UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

**Análise toxicológica de anfetaminas e benzodiazepínicos
em amostras de cabelo por cromatografia gasosa acoplada
a espectrometria de massas**

Lorena do Nascimento Pantaleão

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. Mauricio Yonamine

São Paulo

2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

**Análise toxicológica de anfetaminas e benzodiazepínicos
em amostras de cabelo por cromatografia gasosa acoplada
a espectrometria de massas**

Lorena do Nascimento Pantaleão

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. Mauricio Yonamine

São Paulo

2012

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Pantaleão, Lorena do Nascimento
P197a Análise toxicológica de anfetaminas e benzodiazepínicos
em amostras de cabelo por cromatografia gasosa acoplada a
espectrometria de massas / Lorena do Nascimento Pantaleão.
-- São Paulo, 2012.
150p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.
Orientador: Yonamine, Mauricio

1. Análise toxicológica 2. Cromatografia a gás : Análise
toxicológica 3. Espectrometria de massa : Análise toxicológica
I. T. II. Yonamine, Mauricio, orientador.

615.907 CDD

Lorena do Nascimento Pantaleão

**Análise toxicológica de anfetaminas e benzodiazepínicos em
amostras de cabelo por cromatografia gasosa acoplada a
espectrometria de massas**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Mauricio Yonamine
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Ainda não somos o que deveríamos ser, mas estamos crescendo para tal, o processo ainda não está acabado, mas em andamento.

Martinho Lutero

Aos meus pais Lourenço e Véra, e ao meu melhor amigo e amado esposo, Cristian, por estarem sempre ao meu lado compartilhando minhas alegrias e angústias e por continuarem acreditando em mim nos momentos em que até mesmo eu duvidei.

AGRADECIMENTOS

Ao *Prof Mauricio Yonamine* que aceitou a orientação deste trabalho. Não tenho como agradecer a sua enorme dedicação, paciência e disponibilidade em todas as incontáveis vezes que bati em sua porta com minhas dúvidas que não tinham fim. Eu serei eternamente grata por esta oportunidade!

Aos colegas do Laboratório de Análises Toxicológicas (LAT) e da pós-graduação, aos que já passaram e aos que ainda estão no grupo. Obrigada pela companhia, acolhida e auxílio durante esta jornada.

Aos funcionários do laboratório em especial à *Beatriz, Ângelo, Dona Luzia e Dalva* por darem sempre aquela força em todos os momentos.

Ao meu irmão e minha querida sobrinha, *M^a Cecília*, por encherem meu coração de alegria.

À minha família e todos os meus amigos que sempre estiveram ao meu lado torcendo por mim, mesmo sem entender muito bem o que eu fazia. Em especial aos *Azevedo Andrade*, minha nova família, que considero como irmãos.

À *Leila Aparecida Bonadio* pela normalização das referências bibliográficas.

À equipe da Clínica de Tratamento de Dependentes Químicos, *Vila Serena*, pela coleta das amostras e aos voluntários que as ofereceram e confiaram no nosso trabalho.

E em especial a *Deus*, pela minha vida e pela vida daqueles que eu amo!

Muito obrigada!!!!

RESUMO

Análise toxicológica de anfetaminas e benzodiazepínicos em amostras de cabelo

As anfetaminas compreendem uma série de compostos com estrutura química semelhante à feniletilamina e que apresentam atividade estimulante do sistema nervoso central. Além de substâncias anorexígenas como o femproporex e a dietilpropiona, também estão incluídas nessa classe drogas ilícitas como a metanfetamina (*ice, speed*) e a metilenodioximetanfetamina (MDMA, *ecstasy*). Essas substâncias apresentam grande potencial de abuso, podendo ser utilizadas por diversos grupos sociais como motoristas profissionais (onde são conhecidas por “rebite”), estudantes, jovens (utilizando *ecstasy* em festas denominadas “raves”) e pessoas que abusam de moderadores de apetite para o controle de peso. Interessantemente, há também a possibilidade de alguns indivíduos utilizarem anfetaminas em associação com benzodiazepínicos. Embora a comercialização dos derivados anfetamínicos tenha sido proibida no Brasil desde 2011, é de conhecimento que algumas pessoas ainda utilizam anorexígenos e recorram ao uso concomitante com benzodiazepínicos como forma de controlar a insônia provocada pelas anfetaminas. Outra situação de uso das duas substâncias ao mesmo tempo seria a de motoristas profissionais, usuários de “rebite”, que também tentariam controlar os ciclos de sono utilizando benzodiazepínicos. Em vista dessa situação, seria interessante o monitoramento do uso desses grupos de fármacos através de análises toxicológicas. As análises toxicológicas convencionais (realizadas sobremaneira em sangue e urina) geralmente fornecem uma pequena janela de detecção, o que faz com que o uso intermitente possa não ser detectado. Quando se deseja informação de uso em longo prazo ou ainda sobre os padrões de uso de determinada droga, a matriz mais eficiente para realização das análises é o cabelo. No presente projeto, métodos analíticos foram desenvolvidos visando a detecção de fármacos da classe das anfetaminas (anfetamina, metanfetamina, MDMA, MDA e femproporex) e benzodiazepínicos (diazepam, nordiazepam, clordiazepóxido, oxazepam, clonazepam e temazepam) em amostras de cabelo. A microextração em fase líquida (LPME) e a extração em fase sólida (SPE) foram utilizadas como

técnicas de preparação de amostras. Os analitos de interesse foram identificados por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). Após o desenvolvimento, otimização e validação, os métodos foram aplicados em amostras reais de voluntários suspeitos de utilizar alguma das substâncias em estudo, provenientes de um centro para tratamento de dependência química. Os resultados obtidos com a aplicação dos métodos mostraram sua eficácia para o fim que se destinam.

Palavras chave: Anfetaminas, Benzodiazepínicos, Análises Toxicológicas, Cabelo, GC-MS.

ABSTRACT

Toxicological analysis of amphetamines and benzodiazepines in hair samples

Amphetamines are a class of compounds with chemical structures similar to phenylethylamines that present stimulant activity in the central nervous system. Anorectic drugs such as fenproporex and diethylpropion and some illicit drugs as methamphetamine (ice, speed) and metilenodioximetamphetamine (MDMA, ecstasy) are also included in this class. These substances have a high abuse potential, and they can be used by various social groups, for example, professional drivers (who call them “rebites”), young students (using ecstasy in “rave” parties) and people who abuses anorectics to weight control. Interestingly, there is also a possibility of some people using anorectics and benzodiazepines in association. Although the commercialization of amphetamine derivatives has been recently banned in Brazil (2011), it is known that some people still use anorectic drugs and benzodiazepines to control insomnia induced by amphetamines. Another case of concomitant use would be professional drivers, who use “rebites”, which also try to control their sleep cycles using benzodiazepines. Because of this situation, it would be interesting to monitoring the use of these drugs by toxicological analysis. The conventional toxicological analyses (performed in most cases in blood and urine) generally provide small window detection. In this case, intermittent drug use may not be detected. When long term information about drug use is needed, the most efficient matrix to carry out the analysis is hair. In this project, analytical methods were developed for the determination of amphetamines (amphetamine, methamphetamine, MDMA, MDA and fenproporex) and benzodiazepines (diazepam, nordiazepam, chlordiazepoxide, oxazepam, clonazepam and temazepam) in hair samples. Liquid-phase microextraction (LPME) and solid phase extraction (SPE) were used as sample preparation techniques in these methods. Analites were identified by gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS). After the development, optimization and validation, the methods were applied in hair samples collected from patients of a

drug rehabilitation clinic. The results obtained with the application of the developed methods showed their efficacy for the intended purpose.

