

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 Vandezita 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 cocaetileno 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

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

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	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	v
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 – Conclusões	24
3 – Referências bibliográficas	25

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.

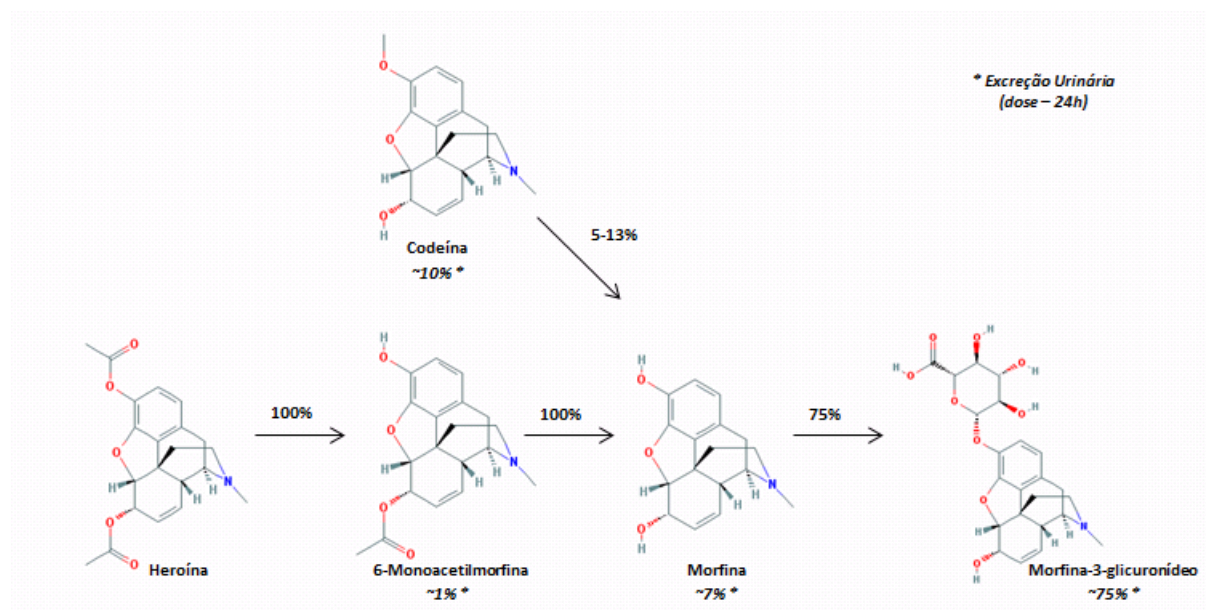


Figura 1 - Principais produtos das vias metabólicas para morfina, heroína e codeína. As porcentagens correspondem à quantidade aproximada do composto convertido no metabólito indicado e a eliminação urinária dos compostos em 24 h (Fonte: Pubchem, 2013).

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.

