UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Toxicologia e Análises Toxicológicas

**DERIVAÇÃO DE BENZOILECGONINA URINÁRIA
COM DIAZOMETANO PARA VERIFICAÇÃO DA
EXPOSIÇÃO À COCAÍNA POR TÉCNICAS
CROMATOGRÁFICAS**

MAURÍCIO YONAMINE

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. OVANDIR ALVES SILVA

São Paulo

2000

MAURÍCIO YONAMINE

**DERIVAÇÃO DE BENZOILECGONINA URINÁRIA COM
DIAZOMETANO PARA VERIFICAÇÃO DA EXPOSIÇÃO
À COCAÍNA POR TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS**

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE**

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Ovandir Alves Silva

Orientador/ Presidente

Prof. Dr. Alice Aparecida da Matta Chasin

1º Examinador

Prof. Dr. Myriam Clara Salvadori

2º Examinador

São Paulo, 24 de agosto de 2000.

Aos meus pais, **João Yoshio** e **Tie Tamashiro**,
Pela educação e constantes ensinamentos
que ajudaram na formação
do meu caráter.

Ao Professor **Ovandır Alves Silva**,
Pela orientação nesse trabalho, pelos ensinamentos transmitidos
E principalmente pela amizade conquistada
durante esses anos de convívio profissional.

AGRADECIMENTOS

À **Catia Mari Matsuo**, fiel companheira, pelo carinho, compreensão e apoio que vem me dando nessa fase da vida.

Aos colegas do Laboratório de Análises Toxicológicas (LAT/USP): Carmen, Profa. Regina Lúcia, Júnior e Marly pela nossa amizade e convívio diário.

Ao 'time' de colegas toxicologistas do curso de Pós-graduação, em especial ao Adriano, Alessandra, Cláudia, Cristiana, Daniela, Eliane, Fábio, Fernanda, George, Inêz, Isarita, Jussara, Nádia, Saulo e Sílvia pela amizade conquistada.

À **Dra. Myriam Clara Salvadori** e **Dra. Alice Aparecida da Matta Chasin** pelas preciosas sugestões no exame de qualificação.

Ao **Prof. Titular Antônio Flávio Mídio** pelas opiniões coerentes no exame de qualificação, pela revisão do *Summary* e por ser um exemplo profissional a ser seguido.

À **Adriana de Almeida Barreiros** e **Leila Bonadio** pela normalização das referências bibliográficas.

Aos meus 'velhos' amigos Cláudio e Zuleika, Roberto e Izumi, Ricardo e Edna, pelo apoio e amizade.

Meus agradecimentos.

CONTEÚDO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. GENERALIDADES.....	9
2.1. Toxicocinética da cocaína.....	9
2.2. Efeitos tóxicos da cocaína.....	15
2.3. Aspectos analíticos.....	18
2.3.1. Técnicas analíticas.....	18
2.3.2. Extração de cocaína e benzoilecgonina de urina.....	19
2.3.3. Reações químicas de derivação de benzoilecgonina.....	22
2.3.4. Cromatografia em fase gasosa/Espectrometria de massa (GC/MS).....	27
2.3.5. Cromatografia em fase gasosa (CG).....	34
2.3.6. Cromatografia em camada delgada (TLC).....	38
3. OBJETIVOS E PLANO DE TRABALHO.....	41
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
4.1. Material.....	42
4.1.1. Equipamentos e acessórios.....	42
4.1.2. Soluções-padrão.....	42
4.1.3. Reagentes e outros materiais.....	43
4.1.3.1. Reagentes e materiais utilizados na extração.....	43
4.1.3.2. Reagentes utilizados para a preparação de diazometano.....	43
4.1.3.3. Solventes, agente cromogênico, placa cromatográfica.....	44
4.1.4. Amostras de urina.....	44
4.1.4.1. Amostras de referência negativa.....	44
4.1.4.2. Amostras de referência positiva para benzoilecgonina na concentração de 150ng/mL e 300ng/mL.....	44
4.1.4.3. Amostras de urina de usuários de cocaína.....	45

4.2. Métodos.....	45
4.2.1. Derivação com diazometano.....	45
4.2.1.1. Estudo do tempo de reação necessário para derivação de benzoilecgonina com diazometano.....	45
4.2.1.2. Eficiência da transformação de benzoilecgonina em cocaína.....	46
4.2.1.3. Estudo de estabilidade do diazometano.....	47
4.2.2. Extração em fase sólida de cocaína e benzoilecgonina.....	47
4.2.3. Reação de derivação com diazometano.....	50
4.2.4. Cromatografia em fase gasosa/ Espectrometria de massa (GC/MS).....	50
4.2.4.1. Limite de detecção.....	50
4.2.4.2. Precisão intra-ensaio e interensaio.....	51
4.2.4.3. Recuperação de benzoilecgonina e cocaína.....	51
4.2.5. Cromatografia em fase gasosa/ detector de nitrogênio- fósforo (GC/NPD).....	52
4.2.5.1. Limite de detecção.....	52
4.2.5.2. Precisão intra-ensaio e interensaio.....	52
4.2.6. Cromatografia em camada delgada de alta eficiência (HPTLC).....	53
4.2.6.1. Escolha do sistema solvente.....	53
4.2.6.2. Limite de detecção.....	54
4.2.7. Análise das amostras de urina de usuários de cocaína.....	54
5. RESULTADOS.....	57
5.1. Derivação com diazometano.....	57
5.1.1. Estudo do tempo necessário de reação para derivação de benzoilecgonina com diazometano.....	57
5.1.2. Eficiência da transformação de benzoilecgonina em cocaína.....	57
5.1.3. Estabilidade do diazometano.....	58
5.2. Cromatografia em fase gasosa/ Espectrometria de massa (GC/MS).....	58

5.2.1. Limite de detecção.....	60
5.2.2. Precisão intra-ensaio e interensaio.....	60
5.2.3. Recuperação de benzoilecgonina e cocaína.....	61
5.3 Cromatografia em fase gasosa/ detector de nitrogênio- fósforo (GC/NPD).....	61
5.3.1. Limite de detecção.....	62
5.3.2. Precisão intra-ensaio e interensaio.....	62
5.4. Cromatografia em camada delgada de alta eficiência (HPTLC).....	63
5.4.1. Escolha do sistema solvente.....	63
5.4.1. Limite de detecção.....	65
5.5. Análise das amostras de urina de usuários de cocaína.....	65
6. DISCUSSÃO.....	67
7. CONCLUSÕES.....	79
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Principais vias de biotransformação da cocaína administrada em humanos.....	13
FIGURA 2	Simulação da taxa de excreção urinária para cocaína (COC), éster metilecgonina (EME) e benzoilecgonina (BE) após administração de dose simples de 100mg de cocaína pela via intravenosa.....	14
FIGURA 3	Etapas da reação do diazometano com benzoilecgonina formando cocaína.....	25
FIGURA 4	Esquema de extração em fase sólida de benzoilecgonina (BE), cocaína (COC) e padrão interno (PI) utilizado nas amostras de urina.....	49
FIGURA 5	Diagrama do procedimento utilizado no tratamento das amostras.....	55
FIGURA 6	Cromatograma obtido com a análise de amostra de referência positiva contendo 150ng/mL de benzoilecgonina.	59
FIGURA 7	Perfil cromatográfico da análise de amostra de referência positiva contendo benzoilecgonina na concentração de 300ng/mL adicionada com padrão interno.....	61
FIGURA 8	Cromatoplaça da análise de adicionados de benzoilecgonina em diferentes concentrações.....	64

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Principais reagentes utilizados na derivação de benzoilecgonina e os respectivos derivados formados.....	26
TABELA 2	Métodos para identificação de cocaína e/ou benzoilecgonina em urina por cromatografia em fase gasosa/espectrometria de massa (GC/MS).....	29
TABELA 3	Métodos para identificação de cocaína e/ou benzoilecgonina em urina por cromatografia em fase gasosa (GC).....	35
TABELA 4	Métodos para identificação de cocaína e/ou benzoilecgonina em urina por cromatografia em camada delgada (TLC) e (HPTLC).....	39
TABELA 5	Estudo do tempo de reação para a derivação de benzoilecgonina em cocaína com diazometano.....	57
TABELA 6	Resultados das razões das áreas formadas pelos fragmentos 182 (cocaína) e 210 (padrão interno) para as análises realizadas com as amostras de referência positiva contendo 150ng/mL de benzoilecgonina para verificação da precisão intra-ensaio e interensaio.....	60
TABELA 7	Resultados das razões das áreas formadas pela cocaína e padrão interno para as análises realizadas com as amostras de referência positiva contendo 300ng/mL de benzoilecgonina para verificação da precisão intra-ensaio e interensaio.....	62
TABELA 8	Valores de R _f de cocaína, cafeína e nicotina aplicados em placas de HPTLC e desenvolvidos em sistemas solventes sugeridos na literatura.....	63
TABELA 9	Resultado das análises de amostras de usuários de cocaína empregando-se ou não a derivação dos extratos e respectivo valor de concentração obtido com a técnica de Imunofluorescência polarizada.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

BE	Benzoilecgonina
BSA	<i>Bis</i> -trimetilsililacetamida
BSTFA	<i>Bis</i> -trimetilsililtrifluoroacetamida
COC	Cocaína
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
EME	Éster metilecgonina
FID	<i>Flame Ionization Detector</i> –Detector de Ionização por Chama
GC	<i>Gas Chromatography</i> –Cromatografia em Fase Gasosa
GC/MS	<i>Gas Chromatography/Mass Spectrometry</i> – Cromatografia em Fase Gasosa/ Espectrometria de Massa
GC/NPD	<i>Gas Chromatography/ Nitrogen-Phosphorous Detector</i> – Cromatografia em Fase Gasosa com Detector de Nitrogênio-Fósforo
HFIP	Hexafluoroisopropanol
HPTLC	<i>High Performance Thin Layer Chromatography</i> – Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência
FPIA	<i>Fluorescence Polarization Immuno Assay</i> – Imunofluorescência Polarizada
LAT	Laboratório de Análises Toxicológicas
LD	Limite de Detecção
líq-líq	Extração Líquido-líquido
MSTFA	<i>n</i> -metil- <i>n</i> -trimetilsililtrifluoroacetamida
MTBSTFA	<i>n</i> -Metil- <i>n</i> -(<i>t</i> -butildimetilsilil) trifluoroacetamida
N/C	Nada Consta
NCI	<i>Negative Chemical Ionization</i> – Ionização Química Negativa
PFP	Pentafluoropropanol
PFFA	Anidrido pentafluoropropiônico
PI	Padrão Interno

REC	Recuperação do método
SIM	<i>Selected Ion Monitoring</i> – Monitoramento Seletivo de Íons
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> – Extração em Fase Sólida
TBDMCS	<i>t</i> -butildimetilclorosilano
TBDMS	<i>t</i> -butildimetilsilil
THA	Tetrahexilamônio
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i> – Cromatografia em Camada Delgada
TMAH	Hidróxido de tetrametilamônio
TMCS	Trimetilclorosilano
TMPAH	Hidróxido de trimetilfenilamônio

RESUMO

O abuso da cocaína representa atualmente um dos grandes problemas mundiais de saúde pública. A utilização de análises toxicológicas para verificar a exposição à cocaína é de grande interesse social pois possibilita que medidas de prevenção e controle sejam adotadas. Um dos indicadores biológicos da exposição à cocaína é a benzoilecgonina pois é o principal produto de biotransformação encontrado na urina. Entretanto, as propriedades físico-químicas da benzoilecgonina dificultam sua análise por técnicas cromatográficas empregadas em Laboratórios de Toxicologia. Extrações líquido-líquido não fornecem bons índices de recuperação e há a necessidade de derivação da benzoilecgonina para posterior análise por cromatografia em fase gasosa. No trabalho, a aplicação de extração em fase sólida seguida da conversão de benzoilecgonina em cocaína com diazometano possibilitou a padronização do método, utilizando as técnicas de cromatografia em fase gasosa associada à espectrometria de massa, cromatografia em fase gasosa com detector de nitrogênio-fósforo e cromatografia em camada delgada de alta eficiência. Amostras provenientes de usuários de cocaína foram submetidas ao método padronizado e em todas foi possível a detecção de cocaína pelas técnicas cromatográficas utilizadas.

SUMMARY

Cocaine abuse is now representing one of the greatest world public health problem. Great social interests have been generated with the using of toxicological analyses with the aim of detecting cocaine exposure to adopt prevention and control measures. Benzoylecgonine, the main metabolite found in urine, is one of the biological markers of cocaine exposure. However, its physical-chemical properties make the chromatographic analyses of this substance a difficult task. Liquid-liquid extraction of this analyte from biological sample does not provide good recovery and the derivatization of benzoylecgonine for further detection by gas chromatography is a need. In this study, the application of solid phase extraction followed by benzoylecgonine conversion into cocaine with diazomethane made the standardization of the method possible. The following techniques were used: gas chromatography/ mass spectrometry (GC/MS), gas chromatography/ nitrogen-phosphorous detection (GC/NPD) and high performance thin-layer chromatography (HPTLC). Samples collected from cocaine abusers were submitted to the standardized extraction and derivatization techniques. Cocaine was detected in all samples when chromatography was applied.

1. INTRODUÇÃO

O efeito estimulante dos princípios ativos da *Erytroxylum coca*, planta da qual se extrai a cocaína, já era conhecido há mais de 3000 anos na História da humanidade, quando os nativos da América do Sul (mais particularmente Bolívia, Peru e Norte da Argentina) mascavam suas folhas (Busto *et al.*, 1989). Na cultura Inca, a planta de coca era considerada de origem divina e chamada de “presente do Rei Sol” (Johanson & Fischman, 1989).

Entretanto, os habitantes da Europa só foram conhecer as propriedades estimulantes da coca quando seu principal constituinte foi quimicamente isolado em 1855. Nos anos seguintes, o uso da cocaína aumentou drasticamente por pessoas que acreditavam que ela tinha poderes especiais. Em 1884, Sigmund Freud sugeriu usos terapêuticos para a cocaína, os quais incluíam: tratamento para asma e disfunções digestivas, anestesia local e até no tratamento da dependência de álcool e morfina. (Johanson & Fischman, 1989).

Atualmente, seu nome está associado com abuso. Aspirada, fumada ou injetada, a cocaína rapidamente produz em seus usuários sensações de bem estar, poder, euforia e força, seguidas de depressão, fadiga e desconforto físico (Clauwaert *et al.*, 1996). A *overdose* pode causar convulsões, parada cardíaco-respiratória e morte (Lundberg *et al.*, 1977).

O abuso da cocaína não conhece fronteiras geográficas, muito menos faz distinção entre níveis sócio-econômicos. Tanto os executivos de grandes empresas nos EUA, como garotos de rua no Brasil fazem uso da droga. O

grande responsável por esse panorama é o advento do "crack", variante fumável da cocaína, que tem baixo custo, sendo mais disponível à população marginalizada ou de baixa renda (Nappo, 1999).

No Brasil, levantamentos realizados em alguns segmentos da sociedade nos fornecem indícios da dimensão do problema. Pesquisa realizada em empresas de vários setores revela que a cocaína é a segunda droga ilícita mais usada entre os trabalhadores (Silva *et al.*, 1999). Analisando-se a tendência de "uso na vida" entre estudantes brasileiros de ensino fundamental e médio, notam-se importantes alterações durante a última década. O consumo de cocaína quadruplicou durante esse período, aumentando de 0,5% em 1987 para 2,0% em 1997 (Galduróz *et al.*, 1997). Entre estudantes da *Universidade de São Paulo* a freqüência do consumo na vida está na faixa dos 7% (Queiroz & Andrade, 1999).

Os intensos efeitos prazerosos propiciados para o usuário fazem com que a cocaína seja uma droga que apresenta um dos maiores potenciais de abuso e conseqüentemente esteja entre as grandes preocupações mundiais em saúde pública (Chasin & Mídio, 1991).

Entretanto, a avaliação clínica para verificar o uso de cocaína é muito difícil e alguns sintomas só aparecem após elevado grau de dependência. O meio mais seguro para a verificação da exposição à cocaína é através das análises toxicológicas. Com as informações fornecidas por esse meio, é possível a adoção de medidas preventivas na tentativa de minimizar o problema. Os resultados das análises também podem ser utilizados como evidência da violação da legislação, acordos e regras, podendo haver graves conseqüências para usuário (Christophersen & Morland, 1994).

A análise toxicológica para se comprovar a exposição à cocaína pode ser um importante instrumento para profissionais envolvidos no controle e prevenção do uso de drogas ilícitas, principalmente nos seguintes contextos:

a) Dopagem no esporte: o abuso de drogas e fármacos por atletas tem sido um grande problema por mais de 30 anos. Aspectos éticos e de saúde são de particular interesse. É considerado dopagem quando substâncias pertencentes a classes proscritas de agentes farmacológicos são administradas ou quando métodos proibidos são utilizados (Silva, 1999).

Apesar de não haver qualquer evidência quanto aos efeitos ergogênicos da cocaína, dados de 1995 do Comitê Olímpico Internacional apontaram que essa substância representava cerca de 6% dos casos positivos registrados (Segura, 1998). Entretanto, diante de um resultado positivo para cocaína no controle da dopagem é muito difícil dizer se é devido a um uso recreativo ou uma tentativa de melhorar sua performance (Segura, 1998).

b) Investigação médico-legal: a realização de análises toxicológicas com finalidades médico-legais podem ser requisitadas por autoridades competentes principalmente nas seguintes circunstâncias: dirigir sob influência de substâncias psicoativas -infração gravíssima prevista no Código de Trânsito Brasileiro - (Brasil, 1997); detecção do uso de drogas ilícitas em atos criminosos (homicídios, estupros e outros), comportamento violento, descoberta do uso em análise de material de necrópsias, casos de *overdose*, intoxicações e outros (Christophersen & Morland, 1994).

Um estudo realizado com 36 indivíduos envolvidos em mortes violentas no Brasil, apontou que cerca de 47% deles apresentavam quantidades detectáveis de cocaína e benzoilecgonina na urina e no cabelo, demonstrando a ligação do uso de drogas com a violência (Toledo, 1999).

c) Programas de prevenção e controle do uso de drogas no ambiente de trabalho: a finalidade de tais programas está baseada nas questões de segurança, aumento da produtividade, evitar ausência no trabalho e diminuir a possibilidade das pessoas se envolverem com atividades ilícitas. As análises podem ser realizadas nas seguintes situações: a) pré admissional;

b) quando há suspeita de uso; c) quando se observa baixo desempenho; d) quando há evidência de intoxicações; e) pós acidente e f) testes aleatórios (Christophersen & Morland, 1994).

A análise para verificar o uso de drogas é realizada em duas etapas: um procedimento preliminar de triagem para um grupo de substâncias (fármaco e/ou seus produtos de biotransformação) e a etapa confirmatória.

