

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento e validação de método para análise de drogas de abuso em urina empregando a microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME) e cromatografia em fase gasosa

Thiago Branco Hanna

Ribeirão Preto
2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento e validação de método para análise de drogas de abuso em urina empregando a microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME) e cromatografia em fase gasosa

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

Área de Concentração: Toxicologia

Orientado: Thiago Branco Hanna

Orientador: Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia em 24/04/2015. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2015

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Hanna, Thiago Branco

Desenvolvimento e validação de método para análise de drogas de abuso em urina empregando a microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME) e cromatografia em fase gasosa.

89 p. : il. ; 30cm.

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

Orientador: Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis.

1. Drogas de abuso. 2. DLLME. 3. GC-MS. 4. Validação. 5. Urina

FOLHA DE APROVAÇÃO

Thiago Branco Hanna

Desenvolvimento e validação de método para análise de drogas de abuso em urina empregando a microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME) e cromatografia em fase gasosa

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: _____

Dedico este trabalho aos meus pais, Conceição e Raider, à minha sempre companheira Livia , ao meu irmão Matheus e à minha família Cumari-Ribeirão-Guaxupé.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

Ao Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto.

Aos funcionários do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto.

Ao Sanatório Espírita São Vicente de Paulo por permitir a realização das coletas de amostras no Centro de Atenção Psicossocial (CAPS-AD) de Ribeirão Preto.

Às coordenadoras do CAPS-AD de Ribeirão Preto, Gisela Pires de Oliveira Marchini e Maria Cristina Taveira e aos funcionários Adilson Aparecido de Souza, Claudineia Andre Kamei, Eber Fernando de Matos, Emmanuel Nunes de Mello, Gisela Amorim Marques Pereira, Julio Carlos Marchiori, Maria Aparecida Barboza Martins, Natalia Prioli Jora, Neila Olivia Menezes Dellai, Tais Elene Junqueira Neme e a todos aqueles não citados que participaram direta ou indiretamente das coletas de amostras.

À CAPES e ao CNPq pelo auxílio concedido.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por tudo o que vivi, que me possibilitou chegar até aqui e me tornar quem eu sou; agradeço pelos bons momentos que me fizeram celebrar a vida e pelos momentos difíceis que me fizeram crescer. Obrigado por nunca ter me abandonado e por nunca ter me deixado fraquejar.

Ao Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis por ter aceitado o desafio de me orientar neste trabalho, por me passar ensinamentos valiosíssimos, por sua amizade, carinho, compreensão, pelos momentos de brincadeira e descontração e por ter acreditado em meu potencial.

Aos meus pais Raider e Conceição, por seu amor, apoio e carinho incondicionais, por me proporcionarem sempre o melhor, por me incentivarem a prosseguir, por sempre acreditarem em meu potencial e por serem meus guias, minhas referências.

À Lívia, meu amor, minha companheira, conselheira, amiga, revisora, um dos meus pilares; sem você muito não seria possível. Te amo e te admiro grandemente.

Ao meu irmão Matheus, que apesar dos nossos conflitos, desejo sempre seu melhor.

Aos meus tios Ebinho e Jusi e às minhas pequenas (hoje não tão pequenas) primas Amanda e Camila por seu amor e carinho, por me acolherem e estarem sempre dispostos para o que eu precisasse.

Às minhas tias Teresinha e Rita por tentarem sempre me agradar e por seu amor e carinho.

Aos meus avós Maria (*in memorian*) e José (*in memorian*); vocês nos fazem muita falta.

Aos meus avós Vandelzita e Hanna (*in memorian*).

À minha segunda família Sr. Olindo, D. Darci, Libânia, Rosinha, Zé Augusto, Tereza, Maurão, Zé Geraldo, Vanessa, Carol, Laís e Pedro por todos os ótimos momentos vivenciados.

Ao meu grande amigo Carlos por ser sempre companheiro, pelos ótimos momentos vivenciados.

Aos amigos e colegas de laboratório Brenda, Bruno, Cássio, Dayanne, Eduardo Fabiana, Fabrício, Fernanda M., Fernanda (FID), Laís, Leonardo, Lidiane, Mariana e Ricardo, por tornarem o trabalho mais divertido, mais agradável e por todos os momentos vividos. Um agradecimento especial à Marcela, grande amiga, por auxiliar-me nas coletas e por seu companheirismo e cumplicidade.

A todos aqueles que não foram citados e que contribuíram direta ou indiretamente neste trabalho.

“Chemistry is the study of matter. But I prefer see as the study of change. Just think about it. Electrons, they change their energy levels. Molecules, molecules change their bounds. Elements, they combine and change into compounds. That's all of life, right? It's the constant, it's the cycle. Solution, dissolution over and over. Growth and decay, then, transformation. It is fascinating, really.”

Walter White

RESUMO

HANNA, T.B. **Desenvolvimento e validação de método para análise de drogas de abuso em urina empregando a microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME) e cromatografia em fase gasosa.** 2015. 118 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Desde os primórdios da civilização o homem utiliza substâncias que causam modificações na percepção da realidade e também por vivenciar sensações prazerosas promovidas por estas. O abuso de drogas consiste em um padrão de utilização onde o indivíduo começa a sofrer prejuízos físicos, psicológicos, legais ou sociais e consiste em um problema de saúde pública de nível mundial. Para a presente pesquisa, foi desenvolvido um método de análise que utiliza a microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME) e a cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) para a pesquisa de drogas e metabólitos em amostras de urina de pacientes em tratamento pelo Centro de Atenção Psicossocial em Álcool e Drogas (CAPS-AD) de Ribeirão Preto. As substâncias que foram analisadas são a anfetamina, metanfetamina, metilendioxianfetamina (MDA), metilendioximetanfetamina (MDMA), metilendioxietilamfetamina (MDEA), anidroecgonina metil éster (AEME), cocaína, cocaetileno, benzoilecgonina, codeína, morfina, heroína e 6-monoacetilmorfina. Para a extração dos analitos das amostras de urina foram estabelecidas e validadas as seguintes condições: utilização de 3,0 mL de urina; mistura de solventes composta por 150 µL de clorofórmio (solvente extrator) e 1400 µL de isopropanol (solvente dispersor), 2,0 mL de tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 10,3 ± 0,5 para a manutenção do pH das amostras e 100 ng dos padrões internos: anfetamina-D11, MDMA-D5, cocaína-D3 e heroína-D9. O extrato resultante foi evaporado, ressuspendido em acetato de etila e derivatizado utilizando N-Metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA) sob aquecimento a 60° C durante 30 min. O método analítico desenvolvido e validado apresentou: seletividade; linearidade na faixa de 10-400 ng/mL para todos os analitos, exceto a AEME, onde a faixa linear foi de 50-300 ng/mL; os coeficientes de correlação linear (r) de todos os analitos foram superiores a 0,99; a precisão e a exatidão ficaram dentro do intervalo preconizado pelos guias de validação utilizados; não foi observado efeito residual; as amostras apresentaram estabilidade de curta duração, estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento e estabilidade pós-processamento. Foram coletadas 117 amostras de urina dos pacientes em tratamento pelo CAPS-AD de Ribeirão Preto. A análise por GC-MS confirmou a presença de cocaínicos em 75% das amostras analisadas (positividade 60% maior em comparação aos testes preliminares). Destas, 51% apresentaram o marcador AEME, que indica o uso da cocaína em base livre (crack) e 52% apresentaram o marcador cocaetileno, que indica o uso concomitante de álcool. Não foram encontrados resultados positivos para os analitos anfetamínicos e opióides. Face aos resultados obtidos, podemos concluir que a técnica de extração otimizada e o método analítico desenvolvido são adequados e de uso promissor para a identificação e quantificação simultânea de drogas de abuso e seus principais metabólitos em amostras de urina.

Palavras-chave: Drogas de abuso; DLLME; GC-MS; Validação; Urina

ABSTRACT

HANNA, T.B. **Development and validation of a method for analysis of drugs of abuse in urine using the dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) and gas chromatography**. 2015. 118 f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciencias Farmaceuticas de Ribeirao Preto – Universidade de Sao Paulo, Ribeirao Preto, 2015.

Since the dawn of civilization man has used substances that cause changes in perception of reality and also to experience pleasurable sensations promoted by them. Drug abuse is a pattern of use where the individual begins to suffer physical, psychological, legal or social damage and consists of a public health problem worldwide. To this research, was developed a method which uses dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) technique and gas chromatography analysis coupled to mass spectrometry (GC-MS) for the detection of drugs and metabolites in urine samples of patients in treatment by Psychosocial Care Center on Alcohol and Drugs (CAPS-AD) in Ribeirão Preto. Substances that have been analyzed are amphetamine, methamphetamine, methylenedioxyamphetamine (MDA), methylenedioxymethamphetamine (MDMA), methylendioxyethylamphetamine (MDEA), methyl ester anidroecgonine (AEME), cocaine, cocaethylene, benzoylecgonine, codeine, morphine, heroin and 6-monoacetylmorphine. For the analyte extraction from urine samples, the following conditions were established and validated: use of 3.0 mL of urine; solvent mixture composed of 150 uL of chloroform (extractor solvent) and 1400 uL isopropanol (dispersing solvent), 2.0 ml of 0.2 M sodium phosphate buffer pH 10.3 ± 0.5 for the pH samples maintenance and 100 ng of internal standards: amphetamine-D11, MDMA-D5, cocaine-D3 and heroin-D9. The resulting extract was evaporated, resuspended in ethyl acetate and derivatized using N-Methyl-N- (trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA) under heating at 60° C for 30 min. The developed and validated analytical method presented: selectivity; linearity in the range of 10-400 ng/ml for all analytes except AEME, where the linear range was 50-300 ng/ml; the linear correlation coefficients (r) of all analytes were greater than 0.99; precision and accuracy were within the recommended range used for validation guides; residual effect was not observed; the samples showed a short-term stability, stability after cycles of freezing and thawing and post-processing stability. We collected 117 urine samples from patients treated by CAPS-AD of Ribeirão Preto. The GC-MS confirmed the presence of cocaine in 75 % of the samples (positivity 60% higher compared to preliminary tests). Of these, 51% had the AEME marker, indicating the use of cocaine free base (crack) and 52% have the cocaethylene marker, indicating the concomitant use of alcohol. No positive results for amphetamines and opioids analytes were found. Considering our results, we conclude that the extraction technique and the analytical method developed are suitable and promising use for simultaneous identification and quantification of drugs of abuse and its main metabolites in urine samples.

Keywords: Drugs of abuse; DLLME; GC-MS; Validation; Urine.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Principais produtos das vias metabólicas para morfina, heroína e codeína. As porcentagens correspondem à quantidade aproximada do composto convertido no metabólito indicado e a eliminação urinária dos compostos em 24 h (Fonte: Pubchem, 2013). 4
- Figura 2** - Biotransformação da cocaína. As porcentagens correspondem à eliminação urinária dos compostos em 24 h (Fonte: Pubchem, 2013). 6
- Figura 3** - Conversão da cocaína em base livre em anidroecgonina metil éster e formação da ecgonidina (Fonte: Pubchem, 2013). 7
- Figura 4** - Formação do cocaetilenol por esterificação com o etanol e metabolismo do produto a outros ésteres de cocaína e metabólitos via esterases (Fonte: Pubchem, 2013). 8
- Figura 5** - Metabolismo da metanfetamina. As porcentagens correspondem à eliminação urinária dos compostos em 24 h (Fonte: Pubchem, 2013). 10
- Figura 6** - Metabolismo do MDMA. As porcentagens correspondem à eliminação urinária dos compostos em 24 h (Fonte: Pubchem, 2013). 12
- Figura 7** - Procedimento da microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME) (Adaptado de CALDAS; GONÇALVES; PRIMEL, 2011). 16
- Figura 8** - Variações da técnica de DLLME (adaptado de SPIETELUN *et al.*, 2014). 17
- Figura 9** - Delineamento dos experimentos para avaliação de volume dos solventes extrator e dispersor. 30
- Figura 10** - Interpretação do teste preliminar para drogas de abuso em urina. 39
- Figura 11** - Cromatograma obtido pela análise de uma amostra em solução após otimização das condições cromatográficas em modo seletivo de íons (SIM). Anfetamina-D11 (ANF-D11), anfetamina (ANF), metanfetamina (MET), anidroecgonina metil éster (AEME), metilenodioxianfetamina (MDA), metilenodioximetanfetamina-D5 (MDMA-D5), metilenodioxietilanfetamina (MDEA), cocaína-D3 (COC-D3), cocaína (COC), cocaetilenol (CE), benzoilecgonina (BE), codeína (COD), morfina (MORF), 6-monoacetilmorfina (6-AM), heroína-D9 (HER-D9), heroína (HER). 40
- Figura 12** - Avaliação da extração de drogas de abuso e seus principais metabólitos utilizando clorofórmio como solvente extrator. Amostras fortificadas na concentração de 40,0 ng/mL para cada analito. Volume de solvente extrator: 100 µL de clorofórmio. Volume dos solventes dispersores: 400 µL. Os resultados representam a média de três determinações ± erro padrão da média (E.P.M.). 41
- Figura 13** - Avaliação da extração de drogas de abuso e seus principais metabólitos utilizando tetracloreto de carbono como solvente extrator. Amostras fortificadas na concentração de 40,0 ng/mL para cada analito. Volume de solvente extrator: 100 µL de tetracloreto de carbono. Volume dos solventes dispersores: 400 µL Os resultados representam a média de três determinações ± E.P.M. 42

- Figura 14** - Avaliação da influência do volume dos solventes extrator e dispersor utilizados no processo de extração dos analitos. Volume do solvente extrator: 100 μ L de clorofórmio; volume do solvente dispersor: 400, 300, 200, 100 μ L de acetona. Os resultados representam a média de três determinações \pm E.P.M.....43
- Figura 15** - Avaliação da influência do volume dos solventes extrator e dispersor utilizados no processo de extração dos analitos. Volume do solvente extrator: 75 μ L de clorofórmio; volume do solvente dispersor: 400, 300, 200, 100 μ L de acetona. Os resultados representam a média de três determinações \pm E.P.M.....44
- Figura 16** - Avaliação da influência do volume dos solventes extrator e dispersor utilizados no processo de extração dos analitos. Volume do solvente extrator: 50 μ L de clorofórmio; volume do solvente dispersor: 400, 300, 200, 100 μ L de acetona. Os resultados representam a média de três determinações \pm E.P.M.....45
- Figura 17** - Avaliação da influência do volume dos solventes extrator e dispersor utilizados no processo de extração dos analitos. Volume do solvente dispersor: 400 μ L de acetona; volume do solvente extrator: 100, 75 e 50 μ L de clorofórmio. Os resultados representam a média de três determinações \pm E.P.M.46
- Figura 18** - Avaliação da influência dos pHs ácido, neutro e alcalino na extração dos analitos utilizando a DLLME. Solvente extrator: clorofórmio 100 μ L; solvente dispersor: acetona 400 μ L. Os resultados representam a média de três determinações \pm E.P.M.47
- Figura 19** - Avaliação da recuperação de diferentes analitos utilizando a DLLME. Volume do solvente extrator: 100 μ L de clorofórmio; volume do solvente dispersor: 400 μ L de acetona. Os resultados representam a média de três determinações \pm E.P.M.49
- Figura 20** - Avaliação da recuperação de diferentes analitos utilizando a DLLME. Volume do solvente extrator: 100 μ L de clorofórmio; volume do solvente dispersor: 400 μ L de acetonitrila. Os resultados representam a média de três determinações \pm E.P.M.49
- Figura 21** - Avaliação da recuperação de diferentes analitos utilizando a DLLME. Volume do solvente extrator: 100 μ L de clorofórmio; volume do solvente dispersor: 400 μ L de etanol. Os resultados representam a média de três determinações \pm E.P.M.50
- Figura 22** - Avaliação da recuperação de diferentes analitos utilizando a DLLME. Volume do solvente extrator: 100 μ L de clorofórmio; volume do solvente dispersor: 400 μ L de isopropanol. Os resultados representam a média de três determinações \pm E.P.M.50
- Figura 23** - Avaliação da recuperação de diferentes analitos utilizando a DLLME. Volume do solvente extrator: 100 μ L de clorofórmio; volume do solvente dispersor: 400 μ L de metanol. Os resultados representam a média de três determinações \pm E.P.M.51
- Figura 24** - Avaliação da recuperação de diferentes analitos utilizando a DLLME. Volume do solvente extrator: 150 μ L de clorofórmio; volume do solvente dispersor: 1400 μ L de isopropanol. Os resultados representam a média de três determinações \pm E.P.M.53
- Figura 25** - Sobreposição entre cromatogramas de uma amostra Branco e uma amostra LIQ em modo *full scan*. A amostra Branco é dada pela linha vermelha do cromatograma, enquanto a amostra LIQ é dada pela linha preta.....54

Figura 26 - Sobreposição entre cromatogramas de uma amostra Branco e uma amostra LIQ em modo <i>SIM</i> (selected ion monitoring). A amostra Branco é dada pela linha vermelha do cromatograma, enquanto a amostra LIQ é dada pela linha preta.	55
Figura 27 - Curvas de calibração, equação da reta e coeficiente de correlação linear dos analitos da classe dos anfetamínicos: ANF, MET, MDA, MDMA e MDEA.	57
Figura 28 - Curvas de calibração, equação da reta e coeficiente de correlação linear dos analitos da classe dos cocaínicos: AEME, COC, BE e CE.	58
Figura 29 - Curvas de calibração, equação da reta e coeficiente de correlação linear dos analitos da classe dos opióides: MORF, COD, 6-AM e HER.	58
Figura 30 - Incidência do uso de drogas de abuso considerando gênero dos pacientes em tratamento no CAPS-AD que participam da presente pesquisa.	62
Figura 31 - Faixa etária em grupos dos participantes da pesquisa.	63
Figura 32 - Idade em que houve o primeiro contato com drogas ilícitas.	63
Figura 33 - Consumo atual de drogas de abuso dos voluntários da pesquisa conforme questionários aplicados.	64
Figura 34 - Escolaridade dos voluntários envolvidos na pesquisa.	65
Figura 35 - Positividade das amostras submetidas ao imunoensaio frente à cocaína.	66
Figura 36 - Positividade das amostras submetidas ao imunoensaio frente à canabinóides.	67
Figura 37 - Positividade das amostras à cocaínicos.	67
Figura 38 - Diferenciação entre o uso de cloridrato de cocaína e cocaína em base livre nas amostras confirmadas como positivas para cocaínicos.	68
Figura 39 - positividade das amostras frente ao indicador de uso concomitante de cocaína e etanol.	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Proporção de indivíduos que tiveram contato com substâncias ilícitas pelo menos uma vez na vida.....	13
Tabela 2 – Estudos relacionados à DLLME, drogas de abuso e urina.....	22
Tabela 3 – Íons utilizados na identificação dos analitos.	27
Tabela 4 – Condições cromatográficas utilizadas nas análises.	27
Tabela 5 – Relação de padrões internos e pKa dos analitos envolvidos na análise.	29
Tabela 6 – Solventes extratores e solventes dispersores utilizados nos experimentos de otimização das condições de extração.....	30
Tabela 7 – Concentração (ng/mL) dos CQs utilizados.....	35
Tabela 8 – Condições estabelecidas para a extração dos analitos em amostras de urina por DLLME.	47
Tabela 9 – Coeficientes de variação obtidos com a utilização dos tampões carbonato de amônio e fosfato de sódio como soluções modificadoras de pH. Extração realizada empregando clorofórmio:isopropanol (SE:SD), 3 mL urina.	48
Tabela 10 – Novas condições estabelecidas para a extração dos analitos em amostras de urina por DLLME.....	51
Tabela 11 – Razões de volume de solvente dispersor e extrator.....	52
Tabela 12 – Condições otimizadas para a extração dos analitos em amostras de urina por DLLME.	53
Tabela 13 – <i>Fator matriz</i> dos analitos envolvidos na pesquisa.....	55
Tabela 14 – Faixa de trabalho e coeficientes de determinação do método.	56
Tabela 15 – Valores obtidos na avaliação da precisão e exatidão para cada analito.	59
Tabela 16 – Limites estabelecidos e sua precisão e exatidão.....	61
Tabela 17 – Resultados quantitativos das análises toxicológicas por substância das amostras analisadas por GC-MS.	69
Tabela 18 – Resultados das amostras situadas entre o limite de detecção e o limite de quantificação.	70
Tabela 19 – Resultados obtidos pela análise de todas as amostras por imunoenensaio e GC-MS..	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL – microlitro

3-OH-MeO-MA – 3-hidroxi-4-metoximetanfetamina

6-AM – 6-monoacetilmorfina

AALLME – do inglês *air-assisted liquid-liquid microextraction* - microextração líquido-líquido auxiliada por ar

AEME – anidroecgonina metil éster

ANF – anfetamina

BE – benzoilecgonina

BSTFA - N,O-bis-(trimetilsilil)trifluoroacetamida

CAPS-AD – Centro de Atenção psicossocial de Álcool e Drogas

CE – cocaetileno

CE-TOF-MS – do inglês *capillary electrophoresis – time off light – mass spectrometer*

CE-UV – do inglês *capillary electrophoresis – ultraviolet detector*

CIAME – do inglês *cold-induced aggregation microextraction* - microextração com agregação induzida por resfriamento

COC – cocaína

COD – codeína

CQ – controle de qualidade

CQA – amostra controle de qualidade alto

CQB – amostra controle de qualidade baixo

CQD – amostra controle de qualidade de diluição

CQM – amostra controle de qualidade médio

CV% – coeficiente de variação expresso em porcentagem

D-μ-SPE – do inglês *dispersive micro solid-phase extraction* - microextração dispersiva em fase sólida

d.i. – diâmetro interno

DLLME – do inglês *dispersive liquid-liquid microextraction* – microextração dispersiva líquido-líquido

DLLME-SFO – do inglês *dispersive liquid-liquid microextraction based in the solidification of a floating organic drop* - microextração líquido-líquido dispersiva baseada em solidificação da gota orgânica flutuante

E.P.M. – erro padrão da média

EPR – erro padrão relativo

EUA – Estados Unidos da América

FM – fator matriz

GC – do inglês *gas chromatography* – cromatografia em fase gasosa

GC-MS – do inglês *gas chromatography - mass spectrometry*, cromatografia em fase gasosa associada à espectrometria de massas

HER – heroína

HHA – 3,4-diidroxianfetamina

HHMA – 3,4-diidroximetanfetamina

HMMA – 4-hidroxi-3-metoximetanfetamina

HPLC-UV – do inglês *high pressure liquid chromatography – ultraviolet detector*

IL-DMME – do inglês *ionic liquid-linked dual magnetic microextraction* - microextração magnética por líquido iônico duplamente ligado

IL-USA-DLLME – do inglês *ionic liquid based ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction* - microextração líquido-líquido dispersiva baseada em líquidos iônicos auxiliada por ultrassom

IL-USAEME – do inglês *ionic liquid-based ultrasound-assisted emulsification microextraction* - microextração emulsiva líquido-líquido auxiliada por ultrassom baseada em líquidos iônicos

IP-SAME – do inglês *ion pair based surfactant assisted microextraction* - microextração auxiliada por surfactante com base em pares iônicos

ISFME – do inglês *in situ solvent-formation microextraction* - microextração por formação do solvente in situ

K – coeficiente de distribuição

LC/TOF-MS – do inglês *liquid chromatography/time off light-mass spectrometer*

LC-ES-MS/MS – do inglês *liquid chromatography-electrospray-mass spectrometer/mass spectrometer*

LD – limite de detecção

LENAD – Levantamento Nacional de Álcool e Drogas

LIQ – limite inferior de quantificação

LLE – do inglês *liquid-liquid extraction* – extração líquido-líquido

LQ – limite de quantificação

LSD – do alemão *Lysergsäurediethylamid* – dietilamida do ácido lisérgico

LSQ – limite superior de quantificação

M – molar

MDA – metilenodioxianfetamina

MDEA – metilenodioxietilamfetamina

MDMA – metilenodioximetamfetamina

MET – metanfetamina

mL – mililitro

MORF – morfina

MSTFA – N-Metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida

N – número

ng – nanograma

pH – potencial hidrogeniônico

PI – padrão interno

pKa – constante de dissociação

PMA – para-metoxianfetamina

r – coeficiente de correlação linear

S – Coeficiente angular da curva analítica

s – estimativa do desvio padrão da resposta

SA-DLLME – do inglês *surfactant-assisted dispersive liquid-liquid microextraction* - microextração líquido-líquido auxiliada por surfactante

SD-DLLME – do inglês *solvent demulsification dispersive liquid-liquid microextraction* - microextração líquido-líquido dispersiva com demulsificação por solvente

SFOD – do inglês *solidification of a floating organic drop* – Solidificação da gota orgânica flutuante

SI-DLLME – do inglês *sequential injection dispersive liquid-liquid microextraction* - microextração líquido-líquido dispersiva com injeção sequencial

SIM – do inglês *selected ion monitoring*

SM-DLLME – do inglês *supramolecular based dispersive liquid-liquid microextraction* - microextração líquido-líquido dispersiva com base supramolecular

SNC – Sistema Nervoso Central

SS-BVMME – do inglês *supramolecular solvent-based vortex-mixed microextraction* - microextração baseada em solvente supramolecular agitado por vórtex

ST-DLLME – do inglês *solvent terminated dispersive liquid-liquid microextraction* - microextração líquido-líquido dispersiva finalizada com solvente

SUSME – do inglês - *supramolecular solvent-based microextraction* - microextração baseada em solvente supramolecular

TCLE – termo de consentimento livre e esclarecido

TCMS – trimetilclorsilano

TEME – do inglês *totally organic solvent-free emulsification microextraction* - microextração emulsiva totalmente livre de solvente orgânico

TILDLME – do inglês *temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid-phase microextraction* - microextração dispersiva em fase líquida com controle de temperatura do líquido iônico

TMS – trimetilsilil

TMSI – trimetilsililimidazol

UA-IL-DLPME/UA-IL-DLLME – do inglês *ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid-phase/liquid microextraction* - microextração em fase/líquido-líquido dispersiva em líquidos iônicos auxiliada por ultrassom

UASEME – do inglês *ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction* - microextração emulsiva aprimorada por surfactante auxiliada por ultrassom

UASEME-SFO – do inglês *ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction with solidification of floating organic droplet* - microextração emulsiva aprimorada por surfactante auxiliada por ultrassom com solidificação da gota orgânica flutuante

UNODC – do inglês *United Nation Office on Drugs and Crime* - Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime

USAEME – do inglês *ultrasound-assisted emulsification microextraction* – microextração emulsiva auxiliado por ultrassom

USAEME – do inglês *ultrasound-assisted emulsification-microextraction* - microextração emulsiva auxiliada por ultrassom

USAEME-SFO – do inglês *ultrasound-assisted emulsification microextraction with solidification of floating organic droplet* - microextração emulsiva com solidificação da gota orgânica flutuante auxiliada por ultrassom

US-DLLME – do inglês *ultrasound dispersion liquid-liquid microextraction* - microextração líquido-líquido dispersiva ultrassônica

VALLME – do inglês *vortex-assisted liquid-liquid microextraction* - microextração líquido-líquido auxiliada por vórtex

VSLLME – do inglês *vortex-assisted surfactant-enhanced emulsification liquid-liquid microextraction* - microextração líquido-líquido emulsiva aprimorada por surfactante auxiliada por vórtex

VSLLME-SFO – do inglês *vortex-assisted surfactant-enhanced emulsification liquid-liquid microextraction with solidification of floating organic droplet* - microextração líquido-líquido emulsiva aprimorada por surfactante auxiliada por vórtex com solidificação da gota orgânica flutuante

Δ^9 -THC – Δ^9 -tetrahydrocannabinol

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vii
1 – Introdução.....	1
1.1 – Opiáceos e opióides.....	1
1.2 – Cocaína.....	4
1.3 – Anfetaminas	8
1.4 – Panorama do uso de drogas no Brasil	12
1.5 – Método para determinação de drogas de abuso	13
2 – Objetivos	24
2.1 – Objetivos gerais.....	24
2.2 – Objetivos específicos.....	24
3 – Material e métodos	25
3.1 – Equipamentos	25
3.2 – Reagentes e solventes.....	25
3.3 – Soluções-padrão	26
3.4 – Desenvolvimento de um método cromatográfico para análise de drogas de abuso e metabólitos por GC-MS	26
3.4.1 – Desenvolvimento das condições cromatográficas.....	26
3.5 – Desenvolvimento do processo de extração de drogas de abuso e metabólitos em urina utilizando a DLLME	28
3.5.1 – Preparo da matriz biológica para o processo de extração	28
3.5.2 – Escolha dos solventes extrator e dispersor	29
3.5.3 – Otimização do processo de extração das drogas e metabólitos em urina utilizando a DLLME	31
3.6 – Derivatização.....	31
3.7 – Validação analítica	32
3.7.1 – Seletividade/Especificidade	32
3.7.2 – Efeito residual	33
3.7.3 – Efeito matriz.....	33
3.7.4 – Linearidade (curva de calibração)	34
3.7.5 – Precisão	34
3.7.6 – Exatidão.....	35

3.7.7 – Limite de detecção (LD)	36
3.7.8 – Limites de quantificação (LQ)	36
3.7.9 – Estabilidade	37
3.8 – Perfil de uso de drogas	37
3.9 – Aspectos éticos da pesquisa	37
3.10 – Casuística	38
3.11 – Amostras.....	38
3.12 – Teste preliminar de drogas nas amostras de urina.....	38
4 - Resultados e discussão	40
4.1 – Análise Cromatográfica.....	40
4.2 – Processo de extração utilizando a DLLME.....	40
4.2.1 – Escolha dos solventes.....	40
4.2.2 – Influência do pH da amostra	46
4.3 Otimização do processo de extração	47
4.4 – Validação analítica	54
4.4.1 – Seletividade	54
4.4.2 – Efeito residual	55
4.4.3 – Efeito matriz.....	55
4.4.4 – Linearidade.....	56
4.4.5 – Precisão e exatidão	59
4.4.6 – Limites de detecção e de quantificação	60
4.4.7 – Estabilidade	61
4.5 – Perfil das amostras coletadas.....	62
5 – Conclusões	74
6 – Referências bibliográficas	75
7 – Anexos.....	84
Anexo 1	84
Anexo 2	85
Anexo 3	87
Anexo 4	89

Introdução

1 – Introdução

Ao longo dos tempos e de acordo com algumas culturas e crenças, determinadas alterações adaptativas no ser humano foram relevantes para que indivíduos ou grupos passassem a fazer uso de determinadas substâncias consideradas prazerosas, exóticas ou estimulantes. Investigações arqueológicas sugerem que o consumo de cerveja e vinho é anterior a 6.400 a.C.; o consumo do ópio é anterior a 5.000 a.C.; a utilização da *Cannabis sativa* data de cerca de 2.700 a.C., na China; evidências encontradas em antigos cemitérios indígenas das Américas Central e do Sul indicam que o hábito de mascar folhas de coca precede 2.500 a.C. (MAISTO, GALIZIO, CONNORS, 2011).

De certa forma, o uso destas substâncias pode ser refletido pela sensação de prazer que elas produzem e, concomitantemente, pela busca repetida pela mesma sensação. O abuso de drogas consiste em um padrão não aceito de consumo de substâncias, manifestado por consequências adversas significativas e recorrentes e está associado a alguns fatores como motivação e aprendizagem, abstinência, hedonismo e sensibilização (INeC, 2011).

O termo “droga de abuso” é utilizado para qualquer substância que cause danos físicos, psicológicos, legais ou sociais ao indivíduo ou outros afetados pelo comportamento do usuário, sendo comumente utilizado para se referir às tradicionais drogas de rua (p. ex.: cocaína, heroína, maconha e metanfetaminas) (PIZZOLATO, DE ALDA, BARCELÓ, 2007; MAISTO, GALIZIO, CONNORS, 2011).

1.1 – Opiáceos e opióides

Os opióides são depressores do sistema nervoso central (SNC). São encontrados no ópio ou em seus derivados. Os opióides incluem os opiáceos, juntamente com todos os compostos sintéticos e peptídeos endógenos. O termo opiáceo é utilizado para os compostos naturais e alguns derivados semissintéticos. Os termos geralmente são intercambiáveis, mas a denominação opióide é mais abrangente (DE WITT, 2001).

O ópio é proveniente da *Papaver somniferum*, uma das muitas espécies de planta da papoula. A papoula é nativa do Oriente Médio, em áreas de fronteira com o Mar Mediterrâneo, sendo extensivamente cultivada na Ásia e no Oriente Médio. Após a papoula florescer, as pétalas caem deixando uma vagem arredondada. Quando riscada gentilmente com uma lâmina, ocorre a secreção de uma seiva branca leitosa. Após secagem, a seiva se transforma em uma goma espessa marrom, que é chamada de ópio. O ópio seco é composto de aproximadamente 12% de morfina, 0,5 % de codeína, 0,2 % de tebaína e quantidades menores de papaverina e noscapina.

Os efeitos do ópio no organismo surgem após o consumo das substâncias por via oral ou quando são fumadas (DE WITT, 2001; NAJAFIPOUR, JOUKAR, MALEKPOUR-AFSHAR, 2010; KUN *et al.*, 2011; MAISTO, GALIZIO, CONNORS, 2011)

O uso de preparações de ópio é uma prática antiga. Há evidências de que Sumérios e Assírios cultivavam e utilizavam o ópio há mais de 6.000 anos. Os antigos Egípcios descobriram a utilização médica para os opióides há 3.500 anos, conforme documentado no papiro de Tebas. As civilizações Grega e Romana também utilizaram o ópio para uma variedade de propósitos médicos (MAISTO, GALIZIO, CONNORS, 2011).

A utilização do ópio com propósitos médicos e recreacionais foi muito difundida entre os islâmicos no Oriente Médio, possivelmente em virtude da proibição explícita do Alcorão ao uso de álcool e outras drogas que não incluem o ópio (LATIMUR, GOLDBERG, 1981). Atualmente o uso de opióides ainda é menos censurado que o de álcool entre alguns muçulmanos. Por mais de nove séculos, comerciantes árabes disseminaram o uso do ópio na Índia e na China, que também desenvolveram a prática de fumar o ópio (MAISTO, GALIZIO, CONNORS, 2011).

Desenvolvimentos no campo farmacêutico aumentaram os problemas de dependência. Em 1803, o farmacêutico alemão Friedrich Sertürner desenvolveu um processo que separava a morfina do ópio. A morfina é o principal componente ativo do ópio e é 10 vezes mais potente que o ópio bruto. Sertürner fez experiências com a morfina e ficou muito impressionado com o estado de felicidade e surrealidade induzido e nomeou o produto químico utilizando como referência Morfeu, o deus do sono na mitologia grega. A morfina começou a se tornar largamente disponível no meio do século XIX e, com o desenvolvimento concomitante da seringa hipodérmica, foi iniciada a utilização da morfina por via intravenosa. Devido seu rápido efeito e potente alívio da dor, a morfina foi o tratamento de escolha para ferimentos graves, levando a problemas de dependência na Europa e nos Estados Unidos (MAISTO, GALIZIO, CONNORS, 2011).

