versão 17.0, considerando $p < 0,05$ (teste qui-quadrado), para verificar a associação com a variável resposta (alcoolemia).

2.4 Aspectos éticos e conflitos de interesse

O trabalho em questão foi submetido e aprovado sob Protocolo nº 338/09, em 30 de junho de 2009, pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário “Barão de Mauá”. Não houve conflito de interesse entre os autores.

3. Resultados

No período proposto no estudo, foram analisados 1455 casos, sendo que 71,55% (n=1041) dos achados apresentaram positividade para o exame de dosagem alcoólica realizado nos indivíduos envolvidos em ocorrências de trânsito, ou seja, tiveram concentração de álcool no sangue superior a 0,60 g/L (limite máximo permitido pelo Conselho Nacional de Trânsito) sob a Lei nº 9.503/98 em vigência no período do estudo. Dentre os anos estudados, 2006 e 2007 apresentaram números aproximados de casos, respectivamente 491 (33,75% do total de casos analisados) e 494 (33,95% do total de casos estudados), sendo que em 2006 dos achados analisados 72,10% (n=354) apresentaram alcoolemia positiva e em 2007 o número

de casos com positividade foi de 69,84% (n=345). Já o ano de 2005 apresentou o menor número de casos dentre os anos estudados 32,30% (n=470), em contrapartida foi observado um maior percentual de casos positivos 72,77% (n=342) em relação aos demais anos do estudo.

A média das concentrações de álcool no sangue dos infratores e vítimas de ocorrências de trânsito, considerados positivos entre os anos de estudo, independentemente do sexo foi de 2,86 g/l ($\pm 1,32$ e mediana 2,68), variando entre 0,62 e 7,83 g/L, o que representou próximo de cinco vezes maior a concentração permitida por lei.

Na Tabela 1, pode ser observado que a maior parte dos indivíduos envolvidos em ocorrências de trânsito nas regiões e no período estudado era do sexo masculino com percentual de 94,08% (n=1369) do total de casos analisados (n=1452), sendo que destes 74,45% (n=1017) apresentaram alcoolemia positiva.

Ao analisar a variável faixa etária, foi possível verificar que a maioria dos envolvidos em ocorrências de trânsito tem entre 18 e 35 anos (48,74% do total de casos estudados 1344), embora indivíduos entre 36 e 55 anos apresentaram o maior percentual de casos positivos em relação às demais faixas etárias, 77,97% dos 563 achados (Tabela 1).

A média das idades observadas entre os indivíduos envolvidos nas ocorrências variou entre 18 e 86 para os homens (média 37 e mediana 36) e para as mulheres entre 18 e 87, tendo como média 40 anos (mediana 34).

Com relação ao estado civil dos indivíduos, foi possível observar que 24,26% (n=353) dos 1455 casos possuem união estável, 18,83% (n=274) são solteiros e na categoria outros a porcentagem foi de 6,25% (n=91).

O estudo referente à etnia (cor da pele) dos infratores e vítimas de ocorrências de trânsito constatou que, 79,04% (n=645) eram de cor branca, em contrapartida os investigados de cor da pele parda (128 casos) apresentaram maior porcentagem de alcoolemia positiva 80,47%.

Quanto ao período das ocorrências de trânsito, o noturno foi o que apresentou maior número de casos de infrações e acidentes de trânsito, com 46,55% (n=128) do total de casos analisados, além de observar a maior porcentagem de casos positivos 76,56% (n=98) em relação aos demais períodos do estudo.

A maioria dos casos de infrações e acidentes de trânsito ocorreu na região de Araraquara, representando 42,26% (n=614) dos 1453 achados analisados, embora Jaboticabal fosse a região que apresentou maior porcentagem de casos positivos

em relação as demais regiões, 78,88% dos 412 casos registrados (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição dos casos segundo as diferentes variáveis do estudo em relação à alcoolemia. Ribeirão Preto, SP, 2005-2007.