É prática comum nesse tipo de análise o estabelecimento de limites de concentração na urina, para categorização de resultados como indicativo ou não do consumo da droga. Esses valores de referência, denominados *cut off* são valores estabelecidos para cada droga ou grupos de drogas. Para identificação do uso da cocaína, os valores de *cut off* recomendados para a concentração de benzoilecgonina (principal produto de biotransformação da cocaína) na urina são: 300ng/ml na fase de triagem e 150ng/ml para análise confirmatória (Osterloch & Becker, 1990); (Clark, 1990); (De La Torre *et al.*, 1997). Dentre as agências governamentais americanas ativamente envolvidas nesse processo estão o *Department of Transportation* e o *Nuclear Regulatory Commission* (Elsohly & Jones, 1995). No Brasil, o Laboratório de Análises Toxicológicas da Universidade de São Paulo, atualmente em convênio com cerca de 300 empresas espalhadas por todo o país, vem aplicando esses programas desde 1992, obtendo bons resultados quanto à redução do uso de drogas no ambiente de trabalho (Silva *et al.*, 1999).

d) Análise toxicológica de cocaína em outros contextos: as análises toxicológicas podem ser realizadas como meio de diagnóstico de intoxicações, verificação do uso de drogas nas escolas e na avaliação da eficácia do tratamento de dependentes em reabilitação.

Na Intervenção Ambulatorial para Dependentes de Cocaína (IAC), implantada no Grupo Interdisciplinar de Estudos de Álcool e Drogas (GREA) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, as análises toxicológicas foram introduzidas com o objetivo de avaliar a confiabilidade

do relato do consumo prévio recente de cocaína. Esse procedimento teve importante papel no tratamento dos pacientes participantes do programa terapêutico da Instituição (Silva & Odo, 1999).

A cocaína e seus produtos de biotransformação podem ser detectados em vários espécimes biológicos como o sangue, suor saliva, vísceras, humor vítreo, mecônio, cabelo e urina.

A amostra de sangue pode ser utilizada para verificar a exposição recente à droga (algumas horas), havendo a possibilidade de se estabelecer correlação entre a concentração plasmática e o estado clínico do paciente. Contudo, a coleta é invasiva e requer pessoal treinado para sua execução. Além disso, trata-se de uma matriz complexa em relação aos constituintes normalmente presentes, dificultando a análise (Kapur, 1993); (Christophersen & Morland, 1994).

Outra amostra que vem sendo estudada para análises toxicológicas é a saliva. Os fármacos são transferidos da corrente sangüínea para essa amostra biológica através de mecanismos de transporte ativo, difusão passiva e ultrafiltração (Huestis *et al.*, 1998). Estudos têm demonstrado correlação entre níveis de concentração de cocaína na saliva e concentrações plasmáticas, o que sugeriria um método menos invasivo que a coleta de sangue para a monitorização do uso recente da cocaína (Cone *et al.*, 1988); (Cone *et al.*, 1989). Entretanto, os resultados devem ser interpretados com muito cuidado, pois a contaminação da saliva proveniente da administração da droga pelas vias oral e respiratória pode gerar distorcidas proporções de concentração saliva/plasma (Huestis *et al.*, 1998).

Estudos também têm sido conduzidos no sentido de avaliar a utilização do suor como amostra biológica para a monitorização da exposição a drogas de abuso. Para a coleta foram desenvolvidos “adesivos” especiais que, aderidos à pele, absorvem o suor liberado pelo corpo (Huestis *et al.*, 1998).

Vísceras e humor vítreo são amostras que podem ser utilizadas com finalidade médico-legal. No fígado, altas concentrações dos fármacos e seus produtos de biotransformação podem ser encontrados. O rim também é uma amostra útil para análise toxicológica pois as concentrações dos fármacos e produtos de biotransformação são mais altas que aquelas encontradas no sangue (Huestis *et al.*, 1998). Por estar situado em um compartimento protegido da ação de microorganismos, o humor vítreo pode ser utilizado quando os corpos se encontrarem em estado de decomposição (Clauwaert *et al.*, 1995).

Para verificar a exposição fetal, o mecônio e o cabelo de neonatos são as amostras recomendadas. A formação do mecônio inicia-se nas primeiras 12 a 16 semanas de gestação e continua durante a gravidez e, portanto, a cocaína e seus produtos de biotransformação podem se acumular durante esse período (Silva & Odo, 1999). A análise toxicológica em cabelo permite verificar a exposição a longo prazo, não apenas de recém nascidos, mas também de usuários de drogas. Se levarmos em consideração que o cabelo cresce em média de 1,0 a 1,5 cm por mês, é possível fazer a correlação do segmento analisado com o período em que houve a exposição, sendo o segmento mais próximo à raiz correspondente ao último mês de exposição (Henderson, 1993). Contudo, a detecção de cocaína no cabelo só é possível se houver exposição freqüente à droga (Silva & Odo, 1999).

Na maioria dos casos, a urina é a amostra de escolha para verificação da exposição recente a drogas de abuso. As concentrações dos fármacos e seus produtos de biotransformação são relativamente altas quando comparadas com outros espécimes biológicos e grandes volumes podem ser obtidos durante a coleta (Silva & Odo, 1999). A disponibilidade maior de reagentes comerciais prontos para análise de triagem também é uma importante razão para o freqüente uso da urina em análises toxicológicas (Christophersen & Morland, 1994).

Para análise em urina, as técnicas imunológicas são as mais utilizadas para triagem (Osterloch & Becker, 1990); (De La Torre *et al.*, 1997) por apresentarem as seguintes características: necessidade de pouco volume de amostra; utilização de sistemas automatizados, diminuindo a probabilidade de erros operacionais e processamento de várias amostras simultaneamente, não havendo necessidade de procedimentos de extração. Entretanto necessitam de aparelhos específicos e reagentes importados e há a probabilidade de ocorrer interferência em reações cruzadas. Devido a grande responsabilidade e a possibilidade de sérias conseqüências legais ao indivíduo implicado, é indubitável que resultados provenientes da triagem sejam confirmados por técnicas mais específicas como a cromatografia em fase gasosa ou líquida associada a espectrometria de massa (Clark, 1990); (Alleyne *et al.*, 1991); (De La Torre *et al.*, 1997).

Outras técnicas cromatográficas como a cromatografia em camada delgada e a cromatografia em fase gasosa também podem ser utilizadas para triagem; no entanto, necessitam de uma etapa prévia de extração dos analitos da urina, o mesmo ocorrendo para a técnica confirmatória de espectrometria de massa associada à cromatografia em fase gasosa.

Procedimentos de extração da urina muitas vezes são difíceis, pois os produtos de biotransformação, indicadores da exposição a drogas, são geralmente polares e hidrofílicos. Um ajuste no valor de pH é necessário para que a forma não-ionizada da substância prevaleça e seja possível a extração líquido-líquido. Para substâncias com características anfóteras, como a benzoilecgonina, esse ajuste não surte o efeito desejado, pois em qualquer meio ele se encontra na forma ionizada.

Uma vez extraída da matriz, uma etapa de derivação se faz necessária para análise por cromatografia em fase gasosa, pois compostos polares são pouco voláteis. A redução na polaridade possibilita a análise cromatográfica do composto, minimizando a indesejável adsorção na coluna (Segura *et al.*, 1998). A preparação de um derivado também pode ser útil

quando o espectro de massa do composto original apresenta íons característicos com baixa intensidade. A estrutura química é alterada após a derivação e conseqüentemente, o padrão de fragmentação também é alterado (Segura *et al.*, 1998). Reações de derivação também podem ser utilizados para aumentar a detectabilidade de um composto, introduzindo grupos com alta afinidade eletrônica como os halogênios, permitindo uma maior eficiência de ionização quando o espectrômetro de massa é selecionado no modo de Ionização Química Negativa (NCI) (Pfleger *et al.*, 1992).

Alguns agentes de derivação permitem a obtenção de derivados com espectros bastante característicos que podem ser relevantes para sua identificação. A formação de fragmentos característicos com alto peso molecular monitorados pelo espectrômetro de massa pode diminuir a possibilidade de interferentes (Segura *et al.*, 1998).

Para análise de benzoilecgonina, os principais procedimentos de derivação citados na literatura são a metilação, a propilação, a trimetilsililação e a pentafluoropropilação. Cada reação possui características próprias que devem ser cuidadosamente avaliadas antes de sua utilização na padronização do método.

Frente a essas dificuldades analíticas, foi necessário um estudo mais aprofundado de procedimentos de extração e derivação da benzoilecgonina urinária, objetivando sua identificação por técnicas cromatográficas amplamente utilizadas em laboratórios de Toxicologia, que são a cromatografia em camada delgada de alta eficiência (HPTLC), cromatografia em fase gasosa (GC) e espectrometria de massa associada à cromatografia em fase gasosa (GC/MS).

2. GENERALIDADES

2.1. Toxicocinética da cocaína

A auto-administração da cocaína pode ocorrer por via respiratória (intranasal e pulmonar), injeção intravenosa ou via oral (Chasin & Mídio, 1991); (Cone, 1995). As diferentes vias podem determinar a velocidade de penetração e alcance da concentração plasmática de pico da cocaína no sangue (Cone, 1995).

A biodisponibilidade da forma fumada da cocaína ou "crack" é de aproximadamente 70% (Cone *et al.*, 1995) e resulta em alta velocidade de penetração, devido à extensa área de superfície dos pulmões, sendo a meia-vida de absorção da ordem de 1,1 min (Jeffcoat *et al.*, 1989). Essa via de administração é caracterizada por um rápido e intenso efeito farmacológico comparável à via intravenosa (Jatlow, 1987); (Johanson & Fischman, 1989); (Chasin & Mídio, 1991). Após utilização de 42mg de cocaína base pela via respiratória (fumada) por seis voluntários, Cone (1995) encontrou concentrações plasmáticas de pico de 154 a 345ng/mL (média=227ng/mL) após 5 minutos. No mesmo experimento, seguindo injeção intravenosa de 25mg de cloridrato de cocaína, os indivíduos apresentaram picos de concentração que variaram de 98 a 349ng/mL (média=230ng/mL). Num estudo similar, Isenschmid *et al.* (1992) relataram valores médios de pico de 260ng/mL em 4 minutos, após injeção

intravenosa de 32mg; e 220ng/mL após dose fumada de 50mg de cocaína base utilizada por 10 voluntários.

A biodisponibilidade da cocaína quando administrada pelas vias intranasal ou oral são da ordem de 60% (Wilkinson *et al.*, 1980); (Jatlow, 1987); (Chasin, 1990) e produzem níveis mais baixos de concentrações plasmáticas em um tempo mais prolongado devido à reduzida velocidade de absorção (Jatlow, 1987); (Cone, 1995).

Os motivos do retardamento da absorção da cocaína quando utilizada por aspiração nasal podem estar relacionados principalmente à baixa difusão pela mucosa naso-orofaríngea, às propriedades vasoconstritoras do fármaco e à possibilidade de deglutição parcial da dose (Busto *et al.*, 1989); (Cone, 1995). As concentrações plasmáticas de pico da cocaína após administração de 32mg por essa via ficaram na faixa de 40 a 88ng/mL (média=63ng/mL) em tempos variáveis de 24 a 51 minutos em estudo realizado com seis voluntários (Cone, 1995). Resultado semelhante de 50ng/mL foi encontrado por Jatlow (1987), após administração de 30 a 40mg de cocaína pela via intranasal. Concentrações plasmáticas de pico de 100 a 200ng/mL de cocaína foram associados com doses de 1 a 2 mg/kg no mesmo experimento.

Embora mais lenta em relação ao aparecimento dos efeitos, a via intranasal é equivalente na sua intensidade, quando comparada com a via intravenosa (Jatlow, 1987); (Isenschimid *et al.*, 1992).

Em relação à via oral, a baixa velocidade de absorção pode ser explicada pela ionização da cocaína no meio ácido do estômago, ocorrendo a absorção somente quando alcança o intestino delgado onde a forma não ionizada prevalece. Busto *et al.* (1989) encontraram valores experimentais de concentração plasmática de pico de 120 a 470ng/ml durante tempo que variou entre 50 e 90 minutos após administração oral de 2,0 mg/kg de peso corpóreo.

Após absorção, a cocaína atravessa a barreira hematencefálica e é rapidamente distribuída para o Sistema Nervoso Central (SNC) o que resulta em altas concentrações no cérebro, maiores que as concentrações sanguíneas correspondentes (Spiehler & Reed, 1985). Dados da literatura sugerem que também haja deposição da cocaína no tecido adiposo, com posterior liberação desses sítios de armazenamento (Cone & Weddington, 1989); (Preston *et al.*, 1998). Outras barreiras biológicas são atravessadas pela cocaína, havendo a ocorrência de transferência placentária, com sérios prejuízos ao feto (Chasnoff *et al.*, 1989).

A rápida distribuição da cocaína por todo o organismo dificulta o estabelecimento de modelos farmacocinéticos para seu estudo (Chasin & Mídio, 1991). Cone *et al.* (1988), empregando modelo farmacocinético monocompartimental encontraram valor médio de meia-vida plasmática de eliminação de 37 minutos, volume de distribuição de 111L e “clearance” total de 123L/h após injeção intravenosa de 40mg de cocaína ($N=5$). Chow *et al.* (1985), utilizando modelo bicompartimental sob a mesma via de administração (dose=32mg, $N=5$), encontraram valor médio de meia-vida de eliminação de 48 minutos, volume de distribuição de 132L e “clearance” total de 126L/h. Alguns autores calcularam a meia-vida plasmática de eliminação de aproximadamente 58 minutos (Jeffcoat *et al.*, 1989) para a via respiratória, 50 minutos para a via oral e 75 minutos para a via intranasal, quando administradas doses equivalentes (Wilkinson *et al.*, 1980); (Jeffcoat *et al.*, 1989). Entretanto, num estudo experimental mais recente, verificou-se que as meias-vidas plasmáticas para as vias respiratória, intranasal e intravenosa foram respectivamente de 272, 299 e 244 minutos (Cone, 1995). Segundo o autor, os resultados discordantes com os trabalhos anteriores poderiam ser explicados pelo maior tempo de coleta e monitorização das concentrações plasmáticas e do baixo limite de detecção do método empregado.

A biotransformação da cocaína no organismo humano acontece principalmente pela hidrólise das duas ligações ésteres presentes na

molécula (um grupo metil éster e outro benzoil éster). A via enzimática da hidrólise ocorre através da ação de enzimas plasmáticas e hepáticas sobre o grupo benzoil éster da cocaína, levando a formação de éster metilecgonina (Stewart *et al.*, 1979); (Ramcharitar *et al.*, 1995). Em relação à formação da benzoilecgonina, a hidrólise que ocorre sobre o grupo metil éster da cocaína pode ser explicada por dois mecanismos. Segundo pesquisa realizada por Stewart *et al.* (1979), há a formação de 42% de benzoilecgonina após incubação da cocaína em solução fisiológica tamponada em pH 7,4. Outro mecanismo seria a hidrólise intermediada por enzimas carboxilesterases presentes no plasma e no fígado (Dean *et al.*, 1991); (Dean *et al.*, 1992); (Sukbuntherng *et al.*, 1995).

A cocaína administrada em humanos é convertida, quase em sua totalidade, em produtos de biotransformação e eliminada na urina como benzoilecgonina (15-50%), éster metilecgonina (15-35%), ecgonina (1-8%), norcocaína (2-6%) e na forma precursora (3%) (Silva & Odo, 1999) (Figura 1). A norcocaína é o único produto de biotransformação da cocaína reconhecidamente ativo (Jatlow, 1987) e é formada pela atuação do citocromo P450 (Sukbuntherng *et al.*, 1995). A ecgonina pode ser formada pela consecutiva hidrólise de pequenas quantidades de benzoilecgonina e éster metilecgonina (Ambre, 1985) e representa de 1 a 8% do total excretado na urina (Silva & Odo, 1999).

FIGURA 1 – Principais vias de biotransformação da cocaína administrada em humanos (adaptado de Chasin, 1996). *porcentagem de eliminação urinária (Silva & Odo, 1999).

A meia vida biológica da cocaína é de 0,5-1,5h, a de éster metilecgonina é de aproximadamente 4 horas e de benzoilecgonina está na faixa de 4,7 a 7,5 horas (Hamilton *et al.*, 1977); (Ambre *et al.*, 1984); (Ambre, 1985).

Através de uma coletânea de dados experimentais da literatura relacionados à cinética da cocaína, Ambre (1985) demonstrou graficamente uma simulação da taxa de excreção urinária de benzoilecgonina, éster metilecgonina e do produto inalterado após uma dose simples de 100mg de cocaína por via intravenosa (Figura 2).

FIGURA 2 – Simulação da taxa de excreção urinária para cocaína (COC), éster metilecgonina (EME) e benzoilecgonina (BE) após administração de dose simples de 100mg de cocaína pela via intravenosa (Ambre, 1985).

A benzoilecgonina é o principal indicador biológico da exposição à cocaína e sua detecção na urina depende obviamente da quantidade de droga utilizada, frequência de uso e na definição do valor de referência - *cut off* - reconhecido pelo laboratório. Um estudo realizado por Guimarães (1999) em usuários de cocaína demonstrou uma variação de 24 a 180 horas no período de detecção de benzoilecgonina urinária, utilizando a técnica de imunofluorescência polarizada e *cut off* de 300ng/mL. Cone & Weddington (1989) encontraram uma variação de 24-96 horas, utilizando a mesma técnica analítica. As diferenças encontradas no período de detecção nos dois estudos podem ser explicadas pelo número de indivíduos usuários avaliados. Enquanto o primeiro avaliou 60 indivíduos, no segundo estudo foram avaliados somente seis. Devido a diferenças individuais nas velocidades de biotransformação e excreção e na maior quantidade de indivíduos avaliados, uma maior faixa de variação foi verificada no estudo de Guimarães (1999).

Com o uso concomitante de etanol, a cocaína é transesterificada por esterases presentes no fígado resultando em cocaetileno (Dean *et al.*, 1991); (Dean *et al.*, 1992), que pode ser um biomarcador para este tipo de exposição (Chasin & Mídio, 1997). Quando isso ocorre, a formação de benzoilecgonina é inibida e há um aumento das concentrações de éster metilecgonina e norcocaína hepático (Roberts *et al.* 1993).

2.2. Efeitos tóxicos da cocaína

A entrada da cocaína no sistema nervoso central produz uma intensificação de estímulos no sítio de recompensa do cérebro, ativando as sensações de prazer e grande euforia (Cone, 1995). Uma simples dose de 1,2g pode ser letal na maioria dos casos, entretanto, farmacodependentes

podem fazer uso de 5 a 10g diariamente. Em contrapartida, doses de apenas 30mg podem ser fatais em pessoas susceptíveis (Moffat, 1986).

A curto prazo, diversos efeitos podem ser observados após administração de doses de 25 a 150mg: distúrbios no sono e no apetite, diminuição da sensação de fadiga, aumento do estado de vigília, hiperatividade motora, inquietação etc. (Silva & Odo, 1999). Com doses maiores, há a intensificação dos efeitos desagradáveis com o aparecimento de progressiva incoordenação motora, tremores, convulsões, taquicardia, hipertensão e midríase (Silva & Odo, 1999).