A morfina possui forte ação sedativa e analgésica. É rapidamente absorvida pelo organismo e sua biotransformação é principalmente hepática, através do sistema enzimático do retículo endoplasmático e apresenta uma meia-vida de 1,9 a 3,1 horas. No processo de biotransformação, a morfina é conjugada ao ácido glicurônico, formando os metabólitos morfina-6-glicuronídeo (ativo) e morfina-3-glicuronídeo (inativo), que são utilizados como biomarcadores de exposição à morfina na análise em amostras biológicas. A excreção ocorre principalmente por via renal, onde 54 a 74% da dose consumida são eliminados pela urina na forma de morfina-3-glicuronídeo, 7,5 a 12,5% na forma de morfina livre, 7 a 10% pelas fezes e 3 a 6% pelo ar expirado. Cerca de 80% da dose são excretados em 6 horas, e quase totalmente em

24 horas (RASHID *et al.*, 1998; IDRIS, ALNAJJAR, 2008, OGA, CAMARGO, BATISTUZZO, 2008; BERG *et al.*, 2009).

Em 1874, o químico britânico Alder Wright publicou relatórios de experimentos que produziram um novo composto químico baseado na alteração da morfina: a 3,6-diacetilmorfina. A descoberta não foi noticiada até 1898, quando o químico alemão Heinrich Dreser redescobriu o composto e notou que era mais poderoso que a morfina. Por ser tão poderoso, foi visto como novo tratamento com “heroicas” possibilidades e, portanto, batizado como heroína. Por possuir alta lipossolubilidade, a heroína é facilmente absorvida pelo organismo após administrada, atingindo rapidamente a corrente circulatória, difundindo-se com facilidade através de vários órgãos e tecidos, principalmente através da barreira hemato-encefálica, acumulando-se no SNC (MAISTO, GALIZIO, CONNORS, 2011).

A heroína possui uma meia-vida plasmática de aproximadamente 5 minutos. É rapidamente degradada por esterases. O grupamento 3-acetil é atacado quase imediatamente após a injeção e, em alguns minutos, praticamente toda a heroína é convertida ao metabólito 6-monoacetilmorfina. O grupamento 6-acetil também é atacado, porém em uma taxa menor. A perda de ambos os grupamentos acetil geram a morfina. Até 80% de uma dose consumida são excretados na urina dentro de 24 horas, principalmente na forma de morfina-3-glicuronídeo, de 5 a 7% como morfina e cerca de 1% como 6-monoacetilmorfina (DE WITT, 2001; JONES *et al.*, 2013).

O metabólito morfina-3-glicuronídeo é utilizado como marcador para a confirmação do consumo de morfina e heroína, enquanto o metabólito 6-monoacetilmorfina é utilizado para identificar o uso recente da heroína e distingue seu consumo da morfina. A heroína foi muito utilizada como antitussígeno e analgésico e, em poucos anos, foi descoberto que seu consumo induzia mais dependência que a morfina (GEROSTAMOULOS *et al.*, 1993; RASHID *et al.*, 1998; FERNÁNDEZ *et al.*, 2006; MAISTO, GALIZIO, CONNORS, 2011).

A codeína ocorre naturalmente como alcaloide do ópio. Foi isolada em 1833 por Pierre Robiquet e seus efeitos analgésicos foram conhecidos pouco tempo depois. A codeína constitui cerca de 0,5% do ópio, que continua sendo uma fonte importante para sua produção, embora a maior parte da codeína utilizada medicinalmente seja preparada pela metilação da morfina. A codeína é menos potente que a morfina, em uma proporção de 1:10. É metabolizada no fígado por glicuronidação na posição 6-OH, a principal rota; N-desmetilação a norcodeína (10-20%); e O-desmetilação à morfina (5-15%). Entre 5 e 15% da dose consumida são excretados de forma inalterada na urina. (WILLIAMS, HATCH, HOWARD, 2001).

A **Figura 1** apresenta os principais produtos das vias metabólicas para morfina, heroína e codeína e sua eliminação urinária.

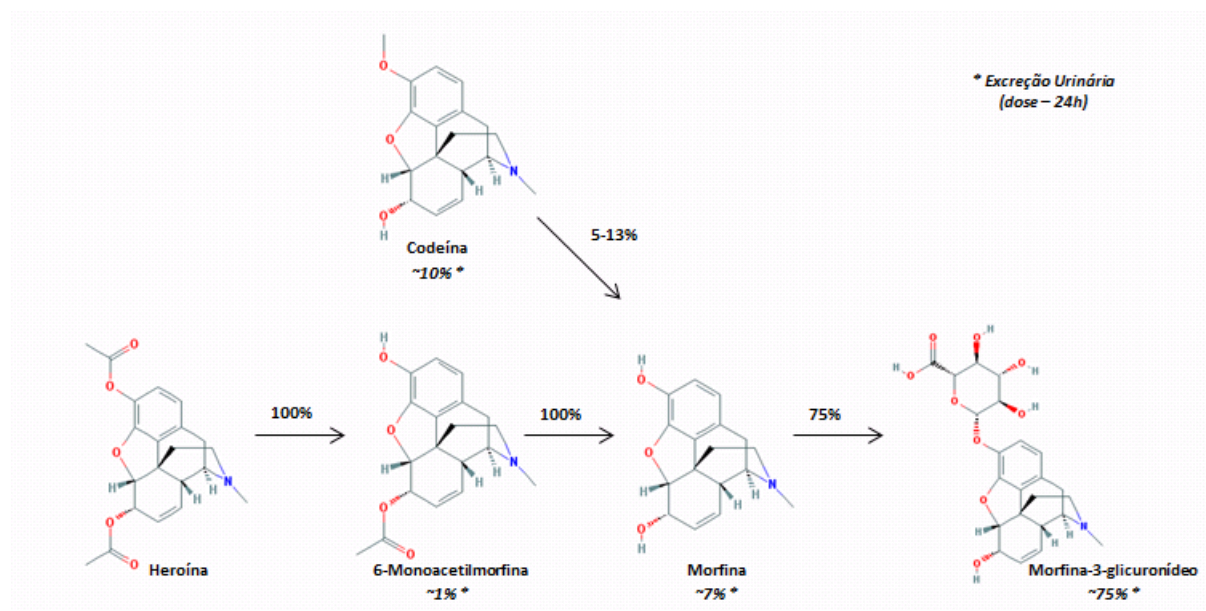


Figura 1 - Principais produtos das vias metabólicas para morfina, heroína e codeína. As porcentagens correspondem à quantidade aproximada do composto convertido no metabólito indicado e a eliminação urinária dos compostos em 24 h (Fonte: Pubchem, 2013).

1.2 – Cocaína

A *Erythroxylum coca* é um pequeno arbusto nativo das regiões da Bolívia, Equador, Peru e norte da Argentina. Das folhas desta planta é extraído um poderoso estimulante, a cocaína (benzoilmetilecgonina – $C_{17}H_{21}NO_4$). O uso desta droga é moderadamente antigo. Por séculos, os habitantes nativos desta região da América do Sul, incluindo Incas e seus descendentes, tinham o hábito de mascar folhas de coca. Não se sabe quando esta prática se iniciou, mas achados arqueológicos indicam várias centenas de anos. Os Incas chamavam a planta de “presente do deus Sol” e acreditavam que a folha lhes concedia poderes sobrenaturais. Durante a ascensão do império Inca, as folhas de coca eram reservadas à nobreza e às cerimônias religiosas, devido sua origem divina. Com a conquista dos Incas pelos espanhóis, o uso da coca foi banido. Os conquistadores logo descobriram que os escravos trabalhavam mais e necessitavam de menos alimentos se mascassem as folhas de coca; a Igreja Católica começou a cultivar a coca e, em alguns casos, utilizava as folhas como pagamento aos “índios”. Apesar dos relatos dos efeitos estimulantes alcançarem a Europa, o uso da coca não ganhou popularidade devido às plantas de coca não se desenvolverem naquele continente e à perda do princípio ativo contido nas folhas durante o transporte. Após o isolamento da cocaína presente nas folhas pelo alemão Albert Niemann, em 1860, e subsequente purificação da droga, ela se tornou popular,

sendo utilizada como medicamento em misturas com vinhos (Vin de Coca) e outras formulações. O interesse pelo uso da cocaína aumentou e os médicos começaram a prescrevê-la para uma variedade de sintomas. No início do século XX tomou-se conhecimento de seus efeitos maléficos e houve reavaliação de seu uso. Foram tomadas medidas para o controle de sua produção e comercialização, o que restringiu seu uso até 1960, quando entrou novamente em foco (DE WITT, 2001; MAISTO, GALIZIO, CONNORS, 2011).

A folha boliviana contém apenas 0,5 % de cocaína e seu conteúdo diminui rapidamente após a colheita. A cocaína surgiu como droga de abuso entre 1970 e 1980, devido a um aumento do suprimento e diminuição dos custos de produção (WHITE, LAMBE, 2003).

A cocaína é uma droga com propriedades anestésicas (potente anestésico local) e vasoconstrictoras, sendo benéfica em cirurgias que se necessite diminuir o sangramento, como as de orelha, nariz e garganta. A dose máxima segura para uso médico é de 3 mg/kg. Entretanto, o uso médico da cocaína diminuiu notavelmente desde seu apogeu, entre 1880-1900, quando um aumento da produção de cocaína refinada levou a um aumento dos relatos médicos em relação à toxicidade e mortalidade causadas pela cocaína, sendo então substituída por outros anestésicos locais, como a lignocaína, que não produz efeitos colaterais simpatomiméticos (WHITE, LAMBE, 2003).

É frequentemente encontrada como pó cristalino, o cloridrato de cocaína, obtido através do tratamento da pasta de coca purificada com ácido clorídrico. Sob esta forma, não se volatiliza e se decompõe com o aumento da temperatura. A administração do cloridrato de cocaína ocorre por aspiração nasal, por via oral ou por via intravenosa (WHITE, LAMBE, 2003; OGA, CAMARGO, BATISTUZZO, 2008).

A forma mais comum de comercialização da cocaína em base livre é o *crack*, preparado através do aquecimento da solução aquosa de cloridrato de cocaína em adição a um composto alcalino (geralmente bicarbonato ou hidróxido de sódio). Aquece-se até obtenção de uma substância oleosa e resfria-se, posteriormente, em banho de gelo até a precipitação da base livre. O aspecto resultante é o de cristais irregulares em forma de “pedras”, nome pelo qual é popularmente referido (WHITE, LAMBE, 2003; OGA, CAMARGO, BATISTUZZO, 2008).

Frequentemente ocorrem adulterações, tanto no cloridrato de cocaína, quanto na cocaína em base livre, compondo as drogas encontradas nas ruas. Como adulterantes, geralmente são utilizados anestésicos locais e estimulantes; quanto aos diluentes: a glicose, lactose, sacarose, manitol, amido, talco, carbonatos, sulfatos, ácido bórico dentre outros (OGA, CAMARGO, BATISTUZZO, 2008).

Após absorvida, a cocaína é rapidamente biotransformada em ecgonina metil éster (EME) através das esterases plasmáticas e hepáticas e sofre hidrólise espontaneamente, originando a benzoilecgonina no plasma. Os produtos de excreção urinária representam de 32 a 49% ecgonina metil éster e 29 a 45% de benzoilecgonina. Outros produtos de biotransformação como a ecgonina, norcocaína e benzoilnorcocaina são encontrados, porém, em menor porcentagem (DE LA TORRE *et al.*, 1995; JANICKA, KOT-WASIK, NAMIÉSNIK, 2010). A **Figura 2** ilustra o processo de biotransformação da cocaína.

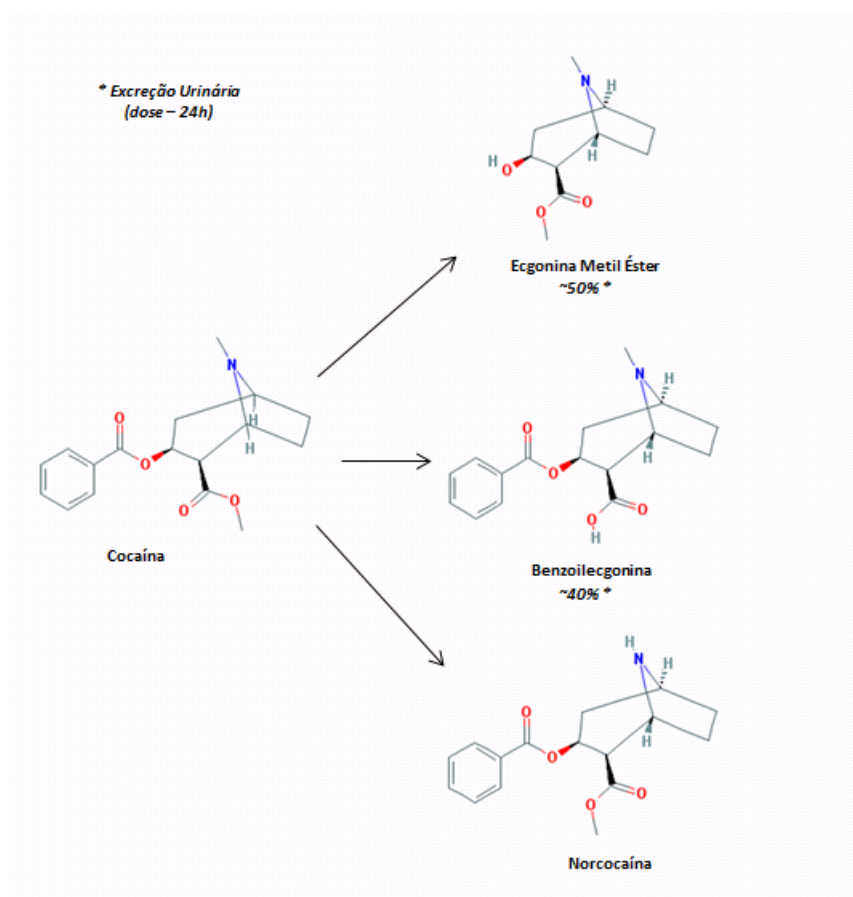


Figura 2 - Biotransformação da cocaína. As porcentagens correspondem à eliminação urinária dos compostos em 24 h (Fonte: Pubchem, 2013).

O aquecimento da cocaína em base livre (*crack*) produz o pirolizado anidroecgonina metil éster (AEME). Devido sua produção ocorrer via conversão térmica, a AEME pode ser utilizada como marcador para diferenciar entre o consumo da cocaína em base livre e o consumo de cloridrato de cocaína. A AEME já foi determinada em várias matrizes biológicas, apresentando maior concentração na urina. É metabolizada em ecgonidina pela atividade da esterase butirilcolina (SCHEIDWEILER *et al.*, 2003). A **Figura 3** ilustra este processo.

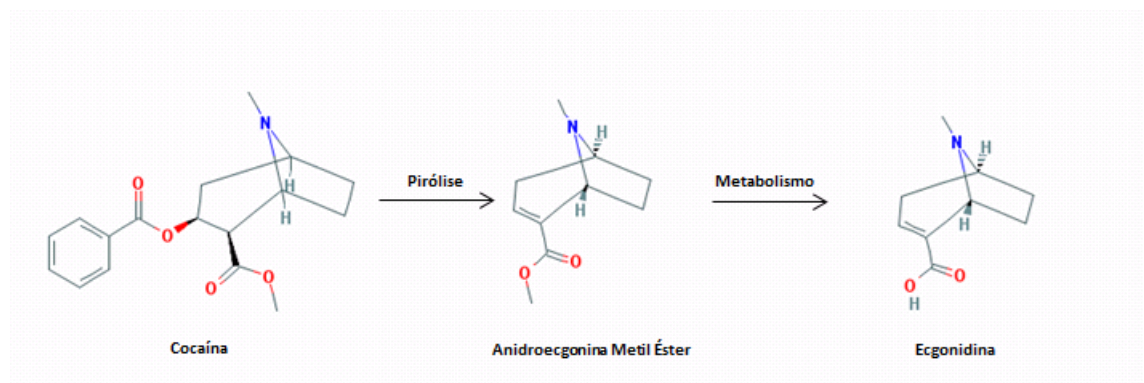


Figura 3 - Conversão da cocaína em base livre em anidroecgonina metil éster e formação da ecgonidina (Fonte: Pubchem, 2013).

Uma das substâncias frequentemente associada ao uso da cocaína é o etanol. Sabe-se que esta interação resulta no aparecimento de um terceiro produto, o cocaetileno, onde o grupo carboximetil da cocaína é transesterificado a carboxietil na presença do etanol, mediada por carboxiesterases. O cocaetileno atua no SNC de maneira semelhante à cocaína, explicando desta maneira o porquê desta associação ser tão frequente (ANTONILLI *et al.*, 2001).

O cocaetileno induz a um estado de euforia mais potente que a cocaína e proporciona “disforia” muito menos desagradável. Além disso, parece ser capaz de retardar o clearance da cocaína e prolongar seus efeitos. Por outro lado, é muito cardiotoxíco e pode induzir convulsões mesmo em baixas concentrações (COLEMAN, 2010). A **Figura 4** ilustra o processo de biotransformação da cocaína em cocaetileno.

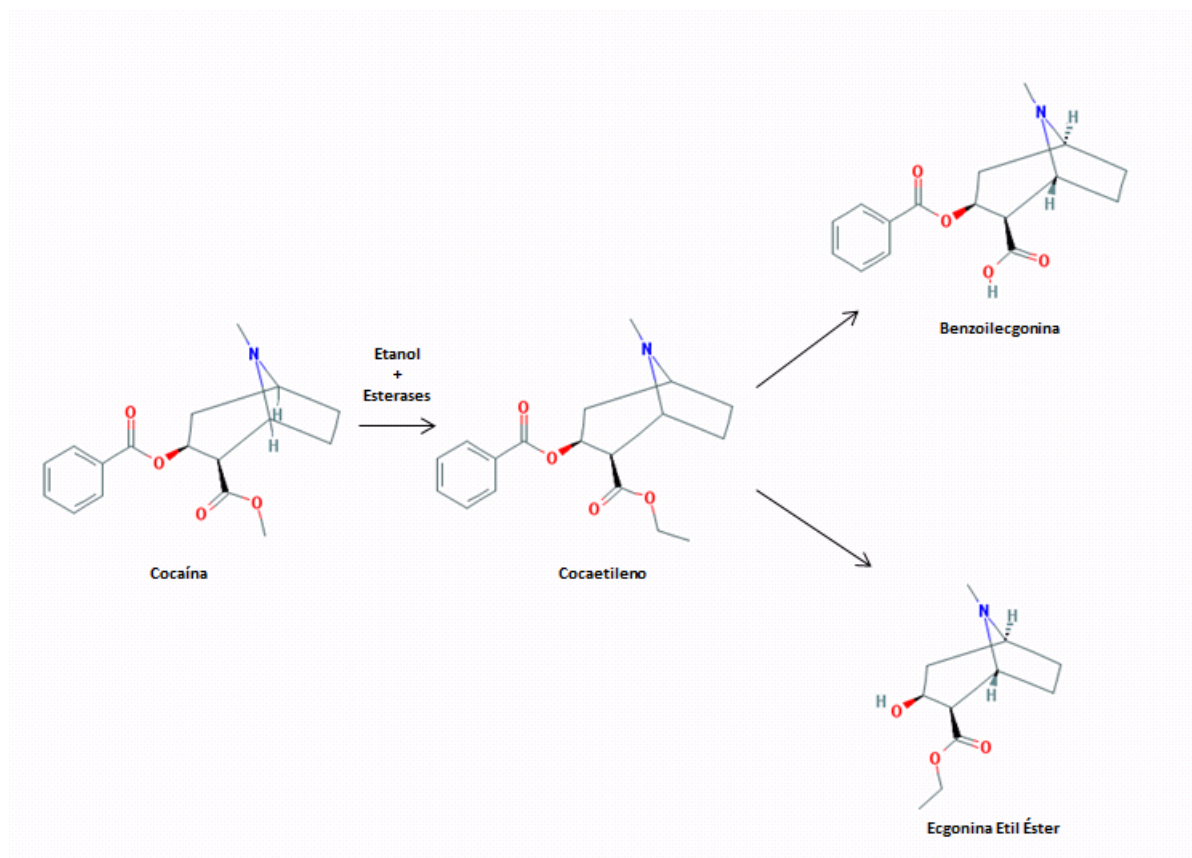


Figura 4 - Formação do cocaetileno por esterificação com o etanol e metabolismo do produto a outros ésteres de cocaína e metabólitos via esterases (Fonte: Pubchem, 2013).

A determinação simultânea de benzoilecgonina e ecgonina metil éster é uma forma confiável de se comprovar a utilização da cocaína; e a determinação do cocaetileno, produzido pela transesterificação hepática da cocaína em presença de álcool, pode apresentar relevância como marcador biológico do consumo de ambas as drogas (ORTUÑO *et al.*, 1990; DE LA TORRE *et al.*, 1995; ANTONILLI *et al.*, 2001).

1.3 – Anfetaminas

As anfetaminas foram sintetizadas pela primeira vez em 1887 por Lazăr Edeleanu, mas seus efeitos estimulantes do SNC não foram notados naquele tempo. Após sua redescoberta em 1930, foi utilizada como estimulante respiratório e suas propriedades estimulantes do SNC foram descritas. Assim como aconteceu com a cocaína, a anfetamina foi promovida como efetiva para a cura de várias doenças, sem risco de dependência. A medicina explorou com entusiasmo os potenciais efeitos da anfetamina, recomendando-a para a cura de tudo. Foi largamente utilizada no tratamento da obesidade, narcolepsia, hipotensão e síndrome de hiperatividade em crianças. O

rótulo de medicamento milagroso contribuiu para o aumento do interesse da população (DE WITT, 2001).

Derivados das anfetaminas, como a metanfetamina, rapidamente foram desenvolvidos em preparações orais e injetáveis e se tornaram disponíveis para uso terapêutico. Apesar de alguns relatos sobre reações adversas, enormes quantidades foram consumidas entre 1940 e 1950 e sua tendência ao abuso não foi reconhecida. Durante a II Guerra Mundial, as anfetaminas, incluindo a metanfetamina, foram largamente utilizadas como estimulantes por militares dos Estados Unidos, Grã-Bretanha, Alemanha e Japão para combaterem a fadiga, aumentar o estado de alerta durante a batalha e vigílias noturnas, aumentar a resistência e elevar o humor. Atualmente as anfetaminas são substâncias sob controle de comercialização devido a seu alto potencial de abuso, sendo aceitas somente para uso médico (DE WITT, 2001).

Anfetaminas são o segundo tipo de droga ilícita mais utilizado no mundo, depois da *Cannabis*. São atualmente produzidas por fabricantes legais e ilegais, existindo em múltiplas formas (DEGENHARDT *et al.*, 2010).

A metanfetamina é conhecida por sua atividade estimulante do SNC, com alto potencial para o abuso e tolerância. Por induzir uma forte dependência, leva à desintegração psicológica. Seu uso é controlado, entretanto, seu abuso continua endêmico (WATANABE, OKADA, KATSU, 1993).

A metanfetamina foi sintetizada em 1919 e seu d-isômero é considerado o derivado anfetamínico com maior potencial de abuso. Data de 1937 a primeira comercialização controlada da anfetamina, o que se deu em razão de suas propriedades estimulantes e reforçadoras (OGA, CAMARGO, BATISTUZZO, 2008).

É uma droga de abuso popular devido aos seus rápidos efeitos de euforia e facilidade de fabricação. A metanfetamina ilícita é disponível como pó cristalino hidrossolúvel, com nomes como “speed”, “crank”, “meth”, “crystal”, ou “ice”. A metanfetamina e seus metabólitos, sendo a anfetamina o principal deles, geralmente são detectados por análise em urina. Em um período de 24 horas, cerca de 40 a 50% de uma dose administrada de metanfetamina é excretada de forma inalterada e aproximadamente 7% é eliminada como anfetamina. Caldwell *et al.* (1972) mostrou que a excreção de produtos urinários da metanfetamina incluem 4-OH metanfetamina e a anfetamina como produto de N-desmetilação (**Figura 5**). A detecção de metanfetamina através do teste em urina é realizada após extração com solventes orgânicos, seguido de purificação (WATANABE, OKADA, KATSU, 1993; LIN *et al.*, 1997; HE, KANG, 2006; CONCHEIRO *et al.*, 2007).

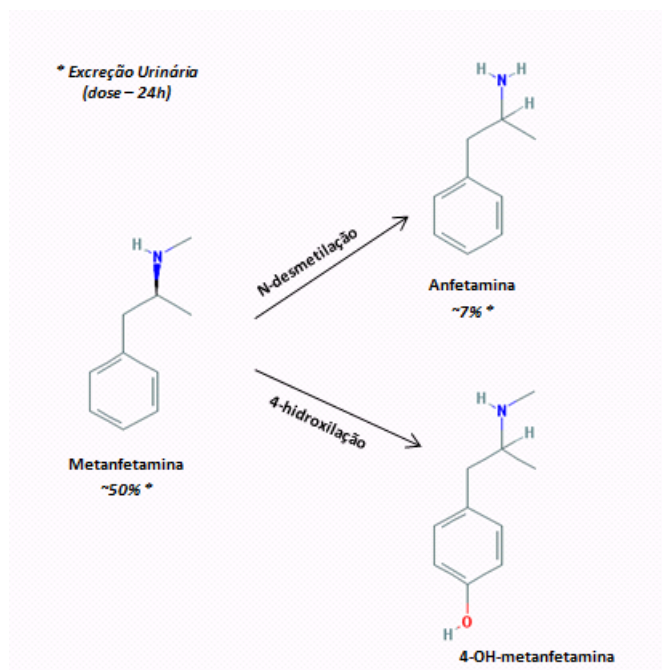


Figura 5 - Metabolismo da metanfetamina. As porcentagens correspondem à eliminação urinária dos compostos em 24 h (Fonte: Pubchem, 2013)

Anfetaminas aumentam a liberação de dopamina, noradrenalina e serotonina, estimulando o SNC, provocando efeitos como aumento da energia, sensação de euforia, diminuição do apetite, aumento da pressão arterial e frequência cardíaca, além de outros problemas fisiológicos (DEGENHARDT *et al.*, 2010).

A 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), a 3,4-metilenodioxietilamfetamina (MDEA), denominadas popularmente por *Ecstasy* e *Eve*, respectivamente e a 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA) se enquadram na categoria das chamadas *designer drugs* e apresentam efeitos psicotrópicos específicos, como capacidade aumentada da comunicabilidade, empatia e autoconhecimento, o que distingue esta classe de compostos das substâncias estimulantes e alucinógenas típicas. Estas substâncias são consideradas como anfetaminas alucinógenas (SADEGHIPOUR *et al.*, 1997; OGA, CAMARGO, BATISTUZZO, 2008).

A MDMA foi primeiramente desenvolvida para o uso como supressor do apetite, porém, nunca foi comercializada. Na década de 1970, um pequeno grupo de psiquiatras passou a utilizá-la em psicoterapias. A partir de 1983, a MDMA tornou-se uma droga recreacional e popular, especialmente entre estudantes (SADEGHIPOUR *et al.*, 1997; OGA, CAMARGO, BATISTUZZO, 2008).

O *ecstasy* é comercializado na forma de comprimidos que possuem grande variedade de cor, forma e tamanho, estampados com vários tipos de figuras e logotipos. Pode também ser

vendido na forma de cápsulas ou em pó. À semelhança das outras drogas comercializadas no mercado ilícito, a dose e a pureza destes comprimidos podem variar muito. A concentração típica presente nos comprimidos está entre 50 e 150 mg de MDMA, podendo variar 70 % ou mais. Dentre os principais adulterantes estão o MDEA, MDA, PMA (para-metoxianfetamina), efedrina, cafeína, dextrometorfano e cetamina (ketamina) (OGA, CAMARGO, BATISTUZZO, 2008; ES'HAGHI *et al.*, 2010).

O MDMA é também conhecido como potente liberador e/ou inibidor da recaptação de serotonina, dopamina e norefedrina pré-sináptica e essas ações contribuem para a estimulação do SNC. Os efeitos farmacológicos mais frequentes após a administração são euforia, bem-estar, estimulação, aumento da sociabilidade, mudança da percepção de cores e sons, aumento da frequência cardíaca e falta de apetite. Sua *overdose* pode causar severos efeitos de intoxicação, como estado de coma, sintomas alucinogênicos e apreensão (SHIMA *et al.*, 2007).

Para prova inequívoca do uso de MDMA, a detecção de seus metabólitos é geralmente realizada em amostras de urina. Alguns metabólitos, incluindo o MDA, 4-hidroxi-3-metoximetanfetamina (HMMA), 3,4-diidroximetanfetamina (HHMA) e 3-hidroxi-4-metoximetanfetamina (3-OH-MeO-MA) foram identificados em urina humana por cromatografia em fase gasosa associada à espectrometria de massas (GC-MS) (SHIMA *et al.*, 2007).

O metabolismo e excreção do MDMA em humanos e em modelos animais são bem documentados. Mais de 80% da dose ingerida de MDMA é eliminada após metabolismo hepático e cerca de 20% é excretado de forma inalterada na urina humana. A N-desmetilação do MDMA produz o MDA, que representa menos de 10% da dose ingerida. Tanto o MDMA quanto o MDA são O-desmetilados a HHMA (3,4-diidroximetanfetamina) e HHA (3,4-diidroxianfetamina), e subsequentemente O-metilados a HMMA e HMA (4-hidroxi-3-metoxianfetamina). O HMMA é descrito como o principal metabólito, com concentrações urinárias aproximadamente iguais àsquelas inalteradas de MDMA; MDA e HHA são considerados metabólitos em menor porcentagem em humanos (DA SILVA *et al.*, 2010) (**Figura 6**).

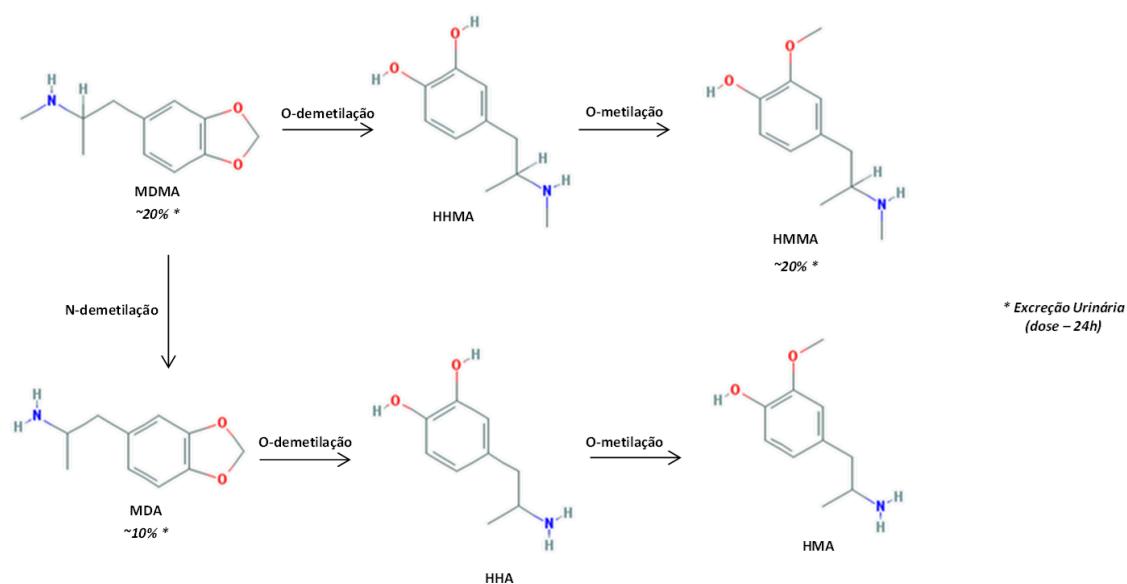


Figura 6 - Metabolismo do MDMA. As porcentagens correspondem à eliminação urinária dos compostos em 24 h (Fonte: Pubchem, 2013).

Em contraste à produção de cocaína e heroína, a produção, disponibilidade e consumo de anfetaminas/metanfetaminas é um processo dinâmico, uma vez que podem ser produzidas clandestinamente em qualquer localização geográfica e, comparativamente, por um menor preço (DEGENHARDT *et al.*, 2010).

1.4 – Panorama do uso de drogas no Brasil

O uso de álcool, drogas e tabaco é um fenômeno mundial que transcende a categoria de problema de saúde. No Brasil, conforme o II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (LENAD) (LARANJEIRA *et al.*, 2014), estudo realizado nas 108 maiores cidades do país, 22,8% da população de faixa etária entre 12 e 65 anos já fez uso, pelo menos uma vez na vida, de qualquer droga psicotrópica (exceto álcool e tabaco), o que corresponde a aproximadamente 12 milhões de pessoas. Embora esse número seja alto, são os usuários problemáticos (dependentes propensos à utilização diária e associada a outras drogas) que fazem o maior consumo, sendo responsáveis pela maior parte dos problemas de saúde e de ordem pública relacionados ao uso de substâncias psicoativas (ANDRADE, DUARTE, OLIVEIRA, 2010; LARANJEIRA *et al.*, 2014).

O Brasil foi apontado pelo Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime (UNODC) como uma das nações emergentes onde o consumo de estimulantes como a cocaína, seja na forma intranasal ou fumada, tem aumentado enquanto na maioria dos países o consumo

tem diminuído. Embora a sociedade brasileira tenha ciência da importância deste problema de saúde pública, seu conhecimento acerca dos padrões de consumo, dependência e problemas associados ao uso de cocaína, ainda são incipientes. Segundo levantamento realizado pelo II LENAD (LARANJEIRA *et al.*, 2014), a proporção de indivíduos que tiveram contato com substâncias de abuso, pelo menos uma vez na vida é dada na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Proporção de indivíduos que tiveram contato com substâncias ilícitas pelo menos uma vez na vida.

Substância	Adolescentes		Adultos	
	%	Número de indivíduos	%	Número de indivíduos
Cocaína	2,3	316.040	3,8	5.131.954
Estimulantes	1,3	182.302	2,7	3.694.737
Ritalina	0,6	87.050	0,4	568.249
Crack	0,8	108.867	1,3	1.766.438
Oxi	0,5	66.454	0,3	420.099
Tranquilizantes	2,5	342.209	9,6	12.842.014
Solventes	2,0	275.460	2,2	2.907.375
Ecstasy	0,5	70.985	0,7	949.804
Morfina	0,1	14.258	0,8	1.105.167
Heroína	0,2	25.854	0,2	208.958
Esteroides	0,8	112.212	0,6	862.833
Alucinógenos	1,4	191.646	0,9	1.208.616
Anestésicos	0,4	52.091	0,5	695.600
Metanfetamina	0,3	40.079	0,3	364.322
Maconha	4,3	597.510	6,8	7.831.476
Total População		13.947.197		134.370.019

Fonte: Laranjeira *et al.*, 2014

A substância ilícita com maior prevalência de uso na população brasileira é a maconha; a prevalência de uso de cocaína pela população adulta é de 3,8% e no caso dos adolescentes, 2,3% declararam ter utilizado pelo menos uma vez na vida. No caso dos tranquilizantes, 9,6% dos adultos e 2,5% dos adolescentes fizeram uso ao menos uma vez na vida, sendo a substância de maior prevalência. Estimulantes aparecem como a substância com quarta maior prevalência entre os adolescentes. A prevalência do uso de crack foi de 1,3% para os adultos e 0,8 % para os adolescentes (LARANJEIRA *et al.*, 2014).

1.5 – Método para determinação de drogas de abuso

Em medicina legal, a detecção de drogas de abuso é de interesse em âmbitos distintos, tanto no sujeito vivo quanto no cadáver. Sua determinação ocorre por análises laboratoriais, em indivíduos sob tratamento de desintoxicação e em diversos procedimentos legais (FERNANDÉZ *et al.*, 2008).

Geralmente, o controle do uso de drogas de abuso é realizado através da análise de amostras biológicas como sangue, soro, fluido oral, mecônio, urina, dentre outras (PIZZOLATO, DE ALDA, BARCELÓ, 2007).