Key words: *Amphetamines, Benzodiazepines, Toxicological Analysis, Hair, GC-MS*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Principais vias de biotransformação das anfetaminas.....	30
Figura 2: Biotransformação da MDMA.....	31
Figura 3: Principais vias de biotransformação dos benzodiazepínicos.....	41
Figura 4: Biotransformação do clonazepam.....	42
Figura 5: Tempo de detecção das drogas nas principais matrizes biológicas.....	46
Figura 6: Estrutura do cabelo.....	52
Figura 7: Representação esquemática da extração em fase sólida.....	65
Figura 8: Modos de extração utilizados na microextração em fase líquida (LPME): duas fases (A) e três fases (B).....	68
Figura 9: Representação esquemática do sistema de HF-LPME para as anfetaminas em cabelo.....	77
Figura 10: Extração e detecção das anfetaminas (HF-LPME).....	78
Figura 11: Extração e detecção de benzodiazepínicos (SPE).....	83
Figura 12: Gráfico de cubo ilustrando o planejamento da extração dos benzodiazepínicos realizados para as variáveis geometricamente.....	87
Figura 13: Diagrama esquemático mostrando a relação entre as concentrações medidas em amostras branco e a estimativa de limite de detecção.....	90
Gráfico 1: Estudo da influência do tempo de agitação na análise das anfetaminas.....	96
Gráfico 2: Estudo da influência da fase aceptora na análise das anfetaminas.....	97
Figura 14: HF-LPME proposta para as substâncias do grupo das anfetaminas.....	98

Gráfico 3: Estudo da velocidade de agitação / sonicação na análise das anfetaminas.....	99
Gráfico 4: Estudo da influência da adição de NaCl na análise das anfetaminas.....	100
Figura 15: Cromatograma obtido para a análise de cabelo por HF-LPME adicionado dos padrões de anfetamina na concentração de 5,0 ng/mg	101
Figura 16: Espectro de massa da anfetamina derivatizada.....	102
Figura 17: Espectro de massa da metanfetamina derivatizada.....	102
Figura 18: Espectro de massa da MDA derivatizada.....	103
Figura 19: Espectro de massa do femproporex derivatizado.....	103
Figura 20: Espectro de massa da MDMA derivatizada.....	104
Figura 21: Análise de superfície para os benzodiazepínicos.....	116
Figura 22: Cromatograma obtido pela análise de cabelo por SPE adicionado dos padrões de benzodiazepínicos na concentração de 5,0 ng/mg.....	117
Figura 23: Espectro de massa do diazepam.....	118
Figura 24: Espectro de massa do nordiazepam derivatizado.....	118
Figura 25: Espectro de massa do oxazepam derivatizado.....	119
Figura 26: Espectro de massa do aminoclonazepam derivatizado.....	119
Figura 27: Espectro de massa do clordiazepóxido derivatizado.....	120
Figura 28: Espectro de massa do temazepam derivatizado.....	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características físico-químicas e farmacológicas das anfetaminas em estudo.....	27
Tabela 2: Características físico-químicas e farmacológicas dos benzodiazepínicos em estudo.....	38
Tabela 3: Alguns trabalhos desenvolvidos em amostras de cabelo.....	60
Tabela 4: Variáveis avaliadas na otimização da extração dos benzodiazepínicos da matriz.....	87
Tabela 5: Limites obtidos para cada analito do grupo das anfetaminas.....	106
Tabela 6: Coeficiente de Variação (CV%) correspondente às precisões intra e interensaio das anfetaminas.....	108
Tabela 7: Exatidão atribuída às anfetaminas.....	109
Tabela 8: Recuperação das anfetaminas.....	110
Tabela 9: Resultados da análise das amostras de cabelo de voluntários que relataram consumo de anfetaminas.....	112
Tabela 10: Planejamento fatorial 2^3 completo, com 5 pontos centrais, realizado para os benzodiazepínicos.....	115
Tabela 11: Limites encontrados para cada analito do grupo dos benzodiazepínicos.....	122
Tabela 12: Coeficiente de Variação (CV%) correspondente às precisões intra e interensaio dos benzodiazepínicos.....	124
Tabela 13: Exatidão atribuída aos benzodiazepínicos.....	125
Tabela 14: Recuperação dos benzodiazepínicos.....	126
Tabela 15: Resultados das análises das amostras de cabelo de voluntários que relataram uso de benzodiazepínicos.....	127

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	24
2.1 Anfetamina.....	24
2.1.1 Características.....	24
2.1.2 Toxicocinética.....	28
2.1.3 Uso Terapêutico.....	31
2.1.4 Efeitos Tóxicos.....	31
2.2 Benzodiazepínicos.....	37
2.2.1 Características.....	37
2.2.2 Toxicocinética.....	40
2.2.3 Uso Terapêutico.....	42
2.2.4 Efeitos Tóxicos.....	43
2.3 Matrizes não convencionais para análises toxicológicas.....	45
2.4 Cabelo como espécime biológico para verificar a exposição a drogas de abuso.....	49
2.5 Estrutura do cabelo.....	51
2.6 Mecanismo de incorporação de fármacos em cabelo.....	53
2.7 Aspectos analíticos da detecção de anfetaminas e benzodiazepínicos em cabelo.....	56
2.8 Extração em fase sólida	64
2.9 Microextração em fase líquida.....	65

3	OBJETIVO DO TRABALHO.....	71
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	73
4.1	Materiais.....	73
4.1.1	Reagentes.....	73
4.1.2	Soluções Padrão.....	73
4.1.3	Instrumentos.....	74
4.1.4	Equipamentos.....	74
4.1.5	Amostras.....	75
4.2	Métodos.....	75
4.2.1	Aplicação do questionário.....	75
4.2.2	Coleta de amostras.....	75
4.2.3	Preparo da amostra (descontaminação).....	76
4.2.4	Análise das Anfetaminas.....	76
4.2.4.1	LPME para anfetaminas.....	76
4.2.4.2	Condições cromatográficas.....	79
4.2.4.3	Otimização da microextração.....	80
4.2.4.3.1	Estudo da influência do tempo de extração.....	80
4.2.4.3.2	Estudo da influência da fase estacionária.....	80
4.2.4.3.3	Estudo da influência da fase aceptora.....	81
4.2.4.3.4	Estudo da influência do tipo e velocidade de agitação.....	81
4.2.4.3.5	Estudo do efeito “<i>salting out</i>”.....	81
4.2.5	Análise dos benzodiazepínicos.....	82
4.2.5.1	SPE para benzodiazepínicos.....	82