A cocaína bloqueia a recaptura de norepinefrina, dopamina e serotonina, monoaminas que comprometem nas funções de memória. As altas concentrações de monoaminas (especialmente dopamina) resultam em aumento do estado de alerta, bem-estar e euforia (Clauwaert *et al.*, 1996). Para compensar esse estado alterado provocado pela cocaína, o organismo diminui a síntese e liberação do neurotransmissor (Galloway, 1988). A subsequente depleção de monoaminas na pré-sinapse provoca uma série de efeitos indesejáveis ao usuário, como exaustão, irritabilidade, depressão e desconforto físico (Gawin, 1987); (Gawin, 1988); (Gawin & Ellinwood Jr., 1988); (Clauwaert *et al.*, 1996). O ciclo é responsável pelas propriedades de reforço do abuso da cocaína: usuários tendem a evitar esses efeitos buscando doses cada vez mais altas da droga, caracterizando a farmacodependência (Jatlow, 1987); (Tarr & Macklin, 1987); (Quandt *et al.*, 1988).

Alguns efeitos tóxicos estão diretamente relacionados à via de administração. Após aspiração intranasal freqüente do cloridrato de cocaína, podem ocorrer hiperemia reativa da mucosa nasal, infecções crônicas das cartilagens nasais, sinusite e perfuração do septo nasal devido às propriedades vasoconstritoras do fármaco (Jatlow, 1997). Complicações pulmonares estão relacionadas ao abuso na forma de *crack*, incluindo efeitos como bronqueolite obstrutiva, infiltração alveolar difusa, edemas

pulmonares e síndrome associada a dores torácicas. Através da administração intravenosa podem ocorrer a formação de abscessos no local da aplicação e flebites (Guimarães, 1999).

Uma das mais significantes conseqüências do abuso da cocaína é o desenvolvimento de patologia comportamental em usuários crônicos. Na forma mais extrema pode ocorrer psicose, caracterizada por paranóia, distúrbios na memória, perda de noção da realidade, ansiedade, comportamento estereotipado e alucinações auditivas, visuais e táteis (Ritz *et al.*, 1990).

Infartos no miocárdio têm sido relacionados com o uso de cocaína, mesmo em pacientes jovens com artérias coronarianas normais (Ritz *et al.*, 1990). Os complexos efeitos da cocaína no coração envolvem tanto a ação anestésica local como a inibição da recaptação de monoaminas (Ritz *et al.*, 1990). Como anestésico local a cocaína impede a condução do impulso nervoso por diminuir a permeabilidade da membrana celular aos íons sódio. No coração esse efeito gera arritmia, enquanto ações da norepinefrina, dopamina e serotonina no sistema nervoso central produzem taquicardia e vasoconstrição periférica (Ritz *et al.*, 1990).

A elevação aguda da pressão arterial decorrente da atividade simpatomimética da cocaína têm sido apontada como responsável pela ocorrência de acidente vascular cerebral (AVC). Áreas imperfeitas de fluxo sangüíneo foram observadas em usuários crônicos devido à ação vasoconstritora do fármaco (Madden *et al.*, 1990).

Hepatotoxicidade também têm sido relatada em decorrência da ação de intermediários eletrofílicos gerados durante a biotransformação n-oxidativa da cocaína. Esses intermediários se ligam covalentemente a proteínas celulares do fígado podendo causar sérios danos hepáticos (Kloss *et al.*, 1984).

A cocaína atravessa a barreira placentária e, desta forma, a sua utilização por mulheres durante o período gestacional é um fator bastante preocupante em relação à saúde do neonato. Baixo peso, gestação mais curta, anormalidades genito-urinárias e menor circunferência da cabeça têm sido verificados em recém-nascidos que sofreram exposição intra-uterina de cocaína (Chasnoff *et al.*, 1989). Durante as dez primeiras semanas de vida, recém nascidos têm apresentado alterações comportamentais, irritabilidade, tremores, hipersensibilidade e ciclos anormais de sono (Guimarães, 1999).

2.3. Aspectos analíticos

2.3.1. Técnicas analíticas

Métodos analíticos para a identificação de cocaína na urina e seu principal produto de biotransformação (benzoilecgonina) têm sido publicados, utilizando-se de técnicas imunológicas (Ramcharitar *et al.*, 1995); (Guimarães, 1998), cromatografia em camada delgada (Budd *et al.*, 1980); (Chasin & Lima, 1998), cromatografia em fase gasosa com detetor de ionização de chama (Von Minden & D'Amato, 1977); (Falk & Harrison, 1985); (Chasin & Lima, 1998) ou nitrogênio-fósforo (Froldi *et al.*, 1984); (Verebey & Depace, 1989) cromatografia líquida de alta eficiência (Balikova & Vecerkova, 1994); (Clauwaert *et al.*, 1996) e espectrometria de massa (Mulé & Casella, 1988); (Gerlits, 1993); (Aderjan *et al.*, 1993); (De Giovanni & Rossi., 1994); (Diamond *et al.*, 1996).

As técnicas mais utilizadas como triagem são as imunológicas (radioimunoensaio, enzimaímunoensaio, imunofluorescência polarizada) (Osterloch & Becker, 1990); (De la Torre *et al.*, 1997), cromatografia em camada delgada e cromatografia em fase gasosa (Wells *et al.*, 1988) (Alleyne *et al.*, 1991). A identidade de todos os fármacos detectados deve

ser confirmada por sistema composto por cromatografia em fase gasosa ou cromatografia líquida com espectrometria de massa (Wells *et al.*, 1988); (Osterloach & Becker, 1990); (Clark, 1990); (Alleyne *et al.*, 1991); (Goldberger & Cone, 1994); (De La Torre *et al.*, 1997).

2.3.2. Extração de cocaína e benzoilecgonina de urina

A extração e identificação da cocaína presente na urina não apresentam grandes dificuldades técnicas durante a análise. A substância é altamente solúvel na maioria dos solventes orgânicos e não apresenta problemas de adsorção em colunas de cromatografia em fase gasosa (Graas & Watson, 1978). Garside *et al.* (1997) desenvolveram uma técnica rápida de extração líquido-líquido de cocaína em urina para posterior identificação por espectrometria de massa associada à cromatografia em fase gasosa. Segundo estes autores, a presença da cocaína na urina poderia ser usada como marcador de uso recente da droga. Cone *et al.* (1998) verificaram que a concentração urinária de cocaína decaía rapidamente abaixo de 1ng/mL em 24 horas após administração única de 25mg (intravenosa), 32mg (intranasal) ou 42 mg (fumada).

Alguns pesquisadores defendem que a identificação cromatográfica de éster metilecgonina e cocaína poderia servir para confirmar resultados positivos de amostras analisadas por técnicas imunológicas, as quais detectam somente benzoilecgonina (Kogan *et al.* 1977); (Ambre *et al.*, 1984); (Clark & Hajar, 1987). Entretanto, num estudo realizado para confirmar resultados positivos de ensaios imunológicos em urina (n=246), 100% continham benzoilecgonina, 79% apresentavam éster metilecgonina e somente 27% continham cocaína (Mulé & Casella, 1988). Num estudo semelhante, Ramcharitar *et al.* (1995) relataram que em 72% de casos positivos confirmados para o uso de cocaína, os valores de concentração de benzoilecgonina na urina excediam os de éster metilecgonina.

Portanto, devido à sua longa meia-vida de eliminação, a benzoilecgonina permanece detectável na urina por períodos maiores que a cocaína e a éster metilecgonina (Ambre, 1985), sendo então o principal indicador de exposição à droga (Cone *et al.*, 1988); (Ellerbe *et al.*, 1992).

Todavia, o grande problema para os analistas é que as propriedades físico-químicas da benzoilecgonina dificultam sua extração da matriz biológica, fase necessária para a aplicação de técnicas cromatográficas. A benzoilecgonina é altamente polar e hidrossolúvel e não é facilmente extraída empregando-se solventes orgânicos em extrações líquido-líquido (Hamilton *et al.*, 1977); (Jain *et al.*, 1977); (Graas & Watson, 1978). Grandes volumes de solventes (representando cerca de 5-25 vezes o volume de amostra) ou extrações sucessivas são necessárias para produzir razoável índice de recuperação da urina (56-70%) (Wallace *et al.*, 1976); (Jain *et al.*, 1977); (Foldi *et al.*, 1984); (Mulé & Casella, 1988); (Verebey & Depace, 1989); (Gerlits, 1993).

Apesar da adição de álcoois como etanol ou isopropanol aumentarem a eficiência da extração de benzoilecgonina, esse procedimento também aumenta a extração de substâncias endógenas tipicamente presentes na urina, provocando interferências e possibilitando a contaminação de detetores utilizados em cromatografia em fase gasosa (Verebey & Depace, 1989); (Jennison *et al.*, 1994).

Por se tratar de composto com propriedades anfóteras, a eficiência da extração líquido-líquido também é independente do pH, pois em qualquer meio ele se apresenta na forma ionizada (Wallace *et al.*, 1975); (Balikova & Vecerkova, 1994).

Saturação da urina com sulfato de sódio, cloreto de sódio ou sulfato de amônio também produz ligeiro aumento na recuperação absoluta, contudo, a extração de interferentes naturais presentes na urina nega a efetividade desse procedimento (Wallace *et al.*, 1975); (Jain *et al.*, 1977).

Para contornar esse problema, alguns autores preconizam a utilização de uma fase de re-extração após derivação da benzoilecgonina, com o objetivo de remover interferências da amostra (Wallace *et al.*, 1976) (Von Minden & D'Amato., 1977); (Griesemer *et al.*, 1983); (Joern, 1987).

Nos últimos anos, devido a sua maior eficácia, a extração em fase sólida tem sido preferível na análise de benzoilecgonina na urina (Matsubara *et al.*, 1984); (Ellerbe *et al.*, 1992); (Aderjan *et al.*, 1993); (Anderson & Nixon, 1993); (Jennison *et al.*, 1994); (Virag *et al.*, 1994); (De Giovanni & Rossi, 1994); (Crouch *et al.*, 1995); (Diamond *et al.*, 1996); (Crouch, 1998). Procedimentos analíticos mais rápidos, maior índice de recuperação e menor quantidade de interferentes foram relatados após a utilização desse método de extração (Jeffcoat *et al.*, 1989); (Crouch *et al.*, 1995).

Apesar desse fato, alguns desses métodos ainda utilizam uma combinação da extração em fase sólida com extração líquido-líquido após derivação da benzoilecgonina, na tentativa de obter extratos mais limpos para análise (Matsubara *et al.*, 1984); (Virag *et al.*, 1994).

Recentemente, foi desenvolvido um novo tipo de fase sólida, visando a análise de fármacos de abuso e/ou seus produtos de biotransformação na urina. Esses cartuchos de extração contém grupos não polares C_8 e grupos trocadores catiônicos (ácido benzeno sulfônico). Os analitos são fortemente retidos no adsorvente pela combinação de forças de *Coulomb* e interações não polares o que permite uma série de lavagens aquosas e com solventes orgânicos (Chasin, 1996); (Clauwaert *et al.*, 1996). Com o resultado desse procedimento obtém-se extratos mais 'limpos' e com boa recuperação do analito, características altamente desejáveis em técnicas cromatográficas.

2.3.3. Reações químicas de derivação de benzoilecgonina

Volatilidade e estabilidade térmica são propriedades físico-químicas necessárias para análise de uma substância por cromatografia em fase gasosa (Pfleger *et al.*, 1992); (Segura *et al.*, 1998). Para compostos polares ou termolábeis, uma etapa de derivação é necessária para análise por essa técnica.

Os procedimentos mais comuns de derivação de benzoilecgonina são aqueles que geram silil-derivados ou alquil-derivados. A cocaína não possui grupos químicos funcionais na molécula para que possa ser derivada, mas o grupo ácido carboxílico presente na benzoilecgonina é o alvo das reações de derivação.

Silil-derivados em geral são formados quando átomos de hidrogênio (em grupos -OH ou -NH) são substituídos por um grupo alquil-silil. A capacidade de vários grupos funcionais para formar silil-derivados segue a seguinte ordem: álcoois > fenóis > ácidos carboxílicos > aminas > amidas (Segura *et al.*, 1998). Para análise de benzoilecgonina, o procedimento mais comum é a formação de trimetilsilil-derivados em reações com *bis*-trimetilsililtrifluoroacetamida (BSTFA), *n*-metil-*n*-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) e *bis*-trimetilsililacetamida (BSA) (Kogan *et al.*, 1977); (Ellerbe *et al.*, 1992); (Anderson & Nixon, 1993); (Jennison *et al.*, 1994). A utilização de BSTFA com 1% de trimetilclorosilano (TCMS) como agente catalisador também é citada na literatura (De Giovanni & Rossi, 1994); (Cone *et al.*, 1994); (Diamond *et al.*, 1996).

T-Butildimetilsilil-derivados (TBDMS) de benzoilecgonina são compostos com maior estabilidade hidrolítica que os correspondentes trimetilsilil-derivados (Chrouch *et al.*, 1995); (Segura *et al.*, 1998). *N*-metil-*n*-(*t*-butildimetilsilil) trifluoroacetamida (MTBSTFA) é o reagente que doa o

grupo TBDMS, podendo ser utilizado juntamente com 1% de *t*-butildimetilclorosilano (TBDMS) como catalisador (Gerlitz, 1993).

A alquilação consiste na substituição de um hidrogênio (em grupos –OH ou –NH) por um grupo alquila. Muitos reagentes e métodos para preparar alquil-derivados de benzoilecgonina têm sido descritos. Hexafluoroisopropanol (HFIP) ou pentafluoropropanol (PFP), juntamente com anidrido pentafluoropropiônico (PFPA) reagem com o grupo funcional carboxílico gerando os respectivos ésteres halogenados (Mulé & Casella, 1988); (Verebey & Depace, 1989); (Bodor *et al.*, 1990); (Gonzales *et al.*, 1995). Para análise por GC/MS, Bodor *et al.* (1990) relataram substancial variação (CV=50%) na abundância do íon molecular relativo ao íon base quando a benzoilecgonina era derivada com PFP/PFPA. Para corrigir essa variação, os autores propuseram a normatização da abundância dos íons formados com os correspondentes íons deuterados. A estabilidade do pentafluoropropil-derivado parece não exceder 48 horas e desta forma recomenda-se que a injeção seja feita no máximo em 24 horas após a reação (Mulé & Casella, 1988). Já o hexafluoroisopropil-derivado de benzoilecgonina é estável por pelo menos quatro dias se mantido a –20°C (Aderjan *et al.*, 1993).

Dimetilformamida-dialquilacetal reage com ácidos carboxílicos, fenóis e tióis para formar os respectivos alquil-derivados. Os reagentes são sensíveis à umidade e portanto a reação deve ser realizada em condições anidras (Segura *et al.*, 1998). Alguns métodos empregando esse reagente foram publicados, com a geração do *n*-alquil éster correspondente de benzoilecgonina (Koontz *et al.*, 1973); (Jain *et al.*, 1977); (Chinn *et al.*, 1980); (Matsubara *et al.*, 1984); (Paul *et al.*, 1996).

O método de "solvente extrativo de alquilação" é utilizado para extrair e derivar simultaneamente compostos ácidos carboxílicos e sulfonamidas (Segura *et al.*, 1998) e também tem sido empregado na análise cromatográfica de benzoilecgonina urinária (Graas & Watson, 1978); (Joern,

1987). O composto ácido é extraído como um par iônico com um amônio quaternário em um solvente apropriado (geralmente diclorometano) e a reação de alquilação ocorre na fase orgânica com um halogeneto de alquila (Segura *et al.*, 1998).

Em outros procedimentos de derivação de benzoilecgonina citados na literatura, halogenetos de alquila, principalmente iodoalcanos (iodometano, iodoetano, iodopropano, iodobutano) têm sido empregados isoladamente ou em conjunto com TMAH/TMPAH ou THA (Graas & Watson, 1978); (Falk & Harisson, 1985); (Joern, 1987); (Liu *et al.*, 1989); (Needleman *et al.*, 1991); (Aderjan *et al.*, 1993); (Ramcharitar *et al.*, 1995).

A alquilação de ácidos carboxílicos também pode ser realizada por esterificação com álcoois. Metanol ou etanol na presença de ácido sulfúrico como catalisador têm sido usados para formar metil ou etil ésteres de benzoilecgonina (Wallace *et al.*, 1976); (Griesemer *et al.*, 1983).

Diazoalcanos também são utilizados na alquilação de grupos funcionais como ácidos carboxílicos, fenóis e enóis (Segura *et al.*, 1998). A reação de ácidos com diazometano é um bom método de preparação de ésteres metílicos em pequenas quantidades, pois ocorre em condições brandas com excelente rendimento (Allinger *et al.*, 1978). Diazometano é o diazoalcano mais freqüentemente utilizado e na reação com benzoilecgonina gera como produto a cocaína. Essa reação de metilação é a recomendada por Pflieger *et al.* (1992) para compostos que contenham um grupo ácido carboxílico na molécula e é utilizada por alguns autores para derivação de benzoilecgonina (Froldi *et al.*, 1984); (Ambre *et al.*, 1988); (Pflieger *et al.*, 1992).

A reação do diazometano com a função ácido carboxílico da benzoilecgonina ocorre em duas fases. Primeiramente ocorre a transferência de um próton ácido da benzoilecgonina para o diazometano (Fase 1). Essa reação produz o íon carboxilato, que é um excelente nucleófilo, e um substrato ao qual está ligado o melhor grupo de saída

conhecido, o nitrogênio (Allinger *et al.*, 1978). Em seguida ocorre a formação de uma nova ligação carbono-oxigênio e a liberação do gás nitrogênio (Fase 2). O resultado é a metilação da benzoilecgonina formando a metilbenzoilecgonina (cocaína). A Figura 3 ilustra a reação da benzoilecgonina com o diazometano, adaptada a partir de Allinger *et al.* (1978).

FIGURA 3 - Etapas da reação do diazometano com benzoilecgonina formando cocaína.

Na Tabela 1 são apresentados os principais reagentes empregados na derivação de benzoilecgonina e os respectivos derivados gerados pela reação.

TABELA 1 – Principais reagentes utilizados na derivação de benzoilecgonina e os respectivos derivados formados.