	Alcoolemia			p*
	Positiva n (%)	Negativa n (%)	Total n (%)	
Sexo				p<0,0001
Masculino	1017 (74,45)	349 (25,55)	1366 (94,08)	
Feminino	23 (26,74)	63 (73,26)	86 (5,92)	
Total	1040 (71,63)	412 (28,37)	1452 (100)	
Faixa Etária				p<0,0001
18-35 anos	462 (70,53)	193 (29,47)	655 (48,74)	
36-55 anos	439 (77,97)	124 (22,03)	563 (41,89)	
> 56 anos	59 (46,83)	67 (53,17)	126 (9,37)	
Total	960 (71,43)	384 (28,57)	1344 (100)	
Sub-Regiões				p=0,0003
NPML de Araraquara				
Eq. Jaboticabal	325 (78,88)	87 (21,12)	412 (28,36)	
Eq. São Carlos	289 (67,68)	138 (32,32)	427 (29,38)	
Total	1041 (71,64)	412 (28,36)	1453 (100)	

Obs: Não estão inclusos os valores perdidos e as amostras prejudicadas. * Qui-quadrado de Pearson.

A maior prevalência das ocorrências se deu no mês de setembro, sendo que o mês com maior índice de casos positivos foi agosto (84,8%), em relação aos demais meses do ano, com diferença estatística significativa ($p=0,04$), conforme Figura 1.

Na Figura 2, podemos observar uma significância de $p=0,03$ na relação entre os dias da semana e a positividade para alcoolemia, destacando as maiores porcentagens de dosagem alcoólica positiva, sábado com 78,77% ($n=167$) e domingo com 76,19% ($n=208$). Os dias correspondentes ao final de semana, sábado e domingo, também foram os que mais registraram ocorrências de trânsito.

No estudo das diferentes categorias de ocorrências de trânsito, a de natureza “Direção perigosa/Averiguação de embriaguez ao volante” foi a que teve o maior número de achados $n= 591$, representando 44,37% do total de casos analisados ($n=1332$), bem como casos positivos, mostrando-se significativa com $p<0,0001$,

Figura 3.

Figura 1. Frequência de positividade em relação ao mês das ocorrências de trânsito. **Figura 2.** Frequência de positividade em relação aos dias da semana das ocorrências de trânsito.

Figura 3. Frequência de positividade em relação às diferentes categorias de ocorrências de trânsito.

4. Discussão e Conclusão

A análise dos resultados apontou um percentual de casos em que os infratores e vítima de ocorrências de trânsito apresentaram positividade inferior ao demonstrado em um estudo nacional, no qual foi observada uma porcentagem de 77,5% de alcoolemia positiva⁸, bem como em um trabalho realizado na França, onde observaram uma porcentagem de casos positivos acima do limite legal de 96,8%⁹. A média das concentrações de alcoolemia encontrada neste trabalho entre os casos positivos de ocorrências de trânsito foi maior à observada em outros estudos, como o realizado entre os anos de 1998 e 1999, na cidade de São Paulo¹⁰, o descrito na região de Ribeirão Preto, no qual obteve uma média de 2,09 g/L⁸, a relatada por e na cidade de Luxemburgo, pesquisadores internacionais relataram que a concentração média de álcool presente no sangue de infratores de trânsito entre os anos de 2001 e 2002, foi de 1,8 g/L⁹.

O índice de prevalência observado no referido estudo de indivíduos do sexo masculino envolvidos em infrações e acidentes de trânsito e que apresentaram alcoolemia positiva, foi parecido com outros trabalhos brasileiros, bem como de outros países^{8,9,10,11,12,13,14}.

Em relação à faixa etária dos infratores e vítimas de ocorrências de trânsito, pudemos observar dados semelhantes em estudos realizados em Hong Kong, na Europa e no Brasil, os quais demonstraram o predomínio da faixa etária 26-35 anos^{8,11,13,14}. Quando analisado a faixa etária com a positividade dos casos, a prevalência encontrada no estudo foi próxima aos percentuais observados em outros estudos^{8,10,13}, porém em outros trabalhos verificaram uma taxa de apenas 33,5% de positividade nos casos envolvendo indivíduos com idade entre 20 e 30 anos⁸, e na cidade de Diadema, entre os anos de 2005 e 2006, demonstraram que 45,6% dos averiguados com idade entre 21 e 30 anos apresentaram concentração de álcool acima do limite legal, através do etilômetro (bafômetro)¹².