4.2.5.2	Condições cromatográficas.....	84
4.2.5.3	Otimização do método.....	85
4.2.5.3.1	Preparação do material de referência.....	86
4.2.5.3.2	Análise de superfície de resposta.....	86
4.2.6	Validação dos métodos.....	88
4.2.6.1	Limite do branco, de detecção e de quantificação.....	88
4.2.6.2	Linearidade.....	90
4.2.6.3	Precisão intraensaio e interensaio.....	92
4.2.6.4	Exatidão.....	92
4.2.6.5	Recuperação.....	93
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	95
5.1	Anfetaminas.....	95
5.1.1	Resultados da otimização do método.....	95
5.1.1.1	Estudo do tempo de extração.....	95
5.1.1.2	Estudo da fase estacionária.....	96
5.1.1.3	Estudo da fase aceptora.....	96
5.1.1.4	Estudo da intensidade de agitação.....	98
5.1.1.5	Estudo do efeito “ <i>salting out</i> ”.....	99
5.1.2	Cromatogramas característicos da análise de anfetaminas em cabelo.....	100
5.1.3	Resultados da validação do método de análise das anfetaminas.....	105
5.1.3.1	Limite de detecção e quantificação.....	105
5.1.3.2	Linearidade.....	106

5.1.3.3	Precisão intraensaio e interensaio.....	108
5.1.3.4	Exatidão.....	108
5.1.3.5	Recuperação.....	109
5.1.4	Resultados obtidos com análises toxicológicas de amostras de usuários de anfetaminas.....	111
5.2	Benzodiazepínicos.....	114
5.2.1	Resultados da otimização do método.....	114
5.2.2	Cromatogramas característicos da análise de benzodiazepínicos em cabelo.....	117
5.2.3	Resultados da validação do método.....	121
5.2.3.1	Limite de detecção e quantificação.....	122
5.2.3.2	Linearidade.....	122
5.2.3.3	Precisão intraensaio e interensaio.....	122
5.2.3.4	Exatidão.....	124
5.2.3.5	Recuperação.....	125
5.2.4	Resultados obtidos com análises toxicológicas de amostras de usuários de benzodiazepínicos.....	126
6	CONCLUSÕES.....	133
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	135
8	ANEXOS.....	149

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A anfetamina (β -fenilisopropilamina) é o protótipo de uma classe de substâncias com atividade estimulante central e periférica que incluem várias substâncias relacionadas estruturalmente e que possuem efeitos farmacológicos e tóxicos semelhantes (de La TORRE *et al*; 2004, CHIANG, 2011). Correspondem a um grupo de fármacos utilizados por décadas na terapêutica como o femproporex (Desobesi-M®) e a dietilpropiona ou anfepramona (Dualid S®; Hipofagin S®; Inibex S®; Moderine®). Alguns fármacos de uso ilícito como a metanfetamina (*ice, meth, speed, cristal*) e as derivadas do grupo do *ecstasy* como a metilenodioximetanfetamina (MDMA) e a metilenodioxianfetamina (MDA) também fazem parte do grupo. Derivados anfetamínicos já foram encontrados muitas vezes em formulações ditas “milagrosos emagrecedores 100% naturais” (LEYTON *et al.*, 2002). Todas essas substâncias têm potencial de uso abusivo, dentro de determinadas circunstâncias.

Diversos levantamentos sobre o uso de drogas indicam que os estimulantes são frequentemente utilizados de forma abusiva nas Américas. Uso bem acima da média global no período entre 2007 e 2009 foi relatado pelos seguintes países (listados em ordem de magnitude): Estados Unidos, Argentina, Brasil, México e Chile. Na América do Sul, em particular, o uso de estimulantes é frequentemente vinculado aos esforços de emagrecimento. Especificamente no Brasil, é observada uma carência de informações oficiais atualizadas sobre o uso de substâncias psicoativas, o que impede uma melhor avaliação da situação brasileira (UNODC, 2012). O dado mais recente que temos para a população do nosso país mostrou que a prevalência de uso de anfetaminas chegou a 3,8% (valor que corresponde quase ao dobro do valor encontrado no levantamento anterior) o que indica tendência crescente de uso (CEBRID, 2005).

Os inibidores de apetite do tipo anfetamínicos (anfepramona e femproporex) foram legalmente comercializadas no Brasil até dia 06 de outubro de 2011, quando a ANVISA proibiu a sua fabricação e comercialização por meio da RDC nº 52 (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Na ocasião a agência entendeu que os riscos associados ao uso destes medicamentos, somados à falta de comprovação de sua

eficácia, não justificavam a manutenção de seus registros. Com esta medida, espera-se uma redução da prevalência desta substância na população brasileira.

Os benzodiazepínicos formam outra classe de fármacos largamente utilizados de forma abusiva e apresentam efeitos sedativo/hipnóticos, tranquilizantes e ansiolíticos (BONO, 2007). Correspondem a um grupo de substâncias como: diazepam (Diaz-NQ®, Valium®, Dienpax®), lorazepam (Lorium®, Lorax®), flunitrazepan (Rohypnol®), clordiazepóxido (Psicosedin®); bromazepan (Somalium®, Lexotam®); clonazepam (Rivotril®, Clopan®), temazepam (Restoril®) entre outros. Todos esses são comercializadas sob a forma de medicamento e possuem potencial de dependência (ORLANDI e NOTO, 2005).

Enquanto o uso de substâncias psicoativas ilícitas entre homens é, em geral, muito maior que entre mulheres, o uso não terapêutico de tranquilizantes e sedativos nas Américas e na Europa é uma exceção a essa regra, com uso duas vezes maior entre mulheres do que entre homens (UNODC, 2012). Estudos feitos no Brasil indicam prevalência de 5,6% da população e, assim como para os anfetamínicos, observa-se uma maior incidência de utilização por mulheres (CEBRID, 2005).

Além disso, quanto ao uso, os benzodiazepínicos “disputam” as três primeiras posições com a maconha e os solventes em todas as regiões do Brasil. Estima-se que o consumo de benzodiazepínicos dobre a cada cinco anos. Em Belo Horizonte (MG), por exemplo, o uso de agentes ansiolítico-hipnóticos em idosos atingiu índices de 95% dos entrevistados (CEBRID, 2005; AUCHEWSKI *et al.*, 2004).

Os anfetamínicos apresentam um alto potencial de abuso, propiciando o desenvolvimento de farmacodependência. A tolerância aos efeitos subjetivos e anorexígenos é instalada rapidamente; o usuário pode apresentar confusão mental, depressão, fadiga e agressividade. Nos casos de overdose, a toxicidade é uma extensão dos efeitos farmacológicos ocorrendo disritmias cardíacas, hipertensão, hipertermia, falência aguda renal, acidose metabólica e coma (CHIANG, 2011, UNODC 2012).

Por outro lado, os benzodiazepínicos são os sedativos mais utilizados no mundo ocidental pela sua relativa eficácia e segurança; porém, muitas vezes, verifica-se o uso não médico dessas substâncias em associação com etanol ou por

poliusuários de drogas (GJERDE *et al*, 1992; GUNNAR *et al*, 2005). Esse grupo de fármacos também é conhecido pela sua capacidade de provocar amnésia anterógrada e prejuízo nas funções neuromotoras (resultado da propriedade de induzir sedação), podendo resultar em risco aumentado de acidentes de trânsito ou em casos de trabalhadores que operam máquinas complexas, além da capacidade de induzir dependência (MINTZER & GRIFFITHS, 2007; GHONEIM, 2004; GUNNAR *et al*, 2005). Outro destaque que deve ser dado a esses fármacos é o fato do seu uso como “drogas facilitadoras de crimes” (NEGRUSZ & GAENSSLEN, 2003).