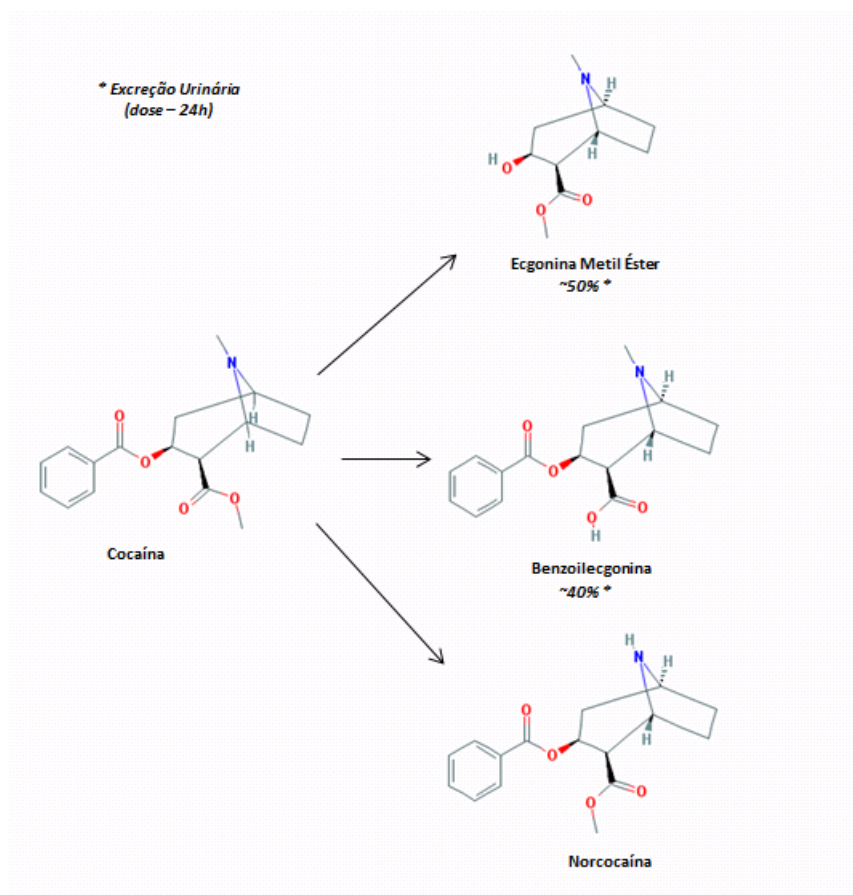


Figura 2 - Biotransformação da cocaína. As porcentagens correspondem à eliminação urinária dos compostos em 24 h (Fonte: Pubchem, 2013).

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.

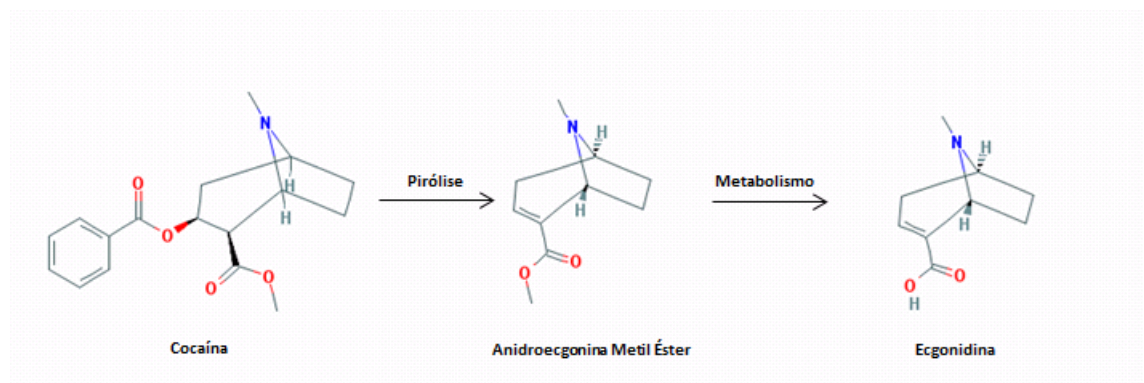


Figura 3 - Conversão da cocaína em base livre em anidroecgonina metil éster e formação da ecgonidina (Fonte: Pubchem, 2013).

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.