Estrutura química do derivado de benzoilecgonina

Reagentes	Grupo substituinte -R	Observações	Referência
MSTFA	- Si (CH ₃)	-Derivado sensível à umidade.	Segura <i>et al.</i> , 1998
BSTFA		-Reação deve ser realizada sob condições anidras.	
BSA			
MTBSTFA	- Si (CH ₃) ₂ C(CH ₃) ₃	-Produto mais estável que o trimetilsilil-derivado.	Crouch <i>et al.</i> , 1995
PFP/PA/PFP	- CH ₂ CF ₂ CF ₃	-Estabilidade do derivado não excede 48 horas.	Mulé & Casella, 1988
HFIP/PFP	- CHCF ₃ CF ₃	-Estável por 4 dias a -20°C.	Aderjan <i>et al.</i> , 1993
DMF-	- CH ₃	-Necessitam de uma fase de purificação do produto formado.	Paul <i>et al.</i> , 1996
dialquilacetal	- CH ₂ CH ₃		
Iodoalcanos	- CH ₂ CH ₂ CH ₃		Liu <i>et al.</i> , 1989
	- CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃		
Metanol/ ácido sulfúrico	- CH ₃	-Necessita de uma fase de purificação.	Wallace <i>et al.</i> , 1976
Etanol/ ácido sulfúrico	- CH ₂ CH ₃	-Necessita de uma fase de purificação.	Griesemer <i>et al.</i> , 1983
Diazometano	- CH ₃	-Reação ocorre em condições brandas com excelente rendimento.	Allinger <i>et al.</i> , 1978

2.3.4. Cromatografia em fase gasosa/ espectrometria de massa (GC/MS)

A espectrometria de massa é a técnica de escolha para confirmação de análises de drogas de abuso, recomendada pela maioria dos órgãos internacionais envolvidos no assunto (Chasin & Lima., 1998). No entanto, a cromatografia em fase gasosa associada à espectrometria de massa é uma técnica complexa, cuja aplicação requer um alto nível de conhecimento e experiência para operação do instrumento e interpretação dos resultados (Christophersen & Morland, 1994).

O GC/MS pode ser operado em modo *Full Scan* para gerar o espectro completo da substância e a melhor informação para identificação. A utilização de um sistema de pesquisa em banco de dados com espectros (*library*) é recomendado para identificar compostos desconhecidos (Christophersen & Morland, 1994). O Monitoramento Seletivo de Íons (SIM) é normalmente empregado para confirmação de resultados positivos na triagem, e nesse modo o instrumento é selecionado para monitorar dois, três ou mais fragmentos específicos da substância a ser analisada (Maurer, 1992). No modo SIM, o espectrômetro de massa é capaz de detectar concentrações bem menores de substância do que quando o equipamento está selecionado no modo *Full Scan*.

Impacto de Elétrons e Ionização Química são as técnicas utilizadas para a fragmentação de substâncias na fonte do espectrômetro de massa. Impacto de elétrons é a técnica mais utilizada (Maurer, 1992) por promover uma maior fragmentação da molécula do que a Ionização Química propiciando mais informações para identificação (Christophersen & Morland, 1994). A Ionização Química geralmente produz menor fragmentação com íons específicos em alta intensidade que podem ser favoráveis como técnica de quantificação. Devido à menor fragmentação da substância em ionização

Química, o íon molecular pode ser detectado (Christophersen & Morland, 1994).

Quando o GC/MS é utilizado para quantificação, o uso de padrões internos deuterados é recomendado. A confiabilidade do método aumenta quando se usa um composto com a mesma recuperação analítica, tempo de retenção e fragmentação semelhantes ao composto de interesse (Maurer, 1992).

Para análise de cocaína e benzoilecgonina por GC/MS, o modo de fragmentação por Impacto de Elétrons e Monitoramento Seletivo de Ions são as formas mais utilizadas.

Na Tabela 2 estão resumidos alguns procedimentos analíticos empregados por diversos autores para detecção de cocaína e/ou benzoilecgonina em urina, utilizando a técnica de cromatografia em fase gasosa/ espectrometria de massa.

TABELA 2 - Métodos para identificação de cocaína e/ou benzoilecgonina em urina por cromatografia em fase gasosa/espectrometria de massa (GC/MS).

Autor (ano)	Analito	Vol. de amostra	Extração	Vol. / solvente	Agente de derivação	Observações
Garside (97)	COC	1mL	líq-líq	2ml – éter de petróleo		REC=48,8% LD=5ng/mL Monitoramento Seletivo de Íons
Diamond (96)	BE	1mL	SPE - Bond Elut Certify		BSTFA 1% TMCS	REC=100%
Paul (96)	BE	N/C	SPE - Clean Screen DAU		DMF- dipropilacetal	-Presença de pindina na derivação
Crouch (95)	COC BE	1mL	SPE - Clean Screen ZSDAU020		MTBSTFA	REC=80% Ionização Química
Ramcharitar (95)	BE	N/C	líq-líq	N/C - clorofórmio/ metanol (8:2)	Iodobutano	Monitoramento Seletivo de Íons

Continuação da Tabela 2

Autor (ano)	Analito	Vol. de amostra	Extração	Vol. / solvente	Agente de derivação	Observações
Giovanni (94)	COC BE	0,5mL	SPE - C-18		BSTFA 1% TMCS	REC (COC)=92% REC (BE)=97% Monitoramento Seletivo de Íons -Detecta 50ng/mL
Cone (94)	COC BE	0,5-1mL	SPE - Clean Screen ZSDAU020		BSTFA 1% TMCS	REC (COC e BE) = 95% LD = 1,0ng/mL Monitoramento Seletivo de Íons
Jennison (94)	BE	2mL	SPE - Clean Screen CSDAU303		BSTFA	REC=70% Monitoramento Seletivo de Íons
Jennison (94)	BE	2mL	líq-líq	5mL - clorofórmio/ etanol (8:2)	BSTFA	REC=70% Monitoramento Seletivo de Íons -Grande quantidade de interferentes
Anderson (93)	BE	5mL	SPE - Drug Clean		MSTFA	REC=74,5% Monitoramento Seletivo de Íons
Gerlitz (93)	BE	0,5mL	líq-líq	4mL - diclorometano	MTBSTFA 1% TBDMCS	REC=67-69% Monitoramento Seletivo de Íons -Detecta 150ng/mL

Continuação da Tabela 2

Autor (ano)	Analito	Vol. de amostra	Extração	Vol. / solvente	Agente de derivação	Observações
Aderjan (93)	COC BE	1mL	SPE - C-18		Iodometano ou PFPA/HFIP	REC (COC) = 95% REC (BE) = 87% LD = 40ng/mL Monitoramento Seletivo de Íons
Ellerbe (92)	BE	5mL	SPE - Bond Elut Certify		BSA	REC=76%
Needleman (91)	BE	3mL	líq-líq	5ml - diclorometano/etanol (1:1)	Iodopropano TMAH/DMSO/ TMPAH	REC=98% -Fase de reextração após derivação
Liu (89)	BE	3mL	SPE - Du Pont PREP type W		Iodopropano TMAH/DMSO/ TMPAH	Monitoramento Seletivo de Íons
Mulé (88)	COC BE	0,2mL	líq-líq		PFPA/PFP	REC (COC) = 82% REC (BE) = 76% LD (COC e BE) = 12,5ng/mL Monitoramento Seletivo de Íons

Continuação da Tabela 2

Autor (ano)	Analito	Vol. de amostra	Extração	Vol. / solvente	Agente de derivação	Observações
Joern (87)	BE	0,5mL	líq-líq	2,5mL - diclorometano	Iodopropano THA	REC = 70% LD = 34ng/mL Monitoramento Seletivo de Íons -Utilização de solvente extrativo de alquilação.
Taylor (87)	COC BE	5mL	SPE - XAD-2		MSTFA	REC (COC e BE) = 75-80% sensibilidade (COC e BE) = 50ng/mL
Matsubara (84)	COC BE	10mL	líq-líq - Extrelut		DMF – dipropilacetato	REC (COC) = 95% REC (BE) = 81% sensibilidade (COC e BE) = 1ng/mL Ionização Química Monitoramento Seletivo de Íons -Fase de reextração após derivação.
Griesemer (83)	COC BE	5mL	líq-líq	25mL - clorofórmio/ etanol (8:2)	etanol/ácido sulfúrico (2:1)	REC (COC) = 91% REC (BE) = 65% sensib (COC e BE) = 15ng/mL -Fase de lavagem e reextração

Continuação da Tabela 2

Autor (ano)	Analito	Vol. de amostra	Extração	Vol. / solvente	Agente de derivação	Observações
Graas (78)	BE	2mL	líq-líq	5mL - diclorometano	Iodoetano THA	REC=70% -Utilização de solvente extrativo de alquilação

Vol de amostra = Volume de amostra

Vol./solvente = Volume e solvente utilizado na extração

COC=cocaína

BE=benzoilecgonina

líq-líq=extração líquido-líquido

REC=recuperação do método

LD=limite de detecção

SPE=*Solid Phase Extraction* – extração em fase sólida

N/C = nada consta

BSTFA= *Bis*-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida

TMCS=trimetilclorosilano

MTBSTFA=*n*-metil-*n*-(*t*-butildimetilsilil)trifluoroacetamida

TBDMCS=*t*-butildimetilclorosilano

PFP=anidrido pentafluoropropiônico

PFP=pentafluoropropanol

HFIP=hexafluoroisopropanol

DMSO=dimetilsulfóxido

TMAH=Hidróxido de tetrametilamônio

THA=Tetrahexilamônio

2.3.5. Cromatografia em fase gasosa (GC)

A cromatografia em fase gasosa é uma técnica bastante utilizada em Toxicologia Analítica por apresentar uma série de vantagens: boa sensibilidade e especificidade, possibilidade de se detectar várias substâncias numa mesma análise e ter um custo acessível.

Para a análise de benzoilecgonina urinária são utilizados procedimentos de derivação química que aumentam sua volatilidade e melhoram o limite de detecção. Reações de alquilação, com a formação dos derivados butilbenzoilecgonina, propilbenzoilecgonina, etilbenzoilecgonina (cocaetileno) ou metilbenzoilecgonina (cocaína) são as mais utilizadas.

Embora exista na literatura um trabalho que relata a utilização de BSTFA como agente de derivação (Kogan *et al.*, 1977), a formação de sili-derivados de benzoilecgonina não é desejável, pois há perda de sensibilidade na técnica de cromatografia em fase gasosa (Jain *et al.*, 1977); (Verebey & Depace, 1989).

O detector mais utilizado é o de ionização de chama (FID), entretanto o detector de nitrogênio/fósforo (NPD) é preferível por ser mais seletivo, reduzindo a possibilidade de interferentes (Verebey & Depace, 1989). Um resumo de métodos para a identificação de benzoilecgonina e cocaína em urina, utilizando a cromatografia em fase gasosa é apresentado na Tabela 3.

TABELA 3- Métodos para identificação de cocaína e/ou benzoilecgonina em urina por cromatografia em fase gasosa (GC).

Autor (ano)	Analito	Detetor	Vol. De amostra	Extração	Vol. / solvente	Derivação	Observações
Chasin (98)	COC BE	FID	2mL	líq-líq	10mL-clorofórmio/ isopropanol (9:1)		-fase de lavagem e reextração
Verebey (89)	BE	NPD	0,2mL	líq-líq	5mL – clorofórmio/ isopropanol (95:5)	PFP/PFPA	REC = 56,4% LD = 125ng/mL
Ambre (88)	BE	NPD	0,5mL	líq-líq	N/C – diclorometano / isopropanol (3:1)	diazometano	-metilação da benzoilecgonina ocorre na urina
Falk (85)	BE	FID	5mL	líq-líq	25mL – clorofórmio/ etanol (75:25)	iodobutano TMAH/TMPAH	-detecta 300ng/mL
Froldi (84)	COC BE	NPD	1mL	líq-líq	Extrelut	Diazometano	LD = 100ng/mL
Griesemer (83)	COC BE	NPD	5mL	líq-líq	25mL – clorofórmio / etanol (8:2)	etanol / ácido sulfúrico	REC (COC) = 91% REC (BE) = 65% -fase de reextração do produto derivado -sensibilidade = 15ng/mL

Continuação da Tabela 3

Autor (ano)	Analito	Detetor	Vol. De amostra	Extração	Vol. / solvente	Derivação	Observações
Von Minden (77)	COC BE	FID	5mL	líq-líq	25mL – clorofórmio / etanol (75:25)	Iodopropano TMAH/TMPAH	REC (COC) = 99% REC (BE) = 80% -sensibilidade (COC e BE) = 0,2µg/mL -fase de lavagem e reextração após derivação.
Kogan (77)	COC BE	FID	1mL	líq-líq	7mL – clorofórmio / etanol (8:2)	BSTFA	-sensibilidade (COC) = 500ng/mL -sensibilidade (BE) = 1000ng/mL
Jain (77)	COC BE	FID	10mL	líq-líq	30mL – clorofórmio / isopropanol (95:5)	DMF- dialquilacetil	REC (COC e BE) = 70%
Wallace (76)	COC BE	FID	5mL	líq-líq	25mL – clorofórmio / etanol (8:2)	ácido sulfúrico / metanol	REC (COC) = 93% REC (BE) = 65% -fase de lavagem e reextração após derivação

Continuação da Tabela 3

Autor (ano)	Analito	Detetor	Vol. De amostra	Extração	Vol. / solvente	Derivação	Observações
Koontz (73)	BE	FID	10mL	líq-líq	10mL - etanol	DMF- dimetilacetil	-requer extensa etapa de purificação por TLC -detecta 1000ng/mL

Vol./solvente=Volume e solvente utilizado na extração
 Líq-líq=extração líquido
 SPE = Solid Phase Extraction – extração em fase sólida
 COC=cocaína
 BE=benzoilecgonina
 N/C=nada consta

REC=recuperação do método
 LD=limite de detecção
 TMAH=hidróxido de tetrametilamônio
 TMPAH =hidróxido de trimetilfenilamônio
 BSTFA=bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida

2.3.6. Cromatografia em Camada Delgada (TLC)

A cromatografia em camada delgada é uma técnica versátil de triagem para uma série de fármacos e seus produtos de biotransformação (Moffat, 1986). As substâncias são separadas de acordo com sua afinidade química pelo sistema solvente (fase móvel) e o material de recobrimento da placa de TLC (Moffat, 1986). A possibilidade de se detectar múltiplas substâncias em várias amostras simultaneamente e o baixo custo do material utilizado são as principais vantagens dessa técnica (Crouch, 1998). Outra característica é que os resultados são qualitativos e a TLC não apresenta boa sensibilidade para muitos fármacos e seus produtos de biotransformação, como no caso da benzoilecgonina (Jain *et al.*, 1977).

Uma evolução da cromatografia em camada delgada são as placas de cromatografia em camada delgada de alta eficiência (HPTLC) que são confeccionadas com granulações mais finas e homogêneas, possibilitando menor tempo de análise, melhor resolução cromatográfica e detecção de concentrações menores que aquelas observadas nas placas tradicionais (Chasin & Lima, 1998).

Na Tabela 4 estão resumidos alguns procedimentos empregados por alguns autores para detecção de cocaína e/ou benzoilecgonina em urina, utilizando a técnica de cromatografia em camada delgada (TLC) ou a cromatografia em camada delgada de alta eficiência (HPTLC).

TABELA 4 - Métodos para identificação de cocaína e/ou benzoilecgonina em urina por cromatografia em camada delgada (TLC) e cromatografia em camada delgada de alta eficiência (HPTLC).

Autor (ano)	Analito	Técnica	Vol. amostra	Extração	Vol. / solvente	Sistema solvente	Revelador	Observações
Chasin (98)	COC BE	HPTLC	5mL	líq-líq	25mL- clorofórmio/ etanol (80:20)	A) Clorofórmio / metanol (1:1) B) Cicloexano/ tolueno/ dietilamina (75:15:10)	A) reativo de iodoplatinato B) reativo de iodoplatinato fortemente ácido	LD (COC) = 200ng/mL
Chasin (90)	COC BE	TLC	5mL	líq-líq	25mL- clorofórmio/ etanol (80:20)	A) clorofórmio/ metanol (1:1) B) cicloexano/ tolueno/ dietilamina (75:15:10)	A) reativo de Dragendorff iodado B) reativo de iodoplatinato fortemente ácido	LD (COC) = 0,5µg/mL LD (BE) = 10µg/mL

Continuação da Tabela 4

Autor (ano)	Analito	Técnica	Vol. amostra	Extração	Vol. / solvente	Sistema solvente	Revelador	Observações
Kogan (89)	COC BE	HPTLC	3-10mL	SPE-Clean Screen DAU131 ou DAU303		Acetato de etila/ Diclorometano/ Amônia/ Metanol (3:1:0,6:3)	Reagente de Ludy Tenger	
Budd (80)	BE	TLC	15mL	líq-líq	20mL – clorofórmio/ isopropanol (95:5)	Hexano/ clorofórmio/ Dietilamina (80:10:10)	Iodoplatina ácida	LD (metilação da BE) = 2,0µg/mL LD (sem metilação) = 10,0µg/mL
Wallace (75)	COC BE	TLC	5mL	líq-líq	25mL – clorofórmio/ etanol (8:2)	Clorofórmio/ Metanol/ Amônia (100:20:1)	Dragendorff iodado + H ₂ SO ₄ + I ₂	LD (COC) = 0,1µg/mL LD (BE) = 0,25µg/mL

Vol.de amostra=Volume de amostra utilizado, Vol./solvente = volume e solvente utilizado na extração, COC=cocaína, BE=benzoilecgonina, líq-líq=extração líquido-líquido, LD=limite de detecção, SPE=Solid Phase Extraction – extração em fase sólida

3. OBJETIVO E PLANO DE TRABALHO

O objetivo do trabalho foi o estudo da transformação da benzoilecgonina urinária em cocaína através da utilização do diazometano como agente metilante e sua aplicação na verificação da exposição à cocaína pelas técnicas: espectrometria de massa associada à cromatografia em fase gasosa (GC/MS), cromatografia em fase gasosa com detetor de nitrogênio-fósforo (GC/NPD) e cromatografia em camada delgada de alta eficiência (HPTLC).

Para alcançar tal objetivo, foi elaborado o seguinte plano de trabalho:

- Pesquisa bibliográfica referente a técnicas de extração de benzoilecgonina de urina e reações químicas de derivação utilizadas para análise dessa substância.

- Padronização das técnicas de extração e de derivação da benzoilecgonina urinária.

- Padronização das técnicas de cromatografia em camada delgada de alta eficiência, cromatografia em fase gasosa e cromatografia em fase gasosa associada à espectrometria de massa para identificação de cocaína.

- Aplicação dos métodos padronizados em amostras de urina provenientes de usuários de cocaína.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Equipamentos e acessórios

-Espectrômetro de massa *FISONS* modelo TRIO 1000 associado a um aparelho de cromatografia em fase gasosa *Carlo Erba* modelo 8000 equipado com coluna capilar de sílica fundida 5% fenilmetilsilicone (CP-Sil-8 *Chrompack*) com as seguintes dimensões: 15m x 0,25mm x 0,10 μ m.

-Aparelho de cromatografia em fase gasosa *Hewlett Packard* modelo 5890 série II, equipado com detector específico de nitrogênio-fósforo e coluna capilar de sílica fundida 5% fenilmetilsilicone (HP Ultra 2) com as seguintes dimensões: 25m x 0,2mm x 0,33 μ m.