Além disso, há evidência de usuários que fazem uso concomitante de anfetaminas e benzodiazepínicos. Existem algumas situações em que se pode caracterizar o uso abusivo desses dois grupos de substâncias. Como dito anteriormente, o Brasil é um grande consumidor de anorexígenos do mundo. Era comum o uso dessas duas substâncias em associação entre pessoas que faziam controle de peso. Sendo assim, as anfetaminas seriam utilizadas como supressores de apetite para perder peso e os benzodiazepínicos para evitar os efeitos colaterais (ansiedade, nervosismo etc.) provocados pelas anfetaminas.

Em outra situação, há indícios de que motoristas profissionais venham utilizando este tipo de recurso para controlar o estado de sono/vigília devido às extenuantes jornadas de trabalho a que se submetem. Neste caso, os compostos anfetamínicos seriam utilizados de forma abusiva pelas propriedades estimulantes (quando estes precisam permanecer acordados e afastar a fadiga) e os benzodiazepínicos pelas propriedades sedativas (quando precisam dormir, já que um dos efeitos das anfetaminas é provocar insônia). De fato, a verificação do uso abusivo por motoristas, não somente de anfetaminas, mas outras substâncias psicoativas, como os benzodiazepínicos tem sido de interesse em outros países.

O uso de anfetaminas (incluindo os derivados do *ecstasy*) entre universitários também merece destaque girando em torno de 7,5% e 13,8% respectivamente. Muitos desses são poliusuários de drogas, o que leva a crer que existe possibilidade de uso concomitante dessas substâncias também neste grupo (Obid/Senad/USP 2010).

Diante do exposto, fica evidente a necessidade de se realizar o controle do uso não médico para estes dois grupos de fármacos.

Recentemente há uma tendência crescente de se aplicar análises toxicológicas em serviços de proteção à saúde, no ambiente de trabalho, no esporte e em investigação forense. A amostra biológica mais utilizada para esta finalidade é a urina devido à simplicidade da coleta, além de outras vantagens como altos níveis de substâncias excretadas por esta via. Entretanto, outras matrizes menos usuais podem ser utilizadas como sangue, saliva, suor, unhas e cabelo (SILVA & YONAMINE, 2004; MOELLER, 2008).

As análises de cabelo possuem algumas vantagens devido a sua ampla janela de detecção, permitindo uma investigação retrospectiva da exposição a certas substâncias psicoativas. O cabelo também possui a vantagem de permitir supervisão de coleta sem constrangimentos e não se degradar facilmente como outros fluidos biológicos (BALIKOVÁ, 2005). Em termos práticos, os testes em cabelo complementam as análises realizadas em matrizes convencionais, ou seja, as análises de sangue ou urina fornecem informação de curto prazo sobre o uso de drogas pelo indivíduo enquanto o histórico de uso (longo prazo) apenas pode ser verificado pela análise de cabelo. Além disso, esta matriz é capaz de fornecer informações que possibilitem diferenciar uma exposição única à determinada substância de uso crônico (KINTZ, 2011).

Geralmente, os métodos analíticos encontrados na literatura são baseados em extração convencional líquido-líquido (LLE) ou extração em fase sólida (SPE) como técnica de preparo de amostras. Nos últimos anos, tem sido observado como tendência em análises toxicológicas, sempre que possível, o emprego de novas técnicas de preparação de amostras que valorizem a simplicidade e praticidade, a menor manipulação da amostra e a diminuição do volume de solventes, características encontradas para a técnica de LPME (*liquid phase microextraction*) (PEDERSEN-BJERGAARD & RASMUSSEN, 2005).

Desta forma, a proposta deste estudo foi desenvolver análises confirmatórias para os fármacos da classe das anfetaminas (anfetamina, metanfetamina, MDMA, MDA e femproporex) e dos benzodiazepínicos (diazepam, nordiazepam, clordiazepóxido, oxazepam, clonazepam e temazepam) em amostras de cabelo. Esta dissertação foi formatada de acordo com as novas regras preconizadas pela ABNT (nova norma válida a partir de abril de 2011).

REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Anfetaminas

2.1.1 Características

O termo anfetamina se refere a um grupo de estimulantes que incluem a anfetamina, metanfetamina, femproporex, metilenodioxianfetamina (MDA) e metilenodioximetanfetamina (MDMA) entre outras. Esses compostos de caráter básico e baixo peso molecular são derivados simpatomiméticos da feniletilamina, que possuem atividade estimulante tanto central quanto periférica. Causam supressão de apetite e produzem estimulação tanto no sistema nervoso central (SNC) quanto no sistema cardiovascular. Esses efeitos são mediados pelo aumento das concentrações sinápticas de norepinefrina e dopamina em decorrência da estimulação da liberação deste neurotransmissor bem como a inibição de sua recaptação nos neurônios pré-sinápticos (JENKINS, 2007, CHIANG, 2011). É considerada a segunda classe de drogas mais consumidas de forma ilícita, depois da *Cannabis* (WILLS, 2005).

A anfetamina, composto protótipo da classe das feniletilaminas, foi sintetizada inicialmente por volta de 1880 e, desde então foi utilizada em uma diversidade de tratamentos (na asma, como analéptico na intoxicação por barbitúricos; como supressor de apetite, na narcolepsia; no transtorno de déficit de atenção em crianças ou na síndrome da hiperatividade infantil, entre outros) apresentando tendência crescente de uso até os anos 30. (WILLS, 2005; HERNÁNDEZ & FERNÁNDEZ, 1998; CHIANG, 2011). Durante a II Guerra Mundial, as anfetaminas foram administradas a soldados de forma indiscriminada com a finalidade de aumentar o estado de alerta e a agressividade além de reduzir o cansaço. O fármaco também era administrado em trabalhadores de fábricas de apoio ao exército, demonstrando ser mais efetiva em trabalhos mais monótonos. Mas foi só na década de 70 que se tornaram as drogas estimulantes mais consumidas no mundo (HERNÁNDEZ & FERNÁNDEZ, 1998; YUKDO, 2003; WILLS, 2005, CHIANG, 2011).

As anfetaminas também foram amplamente utilizadas para tratamento de doenças comuns como a rinite. O fácil acesso a essas substâncias facilitava seu uso de forma abusiva com a finalidade de se obter efeitos estimulantes. Nos anos 1960, o uso de anfetaminas cresceu exponencialmente, sendo comercializada como “droga de rua” sob o nome de *speed* (WILLS, 2005).

Também são utilizadas de forma abusiva por atletas constituindo-se *doping*, constando hoje, na lista de substâncias proibidas pela Agência Mundial Antidoping. Um exemplo do perigo do uso dessas substâncias para aumentar o rendimento foi a morte do ciclista britânico Tom Simpson no “*Tour de France*” (HERNÁNDEZ & FERNÁNDEZ, 1998).