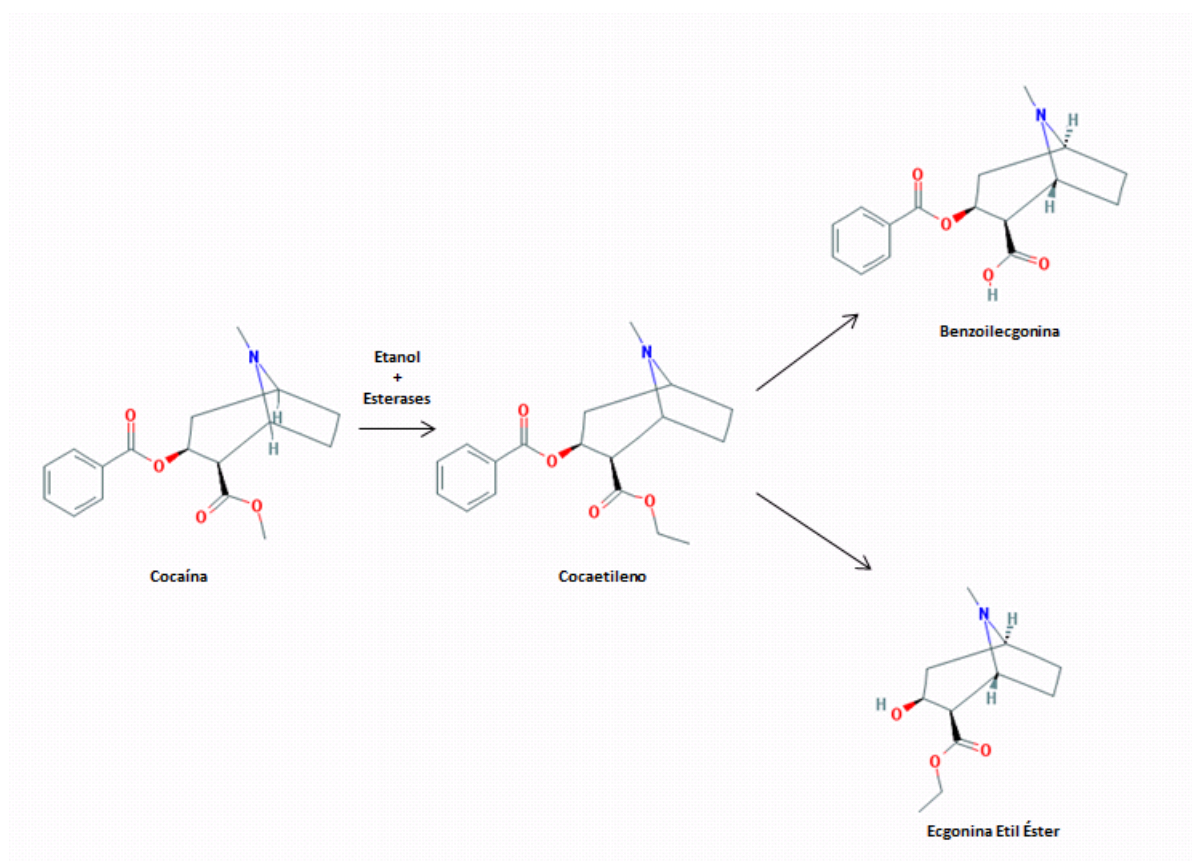


Figura 4 - Formação do cocaetileno por esterificação com o etanol e metabolismo do produto a outros ésteres de cocaína e metabólitos via esterases (Fonte: Pubchem, 2013).

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).

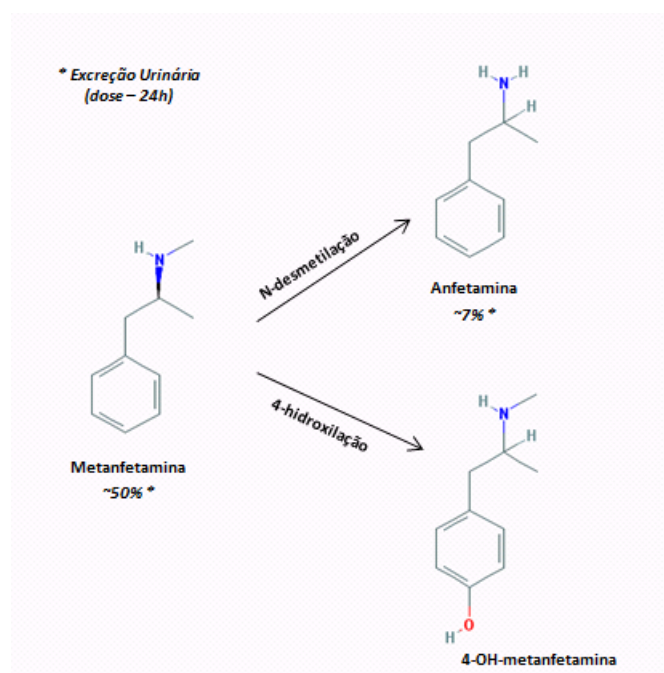


Figura 5 - Metabolismo da metanfetamina. As porcentagens correspondem à eliminação urinária dos compostos em 24 h (Fonte: Pubchem, 2013)

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**).