A média de idade entre os averiguados de ocorrências de trânsito segundo o sexo encontrado no trabalho se assemelha aos dados obtidos nos estudos realizados na França⁹ e na região de Ribeirão Preto⁸, os quais descrevem o mesmo valor médio para indivíduos do sexo masculino de 37 anos e para indivíduos do sexo feminino, a idade média foi respectivamente de 41 anos e 38 anos.

Quando analisado o estado civil dos infratores e vítimas envolvidos em ocorrências de trânsito, ficou demonstrado que a maioria apresentava união estável, enquanto outros estudos nacionais^{8,10} demonstraram predomínio dos indivíduos solteiros nas ocorrências, com porcentagens de 53,4% e 46,12% respectivamente.

Trabalhos realizados na Austrália (36%)¹⁵ e na Espanha (35,4%)¹⁶ verificaram índice de porcentagem de casos positivo para álcool, ou seja, acima do limite permitido pela legislação local entre as vítimas de acidente de trânsito semelhante o observado em nosso estudo que foi de 35,03%. Enquanto outros estudos descritos na Itália (49%)¹⁷, no Canadá (48%)¹⁷, em algumas áreas dos USA (46%)¹⁷, na França (45,7%)¹³ e na Hungria (42%)¹⁷ apresentaram em seus achados percentuais superiores em relação ao referido trabalho. Por outro lado, trabalhos desenvolvidos no Reino Unido 20,25%¹⁸, na Bélgica (28%)¹⁹, em países nórdicos (Noruega – 28,3%)²⁰, e na Suécia (22%)²¹ verificaram porcentagens de positividade dos casos de vítimas de acidentes de trânsito inferiores quando comparados aos nossos dados.

Os resultados do presente trabalho em relação às vítimas de acidentes de trânsito e a positividade foi verificado percentuais superiores em alguns estudos nacionais, como o realizado na região metropolitana de São Paulo²² e na região de Ribeirão Preto⁸, as quais apresentaram respectivamente taxas de 52,3% e 44,33% das vítimas fatais com alcoolemia positiva. Outros trabalhos nacionais como o

realizado em 1999, no IML de São Paulo, no qual foi observado que dos 2360 casos de vítimas mortas devido às ocorrências de trânsito, 1541 vítimas de colisão que vieram a óbito, 44,9% tiveram alcoolemia positiva²³, em estudo mais recente realizado na cidade de Brasília demonstrou que 44,2% das vítimas fatais de colisão apresentaram níveis de alcoolemia superior a 0,60 g/L²⁴. Já um estudo realizado em serviços de emergência e institutos médico-legais de Brasília, Curitiba, Recife e Salvador apontou que dentre as 34 vítimas fatais, apenas 27,2% do total de casos apresentaram valores maiores ou iguais a 0,60 g/L²⁵, porcentagem esta inferior a observada no presente estudo. Em contrapartida, dados fornecidos pelo Instituto de Medicina-Legal Afrânio Peixoto (IMLAP) revelaram que apenas 33% das vítimas fatais de trânsito, no Rio de Janeiro, apresentaram testes para alcoolemia com valores acima de 0,60 g/L²⁶, percentual este semelhante ao nosso estudo.

Quando analisados os dados das vítimas de atropelamento que vieram a óbito, estudos brasileiros encontraram índice de positividade de 50,6%²² e 43,30%⁸ e, dos 819 casos, 50,9% apresentaram alcoolemia positiva²³, taxas essas superiores à encontrada no trabalho. Já nos casos de vítimas de atropelamento observados em Brasília, 32,5% tiveram alcoolemia acima do permitido por lei²⁴, dado que se assemelha ao presente estudo.