-Integrador *Hewlett Packard* modelo 3396 série II.

-Gases especiais para cromatografia em fase gasosa: nitrogênio, hidrogênio e hélio (*Air Products*).

-Bloco de aquecimento com sistema de evaporação (*Pierce*).

4.1.2. Soluções-padrão

Soluções-padrão de benzoilecgonina, cocaína e isopropilbenzoilecgonina (padrão interno) foram obtidas da *Radian International* na concentração de 1mg/mL em acetonitrila.

A partir dessas soluções, foram preparadas soluções de trabalho em acetonitrila nas concentrações de 100µg/mL e 10µg/mL de cada substância.

4.1.3. Reagentes e outros materiais

4.1.3.1. Reagentes e materiais utilizados na extração

-Metanol, diclorometano, isopropanol, hidróxido de amônio e sulfato de sódio foram de grau p.a. da *Merck*.

-Tampão fosfato 0,1M: 13,61g de KH_2PO_4 (fosfato de potássio monobásico) foram dissolvidos em 900mL de água destilada. O pH (6,0) foi ajustado com KOH 1M.

-Fita de pH (*Merck*).

-Coluna de extração em fase sólida *Bond Elut Certify* (*Varian*).

-Sistema de vácuo para extração em fase sólida (*Supelco*).

4.1.3.2. Reagentes utilizados para a preparação do diazometano

-Sal de *p*-tolilsulfonilmetilnitrosamina (*Fluka*).

-Etanol, hidróxido de potássio, éter etílico(*Merck*) .

Em um balão volumétrico de 125mL são dissolvidos 1,07g de *p*-tolilsulfonilmetilnitrosamina em 15mL de éter, adicionando aos poucos, em gelo. Sobre essa, adiciona-se uma solução de 0,2g de KOH em 5mL de etanol 98%. Após 5 minutos destila-se a solução etérea em manta térmica a 60-65°C. Esse procedimento fornece um rendimento de aproximadamente 15mL de solução etérea contendo 0,16 a 0,18g de diazometano (Vogel, 1989).

4.1.3.3. Solventes, agente cromogênico, cromatoplaca

Acetato de etila, cicloexano, hidróxido de amônio, diclorometano, metanol, hexano, clorofórmio, dietilamina, clorofórmio e tolueno. Todos de grau p.a. da *Merck*.

-Reativo de Dragendorff iodado (DI):

10mL de solução aquosa de iodeto de potássio a 40%, 10mL de solução 1N de nitrato de bismuto em ácido acético glacial a 20%, 80mL de ácido sulfúrico a 10%, 2g de iodo ressublimado (Moffat, 1986).

-Placas cromatográficas de sílica gel 60 F₂₅₄ de alta eficiência com dimensões de 10 x 10 cm (art. 1.05628 - *Merck*).

4.1.4. Amostras de urina

4.1.4.1. Amostras de referência negativa

Amostras de referência negativa foram obtidas de voluntários que não fizeram uso de cocaína.

4.1.4.2. Amostras de referência positiva para benzoilecgonina na concentração de 150ng/mL e 300ng/mL

Para a técnica confirmatória de cromatografia em fase gasosa/espectrometria de massa (GC/MS), foi utilizada como referência positiva, amostra de urina contendo benzoilecgonina na concentração de 150ng/mL (2,5mL de amostra de referência negativa adicionada de 37,5μL da solução-padrão de benzoilecgonina na concentração de 10μg/mL).

Para as técnicas de triagem (GC/NPD e HPTLC), foi utilizada como referência positiva, amostra de urina contendo benzoilecgonina na concentração de 300ng/mL (2,5mL de amostra de referência negativa adicionada de 75 μ L da solução-padrão de benzoilecgonina na concentração de 10 μ g/mL).

4.1.4.3. Amostras de urina de usuários de cocaína

Amostras de usuários de cocaína (n=20), analisadas previamente por Imunofluorescência Polarizada (FPIA) foram obtidas no Laboratório de Análises Toxicológicas do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas/FCF/USP.

4.2. Métodos

4.2.1. Derivação com diazometano

4.2.1.1. Estudo do tempo de reação necessário para derivação de benzoilecgonina com diazometano

Alíquotas de 75 μ L da solução padrão de benzoilecgonina a 100 μ g/mL e 75 μ L da solução 100 μ g/mL de isopropilbenzoilecgonina foram submetidas à evaporação sob fluxo de nitrogênio a 40°C até secar total em frascos de derivação. Em cada frasco foram adicionados 100 μ L da solução etérea de diazometano e mantidos à temperatura ambiente sob os seguintes tempos de reação: 1, 5, 10 e 15 minutos. As reações foram conduzidas em triplicata para cada intervalo de tempo mencionado. Em seguida, o excesso de reagentes (diazometano e éter) foi evaporado sob fluxo de nitrogênio a 40°C e os resíduos ressuspensos em 1mL de metanol. Dessa solução, 1 μ L foi

injetado no GC/MS em modo SCAN. A razão de áreas formadas pelos fragmentos 182 (cocaína) e 210 (isopropilbenzoilecgonina) foi calculada para cada tempo de reação.

4.2.1.2. Eficiência da transformação da benzoilecgonina em cocaína

Alíquotas de 75 μ L (n=6) da solução padrão de benzoilecgonina a 100 μ g/mL e 75 μ L da solução 100 μ g/mL de isopropilbenzoilecgonina foram submetidas à evaporação sob fluxo de nitrogênio a 40°C até secura total em frascos de derivação silanizados. Em cada frasco foram adicionados 100 μ L da solução etérea de diazometano e mantidos à temperatura ambiente sob o melhor tempo de reação verificado em 4.2.1.1. Em seguida, o excesso de reagentes foi evaporado sob fluxo de nitrogênio a 40°C e os resíduos ressuspensos em 1mL de metanol. Dessa solução, 1 μ L foi injetado no GC/MS em modo SCAN. A relação de áreas formadas pelo fragmento 182 e 210 foi calculada para cada replicata.

Em paralelo, alíquotas de 75 μ L (n=6) da solução padrão de cocaína a 100 μ g/mL e 75 μ L da solução 100 μ g/mL de isopropilbenzoilecgonina também foram submetidas à evaporação e ressuspensas em 1mL de metanol. Dessa solução, 1 μ L foi injetado no GC/MS em modo SCAN. A relação de áreas formadas pelos fragmentos 182 (cocaína) e 210 (isopropilbenzoilecgonina) foi calculada para cada replicata. O cálculo da porcentagem da eficiência da transformação da benzoilecgonina em cocaína foi feito através da razão entre a média das áreas formadas pela cocaína obtida com a metilação da benzoilecgonina e a média das áreas formadas pela injeção direta de cocaína, corrigidas com o padrão interno (isopropilbenzoilecgonina). O valor obtido foi multiplicado por 100.

4.2.1.3. Estudo de estabilidade do diazometano

A solução etérea de diazometano preparada conforme descrito anteriormente foi armazenada em frasco âmbar sob refrigeração (-20°C). Semanalmente, alíquotas de 75µL da solução padrão de benzoilecgonina a 100µg/mL e 75µL da solução de isopropilbenzoilecgonina a 100µg/mL foram evaporadas em triplicata sob fluxo de nitrogênio e adicionadas com 100µL de diazometano em frascos de derivação silanizados. Após evaporação do excesso de reagente, o produto foi ressuscitado em 1mL de metanol. Dessa solução, 1µL foi injetado no GC/MS em modo *SCAN*. A média da relação de áreas formadas pelos fragmentos 182 (cocaína) e 210 (isopropilbenzoilecgonina) foi calculada para cada semana.

4.2.2. Extração em fase sólida de cocaína e benzoilecgonina

O procedimento de extração em fase sólida foi realizado conforme especificação do fabricante das colunas. Alíquotas de 2,5mL da amostra a ser analisada (item 4.1.4) foram adicionadas com 75µL da solução de isopropilbenzoilecgonina a 10µg/mL, 2,5mL de água desionizada e 2mL de tampão fosfato 0,1M pH 6,0 (deve apresentar valor de pH entre 4,0 e 6,0). As colunas de extração em fase sólida foram condicionados com 2mL de metanol seguidos de 2mL de tampão fosfato 0,1M com o sistema de 2-5 inHg. O vácuo foi desligado assim que a solução tampão alcançou o topo da camada do material da coluna. Imediatamente, as amostras foram aplicadas sob fluxo de 1mL/min, aproximadamente. A lavagem foi realizada aplicando-se 2 volumes de 3mL de água deionizada e 3 mL de ácido clorídrico 0.1M, sob vácuo a 8-12 inHg. Em seguida, as colunas foram submetidas à secagem com vácuo ajustado em 15 inHg durante 5 minutos e nova

lavagem foi realizada, passando-se 3 volumes de 3mL de metanol. A eluição foi feita com 2mL de uma solução de diclorometano/isopropanol/amônia na proporção de 80:20:2 usando vácuo a 4 inHg. O eluato foi coletado em frasco de derivação silanizado e em seguida evaporado sob fluxo de nitrogênio a 40°C. O esquema de extração em fase sólida é demonstrado na Figura 4.

FIGURA 4 - Esquema de extração em fase sólida de benzoilecgonina (BE), cocaína (COC) e padrão interno (PI) utilizado nas amostras de urina. 1) Condicionamento, 2) Passagem de amostra, 3) Lavagem e 4) Eluição.

4.2.3. Reação de derivação com diazometano

Foram adicionados aos resíduos provenientes da extração, 100 μ L da solução etérea de diazometano. Após 1 minuto em temperatura ambiente, o excesso de reagente foi evaporado sob fluxo de nitrogênio a 40°C e ressuspendido em 100 μ L de metanol.

4.2.4. Cromatografia em fase gasosa/Espectrometria de massa (GC/MS)

Do extrato final, 1 μ L foi injetado no GC/MS nas seguintes condições: injeção splitless, temperatura do injetor, 250°C; gás de arraste, hélio a um fluxo de 0,7mL/min; programação da temperatura do forno: 100°C (1min), 20°C/min, 250°C (5min); modo de operação do espectrômetro de massa, ionização por impacto de elétrons (70 eV), SCAN na faixa de 50 a 340 u.m.a.

4.2.4.1. Limite de detecção

O limite de detecção foi determinado através da aplicação do método (extração e derivação) em diluições sucessivas com urina da amostra de referência positiva contendo benzoilecgonina na concentração de 150ng/mL (item 4.1.4.2) e obtido como sendo a menor concentração na qual foi possível obter picos com tempos de retenção relativo com variação menor que 1% e espectro com índice de similaridade superior a 70% em 6 replicatas quando comparado ao espectro do padrão de cocaína introduzido na “biblioteca” de espectros desenvolvida no LAT.

4.2.4.2. Precisão intra-ensaio e interensaio

A precisão intra-ensaio foi determinada através da análise, em um mesmo dia, da amostra de referência positiva contendo benzoilecgonina na concentração de 150ng/mL em 6 replicatas e adicionadas com padrão interno. A relação de áreas formadas pelos fragmentos 182 e 210 foi calculada para cada replicata. A imprecisão foi calculada através do coeficiente de variação (CV) das razões de áreas obtidas.

Para a determinação da precisão interensaio foram analisadas, em 6 dias diferentes, 6 replicatas da amostra de referência positiva contendo 150ng/mL de benzoilecgonina, e o coeficiente de variação para essas análises também foi determinado.

4.2.4.3. Recuperação de benzoilecgonina e cocaína

Alíquotas (n=12) de 2,5mL de amostra de referência negativa (item 4.1.4.1) foram adicionadas com 75 μ L da solução de isopropilbenzoilecgonina a 10 μ g/mL em cada. Em seis alíquotas foram adicionados 75 μ L da solução de benzoilecgonina a 10 μ g/mL antes da extração (representando uma concentração urinária de 300ng/mL) e nas outras 6 alíquotas, a mesma quantidade foi adicionada após a extração. Após derivação do extrato obtido, o resíduo foi ressuspendido em 100 μ L de metanol e 1 μ L foi injetado no sistema GC/MS. A recuperação foi calculada através da comparação da relação de áreas em que a benzoilecgonina foi adicionada antes da extração com as áreas em que a benzoilecgonina foi adicionada após extração.

A recuperação da cocaína foi feita de modo semelhante, adicionando-se 75 μ L da solução de cocaína a 10 μ g/mL em cada alíquota, utilizando-se de outras 12 alíquotas da amostra de referência negativa.

4.2.5. Cromatografia em fase gasosa/Detector de nitrogênio-fósforo (GC/NPD)

Do extrato final, 1 μ L foi injetado no GC/NPD nas seguintes condições: injeção split (1:40); temperatura do injetor, 270°C; gás de arraste, nitrogênio a um fluxo de 0,7mL/min; programação da temperatura no forno: 148°C (1min), 10°C/min, 200°C, 20°C/min, 270°C (7 minutos). Parâmetros de integração: "THRESHOLD" = 1, "ATT 2^"=0, "AREA REJ" = 0, "PK WIDTH"=0.04.

4.2.5.1. Limite de detecção

O limite de detecção foi determinado através da aplicação do método (extração e derivação) em diluições sucessivas com urina da amostra de referência positiva contendo benzoilecgonina na concentração de 300ng/mL e obtido como sendo a menor concentração na qual foi possível obter picos com tempos de retenção relativo com variação menor que 1% e que o equipamento pudesse integrar em 6 replicatas nas condições acima especificadas.

4.2.5.2. Precisão intra-ensaio e interensaio

A precisão intra-ensaio foi determinada através da análise, em um mesmo dia, da amostra de referência positiva contendo benzoilecgonina na concentração de 300ng/mL (n=6) adicionada com o padrão interno. A relação de áreas formadas pelo pico de cocaína e isopropilbenzoilecgonina foi calculada para cada análise. O coeficiente de variação (CV) da razão das áreas foi calculado para as seis replicatas.

Para a determinação da precisão interensaio foram analisadas, em 6 dias diferentes, 6 replicatas da amostra de referência positiva contendo 300ng/mL de benzoilecgonina, e o coeficiente de variação para essas análises também foi determinado.

4.2.6. Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (HPTLC)

4.2.6.1. Escolha do sistema solvente

Inicialmente foram realizados testes para verificar qual o melhor sistema solvente a ser empregado. Os critérios de escolha foram: melhor resolução cromatográfica para cocaína e melhor separação dessa substância de nicotina e cafeína. Essas duas substâncias foram escolhidas devido a grande possibilidade da presença das mesmas em urina e a informação prévia de haver coincidência de Rf's com a cocaína em alguns sistemas solventes (Moffat, 1986). Padrões de cocaína, nicotina e cafeína foram aplicados nas placas de cromatografia em camada delgada de alta eficiência e desenvolvidos nos seguintes sistemas solventes empregados na literatura:

- A) Acetato de etila / ciclohexano / amônia (25:20:0,5)
- B) Acetato de etila/ diclorometano/ amônia/ metanol (3:1:0,6:3)
- C) Hexano/ clorofórmio/ dietilamina (80:10:10)
- D) Clorofórmio/ metanol/ amônia (100:20:1)
- E) Clorofórmio/ metanol (1:1)
- F) Metanol/ amônia (100:1,5)
- G) Clorofórmio/ metanol (9:1)
- H) Cicloexano/ tolueno/ dietilamina (75:15:10)
- I) 1-Acetato de etila/ cicloexano / metanol/ amônia (70:15:10:5)
- 2- Acetato de etila/ cicloexano/ amônia (50:40:0,1)

Após a escolha do sistema solvente, o seguinte procedimento foi adotado em relação às amostras: os extratos foram evaporados, ressuspensos em 3-4 gotas de clorofórmio/ metanol (3:1) e transferidos quantitativamente para cromatoplasmas de alta eficiência. A corrida cromatográfica foi de 7 centímetros a partir do ponto de aplicação e a revelação foi feita utilizando reativo de Dragendorff lodado.

4.2.6.2. Limite de detecção

O limite de detecção foi determinado através da aplicação do método (extração e derivação) em diluições sucessivas com urina da amostra de referência positiva contendo benzoilecgonina na concentração de 300ng/mL e obtido como sendo a menor concentração capaz de gerar uma mancha perceptível na mesma altura da cocaína em 6 replicatas.

4.2.7. Análise das amostras de urina de usuários de cocaína

Para avaliar a eficiência do método padronizado, comparou-se dois procedimentos analíticos que foram aplicados em amostras de usuários: a) o método padronizado, com transformação da benzoilecgonina em cocaína com diazometano e b) o método sem derivação, na qual identificou-se somente a cocaína presente na urina.

Duas alíquotas de 2,5mL de cada amostra positiva (item 4.1.4.3) foram submetidas à extração utilizando duas colunas de fase sólida. Um dos extratos foi derivado com diazometano e ambos foram ressuspensos em 100µL de metanol. Do extrato final, 1µL de cada foi injetado no GC/MS e 1µL no GC/NPD. As soluções remanescentes foram evaporadas, ressuspensas com 3 gotas de clorofórmio/metanol (3:1) e transferidas quantitativamente para placas de HPTLC. Um esquema geral do

procedimento utilizado no tratamento de cada amostra é demonstrado na Figura 5.

FIGURA 5 - Diagrama do procedimento utilizado no tratamento das amostras.

Para cada bateria de amostras foram processadas concomitantemente amostras de referência positiva e referência negativa. Para a técnica de GC/MS foi utilizada a amostra de referência positiva contendo benzoilecgonina na concentração de 150ng/mL. Para as técnicas de GC/NPD e HPTLC foi utilizada amostra de referência positiva contendo benzoilecgonina na concentração de 300ng/mL. As amostras de referência

foram submetidas à derivação com diazometano e, portanto, convertidas para cocaína.

As alíquotas que foram submetidas à derivação apresentaram resposta referente à soma da cocaína já existente com a formada pela metilação da benzoilecgonina. O resultado foi considerado positivo para determinada técnica quando a amostra apresentava área do pico, ou intensidade da mancha maior que a amostra de referência positiva. As alíquotas das amostras que não foram derivadas mostraram resposta referente apenas à concentração de cocaína presente na amostra e foram consideradas positivas quando apresentavam resposta maior que o limite de detecção do método.

5. RESULTADOS

5.1. Derivação com diazometano

5.1.1. Estudo do tempo de reação necessário para derivação de benzoilecgonina com diazometano

Não houve diferenças significativas entre os tempos analisados na conversão da benzoilecgonina em cocaína, sendo portanto adotado o tempo mínimo (1 minuto) como suficiente para completar a reação. A média da razão das áreas formadas pelo fragmento 182 (cocaína) e 210 (isopropilbenzoilecgonina) para cada tempo de reação conduzida em triplicata é demonstrada na Tabela 5.

TABELA 5 – Estudo do tempo de reação para a derivação de benzoilecgonina em cocaína com diazometano.