Em geral, os usuários buscam os efeitos estimulantes das anfetaminas por razões diversas: estudantes as utilizam pela propriedade de evitar a fadiga, permitindo estudar por períodos mais longos; trabalhadores com jornadas extenuantes e repetitivas também lançam mão desse recurso para a execução de seus trabalhos; atletas também a utilizam para permitir treinos mais longos por mascararem os sinais de fadiga. As anfetaminas também são empregadas por aqueles que utilizam essas substâncias pelos efeitos de euforia e bem estar que elas provocam como melhora do humor, da autoestima ou aumentar a atividade e o prazer sexual (CHIANG, 2011, WILLS, 2005; HERNÁNDEZ & FERNÁNDEZ, 1998).

Por volta dos anos 1980, a metanfetamina começou a ser produzida, provavelmente no leste asiático. O procedimento para a obtenção da droga gerava, como produto final, cristais incolores que pareciam pequenos cristais de gelo, motivo pelo qual recebeu o nome de “*ice*” no mercado ilícito. Entretanto, essa substância é encontrada mais comumente na forma de pó quando recebe outros nomes como “*cristal*” ou “*meth*”. A maior parte dos laboratórios clandestinos utilizados para a produção de metanfetamina está localizada no sudeste da Ásia, na América Central e América do Norte (WILLS, 2005).

A MDMA ou 3,4-metilenodioximetanfetamina, também conhecida como “*ecstasy*” ou “*E*”, foi sintetizada inicialmente pela *Merck Pharmaceutical* pouco antes da 1ª Guerra Mundial como supressora de apetite. Porém, outras substâncias também podem entrar na composição da droga “de rua”, incluindo 3,4-metilenodioxietilamfetamina (MDEA), 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA), sendo o

MDMA o principal constituinte dos comprimidos encontrados no mercado ilícito (XAVIER *et al.*, 2007; McDERMOTT, 2011).

Nos anos 1970, o *ecstasy* se tornou amplamente disponível nos EUA e indicado como adjuvante em farmacoterapia sobremaneira no campo de relacionamentos interpessoais e orientação matrimonial, pois se considerava que a MDMA tinha a capacidade de promover a harmonia emocional e reduzir conflitos interpessoais. Em 1985, o uso ilegal de *ecstasy* alcançou proporções tão grandes nos EUA que ele foi declarado ilegal. No Reino Unido, desde 1977, todas as substâncias derivadas da anfetamina (incluindo a MDMA) já eram consideradas ilegais sendo incorporada à Lista I do Convênio de Substâncias Psicotrópicas e classificada como droga de abuso (WILLS, 2005; YUKDO, 2003).

O Convênio de Substâncias Psicotrópicas realizado inicialmente em 1961, em Nova York, de abrangência internacional, foi ratificado junto ao Secretário Geral da Organização das Nações Unidas (18/06/1964). No Brasil, esta convenção foi executada no através do Decreto 54.216 (Agosto/1964).

Algumas características das anfetaminas estudadas neste trabalho estão resumidas na Tabela 1:

Tabela 1: Características físico-químicas e farmacológicas das anfetaminas em estudo. Fonte: Clarke's Analysis of drugs and poisons, 2011.

	Anfetamina	Femproporex	Metanfetamina	MDMA	MDA
Estrutura química
Nome IUPAC	1-Phenylpropan-2-amine	3-(1-Phenylpropan-2-ylamino)propanenitrile	(2S)-N-Methyl-1-phenylpropan-2-amine	1-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-N-methylpropan-2-amine	1-(1,3-Benzodioxol-5-yl)propan-2-amine
Fórmula molecular	$C_9H_{13}N$	$C_{12}H_{16}N_2$	$C_{10}H_{15}N$	$C_{11}H_{15}NO_2$	$C_{10}H_{13}NO_2$
CAS	300-62-9	15686-61-0	537-46-2	42542-10-9	4764-17-4
pKa	9,9	----	9,87	*(pH 9) Benzeno 9,41 Hexano 8,69 Acetato etila 8,84	9,67
logP	1,8	1,7	2,07	----	1,64
Classificação Geral	Estimulante Central; Simpatomimético	Anorexígeno	Estimulante Central	Alucinógeno, Estimulante	Alucinógeno

A anfetamina e a metanfetamina (principais membros da classe das anfetaminas) ocorrem como estereoisômeros, sendo encontradas na forma de seu isômero D- e L- formando uma mistura racêmica. A forma D- possui atividade estimulante significativa com atividade central 3 a 4 vezes maior que a do isômero L. Também é importante observar que as formas enantioméricas D- e L- não se diferenciam apenas em sua atividade farmacológica, mas também em sua farmacocinética (KRAEMER & MAURER, 1998; JENKINS, 2007; HERNÁNDEZ & FERNÁNDEZ, 1998; WILLS, 2005, CHIANG, 2011).

A MDMA é um composto derivado da metanfetamina, que apresenta propriedades estimulantes, semelhantes às anfetaminas, e alucinógenas, semelhantes à mescalina. A MDMA interfere em vários neurotransmissores causando liberação de serotonina (5-hidroxitriptamina), dopamina e norepinefrina no sistema nervoso central, os quais estão envolvidos no controle do humor, termorregulação, sono, apetite e no controle do sistema nervoso autônomo (XAVIER *et al.*, 2007).

As substâncias do grupo *ecstasy* ganharam grande popularidade em festas “rave”, pois produzem sensações de euforia, energia e desejo de sociabilização, características pelas quais alguns autores atribuíram a ela o termo “entactógenas” (KRAEMER & MAURER, 1998; KRAEMER & MAURER, 2002, WILLS, 2005).

2.1.2 Toxicocinética

Quando usadas de forma abusiva a anfetamina pode ser administrada por via oral, intranasal, pulmonar ou injetada. É comum serem administradas continuamente pelos usuários a fim de obter a manutenção dos efeitos desejados de forma semelhante a usuários de cocaína. Entretanto, o intervalo entre as administrações costuma ser maior que os de outros estimulantes como a cocaína devido aos efeitos mais duradouros da anfetamina e seus derivados (JENKINS, 2007; WILLS, 2005). O seu controle é imprescindível a fim de evitar o abuso (CHIANG, 2011).

A via preferencial de utilização do *ecstasy* é a oral, porém, já foram reportados casos nos quais a droga foi injetada. A droga geralmente é encontrada na forma de comprimidos brancos ou quase brancos podendo ter marcações em relevo e ser encontrada no mercado ilícito em forma de cápsula. A dose típica para usuários inicialmente é de 75-100 mg, porém, devido ao desenvolvimento de tolerância, a dose precisa ser gradualmente aumentada para a obtenção dos efeitos desejados pelo usuário. Alguns usuários chegam a tomar várias doses da droga repetidamente num intervalo de poucas horas a fim de se manterem sem dormir por até dois dias (WILLS, 2005).

As anfetaminas apresentam boa absorção através de membranas biológicas o que as tornam absorvíveis por via oral. Devido à sua lipossolubilidade, elas atravessam a barreira hematoencefálica e placentária (HERNÁNDEZ & FERNÁNDEZ, 1998; CHIANG, 2011). Esses fármacos parecem demonstrar um comportamento linear que se encaixa no modelo de distribuição monocompartimental quando na faixa de dose entre 20 a 200 mg (JENKINS, 2007).