O percentual de concentração de álcool positiva encontrada no sangue dos indivíduos envolvidos em ocorrências de trânsito como condutores, verificado no presente trabalho, foi superior ao observado em outro estudo nacional, que observou uma porcentagem de casos positivos 61,4%²⁵. Em contrapartida, estudo realizado na região de Ribeirão Preto ficou demonstrado um percentual superior (88,26%)⁸, quando comparado aos achados do referido trabalho.

Em relação à porcentagem de positividade para alcoolemia entre os infratores envolvidos em casos de direção perigosa do presente estudo, com outro estudo⁸, observou-se uma semelhança, na qual os pesquisadores demonstraram que dos 791 casos analisados, 96,59% tiveram concentração de álcool no sangue acima do limite máximo permitido pelo CONTRAN.

Portanto, conclui-se que a prevalência de indivíduos do sexo masculino, com idade entre 36 e 55 anos e que apresentaram alcoolemia positiva, coincide com outros trabalhos nacionais e internacionais. Quanto à caracterização das infrações e acidentes de trânsito, as mesmas ocorrem em sua grande maioria aos domingos, no período noturno e no mês de setembro.

Assim, o estudo comprova que o ato de beber e dirigir, somado à negligência

e imprudência, resulta nas inúmeras infrações e acidentes de trânsito registrados em todo o mundo. E mais, que o grupo prevalente de indivíduos que apresentam alcoolemia positiva quando envolvidos em ocorrências de trânsito, nos leva a acreditar que são contra as medidas de prevenção criadas e aplicadas pelas autoridades competentes, com o intuito de preservar a vida.

As limitações encontradas no presente estudo foram o não preenchimento de todos os campos presentes nas requisições de exame de dosagem alcoólica e a não obrigatoriedade para a realização de testes de alcoolemia por parte dos infratores e vítimas não fatais de ocorrências de trânsito.

Referências

1. Toro K, Hubay M, Sotonvi P, Keller E. Fatal traffic injuries among pedestrians, bicyclists and motor vehicle occupants. *Forensic Sci. Int.* 2005;151(2/3):151-6.
2. Edwards G, Marshall EJ, Cook CCH. O tratamento do alcoolismo: um guia para profissionais de saúde. Porto Alegre: *Artmed*. 2005; Cap.6:88-9.
3. Shults R, Elder RW, Sleet DA, Nichols JL, Alao MO, Carande-Kulis VG, et al. Review of evidence regarding interventions to reduce alcohol-impaired driving. *Am J. Prev. Med.* 2001;21:66-8.
4. World Health Organization. Fifty-Eighth World Health Assembly. A58/18. Provisional agenda item 13.14.7 April 2005. Public health problems caused by harmful use of alcohol. *Report by the Secretariat*. Geneva 2005:1-4.
5. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Análise de Situação em Saúde. Mortalidade por acidentes de transportes terrestre no Brasil. Brasília – DF; 2007.
6. Instituto de Pesquisa Econômica e Aplicada (IPEA). Associação Nacional de Transportes Públicos (ANTP): Impactos sociais e econômicos dos acidentes de trânsito nas aglomerações urbanas: relatório executivo. Brasília: IPEA, ANTP, 2006.
7. De Martinis BS, De Paula CM, Braga A, Moreira HT, Martin CC. Alcohol distribution in different postmortem body fluids. *Hum. Exp. Toxicol.* 2006; 25(2):93-7.
8. Pereira RE, Perdoná GSC, Zini LC, Cury MBS, Ruzzene MAM, Martin CCS, et al. Relation between alcohol consumption and traffic violations and accidents in the region of Ribeirão Preto, São Paulo State. *Forensic Sci. Int.* 2011;207:164-9.
9. Appenzeller BMR, Schneider S, Yegles M, Maul A, Wenning R. Drugs and chronic alcohol abuse in drivers. *Forensic Sci. Int.* 2005;155:83-90.
10. Gazal-Carvalho C, Carlini-Contrim B, Silva AO, Sauaia N. Blood alcohol content prevalence among trauma patients seen at a level 1 trauma center. *Rev. Saúde Pública.* 2002;36(1):47-54.