Tempo	Média da razão das áreas 182/210
1 min	0,510
5 min	0,503
10 min	0,505
15 min	0,509

5.1.2. Eficiência da transformação da benzoilecgonina em cocaína

Utilizando-se o tempo de reação selecionado (1 min), obteve-se 95% de conversão de benzoilecgonina em cocaína.

5.1.3. Estabilidade do diazometano

Durante os 4 meses em que foi conduzido o teste de estabilidade da solução etérea de diazometano (tempo em que a solução foi devidamente armazenada a -20°C em frasco âmbar) não se verificou nenhuma alteração na eficiência de metilação da benzoilecgonina,.

5.2. Cromatografia em fase gasosa/espectrometria de massa (GC/MS)

Um cromatograma da análise da amostra de referência positiva contendo benzoilecgonina na concentração de 150ng/mL e o respectivo espectro de massa da cocaína e isopropilbenzoilecgonina (PI) pode ser visualizado na Figura 6.

FIGURA 6 – (A) Cromatograma obtido com a análise de amostra de referência positiva contendo 150ng/mL de benzoilecgonina nas seguintes condições: injeção *splitless*; coluna capilar de sílica fundida 5% fenilmetilsilicone (CP-Sil 8 Chromapack); temperatura do injetor 250°C; gás de arraste, hélio; temperatura do forno: 100°C (1min), 20°C/min, 250°C (5 min); modo de operação do espectrômetro de massa, ionização por impacto de elétrons (70eV), SCAN de 50 a 340 u.m.a. (1) Pico referente à cocaína, (2) pico referente ao padrão interno. (B) Espectro de massa de cocaína e (C) espectro de massa do padrão interno isopropilbenzoilecgonina.

5.2.1. Limite de detecção

O limite de detecção para a técnica de cromatografia em fase gasosa associada à espectrometria de massa foi de 25ng/mL.

5.2.2. Precisão intra-ensaio e interensaio

O coeficiente de variação obtido nas análises da amostra de referência positiva contendo 150ng/mL de benzoilecgonina realizadas no estudo de precisão intra-ensaio foi de 4,3%. O coeficiente de variação para as análises realizadas no estudo de precisão interensaio foi de 7,0%. A Tabela 6 demonstra os valores obtidos da razão das áreas formadas pelos fragmentos 182 (cocaína) e 210 (padrão interno) para as análises de precisão intra-ensaio e interensaio.

TABELA 6 – Resultados das razões das áreas formadas pelos fragmentos 182 (cocaína) e 210 (padrão interno) para as análises realizadas com as amostras de referência positiva contendo 150ng/mL de benzoilecgonina para verificação da precisão intra-ensaio e interensaio.

Replicata	Intra-ensaio	Interensaio
	Razão das áreas 182/210	Razão das áreas 182/210
1	0,505	0.573
2	0,520	0.544
3	0,550	0.482
4	0,515	0.512
5	0,565	0.520
6	0,540	0.580

5.2.3. Recuperação de benzoilecgonina e cocaína

A recuperação média de benzoilecgonina em amostras adicionadas e submetidas à extração em fase sólida foi de 96,6% e a recuperação de cocaína foi de 96,4%.

5.3. Cromatografia em fase gasosa/Detector de nitrogênio-fósforo (GC/NPD)

Um cromatograma da análise da amostra de referência positiva contendo benzoilecgonina na concentração de 300ng/mL pode ser visualizado na Figura 7.

FIGURA 7 –Perfil cromatográfico da análise de amostra de referência positiva contendo benzoilecgonina na concentração de 300ng/mL adicionada com padrão interno, obtido nas seguintes condições: temperatura do injetor, 270°C; gás de arraste, nitrogênio, programação da temperatura no forno: 148°C, 200°C (10°C/min), 270°C. (A) Cocaína, (B) Isopropilbenzoilecgonina.

5.3.1. Limite de detecção

O limite de detecção para a técnica de cromatografia em fase gasosa com detetor de nitrogênio/fósforo foi de 50ng/mL.

5.3.2. Precisão intra-ensaio e interensaio

O coeficiente de variação obtido nas análises da amostra de referência positiva contendo 300ng/mL de benzoilecgonina realizadas no estudo de precisão intra-ensaio foi de 5,2%. O coeficiente de variação para as análises realizadas no estudo de precisão interensaio foi de 7,3%. A Tabela 7 demonstra os valores obtidos da razão das áreas formadas pelos picos da cocaína e do padrão interno para as análises de precisão intra-ensaio e interensaio.

TABELA 7 – Resultados das razões das áreas formadas pela cocaína e padrão interno para as análises realizadas com as amostras de referência positiva contendo 300ng/mL de benzoilecgonina para verificação da precisão intra-ensaio e interensaio.

Replicata	Intra-ensaio	Interensaio
	Razão das áreas COC/PI	Razão das áreas COC/PI
1	0,787	0,896
2	0,879	0,820
3	0,785	0,760
4	0,850	0,752
5	0,862	0,802
6	0,791	0,740

5.4. Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (HPTLC)

5.4.1. Escolha do sistema solvente

Os valores de R_fs de cocaína, nicotina e cafeína aplicados em placas de cromatografia em camada delgada de alta eficiência e desenvolvidos em 9 diferentes sistemas solventes são apresentados na Tabela 8.

TABELA 8 – Valores de R_f de cocaína, cafeína e nicotina aplicados em placas de HPTLC e desenvolvidos em sistemas solventes sugeridos na literatura.

Referência	Sistema Solvente	Valores de R _f		
		Cocaína	Cafeína	Nicotina
Yonamine (99)	Acetato de etila / cicloexano / amônia (25:20:0,5)	49	11	14
Kogan (79)	Acetato de etila/ diclorometano/ amônia/ metanol (3:1:0,6:3)	85	77	80
Budd (80)	Hexano/ clorofórmio/ dietilamina (80:10:10)	58	0	54
Wallace (75)	Clorofórmio/ metanol/ amônia (100:20:1)	94	87	83
Chasin (98)	Clorofórmio/ metanol (1:1)	33	69	38
Moffat (86)	Metanol/ amônia (100:1,5)	57	57	53
Moffat (86)	Clorofórmio/ metanol (9:1)	46	76	47
Moffat (86)	Cicloexano/ tolueno/ dietilamina (75:15:10)	60	0	63
Kaistha (75)	a) Acetato de etila/ cicloexano/ metanol/ amônia (70:15:10:5)	80	53	60
	b) Acetato de etila/ cicloexano/ amônia (50:40:0,1)			

Foi selecionado o sistema solvente acetato de etila/ cicloexano/ amônia (25: 20: 0,5). Uma cromatoplaça HPTLC da análise de amostras de urina com concentrações conhecidas de benzoilecgonina desenvolvida nesse sistema solvente é apresentado na Figura 8.

FIGURA 8 – Cromatoplaça da análise de adicionados de benzoilecgonina em diferentes concentrações: (A) 500ng/mL; (B) 300ng/mL; (C) 250ng/mL; (D) 200ng/mL; (E) 150ng/mL; (F) 100ng/mL; (G) 50ng/mL e (H) amostra de referência negativa, desenvolvido em sistema solvente acetato de etila/ cicloexano/ amônia (25:20:0,5) e revelado com Dragendorff. (1) mancha relativa a cocaína.

5.4.1. Limite de detecção

O limite de detecção para a técnica de cromatografia em camada delgada de alta eficiência foi de 100ng/mL .

5.5. Análise das amostras de urina de usuários de cocaína

O resultado das análises por HPTLC, GC/NPD e GC/MS das amostras de urina provenientes de usuários de cocaína e seus respectivos valores de concentração de benzoilecgonina dados pela Imunofluorescência polarizada (FPIA) são demonstrados na Tabela 9.

TABELA 9 - Resultado das análises de amostras de usuários de cocaína empregando-se ou não a derivação dos extratos e respectivo valor de concentração obtido com a técnica de Imunofluorescência polarizada.

Amostra	FPIA	C/ derivação			S/ derivação		
	Conc. (ng/mL)	HPTLC	GC/NPD	GC/MS	HPTLC	GC/NPD	GC/MS
A	299	+	+	+	-	-	+
B	353	+	+	+	-	-	-
C	373	+	+	+	-	-	-
D	687	+	+	+	-	-	-
E	781	+	+	+	-	-	+
F	787	+	+	+	-	-	-
G	1602	+	+	+	-	-	+
H	1699	+	+	+	+	+	+
I	1886	+	+	+	+	+	+
J	2085	+	+	+	+	+	+
L	2290	+	+	+	-	+	+
M	2504	+	+	+	+	+	+
N	2515	+	+	+	+	+	+
O	2710	+	+	+	+	+	+
P	3227	+	+	+	-	+	+
Q	4267	+	+	+	-	-	-
R	4715	+	+	+	+	+	+
T	HI	+	+	+	+	+	+
U	HI	+	+	+	+	+	+
V	HI	+	+	+	+	+	+

FPIA=Imunofluorescência polarizada, Conc.=concentração, HI=concentração maior que 5000ng/mL.

(+) = resultado positivo

(-) = resultado negativo

6. DISCUSSÃO

A análise toxicológica em urina é sem dúvida um importante instrumento para se verificar a exposição recente (alguns dias) a drogas de abuso. Por outro lado, interpretações equivocadas de resultados analíticos podem alterar o curso de uma investigação médica ou policial e prejudicar a vida do indivíduo implicado, comprometendo também a credibilidade do laboratório. Devido à grande responsabilidade, é necessário que o laboratório disponha de recursos técnico-científicos suficientes que tornem suas análises precisas e isentas de falhas. Considerando a dificuldade relatada por toxicologistas na detecção de benzoilecgonina, principal produto de biotransformação da cocaína, encontrado em urina de usuários, um estudo mais detalhado quanto à métodos de identificação foi necessário. Desta forma, foi investigado o emprego tanto de técnicas mais simples e de baixo custo como a cromatografia em camada delgada de alta eficiência, como técnicas mais complexas como a cromatografia em fase gasosa com detetor de nitrogênio/fósforo e a espectrometria de massa associada à cromatografia em fase gasosa.

O primeiro problema encontrado e bastante discutido na literatura foi a dificuldade de extração de benzoilecgonina da urina devido às suas características polares. Por se tratar de uma prática mais viável economicamente, tentou-se inicialmente a aplicação de extração líquido-líquido, utilizando-se de 5mL de clorofórmio/etanol (8:2) como solvente extrator em 2,5mL de urina. Com esse procedimento foi obtido um índice de recuperação de benzoilecgonina de apenas 31%. Quando realizado o

mesmo procedimento com duas extrações consecutivas de 5mL do solvente extrator, um índice de recuperação de 64% foi encontrado. Embora a recuperação tenha aumentado consideravelmente, verificou-se que esse procedimento aumentava também a extração de interferentes presentes na urina, fato não desejável em técnicas cromatográficas.

Ainda na tentativa de obter extratos mais “limpos” para análise, uma fase de reextração com éter/isopropanol (3:1) foi introduzida após a conversão de benzoilecgonina em cocaína com diazometano. Apesar do processo ter apresentado resultados satisfatórios quanto à obtenção de extratos mais “limpos”, possibilitando até a análise por GC/NPD, tornou o procedimento um tanto trabalhoso e pouco prático.

Devido a esse fato, a adoção da extração em fase sólida foi de fundamental importância para a eficácia do método. Procedimentos mais rápidos, maior índice de recuperação da benzoilecgonina e extratos mais limpos foram verificados após a aplicação dessa forma de extração. Sua principal desvantagem é o custo das colunas que no Brasil ainda é um pouco elevado.

Uma outra etapa importante no procedimento analítico é a escolha do agente de derivação. Os principais requisitos para uma reação de derivação bem sucedida são: um simples derivado deve ser formado para cada composto, a reação deve ser simples e rápida, deve ocorrer sob condições brandas, o derivado deve ser formado com um alto e reproduzível índice de conversão e ser estável no meio de reação (Segura *et al.*, 1998).

As condições de reação também devem ser bem estabelecidas pois derivados múltiplos podem ser formados com compostos polifuncionais em consequência da derivação incompleta. A remoção de alguns reagentes antes da injeção também é importante para se evitar reações secundárias no injetor. Em outros casos, a não remoção do excesso de reagente pode ser uma vantagem em termos de tempo gasto na preparação da amostra (Segura *et al.*, 1998). Um exemplo disso são as reações que formam silil-

derivados de benzoilecgonina em que se preconiza a injeção direta dos agentes de derivação no cromatógrafo.

Interferência também é um importante aspecto a ser observado em reações de derivação. Wu *et al.* (1994) relataram que o fluconazol (antifúngico) coelui juntamente com a benzoilecgonina após a conversão em trimetilsilil-derivados, gerando resultados falsos negativos após análise por GC/MS. Essa interferência é completamente eliminada quando o pentafluoropropil-derivado de benzoilecgonina é formado (Dasgupta *et al.*, 1996).

Ambos os derivados são sensíveis à umidade e portanto a estabilidade depende de condições anidras durante a análise (Maurer, 1992); (Paul *et al.*, 1996).

Apesar dessas observações, a formação de compostos silil e pentafluoropropil-derivados de benzoilecgonina são bastante utilizados na literatura para análise por GC/MS. Como o intuito do trabalho foi padronizar um método que também fosse aplicável em outras técnicas cromatográficas mais acessíveis em laboratórios de Toxicologia no Brasil, foi necessária uma avaliação mais detalhada sobre agentes de derivação. Trimetilsilil-derivados não apresentam boa sensibilidade em técnicas de GC/NPD ou GC/FID (Jain *et al.*, 1977); (Verebey & Depace, 1989). Já os alquil-derivados de benzoilecgonina são mais estáveis e também possuem boas características cromatográficas. Para a formação desses compostos, diversos reagentes podem ser empregados conforme citado no item 2.3.3.

A utilização de dimetilformamida dialquilacetal, iodoalcanos ou reações com álcoois e ácidos necessitam de uma fase extra de purificação do produto formado, o que pode tornar o método pouco prático, além da perda do analito na fase de reextração. Ao utilizar iodopropano como agente de derivação, Paul *et al.* (1996) afirmaram uma conversão de apenas 32-64% do produto formado, além da perda de 14-42% devido à necessidade de purificação. Graas *et al.* (1978) calcularam cerca de 70% de recuperação

após extração e formação de cocaetileno com iodoetano. Esse mesmo produto é formado pela reação de benzoilecgonina com etanol na presença de ácido sulfúrico (Griesemer *et al.*, 1983). Uma conversão de 72% de benzoilecgonina em cocaína é descrita na literatura, utilizando reação semelhante com metanol e ácido sulfúrico (Wallace *et al.*, 1976).

A técnica de “solvente extrativo de alquilação” é mais prática por extrair e derivar simultaneamente compostos ácidos orgânicos. Contudo, a presença de outros ânions na amostra, que competem com o analito na transferência para a fase orgânica, pode comprometer o resultado da análise (Segura *et al.*, 1998).

A utilização do diazometano é citada poucas vezes nos trabalhos científicos para identificação analítica da exposição à cocaína (Froldi *et al.*, 1984); (Ambre *et al.* 1988); (Pfleger *et al.*, 1992), entretanto apresenta algumas características especiais, que justificaram a opção por esse agente:

- o produto formado na reação da benzoilecgonina com o diazometano é a cocaína (ocorre a metilação da benzoilecgonina), que apresenta propriedades físico-químicas e analíticas bastante conhecidas. Essas propriedades facilitaram a padronização do método para as técnicas de GC/MS, GC/NPD e HPTLC;

- a reação ocorre em condições brandas com excelente rendimento (Allinger *et al.*, 1978);

- a reação é muito rápida, se completa em segundos e não há necessidade de purificar a mistura de reação (Glastrup, 1998);

- o subproduto da reação é o nitrogênio e o excesso de diazometano e o solvente (éter), por serem altamente voláteis, podem ser facilmente removidos por evaporação, praticamente não deixando resíduos.

Entretanto, alguns cuidados devem ser tomados ao se manusear esse agente químico. O diazometano é um gás amarelo, tóxico e explosivo,

de fórmula estrutural CH_2N_2 e ponto de ebulição -23°C ; entretanto pode-se preparar soluções etéreas desse composto (Allinger *et al.*, 1978), tornando-o mais estável. A decomposição é mais rápida se álcoois ou água estiverem presentes (MERCK INDEX, 1996). O diazometano também pode ser decomposto pela ação da luz e do calor (Allinger *et al.*, 1978), e portanto sua solução etérea deve ser armazenada em frascos âmbar a baixas temperaturas. Nessas condições foi verificado uma estabilidade de mais de 4 meses.

O Limite de exposição recomendado (REL) para o diazometano, estabelecido por diversos órgãos de saúde dos Estados Unidos como o *Occupational Safety and Health Administration* (OSHA), o *National Institute for Occupational Safety and Health* (NIOSH) e o *American Conference of Governmental Industrial Hygienists* (ACGIH) é de 0,2ppm ($0,4\text{mg}/\text{m}^3$). Esses limites são baseados no risco de irritação nos olhos e membranas mucosas (*Occupational Safety and Health Administration*, 2000). Estudos indicam que o diazometano é carcinogênico para ratos e camundongos, entretanto o *International Agency for Research on Cancer* (IARC) concluiu que essa substância não é classificável em termos de sua carcinogenicidade para humanos (*Occupational Safety and Health Administration*, 2000).

No presente trabalho, quantidades adequadas da solução etérea de diazometano foram preparadas, armazenadas e manuseadas com os seguintes cuidados:

- Toda a fase de derivação foi efetuada em capela para prevenir a exposição aos vapores do reagente;

- Para evitar um possível contato com a pele foram utilizadas luvas.

- A solução etérea de diazometano foi armazenada em freezer que não possuía o sistema de iluminação automática interna;

Em um dos trabalhos em que o diazometano é empregado para metilação de benzoilecgonina urinária, o autor *relata* a conversão em

cocaína na própria urina (Ambre *et al.*, 1988). Essa reação seria bastante interessante pois as propriedades lipofílicas da cocaína facilitariam o processo de extração da matriz biológica. Entretanto, em nosso laboratório, na tentativa de reproduzir o procedimento, não obtivemos resultados satisfatórios. A mistura da urina com a solução etérea de diazometano e posterior agitação do sistema provocava rapidamente uma descoloração da solução etérea, provavelmente em decorrência da decomposição do diazometano na presença de água. Consequentemente, não se verificou a transformação de benzoilecgonina em cocaína com esse procedimento.

Embora seja o fragmento com maior intensidade tanto para a cocaína como para o padrão interno isopropilbenzoilecgonina, o íon 82 não foi utilizado para o monitoramento das áreas, devido a maior possibilidade de interferentes em fragmentos com baixo peso molecular (Segura *et al.*, 1998). Os íons moleculares que são mais específicos, obtidos pelo modo de ionização por Impacto de Elétrons, são de baixa intensidade e portanto também pouco adequados para a monitorização das áreas. Optou-se, então, trabalhar com fragmentos de intensidade média, mais específicos que o íon 82, que foram os fragmentos 182 para cocaína e 210 para isopropilbenzoilecgonina.