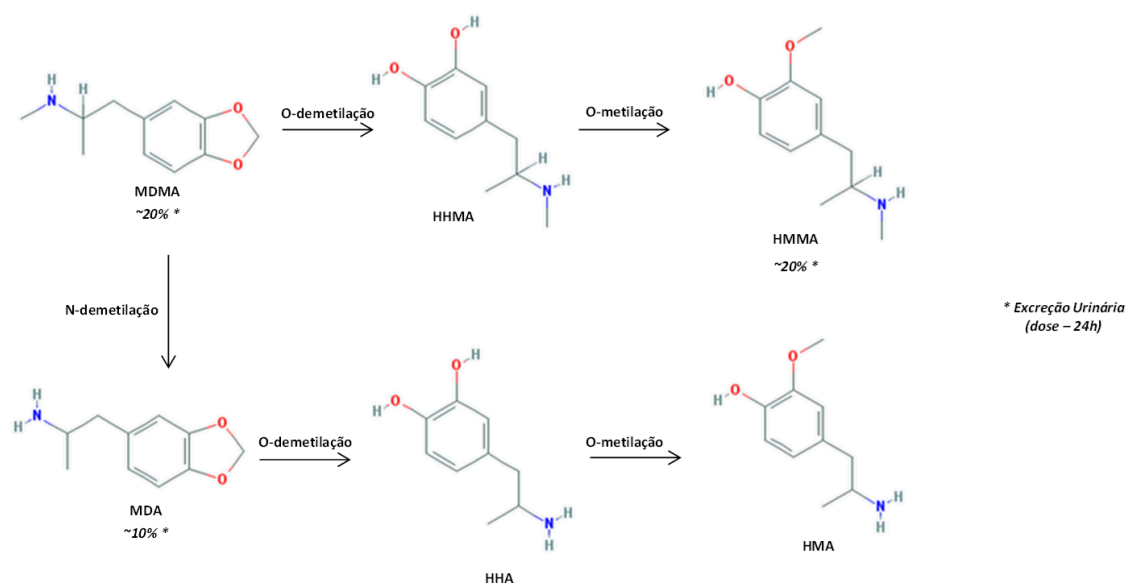


Figura 6 - Metabolismo do MDMA. As porcentagens correspondem à eliminação urinária dos compostos em 24 h (Fonte: Pubchem, 2013).

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).

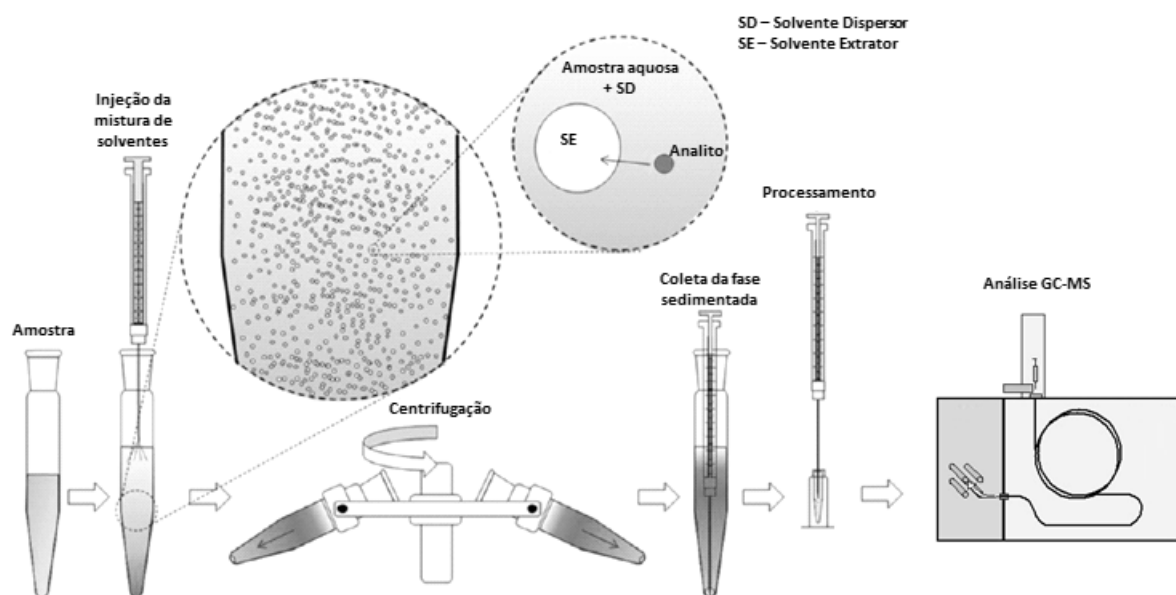


Figura 7 - Procedimento da microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME) (Adaptado de CALDAS; GONÇALVES; PRIMEL, 2011).