11. Cheng JYK, Chan DTW, Mok VKK. An epidemiological study on alcohol/drugs related fatal traffic crash cases of deceased drivers in Hong Kong between 1996 and 2000. *Forensic Sci. Int.* 2005;153:196-201.
12. Duailibi S, Pinsky I, Laranjeira R. Prevalência do beber e dirigir em Diadema, estado de São Paulo. *Rev. Saúde Pública.* 2007;41(6):1058-61.
13. Mura P, Kintz P, Ludes B, Gaulier JM, Marquet P, Martin-Dupont S, et al. Comparison of the prevalence of alcohol, cannabis and other drugs between 900 injured drivers and 900 control subjects: results of a French collaborative study. *Forensic Sci. Int.* 2003; 133:79-85.
14. Ponce JC, Munõz DR, Andreuccetti G, Carvalho DG, leyton V. Alcohol- related traffic accidents with fatal outcomes in the city of São Paulo. *Accident Anal. Prev* 2011 43, 782-787.
15. Drummer OH, Gerostamoulos J, Batziris H, Chu N, Caplehorn JRM, Robertson MD, et al. The incidence of drugs in drivers killed in Australian road traffic crashes. *Forensic Sci. Int.* 2003;134:154-62.
16. Del Rio MC, Gomez J, Sancho M, Alvarez FJ. Alcohol, illicit drugs and medicinal drugs in fattaly injured drivers in Spain between 1991 and 2000. *Forensic Sci. Int.* 2002;127:63-70.
17. Smart RG, Ogborne A. Drinking and heavy dinking by students in 18 countries. *Drug Alcohol Depend.* 2000; 60: 315–318.
18. Brewer RD, Morris PD, Cole TB, Watkins S, Patetta MJ, Pokins C. The risk of dying in alcohol-related automobile crashes among habitual drunk drivers. *N. Engl. J. Med.* 1994;331:513-7.
19. Smink BE, Ruiter B, Lusthof KJ, Zweipfenning PGM. Driving under the influence of alcohol and/or drugs in the Netherlands, 1995-1998 in view of the German and Belgian legislation. *Forensic Sci. Int.* 2001; 120:195-203.
20. Christophersen AS, Ceder G, Kristinsson J, Lillsunde P, Steentoft A. Drugged driving in the Nordic countries – a comparative study between five countries. *Forensic Sci. Int.* 1999;106:173-90.
21. Jones AW, Kugelberg FC, Holmgren A, Ahlner J. Five-year update on the occurrence of alcohol and other drugs in blood samples from drivers killed in road-traffic crashes in Sweden, *Int. Forensic Sci.* 2009;186:56–62.
22. Carlini-Cotrim B, Chasin AAM. Blood alcohol content (BAC) and death from fatal injury: a study in the metropolitan area of São Paulo, Brazil. *J. Psychoactive Drugs.* 2000;32(3):269-75.
23. Leyton V, Greve JMD'A, Carvalho DG, Munõz DR. Perfil epidemiológico das vítimas fatais por acidente de trânsito e a relação com o uso do álcool. *Rev. Saúde, Ética & Justiça.* 2005;10(1/2):12-8.

24. Modelli MES, Pratesi R, Tauil PL. Alcoolemia em vítimas fatais de acidentes de trânsito no Distrito Federal, Brasília. *Rev. Saúde Pública*. 2008;42(2):350-2.
25. Nery-Filho A, Medina MG, Melcop AG, Oliveira EM. Impacto do uso do álcool e outras drogas em vítimas de acidentes de trânsito. Brasília (DF): Associação Brasileira dos Departamentos Estaduais de Trânsito (ADBETRAN); 1997.
26. Lima JMB, Abreu AMM. O álcool e os acidentes de trânsito: estudo preliminar sobre mortalidade. In: Gigliotti, A. Dependência, compulsão e impulsividade. Rio de Janeiro: *Editora Rubio*. 2007; Cap.14:105-8.