A padronização das condições de temperatura do sistema GC/MS e do GC/NPD seguiu a utilizada pelo *Laboratório de Análises Toxicológicas-USP* para identificação de cocaína, no entanto, a temperatura do injetor foi um parâmetro de particular interesse devido ao relato na literatura da possibilidade de degradação térmica dessa substância a altas temperaturas (Moffat, 1986).

De acordo com Gonzales *et al.* (1995), que realizaram estudos monitorando o íon 152 correspondente à formação de ecgonidina metil ester, produto de degradação térmica da cocaína, foram verificadas porcentagens de degradação menores que 2,6% utilizando *liners* abertos ou *empacotados com lã de vidro*, injetores a 280°C e modo *splitless*.

Cone *et al.* (1994), verificaram que a utilização da temperatura do injetor em 250°C com injeção *splitless* permitiu uma eficiente volatilização da cocaína e degradação térmica menor que 1%. Nessas mesmas condições, Chasin (1996) também não encontrou evidências de degradação térmica, coincidindo com nossos estudos, quando monitorado o fragmento 152.

No entanto, para a análise por GC/NPD com injeção em modo *split*, a temperatura do injetor a 270°C apresentou uma melhor resposta para a cocaína do que com o injetor a 250°C.

Quando a injeção em modo *splitless* é selecionada, a substância injetada fica em contato com a superfície quente do *liner* por um período de até 1 minuto até a sua introdução na coluna cromatográfica. Apesar disso, o tempo em contato com o *liner* e a temperatura do injetor não são suficientes para a degradação térmica da cocaína, mas são suficientes para volatilizá-la. No caso da injeção em modo *split*, o processo de volatilização deve ser imediato pois a substância injetada logo é introduzida na coluna e uma parte é desprezada por uma saída de escape. Provavelmente, devido a esse fato há a necessidade da seleção de uma maior temperatura do injetor quando se pretende trabalhar com esse modo de injeção.

A cromatografia em camada delgada de alta eficiência também foi incluída em nossa pesquisa devido a sua maior acessibilidade em Laboratórios de Toxicologia. Um bom método de HPTLC pode fornecer importantes informações a respeito da exposição a drogas de abuso, a um custo relativamente baixo.

Contudo, a análise de benzoilecgonina por HPTLC também apresenta algumas dificuldades técnicas inerentes às próprias características da substância. Muitos sistemas solventes não são capazes de movê-la da origem de aplicação e sua visualização e identificação na placa são comprometidas pela pouca sensibilidade a maioria dos agentes cromogênicos.

Desta forma, a conversão de benzoilecgonina em cocaína com diazometano foi fundamental para a padronização do método por HPTLC. A cocaína é mais sensível a agentes cromogênicos e, portanto, sua visualização na placa é possível mesmo quando pequenas quantidades da substância são aplicadas. Budd *et al.* (1980) verificaram essa diferença de sensibilidade quando compararam resultados da análise de benzoilecgonina por TLC, aplicando-se ou não a metilação com dimetilsulfato. Nesse experimento, com o uso de iodoplatina ácida como revelador, o limite de detecção para a cocaína foi de 2µg/mL enquanto para a benzoilecgonina esse limite foi de 10µg/mL.

No entanto, quando adotado o procedimento de conversão de benzoilecgonina em cocaína, outro problema foi verificado na identificação dessa substância por HPTLC. A maioria dos sistemas solventes citados na literatura não possibilitava separar a cocaína de substâncias normalmente encontradas em urina humana como a cafeína e/ou a nicotina. Esse quadro foi verificado experimentalmente com a aplicação dessas três substâncias em placas de HPTLC, utilizando os referidos sistemas solventes (Tabela 8). A única exceção foi verificada no sistema proposto por Kaistha *et al.* (1975) no qual se preconizava a utilização de dois sistemas solventes consecutivos para separação das substâncias.

Baseado neste trabalho, foi desenvolvido o sistema solvente 'acetato de etila/ cicloexano/ amônia' (25:20:0,5) (Yonamine & Silva, 1999) capaz de separar essas três substâncias em uma única corrida cromatográfica. Lidocaína e procaína, dois adulterantes da cocaína, apresentaram "R_fs" de 54 e 34. Cocaetileno apresentou "R_f" de 60. Esses resultados demonstram que mais informações podem ser obtidas através da análise por HPTLC, sem comprometer a identificação de cocaína.

Como critério para identificar amostras positivas foi adotado o estabelecimento de valores de referência - *cut off* - recomendados internacionalmente para programas de prevenção e controle do uso de

drogas no ambiente de trabalho (300ng/ml de benzoilecgonina na fase de triagem e 150ng/mL na confirmação). Esse tipo de critério pode, entretanto, permitir a ocorrência de "falsos negativos", quando as amostras apresentarem concentrações de benzoilecgonina abaixo dos valores de referência. Por outro lado, evitaria a remota possibilidade de uma amostra ser positiva como consequência da exposição passiva a vapores de *crack*, como demonstrado em estudo realizado por Cone *et al.* (1995). Nesse estudo 6 voluntários foram expostos ao vapor de 100 e 200mg de cocaína na forma de base livre, aquecida à temperatura de 200°C numa sala não ventilada durante 1 hora. Urina coletada dos voluntários alcançou picos de 22 a 123ng/mL e portanto, abaixo do valor de *cut off* recomendado internacionalmente. Embora realizado em condições exageradas e pouco prováveis de exposição passiva, o experimento serviu para esclarecer a possibilidade de resultados positivos originários de outras razões que não o uso de cocaína.

No método proposto, a resposta obtida pelas técnicas de GC/MS, GC/NPD e HPTLC corresponde à soma da cocaína formada pela metilação da benzoilecgonina com a cocaína já presente na urina. Contudo, na maior parte das vezes, a concentração de cocaína originariamente presente nas amostras de usuários pouco influencia o resultado por esse método, já que na média, esse valor não ultrapassa 5% da concentração de benzoilecgonina urinária (Preston *et al.*, 1998).

Preston *et al.* (1998), analisando a ocorrência de cocaína em urina de pacientes em tratamento de dependência, verificou que somente em algumas raras exceções (52 amostras em um total de 2327) as concentrações de cocaína excediam as de benzoilecgonina. No mesmo trabalho, os autores verificaram que as concentrações de cocaína tendiam a acompanhar as concentrações equivalentes de benzoilecgonina. Isto é, concentrações altas de benzoilecgonina correspondiam também a altas concentrações de cocaína, em suas devidas proporções.

Em nossos experimentos também verificamos essa tendência, apesar do número relativamente baixo de amostras analisadas. A maioria das amostras de urina que apresentou as mais altas concentrações de benzoilecgonina medidas pela Imunofluorescência Polarizada (FPIA) foram aquelas em que foi possível detectar pelo GC/MS, GC/NPD e/ou HPTLC a presença de cocaína, quando o extrato não era submetido à derivação com diazometano.

Entretanto, em uma das amostras em que se mediu uma concentração relativamente alta de benzoilecgonina por IFP (Amostra Q = 4267ng/mL) não foi possível a detecção de cocaína originariamente presente, nem na técnica de GC/MS que detecta concentrações de até 25ng/mL. Por outro lado, em uma amostra que apresentou leitura no limiar do valor de *cut off* (Amostra A = 299ng/mL) foi possível a detecção de cocaína por GC/MS no extrato não submetido ao procedimento de derivação.

A Imunofluorescência Polarizada (FPIA) detecta benzoilecgonina com reatividade cruzada para cocaína, éster metilecgonina e ecgonina menor que 1% (Preston *et al.*, 1998). Portanto, não é possível predizer pelo valor da FPIA, a presença ou não de cocaína na amostra.

Diversos fatores podem estar envolvidos na variação das concentrações de benzoilecgonina e cocaína em amostras de usuários: a) a coleta foi única, sem informações quanto ao tempo da exposição; b) existem diferenças individuais de biotransformação e excreção; c) existem diferenças de excreção de acordo com a via de administração (Cone *et al.*, 1998) e d) há a possibilidade de ocorrer acumulação da cocaína nos tecidos adiposos em usuários crônicos, com posterior liberação desses sítios de armazenamento (Preston *et al.*, 1998).

Outro fator a ser considerado se refere à estabilidade da cocaína e da benzoilecgonina quando a urina é armazenada a -20°C. O *Department of Health and Human Services* dos Estados Unidos recomenda que

amostras de urina com resultados positivos, provenientes de programas de controle do uso de drogas no ambiente de trabalho, sejam armazenadas em congelador durante um ano (Dugan *et al.*, 1994). No Brasil não temos legislação semelhante, mas a reanálise de urina pode ser requisitada, tornando necessário o conhecimento sobre estabilidade. Estudos realizados por Dugan *et al.* (1994) verificaram que a benzoilecgonina é bastante estável na urina em condições de congelamento a -20°C em um período de 1 ano. Em relação à cocaína, houve em média um decréscimo de 37% da concentração inicialmente analisada, sob as mesmas condições e período de armazenamento (1 ano), em decorrência da hidrólise *in vitro*.

Portanto, em um sistema analítico baseado somente na identificação de cocaína na urina, há a possibilidade de uma amostra originariamente positiva resultar negativa, após um certo período de armazenamento.

Os procedimentos de extração e derivação da benzoilecgonina padronizados neste trabalho apresentaram ótimos resultados, com índices de recuperação e conversão em cocaína acima de 90%. Esse fato contribuiu para que um volume relativamente baixo de amostra fosse utilizado (2,5mL), possibilitando a detecção da cocaína pelas técnicas cromatográficas mencionadas.

Os limites de detecção encontrados para a cromatografia em camada delgada de alta eficiência (100ng/mL) e cromatografia em fase gasosa com detector de nitrogênio-fósforo (50ng/mL) indicam que estas podem ser perfeitamente empregadas como técnicas de triagem se adotado um *cut off* de 300ng/mL pelo laboratório. Os mesmos procedimentos de extração e derivação podem ser utilizados para a detecção da cocaína pelas três técnicas mencionadas.

Na avaliação do método padronizado em amostras de urina de usuários, para todas as técnicas cromatográficas foi possível a detecção de cocaína, demonstrando que o sistema analítico é apropriado na verificação da exposição a esse fármaco. O mesmo não foi observado quando a

alíquota da amostra não era derivada com diazometano, possibilitando a detecção de cocaína presente na amostra somente em 75% dos casos no GC/MS, 60% no GC/NPD e 50% na técnica de HPTLC.

7.CONCLUSÕES

-O procedimento de extração em fase sólida forneceu extratos sem interferentes para posterior identificação de cocaína pelas técnicas cromatográficas, características não alcançadas em extrações líquido-líquido.

-O método de extração apresentou ótimos índices de recuperação tanto para cocaína (96,4%) como para benzoilecgonina (96,6%).

-Nas condições padronizadas, a derivação com diazometano forneceu ótimo índice de conversão de benzoilecgonina em cocaína (95%).

-A transformação de benzoilecgonina em cocaína com diazometano possibilitou a padronização das técnicas estudadas (GC/MS, GC/NPD e HPTLC) para verificar o uso dessa droga.

-Os limites de detecção obtidos para as técnicas de GC/NPD (50ng/mL) e HPTLC (100ng/mL) estão abaixo do valor de referência *-cut off* – recomendado na fase de triagem para detecção de benzoilecgonina (300ng/mL).

-Nas condições padronizadas, a GC/NPD e a HPTLC podem ser utilizadas na fase de triagem para verificar o uso de cocaína.

-Para a técnica de GC/MS, o limite de detecção obtido no método padronizado (25ng/mL) está abaixo do valor de referência - *cut off* - recomendado para confirmação de benzoilecgonina urinária (150ng/mL), o que possibilita seu uso como técnica confirmatória.

-Em todas as amostras de usuários de cocaína foi possível a detecção dessa substância pelos métodos padronizados.

-Um sistema analítico baseado na derivação de benzoilecgonina com diazometano e detecção da cocaína formada é mais eficiente que um sistema baseado somente na detecção da cocaína originariamente presente na amostra.

-De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que os métodos padronizados podem ser empregados para verificar a exposição à cocaína.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADERJAN, R.E., SCHMITT, G., WU, M., MEYER, C. Determination of cocaine and benzoylecgonine by derivatization with iodomethane-D3 or PFPA/HFIP in human blood and urine using GC/MS (EI or PCI mode). *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.17, p.51-55, 1993.

ALLEYNE, B.C., STUART, P., COPES, R. Alcohol and other drug use in occupational fatalities. *J. Occup. Med.*, Chicago, v.33, n.4, p.496-500, 1991.

ALLINGER, N.L, CAVA, M.P., DE JONGH, D.C., JOHNSON, C.R., LEBEL, N.A., STEVENS, C.L. *Química orgânica*. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1978, p. 201, 480.

AMBRE, J., FISCHMAN, M., RUO T.I. Urinary excretion of ecgonine methyl ester, a major metabolite of cocaine in humans. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.8, p.23-25, 1984.

AMBRE, J. The urinary excretion of cocaine and metabolites in humans: a kinetic analysis of published data. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.9, p.241-245, 1985.

AMBRE, J., RUO, T.I., NELSON, J., BELKNAP, S. Urinary excretion of cocaine, benzoylecgonine, and ecgonine methyl ester in humans. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.12, p.301-306, 1988.

- ANDERSON, R.E., NIXON, G.L. Isolation of benzoylecgonine from urine using solid-phase extraction. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.17, p.432-433, 1993.
- BALIKOVA, M., VECERKOVA, J. High-performance liquid chromatographic confirmation of cocaine and benzoilecgonine in biological samples using photodiode-array detection after toxicological screening. *J. Chromatogr. B: Biomed. Appl.*, Amsterdam, v.656, p.267-273, 1994.
- BODOR, G., ROGGERMAN, R., TURK, J. Variation in abundance of the molecular ion of the derivatized cocaine metabolite benzoylecgonine. *Clin. Chem.*, Washington, v.36, p.742-747, 1990.
- BRASIL. Leis, Decretos, etc. Código de trânsito brasileiro: lei n. 9.503 de 23 de setembro de 1997. São Paulo: LTr, 1998. 373p.
- BUDD, R.D., MATHIS, D.F., YANG, F.C. TLC analysis of urine for benzoylecgonine and norpropoxyphene. *Clin. Toxicol.*, New York, v.16, n.1, p.1-5, 1980.
- BUSTO, U., BENDAYAN, R., SELLERS, E.M. Clinical pharmacokinetics of non-opiate abuse drugs. *Clin. Pharmacokinet.*, Auckland, v.16, p.1-26, 1989.
- CHASIN, A.A.M. Diagnóstico laboratorial da intoxicação aguda por cocaína: aspecto forense. São Paulo, 1990. 109p. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).
- CHASIN, A.A.M, MIDIO, A.F. Aspecto Toxicológico da overdose de cocaína, *Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo*, São Paulo, v.27, n.1, p.1-27, 1991.

- CHASIN, A.A.M. Cocaína e cocaetileno: influência do etanol nas concentrações de cocaína em sangue humano *post mortem*. São Paulo, 1996. 141p. (Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).
- CHASIN, A.A.M., MIDIO, A.F. Exposição humana à cocaína e ao cocaetileno: disposição e parâmetros toxicocinéticos. *Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo*, São Paulo, v. 33, n.1, p.1-12, 1997.
- CHASIN, A.A.M., LIMA, I.V. Detecção de cocaína, cocaetileno e benzoilecgonina em urina por técnicas cromatográficas (HPTLC, GC-FID e GC/MS). *Rev. Bras. Toxicol.*, São Paulo, v.11, n.2, p.45-49, 1998.
- CHASNOFF, I.J., LEWIS, D.E., GRIFFITH, D.R., WILLEY, S. Cocaine and pregnancy: clinical and toxicological implications for the neonate. *Clin. Chem.*, Washington, v.35, n.7, p.1276-1278, 1989.
- CHINN, D.M., CROUCH, D.J., PEAT, B.S., FINKLE, B.S., JENNISON, T.A. Gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry of cocaine and its metabolites in biological fluids. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.4, p.37-42, 1980.
- CHOW, M.J., AMBRE, J.J., RUO, T.I. Kinetics of cocaine distribution, elimination, and chronotropic effects. *Clin. Pharmacol. Ther.*, St. Louis, v.38, p.318-324, 1985.
- CHRISTOPHERSEN, A.S., MORLAND, J. Drug analysis for control purposes in forensic toxicology, workplace testing, sports medicine and related areas. *Pharmacol. Toxicol.*, Copenhagen, v.74, p.202-210, 1994.

- CLARK, D.R., HAJAR, T.M. Detection and confirmation of cocaine use by chromatographic analysis for methylecgonine in urine. *Clin Chem*, Washington, v.33, p.118-119, 1987.
- CLARK, H.W. The role of physicians as medical review officers in workplace drug testing programs. In pursuit of the last nanogram. *West. J. Med.*, San Francisco, v.152, n.5, p.514-524, 1990.
- CLAUWAERT, K.M., LAMBERT, W.E., LEENHER, A.P. High performance liquid chromatographic determination of cocaine and its metabolites in biological samples: a review, *J. Liq. Chromatogr.*, New York, v.18, n.11, p. 2097-114, 1995.
- CLAUWAERT, K.M., VAN BOCXLAER, J.F., LAMBERT, W.E., DE LEENHEER, A.P. Analysis of cocaine, benzoilecgonine, and cocaethylene in urine by HPLC with diode array detection. *Anal. Chem.*, Washington, v.68, p.3021-3028, 1996.
- CONE, E.J., KUMOR, K., THOMPSON, L.K. Correlation of saliva cocaine levels with plasma levels and with pharmacologic effects after intravenous cocaine administration in human subjects. *J Anal. Toxicol.*, Niles, v.12, p.200-206, 1988.
- CONE, E.J., WEDDINGTON, J.W.W. Prolonged occurrence of cocaine in human saliva and urine after chronic use. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.13, 65-68, 1989.
- CONE, E.J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cocaine. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.19, p.459-478, 1995.

CONE, E.J., YOUSEFNEJAD, D., HILLSGROVE, M.J., HOLICKY, B., DARWIN, W.D. Passive inhalation of cocaine. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.19, p.339-411, 1995.

CONE, E.J., TASDIK, A., OYLER, J., DARWIN, W.D. Cocaine metabolism and urinary excretion after different routes of administration. *Ther. Drug. Monit.*, New York, v.20, p.556-560, 1998.

CROUCH, D., ALBURGES, M.E., SPANBAUER, A.C., ROLLINS, D.E., MOODY, D.E., CHASIN, A.A. Analysis of cocaine and its metabolites from biological specimens using solid-phase extraction and positive ion chemical ionization mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.19, p.352-358, 1995.

CROUCH, D. Alternative drugs, specimens, and approaches for non-regulated drug testing. In: KARCH, S.B., ed. *Drug abuse handbook*. Boca Raton: CRC Press, 1998. p.776-793.