A urina é um fluido biológico que pode ser utilizado na identificação de drogas devido às concentrações relativamente altas destes compostos e de seus metabólitos nesta matriz e à simplicidade de tratamento da amostra, em comparação ao sangue. Testes de urina proporcionam uma larga janela de detecção para drogas de abuso, de alguns dias para opiáceos e cocaína e até meses para usuários de canabinóides. Além disso, a urina apresenta facilidade de coleta, por não ser invasiva. Em contrapartida, amostras de urina são passíveis de adulteração, sendo necessária coleta assistida, que pode infringir a privacidade do indivíduo; e, em alguns casos, a urina pode não ser suficiente para avaliar a influência da substância no momento da ocorrência (PIZZOLATO, DE ALDA, BARCELÓ, 2007; DOWLING *et al.*; 2010).

Em muitos casos, a confirmação e a análise quantitativa das drogas e/ou metabólitos é feita somente quando uma triagem prévia das amostras, geralmente através de imunoenaios, sugere a presença destas substâncias. Então, amostras positivas são submetidas a análises confirmatórias e quantitativas (PIZZOLATO, DE ALDA, BARCELÓ, 2007; LU, O'DONNELL, HARRINGTON, 2009).

A cromatografia em fase gasosa (GC) é uma técnica analítica adequada para a identificação de drogas, devido sua sensibilidade e especificidade. A cromatografia em fase gasosa associada à espectrometria de massas (GC-MS) é uma técnica analítica que fornece informações como estrutura, composição e massa molecular do composto analisado, através da análise do espectro de massas (análise qualitativa), permitindo também a quantificação pela área dos picos (LOPES, 2011).

Para a obtenção de resultados exatos, confiáveis e sensíveis, um método de separação/pré-concentração da amostra é necessário previamente à análise cromatográfica (XIONG *et al.*, 2009).

Alguns procedimentos de separação/pré-concentração como extração líquido-líquido (LLE) e extração de fase sólida foram aplicados para a determinação de drogas (FARINA, YONAMINE, SILVA, 2002; GUNNAR *et al.*, 2004; LANGEL *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2012). Entretanto, a LLE consome tempo e normalmente exige uma grande quantidade de solventes orgânicos, que são potencialmente perigosos para a saúde humana. Extrações em fase sólida requerem equipamentos que utilizam pressão ou vácuo para auxiliar a passagem da amostra através dos cartuchos de extração, que são carregados com materiais específicos para adsorção

dos analitos e estes materiais podem ser relativamente caros (XIONG *et al.*, 2009; NOVÁKOVÁ, VLCKOVÁ, 2009; MENG *et al.*, 2011).

Em 2006, Rezaee e colaboradores desenvolveram uma nova técnica de extração em fase líquida, chamada microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME). Esse método é caracterizado por um sistema de extração ternário, onde o solvente extrator e o solvente dispersor são rapidamente injetados na amostra aquosa com o auxílio de uma seringa. Uma solução turva (amostra aquosa/solvente extrator/solvente dispersor) é formada no tubo. Após centrifugação, as partículas do solvente extrator são sedimentadas no fundo do tubo cônico. A fase sedimentada resultante é recolhida com o auxílio de uma microsseringa e submetida à análise. A DLLME é uma extração miniaturizada que utiliza microlitros de solvente extrator. Suas vantagens são operação simples, rapidez, baixo custo, alta recuperação, alto fator de enriquecimento, menos prejudicial ao meio ambiente e com ampla aplicação na análise de analitos em baixa concentração (REZAEI *et al.*, 2006; BERIJANI *et al.*, 2006; ZANG *et al.*, 2009).

A DLLME é baseada no processo de equilíbrio de distribuição dos analitos entre a amostra e o solvente extrator. O coeficiente de distribuição (K) é definido como a média entre a concentração do analito no solvente extrator e na amostra. A DLLME é aplicável apenas para analitos com propriedades altamente ou moderadamente lipofílicos ($K > 500$). Para analitos ácidos ou alcalinos, o coeficiente de distribuição precisa ser aumentado com o controle do pH da solução da amostra, fazendo com que os analitos passem para o estado não-ionizado (ZANG *et al.*, 2009).

O processo de extração por DLLME é ilustrado na **Figura 7**. Um determinado volume de amostra é transferido para um tubo de fundo cônico e, em seguida, a mistura de solventes (extrator e dispersor) é rapidamente injetada na amostra com o auxílio de uma seringa ou pipeta. Uma solução turva (amostra aquosa/solvente extrator/solvente dispersor) é formada, proporcionando uma enorme área interfacial entre o solvente de extrator e a amostra aquosa, facilitando a transição do analito presente na amostra para o solvente extrator; o estado de equilíbrio é alcançado rapidamente, resultando um curto tempo de extração, uma das principais vantagens da DLLME frente às técnicas de extração tradicionais. Finalmente, as gotículas dispersas são sedimentadas no fundo do tubo cônico através de centrifugação. A fase sedimentada é coletada e processada para a análise cromatográfica (ZANG *et al.*, 2009).

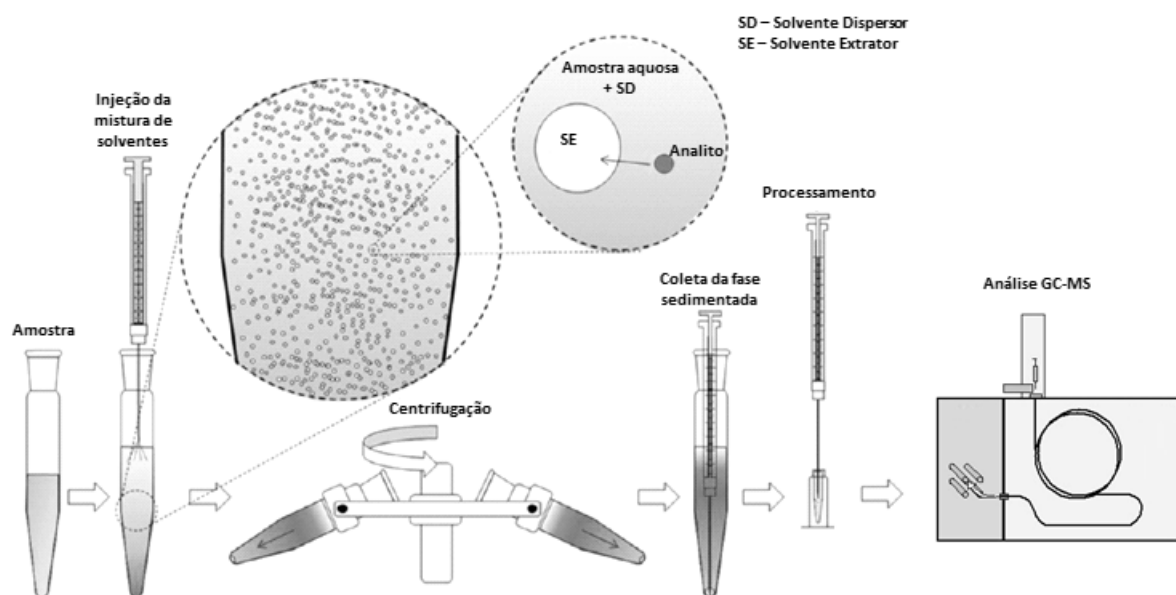


Figura 7 - Procedimento da microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME) (Adaptado de CALDAS; GONÇALVES; PRIMEL, 2011).

A seleção do solvente extrator apropriado é o principal parâmetro no processo da DLLME. São selecionados solventes orgânicos com base em sua densidade, que deve ser maior que a da água, que sejam capazes de extrair os compostos de interesse e sejam compatíveis com a análise cromatográfica. O volume do solvente extrator possui efeito importante no fator de pré-concentração, uma vez que a quantidade utilizada é proporcional ao volume final da amostra sedimentada obtida, influenciando diretamente na concentração do analito de interesse (XIONG *et al.*, 2009; REZAEI, YAMINI, FARAJI, 2010; HERRERA-HERRERA *et al.*, 2010).

A miscibilidade do solvente dispersor no solvente extrator e na fase aquosa é essencial em sua seleção, o que permite que solvente extrator seja disperso em finas gotículas na fase aquosa para formar uma solução turva (amostra aquosa/solvente extrator/solvente dispersor), tornando a área superficial entre o solvente extrator e a amostra aquosa infinitamente grande, aumentando a eficiência de extração (ZANG *et al.*, 2009, REZAEI, YAMINI, FARAJI, 2010).

Devido ao potencial da DLLME como técnica de preparo de amostras, algumas modificações foram realizadas visando o aumento da eficiência de extração. Modos novos de extração baseados no procedimento original são apresentados a seguir (**Figura 8**).

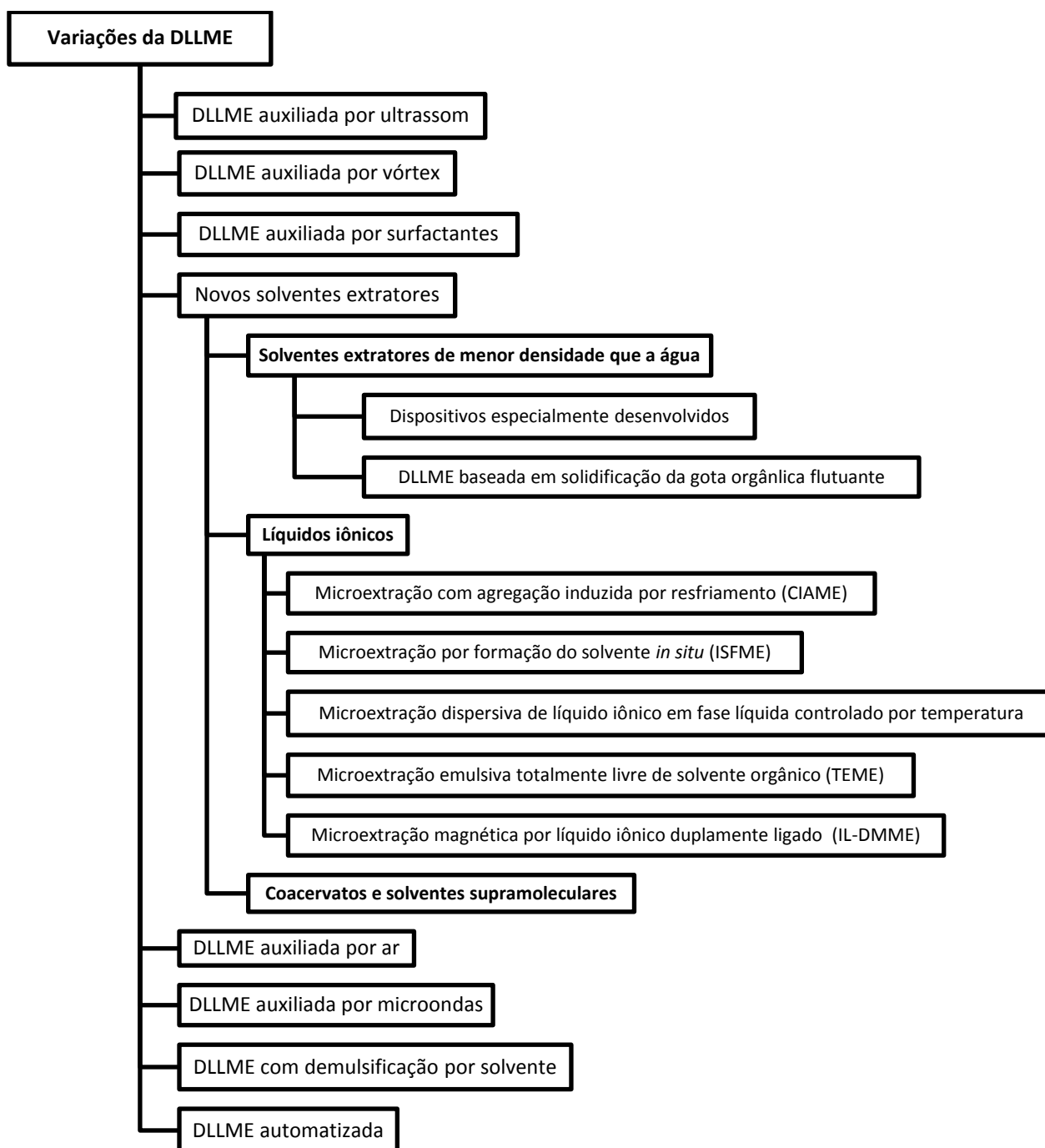


Figura 8 - Variações da técnica de DLLME (adaptado de SPIETELUN *et al.*, 2014).

Em sua forma originalmente concebida, a DLLME utilizava como extratores apenas solventes orgânicos de maior densidade que a água, por proporcionarem separação de fases facilitada após submetidos à centrifugação. A utilização de solventes orgânicos de menor densidade que a água veio do interesse de se utilizar solventes menos tóxicos e menos agressivos ao meio ambiente e também foi possibilitada pelo desenvolvimento de recipientes especiais – recipientes de gargalo estreito; recipientes que permitem a agitação utilizando barras magnéticas; e uma versão de seringa com uma barra magnética inserida em seu interior para a realização da

in-syringe DLLME. Mais recentemente, foram desenvolvidas modalidades que utilizam solventes extratores que não necessitam de agente dispersor e que, em alguns casos, eliminam a necessidade do procedimento de centrifugação; e também a aplicação de líquidos iônicos associados a variações da temperatura da amostra, aplicação de microondas, agitação realizada com o auxílio de ultrassom e vórtex (SPIETELUN *et al.*, 2014)

A combinação das vantagens oferecidas pela DLLME e SFOD (*solidification of a floating organic drop*) ocasionou a microextração líquido-líquido dispersiva baseada em solidificação da gota orgânica flutuante (*dispersive liquid-liquid microextraction based in the solidification of a foating organic drop - DLLME-SFO*), que é caracterizada pela utilização de solventes extratores de menor densidade que a água e que apresentam ponto de fusão próximo à temperatura ambiente. O procedimento de extração é realizado de acordo com a forma clássica até a centrifugação. Em seguida, a amostra é submetida ao resfriamento em banho de gelo para que ocorra a solidificação do solvente extrator, possibilitando sua coleta na superfície da amostra (ZANJANI *et al.*, 2007; SPIETELUN *et al.*, 2014).

A aplicação de energia ultrassônica também pode ser útil no processo de dispersão/emulsificação das amostras; ao associá-la à DLLME, foram concebidas a microextração emulsiva auxiliada por ultrassom (*ultrasound-assisted emulsification-microextraction - USAEME*) e a microextração líquido-líquido dispersiva ultrassônica (*ultrasound dispersion liquid-liquid microextraction - US-DLLME*). A irradiação ultrassônica potencializa a dispersão do solvente extrator na amostra, acelerando a transferência de massas entre a amostra e a fase extratora, reduzindo o tempo de equilíbrio. A irradiação ultrassônica também pode ser associada a líquidos iônicos, denominando novas técnicas, como a microextração emulsiva líquido-líquido auxiliada por ultrassom baseada em líquidos iônicos (*ionic liquid-based ultrasound-assisted emulsification microextraction - IL-USAEME*). A utilização de irradiação ultrassônica também pode ser combinada à técnica de solidificação da gota orgânica flutuante através de banho de gelo, resultando na microextração emulsiva com solidificação da gota orgânica flutuante auxiliada por ultrassom (*ultrasound-assisted emulsification microextraction with solidification of floating organic droplet - USAEME-SFO*), evitando os problemas relacionados ao uso de solventes tóxicos de alta densidade comumente utilizados nas técnicas de USAEME, substituindo-os por solventes de menor densidade e com pontos de fusão próximos à temperatura ambiente. Como alternativa à irradiação ultrassônica, a agitação por vórtex também pode ser utilizada na otimização do processo de dispersão dos solventes na amostra. Na microextração líquido-líquido auxiliada por vórtex (*vortex-assisted liquid-liquid microextraction - VALLME*) a agitação proporcionada cria emulsões

termodinamicamente instáveis; quando cessada a agitação, as gotículas tendem a coalescer, o que acarreta uma separação de fases mais fácil. A agitação por vórtex também foi associada à líquidos iônicos, que eliminam a necessidade de se utilizar agentes dispersores, reduzindo a coalescência e o aquecimento induzido pela agitação e auxiliando o processo de separação após a centrifugação (REGUEIRO *et al.*, 2008; LAVILLA *et al.*, 2010; YIANTZI *et al.*, 2010; KAMAREI, EBRAHIMZADEH, YAMINI, 2011; LIANG, WANG, WAN, 2013; SPIETELUN *et al.*, 2014).

De forma a evitar a utilização de solventes dispersores tóxicos, foi proposta sua substituição por surfactantes, que proviram as modalidades conhecidas como microextração líquido-líquido auxiliada por surfactante (*surfactant-assisted dispersive liquid-liquid microextraction* - SA-DLLME); microextração auxiliada por surfactante com base em pares iônicos (*ion pair based surfactant assisted microextraction* - IP-SAME); microextração emulsiva aprimorada por surfactante auxiliada por ultrassom (*ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction* – UASEME); e microextração líquido-líquido emulsiva aprimorada por surfactante auxiliada por vórtex (*vortex-assisted surfactant-enhanced emulsification liquid-liquid microextraction* - VSLLME). Estas técnicas também foram modificadas de modo a combinar suas vantagens e originar métodos de microextração por emulsão aprimorada de surfactante e por solidificação da gota orgânica flutuante (UASEME-SFO e VSLLME-SFO), utilizando solventes de menor densidade que a água e com temperatura de fusão próxima à ambiente, possibilitando sua solidificação em banho de gelo após o procedimento de centrifugação (WU *et al.*, 2010; MORADI, YAMINI, BAHARI, 2011; MORADI *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2013; YOU *et al.*, 2013; VICHAPONG, BURAKHAM, SRIJARANAI, 2013; SPIETELUN *et al.*, 2014).

Em 2012 foi proposta uma versão conhecida como microextração líquido-líquido auxiliada por ar (*air-assisted liquid-liquid microextraction* – AALLME), que utiliza menor volume de solvente extrator e não necessita de solvente dispersor. A dispersão do solvente extrator na amostra é realizada pela aspiração e injeção da mistura composta por amostra e solvente extrator, com o auxílio de uma seringa, por várias vezes, em um tubo de fundo cônico. Após a extração, as amostras são centrifugadas para a separação da fase extratora (FARAJZADEH, MOGADDAM, 2012; SPIETELUN *et al.*, 2014).

Devido aos avanços relacionados à técnica, atualmente é possível omitir algumas etapas do procedimento de DLLME – como o procedimento de centrifugação, a agitação da amostra, a emulsificação em banho de ultrassom e a remoção da fase extratora por resfriamento. Recentemente, foi desenvolvido um procedimento conhecido como demulção, que consiste

em, após realizado o procedimento de extração, adicionar uma porção de solvente dispersor, que promove a separação da emulsão em duas fases. As modalidades que utilizam este procedimento são conhecidas como microextração líquido-líquido dispersiva finalizada com solvente (*solvent terminated dispersive liquid-liquid microextraction* - ST-DLLME) e microextração líquido-líquido dispersiva com demulsificação por solvente (*solvent demulsification dispersive liquid-liquid microextraction* - SD-DLLME). Nestas duas técnicas são utilizados solventes extratores de menor densidade que a água, que permitem sua coleta na superfície da amostra com o auxílio de uma microsseringa (CHEN, CHEN, LI, 2010; GUO, LEE, 2011; SPIETELUN *et al.*, 2014).

Como realizado em outras técnicas de extração, também foi desenvolvida uma versão completamente automatizada, conhecida como microextração líquido-líquido dispersiva com injeção sequencial (*sequential injection dispersive liquid-liquid microextraction* - SI-DLLME) (ANTHEMIDIS, IOANNOU, 2009; SPIETELUN *et al.*, 2014).

O emprego de coacervatos e sistemas supramoleculares na extração de analitos por DLLME é conhecido como microextração líquido-líquido dispersiva com base supramolecular (*supramolecular based dispersive liquid-liquid microextraction* - SM-DLLME). Coacervatos consistem em micelas de ácido decanóico dispersas em solução aquosa de tetraidrofurano e esta solução é adicionada à amostra. Após a extração, os coacervatos são separados por centrifugação. Neste sistema o tetraidrofurano tem um papel duplo: dispersar a fase extratora e estimular a auto-organização das micelas de ácido decanóico. Em contraste à versão clássica, a SM-DLLME é caracterizada por um tempo de extração ainda menor, podendo ser utilizada na extração de analitos hidrofóbicos (compostos polares e em uma ampla faixa de polaridade), não requerendo o uso de solventes tóxicos e agitação da amostra. Outra variação desta é conhecida como microextração baseada em solvente supramolecular agitado por vórtex (*supramolecular solvent-based vortex-mixed microextraction* - SS-BVMME), onde o solvente supramolecular é formado pela dispersão de líquido iônico em butanol. Durante a extração dos analitos a mistura é agitada por um vórtex e, subsequentemente, o solvente supramolecular é separado da amostra por centrifugação. Uma técnica similar, chamada microextração baseada em solvente supramolecular (*supramolecular solvent-based microextraction* - SUSME) consome menos solvente orgânico e promove uma pré-concentração mais efetiva. Nesta última, o solvente supramolecular e a amostra sofrem a ação de agitadores magnéticos para a obtenção da dispersão supramolecular (MORAL, SICILLIA, RUBIO, 2009; JAFARVAND, SHEMIRANI, 2011; QIN *et al.*, 2013; SPIETELUN *et al.*, 2014).

A utilização de líquidos iônicos como solventes extratores é interessante devido à possibilidade de alterar suas propriedades (viscosidade, tensão superficial e

hidrofilicidade/hidrofobicidade) para selecionar o sistema mais apropriado. A variação da técnica que emprega o auxílio da irradiação ultrassônica e líquidos iônicos é conhecida como microextração líquido-líquido dispersiva baseada em líquidos iônicos auxiliada por ultrassom (*ionic liquid based ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction* - IL-USA-DLLME) ou microextração em fase/líquido-líquido dispersiva em líquidos iônicos auxiliada por ultrassom (*ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid-phase/liquid microextraction* - UA-IL-DLPME/UA-IL-DLLME). Além da irradiação ultrassônica, as microondas também podem ser utilizadas em conjunto aos líquidos iônicos em uma modalidade conhecida como microextração líquido-líquido dispersiva auxiliada por microondas (*microwave-assisted dispersive liquid-liquid microextraction* - MADLLME) (ZHOU, ZHANG, XIAO, 2009; MOLAAKBARI, MOSTAFAVI, AFZALI, 2011; SPIETELUN *et al.*, 2014; NIAZI, KHORSHIDI, GHAEMMAGHAMI, 2015).

Na técnica conhecida como microextração com agregação induzida por resfriamento (*cold-induced aggregation microextraction* - CIAME), um líquido iônico é dissolvido em uma amostra aquecida que em seguida é resfriada em banho de gelo para que ocorra a formação da dispersão. Posteriormente o tubo é centrifugado, possibilitando a coleta da fase extratora sedimentada. Uma outra modalidade, conhecida como microextração por formação do solvente *in situ* (*in situ solvent-formation microextraction* - ISFME), a extração ocorre durante a formação *in situ* de finas gotículas de líquido iônico hidrofóbico pela adição de líquido iônico hidrofílico e um agente de pareamento iônico na amostra; o extrato é separado após centrifugação. O efeito dispersor também pode ser atingido pelo controle da temperatura; este fenômeno foi empregado em uma técnica chamada microextração dispersiva em fase líquida com controle de temperatura do líquido iônico (*temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid-phase microextraction* - TILDLME), que também não necessita de solvente dispersor. Uma gota de líquido iônico é adicionada à amostra e se dispersa completamente durante o aquecimento desta. A gota é enriquecida de analito durante o resfriamento, quando ocorre a formação de gotículas de solvente. A técnica conhecida como microextração emulsiva totalmente livre de solvente orgânico (*totally organic solvent-free emulsification microextraction* - TEME) age de forma semelhante; líquidos iônicos são adicionados às amostras em banho de ultrassom e submetidos ao aquecimento; em seguida, a temperatura do banho de ultrassom é baixada simultaneamente ao tratamento ultrassônico para que ocorra a formação da dispersão e a extração dos analitos (ZHOU *et al.*, 2008; BAGHDADI, SHEMIRANI, 2009; ZHANG *et al.*, 2013; SPIETELUN *et al.*, 2014).

Novas combinações entre as técnicas de DLLME e microextração em fase sólida resultaram na microextração dispersiva em fase sólida (*dispersive micro solid-phase extraction - D- μ -SPE*) e na microextração magnética por líquido iônico duplamente ligado (*ionic liquid-linked dual magnetic microextraction - IL-DMME*) (ZHANG *et al.*, 2012; SPIETELUN *et al.*, 2014).

Apesar do grande potencial como técnica de extração e de possuir inúmeras aplicações em outras áreas, como na análise de compostos diversos em amostras ambientais, principalmente água (BERIJANI *et al.*, 2006; ANTHEMIDIS, IOANNOU, 2009; BAGHDADI, SHEMIRANI, 2009; CHEN, CHEN. LI, 2010; FARAJZADEH, MOGADDAM, 2012; ZHANG, LEE, 2012; QIN *et al.*, 2013), resíduos diversos em alimentos (MORAL, SICILLIA, RUBIO, 2009; JAFARVAND, SHEMIRANI, 2011; YOU *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2013) e na análise de preparações cosméticas (LAVILLA *et al.*, 2010; KAMARI, EBRAHIMZADEH, YAMINI, 2011), a DLLME ainda é pouco utilizada no âmbito forense. A **Tabela 2** relaciona os trabalhos relacionados à aplicação da DLLME na análise de drogas de abuso em amostras de urina e outras de interesse forense.

Tabela 2 – Estudos relacionados à DLLME, drogas de abuso e urina

Grupo de pesquisa	Analito	Matriz	Técnica analítica	Tipo de extração
Xiong <i>et al.</i> , 2009	Amitriptilina, clomipramina e tioridazina	Urina	HPLC-UV	DLLME
Melwanki <i>et al.</i> , 2009	7-aminoflunitrazepam	Urina	LC-ES-MS/MS	DLLME
Meng <i>et al.</i> , 2011	Metanfetamina, mdma e ketamina	Amostras de interesse forense*	CE-UV	DLLME
Moradi, Yamini, Baheri, 2011	Canabidiol, Canabinol e Δ^9 -THC	Urina	HPLC-UV	SA-DLLME
Ranjbari, Golbabanezhad-Azizi, Hadjmohammadi, 2012	Metadona	Urina, plasma, saliva e suor	HPLC-UV	DLLME
Airado-Rodríguez, Cruces-Blanco, García-Campaña, 2012	MDMA, LSD e fenciclidina	Urina	CE-UV	DLLME
Kohler <i>et al.</i> , 2013	Anfetaminas e derivados, opiáceos, cocaína e metabólitos e fármacos	Urina	CE-TOF-MS	DLLME
Behbahani <i>et al.</i> , 2013	Zonisamida e carbamazepina SA-DLLME	Urina e plasma	HPLC-UV	SA-DLLME
Ahmadi-Jouibari, Fattahi, Shamsipur, 2014	Anfetamina e metanfetamina	Urina	HPLC-UV	DLLME-SFO

Tabela 2 – Estudos relacionados à DLLME, drogas de abuso e urina

Grupo de pesquisa	Analito	Matriz	Técnica analítica	Tipo de extração
Saito, Kikuchi, Saito, 2014	Benzodiazepínicos	Urina e soro	LC/TOF-MS	D- μ -SPE
Habibollahi <i>et al.</i>, 2014	Tramadol	Urina e sangue	GC-MS	DLLME

*Cédulas em circulação, papel pardo, sacolas plásticas e papel alumínio.

Conforme mencionado anteriormente, existe um número diminuto de aplicações da DLLME no âmbito forense. Até o momento não existem outros estudos que correlacionem o emprego da DLLME e da GC-MS à pesquisa de drogas de abuso em urina. Como diferenciais deste trabalho, temos a determinação simultânea de analitos de diferentes classes (morfina, heroína, codeína, 6-monoacetilmorfina, cocaína, cocaetileno, benzoilecgonina, anidroecgonina metil éster, metanfetamina, anfetamina, MDMA, MDA e MDEA) em amostras de urina, utilizando a GC-MS e a DLLME, que possibilita a diminuição do volume de solventes utilizados, minimizando a geração de resíduos e diminuindo custos em relação a outras técnicas de extração, além de proporcionar grande recuperação e, neste caso, a utilização de um volume de amostra reduzido.

Objetivos

2 – Objetivos

2.1 – Objetivos gerais

Desenvolver e validar um método para identificação e quantificação de drogas de abuso e seus principais metabólitos (morfina (MORF), heroína (HER), codeína (COD), 6-monoacetilmorfina (6-AM), cocaína (COC), cocaetileno (CE), benzoilecgonina (BE), anidroecgonina metil éster (AEME), metanfetamina (MET), anfetamina (ANF), MDMA, MDA e MDEA) em amostras de urina, utilizando a microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME) e a cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).

2.2 – Objetivos específicos

- Desenvolver as condições cromatográficas para análise de drogas de abuso e metabólitos utilizando a GC-MS;
- Otimizar a extração de drogas de abuso e metabólitos em urina utilizando a DLLME;
- Validar o método desenvolvido;
- Aplicar o método validado para a determinação de drogas de abuso e metabólitos em amostras de urina de voluntários em tratamento no CAPS-AD de Ribeirão Preto – SP;
- Traçar o perfil de incidência de uso de drogas através da avaliação dos questionários das amostras coletadas.

Material e métodos

3 – Material e métodos

3.1 – Equipamentos

- Cromatógrafo em fase gasosa Agilent 7890A, Santa Clara, EUA.
 - Detector seletivo de massas Agilent 5975C, Santa Clara, EUA.
 - Amostrador automático Agilent 7693, Santa Clara, EUA.
 - Coluna capilar HP-5MS (30 m – 0,25 mm d.i. x 0,25 µm espessura do filme), Santa Clara, EUA.
- Cromatógrafo em fase gasosa Varian (Agilent), modelo CP-3800, Santa Clara, EUA.
 - Detector seletivo de massas Varian (Agilent) Saturn 2000 GC/MS/MS, Santa Clara, EUA.
 - Amostrador automático CombiPAL, Zwingen, Suíça.
 - Coluna capilar HP-5MS (30 m – 0,25 mm d.i. x 0,25 µm espessura do filme), Santa Clara, EUA.
- Evaporador de amostras TurboVap LV, Caliper Life Sciences, Hopkinton, EUA
- Banho de ultrassom Unique MaxiClean 1450, Indaiatuba, Brasil.
- Balança analítica Sartorius BL 1500 S, Goettingen, Alemanha.
- Balança analítica Sartorius BP 211 D, Goettingen, Alemanha.
- Pipetadores Thermo Scientific Finnpiette F2, Waltham, EUA.
- Centrífuga Hettich Universal 32, Tuttlingen, Alemanha.
- Centrífuga Hitachi CF 15RXII, Tokyo, Japão.
- Microseringa Hamilton Microliter #750, Reno, EUA.
- Microseringa Hamilton Microliter #705, Reno, EUA.
- Dry-Block Tecnal TE-021, Piracicaba, Brasil.
- Unidades filtrantes Millipore Millex JBR 13HN10, Darmstadt, Alemanha.
- Geladeira General Icy, Barueri, Brasil.
- Freezer General Icy, Barueri, Brasil.

3.2 – Reagentes e solventes

- Acetona grau HPLC - J.T. Baker, Center Valley, EUA.
- Ácido Clorídrico P.A. ACS (HCl) – Merck, Whitehouse Station, EUA.
- Acetonitrila grau HPLC - J.T. Baker, Center Valley, EUA.
- Clorofórmio grau HPLC - J.T. Baker, Center Valley, EUA.

- Clorobenzeno grau HPLC - Sigma-Aldrich, ST. Louis, EUA.
- Diclorometano grau HPLC - Sigma-Aldrich, ST. Louis, EUA.
- Etanol absoluto grau HPLC - Merck, Whitehouse Station, EUA.
- Fosfato de sódio monobásico monohidratado – Mallinckrodt, Dublin, Irlanda.
- Fosfato de sódio dibásico hidratado - Mallinckrodt, Dublin, Irlanda.
- Hidróxido de Sódio (NaOH) - Mallinckrodt, Dublin, Irlanda.
- Imunoensaio Rapid Drug Screen – American Bio Medica Corporation, Kinderhook, EUA
- Isopropanol grau HPLC - Mallinckrodt, Dublin, Irlanda.
- Metanol grau HPLC - J.T. Baker, Center Valley, EUA.
- MSTFA (N-Metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida) - Sigma-Aldrich, ST. Louis, EUA.
- Tetracloroeto de Carbono P.A. – Dinâmica, Diadema, Brasil.

3.3 – Soluções-padrão

Os padrões analíticos foram obtidos da Cerilliant (Round Rock, EUA) As soluções estoque foram preparadas em metanol grau cromatográfico, na concentração de 100,0 µg/mL e armazenadas a -20° C. A partir das soluções estoque foram obtidas soluções de trabalho, também em metanol, nas concentrações de 10,0 µg/mL e 1,0 µg/mL, armazenadas a 4° C por um período de até 30 dias.

3.4 – Desenvolvimento de um método cromatográfico para análise de drogas de abuso e metabólitos por GC-MS

3.4.1 – Desenvolvimento das condições cromatográficas

As condições cromatográficas foram ajustadas até a que houvesse boa separação dos compostos.

Para a definição das condições cromatográficas, foram utilizadas soluções-padrão em metanol compostas pelos seguintes analitos (100 ng de cada analito): morfina, heroína, codeína, 6-monoacetilmorfina, cocaína, cocaetileno, benzoilecgonina, anidroecgonina metil éster, metanfetamina, anfetamina, MDMA, MDEA, MDA. A mistura de padrões foi submetida à evaporação do solvente, reconstituída em 25 µL de acetato de etila, derivatizada utilizando 25 µL de N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA) (submetida ao “dry-block” a 60° C por 30 min) e analisada por GC-MS.

Os íons utilizados para identificação e quantificação (em negrito) dos analitos são apresentados na **Tabela 3**.

Tabela 3 – Íons utilizados na identificação dos analitos.

Analito	Íons (m/z)
Anfetamina	116 , 91, 192
Metanfetamina	130 , 91, 206
AEME	152 , 181, 166
MDA	116 , 135, 236
MDMA	130 , 135, 250
MDEA	144 , 135, 264
Cocaína	82, 182 , 303
Cocaetileno	82, 105, 196
Benzoilecgonina	82, 105, 240
Codeína	371 , 178, 196
Morfina	401, 429 , 236
6-monoacetilmorfina	399 , 340, 287
Heroína	327 , 369, 268

As condições cromatográficas definidas para a análise de drogas de abuso e metabólitos encontram-se descritas na **Tabela 4**.

Tabela 4 – Condições cromatográficas utilizadas nas análises.

Condições	Método Otimizado		
Equipamento	GC Agilent 7890A / MSD 5975C / Autosampler 7693		
Coluna	DB-5MS 30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 µm espessura do filme		
Gás de arraste	Hélio, com vazão de 1,0 mL/min		
Volume de injeção	1 µL		
Modo de injeção	“Splitless”		
Temperatura do injetor	280° C		
Rampa de aquecimento	Temperatura (°C)	Taxa de aquecimento (°C/min)	Permanência (min)
	85		1
	190	10	4
	270	15	6
Tempo total da corrida: 26,83 min			

Tabela 4 – Condições cromatográficas utilizadas nas análises.