Após absorção, aproximadamente 16 a 20% das anfetaminas encontram-se ligadas a proteínas plasmáticas. Há estudos indicando que o volume de distribuição difere entre exposição única (3,5 a 4,6 L/Kg) e frequente (6,1 L/Kg) sendo considerado um volume de distribuição elevado em ambos os casos (JENKINS, 2007; CHIANG, 2011).

A excreção de anfetamina depende do pH urinário. Quando se administra 5 mg de D-L-anfetamina em homens adultos saudáveis observa-se eliminação por via urinária em um intervalo de 3 a 4 dias. Aproximadamente 70% da dose é eliminada em 24 h na urina sendo 30% na forma inalterada. Há relatos de dependentes que ingerem a própria urina em função disto. A alcalinização da urina prejudica a eliminação dos derivados anfetamínicos (JENKINS, 2007; WILLS, 2005; HERNÁNDEZ & FERNÁNDEZ, 1998).

A meia vida de ambos os isômeros encontradas nas formas comerciais é de aproximadamente 12-14 horas podendo chegar a 34 horas e a proporção da substância metabolizada é dependente do pH urinário. São muito lipossolúveis e passam para o leite materno onde são encontradas em concentrações mais elevadas que no sangue (WILLS, 2005; CHIANG, 2011).

As anfetaminas são biotransformadas em outros compostos ativos da classe durante o processo de biotransformação (Figura 1). O conhecimento da toxicocinética é essencial para o sucesso na interpretação de resultados em análises toxicológicas influenciando diretamente na avaliação final e emissão de laudos analíticos (CODY, 2002; KRAEMER et al, 2004).

Figura 1: Principais vias de biotransformação das anfetaminas

Assim como as anfetaminas, a MDMA é biotransformada em outros metabólitos ativos (principalmente a MDA). A biotransformação da MDMA está esquematizada na Figura 2 (COSTA, 2004; CAPELA et al, 2009).

Figura 2: Biotransformação da MDMA

Estas quatro substâncias, incluindo a HMMA (4-hidroxi-3-metoxi-metanfetamina) e HMA (4-hidroxi-3-metoxianfetamina), são excretadas na urina, embora não existam muitos dados que correlacionem a concentração desses produtos de biotransformação com as doses administradas. Observa-se que, independente da dose administrada de MDMA, cerca de 50% a 65% é excretada inalterada na urina em 24 horas, além da presença de consideráveis proporções de seus metabólitos (COSTA, 2004; CAPELA et al, 2009).

2.1.3 Uso Terapêutico

Os estimulantes orais quando utilizados em programas de redução de peso possuem eficácia curta porque a tolerância é rapidamente desenvolvida (O'BRIEN, 2007).

No dia 10 de outubro de 2011, foi publicada no Diário Oficial da União a resolução da ANVISA RDC nº 52 que proíbe a produção, prescrição, distribuição e comercialização de todas as anfetaminas presentes no mercado, sendo todos os registros de medicamentos contendo estes princípios ativos cancelados. Portanto,

no Brasil, oficialmente, não há mais indicação terapêutica oficial para estes fármacos (ANVISA, 2011).

A dependência anfetamínica geralmente tem origem no uso não médico da substância, porém, há relatos de casos de dependência em pessoas que utilizaram o fármaco inicialmente com finalidades terapêuticas. Muitas pessoas, especialmente mulheres de meia idade que consomem estas substâncias para perder peso podem desenvolver rápida tolerância, sendo necessário aumentar a dose (HERNÁNDEZ & FERNÁNDEZ, 1998).

Entre as principais ações terapêuticas das anfetaminas encontram-se o tratamento do TDAH (transtorno do déficit de atenção equivalente a um transtorno mental mínimo), narcolepsia e obesidade (sendo este último um tratamento bastante contestado). Por se tratar de fármacos que causam acentuada tolerância com risco de dependência, sua utilização deve ser muito bem avaliada pelo prescritor em relação ao risco/benefício. A administração dos fármacos desta classe pode resultar em acidente vascular cerebral hemorrágico em pacientes com doença subjacente, além do que o uso prolongado pode desencadear esquizofrenia (WESTFALL & WESTFALL, 2007).

2.1.4 Efeitos Tóxicos

Os efeitos toxicológicos dos derivados anfetamínicos são complexos, mas basicamente os análogos anfetamínicos são conhecidos por aumentar a concentração de aminas biogênicas, incluindo dopamina e norepinefrina, no sistema nervoso central (SNC). Este é o mecanismo de ação aceito para indução de distúrbios de movimento (hiperestimulação) bem como para a psicose anfetamínica associados ao abuso dessa substância. As anfetaminas possuem capacidade de aumentar as concentrações sinápticas destes neurotransmissores por diferentes mecanismos, que incluem aumento da liberação de dopamina na fenda sináptica devido à alteração do pH das vesículas armazenadoras de dopamina permitindo sua liberação. Outro mecanismo aceito é a inibição da recaptação dessas substâncias via transporte ativo ou por atividade do transportador de dopamina dependente de

canal (DOWNES & WHYTE, 2005; RIDDLE *et al.*, 2005; O'BRIEN, 2007, CHIANG, 2011; YAMAMOTO *et al.*, 2010).

Embora altas doses de anfetamínicos possam provocar liberação de serotonina, os efeitos nos receptores serotoninérgicos são muito mais significativos para as anfetaminas alucinógenas (grupo *ecstasy*). A concentração de MDMA requerida para estimular a liberação de serotonina é dez vezes menor que a requerida para a liberação de dopamina ou norepinefrina (O'BRIEN, 2007).

Como consequência da liberação de catecolaminas, há poderosas ações estimulantes tanto no sistema nervoso central (SNC) quanto nos receptores periféricos alfa e beta adrenérgicos, resultando em estado de alerta aumentado, aumento das pressões sistólica e diastólica, aumento da atividade locomotora, estimulação do centro respiratório bulbar e na redução da sensação de fadiga e aumento do efeito anorexígeno (WESTFALL & WESTFALL, 2007).

O mecanismo de dependência a essas substâncias parece estar relacionado especificamente à ação da dopamina e das ações desta amina sobre estruturas da via mesolímbica (*nucleus accumbens*, córtex frontal etc.) (HERNÁNDEZ & FERNÁNDEZ, 1998). Os efeitos da serotonina e da dopamina no sistema mesolímbico são responsáveis pela alteração da percepção e pelo comportamento psicótico, paranoia e agressividade verificados na intoxicação (CHIANG, 2011; CHUNG *et al.*, 2008).

As anfetaminas apresentam um fenômeno chamado taquifilaxia (tolerância aguda), que consiste na obtenção de respostas menores a substâncias depois de repetidas administrações. A explicação para este fenômeno se encontra em seu próprio mecanismo de ação. Se as administrações são contínuas e próximas umas das outras ocorrerá um esvaziamento progressivo dos neurotransmissores adrenérgicos e dopaminérgicos que podem chegar ao esvaziamento completo (HERNÁNDEZ & FERNÁNDEZ, 1998).