DASGUPTA, A., MAHLE, C., MCLEMORE, J. Elimination of fluconazole interference in gas chromatography/mass spectrometric confirmation of benzoylecgonine, the major metabolite of cocaine using pentafluoropropionyl derivative. *J. Forensic Sci.*, Philadelphia, v.41, n.3, p.511-513, 1996.

DE GIOVANNI, N., ROSSI, S.S. Simultaneous detection of cocaine and heroin metabolites in urine by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B: Biomed. Appl.*, Amsterdam, v.658, p.69-73, 1994.

DE LA TORRE, R., SEGURA, J., DE ZEEUW, R., EILLIANS, J. Recommendation for the reliable detection of illicit drugs in urine in the

European Union, with special attention to the workplace. EU Toxicology Experts working Group. *Ann. Clin. Biochem.*, London, v.34, p.339-344, 1997.

DEAN, R.A., CHRISTIAN, C.D., SAMPLE, R.H.B., BOSRON, W.E. Human liver cocaine esterases: ethanol-mediated formation of ethylcocaine. *FASEB J.*, Bethesda, v.5, p.2735-2739, 1991.

DEAN, R.A., HARPER, E.T., DUMAUAL, D., DTOECKEL, D.A., BOSRON, W.F. Effects of ethanol on cocaine metabolism: formation of cocaethylene and norcocaethylene. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, New York, v.117, p.1-8, 1992.

DIAMOND, F.X., VICKERY, W.E., DE KANEL, J. Extraction of benzoylecgonine (cocaine metabolite) and opiates (codeine and morphine) from urine samples using the Zymark Rapid Trace. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.20, p.587-591, 1996.

DUGAN, S., BOGEMA, S., SCHARTZ, R.W., LAPPAS, N.T. Stability of drugs of abuse in urine samples stored at -20 degrees C. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.18, p.391-396, 1994.

ELLERBE, P., TAI, S.S.C., CHRISTENSEN, R.G., ESPINOSA-LENIZ, R., PAULE, R.C., SANDER, L.C., SNIEGOSKI, L.T., WELCH, M.J. WHITE, E. The certification of cocaine and benzoylecgonine in a human urine standard reference material. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.16, p.158-162, 1992.

ELSOHLY, M.A., JONES, A.B. Drug testing in the workplace: could a positive test for one of mandated drug be for reasons other than illicit use of the drug? *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.19, p.450-458, 1995.

- FALK, P.M., HARRISON, B.C. Use of DB-1 capillary columns in the GC/FID analysis of benzoylecgonine. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.9, p.273-274, 1985.
- FROLDI, R., GAMBARO, V., MARIANI, R., PISONI, F., PROCACCIANTI, P. Rapid quantitation of cocaine and benzoilecgonine in urine by "on column" capillary gas chromatography after "Extrelut[®]" extraction. *II Farmaco*, Pavia, v.39, n.12, p.417-23, 1984.
- GALDURÓZ, J.C.F., NOTO, A.R., CARLINI, E.A. *IV Levantamento sobre o uso de drogas entre estudantes de 1º e 2º graus em 10 capitais brasileiras-1997*. São Paulo: CEBRID, 1997.
- GALLOWAY, M.P. Neurochemical interations of cocaine with dopaminergic systems. *Trends Pharmacol. Sci.*, Amsterdam, v.9, p.451-454, 1988.
- GARSDIE, D., GOLDBERGER, B.A., PRESTON, K.L., CONE, E.J. Rapid liquid-liquid extraction of cocaine from urine for gas chromatographic-mass spectrometric analysis. *J. Chromatogr. B: Biomed. Appl.*, Amsterdam, v.692, p.61-65, 1997.
- GAWIN, F.H. Laboratory assesment in treatments of substance abuse: utilization and effects on treatment design. *Clin. Chem.*, Washington, v.33, n.11B, p.95B-100B, 1987.
- GAWIN, F.H., ELLINWOOD JR, E.H. Cocaine and other stimulants: actions abuse and treatment. *N. Engl. J. Med.*, Boston, v.318, p.1173-1182, 1988.

- GAWIN, F.H. Chronic neuropharmacology of cocaine: progress in pharmacotherapy. *J. Clin. Psychiatry*, Memphis, v.49, suppl.2, p.11-16, 1988.
- GERLITS, J. GC/MS quantitation of benzoylecgonine following liquid-liquid extraction of urine. *J. Forensic Sci.*, Philadelphia, v.38, n.5, p.1210-1214, 1993.
- GIBB, R.P., COCKERHAM, H., GOLDFOGEL, G.A., LAWSON, G.M., RAISYS, V.A. Substance abuse testing of urine by GC/MS in scanning mode evaluated by proficiency studies, TLC/GC, and EMIT. *J. Forensic Sci.*, Philadelphia, v.38, n.1, p.124-133, 1993.
- GLASTRUP, J. Diazomethane preparation for gas chromatographic analysis. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v.827, p.133-136, 1998.
- GOLDBERGER, B.A., CONE E.J. Confirmatory tests for drugs in the workplace by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v.674, p.73-80, 1994.
- GONZALES, M.L., CARNICERO, M., DE LA TORRE, R., ORTUNO, J., SEGURA, J. Influence of injection technique on the thermal degradation of cocaine and its metabolites in gas chromatography. *J. Chromatogr. B: Biomed. Appl.*, Amsterdam, v. 664, p.317-327, 1995.
- GOODMAN, L.S., GILMAN, A. *The pharmacological basis of therapeutics*. 6.ed. New York: Macmillan Publishing, p.307-308, 1980.
- GRAAS, J.E., WATSON, E. The GC/MS determination of benzoylecgonine in urine following an extractive alkylation technique. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.2, p.80-82, 1978.

- GRIESEMER, E.C., LIU, Y., BUDD, R.D., RAFTOGIANTS, L., NOGUSHI, T.T. The determination of cocaine and its major metabolite, benzoylecgonine, in postmortem fluids and tissues by computerized gas chromatography/mass spectrometry. *J. Forensic Sci.*, Philadelphia, v.28, n.4, p.894-900, 1983.
- GUIMARÃES, I.M. Determinação do período de detecção de benzoilecgonina urinária em usuários de cocaína por imunofluorescência polarizada. São Paulo, 1998. 107p. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).
- HAMILTON, H.E., WALLACE, J.E., SHIMEK, E.L., LAND, P., HARRIS, S.C., CHRISTENSON, J.G. Cocaine and benzoilecgonine in humans. *J. Forensic Sci.*, Philadelphia, v.22, p.697-707, 1977.
- HENDERSON, GL. Mechanisms of drug incorporation in hair. *Forensic Sci. Int.*, Lausanne, v.63, n.1, p.19-29, 1993.
- HUESTIS, M.A., CONE, E.J. Alternative testing matrices. In: KARCH, S.B. ed. *Drug Abuse Handbook*. Boca Raton: CRC Press, 1998, p.799-857.
- ISENSCHIMID, D.S., FISCHMAN, M.W., FOLTIN, R.W., CAPLAN, Y.H. Concentration of cocaine and metabolites in plasma of humans following intravenous administration and smoking of cocaine. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.16, p.311-314, 1992.
- JAIN, N.C., CHINN, D.M., BUDD, R.D., SNEATH, T.S., LEUNG, W.J. Simultaneous determination of cocaine and benzoylecgonine in urine by gas chromatography with on-column alkilation. *J. Forensic Sci.*, Philadelphia, v.22, p.7-16, 1977.

- JATLOW, P.I. Drug of abuse profile: cocaine. *Clin. Chem.*, Washington, v.3, n.11B, p.66B-71B, 1987.
- JEFFCOAT, A.R., REYS, P.M., HILL, J.M., SADLER, B.M., COOK, C.E. Cocaine disposition in humans after intravenous injection, nasal insufflation (snorting) or smoking. *Drug. Metab. Dispos.*, Baltimore, v.17, p.153-159, 1989.
- JENNISON, T.A., JONES, C.W., WOZNIAK, E., URRY, F.M. The reliability of a solid-phase extraction system for the analysis of benzoylecgonine in urine. *J. Chromatogr. Sci.*, Niles, v.32, p.126-31, 1994.
- JOERN, W.A. Routine detection of benzoylecgonine in urine at sensitivity of 35ng/mL by a combination of EMIT and gas chromatography/mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.11, p.110-112, 1987.
- JOHANSON, C.E., FISCHMAN, M.W. The pharmacology of cocaine related to its abuse. *Pharmacol. Rev.*, Baltimore, v.41, p.3-52, 1989.
- KAISTHA, K.K., TADRUS, R., JANDA, R. Simultaneous detection of a wide variety of commonly abused in a urine screening program using thinlayer identification techniques. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.107, p.359-379, 1975.
- KAPUR, B.M. Drug-testing methods and clinical interpretations of test results. *Bull. Narc.*, New York, v.45, n.2, p.115-54, 1993.
- KLOSS, M.W., ROSEN, G.M., RAUCKMAN, E.J. Cocaine mediated hepatotoxicity a critical review. *Biochem. Pharmacol.* Oxford, v.33, n.2, p.169-73, 1984.

- KOGAN, M.J., VEREBEY, K.G., DEPACE, A.C., RESNICK, R.B., MULÉ, S.J. Quantitative determination of benzoylecgonine and cocaine in human biofluids by gas-liquid chromatography. *Anal. Chem.*, Washington, v.49, n.13, p.1965-1969, 1977
- KOGAN, M.J., PIERSON, D.J., DURKIN, M.M., WILSON, N.J. Thin-layer chromatography of benzoylecgonine: a rapid qualitative method for confirming the EMIT urine cocaine metabolite assays. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.490, p.236-242, 1989.
- KOONTZ, S., BASEMER, D., MACKEY, N. Detection of benzoyl ecgonine (cocaine metabolite) in urine by gas chromatography. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.85, p.75-79, 1973.
- LIU, R.H., BAUGH, L.D., ALLEN, E.E., SALUD, S.C., FENTRESS, J.G., CHADHA, H., WALIA, A.S. Isotopic analogue as the internal standard for quantitative determination of benzoylecgonine: concerns with isotopic purity and concentration level. *J. Forensic Sci.*, Philadelphia, v.34, n.4, p.986-990, 1989.
- LUNDBERG, G.D., GARRIOT, J.C., REYNOLDS, P.C., CRAVEY, R.N., SHAW, R.F. Cocaine-related death, *J. Forensic Sci.*, Philadelphia, v.22,n.2, p.307-8, 1977.
- MADDEN, J.A., POWERS, P.H. Effect of cocaine and cocaine metabolites on cerebral arteries in vitro. *Life Sci.* Elmsford, v.47, p.1109-14, 1990.
- MATSUBARA, K., MASEDA, C., FUKUI, Y. Quantitation of cocaine, benzoylecgonine and ecgonine methyl ester by GC-CI-SIM after Extrelut extraction. *Forensic Sci. Int.*, Lausanne, v.26, p.181-192, 1984.

MAURER, H.H. Systematic toxicologic analyses of drugs and their metabolites by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.580, p.3-41, 1992.

MERCK Index. 12.ed. Withehouse Station, 1996. p.415, 416.

MOFFAT, A.C. *Clarke's isolation and identification of drugs*. 2.ed. London: Pharmaceutical Press, 1986. p.489-490.

MULÉ, S.J., CASELLA, G.A. Confirmation and quantitation of cocaine, benzoylecgonine, ecgonine methyl ester in human urine by GC/MS. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.12, p.153-155, 1988.

NAPPO, S.A. Análise qualitativa do uso de cocaína: um estudo em São Paulo. In: LEITE, M.C., ANDRADE, A.G. *Cocaína e crack*. Porto Alegre: Artmed, 1999. p.205-226.

NEEDLEMAN, S.B., GOODIN, K., SEVERINO, W. Liquid-liquid extraction systems for THC-COOH and benzoylecgonine. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.15, p.179-181, 1991.

OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH ADMINISTRATION /OSHA – Occupational Safety and Health Guideline for diazomethane [Online]. Available:<http://www.osha-slc.gov/SLTC/healthguidelines/diazomethane/recognition.html>. [May, 27,2000].

OSTERLOCH, J.D., BECKER, C.E. Chemical dependency and drug testing in the workplace. *West. J. Med.*, San Francisco, v.152, n.5, p.506-513, 1990.

- PAUL, B.D., DREKA, C., SUMMERS, J.L., SMITH, M.L. One-step esterification of benzoylecgonine with dimethylformamide-dipropylacetal or dimethylformamide-diisopropylacetal in the presence of pyridine. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.20, p.506-508, 1996.
- PFLEGER, K., MAURER, H.H., WEBER, A. *Mass Spectral and GC data of drugs, poisons, pesticides, pollutants and their metabolites*. Weinheim: VCH, 1992. pt.1, p.7, 12.
- PRESTON, K.L., GOLDBERGER, B.A., CONE, E.J. Occurrence of cocaine in urine of substance abuse treatment patients. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.22, p.580-586, 1998.
- QUANDT, C.M., SOMMI, R.W., PIPKIN, T., MCCALLUM, M.H. Differenciation of cocaine toxicity: role of the toxicology drug screen. *Drug Intell. Clin. Pharm.*, Hamilton, v.22, p.582-587, 1988.
- QUEIROZ, S., ANDRADE, A.G. Uso de cocaína entre estudantes universitários. In: LEITE, M.C., ANDRADE, A.G. *Cocaína e crack*. Porto Alegre: Artmed, 1999. p.175-183.
- RAMCHARITAR, V., LEVINE, B., SMIALEK, J.E. Benzoylecgonine and ecgonine methyl ester concentrations in urine specimens. *J. Forensic Sci.*, Philadelphia, v.40, p.99-101, 1995.
- RITZ, M.C., CONE, E.J., KUCHAR, M.J. Cocaine inhibition of ligand binding at dopamine, norepinephrine and serotonin transporters: a structure activity study. *Life Sci.*, Elmsford, v.46, p.635-645, 1990.
- ROBERTS, S. M.; HARBISON, R. D.; JAMES, R. C. Inhibition by ethanol of the metabolism of cocaine to benzoylecgonine and ecgonine methyl

- ester in mouse and human liver. *Drug Metab. Dispos.*, Baltimore, v.21, p.537-41, 1993.
- SEGURA, J. Sports. In: KARCH, S.B. ed. *Drug abuse handbook*. Boca Raton: CRC Press, 1998. p.641-726.
- SEGURA, J., VENTURA, R., JURADO, C. Derivatization procedures for gas chromatographic-mass spectrometry determination of xenobiotics in biological samples, with special attention to drugs of abuse and doping agents. *J. Cromatogr. B.*, Amsterdam, v.713, p.61-90, 1998.
- SILVA, O. A. *Dopagem no esporte: guia de fármacos controlados*. São Paulo: Atheneu Editora, 1999, p.1-4.
- SILVA, O.A., ODO, S.A. Toxicologia da cocaína. In: LEITE, M.C., ANDRADE, A.G. *Cocaína e crack*. Porto Alegre: Artmed, 1999. p.88-95.
- SILVA, O.A., YONAMINE, M., ODO, S.A. Drug abuse testing in the workplace: the brazilian experience. In: CONGRESS OF TOXICOLOGY IN DEVELOPMENT COUNTRIES, 4., Antalya, 1999. *Abstracts*. Antalya: Turkish Society of Toxicology, 1999. p.211.
- SPIHELER, V.R., REED, D. Brain concentrations of cocaine and benzoilecgonine in fatal cases. *J. Forensic Sci.*, Philadelphia, v.30, p.1003-1011, 1985.
- STEWART, D.J., INABA, T., LUCASSEN, M., KALOW, W. Cocaine metabolism: cocaine and norcocaine hydrolysis by liver and serum esterases. *Clin. Pharmacol. Ther.*, St. Louis, v.25, p.464-468, 1979.

- SUKBUNTHERNG, J., WALTERS, A., CHOW, H.H., MAYERSOHN, M. Quantitative determination of cocaine, cocaethylene (ethylcocaine), and metabolites in plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v.84, n.7, p.799-804, 1995.
- TARR, J.E., MACKLIN, M. Cocaine. *Pediatr. Clin. North Am.*, Philadelphia, v.34, p.319-331, 1987.
- TAYLOR, R.W., JAIN, N.C., GEORGE, M.P. Simultaneous identification of cocaine and benzoylecgonine using solid phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.11, p.233-234, 1987.
- TOLEDO, F.C.P. Identificação de benzoilecgonina por imunofluorescência polarizada em cabelo de usuários de cocaína. São Paulo, 1999. 97p. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).
- VEREBEY, K., DEPACE, A. Rapid confirmation of enzyme multiplied immunoassay technique (EMIT) cocaine positive urine samples by capillary gas-liquid chromatography/nitrogen phosphorous detection (GCL/NPD). *J. Forensic. Sci.*, Philadelphia, v.34, n.1, p.46-52, 1989.
- VIRAG, L., JAMDAR, S., CHAO, C.R., MORISHIMA, H.O. Sensitive assay for cocaine and benzoylecgonine using solid-phase extraction and gas chromatography. *J. Chromatogr. B: Biomed. Appl.*, Amsterdam, v.658, p.135-141, 1994.
- VOGEL, A.I. *Vogel's textbook of practical organic chemistry*. 5.ed. London: Longman Scientific & Technical, 1989. p.430-432.

VON MINDEN, D.L., D'AMATO, N.A. Simultaneous determination of cocaine and benzoylecgonine in urine by gas chromatography. *Anal. Chem.*, Washington, v.49, n.13, p.1974-1977, 1977.

WALLACE, J.E., HAMILTON, H.E., SCHWERTNER, H.A., KING, D.E., MCNAY, J.L., BLUM, K. Thin layer chromatographic analysis of cocaine and benzoylecgonine in urine. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.114, p.433-441, 1975.

WALLACE, J.E., HAMILTON, H.E., KING, D.E., BASON, D.J., SCHWERTNER, H.A., HARRIS, S.C. Gas-liquid chromatographic determination of cocaine and benzoylecgonine in urine. *Anal. Chem.*, Washington, v.48, n.1, p.34-38, 1976.

WELLS, V.E., HALPERIN, W., THUN, M. The estimated predictive value of screening for illicit drugs in the workplace. *Am. J. Public Health*, Washington, v.78, n.7, p.817-819, 1988.

WILKINSON, P., VAN DYKE, C., JATLOW, P., BARASH, P., BYCK, R. Intranasal and oral cocaine kinetics. *Clin. Pharmacol Ther.*, St. Louis, v.27, p.386-394, 1980.

WU, A.H.B., OSTHEIMER, D., CREMESE, M., FORTE, E., HILL, D. Characterization of drug interferences caused by coelution of substances in gas chromatography/mass spectrometry confirmation of targeted drug in full-scan and selected ion monitoring modes. *Clin. Chem.*, Washington, v.40, n.2, P.216-220, 1994.

YONAMINE, M., SILVA, O.A. Identificação da exposição à cocaína por cromatografia em camada delgada. *Rev. Bras. Toxicol.*, São Paulo, v.12, n.2(supl.), p.157, 1999.