Condições	Método Otimizado
Modo de operação do MS	Impacto de elétrons (EI)
Temperaturas:	
- Interface	280° C
- Fonte de ionização	230° C
- Quadrupolo	150° C

3.5 – Desenvolvimento do processo de extração de drogas de abuso e metabólitos em urina utilizando a DLLME

Após estabelecidas as condições para a análise cromatográfica das substâncias e seus metabólitos, a etapa seguinte consistiu na avaliação de procedimentos de preparação da amostra para viabilizar a análise a partir da matriz de interesse. Esta etapa é de fundamental importância por eliminar possíveis interferentes, e por possibilitar a concentração dos analitos na matriz, melhorando, assim, a sensibilidade do método. O procedimento de preparo de amostras avaliado utilizou a técnica de microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME). A otimização das condições de extração foi baseada no trabalho de Zang *et al.* (2009).

Às amostras de urina, preparadas como descrito no item a seguir, foi adicionada, com auxílio de uma microsseringa, uma mistura de solventes composta pelo solvente extrator e o solvente dispersor. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 1370 g por 5 min para a separação das fases. A fase sedimentada foi coletada, o solvente evaporado em um TurboVap, reconstituída em 25,0 µL de acetato de etila, derivatizada de acordo com o item 3.6, e analisada por GC-MS.

Diferentes misturas dos solventes extrator e dispersor (composição e volume) foram avaliadas para a escolha da condição mais adequada para obtenção de uma melhor recuperação dos analitos, e estão descritas no item 3.5.2.

3.5.1 – Preparo da matriz biológica para o processo de extração

As extrações foram realizadas, inicialmente, utilizando 5,0 mL e, após otimizada a extração, 3,0 mL de urina de não usuários (amostras que não contem nenhum dos analitos pesquisados/amostra Branco) previamente centrifugada e fortificada na concentração de 40,0 ng/mL para cada analito ou amostras de urina de pacientes em tratamento pelo CAPS-AD de Ribeirão Preto.

Como padrões internos, foram adicionados 100 ng de cada analito deuterado: anfetamina-D11, MDMA-D5, cocaína-D3 e heroína-D9. Em seguida, foi adicionado 1,0 mL de NaOH,

solução modificadora de pH, para o favorecimento da forma não-ionizada dos analitos. A **Tabela 5** apresenta padrões internos e valores de constante de dissociação (pKa) para os analitos pesquisados.

Tabela 5 – Relação de padrões internos e pKa dos analitos envolvidos na análise.

Analito	Padrão interno	pKa
Anfetamina	Anfetamina-D11	9,8
Metanfetamina	Anfetamina-D11	9,5
Anidroecgonina metil éster	Cocaína-D3	.*
MDA	MDMA-D5	9,7
MDMA	MDMA-D5	9,9
MDEA	MDMA-D5	9,9
Cocaína	Cocaína-D3	8,6
Cocaetileno	Cocaína-D3	8,0
Benzoilecgonina	Cocaína-D3	2,25; 11,2
Codeína	Heroína-D9	8,55
Morfina	Heroína-D9	9,8
6-monoacetilmorfina	Heroína-D9	.*
Heroína	Heroína-D9	7,6

* Valores não encontrados

Dados os valores de pKa acima, nota-se que a solução modificadora de pH mais adequada para o favorecimento da forma não ionizada dos analitos é a que possui pH básico, porém outras duas soluções modificadoras de pH (HCl 0,1 M e tampão fosfato de sódio pH 7,0) foram avaliadas no procedimento de extração dos analitos. Além disso, outras soluções de caráter básico e o aumento do volume adicionado por amostra foram avaliados para otimização do processo de preparo da amostra.

3.5.2 – Escolha dos solventes extrator e dispersor

Como solvente extrator, foram utilizados aqueles que apresentassem maior densidade que a água, alta lipofilicidade e que não sofressem volatilização durante o processo de extração. Foram avaliados como solventes extratores: diclorometano, clorofórmio, tetracloreto de carbono e clorobenzeno. O solvente dispersor deve ser miscível tanto no solvente extrator, quanto na

amostra aquosa (urina). Para tal, foram avaliados: acetonitrila, metanol, acetona, isopropanol e etanol.

As diferentes misturas de solvente extrator e solvente dispersor foram avaliadas conforme demonstrado na **Tabela 6**. Para cada solvente extrator foi avaliado individualmente um solvente dispersor. Nesta etapa, foram utilizados 100 μL de solvente extrator, 400 μL de solvente dispersor e 1 mL de solução de NaOH 0,1 M.

Tabela 6 – Solventes extratores e solventes dispersores utilizados nos experimentos de otimização das condições de extração.

Seleção dos solventes utilizados na extração (solvente extrator:solvente dispersor)			
Diclorometano: Acetona	Clorobenzeno: Acetona	Clorofórmio: Acetona	Tetracloroeto de carbono: Acetona
Diclorometano: Acetonitrila	Clorobenzeno: Acetonitrila	Clorofórmio: Acetonitrila	Tetracloroeto de carbono: Acetonitrila
Diclorometano: Etanol	Clorobenzeno: Etanol	Clorofórmio: Etanol	Tetracloroeto de carbono: Etanol
Diclorometano: Isopropanol	Clorobenzeno: Isopropanol	Clorofórmio: Isopropanol	Tetracloroeto de carbono: Isopropanol
Diclorometano: Metanol	Clorobenzeno: Metanol	Clorofórmio: Metanol	Tetracloroeto de carbono: Metanol

A próxima etapa consistiu em avaliar o volume dos solventes que apresentaram a melhor recuperação dos analitos presentes na amostra após sua extração. O volume do solvente extrator selecionado foi avaliado em três variações: 100, 75 e 50 μL ; e o volume do solvente dispersor selecionado foi avaliado em quatro variações: 400, 300, 200 e 100 μL . A **Figura 9** ilustra o delineamento dos experimentos.

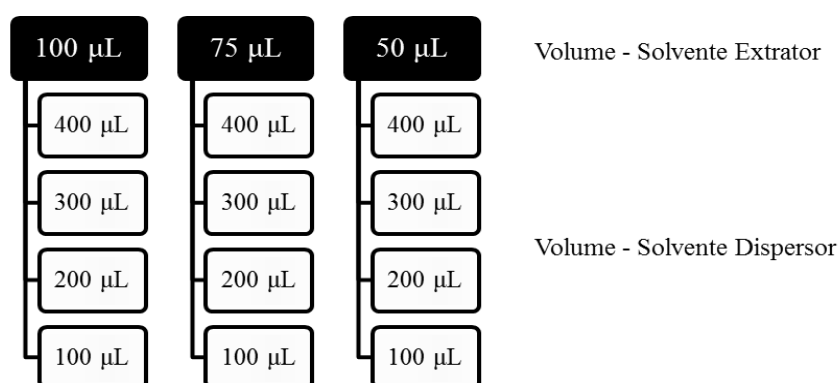


Figura 9 - Delineamento dos experimentos para avaliação de volume dos solventes extrator e dispersor.

3.5.3 – Otimização do processo de extração das drogas e metabólitos em urina utilizando a DLLME

Durante o desenvolvimento do método de extração das drogas e metabólitos em urina foi necessário o ajuste do volume da amostra de urina (de 5,0 para 3,0 mL) com a finalidade de reduzir a grande variabilidade da recuperação dos analitos devido, em parte, a formação de emulsões estáveis após a dispersão da mistura de solventes extrator e dispersor às amostras de urina.

Outra medida realizada na otimização do processo de extração foi a substituição da solução modificadora de pH (NaOH 0,1 M) por tampão carbonato de amônio 0,2 M pH 9,5 ou tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 10,3 \pm 0,5 e o aumento do volume adicionado de solução modificadora de pH de 1,0 para 2,0 mL.

Após selecionados o conjunto de solventes extrator e dispersor, foi realizado o ajuste na razão de seus volumes com a finalidade de promover, ao final da extração, a coleta do mesmo volume de solvente extrator adicionado inicialmente e recuperar ao máximo os analitos presentes na amostra.

3.6 – Derivatização

Para a determinação de compostos por GC-MS é necessário que estes sejam voláteis e termicamente estáveis. A cromatografia em fase gasosa, quando utilizada para análises de compostos polares e hidrofílicos, apresenta alguns inconvenientes. Para que estes compostos sejam analisados é necessário que sejam quimicamente convertidos, ou seja, derivatizados. A derivatização permite a modificação da funcionalidade da molécula, aumentando sua volatilidade, diminuindo sua polaridade e conferindo estabilidade. A derivatização promove redução da adsorção do analito no GC, resultando em melhor resposta do detector e separação cromatográfica mais eficiente. Alguns reagentes derivatizantes permitem a obtenção de espectros de massa muito característicos que podem ser relevantes para propósitos de identificação. A mudança dos íons do principal fragmento para faixas maiores de massa e a formação de fragmentos característicos para um grupo específico de drogas são outras vantagens apresentadas pela derivatização (SEGURA, VENTURA, JURADO, 1998; FERREIRA, 2011).

A escolha do reagente derivatizante é realizada com base no grupo funcional (aminas, ácidos carboxílicos, cetonas, aldeídos e álcoois), na estrutura química e propriedades da molécula que se necessita derivatizar. Os critérios utilizados na seleção do reagente derivatizante

são: a reação de derivatização deve ser completa, com rendimento de 95 a 100%; deve ser reprodutível; não deve causar alteração estrutural ou rearranjo na formação do derivado; e compostos formados devem apresentar estabilidade no meio em que é realizada a reação.

Os métodos de derivatização comumente utilizados são a alquilação, acetilação e sililação, ocorrendo substituição do hidrogênio dos grupos polares, como, NH, OH, e SH por grupos alquil, acil e silil. Essas substituições aumentam significativamente a volatilização das amostras (SEGURA, VENTURA, JURADO, 1998; FERREIRA, 2011).

A sililação é a reação de derivatização mais amplamente utilizada e tem como objetivo a substituição do hidrogênio (grupo hidroxil ou grupo amino) pelo grupo trimetilsilil (TMS), reduzindo a polaridade do composto formando ligações de hidrogênio. A sililação, e em geral as reações de derivatização, têm como vantagem o aumento de volatilidade e estabilidade dos compostos. A eficiência da reação depende do agente de sililação, quanto mais forte for aceitação de cargas do composto sililado, maior é o rendimento da reação. Os reagentes mais comuns são o trimetilclorosilano (TCMS), trimetilsililimidazol (TMSI), N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA), N,O-bis-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) e N-(t-butildimetilsilil)-N-metiltrifluoroacetamida. Os produtos de reação são mais voláteis e termicamente mais estáveis, podendo ser injetados diretamente no GC-MS. O solvente mais comumente utilizado nas reações de sililação é a piridina, uma vez que inibe a formação de produtos secundários (SEGURA, VENTURA, JURADO, 1998; FERREIRA, 2011).

Foi escolhido o reagente MSTFA para a derivatização dos analitos extraídos. Foram utilizados 25,0 µL do reagente por amostra que, em seguida, foi submetida ao aquecimento (“dry-block” a 60°C) por 30 min.

3.7 – Validação analítica

A validação analítica foi realizada com base na Resolução RDC 27 de 17 de maio de 2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e no guia “*Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology*” do *Scientific Working Group for Forensic Toxicology* (SWGTOX), de 2013. Foram avaliados os seguintes parâmetros de validação: seletividade, efeito residual, efeito de matriz, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e estabilidade.

3.7.1 – Seletividade/Especificidade

A seletividade é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, a substância de interesse na presença de componentes que possam interferir na análise. A seletividade avalia o grau de

interferência de espécies como outros ativos, produtos de degradação, metabólitos ou compostos similares que possam estar presentes, incluindo componentes da matriz (RIBANI *et al.*, 2004).

A seletividade do método foi realizada utilizando matrizes biológicas de seis fontes distintas. O resultado obtido da realização destas análises foi comparado com aquele obtido de amostras processadas do limite inferior de quantificação (LIQ) (10 ng/mL). A resposta de picos interferentes próximos ao tempo de retenção dos analitos deve ser inferior a 20% da resposta do LIQ, enquanto a resposta de interferentes próximos ao tempo de retenção do padrão interno (PI) deve ser inferior a 5% da resposta do PI.

3.7.2 – Efeito residual

O efeito residual ou *carryover* é o efeito gerado pelo aparecimento ou aumento do sinal do analito ou PI causado por contaminação proveniente de amostras analisadas anteriormente. O efeito residual foi avaliado através da análise de três amostras Branco (amostra de matriz processada sem a adição de analitos e padrão interno), sendo uma analisada previamente e duas logo após a análise de uma amostra do limite superior de quantificação (LSQ) (400 ng/mL).

3.7.3 – Efeito matriz

O efeito matriz ocorre quando substâncias inerentes à matriz biológica co-eluem com os compostos de interesse, afetando a sua detecção. Ao utilizar um detector seletivo de massas, a presença de substâncias não monitoradas pertencentes à matriz biológica pode comprometer a eficiência da ionização dos compostos de interesse, caracterizando este efeito. Pode ser expresso através de um fator denominado fator matriz (FM), que foi calculado através da análise de seis amostras de uma mesma matriz biológica de diferentes procedências, seguindo a fórmula a seguir:

$$FM = \frac{\text{Resposta do analito na presença de matriz}}{\text{Resposta do analito na ausência de matriz}}$$

onde a resposta do analito é definida como a área, altura, razão de área ou razão de altura do pico cromatográfico. A resposta dos analitos na presença de matriz foi realizada pela adição de analitos após o procedimento de extração de uma amostra branco (CASSIANO *et al.*, 2009). Para a avaliação do efeito matriz foram utilizados os controles CQA e CQB

Quando o valor de FM é igual a 1, significa que nenhum efeito de matriz é observado; FM menor que 1 sugere supressão da ionização dos compostos; e FM maior que 1 sugere aumento da ionização. Valores de FM variáveis indicam falta de precisão na análise, devendo

apresentar valores de coeficiente de variação (ver Precisão) menores que 15% (CASSIANO *et al.*, 2009).

3.7.4 – Linearidade (curva de calibração)

A linearidade do método corresponde à sua capacidade de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância analisada, dentro de uma determinada faixa de aplicação (RIBANI *et al.*, 2004).

A linearidade foi avaliada através da análise de sete pontos de concentrações crescentes, realizando cinco replicatas para cada ponto. A partir dessas análises foram construídas as curvas de calibração em matriz (urina) e utilizando padrão interno, para cada analito. Cada ponto da curva foi determinado através da correlação entre a concentração e o valor obtido pela razão entre a área do íon de quantificação do analito de interesse e área do íon de quantificação do padrão interno. A partir destes pontos, foi realizado o método matemático de regressão linear, que, além dos coeficientes de regressão **a** e **b**, também foi calculado o coeficiente de correlação linear (**r**). Quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação linear (**r**) maior ou igual a 0,98 para ensaios bioanalíticos (CASSIANO *et al.*, 2009).

3.7.5 – Precisão

A precisão “representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas” (RIBANI *et al.*, 2004).

Precisão Intra-ensaio ou Repetibilidade: é uma estimativa da concordância dos resultados obtidos pelo método, avaliada pela análise dos controles LIQ, CQB, CQM, CQA, CQD pelo mesmo procedimento analítico, pelo mesmo instrumento, pelo mesmo analista, em um curto período de tempo.

Precisão inter-ensaio ou Intermediária: é uma estimativa da concordância dos resultados obtidos pelo método, avaliada pela análise dos controles LIQ, CQB, CQM, CQA, CQD pelo mesmo procedimento analítico, em diferentes dias, utilizando o mesmo analista e o mesmo equipamento, dentro de um mesmo laboratório.

A precisão foi avaliada em cinco níveis de concentração, utilizando cinco replicatas em cada nível, contemplando, de maneira uniforme, o intervalo adotado pela curva de calibração. A **Tabela 7** mostra os níveis de concentração das soluções controle de qualidade (CQs) utilizados.

Tabela 7 – Concentração (ng/mL) dos CQs utilizados.

LIQ	CQB	CQM	CQA	CQD
10	25	200	300	500

LIQ – limite inferior de quantificação; CQB – amostra controle de qualidade baixo; CQM – amostra controle de qualidade médio; CQA – amostra controle de qualidade alto; CQD – amostra controle de qualidade de diluição.

Os resultados da precisão foram expressos em forma de Coeficiente de Variação (CV%), não admitindo valores superiores a 15%, exceto para o limite inferior de quantificação (LIQ), para o qual são admitidos valores de até 20%. O CV% foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$CV\% = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Concentração média determinada}} \times 100$$

3.7.6 – Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referencia aceito como verdadeiro (RIBANI *et al.*, 2004).

A exatidão de um método é definida como a diferença entre o valor obtido (média) e o valor verdadeiro presente na amostra. A exatidão foi calculada através do erro padrão relativo (EPR), seguindo a equação abaixo:

$$EPR = \frac{(\text{Concentração média experimental} - \text{Valor nominal})}{\text{Valor nominal}} \times 100$$

A exatidão foi determinada comparando os valores obtidos pela análise dos CQs apresentados na **Tabela 7** e expressa como porcentagem da concentração teórica.

Assim como na precisão, a exatidão foi determinada em um mesmo dia - *Precisão intra-ensaio*; e entre três dias diferentes - *Precisão inter-ensaio*. Como critério de aceitação, os

resultados obtidos pela a análise dos CQs devem originar valores entre 85% e 115%, exceto para o limite inferior de quantificação, onde são aceitos valores entre 80% e 120%.

3.7.7 – Limite de detecção (LD)

O limite de detecção representa a menor concentração da substância em análise que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando determinado procedimento experimental (RIBANI *et al.*, 2004).

O limite de detecção foi calculado com base em parâmetros da curva analítica, sendo expresso como:

$$LD = 3,3 \frac{s}{S}$$

onde s é a estimativa do desvio padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação e S é a inclinação (*slope*) ou coeficiente angular da curva analítica.

3.7.8 – Limites de quantificação (LQ)

O limite inferior de quantificação (LIQ) é a menor concentração onde os analitos podem ser quantificados com precisão de até 20% e exatidão de $\pm 20\%$, apresentando relação sinal-ruído maior ou igual a 10. O limite superior de quantificação (LSQ) é a maior concentração onde os analitos podem ser quantificados com precisão de até 15% e exatidão de $\pm 15\%$.

O LIQ foi estabelecido por meio de análises, em cinco replicatas, de amostras de urina fortificadas que apresentassem precisão e exatidão aceitáveis.

Dentro da faixa de trabalho utilizada, o LSQ foi selecionado (400 ng/mL) com base na maior concentração utilizada para a construção da curva analítica e que apresentasse linearidade, precisão e exatidão aceitáveis.

3.7.9 – Estabilidade

Para assegurar que os analitos se mantenham estáveis nas condições de preparo, análise e estocagem das amostras, vários tipos de estabilidade devem ser avaliados durante a validação de um método analítico (CASSIANO *et al.*, 2009):

Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento: Avalia a capacidade do composto resistir à ciclos de congelamento e descongelamento. As amostras CQB e CQA foram mantidas a -20 °C por 24 h e então submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente. Após completamente descongeladas, as amostras foram novamente congeladas a -20°C, por no mínimo 12 horas, e então descongeladas. Este ciclo foi repetido por mais duas vezes. A estabilidade é demonstrada quando não se observa desvio superior a 15% da média das concentrações obtidas com relação ao valor nominal.

Estabilidade das amostras processadas: Avalia a estabilidade dos analitos após processados para a análise, indicando o tempo em que as amostras podem ser analisadas após o preparo. Foi avaliada pelo reprocessamento dos extratos derivatizados obtidos das amostras CQB e CQA em 24, e 48 h após o preparo.

Estabilidade de curta duração (estabilidade de bancada): avalia a estabilidade dos analitos em condições de curta duração. As amostras CQB e CQA foram mantidas à temperatura ambiente por 24 h e então submetidas ao procedimento de extração e analisadas. Os resultados obtidos devem ser semelhantes ao de amostras recém-preparadas.

3.8 – Perfil de uso de drogas

Com base no questionário aplicado na coleta das amostras (**Anexo 1**), foram traçados alguns gráficos para avaliar a incidência do uso de drogas levando em consideração sexo, idade e drogas mais utilizadas.

3.9 – Aspectos éticos da pesquisa

Atendendo à Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, o projeto desta pesquisa e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**Anexo 2**) foram encaminhados e aprovados (**Anexo 3**) pelo Comitê de Ética em Pesquisa Faculdade Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP).

A pesquisa também teve a aprovação da coordenação do Sanatório Espírita São Vicente de Paulo, que é a entidade responsável pelo CAPS-AD (**Anexo 4**).

3.10 – Casuística

As coletas de amostras foram realizadas no Centro de Atenção Psicossocial de Álcool e Drogas (CAPS-AD) de Ribeirão Preto. As amostras de urina foram coletadas em frascos de polipropileno, identificadas com etiquetas contendo códigos relativos aos nomes dos voluntários e armazenadas a -20° C até o momento da análise.

Os critérios de inclusão foram: indivíduos de ambos os sexos, maiores de dezoito anos, não importando seu nível sócio-econômico e que aceitaram participar do estudo, desde que assinassem o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Foram excluídos: pacientes em estado de saúde grave, com risco de morte e aqueles com confusão mental.

3.11 – Amostras

Foram coletadas 117 amostras de urina de voluntários em tratamento no CAPS-AD de Ribeirão Preto – SP, que foram armazenadas a -20° C até o momento da análise, quando, então, foram descongeladas à temperatura ambiente, centrifugadas e submetidas aos processos de extração e análise.

3.12 – Teste preliminar de drogas nas amostras de urina

Foram realizados testes preliminares de drogas nas amostras de urina coletadas dos pacientes do CAPS-AD utilizando testes Rapid Drug Screen[®], que são imunoenaios para detecção qualitativa de drogas de abuso e metabólitos em amostras de urina, nos limites de corte (*cut-off*) a seguir:

- Anfetaminas – 1000 ng/mL;
- Cocaína – 300 ng/mL;
- Canabinóides/Marijuana – 50 ng/mL.

As amostras foram descongeladas até a temperatura ambiente. Em seguida, o cartão de testes foi inserido no copo coletor e foi aguardado o aparecimento das linhas de controle. Os resultados dos testes foram considerados válidos após as linhas de controle se tornarem visíveis. Os testes que não apresentaram linhas visíveis em até 10 minutos foram considerados inválidos e repetidos.

Um resultado negativo apresenta duas linhas, teste e controle. Qualquer linha, independentemente de sua intensidade, cor ou tamanho, foi considerada como negativo para o analito avaliado. Um resultado positivo apresenta apenas a linha controle e ausência da linha de teste, como ilustrado na **Figura 10**.

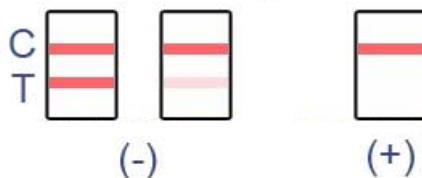


Figura 10 - Interpretação do teste preliminar para drogas de abuso em urina.

Resultados e discussão

4 - Resultados e discussão

4.1 – Análise Cromatográfica

Um cromatograma obtido após a otimização das condições, pela análise de uma amostra em solução, na concentração de 50 ng/mL por analito é apresentado na **Figura 11**.

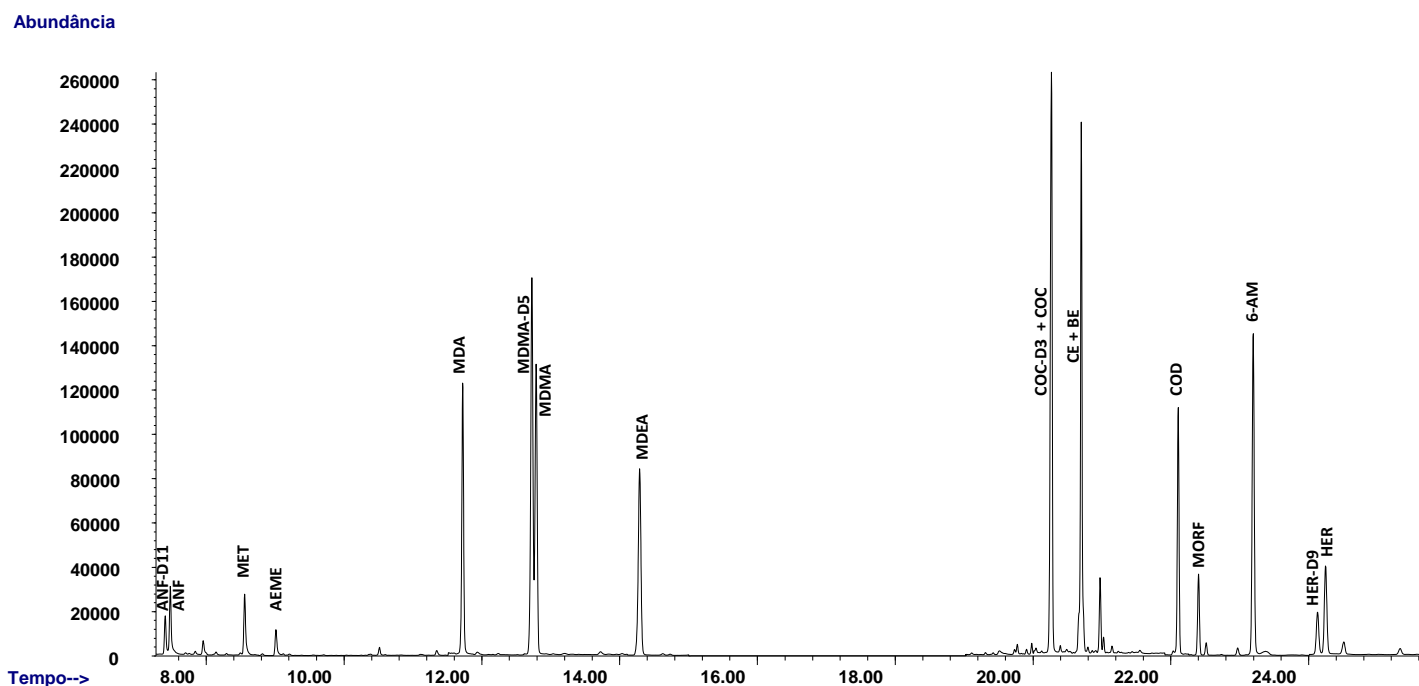


Figura 11 - Cromatograma obtido pela análise de uma amostra em solução após otimização das condições cromatográficas em modo seletivo de íons (SIM). Anfetamina-D11 (ANF-D11), anfetamina (ANF), metanfetamina (MET), anidroecgonina metil éster (AEME), metilendioxfanfetamina (MDA), metilendioximetanfetamina-D5 (MDMA-D5), metilendioxi-etil-anfetamina (MDEA), cocaína-D3 (COC-D3), cocaína (COC), cocaetileno (CE), benzoilecgonina (BE), codeína (COD), morfina (MORF), 6-monoacetilmorfina (6-AM), heroína-D9 (HER-D9), heroína (HER).

Podemos observar que as condições cromatográficas padronizadas (**Tabela 4**) proporcionaram uma boa separação dos analitos, apresentando picos simétricos e bem definidos.

4.2 – Processo de extração utilizando a DLLME

4.2.1 – Escolha dos solventes

A escolha dos solventes extrator e dispersor foi realizada levando em consideração o maior valor de área obtido nas análises cromatográficas, ou seja, a melhor recuperação do analito da amostra após a extração.

Preliminarmente, o volume de solvente extrator foi fixado em 100,0 µL e o volume de solvente dispersor foi fixado em 400,0 µL. Foram utilizados 5,0 mL de urina fortificada utilizando uma mistura de analitos na concentração de 40 ng/mL por analito. Nas diferentes

condições avaliadas pelos experimentos, a utilização dos solventes extratores diclorometano e clorobenzeno em conjunto aos solventes dispersores propostos, promoveram a formação de emulsões muito estáveis. Os emulsionados foram tratados com adição de 300,0 μL de acetonitrila, seguido de filtração através de unidades filtrantes de nylon com poros de 0,45 μm Millex[®]. Os filtrados foram submetidos à evaporação do solvente, reconstituídos em 50,0 μL de acetato de etila, derivatizados e analisados por GC-MS.

A análise cromatográfica não apresentou nenhum traço dos analitos adicionados às amostras, indicando que, nas condições avaliadas, as extrações foram ineficientes. Por não proporcionarem resultados satisfatórios, a utilização de diclorometano e clorobenzeno como solventes extratores foi descartada.

Os experimentos realizados utilizando clorofórmio e tetracloreto de carbono como solventes extratores associados aos solventes dispersores propostos inicialmente, proporcionaram fases sedimentadas límpidas e bem definidas. Estas fases foram coletadas com o auxílio de uma microseringa, o solvente foi evaporado, reconstituídas em 50,0 μL de acetato de etila, derivatizadas e analisadas por GC-MS.

Os resultados obtidos nos experimentos utilizando clorofórmio e tetracloreto de carbono como solventes extratores em conjunto aos solventes dispersores propostos estão representados nas **Figuras 12 e 13**, respectivamente.

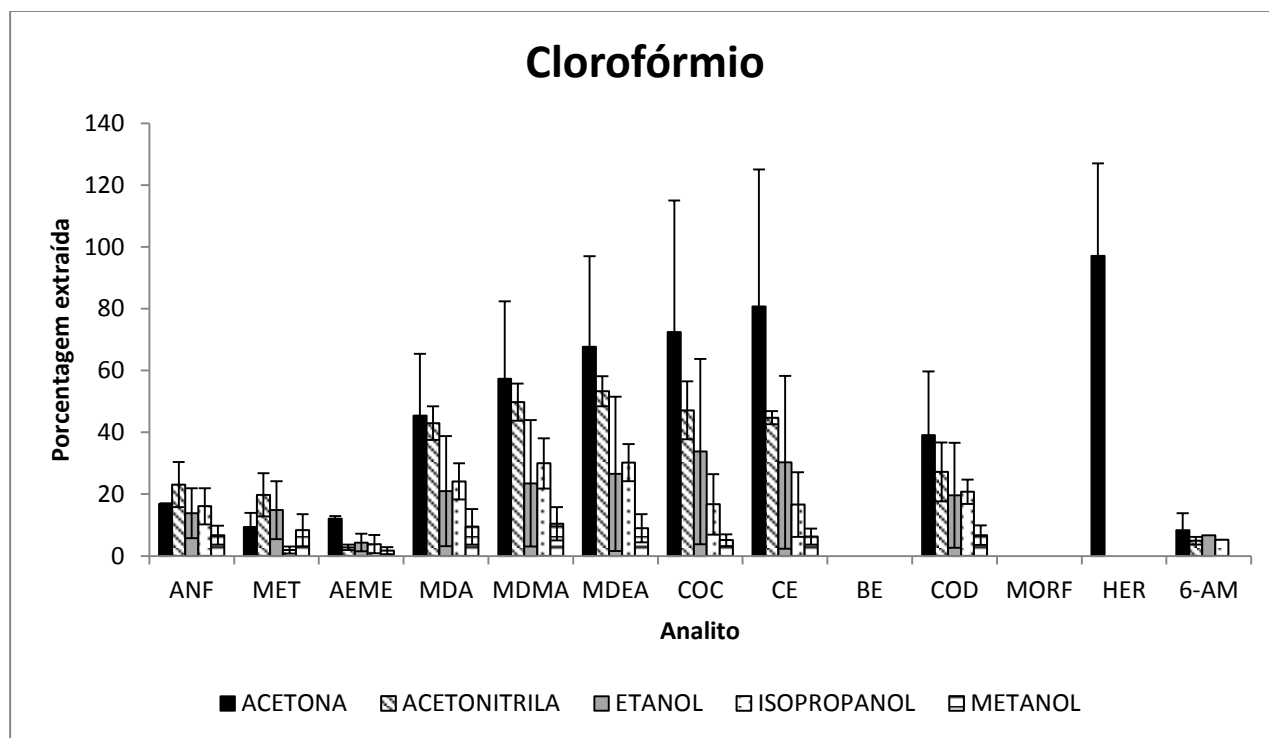


Figura 12 - Avaliação da extração de drogas de abuso e seus principais metabólitos utilizando clorofórmio como solvente extrator. Amostras fortificadas na concentração de 40,0 ng/mL para cada analito. Volume de solvente extrator: 100 μL de clorofórmio. Volume dos solventes dispersores: 400 μL . Os resultados representam a média de três determinações \pm erro padrão da média (E.P.M.).

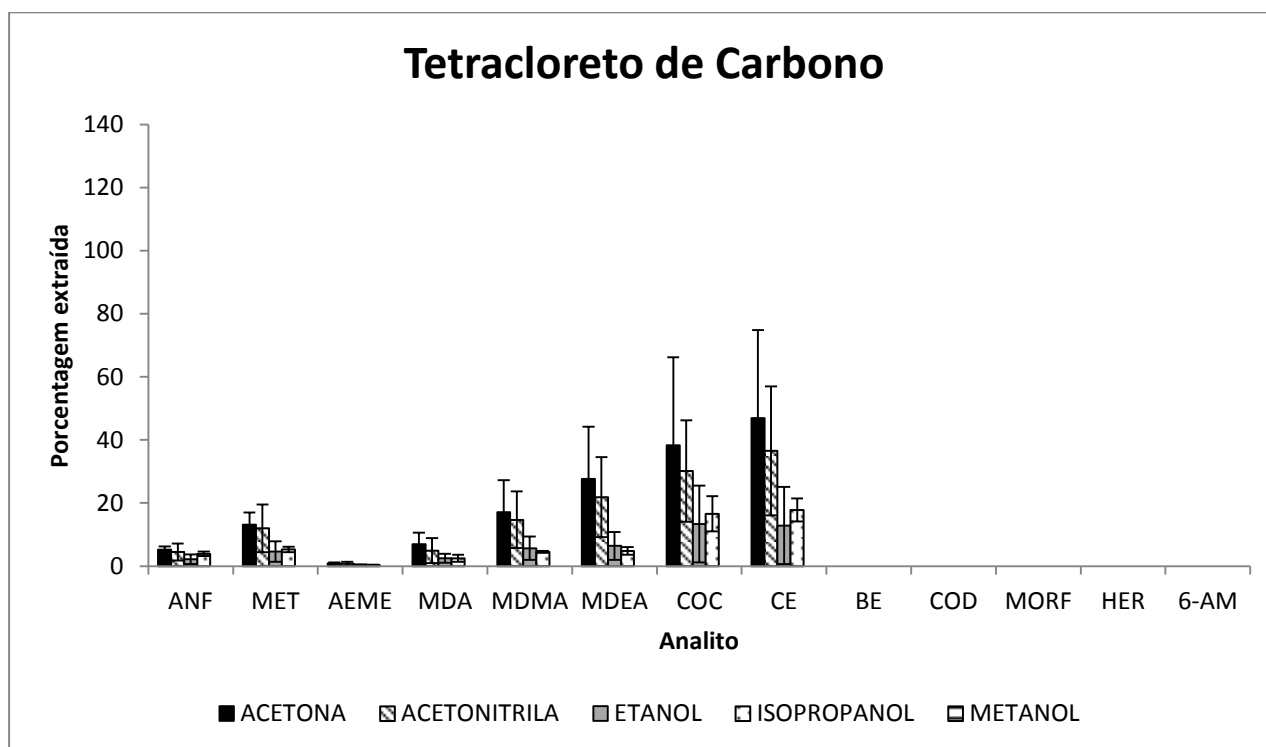


Figura 13 - Avaliação da extração de drogas de abuso e seus principais metabólitos utilizando tetracloroeto de carbono como solvente extrator. Amostras fortificadas na concentração de 40,0 ng/mL para cada analito. Volume de solvente extrator: 100 μ L de tetracloroeto de carbono. Volume dos solventes dispersores: 400 μ L. Os resultados representam a média de três determinações \pm E.P.M.