Os efeitos tóxicos agudos das anfetaminas são geralmente extensões de suas ações farmacológicas e, em geral, resultam de superdosagem. Os efeitos sobre o SNC consistem comumente em inquietação, tontura, tremor, reflexos hiperativos, loquacidade, tensão, irritabilidade, insônia, febre e, algumas vezes, euforia. Pode ocorrer confusão, agressividade, alterações da libido, ansiedade,

delírio, alucinações paranoides, estados de pânico e tendências suicidas ou homicidas, sobretudo em pacientes com transtornos mentais. Todavia, esses efeitos psicóticos podem ser produzidos em qualquer indivíduo, se forem ingeridas quantidades suficientes da substância por período prolongado. Em geral, a estimulação central é seguida de fadiga e depressão. Os efeitos cardiovasculares são comuns e incluem cefaleia, calafrios, palidez ou rubor, palpitação, arritmias cardíacas, dor anginosa, hipertensão ou hipotensão e colapso circulatório. Pode ocorrer sudorese excessiva. Os sintomas gastrintestinais incluem boca seca, gosto metálico, anorexia, náuseas, vômitos, diarreia e cólicas abdominais. Em geral, a intoxicação fatal termina em convulsões e coma, e os principais achados patológicos consistem em hemorragias cerebrais (WESTFALL & WESTFALL, 2007; HERNÁNDEZ & FERNÁNDEZ, 1998; WILLS, 2005). Os mecanismos moleculares clássicos pelos quais estes eventos se desencadeiam incluem estresse oxidativo, excitotoxicidade e disfunção mitocondrial (YAMAMOTO *et al*, 2010).

A intoxicação crônica por anfetaminas é caracterizada por sintomas semelhantes aos da superdosagem aguda. Todavia, as condições mentais anormais são mais comuns, levando ao surgimento de psicose anfetamínica, caracterizada por alucinações tácteis e ilusões paranoides, confusão, delírio e pânico, podendo atuar como fator precipitante de esquizofrenia incipiente (UNODC, 2012; WESTFALL & WESTFALL, 2007).

O *ecstasy* é frequentemente utilizado em associação com outras drogas como, por exemplo, o LSD (dietilamina do ácido lisérgico), o GHB (ácido hidróxi-aminobutírico) e mesmo a anfetamina. Este fato somado à incerteza do conteúdo dos comprimidos que circulam no mercado ilícito (no qual é comum a presença de adulterantes), torna difícil prever os efeitos adversos resultantes do abuso (WILLS, 2005).

Alguns efeitos tóxicos clássicos associados à MDMA como arritmia, hipertermia, rabdomiólise, coagulação intravascular disseminada e síndrome serotoninérgica são verificados em pacientes após administração aguda de altas doses de MDMA. Um dos efeitos mais marcantes é a hipertermia, quadro clínico no qual a temperatura corporal do usuário pode ficar acima de 43°C e que constitui uma importante emergência médica. Geralmente, é observada excessiva ingestão de

água com consequente perda de sódio, que somado à excessiva liberação de vasopressina (ADH), resultante do aumento de serotonina, pode resultar em alterações eletrolíticas conhecidas como hiponatremia, progredindo para coma e morte em casos extremos (SCHIFANO, 2004; BAYLEN & ROSENBERG, 2006; XAVIER *et al.*, 2008). Embora ainda controverso, a literatura mostra que no longo prazo existe o risco de efeitos neuropsiquiátricos irreversíveis, com toxicidade aos neurônios serotoninérgicos em diferentes espécies animais (BOOT *et al.*, 2000; ROISER *et al.*, 2007; WIN *et al.*, 2008). Acredita-se que a atividade da serotonina cerebral seja reduzida em usuários de *ecstasy*. Isso é evidenciado pelas concentrações reduzidas do metabólito da substância, o ácido 5-hidroindol acético no líquido sinovial (WILLS, 2005).

Os efeitos observados após a administração dessas substâncias podem ser agrupados em dois grupos: aqueles devido à sua ação no sistema nervoso simpático e as que são consequência de sua ação em nível de sistema nervoso central (HERNÁNDEZ & FERNÁNDEZ, 1998).

A maioria dos efeitos em nível de sistema nervoso central (anorexígeno, aumento da atenção e estimulação motora) é mediada por um aumento na liberação de noradrenalina. Contudo, os efeitos que são observados quando doses maiores são administradas como conduta estereotipada, estimulação motora, alteração na percepção e outros quadros psicóticos são devidos ao aumento da liberação de dopamina e serotonina (YAMAMOTO *et al.*, 2010).

É difícil determinar a dose tóxica de anfetamina capaz de produzir os efeitos reportados, devido ao fenômeno da tolerância. Além disso, observa-se tolerância cruzada com outros agentes simpatomiméticos. É raro o aparecimento de efeitos tóxicos em doses menores que 15 mg (porém existem casos reportados com a ingestão de 2 mg). Por outro lado, doses elevadas podem ser toleradas por usuários crônicos. Para esses indivíduos, doses de 400 a 500 mg podem não ser letais. O tratamento da intoxicação aguda por anfetaminas consiste, além do tratamento de suporte, na acidificação da urina com cloreto de amônio para se favorecer sua eliminação. Em casos de estimulação central intensa, podem ser utilizados sedativos para reversão dos efeitos (HERNÁNDEZ & FERNÁNDEZ, 1998; CHIANG, 2011).

Casos de morte por intoxicação pelos derivados anfetamínicos geralmente ocorrem em decorrência de hipertermia, arritmias e hemorragia intracerebral (CHIANG, 2011).

O abuso crônico das anfetaminas é caracterizado por fases de autoadministração de doses repetidas durante horas ou dias seguidas por períodos de sono profundo e prolongado depois do qual, o indivíduo apresenta-se hiperfágico, disfórico e com grande sensação de cansaço físico. A tolerância aos efeitos simpaticomiméticos (taquicardia, hipertermia, hipertensão) é menor do que as que induzem efeitos psicoestimulantes, sendo o uso repetido um fator de risco para outras complicações orgânicas. Além do mais, é muito frequente que os usuários habituais de anfetaminas utilizem sedativos para reduzir a sensação de disforia induzida pelo uso prolongados da substância gerando um risco de adição ou potenciação dos efeitos tóxicos caso não se alcance o seu mascaramento (YAMAMOTO *et al*, 2010; HERNÁNDEZ & FERNÁNDEZ, 1998). Vasculites necrosantes também estão associadas ao abuso crônico destas substâncias além de problemas em válvulas cardíacas e hipertensão pulmonar primária (CHIANG, 2011).

Existem evidências de que a toxicidade induzida pelas anfetaminas vai além do dano envolvido com receptores neuronais dopaminérgicos e serotoninérgicos, atingindo até mesmo células endoteliais. Os mecanismos exatos e os danos associados ainda necessitam de elucidação. Entretanto, os danos se estendem a processos excitotóxicos, proteolíticos, inflamatórios e biogênicos que contribuem com o processo de estresse oxidativo (YAMAMOTO *et al*, 2010).

A interrupção do uso crônico das substâncias desse grupo pode acarretar um efeito rebote semelhante ao observado em usuários de cocaína e ocorre em, aproximadamente, 90% dos usuários. É caracterizado por depressão, “fissura” pela substância, ansiedade, insônia, cansaço físico, paranoia e irritabilidade. Os sintomas são mais intensos nas primeiras semanas de abstinência e podem persistir por meses (WILLS, 2005).