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**).

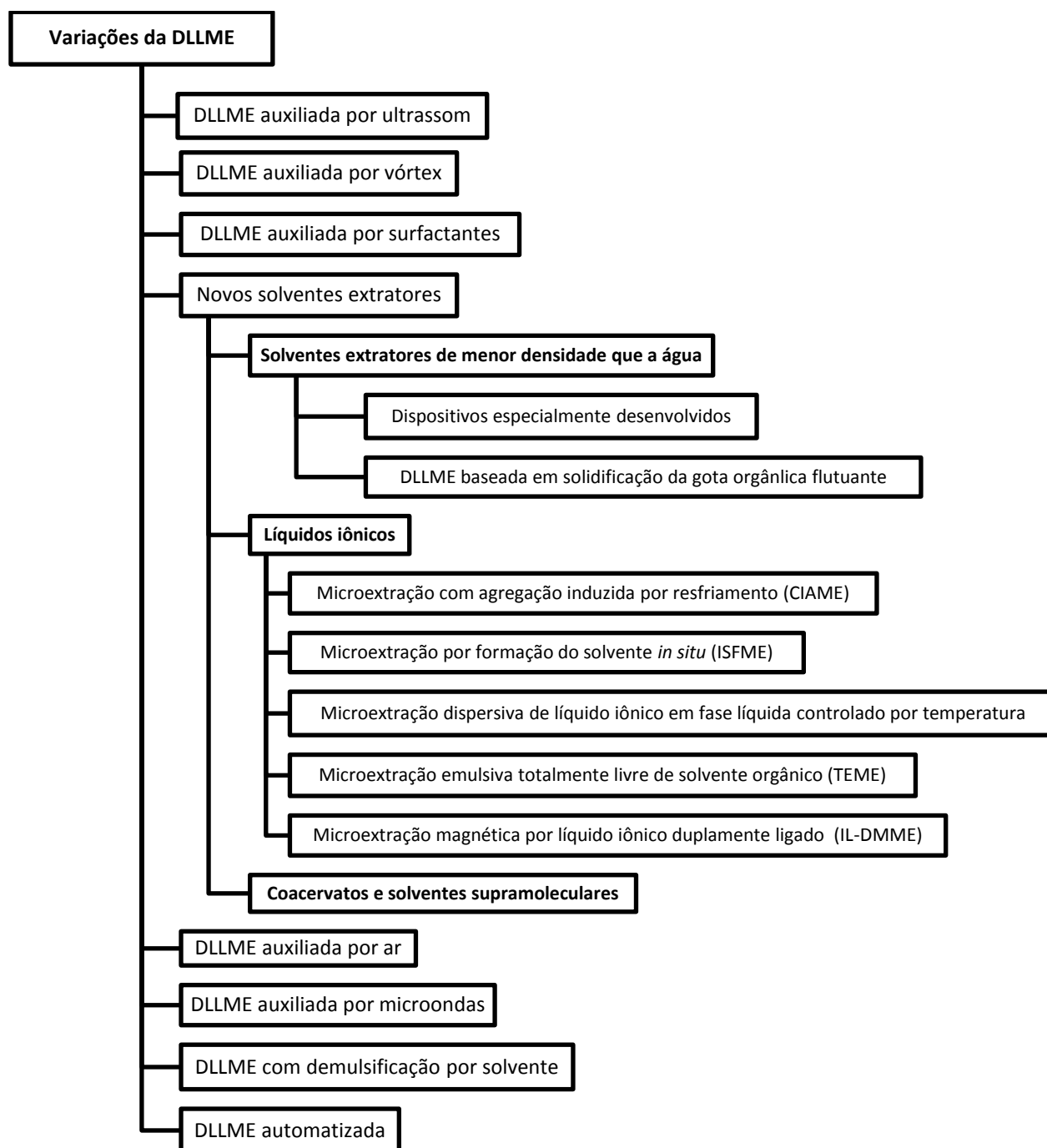


Figura 8 - Variações da técnica de DLLME (adaptado de SPIETELUN *et al.*, 2014).

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 microseringa (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.

Conclusões

2 – 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

3 – 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, benzoylecgonine 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 samplpes. **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.