De acordo com as **Figuras 12 e 13**, podemos observar que a mistura de solventes composta por clorofórmio como solvente extrator e acetona como solvente dispersor proporcionou maior eficiência para grande parte dos analitos e, portanto, foi o conjunto de solventes selecionado para o processo de extração.

O volume de solvente extrator (clorofórmio) foi avaliado em três níveis diferentes: 100, 75 e 50 μ L; e o volume de solvente dispersor (acetona) foi avaliado em quatro níveis diferentes: 400, 300, 200 e 100 μ L. Nestes experimentos o analito MDA não foi utilizado por estar disponível em pequena quantidade.

Para avaliar a influência do volume do solvente dispersor o volume de solvente extrator foi mantido em 100 μ L. Os resultados obtidos estão representados na **Figura 14**.

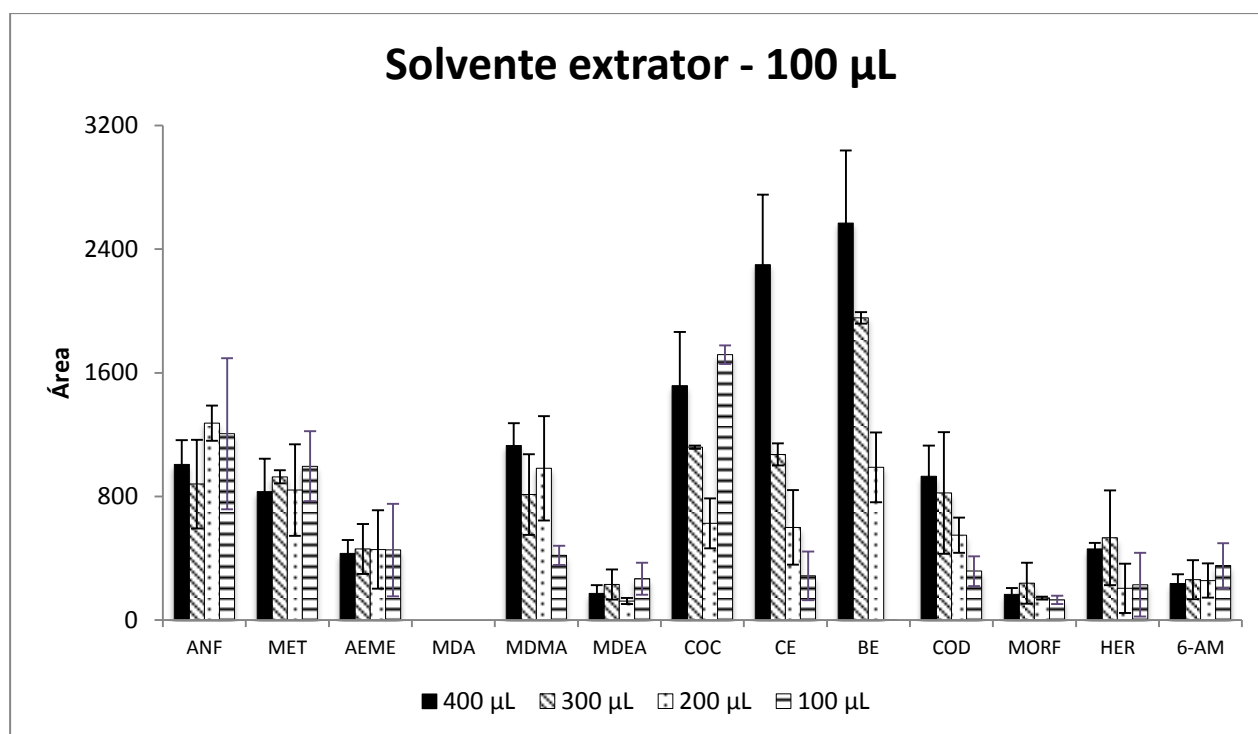


Figura 14 - Avaliação da influência do volume dos solventes extrator e dispersor utilizados no processo de extração dos analitos. Volume do solvente extrator: 100 µL de clorofórmio; volume do solvente dispersor: 400, 300, 200, 100 µL de acetona. Os resultados representam a média de três determinações \pm E.P.M.

Praticamente não há diferenças na recuperação dos analitos pertencentes às classes das anfetaminas e dos opióides, porém, quando foi utilizado o volume de 400 µL de solvente dispersor, houve maior recuperação dos analitos pertencentes à classe dos cocaínicos.

A **Figura 15** apresenta os resultados obtidos mantendo-se o volume do solvente extrator em 75 µL e variando-se o volume do solvente dispersor.

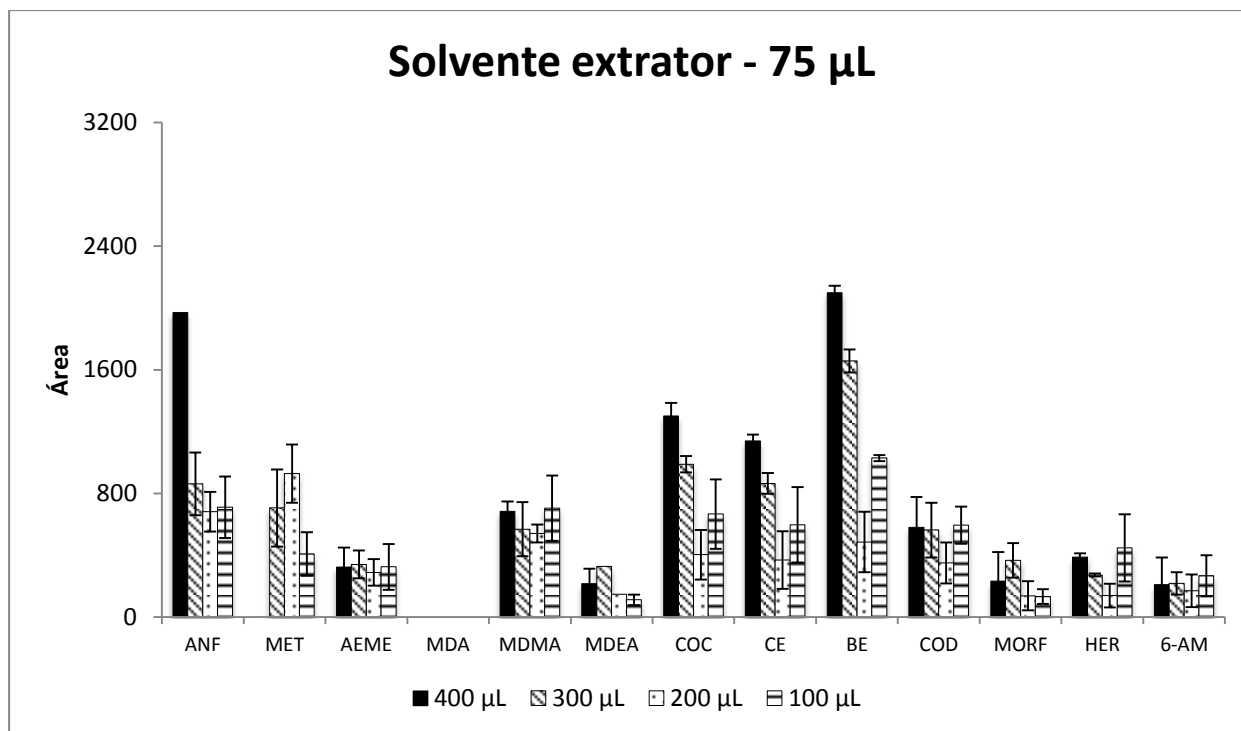


Figura 15 - Avaliação da influência do volume dos solventes extrator e dispersor utilizados no processo de extração dos analitos. Volume do solvente extrator: 75 µL de clorofórmio; volume do solvente dispersor: 400, 300, 200, 100 µL de acetona. Os resultados representam a média de três determinações \pm E.P.M.

Notam-se diferenças sutis na recuperação dos analitos. Como visualizado nos experimentos anteriores, a utilização de 400 µL de acetona como solvente dispersor, proporcionou a maior recuperação dos analitos. Nota-se também que a diminuição do volume de clorofórmio (solvente extrator) diminuiu a porcentagem de recuperação de alguns analitos.

Seguindo o planejamento experimental, a **Figura 16** apresenta os resultados obtidos mantendo-se o volume de solvente extrator em 50 µL e variando-se o volume do solvente dispersor.

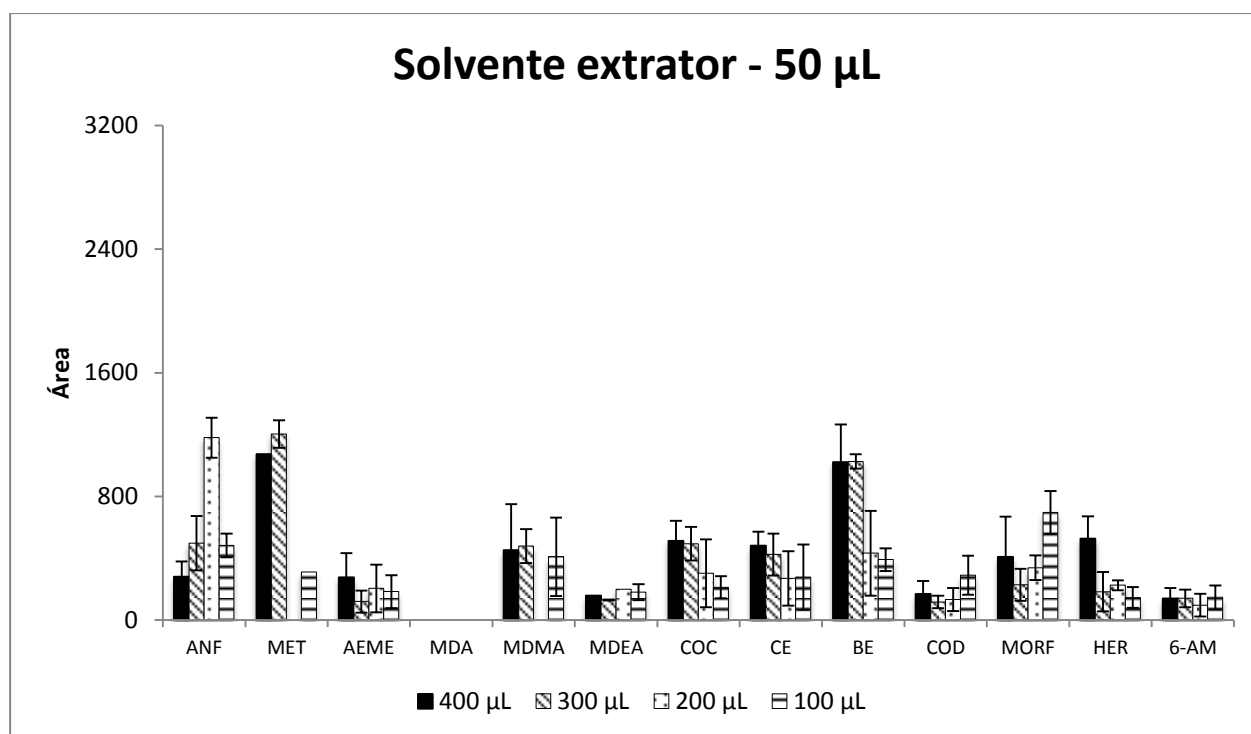


Figura 16 - Avaliação da influência do volume dos solventes extrator e dispersor utilizados no processo de extração dos analitos. Volume do solvente extrator: 50 µL de clorofórmio; volume do solvente dispersor: 400, 300, 200, 100 µL de acetona. Os resultados representam a média de três determinações ± E.P.M.

É evidenciado que a diminuição do volume de clorofórmio (solvente extrator) prejudicou a recuperação dos analitos. A utilização do volume de 400 µL de acetona (solvente dispersor) novamente proporcionou a maior recuperação entre a maioria dos analitos.

Para facilitar a visualização da proporção ideal de solventes extrator e dispersor, foi plotado um gráfico onde o volume de solvente dispersor foi mantido em 400 µL e o volume de solvente extrator foi variado (**Figura 17**).

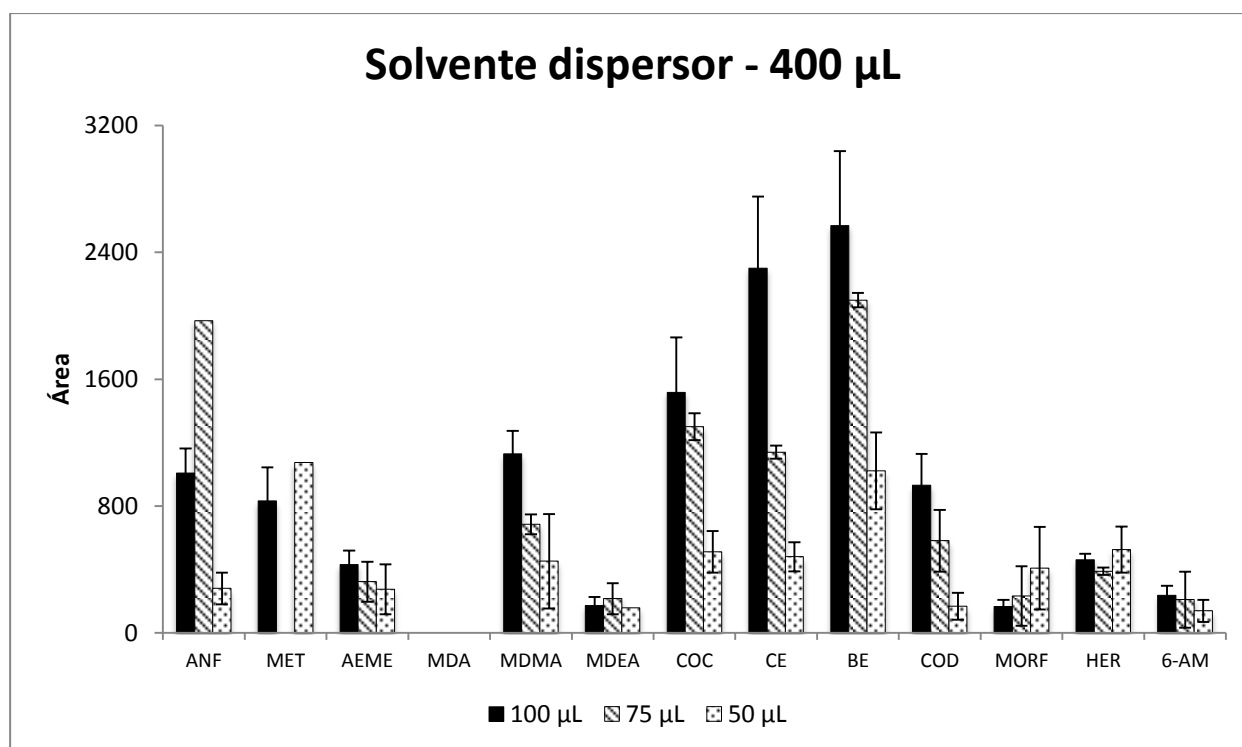


Figura 17 - Avaliação da influência do volume dos solventes extrator e dispersor utilizados no processo de extração dos analitos. Volume do solvente dispersor: 400 µL de acetona; volume do solvente extrator: 100, 75 e 50 µL de clorofórmio. Os resultados representam a média de três determinações \pm E.P.M.

A figura acima evidencia que a proporção 100 µL de clorofórmio como solvente extrator e 400 µL de acetona como solvente dispersor propiciou a maior recuperação dos analitos.

4.2.2 – Influência do pH da amostra

A influência da solução modificadora de pH foi avaliada através a utilização de três soluções: NaOH 0,1 M; tampão fosfato de sódio pH 7; e HCl 0,1 M. Os resultados obtidos na recuperação dos analitos após processo de extração encontram-se na **Figura 18**.

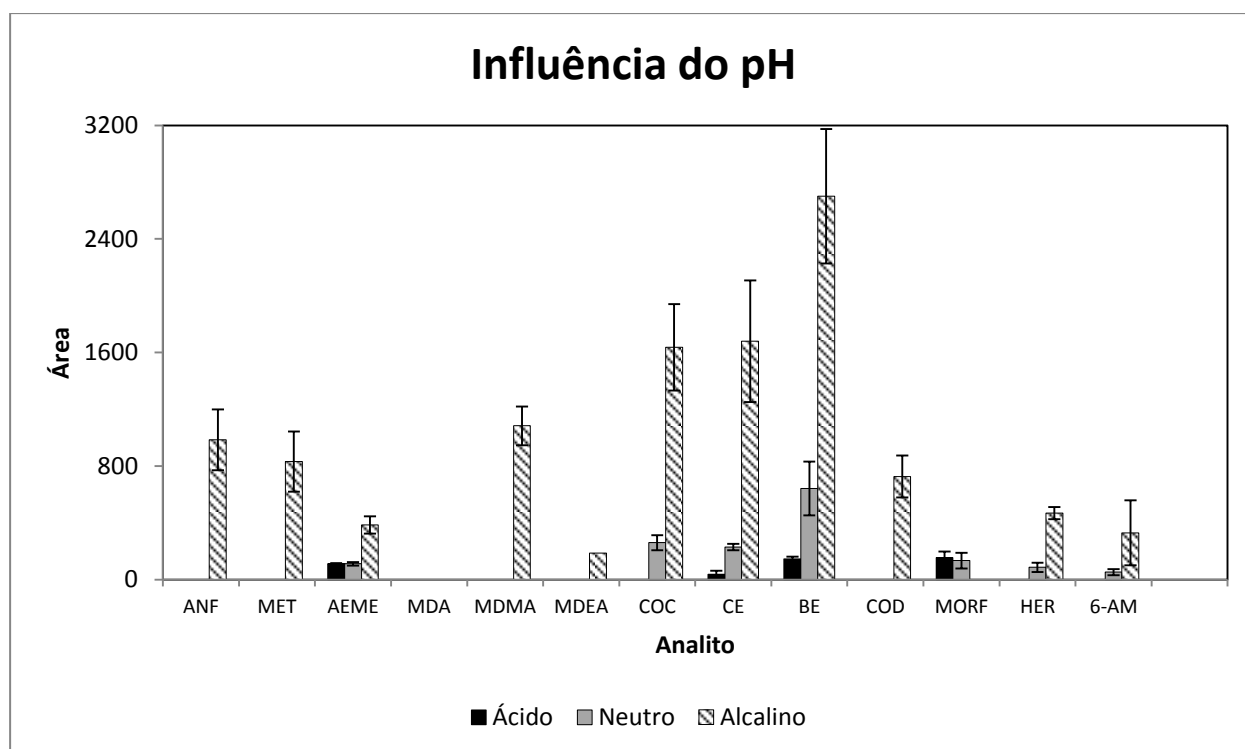


Figura 18 - Avaliação da influência dos pHs ácido, neutro e alcalino na extração dos analitos utilizando a DLLME. Solvente extrator: clorofórmio 100 μ L; solvente dispersor: acetona 400 μ L. Os resultados representam a média de três determinações \pm E.P.M.

Por apresentarem valores de pKa situados na faixa alcalina e devido ao mecanismo de extração da DLLME basear-se no processo de equilíbrio de distribuição dos analitos entre a amostra aquosa e o solvente extrator, a utilização da solução de NaOH favoreceu a passagem dos analitos para o estado não-ionizado, permitindo que fossem solubilizados pelo solvente extrator, resultando em maior recuperação dos analitos.

As condições estabelecidas nesta primeira etapa do desenvolvimento do processo de extração de drogas de abuso e metabólitos utilizando a DLLME encontram-se na **Tabela 8**.

Tabela 8 – Condições estabelecidas para a extração dos analitos em amostras de urina por DLLME.

Volume de solvente extrator (clorofórmio)	Volume de solvente dispersor (acetona)	Ajuste de pH da amostra	Volume da amostra
100 μ L	400 μ L	1,0 mL NaOH 0,1 M	5 mL

4.3 Otimização do processo de extração

Devido à relativa complexidade da urina, os componentes desta matriz interagiram com a mistura de solventes extrator e dispersor, resultando em emulsões de difícil quebra, que, mesmo quando submetidas à centrifugação e à adição de cloreto de sódio, permaneceram estáveis. A

formação de emulsões foi prejudicial na recuperação dos analitos, pois grande parte do solvente extrator foi retido na emulsão, conjuntamente aos analitos. Somente cerca de 30% do volume de solvente extrator inicialmente adicionado era recuperado, o que concomitantemente ocasionava grande variação da recuperação dos analitos na realização das replicatas.

Desta forma, avaliou-se a influência da redução do volume de urina utilizado no processo de extração de 5,0 para 3,0 mL, a substituição da solução modificadora de pH NaOH 0,1 M, por tampão carbonato de amônio 0,2 M pH 9,5 ou tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 10,3 \pm 0,5 e o aumento do volume de solução modificadora de pH adicionado de 1 para 2 mL.

Após a redução do volume da amostra e a substituição da solução modificadora de pH, foi observada a diminuição significativa do volume de emulsão formado, possibilitando a obtenção de um volume de solvente extrator mais próximo ao adicionado inicialmente além da redução nos coeficientes de variação obtidos (**Tabela 9**).

Tabela 9 – Coeficientes de variação obtidos com a utilização dos tampões carbonato de amônio e fosfato de sódio como soluções modificadoras de pH. Extração realizada empregando clorofórmio:isopropanol (SE:SD), 3 mL urina.

Analito	MDMA	MET	ANF	MDA	MDEA	AEME	BE	COC	CE	MORF	6-AM	HER	COD
Tampão carbonato de amônio	37,04	12,73	8,48	41,45	25,98	31,62	-	9,39	4,26	25,60	1,10	6,89	1,29
Tampão fosfato de sódio	9,04	9,51	5,35	12,62	13,64	7,67	-	2,59	4,07	13,44	9,45	11,93	9,99

A utilização do tampão fosfato de sódio como agente modificador de pH proporcionou menor variação entre as replicatas, apresentando coeficientes de variação inferiores a 15 %, como preconizado em guias de validação para ensaios bioanalíticos (ANVISA – RDC 27 de 17 de maio de 2012). A significativa melhora na repetitividade ocorreu provavelmente devido ao tampão proporcionar à amostra valores de pH mais estáveis, suprimindo a ionização dos analitos e possibilitando sua extração pelo solvente orgânico.

As condições pré-definidas que utilizavam o clorofórmio como solvente extrator em combinação aos diferentes solventes dispersores foram reavaliadas utilizando menor volume de amostra, 3,0 mL, e tampão fosfato de sódio como solução modificadora de pH. Os resultados obtidos encontram-se nas **Figuras 19, 20, 21, 22 e 23**.

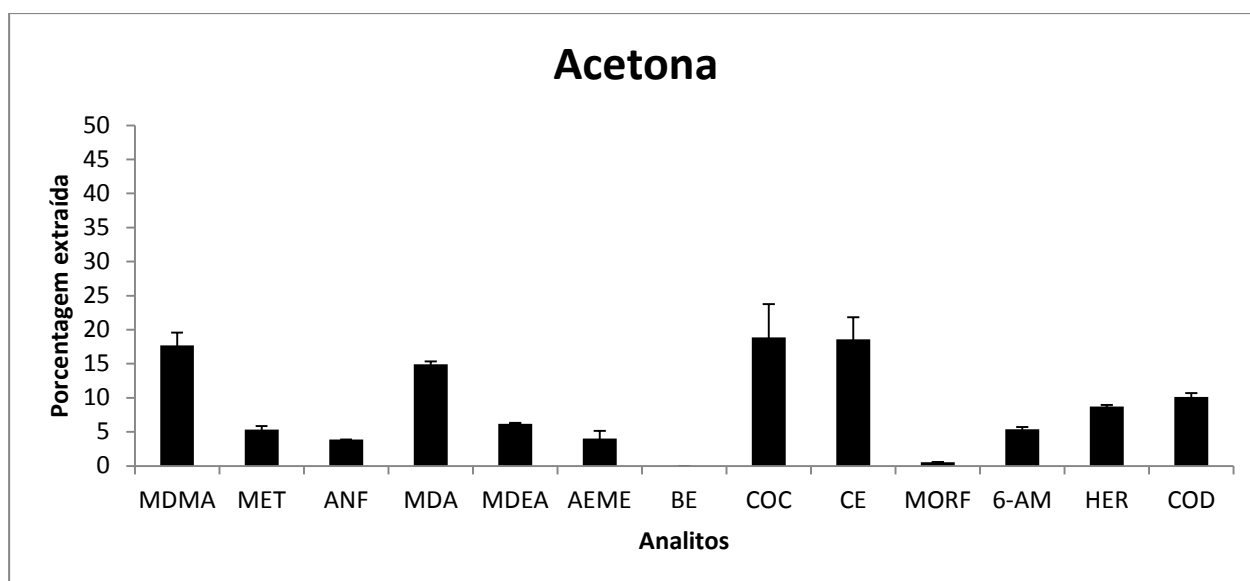


Figura 19 - Avaliação da recuperação de diferentes analitos utilizando a DLLME. Volume do solvente extrator: 100 μL de clorofórmio; volume do solvente dispersor: 400 μL de acetona. Os resultados representam a média de três determinações \pm E.P.M.

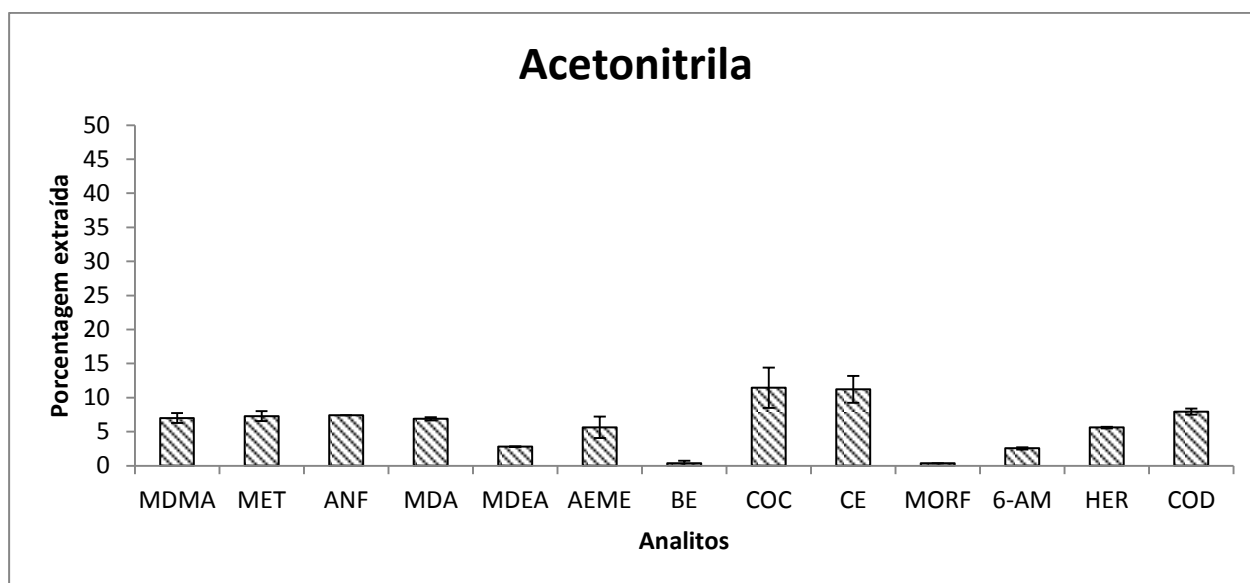


Figura 20 - Avaliação da recuperação de diferentes analitos utilizando a DLLME. Volume do solvente extrator: 100 μL de clorofórmio; volume do solvente dispersor: 400 μL de acetonitrila. Os resultados representam a média de três determinações \pm E.P.M.

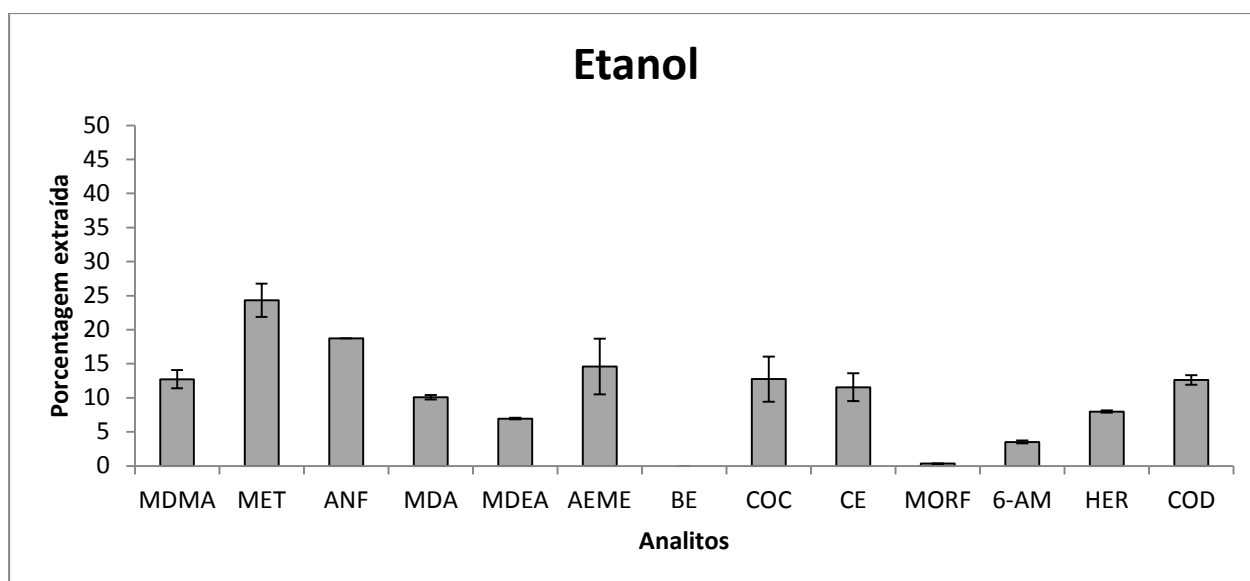


Figura 21 - Avaliação da recuperação de diferentes analitos utilizando a DLLME. Volume do solvente extrator: 100 μL de clorofórmio; volume do solvente dispersor: 400 μL de etanol. Os resultados representam a média de três determinações \pm E.P.M.

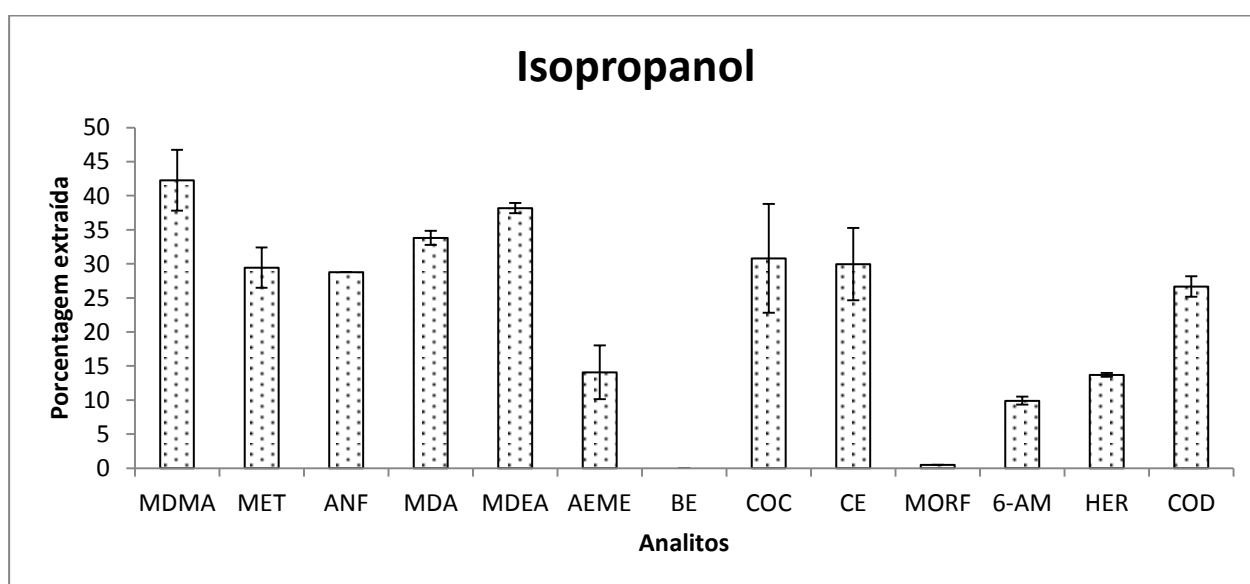


Figura 22 - Avaliação da recuperação de diferentes analitos utilizando a DLLME. Volume do solvente extrator: 100 μL de clorofórmio; volume do solvente dispersor: 400 μL de isopropanol. Os resultados representam a média de três determinações \pm E.P.M.

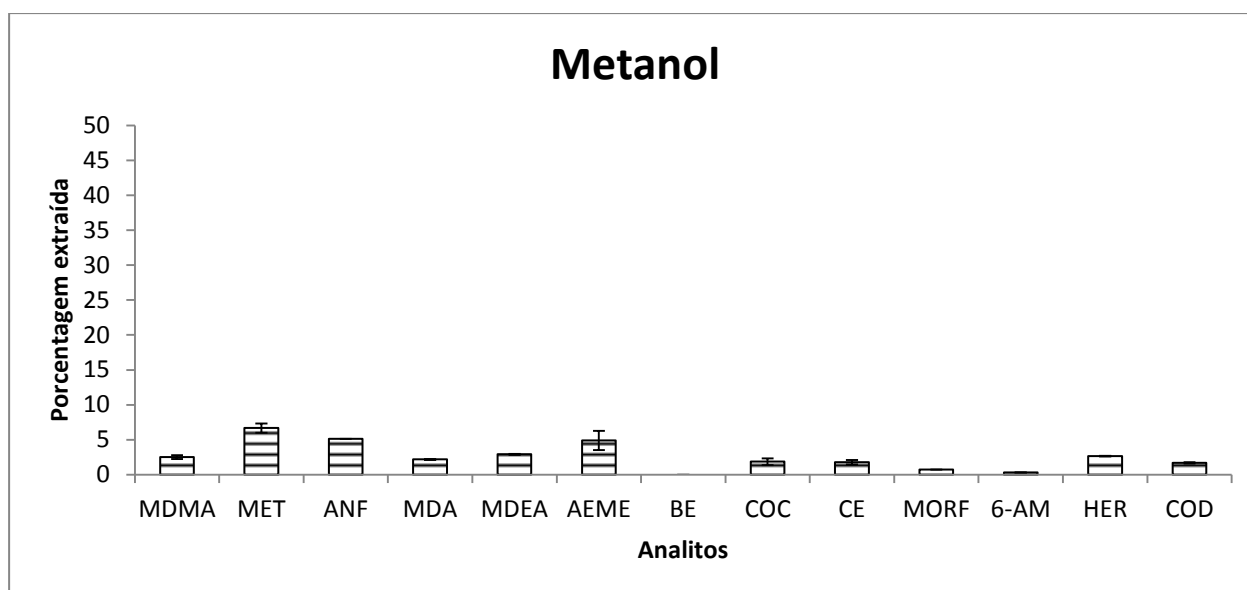


Figura 23 - Avaliação da recuperação de diferentes analitos utilizando a DLLME. Volume do solvente extrator: 100 μ L de clorofórmio; volume do solvente dispersor: 400 μ L de metanol. Os resultados representam a média de três determinações \pm E.P.M.

A utilização de isopropanol como solvente dispersor proporcionou maior recuperação dos analitos. Em nenhuma condição avaliada houve recuperação do analito benzoilecgonina, provavelmente por seu caráter anfótero ou devido à baixa concentração de analito utilizada (YONAMINE, 2004).

Devido à boa recuperação dos analitos e a redução na formação de emulsão, o isopropanol foi o solvente dispersor escolhido para as próximas etapas na otimização no processo de extração.

A **Tabela 10** apresenta as novas condições estabelecidas para o processo de extração de drogas de abuso e metabólitos empregando a DLLME.

Tabela 10 – Novas condições estabelecidas para a extração dos analitos em amostras de urina por DLLME.

Volume de solvente extrator (clorofórmio)	Volume de solvente dispersor (isopropanol)	Ajuste de pH da amostra	Volume da amostra
100 μ L	400 μ L	2,0 mL Tampão Fosfato de Sódio 0,2 M	3 mL

Após reestabelecidas as condições para a extração dos analitos em amostras de urina usando a DLLME, foram realizados testes para avaliar razões de volume dos solventes extrator e dispersor que proporcionassem a recuperação do mesmo volume de solvente extrator adicionado na amostra. A **Tabela 11** abaixo apresenta as razões de volume avaliadas e os volumes de solvente extrator recuperados.

Tabela 11 – Razões de volume de solvente dispersor e extrator.

Volume SD (μL)	Volume SE (μL)	Volume recuperado (μL)*
400	100	45
400	150	90
400	200	150
500	100	30
500	150	85
500	200	145
600	100	30
600	150	85
600	200	150
700	100	40
700	150	75
700	200	140
800	100	25
800	150	95
800	200	110
900	100	27
900	150	77
900	200	122
1000	100	35
1000	150	83
1000	200	120
1100	100	43
1100	150	95
1100	200	145
100	100	38
1200	150	72
1200	200	140
1300	100	25
1300	150	78
1300	200	155
1400	100	53
1400	150	150
1400	200	225
1500	100	58
1500	150	145
1500	200	238

*Os valores representam a média de duas determinações. SD: solvente dispersor;
SE: solvente extrator.

Podemos observar que foi necessário grande aumento do volume do solvente dispersor e do solvente extrator para que o volume de solvente sedimentado, o solvente extrator, fosse o mesmo adicionado inicialmente. Com a razão 1400 μL de solvente dispersor (isopropanol) para

150 μL de solvente extrator (clorofórmio) foi possível atingir as condições ideais para a realização da extração. Com razões maiores ocorre a sedimentação de um volume superior ao adicionado inicialmente, o que não é interessante, pois promove o aumento da miscibilidade entre a amostra aquosa e o solvente extrator. A **Figura 24** apresenta as porcentagens extraídas dos analitos ao se utilizar 1400 μL de solvente dispersor e 150 μL de solvente extrator.

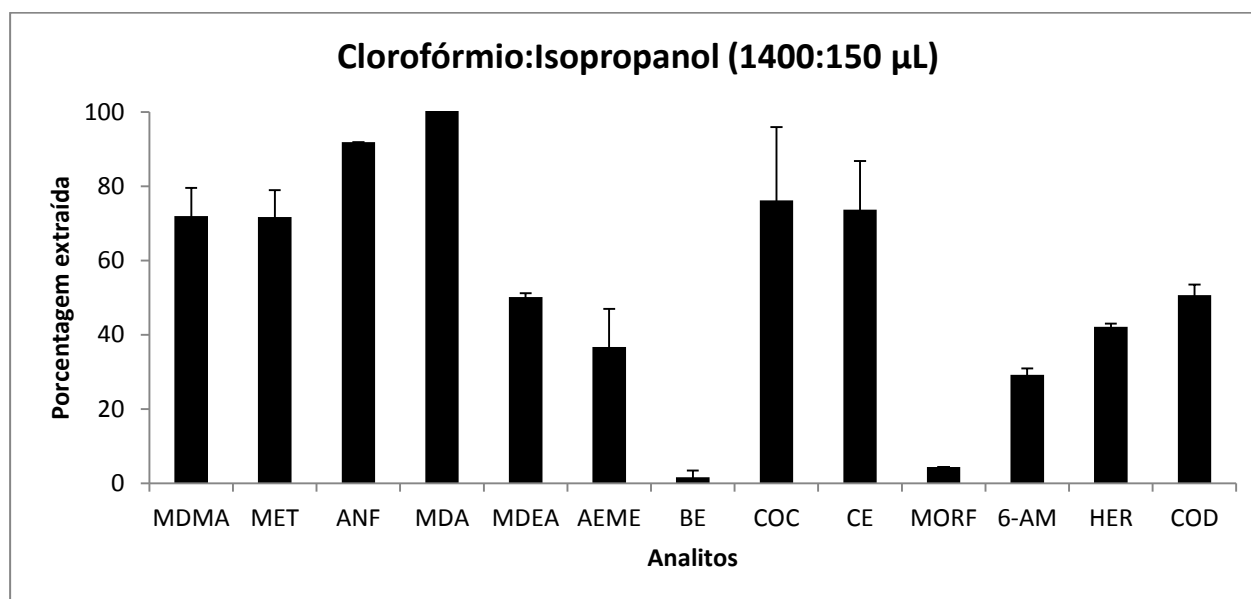


Figura 24 - Avaliação da recuperação de diferentes analitos utilizando a DLLME. Volume do solvente extrator: 150 μL de clorofórmio; volume do solvente dispersor: 1400 μL de isopropanol. Os resultados representam a média de três determinações \pm E.P.M.

As condições que proporcionaram maior recuperação dos analitos na otimização do processo de extração de drogas de abuso e metabólitos utilizando a DLLME estão apresentadas na **Tabela 12**.

Tabela 12 – Condições otimizadas para a extração dos analitos em amostras de urina por DLLME.

Volume de solvente extrator (clorofórmio)	Volume de solvente dispersor (isopropanol)	Ajuste de pH da amostra	Volume da amostra
150 μL	1400 μL	2,0 mL Tampão Fosfato de Sódio 0,2 M	3 mL

4.4 – Validação analítica

Os resultados dos ensaios de seletividade, efeito residual, efeito de matriz, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limites de quantificação e estabilidade são apresentados a seguir.

4.4.1 – Seletividade

Para avaliar a seletividade, foram analisadas amostras provenientes de diferentes fontes e estas foram comparadas com uma amostra do limite inferior de quantificação (LIQ) (10 ng/mL). A sobreposição entre os cromatogramas de uma amostra Branco e uma amostra LIQ é mostrada na **Figura 25**.

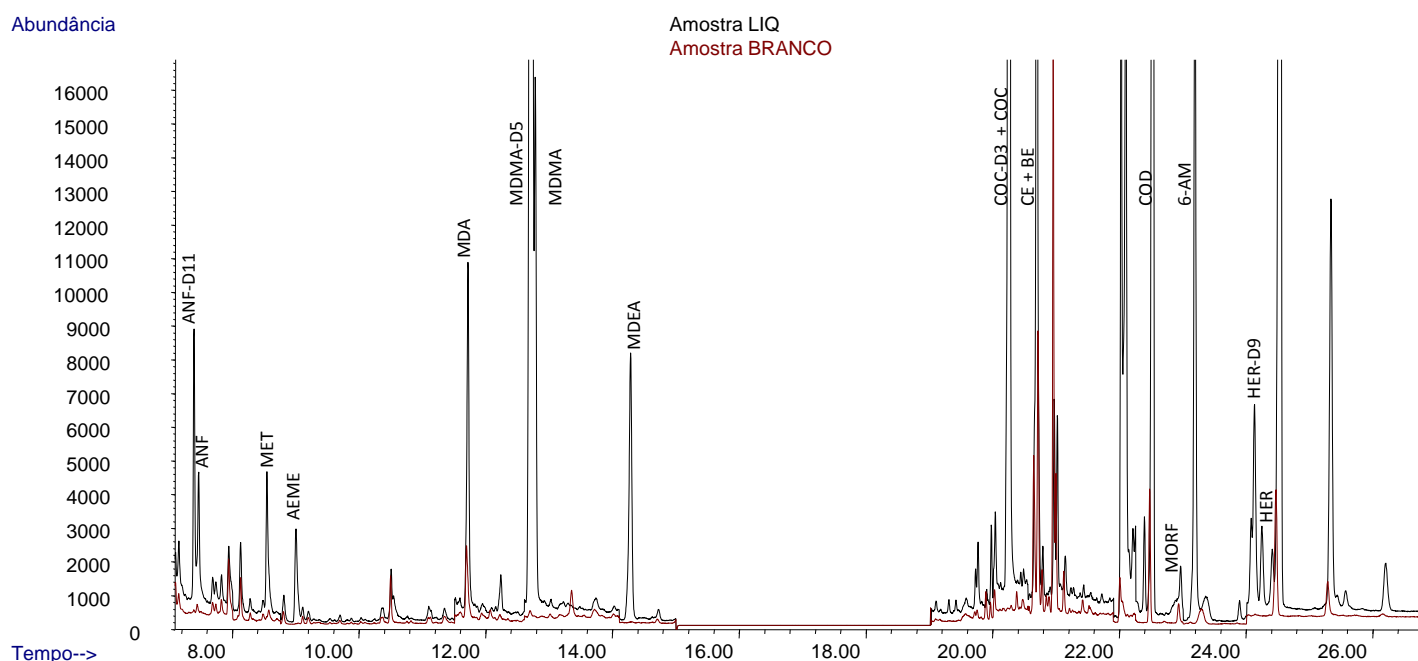


Figura 25 - Sobreposição entre cromatogramas de uma amostra Branco e uma amostra LIQ em modo *full scan*. A amostra Branco é dada pela linha vermelha do cromatograma, enquanto a amostra LIQ é dada pela linha preta.

Conforme a figura acima é possível observar a ocorrência de coeluição entre componentes da matriz biológica e os analitos MDA, cocaetileno, benzoilecgonina e morfina. Embora indesejável, neste caso, a coeluição de componentes da matriz não interfere na identificação e quantificação dos compostos, devido ao detector seletivo de massas possibilitar a monitorização dos íons moleculares de interesse, de certa forma, anulando a interferência dos compostos oriundos da matriz biológica, conforme pode ser visualizado na **Figura 26**.

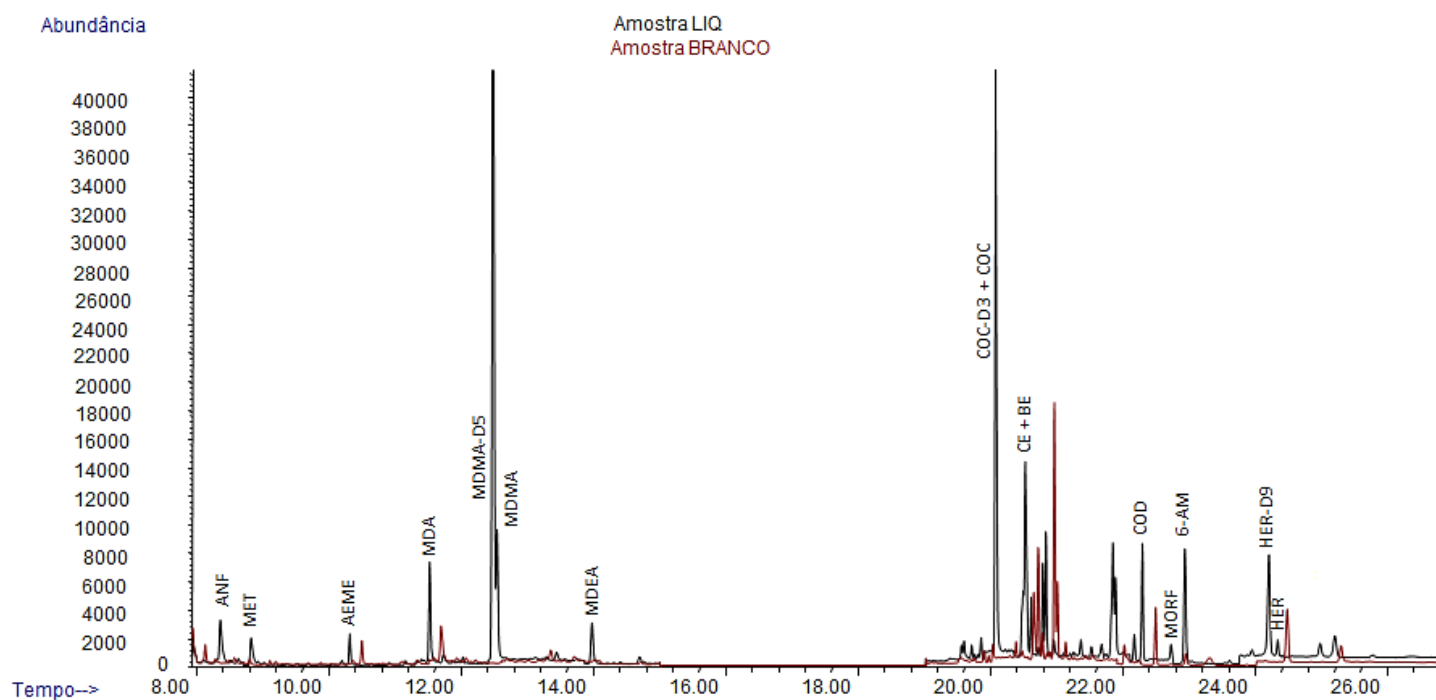


Figura 26 - Sobreposição entre cromatogramas de uma amostra Branco e uma amostra LIQ em modo *SIM* (selected ion monitoring). A amostra Branco é dada pela linha vermelha do cromatograma, enquanto a amostra LIQ é dada pela linha preta.

4.4.2 – Efeito residual

A avaliação do efeito residual foi realizada pela análise de três amostras Branco; sendo uma analisada anteriormente a uma amostra do limite superior de quantificação (LSQ) (400 ng/mL) e duas analisadas após. A análise das amostras Branco realizada após a análise do LSQ não apresentou vestígio de nenhum dos analitos adicionados, indicando que não houve efeito residual.

4.4.3 – Efeito matriz

Para a avaliação do efeito matriz, após a análise de seis amostras de diferentes procedências, foi calculado o *fator matriz* (FM) para cada uma das amostras e os resultados podem ser visualizados na **Tabela 13**.

Tabela 13 – *Fator matriz* dos analitos envolvidos na pesquisa.

Analito	Média FM CQB	CV% FM CQB	Média FM CQA	CV% FM CQA
ANF	1,15	14,43	1,35	4,06
MET	1,40	12,14	1,49	15,38
MDA	1,63	15,72	1,20	13,63
MDMA	1,08	4,85	0,97	5,12
MDEA	1,56	13,80	0,98	15,85
AEME	0,10	12,14	0,71	12,38
COC	1,26	8,25	1,02	5,00
BE	1,97	10,57	1,10	4,19

Tabela 13 – Fator matriz dos analitos envolvidos na pesquisa

Analito	Média FM CQB	CV% FM CQB	Média FM CQA	CV% FM CQA
CE	1,35	7,02	1,01	4,75
MORF	1,06	13,78	0,81	6,75
COD	1,28	12,86	0,82	6,64
6-AM	1,03	15,19	0,78	8,83
HER	1,33	10,19	0,93	5,76

Alguns analitos sofrem influência de componentes da matriz em sua ionização. A BE é o analito mais propenso ao aumento da ionização. Mesmo sofrendo grande influência da matriz, é importante observar que a variação entre as amostras está dentro dos 15% considerados como aceitável. A diferença de ionização entre os analitos pode comprometer a quantificação dos mesmos, sendo necessário o uso de padrão interno (CASSIANO *et al.*,2009).

4.4.4 – Linearidade

Para a construção das curvas analíticas e a avaliação da linearidade do método, foram empregadas amostras de urina fortificadas com soluções-padrão no intervalo de 10 ng/mL até 400 ng/mL, exceto para a anidroecgonina metil éster (AEME), que apresentou linearidade no intervalo de concentração de 50 ng/mL até 300 ng/mL. Foi determinada a equação de regressão linear e coeficiente de correlação linear (**r**). Todos os analitos apresentaram curvas de calibração com valores de **r** superiores a 0,99 (**Tabela 14**).

Tabela 14 – Faixa de trabalho e coeficientes de determinação do método.

Analito	Faixa de trabalho (ng/mL)	r
ANF	10-400	0,9997
MET	10-400	0,9979
MDA	10-400	0,9986
MDMA	10-400	0,9989
MDEA	10-400	0,9985
AEME	50-300	0,9992
COC	10-400	0,9998
BE	10-400	0,9998
CE	10-400	0,9952
COD	10-400	0,9994
MORF	10-400	0,9998
HER	10-400	0,9995
6-AM	10-400	0,9978

As **Figuras 27, 28 e 29** apresentam as curvas de calibração, equação da reta e coeficiente de correlação linear (**r**) para cada analito.

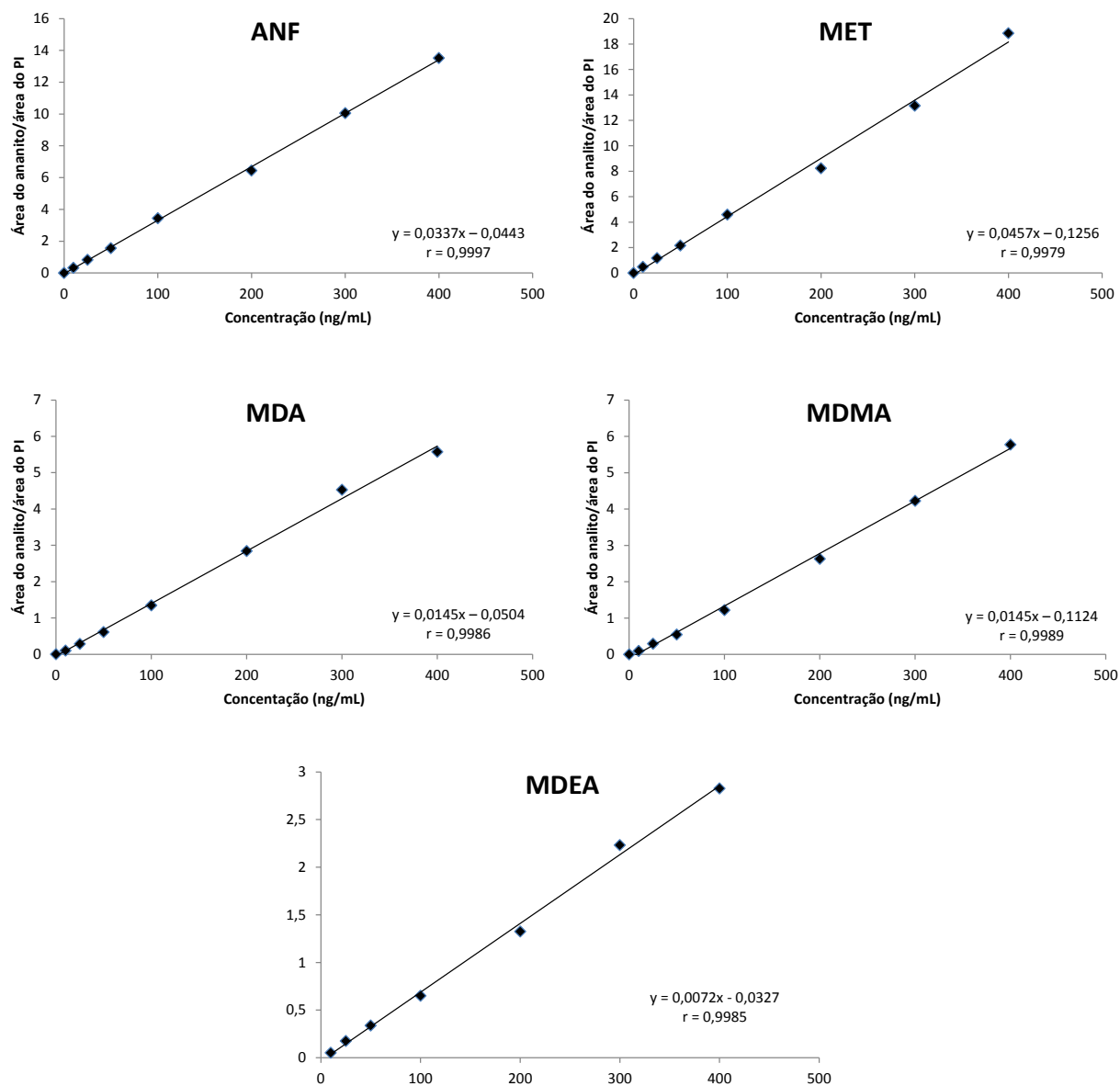


Figura 27 - Curvas de calibração, equação da reta e coeficiente de correlação linear dos analitos da classe dos anfetamínicos: ANF, MET, MDA, MDMA e MDEA.

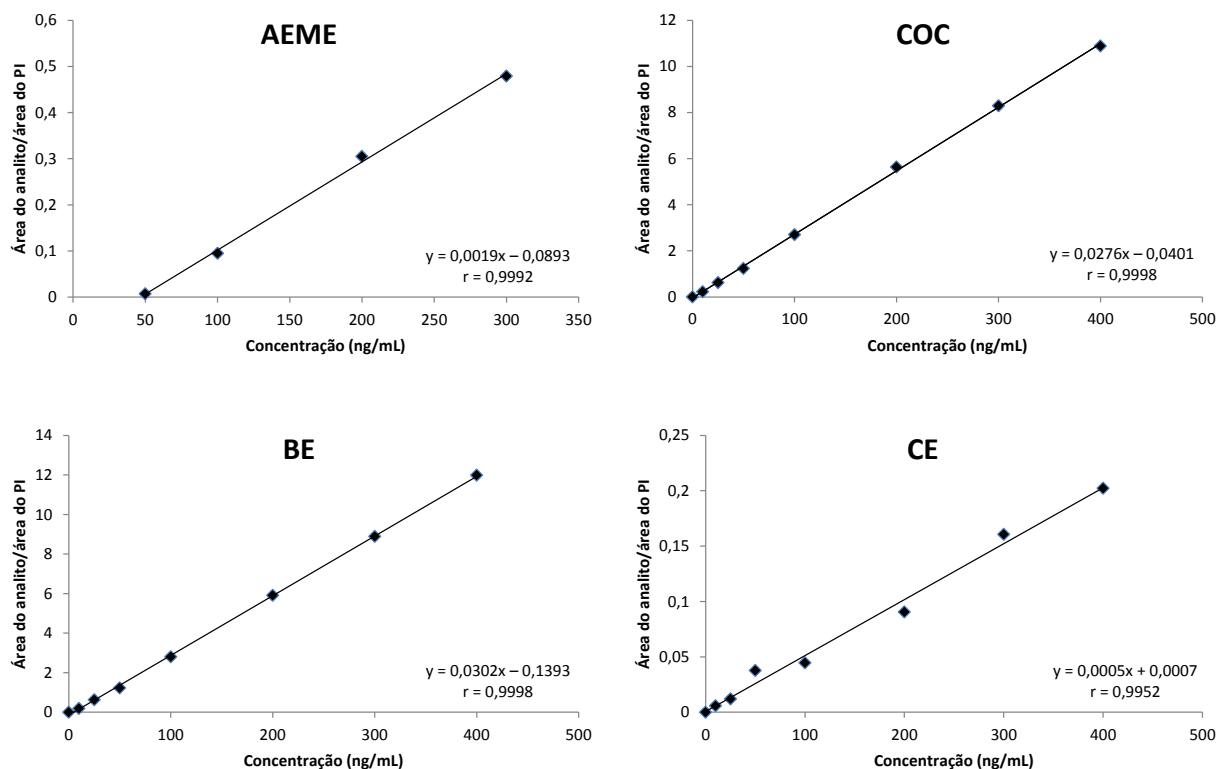


Figura 28 - Curvas de calibração, equação da reta e coeficiente de correlação linear dos analitos da classe dos cocaínicos: AEME, COC, BE e CE.

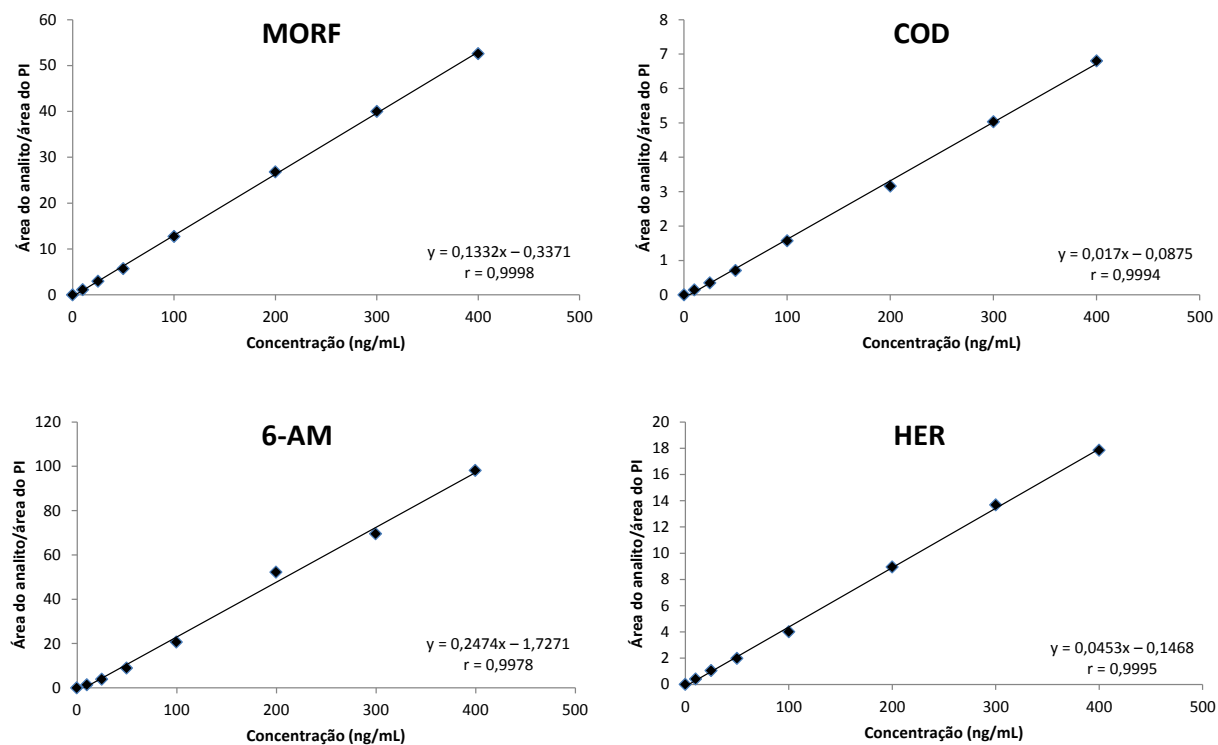


Figura 29 - Curvas de calibração, equação da reta e coeficiente de correlação linear dos analitos da classe dos opióides: MORF, COD, 6-AM e HER.

Todos os analitos pesquisados apresentaram coeficientes de determinação superiores a 0,99, em concordância com o preconizado pelos principais guias de validação de métodos bioanalíticos.

4.4.5 – Precisão e exatidão

Os ensaios de precisão e exatidão apresentaram resultados satisfatórios, dentro dos limites preconizados pelos guias adotados neste estudo. A **Tabela 15** apresenta os resultados obtidos nos ensaios de precisão e exatidão.

Tabela 15 – Valores obtidos na avaliação da precisão e exatidão para cada analito.

Analito	Concentração nominal (ng/mL)	Precisão (CV %)		Exatidão (EPR %)	
		Intra-ensaio	Inter-ensaio	Intra-ensaio	Inter-ensaio
ANF	10	11,00	11,69	15,69	18,78
	25	1,76	2,37	13,30	13,86
	200	5,92	5,64	6,82	6,02
	300	4,65	6,70	9,33	11,77
	500	5,94	4,58	2,72	4,85
MET	10	10,48	13,00	13,18	18,47
	25	8,61	10,09	-9,25	-7,99
	200	9,19	10,28	-4,12	-3,13
	300	8,48	10,15	10,21	5,97
	500	9,20	8,96	-9,38	-11,10
MDA	10	8,11	7,50	9,00	9,63
	25	7,73	6,81	2,11	-0,67
	200	7,59	10,43	-5,35	-11,16
	300	7,14	6,01	-12,40	-12,74
	500	10,59	8,96	-11,03	-10,98
MDMA	10	10,50	9,77	2,69	3,19
	25	2,42	2,03	-9,91	-9,90
	200	11,31	9,80	1,39	4,44
	300	7,31	6,95	14,57	14,85
	500	2,12	2,12	12,20	12,54
MDEA	10	18,18	16,72	7,27	-14,30
	25	1,39	14,15	0,18	-5,90
	200	9,87	7,92	7,96	9,42
	300	12,49	14,26	0,40	2,18
	500	7,99	10,60	4,24	-2,17
AEME	50	1,87	6,04	0,80	1,62
	100	5,38	7,42	3,27	-2,98
	200	2,45	5,96	13,93	3,71
	300	3,63	4,27	-10,12	-0,33
	500	4,51	6,28	-2,92	-2,36

Tabela 15 – Valores obtidos na avaliação da precisão e exatidão para cada analito

Analito	Concentração nominal (ng/mL)	Precisão (CV %)		Exatidão (EPR %)	
		Intra-ensaio	Inter-ensaio	Intra-ensaio	Inter-ensaio
COC	10	7,02	5,17	-2,82	-5,90
	25	2,66	2,43	7,06	7,02
	200	5,02	4,81	3,33	3,09
	300	2,69	2,69	7,81	8,15
	500	2,30	1,68	8,33	8,06
BE	10	7,45	18,15	6,34	9,50
	25	1,73	5,05	4,56	2,13
	200	2,73	19,84	-2,72	0,60
	300	6,45	5,57	0,16	-0,40
	500	5,79	7,64	0,34	0,34
CE	10	8,31	6,07	-14,31	-16,06
	25	8,62	13,24	-12,96	-14,09
	200	1,68	1,89	-13,59	-14,13
	300	2,74	2,76	-13,21	-12,98
	500	2,24	1,65	-12,48	-12,75
MORF	10	7,90	3,89	13,40	14,91
	25	2,56	2,58	6,15	5,86
	200	5,33	5,07	1,05	0,66
	300	3,28	3,22	6,17	6,27
	500	1,48	1,46	5,04	5,82
COD	10	3,05	17,60	0,85	-3,67
	25	1,28	1,55	-13,35	-14,64
	200	6,02	7,08	-3,51	-4,40
	300	2,19	6,67	3,89	0,42
	500	4,18	5,34	-0,45	1,33
6-AM	10	3,41	6,89	11,34	14,88
	25	3,15	10,83	-13,14	-8,71
	200	0,88	6,06	5,24	8,96
	300	9,17	9,95	-1,10	-3,97
	500	9,49	8,02	0,08	0,85
HER	10	4,41	7,10	-15,54	-19,06
	25	14,37	14,09	2,97	-3,40
	200	9,19	9,49	5,35	5,65
	300	14,19	14,82	6,16	4,47
	500	3,46	4,22	6,67	6,50

4.4.6 – Limites de detecção e de quantificação

O limite de detecção foi estabelecido com base nos parâmetros obtidos da curva analítica. O limite inferior de quantificação foi estabelecido pela análise, em cinco replicatas, da amostra fortificada pela menor concentração de analitos, que apresentasse relação sinal-ruído maior ou

igual a 10 e que apresentasse precisão e exatidão adequados (variação de até 20%). O limite superior de quantificação foi determinado pela análise, em cinco replicatas, da amostra fortificada pela maior concentração de analitos, que apresentasse linearidade, precisão e exatidão satisfatórios (variação de até 15%).

Os limites estabelecidos para o método encontram-se na **Tabela 16**.

Tabela 16 – Limites estabelecidos e sua precisão e exatidão.

Analito	LD (ng/mL)	LIQ (ng/mL)	Precisão/Exatidão (CV%/EPR%)	LSQ (ng/mL)	Precisão/Exatidão (CV%/EPR%)
ANF	0,11	10	11,00/15,69	400	4,65/9,33
MET	0,70	10	10,48/13,18	400	8,48/10,21
MDA	0,37	10	8,11/9,00	400	7,14/-12,40
MDMA	0,44	10	10,50/2,69	400	7,31/14,54
MDEA	0,99	10	18,18/7,27	400	12,49/0,40
AEME	14,64	50	1,87/0,80	300	3,63/-10,12
COC	0,67	10	7,02/-2,82	400	2,69/7,81
BE	1,40	10	7,45/6,34	400	6,45/0,16
CE	0,49	10	8,31/-14,31	400	2,74/-13,21
MORF	2,73	10	7,90/13,40	400	3,28/6,17
COD	1,79	10	3,05/0,85	400	2,19/3,89
6-AM	1,26	10	3,41/11,34	400	9,17/-1,10
HER	0,93	10	4,41/-15,54	400	14,19/6,16

4.4.7 – Estabilidade

A estabilidade pós-processamento foi avaliada pela re-injeção das amostras anteriormente processadas. A estabilidade de curta duração foi realizada pela análise de amostras preparadas com 24 h de antecedência e mantidas sem refrigeração. A estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento foi avaliada realizando três ciclos de congelamento (-20 °C) e descongelamento (à temperatura ambiente) da amostra. Os resultados dos testes de estabilidade foram comparados com resultados obtidos de amostras recém-preparadas em um mesmo experimento. Foram consideradas estáveis as amostras que apresentassem coeficiente de variação de até 20% para o LIQ e de até 15% para o LSQ. As amostras demonstraram estabilidade quando reprocessadas 24 horas após o preparo, quando analisadas após 24 h à temperatura ambiente e também após três ciclos de congelamento e descongelamento.

4.5 – Perfil das amostras coletadas

Com base nos questionários aplicados durante as coletas, foram traçados alguns gráficos que representam o perfil das amostras obtidas dos pacientes em tratamento pelo CAPS-AD de Ribeirão Preto, que perfizeram um total de 117 amostras. A **Figura 30** apresenta a incidência de uso entre gêneros.

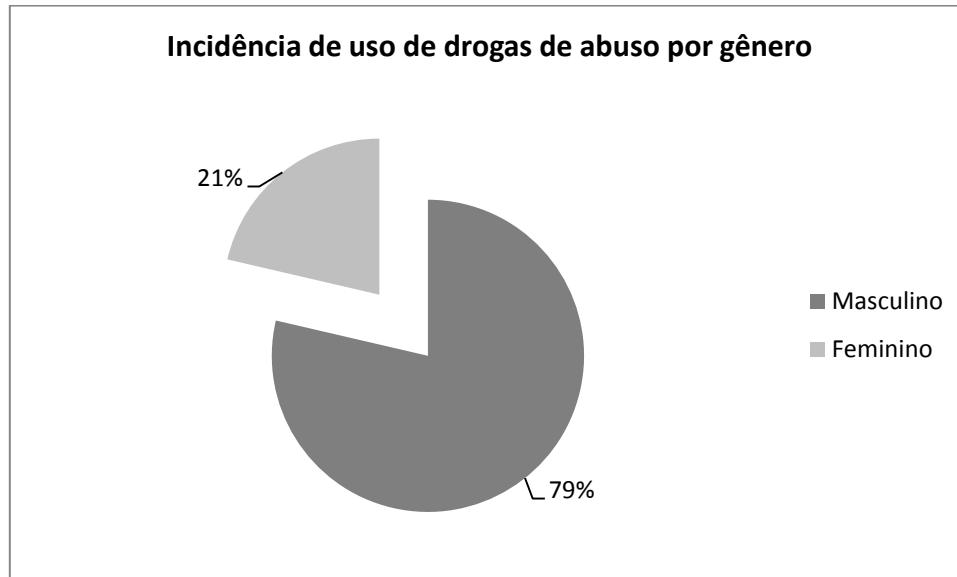


Figura 30 - Incidência do uso de drogas de abuso considerando gênero dos pacientes em tratamento no CAPS-AD que participam da presente pesquisa.

Ao observar o gráfico acima nota-se uma predominância de voluntários pertencente ao gênero masculino. Estes resultados apresentam similaridades com o *World Drug Report*, apresentado pela UNODC (2012), indicando que cerca de 62 % dos usuários de drogas de abuso correspondem ao gênero masculino e 38 % ao gênero feminino. A Pesquisa Nacional Sobre uso de crack (BASTOS, BERTONI, 2014) indicou predominância de cerca de 78% dos usuários de crack pertencentes ao gênero masculino. Mesmo se tratando de uma população restrita, os resultados apresentam semelhança com a literatura, apontando uma presença masculina maior.

A **Figura 31** apresenta a faixa etária dos indivíduos participantes da pesquisa em grupos.

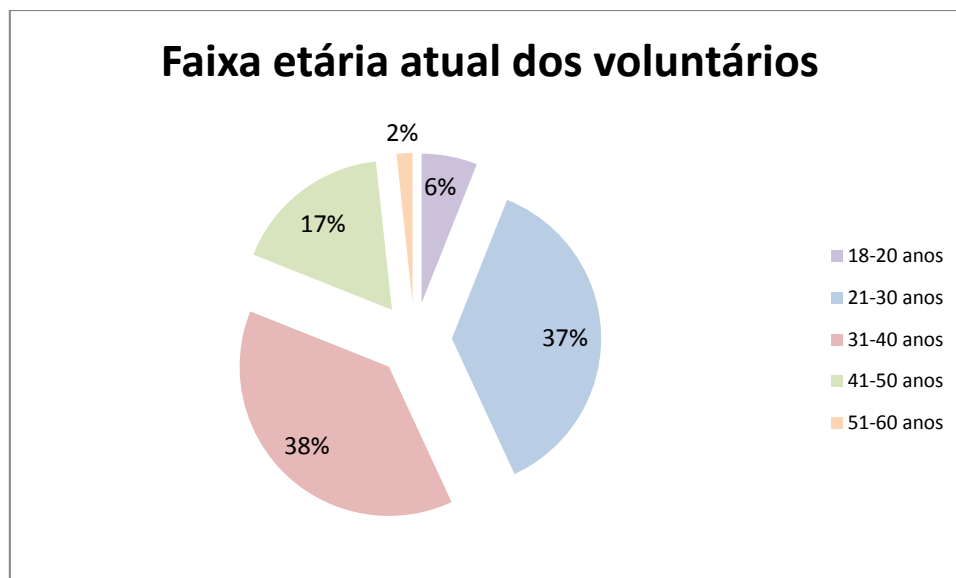


Figura 31 - Faixa etária em grupos dos participantes da pesquisa.

Há duas faixas etárias onde ocorre concentração do número de usuários: dos 21 aos 30 e dos 31 aos 40 anos, que somadas, perfazem um total de cerca de 75% dos indivíduos participantes da pesquisa. Os resultados apresentados pelo relatório de 2012 da UNODC indicam um número acentuado de usuários concentrados na faixa etária dos 18 aos 25 anos, decaindo com o aumento da idade. As discrepâncias apresentadas são provavelmente devidas à restrição da população utilizada neste estudo.

Através dos questionários foi possível obter informações a respeito da idade em que os voluntários tiveram seu primeiro contato com drogas ilícitas (**Figura 32**).

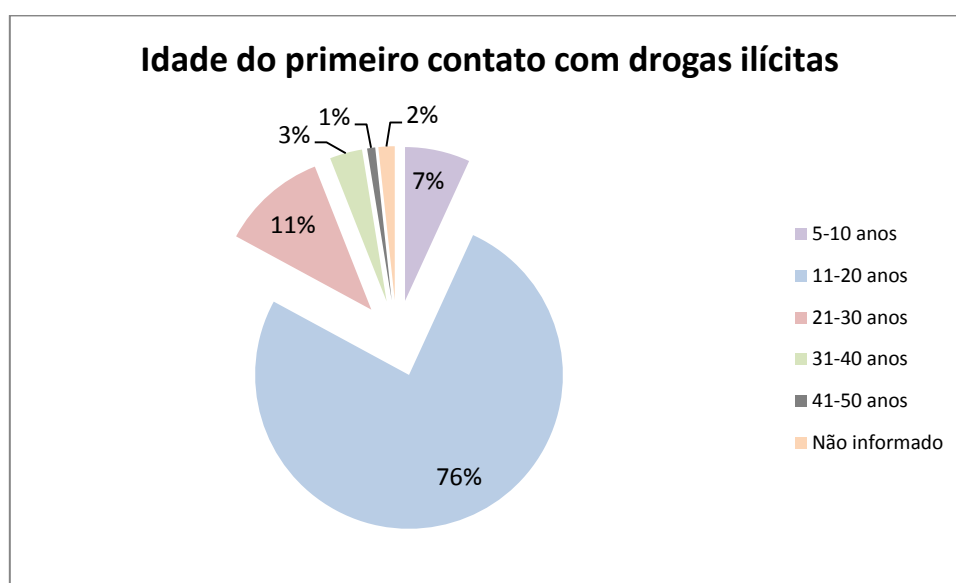


Figura 32 - Idade em que houve o primeiro contato com drogas ilícitas.

Grande parte dos voluntários teve seu primeiro contato com drogas ilícitas no período da pré-adolescência até o início da fase adulta (cerca de 76%). Um número considerável de indivíduos tiveram seu primeiro contato com drogas entre os 5 e 10 anos (cerca de 7%).

O acompanhamento do uso de drogas entre os jovens é importante pelos seguintes motivos: a maioria dos usuários de droga tem seu primeiro contato na juventude e é entre os jovens que as ações preventivas têm alcançado maiores resultados; o uso de drogas ilícitas pelos jovens é indicativo da influência de segmentos sociais aos quais os jovens são mais sensíveis, como aumento da acessibilidade às drogas e outras transformações nesse mercado; os jovens têm cada vez mais acesso a uma ampla variedade de substâncias, constituindo novos padrões de uso ou modificação de padrões de uso já existentes; o início precoce do uso de drogas é associado a uma série de resultados negativos na saúde dos indivíduos (ANDRADE, DUARTE, OLIVEIRA, 2010).

Os voluntários da pesquisa também foram questionados sobre seu consumo atual de drogas de abuso e o resultado é apresentado na **Figura 33**.

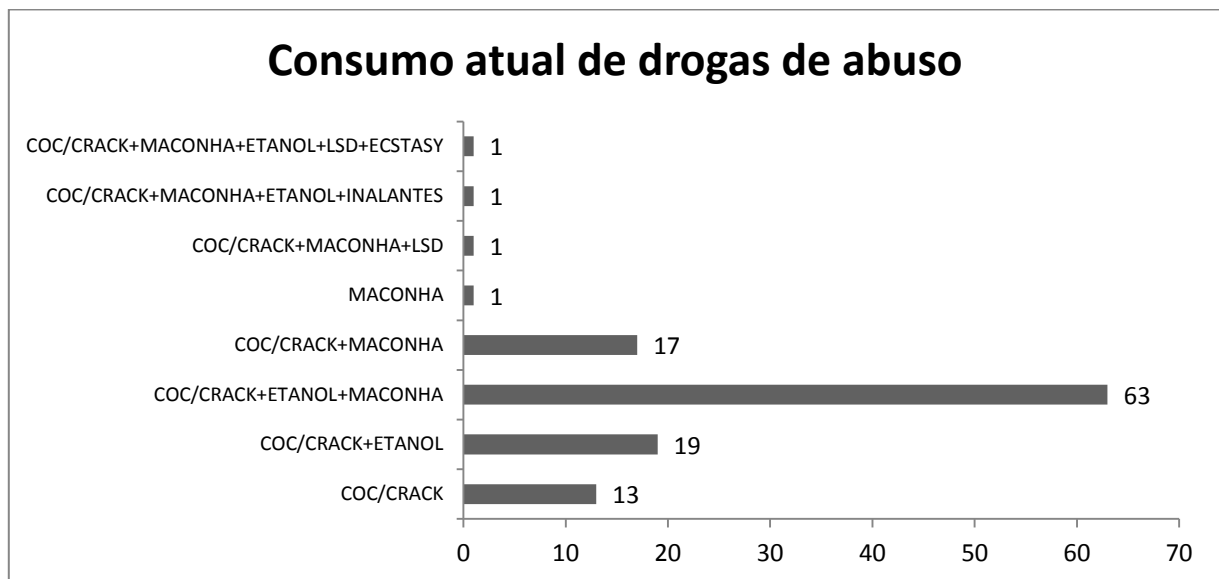


Figura 33 - Consumo atual de drogas de abuso dos voluntários da pesquisa conforme questionários aplicados.

Grande número dos voluntários é poliusuário de drogas, isto é, utiliza combinação de várias drogas simultaneamente, ou dentro de um curto período de tempo. Conforme relatado, há prevalência de uso de cloridrato de cocaína/cocaína em base livre, seguido pela maconha, álcool e outras drogas. Quando comparados aos resultados apresentados pelo relatório de 2012 da

UNODC, há uma troca de posições, indicando maior consumo, em ordem decrescente, de álcool, *Cannabis* (maconha), opióides e cocaínicos.

Existem três padrões distintos de policonsumo de drogas: No primeiro padrão, substâncias diferentes são utilizadas em conjunto visando efeito cumulativo ou complementar. Este padrão é muito frequente entre usuários de cannabis e cocaína, que podem utilizar a droga em combinação com álcool; outras combinações são o consumo de heroína combinado a benzodiazepínicos, álcool ou outros opióides (metadona, oxicodona, etc.) e o uso de cocaína em combinação a outros estimulantes. No segundo padrão ocorre a utilização de um fármaco para reduzir os efeitos adversos de outra droga, por exemplo, o uso de cocaína e heroína (“*speedball*”), ou cocaína e outros opióides, embora neste último caso, há também um efeito complementar. Um terceiro padrão é observado quando a droga é gradualmente substituída, ou completamente substituída por outra devido às variações de preço, disponibilidade ou porque a droga está na moda. Os exemplos mais comuns são a substituição de heroína por oxicodona, desomorfina ou outros opióides, ou o ecstasy ser substituído por mefedrona ou alguma outra nova substância psicoativa (UNODC, 2014).

O principal risco do uso de múltiplas drogas é o aumento da toxicidade, podendo levar à overdose e morte. De uma perspectiva política, é importante entender os padrões de uso de múltiplas drogas, porque tal utilização invalida o perfil estabelecido e caracterizado do usuário que utiliza uma única droga específica (UNODC, 2014).

Dados referentes à escolaridade dos voluntários da pesquisa são apresentados na **Figura 34**.

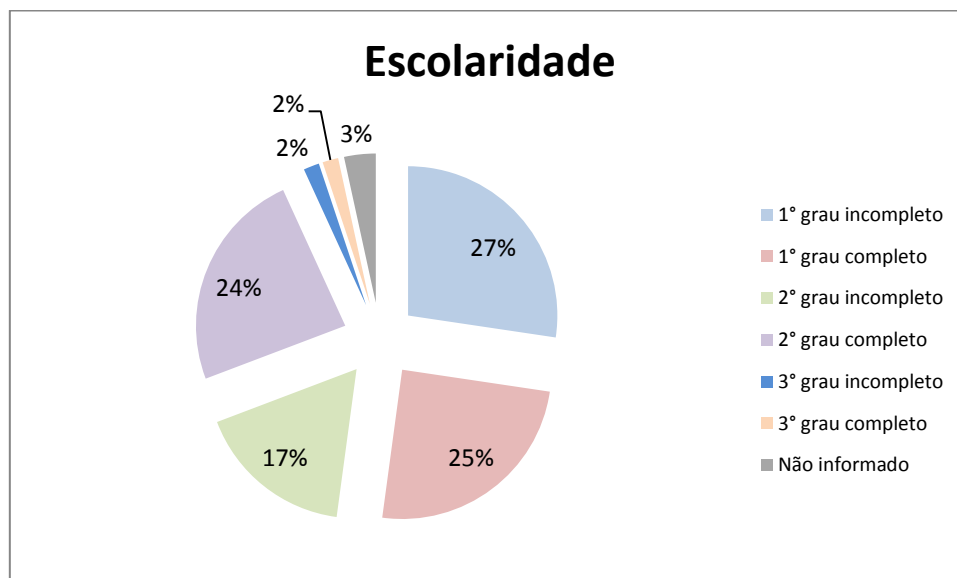


Figura 34 - Escolaridade dos voluntários envolvidos na pesquisa.

Grande parte dos voluntários possui baixa escolaridade. Cerca de 69% não possui segundo grau completo. Cerca de 52% cursaram apenas o primeiro grau. Cabe observar que os participantes da pesquisa estiveram em algum momento na escola, reforçando desta forma a importância de programas de prevenção em âmbito escolar a serem implementados desde os níveis iniciais de escolarização, a necessidade de se manter estas populações nas escolas para que obtenham formação adequada e aumentar a capacidade das escolas em lidar com uma população com problemas psicossociais relevantes (BASTOS, BERTONI, 2014).

Previamente à realização das análises das amostras por GC-MS foi realizado um teste preliminar para verificar a presença de anfetamínicos, cocaínicos e canabinóides. A **Figura 35** apresenta a porcentagem de positividade das amostras submetidas ao imunoenensaio frente à cocaína.

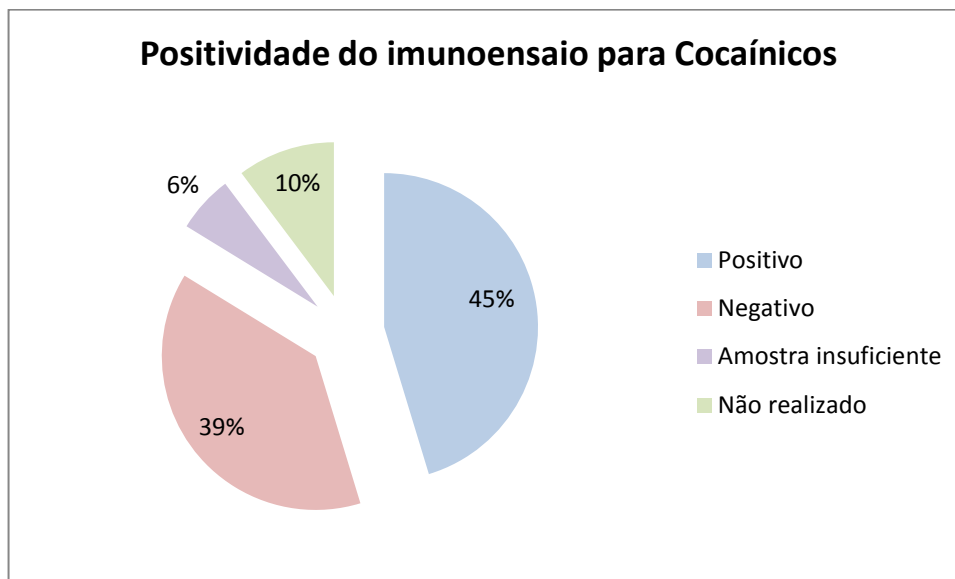


Figura 35 - Positividade das amostras submetidas ao imunoenensaio frente à cocaína.

O teste preliminar também indicou presença de canabinóides, porém esta classe não houve confirmação por GC-MS. Conforme abordado anteriormente, é comum a utilização destas drogas em conjunto buscando efeito cumulativo ou complementar. A porcentagem de amostras positivas para o canabinóides é apresentada na **Figura 36**.

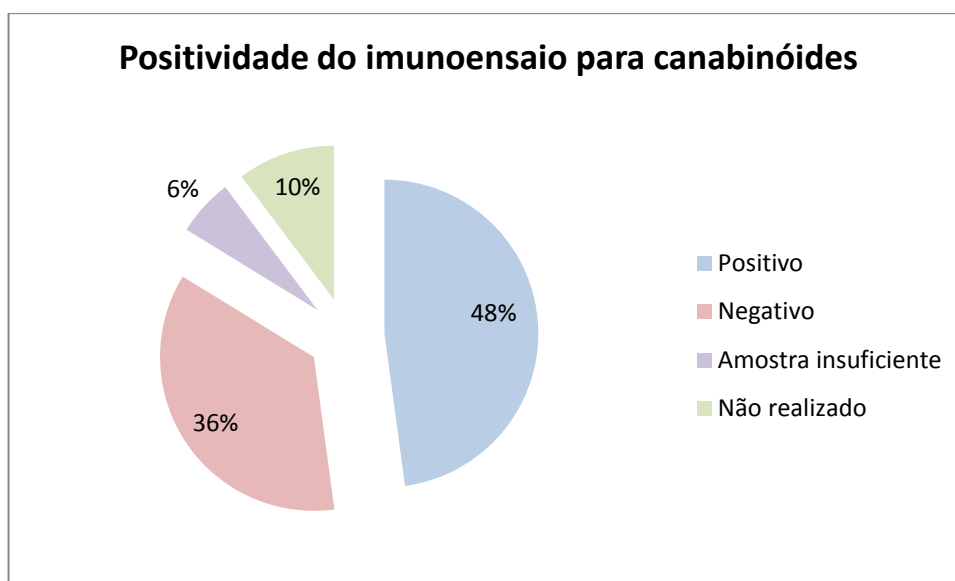


Figura 36 - Positividade das amostras submetidas ao imunoensaio frente à canabinóides.

O teste preliminar não identificou a presença de anfetamínicos nas amostras analisadas.

A análise das amostras por GC-MS indicou positividade para um número superior de amostras devido aos limites de quantificação e detecção do método cromatográfico serem muito inferiores ao *cut-off* do imunoensaio. A positividade dos resultados concentrou-se no grupo dos cocaínicos. Não foi detectada a presença de anfetamínicos ou opióides. A positividade das amostras frente ao uso de cocaínicos é dada na **Figura 37**.

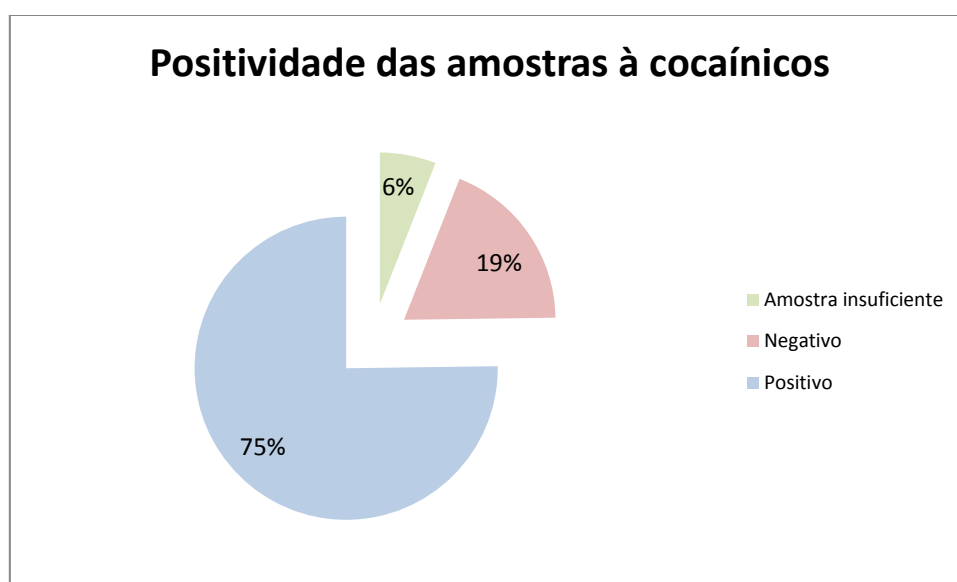


Figura 37 - Positividade das amostras à cocaínicos.

Das análises realizadas por GC-MS, foi possível distinguir entre o uso de cloridrato de cocaína e cocaína em base livre devido ao último possuir um marcador específico de pirólise, a anidroecgonina metil éster (AEME); também foi possível verificar a associação entre cocaína e etanol, devido à presença do cocaetileno, que é um indicador de uso concomitante. As amostras confirmadas como positivas para cocaínicos, foram divididas em dois grupos: aquelas que apresentaram o marcador AEME e aquelas que não apresentaram. A diferenciação das amostras entre o uso de cloridrato de cocaína e cocaína em base livre encontra-se na **Figura 38** e a positividade das amostras frente ao cocaetileno encontra-se na **Figura 39**.

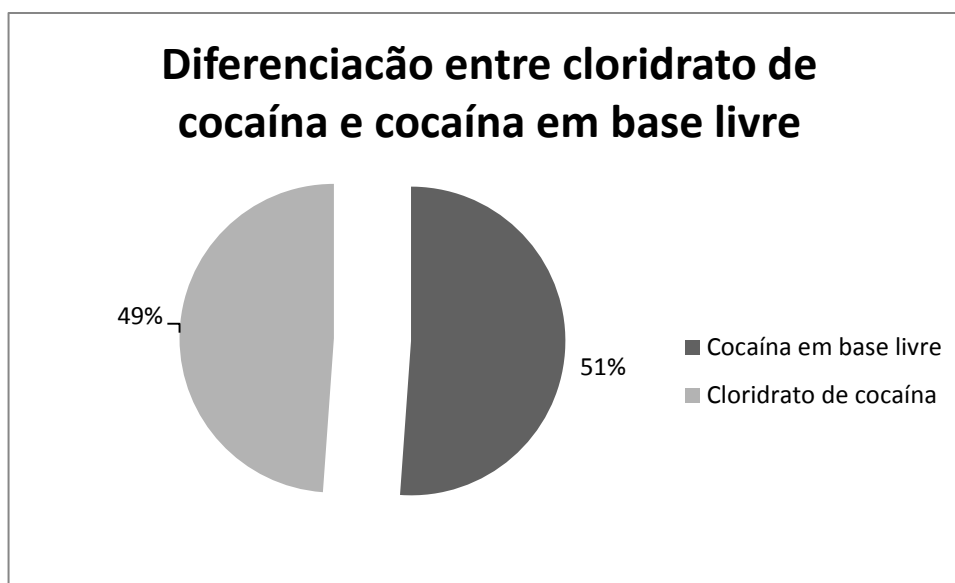


Figura 38 - Diferenciação entre o uso de cloridrato de cocaína e cocaína em base livre nas amostras confirmadas como positivas para cocaínicos.

Cerca de metade das amostras positivas para cocaínicos apresentaram marcador AEME, que indica o uso de crack.

Segundo a Pesquisa Nacional de Uso de Crack - ICICT/FIOCRUZ (BASTOS, BERTONI, 2014), os usuários de crack são, em geral, adultos jovens, com em média de 30 anos (pesquisa realizada apenas com voluntários maiores de 18 anos), predominantemente do sexo masculino (cerca de 78%), de baixa escolaridade (cerca de 55% possui apenas o ensino fundamental); são, basicamente, poliusuários. As principais drogas utilizadas em conjunto são: álcool (83,8%); maconha (76,1%); cocaína (52,2%); inalantes (26,4%); benzodiazepínicos (14,6%); anfetaminas (3,0%); MDMA (3,0%); LSD (2,0%), opióides que não a codeína (1,2%); e codeína (0,6%). Os dados obtidos com a presente pesquisa apresentam grande similaridade aos dados apresentados pela Pesquisa Nacional do Uso de Crack (BASTOS, BERTONI, 2014).

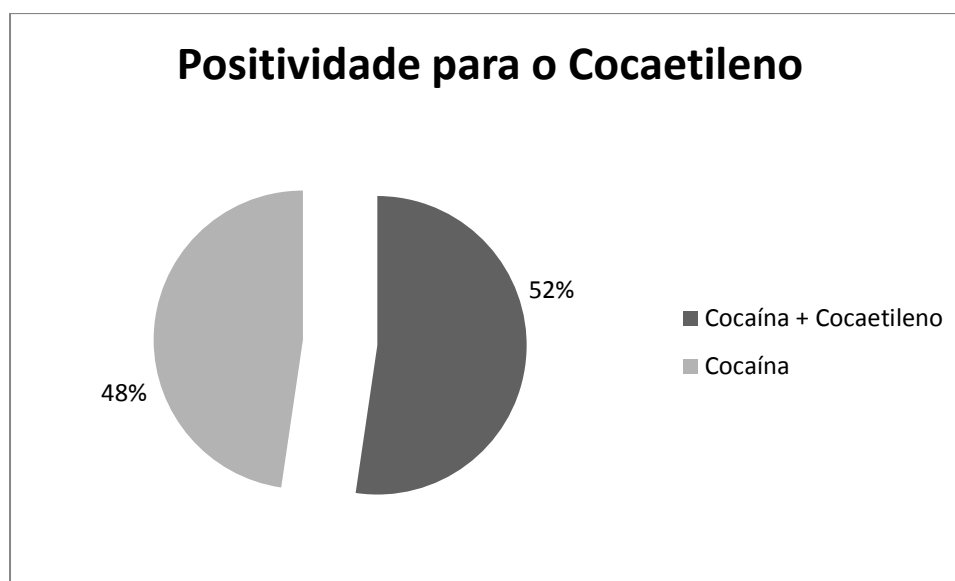


Figura 39 - positividade das amostras frente ao indicador de uso concomitante de cocaína e etanol.

O gráfico acima indica que cerca de 52% das amostras positivas para cocaínicos continham o marcador cocaetileno, que é característico da utilização conjunta de cloridrato de cocaína e/ou cocaína em base livre e etanol, por proporcionar efeito acumulativo ou complementar, caracterizando o indivíduo como poliusuário.

Também foi realizada a quantificação dos analitos presentes nas amostras dos voluntários. Para tal, foi calculada a razão entre a área do íon de quantificação do analito encontrado e a área do íon de quantificação do padrão interno. A concentração dos analitos foi calculada a partir das curvas de calibração realizadas anteriormente, utilizando as equações obtidas pelo método de regressão linear. Os resultados da quantificação dos analitos presentes nas amostras encontram-se na **Tabela 17**.

Tabela 17 – Resultados quantitativos das análises toxicológicas por substância das amostras analisadas por GC-MS.

Analito	N	Média	Mediana	Varição
AEME	86	153,31	101,96	50,17-300 ¹
COC	35	151,91	59,86	11,39-400 ²
BE	49	191,37	141,21	10,34-400 ³
CE	79	137,82	63,21	10,19-400 ³

Concentrações expressas em ng/mL. N: número. ¹ 19 amostras apresentaram valores superiores a 300 ng/mL. ² 10 amostras apresentaram valores superiores a 400 ng/mL. ³ 15 amostras apresentaram valores superiores a 400 ng/mL. 88 amostras apresentaram positividade para cocaínicos.

As amostras foram quantificadas com base nos parâmetros estabelecidos na validação analítica. Para o analito AEME, o intervalo de quantificação, determinado com precisão e exatidão, contemplou a faixa de 50 a 300 ng/mL. Para os demais analitos, este intervalo

contemplou a faixa de 10 a 400 ng/mL. O maior número de amostras consideradas positivas em relação ao N apresentado na tabela anterior é devido às amostras que apresentaram concentração de analito suficiente para que fossem detectadas, isto é, acima do limite de detecção estabelecido para o método (ver ítem 4.4.6). Os valores de amostras positivas encontradas dentro da faixa compreendida entre o limite de detecção e o limite de quantificação encontram-se na **Tabela 18**.

Tabela 18 – Resultados das amostras situadas entre o limite de detecção e o limite de quantificação.

Analito	N	Média	Mediana	Varição
AEME	2	49,42	49,42	49,33-49,51
COC	53	4,13	3,47	1,54-9,30
BE	39	6,13	5,66	4,72-9,63
CE	9	7,35	7,25	5,73-8,82

Concentrações expressas em ng/mL. N: Número.

Os resultados obtidos pela análise das amostras coletadas encontram-se na **Tabela 19**.

Tabela 19 – Resultados obtidos pela análise de todas as amostras por imunoensaio e GC-MS

Amostra	Imunoensaio			GC-MS			
	Anfetaminas	THC	Cocaínicos	AEME	COC	BE	CE
1	-	+	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	67,34	< 10	< 10	13,92
4	-	-	-	-	-	-	-
5	-	+	+	90,60	< 10	14,48	63,18
6	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	87,27	< 10	< 10	255,16
8	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	+	50,17	< 10	140,16	16,35
10	-	-	+	81,72	< 10	390,71	> 400
11	-	-	+	284,36	59,86	184,52	257,18
12	2	2	2	2	2	2	2
13	-	-	+	134,14	14,81	17,25	< 10
14	-	-	-	69,07	< 10	< 10	46,67
15	-	+	-	89,30	< 10	< 10	89,33
16	-	-	-	> 300	12,76	< 10	133,30
17	-	-	+	> 300	41,14	< 10	16,62
18	2	2	2	2	2	2	2
19	-	-	-	64,48	< 10	< 10	< 10

Tabela 19 – Resultados obtidos pela análise de todas as amostras por imunoensaio e GC-MS

Amostra	Imunoensaio			GC-MS			
	Anfetaminas	THC	Cocaínicos	AEME	COC	BE	CE
20	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-
22	-	+	-	55,39	< 10	10,34	16,76
23	-	-	+	78,81	> 400	> 400	10,82
24	-	+	-	82,56	< 10	< 10	> 400
25	-	+	+	> 300	12,94	217,12	116,15
26	-	-	-	-	-	-	-
27	-	+	+	80,51	< 10	10,98	21,86
28	-	+	+	210,10	< 10	121,54	13,36
29	-	+	-	212,09	< 10	10,46	24,18
30	-	+	+	222,96	> 400	> 400	35,96
31	-	-	-	80,86	< 10	< 10	215,01
32	-	-	+	249,73	20,05	22,29	26,38
33	-	+	+	> 300	> 400	62,16	60,13
34	-	+	-	68,67	< 10	< 10	21,04
35	-	+	+	> 300	< 10	251,83	> 400
36	-	-	+	63,29	29,01	159,18	74,43
37	-	+	-	73,42	< 10	< 10	16,35
38	-	+	+	> 300	> 400	> 400	51,51
39	-	+	-	234,57	49,72	26,97	140,88
40	-	-	-	-	-	-	-
41	-	+	-	81,20	< 10	< 10	105,72
42	-	+	+	286,48	< 10	< 10	66,88
43	-	+	+	103,72	11,39	> 400	> 400
44	-	+	+	> 300	> 400	45,00	28,62
45	-	-	-	57,97	< 10	< 10	400
46	-	+	+	101,83	< 10	45,47	88,85
47	-	+	-	-	-	-	-
48	-	+	+	52,55	< 10	> 400	263,21
49	-	+	+	> 300	> 400	141,21	> 400
50	-	+	+	> 300	91,21	> 400	129,29
51	-	+	+	> 300	> 400	> 400	203,47
52	-	-	+	61,82	< 10	223,92	400
53	-	+	+	93,35	< 10	< 10	11,55
54	-	+	+	251,90	< 10	> 400	> 400
55	-	-	-	102,80	< 10	< 10	10,19

Tabela 19 – Resultados obtidos pela análise de todas as amostras por imunoenensaio e GC-MS

Amostra	Imunoenensaio			GC-MS			
	Anfetaminas	THC	Cocaínicos	AEME	COC	BE	CE
56	-	+	+	> 300	47,62	47,76	> 400
57	-	+	+	166,86	13,67	< 10	36,40
58	-	+	+	52,55	< 10	> 400	263,20
59	-	+	+	87,57	< 10	< 10	28,46
60	-	-	-	-	-	-	-
61	-	+	-	-	-	-	-
62	-	-	-	-	-	-	-
63	-	+	-	-	-	-	-
64	-	-	+	142,80	< 10	43,33	32,05
65	-	+	-	136,78	< 10	11,05	< 10
66	-	-	-	-	-	-	-
67	-	-	-	> 300	< 10	< 10	40,25
68	-	-	-	< 50	< 10	< 10	38,76
69	-	-	+	> 300	69,84	< 10	18,19
70	-	-	+	85,65	< 10	26,01	< 10
71	-	-	+	161,29	300,80	> 400	> 400
72	-	-	-	152,32	< 10	< 10	48,42
73	-	-	-	-	-	-	-
74	-	-	-	-	-	-	-
75	-	+	+	78,18	< 10	< 10	15,45
76	-	+	-	74,04	< 10	< 10	63,21
77	2	2	2	2	2	2	2
78	-	+	+	> 300	> 400	> 400	> 400
79	2	2	2	2	2	2	2
80	-	+	-	55,01	< 10	12,16	< 10
81	2	2	2	2	2	2	2
82	-	+	+	> 300	> 400	> 400	17,71
83	2	2	2	2	2	2	2
84	-	-	+	52,76	< 10	41,63	20,38
85	-	+	+	> 300	26,26	100,62	263,71
86	-	+	+	> 300	> 400	> 400	> 400
87	-	+	+	54,96	15,88	19,75	< 10
88	-	+	+	182,79	51,31	126,81	105,90
89	-	+	+	156,90	< 10	< 10	24,36
90	-	+	+	102,08	< 10	< 10	29,87
91	-	+	+	119,01	84,38	271,12	> 400

Tabela 19 – Resultados obtidos pela análise de todas as amostras por imunoensaio e GC-MS

Amostra	Imunoensaio			GC-MS			
	Anfetaminas	THC	Cocáinicos	AEME	COC	BE	CE
92	-	+	-	-	-	-	-
93	-	+	-	55,07	17,51	< 10	> 400
94	-	+	+	132,30	< 10	< 10	41,44
95	-	+	+	66,05	< 10	< 10	< 10
96	-	+	+	72,45	< 10	< 10	202,17
97	²	²	²	²	²	²	²
98	-	+	+	²	²	²	²
99	-	+	+	> 300	127,30	> 400	221,99
100	-	+	+	232,72	24,81	19,07	55,28
101	¹	¹	¹	95,90	60,72	> 400	255,22
102	¹	¹	¹	-	-	-	-
103	¹	¹	¹	64,23	< 10	197,58	< 10
104	¹	¹	¹	94,69	< 10	63,66	51,25
105	¹	¹	¹	58,10	< 10	< 10	< 10
106	-	+	-	82,08	< 10	< 10	12,56
107	-	-	-	-	-	-	-
108	¹	¹	¹	59,76	< 10	< 10	13,28
109	¹	¹	¹	68,86	31,36	< 10	204,37
110	¹	¹	¹	50,73	< 10	< 10	22,82
111	-	-	-	-	-	-	-
112	¹	¹	¹	-	-	-	-
113	¹	¹	¹	66,12	< 10	< 10	23,39
114	-	-	-	77,00	< 10	< 10	74,78
115	¹	¹	¹	< 50	19,38	100,97	64,30
116	-	-	-	286,94	< 10	< 10	16,70
117	¹	¹	¹	133,78	< 10	200,06	135,87

¹ amostras que não foram submetidas ao teste preliminar; ² amostra insuficiente; – resultado negativo; + resultado positivo; < menor; > maior. Concentrações expressas em ng/mL.

Pelos resultados obtidos através da quantificação dos analitos presentes nas amostras de voluntários, podemos observar que o método de GC-MS apresenta sensibilidade superior comparado ao teste rápido utilizado na análise preliminar das amostras. As análises por GC-MS apresentaram uma positividade 60,23% maior em comparação ao teste preliminar, demonstrando o potencial do método de extração utilizando a DLLME no preparo de amostra associado à identificação e quantificação por GC-MS aplicado à pesquisa de drogas de abuso e seus principais metabólitos em amostras de urina.

Conclusões

5 – Conclusões

A extração de drogas de abuso e metabólitos em amostras de urina utilizando a DLLME foi otimizada com sucesso e a mistura de solventes que proporcionou a maior recuperação dos analitos foi composta por clorofórmio (150 µL, solvente extrator) e isopropanol (1400 µL, solvente dispersor), utilizando 3,0 mL de amostra e 2,0 mL de tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 10,3 ±0,5.

O método cromatográfico foi desenvolvido e validado com sucesso, contemplando os parâmetros de seletividade, efeito residual, efeito de matriz, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e estabilidade com base na Resolução RDC 27 de 17 de maio de 2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e no guia “*Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology*” do *Scientific Working Group for Forensic Toxicology* (SWGTOX), de 2013.

Foram coletadas 117 amostras de urina de voluntários em tratamento pelo CAPS-AD de Ribeirão Preto – SP. Estas amostras foram submetidas à técnica de extração e ao método cromatográfico para análise da presença de metabólitos e drogas de abuso.

Cerca de 79% das amostras coletadas foram provenientes de voluntários do gênero masculino contra 21% do gênero feminino. Cerca de 76% dos voluntários tiveram seu primeiro contato com drogas de abuso na faixa etária dos 11 aos 20 anos. A grande maioria é composta por poliusuários de drogas e as principais drogas de abuso consumidas são a cocaína/crack, o etanol e a maconha. A escolaridade de cerca de 69% dos participantes corresponde ao 2º grau incompleto. O teste preliminar das amostras apresentou 45% de positividade para cocaínicos e 48% de positividade para canabinóides. A análise por GC-MS apresentou positividade para cocaínicos em 75% das amostras; destas, em cerca de 51% foi encontrado o marcador AEME, que caracteriza o uso de cocaína em base livre (crack); e em cerca de 52% foi encontrado o cocaetileno, que é um indicador de uso concomitante de cocaínicos e etanol. O método cromatográfico apresentou uma positividade cerca de 60% maior em relação ao teste preliminar para cocaínicos.

Face aos resultados obtidos, podemos concluir que a técnica de extração otimizada e o método analítico desenvolvido são adequados e de uso promissor para a identificação e quantificação simultânea de drogas de abuso e seus principais metabólitos em amostras de urina.

Referências bibliográficas

6 – Referências bibliográficas

1. AHMADI-JOUIBARI, T.; FATTAHI, N.; SHAMSIPUR, M. Rapid extraction and determination of amphetamines in human urine samples using dispersive liquid-liquid microextraction and solidification of floating organic drop followed by high performance liquid chromatography. **J Pharm Biomed Anal**, v. 94, p. 145-151, 2014.
2. AIRADO-RODRÍGUEZ, D.; CRUCES-BLANCO, C.; GARCÍA-CAMPAÑA, A.M. Dispersive liquid-liquid microextraction prior to field-amplified sample injection for the sensitive analysis of 3,4-methylenedioxymethamphetamine, phencyclidine and lysergic acid diethylamide by capillary electrophoresis in human urine. **J Chromatogr A**, v. 1267, p. 189– 197, 2012.
3. ANDRADE, A.G.; DUARTE, P.C.A.V.; OLIVEIRA, L.G. I Levantamento Nacional sobre o uso de álcool, tabaco e outras drogas entre universitários das 27 capitais brasileiras. Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas, 2010.
4. ANTHEMIDIS, A.N.; IOANNOU, K.I.G. On-line sequential injection dispersive liquid-liquid microextraction system for flame atomic absorption spectrometric determination of copper and lead in water samples. **Talanta**, v. 79, p. 86-91, 2009.
5. ANTONILLI, L.; SURIANO, C.; GRASSI, M.C.; NENCINI, P. Analysis of cocaethylene, benzoylecginine and cocaine in human urine by high-performance thin-layer chromatography with ultraviolet detection: a comparison with high-performance liquid chromatography. **J Chromatogr B**, v. 751, p. 19-27, 2001.
6. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 27 de 17 de maio de 2012. Requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. **DOU** 22/mai/2012.
7. BAGHDADI, M.; SHEMIRANI, F. In situ solvent formation microextraction based on ionic liquids: a novel sample preparation technique for determination of inorganic species in saline solutions. **Anal Chim Acta**, v. 634, p. 186-191, 2009.
8. BASTOS, F.I.; BERTONI, N. Pesquisa nacional sobre o uso de crack. Quem são os usuários de crack e/ou similares no Brasil? Quantos são nas capitais brasileiras? **ICICT/FIOCRUZ**, Rio de Janeiro, 2014.
9. BEHBAHANI, M.; NAJAFI, F.; BAGHERI, S.; BOJDI, M.K.; SALARIAN, M.; BAGHERI, A. Application of surfactant assisted dispersive liquid-liquid microextraction as an efficient sample treatment technique for preconcentration and trace detection of zonisamide and carbamazepine in urine and plasma samples. **J Chromatogr A**, v. 1308, p. 25-31, 2013.
10. BERG, T.; LUNDANES, E.; CHRISTOPHERSEN, A.S.; STRAND, D.H. Determination of opiates and cocaine in urine by high pH mobile phase reversed phase UPLC-MS/MS. **J Chromatogr B**, v. 877, p. 421-432, 2009.

11. BERIJANI, S.; ASSADI, Y; ANBIA, M.; MILANI HOSSEINI, M.R.; AGHAEI, E. Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Combined With Gas Chromatography-flame Photometric Detection: Very Simple, Rapid And Sensitive Method For The Determination Of Organophosphorus Pesticides In Water. **J Chromatogr A**, v.1123, p. 1-9, 2006
12. CALDAS, S.S., GONÇALVES, F.F., PRIMEL, E.G. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Quim Nova**, v. 34, p. 1604-1617, 2011
13. CALDWELL, J.; DRING, L.G.; WILLIAMS, R.T. Metabolism Of [14C] Methamphetamine In Man, The Guinea Pig And The Rat. **Biochem. J**, v 129, p. 11-22, 1972.
14. CASSIANO, N.M.; BARREIRO, J.C.; MARTINS, L.R.R.; OLIVEIRA, R.V.; CASS, Q.B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Quim Nova**, v. 32, p. 1021-1030, 2009.
15. CHEN, H.; CHEN, R.; LI, S. Low-density extraction solvent-based solvent terminated dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of carbamate pesticides in water samples. **J Chromatogr A**, v. 1217, p. 1244-1248, 2010.
16. COLEMAN, M.D. *Human Drug Metabolism*. 2ª Ed; West Sussex: Wiley-Blackwell, 2010.
17. CONCHEIRO, M.; SIMÕES, S.M.S.S.; QUINTELA, O.; CASTRO, A.; DIAS, M.J.R.; CRUZ, A.; LOPEZ-RIVADULLA, M. Fast LC-MS/MS method for the determination of amphetamine, methamphetamine, MDA, MDMA, MDEA, MBDB and PMA in urine. **Forensic Sci Int**, v. 171, p. 44-51, 2007.
18. DA SILVA, D.G.; DE PINHO, P.G.; PONTES, H.; FERREIRA, L.; BRANCO, P.; REMIÃO, F.; CARVALHO, F.; BASTOS, M.L.; CARMO, H. Gas chromatography-ion trap mass spectrometry method for the simultaneous measurement of MDMA (ecstasy) and its metabolites, MDA, HMA, and HMMA in plasma and urine. **J Chromatogr B**, v. 878, p. 815-822, 2010.
19. DE LA TORRE, R.; ORTUÑO, J.; GONZÁLEZ, M.L.; FARRÉ, M.; CAMÍ, J.; SEGURA, J. Determination of cocaine and its metabolites in human urine by gas chromatography/mass spectrometry after simultaneous use of cocaine and ethanol. **J Pharm Biomed Anal**, v. 13, n. 3, p. 305-312, 1995.
20. DE WITT, R.C. *Encyclopedia of drugs, alcohol and addictive behavior*. 2ª ed., Macmillan Reference USA, 2001.
21. DEGENHARDT, L.; MATHERS, B.; GUARINIERI, M.; PANDA, S.; PHILLIPS, B.; STRATHDEE, S.A.; TYNDALL, M.; WIESSING, L.; WODAK, A.; HOWARD, J. Meth/amphetamine use and associated HIV: Implication for global. **Int J Drug Policy**, v. 21, p. 347-358, 2010.
22. DOWLING, G.; REGAN, L.; TIERNEY, J.; NANGLE, M. A hybrid liquid chromatography-mass spectrometry strategy in a forensic laboratory for opioid,

- cocaine and amphetamine classes in human urine using a hybrid linear ion trap-triple quadrupole mass spectrometer. **J Chromatogr A**, v. 1217, p. 6857-6866, 2010.
23. ES'HAGHI, Z.; MOHTAJI, M.; HASANZADE-MEIDANI, M.; MASROURNIA, M. The measurement of ecstasy in human hair by triple phase directly suspended droplet microextraction prior to HPCL-DAD analysis. **J Chromatogr B**, v. 878, p. 903-908, 2010.
24. FARAJZADEH, M.A.; MOGADDAM, M.R. Air-assisted liquid-liquid microextraction method as a novel microextraction technique; application in the extraction and preconcentration of phthalate esters in aqueous sample followed by gas chromatography-flame ionization detection. **Anal Chim Acta**, v. 728, p. 31-38, 2012.
25. FARINA, M.; YONAMINE, M.; SILVA, O.A. One-step liquid-liquid extraction of cocaine from urine samples for gas chromatographic analysis. **Forensic Sci Int**, v. 127, p. 204-207, 2001.
26. FERNANDÉZ, A.A.; FONTE, A.M.; FITÉ, M.S.; PAGÉS, M.B.; ADROHER, M.P. Drogas de abuso en saliva de conductores: aspectos médico-legales. **Rev esp med legal**, v. 34, p. 3-10, 2008.
27. FERNÁNDEZ, P.; MORALES, L.; VÁZQUEZ, C.; BERMEJO, A.M.; TABERNERO, M.J. HPLC-DAD determination of opioids, cocaine and their metabolites in plasma. **Forensic Sci Int**, v. 161, p. 31-35, 2006.
28. FERREIRA, C. Caracterização por GC-MS de Glicídios. Derivatização assistida por microondas, 2011, 95f. **Dissertação para obtenção do grau de mestre**. Universidade de Coimbra, Coimbra.
29. GEROSTAMOULOS, J.; CRUMP, K.; McINTYRE, I.M.; DRUMMER, O.H. Simultaneous determination of 6-monoacetylmorphine, morphine and codeine in urine using high-performance liquid chromatography with combined ultraviolet and electrochemical detection. **J Chromatogr**, v. 617, p. 152-156, 1993.
30. GUNNAR, T.; MYKKÄNEN, S.; ARINIEMI, K.; LILLSUNDE, P. Validated semiquantitative/quantitative triagem of 51 drugs in whole blood as silylated derivatives by gas chromatography-selected ion monitoring mass spectrometry and gas chromatography electron capture detection. **J Chromatogr B**, v. 806, p. 205-219, 2004.
31. GUO, L.; LEE, H.K. Low-density solvent-based solvent demulsification dispersive liquid-liquid microextraction for the fast determination of trace levels of sixteen priority polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water samples. **J Chromatogr A**, v. 1218, p. 5040-5046, 2011.
32. HABIBOLLAHI, S.; TAVAKKOLI, N.; NASIRIAN, V.; KHANI, H. Determination of Tramadol by dispersive liquid-liquid microextraction combined with GC-MS. **J. Chromatogr. Sci.**, (in press) 2014.
33. HE, Y.; KANG, Y.J. Single drop liquid-liquid-liquid microextraction of methamphetamine and amphetamine in urine. **J Chromatogr A**, v. 1133, p. 35-40, 2006.

34. HERRERA-HERRERA, A.V.; ASENSIO-RAMOS, M.; HERNANDEZ-BORGES, J.; RODRÍGUEZ-DELGADO, A.A. Dispersive liquid-liquid microextraction for determination of organic analytes. **Trends Analyt Chem**, v. 29, n. 7, p. 728-751, 2010.
35. IDRIS, A.M.; ALNAJJAR, A.O. Exploiting sequential injection analysis technique to automate on-line sample treatment and quantitative determination of morphine in human urine. **Talanta**, v. 77, p. 522-526, 2008.
36. INeC - Drogas de abuso. Instituto de Neurociências e Comportamento. Disponível em: <http://www.inec-usp.org/cursos/curso%20VI/consideracoes_gerais.htm>. Acesso em: fevereiro, 2011.
37. JAFARVAND, S.; SHEMIRANI, F. Supramolecular-based dispersive liquid-liquid microextraction: determination of cádmium in water and vegetable samples. **Anal Methods**, v. 3, p. 1552-1559, 2011.
38. JANICKA, M.; KOT-WASIK, A.; NAMIÉSNIK, J. Analytical procedures for determination of cocaine and its metabolites in biological samples. **Trends Analyt Chem**, v. 29, n. 3, p. 209-224, 2010.
39. JONES, J.M.; RALEIGH, M.D.; PENTEL, P.R.; HARMON, T.M.; KEYLER, D.E.; REMMEL, R.P.; BIRNBAUM, A.K. Stability of heroin, 6-monoacetylmorphine, and morphine in biological samples and validation of an LC-MS assay for delayed analyses of pharmacokinetic samples in rats. **J Pharm Biomed Anal**, v. 74, p. 291-297, 2013.
40. KAMAREI, F.; EBRAHIMZADEH, H.; YAMINI, Y. Optimization of ultrasound-assisted emulsification microextraction with solidification of floating organic droplet followed by high performance liquid chromatography for the analysis of phthalate esters in cosmetic and environmental water samples. **Microchem J**, v. 99, p. 26-33, 2011.
41. KOHLER, I.; SCHAPPLER, J.; SIERRO, T.; RUDAZ, S. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with capillary electrophoresis and time-of-flight mass spectrometry for urine analysis, **J Pharm Biomed Anal**, v. 73, p. 82- 89, 2013.
42. KUN, J.; BINGFANG, W.; YCHEN, T.; QIANGZI, L.; XIN, D.; An effective biophysical indicator for opium yield estimation. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 25, p. 272-277, 2011.
43. LANGEL, K.; GUNNAR, T.; ARINIEMI, K.; RAJAMÄKI, O.; LILLSUNDE, P. A validated method for the detection and quantitation of 50 drugs of abuse and medicinal drugs in oral fluid by gas chromatography-mass spectrometry. **J Chromatogr B**, v. 879, p. 859-870 2011.
44. LARANJEIRA, R.; MADRUGA, C.S.; PINSKY, I.; CAETANO, R.; MITSUHIRO, S.S.; CASTELLO, G. II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (LENAD). Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas de Álcool e outras drogas (INPAD), UNIFESP, 2014.
45. LATIMER, D., & GOLDBERG, J. Flowers in the blood: The story of opium. Ed. Franklin Watts, New York, 1981.

46. LAVILLA, I.; CABALEIRO, N.; PENA, F.; DE LA CALLE, I.; BENDICHO, C. Ultrasound-assisted emulsification microextraction with simultaneous derivatization coupled to fibre optics-based cuvetteless UV-vis micro-spectrophotometry for formaldehyde determination in cosmetic samples. **Anal chim acta**, v. 674, p. 59-63, 2010.
47. LEE, J.; PARK, Y.; YANG, W.; CHUNG, H.; CHOI, W.; INOUE, H.; KUWAYAMA, K.; PARK, J. Cross-examination of liquid-liquid extraction (LLE) and solid-phase microextraction (SPME) methods for impurity profiling of methamphetamine. **Forensic Sci Int**, v. 215, p. 175-178, 2012.
48. LIANG, P.; WANG, F.; WAN, Q. Ionic liquid-based ultrasound-assisted emulsification microextraction coupled with high performance liquid chromatography for the determination of four fungicides in environmental water samples. **Talanta**, v. 105, p. 57-62, 2013.
49. LIN, L.Y., DI STEFANO, E.W.; SCHMITZ, D.A.; HSU, L.; ELLIS, S.W.; LENNARD, M.S.; TUCKER, G.T.; CHO, A.K. Oxidation Of Methamphetamine And Methylenedioxymethamphetamine By CYP2D6. **Drug Metab Dispos**, v. 25, p. 1059-1064, 1997.
50. LOPES, E.L. Estudo e determinação das condições experimentais da reação de silição utilizada na análise multirresíduo de anti-inflamatórios não-esteroides em matrizes aquosas ambientais por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas, 2011. 75f. **Trabalho de conclusão de curso** – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Química, Porto Alegre.
51. LU, Y.; O'DONNELL, R.M.; HARRINGTON, P.B. Detection of cocaine and its metabolites in urine using solid phase extraction-ion mobility spectrometry with alternating least squares. **Forensic Sci Int**, v. 189, p. 54-59, 2009.
52. MAISTO, A.S.; GALIZIO, M.; CONNORS, G.J. *Drug use and abuse*. 6ª ed., Wadsworth Cengage Learning, 2011.
53. MELWANKI, M.B.; CHEN, W.S.; BAI, H.Y.; LIN, T.Y.; FUH, M.R. Determination of 7-aminoflunitrazeoam in urine by dispersive liquid-liquid microextraction with liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 78, p. 618-622, 2009.
54. MENG, L.; WANG, B.; LUO, F.; SHEN, G.; WANG, Z.; GUO, M. Application of dispersive liquid-liquid microextraction and CE with UV detection for the chiral separation and determination of the multiple illicit drugs on forensic samples. **Forensic Sci Int**, v. 209, p. 42-47, 2011.
55. MOLAABARI, E.; MOSTAFAVI, A.; AFZALI, D. Ionic liquid ultrasound assisted dispersive liquid-liquid microextraction method for preconcentration of trace amounts of rhodium prior to flame atomic absorption spectrometry determination. **J Hazard Mater**, v.185, p. 647-652, 2011.
56. MORADI, M.; YAMINI, Y.; BAHARI, T. Analysis of abuse drugs in urine using surfactant-assisted dispersive liquid-liquid microextraction. **J Sep Sci**, v. 34, p. 1722-1729, 2011.

57. MORADI, M.; YAMINI, Y.; KAKEHMAM, J.; ESRAFILI A.; GHAMBARIAN, M. A new strategy to simultaneous microextraction of acid and basic compounds. **J Chromatogr A**, v.1218, p. 3945-3951, 2011.
58. MORAL, A.; SICILLIA, M.D.; RUBIO, S. Determination of benzimidazolic fungicides in fruits and vegetables by supramolecular solvent-based microextraction/liquid chromatography/fluorescence detection. **Anal Chim Acta**, v. 650, p. 207-213, 2009.
59. NAJAFIPOUR, H.; JOUKAR, S.; MALEKPOUR-AFSHAR, R. Passive opium smoking does not have beneficial effect on plasma lipids and cardiovascular indices in hypercholesterolemic rabbits with ischemic and non-ischemic hearts. **J Ethnopharmacol**, v. 127, p. 257-263, 2010.
60. NIAZI, A.; KHORSHIDI, N.; GHAEMMAGHAMI, P. Microwave-assisted of dispersive liquid-liquid microextraction and spectrophotometric determination of uranium after optimization based on Box-Behnken design and chemometrics methods. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 135, p. 69-75, 2015
61. NOVÁKOVÁ, L.; VLCKOVÁ, H. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. **Anal Chim Acta**, v. 656, p. 8-35, 2009.
62. OGA, S.; CAMARGO, M.M.A.; BATISTUZZO, J.A.O. *Fundamentos de Toxicologia*. 3ª Ed, São Paulo, Atheneu Editora São Paulo, 2008.
63. ORTUÑO, J.; DE LA TORRE, R.; SEGURA, J.; CAMÍ, J. Simultaneous detection in urine of cocaine and its main metabolites. **J Pharm Biomed Anal**, v. 8, p. 911-914, 1990.
64. PIZZOLATO, T.M.; DE ALDA, M.J.L.; BARCELÓ, D. LC-based analysis of drugs of abuse and their metabolites in urine. **Trends Analyt Chem**, v. 26, n. 6, p. 609-624, 2007.
65. QIN, H.; QIU, X.; ZHAO, J.; LIU, M.; YANG, Y. Supramolecular solvent-based vortex-mixed microextraction: determination of glucocorticoids in water samples. **J Chromatogr A**, v. 1311, p. 11-20, 2013.
66. RANJBARI, E.; GOLBABANEZHAD-AZIZI, A.A.; HADJMOHAMMADI, M.H. Preconcentration of trace amounts of methadone in human urine, plasma, saliva and sweat samples using dispersive liquid-liquid microextraction followed by high performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 94, p. 116– 122, 2012.
67. RASHID, B.A.; AHERNE, G.W.; KATMEH, M.F.; KWASOWSKI, P.; STEVENSON, D. Determination of morphine in urine by solid-phase immunoextraction and high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **J Chromatogr A**, v. 797, p. 245-250, 1998.
68. REGUEIRO, J.; LLOMPART, M.; PSILLAKIS, E.; GARCIA-MONTEAGUDO, J.C., GARCIA-JARES, C. Ultrasound-assisted emulsification–microextraction of phenolic preservatives in water. **Talanta**, v. 79 p. 1387–1397, 2008.

69. REZAEI, M.; ASSADI, Y.; MILANI HOSSEINI, M.R.; AGHAEI, E.; AHMADI, F.; BERIJANI, S. Determination Of Organic Compounds In Water Using Dispersive Liquid-Liquid Microextraction. **J. Chromatogr. A**, v.1116. p. 1-9, 2006
70. REZAEI, M.; YAMINI, Y.; FARAJI, M. Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. **J Chromatogr A**, v. 1217, p. 2342-2357, 2010.
71. RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim Nova**, v.27, p. 771-780, 2004.
72. SADEGHIPOUR, F.; VARESI, E.; GIROUD, C.; RIVIER, L.; VEUTHEY, J.L. Analysis of amphetamines by capillary electrophoresis and liquid chromatography: application to drug seizures and cross-validation. **Forensic Sci Int**, v. 86, p. 1-13, 1997.
73. SAITO, K.; KIKUCHI, Y.; SAITO, R. Solid-phase dispersive extraction method for analysis of benzodiazepine drugs in serum and urine samples. **J Pharm Biomed Anal**, v. 100, p. 28-32, 2014.
74. SCHEIDWEILER, K.B.; PLESSINGER, M.A.; SHOJAIE J.; WOOD, R.W.; KWONG, T.C. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Methylecgonidine, a Crack Cocaine Pyrolyzate. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 307, p. 1179-1187, 2003.
75. SEGURA, J.; VENTURA, R; JURADO, C. Derivatization procedure for gas chromatographic-mass spectrometric determination of xenobiotics in biological samples, with special attention to drugs of abuse and doping agents. **J Chromatogr B**, v. 713, p. 61-90, 1998.
76. SHIMA, N.; KAMATA, H.; KATAGI, M.; TSUCHIHASHI, H.; SAKUMA, T.; NEMOTO, N. Direct determination of glucuronide and sulfate of 4-hydroxy-3-methoxymethamphetamine, the main metabolite of MDMA, in human urine. **J Chromatogr B**, v. 857, p. 123-129, 2007.
77. SPIETELUN, A.; MARCINKOWSKI, L.; DE LA GUARDIA, M.; NAMIESNIK, JACEK. Green aspects, developments and perspectives of liquid phase microextraction techniques. **Talanta**, v.119, p. 34-45, 2014.
78. SWGTOX – Report from the Scientific Working Group for Forensic Toxicology – Standard practices for method validation in forensic toxicology. **J Anal Toxicol**, v. 37, p.452-474, 2013.
79. UNODC – United Nations Office of Drugs and Crime. World Drug Report. **United Nations**, Viena, 2012.
80. UNODC – United Nations Office of Drugs and Crime. World Drug Report. **United Nations**, Viena, 2014.
81. VICHAPONG, J.; BURAKHAM, R.; SRIJARANAI, S. Vortex-assisted surfactant-enhanced-emulsification liquid-liquid microextraction with solidification of floating organic droplet combined with HPLC for the determination of neonicotinoid pesticides. **Talanta**, v. 117, p. 221-228, 2013.

82. WATANABE, K.; OKADA, K. KATSU, T. Determination of methamphetamine in urine in situ using a methamphetamine-sensitive membrane electrode. **Anal Chim Acta**, v. 274, p. 59-63, 1993.
83. WHITE, S.M.; LAMBE, C.J.T. The pathophysiology of cocaine abuse. **J Clin Forensic Med**, v. 10, p. 27-39, 2003.
84. WILLIAMS, D.G.; HATCH, D.J.; HOWARD, R.F. Codeine phosphate in paediatric medicine. **Br J Anaesth**, v. 86, p. 413-421, 2001.
85. WU, C.; LIU, N.; WU, Q.; WANG, C.; WANG, Z. Application of ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction for the determination of some organophosphorus pesticides in water samples. **Anal Chim Acta**, v. 679, p. 56-62, 2010.
86. WU, Q.; CHANG, Q.; WU, C.; RAO, H.; ZENG, X.; WANG, C.; WANG, Z. Ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction for the determination of carbamate pesticides in water samples by high performance liquid chromatography. **J Chromatogr A**, v. 1217, p. 1773-1778, 2010.
87. XIONG, C.; RUAN, J.; CAI, Y.; TANG, Y. Extraction and determination of some psychotropic drugs in urine samples using dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography. **J Pharm Biomed Anal**, v. 49, p. 572-578, 2009.
88. YANG, Z.H.; WANG, P.; ZHAO, W.T.; ZHOU, Z.Q.; LIU, D.H. Development of a home-made extraction device for vortex-assisted surfactant-enhanced-emulsification liquid-liquid microextraction with lighter than water organic solvents. **J Chromatogr A**, v. 1300, p. 58-63, 2013.
89. YIANTZI, E.; PSILLAKIS, E.; TYROVOLLA, K.; KALOGERAKIS, N. Vortex-assisted liquid-liquid microextraction of octylphenol, nonylphenol and bisphenol-A. **Talanta**, v. 80, P. 2057-2062, 2010.
90. YONAMINE, M. A saliva como espécime biológico para monitorar o uso de álcool, anfetamina, metanfetamina, cocaína e maconha por motoristas profissionais, 2004, 139f. **Tese para obtenção do grau de Doutor** - Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas, São Paulo.
91. YOU, X.; WANG, S.; LIU, F.; SHI, K. Ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction based on the solidification of a floating organic droplet used for the simultaneous determination of six fungicide residues in juice and red wine. **J Chromatogr A**, v. 1300, p. 64-69, 2013.
92. ZANG, X.H.; WU, Q.H.; ZHANG, M.Y.; XI, G.H.; WANG, Z. Developments Of Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Technique. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 37, p.161-168, 2009.
93. ZANJANI, M.R.K.; YAMINI, Y.; SHARIATI, S.; JÖNSSON, J.A. A new liquid microextraction method based on solidification of floating organic drop. **Anal Chim Acta**, v. 585, p. 286-293, 2007.

-
94. ZHANG, Y.; LEE, H.K. Determination of ultraviolet filters in water samples by vortex-assisted dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas-chromatography – mass spectrometry. **J Chrom A**, v. 1249, p. 25-31, 2012.
95. ZHANG, J.; LI, M.; YANG, M.; PENG, B.; LI, Y.; ZHOU, W.; GAO, H.; LU, R. Magnetic retrieval of ionic liquids: fast dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of benzoylurea insecticides in environmental water samples. **J Chromatogr A**, v. 1254, p. 23-29, 2012.
96. ZHANG, J.; LIANG, Z.; GUO, H. GAO, P.; LU, R.; ZHOU, W.; ZHANG, S.; GAO, H. Ionic liquid-based totally organic solvent-free emulsification microextraction coupled with high performance liquid chromatography for the determination of three acaricides in fruit juice. **Talanta**, v. 115, p. 556-562, 2013.
97. ZHOU, Q.; BAI, H.; XIE, G.; XIAO, J. Trace determination of organophosphorus pesticides in environmental samples by temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid-phase microextraction. **J Chromatogr A**, v. 1188, p. 148-153, 2008
98. ZHOU, Q.; BAI, H.; XIE, G.; XIAO, J. Temperatura-controlled ionic liquid dispersive liquid-phase microextraction. **J Chromatogr A**, v. 1177, p. 43-49, 2008.
99. ZHOU, Q.; ZHANG, X.; XIAO, J. Ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid-phase micro-extraction: a novel approach for the sensitive determination of aromatic amines in water samples. **J Chromatogr A**, v. 1216, p. 4361-4365, 2009.

Anexos

7 – Anexos

Anexo 1

Questionário relativo ao Projeto de Doutorado “**Desenvolvimento e validação de método para análise de drogas de abuso em urina empregando a microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME) e cromatografia em fase gasosa**”, sob responsabilidade dos pesquisadores Thiago Branco Hanna e Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis.

Nome:		Código:
Endereço:		
Telefone:	Idade:	Gênero: <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> F
Escolaridade:	Profissão:	

Faz uso de bebidas alcoólicas?

Se sim para a pergunta anterior, quando foi a última vez que utilizou?

Faz uso de tabaco (cigarro, charuto, cachimbo, fumo, etc)?

Se sim para a pergunta anterior, quando foi a última vez que utilizou?

Faz uso de alguma droga?

Se sim para a pergunta anterior, qual/quais?

Quando foi a última vez que utilizou essa/essas substâncias?

Há quanto tempo faz uso dessa/dessas substâncias?

Com que frequência utiliza essa/essas substâncias?

Com que idade teve o primeiro contato com essa/essas substâncias?

Faz uso de algum medicamento?

Se sim, para a pergunta anterior, qual/quais?

Anexo 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DA PESQUISA: “Desenvolvimento e validação de método para análise de drogas de abuso em urina empregando a microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME) e cromatografia em fase gasosa”.

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:

- Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis
CRQ nº 04.100.360
Tel: (16) 3602-3670
E-mail: martinis@usp.br
- Thiago Branco Hanna
CRF-SP nº 42.770
Tel: (16) 3602-3670
E-mail: libanis@fcfrp.usp.br

PROMOTOR DA PESQUISA

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

Você está sendo convidado a participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após esclarecimento das informações abaixo, se concordar fazer parte da pesquisa, favor assinar ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e outra é dos pesquisadores responsáveis. Você é livre para não querer participar ou desistir da pesquisa a qualquer momento que desejar. Caso mude de idéia, você não será prejudicado e o atendimento prestado a você será o mesmo, participando ou não da pesquisa. Você tem direito a perguntar o que quiser durante a pesquisa. Você não pagará nada e também não receberá nenhum dinheiro ou benefício adicional.

MOTIVO DA PESQUISA

O objetivo da pesquisa é desenvolver um método de análise e detecção de drogas de abuso devido ao aumento do uso pela população, utilizando amostras de urina.

EXPLICAÇÕES SOBRE O USO DE DROGAS

O uso de drogas traz sérios problemas à saúde, como dependência, esterilidade, desnutrição, danos ao cérebro e outros órgãos, e também problemas sociais.

PROCEDIMENTOS DA PESQUISA

Caso concorde em participar da pesquisa, será coletada uma amostra de sua urina em um frasco plástico. Esta urina será analisada para verificar a presença de tais substâncias (maconha, cocaína, crack, anfetamina e anestésicos).

RISCOS E/OU DESCONFORTOS

A coleta da urina não traz nenhum desconforto ou risco para você, já que serão colhidas através do próprio ato de urinar, sem haver nenhum contato com você.

BENEFÍCIOS

Você continuará recebendo tratamento no Centro de Apoio Psico Social Álcool e Drogas de Ribeirão Preto (CAPS-AD) e poderá saber o resultado dos exames feitos em sua amostra de urina.

CONFIDENCIALIDADE

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

PROBLEMAS OU PERGUNTAS

Se você tiver dúvida sobre qualquer etapa ou procedimento da pesquisa, entre em contato com **Thiago Branco Hanna** ou **Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis** pelos telefones: 3602-3670 ou (16) 8805-1315. Você também poderá procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP, através do telefone (16) 3602-4213.

ASSINATURAS

Se você leu e entendeu as informações contidas neste documento e concorda em participar voluntariamente do estudo, favor assinar abaixo:

Voluntário_____
Assinatura_____
Data

Expliquei o propósito do estudo ao voluntário e estou certo de que ele os entendeu, assim como os procedimentos, riscos e benefícios.

Ribeirão Preto, _____

Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis
CRQ: 04.100.360_____
Thiago Branco Hanna
CRF-SP: 42.770

Anexo 3



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

Of. CEP/FCFRP nº. 041/2012
kms

Ribeirão Preto, 24 de maio de 2012.

Ao pós-graduando
Thiago Branco Hanna
Orientador: Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis
FFCLRP/USP

Prezado Pós-graduando,

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP aprovou, em sua 102ª Sessão Ordinária, realizada em 23/05/2012, o projeto de pesquisa intitulado "DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA ANÁLISE DE DROGAS DE ABUSO EM URINA EMPREGANDO A MICROEXTRAÇÃO DISPERSIVA LÍQUIDO-LÍQUIDO (DLLME) E CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA" apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo CEP/FCFRP nº. 268, com base no parecer que segue anexo.

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

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

Atenciosamente,

PROFª. DRª. MARIA REGINA TORQUETI
Coordenadora do CEP/FCFRP

Anexo 3



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

Protocolo nº 263

Entrada:

Pesquisadores: Bruno Spinosa de Martinis, Thiago Branco Hanna

PARECER

Título do Projeto: Desenvolvimento e validação de método para análise de drogas de abuso em urina empregando a microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME) e cromatografia em fase gasosa.

Apresentação do projeto: O projeto de pesquisa, de modo geral, apresenta-se adequadamente descrito, embasado em literatura científica atual e pertinente.

Objetivo da pesquisa: Desenvolvimento e validação de métodos para identificação e quantificação de drogas de abuso a partir da urina.

Avaliação dos riscos e benefícios: A coleta de urina a ser realizada no projeto não traz riscos aos sujeitos da pesquisa. Os dados a serem obtidos permitirão, como benefícios, o desenvolvimento de novas metodologias para determinação de drogas de abuso em matrizes biológicas.

Comentários e considerações sobre a pesquisa: O projeto de pesquisa apresenta-se adequadamente estruturado e planejado, com importantes procedimentos para a área de Toxicologia

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: O TCLE apresenta-se adequadamente escrito, incorporando todos os itens necessários. O projeto apresenta orçamento detalhado e fontes de financiamento. Os demais documentos (declaração dos pesquisadores, declaração de infraestrutura tanto da instituição proponente quanto da co-participante e/ou outros) também apresentam-se corretamente preenchidos e adequados.

Recomendações:

Conclusões ou pendências e lista de inadequações:

Recomendação:

- Aprovação
- Aprovação e encaminhamento para apreciação pelo CONEP.
- Considerar em PENDÊNCIA até esclarecimentos dos pontos levantados
- Não aprovado
- Retirado

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
 Avenida do Café S/N - Monte Alegre - CEP 14040-903 - Ribeirão Preto - SP
 Comitê de Ética em Pesquisa - cep@fcrp.usp.br
 Fone: (16) 3602-4213 ou 3602-4216 - Fax: (16) 3602-4892

USP

Anexo 4

**Sanatório Espírita Vicente de Paulo**

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

CAPS ad II

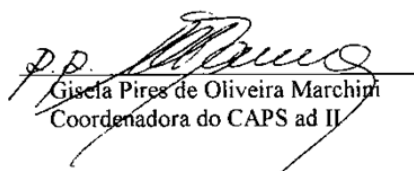
CENTRO DE ATENÇÃO PSICOSSOCIAL PARA ALCÓOL E OUTRAS DROGAS
Rua Pará, 1310 - Ipiranga, Ribeirão Preto-SP - CEP: 14060-440
Fone: (16) 3615-3336 - Fax: (16) 3622-2376 e-mail: capsadrp@hotmail.com

AUTORIZAÇÃO

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

Sendo o que nos cabe para o momento.

Ribeirão Preto, 14 de setembro de 2011


Gisela Pires de Oliveira Marchini
Coordenadora do CAPS ad II