2.2 Benzodiazepínicos

2.2.1 Características

Os benzodiazepínicos começaram a ser utilizados na década de 1960. O clordiazepóxido, o primeiro fármaco do grupo lançado no mercado, foi um marco devido às suas propriedades ansiolíticas e miorrelaxantes. Este novo grupo de fármacos passou, rapidamente a substituir sedativos com efeitos colaterais mais severos, especialmente os barbitúricos. Depois disso mais de 3.000 compostos semelhantes foram sintetizados e uma centena foi comercializada. Nos anos seguintes, foram observados os primeiros casos de uso abusivo, além do desenvolvimento de tolerância, síndrome de abstinência e dependência pelos usuários crônicos dos benzodiazepínicos. A década de 1970 é considerada como o auge do uso desses fármacos e nas décadas seguintes se iniciaram as restrições de vendas desses medicamentos com legislação sanitária e exigência de receita pelas farmácias e drogarias (WILLS, 2005; HOFFMAN *et al.*, 2011; GUNNAR, *et al.*, 2005, SÁNCHEZ & HERNÁNDEZ, 1998). No Brasil, sua comercialização é controlada pela Portaria 344/1996.

Os benzodiazepínicos estão entre os fármacos mais prescritos no mundo e são usados principalmente no tratamento de transtornos de ansiedade e insônia. Quando um benzodiazepínico é usado durante algumas semanas, há pouca ou nenhuma dificuldade de interrupção do tratamento, quando as condições do paciente não justificarem mais o seu uso. Depois de vários meses, o percentual de pacientes que desenvolvem tolerância aumenta e a redução da dose ou a interrupção do tratamento podem causar sintomas de abstinência (O'BRIEN, 2007).

Todos os benzodiazepínicos possuem uma estrutura química comum. Um anel benzênico é acoplado a um núcleo diazepínico que é responsável por dar nome à classe. Um substituinte fenil na posição 5 do anel diazepínico está presente em todos os compostos da classe com importância terapêutica (HOFFMAN *et al.*, 2011).

Na Tabela 2 encontram-se resumidas algumas características dos principais benzodiazepínicos em estudo:

Tabela 2: Características físico-químicas e farmacológicas dos benzodiazepínicos em estudo Fonte: Clarke's Analysis of drugs and poisons, 2011.

	Diazepam	Nordiazepam	Oxazepam	Clonazepam	Temazepam	Clordiazepóxido
Estrutura química
Nome IUPAC	7-Chloro-1,3-dihydro-1-methyl-5-phenyl-3H-1,4-benzodiazepin-2-one	7-Chloro-5-phenyl-1,3-dihydro-1,4-benzodiazepin-2-one	7-Chloro-3-hidroxy-5-phenyl-1,3-dihydro-1,4-benzodiazepin-2-one	5-(2-Chlorophenyl)-7-nitro-1,3-dihydro-1,4-benzodiazepin-2-one	7-Chloro-3-hidroxy-1-methyl-5-phenyl-1,3-dihydro-benzo[e][1,4]diazepin-2-one	7-Chloro-N-methyl-5-phenyl-3H-1,4-benzodiazepine 4-oxide
Fórmula molecular	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O PM: 284,8	C ₁₅ H ₁₁ ClN ₂ O PM: 270,7	C ₁₅ H ₁₁ ClN ₂ O ₂ PM: 286,7	C ₁₅ H ₁₀ ClN ₃ O ₃ PM: 315,7	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O ₂ PM: 300,7	C ₁₆ H ₁₄ ClN ₃ O PM: 299,75
CAS	439-14-5	1088-11-5	604-75-1	1622-61-3	846-50-4	58-25-3
pKa	1. 3,5 2. 3,3	1. 3,5 2. 12,0	1. 1,7 2. 11,6	1. 1,5 2. 10,5	1,6	4.8
logP	2,8	2,93	2,24	2,41	2,2	2,86
Classificação Geral	Ansiolítico, Tranqüilizante	Tranqüilizante; Benzodiazepínico	Tranqüilizante; Benzodiazepínico	Anticonvulsivante; Benzodiazepínico	Tranquilizante	Ansiolítico, Tranqüilizante

O primeiro contato com os benzodiazepínicos geralmente ocorre por meio de tratamento médico contra a ansiedade e/ou insônia. O desenvolvimento da dependência costuma ser gradual tendo início com o tratamento prolongado. Os sinais e sintomas da abstinência do fármaco (ansiedade, nervosismo e insônia), são facilmente confundidos com os sinais do problema que desencadeou o tratamento inicialmente (SÁNCHEZ & HERNÁNDEZ, 1998; O'BRIEN, 2007).

SILVA *et al.* (2005) demonstraram em seus trabalhos que o benzodiazepínico mais dispensado no setor central de Goiânia foi o clonazepam (33,53%) seguido do bromazepam (16,93%). Neste estudo, o diazepam respondeu por 6,03% das dispensações.

Além dos efeitos colaterais já descritos como sonolência excessiva noturna, piora na coordenação motora fina e na memória (amnésia anterógrada), outros efeitos têm sido relatados como tonteiras, zumbidos, reações paradoxais (excitação, agressividade etc.), anestesia emocional (indiferença afetiva a eventos da vida); e em idosos, aumento do risco de interação medicamentosa, além do risco de dependência que é observado em qualquer faixa etária (CPMS/SMS-Rio, 2006).

Estes fármacos são comumente utilizados de forma não médica por pessoas com problemas de alcoolismo ou abuso de várias substâncias concomitantemente. Adicionalmente, diversos estudos indicam que os benzodiazepínicos reduzem a resposta psicomotora constituindo-se em risco para a segurança no tráfego, especialmente quando utilizados em associação com outras substâncias de forma abusiva (GUNNAR, *et al.*, 2005).

Além disso, os benzodiazepínicos possuem importância em toxicologia forense por serem utilizados como “drogas de estupro” (*Date-rape drugs*) também chamadas de “drogas facilitadoras de abuso sexual” (*Drug-Facilitated Sexual Assault – DFSA*). Estas substâncias têm sido amplamente utilizadas por criminosos com o propósito de provocar efeito sedativo e amnésia anterógrada em suas vítimas (CHÈZE *et al.*, 2004; WILLS, 2005).

2.2.2 Toxicocinética

As propriedades físico-químicas e farmacocinéticas dos benzodiazepínicos afetam amplamente a sua utilidade clínica. Todos eles possuem altos coeficientes de distribuição O/A na sua forma não ionizada (CHARNEY et al., 2007).

Os benzodiazepínicos são quase completamente absorvidos quando administrados por via oral e alcançam sua concentração máxima no sangue em aproximadamente 1 hora. Se administrados por via intramuscular, os benzodiazepínicos são absorvidos de forma errática e lenta devido à sua afinidade pelo tecido adiposo (SÁNCHEZ & HERNÁNDEZ, 1998; CHARNEY et al., 2007).

Os benzodiazepínicos possuem elevada solubilidade o que facilita sua distribuição pelo corpo. Após absorção, se ligam quase totalmente a proteínas plasmáticas. A pequena parte que permanece livre, farmacologicamente ativa, é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e placentária e são secretados no leite materno (SÁNCHEZ & HERNÁNDEZ, 1998).

Tanto os compostos originais quanto os seus produtos de biotransformação ligam-se a proteínas plasmáticas. A extensão da ligação é correlacionada com a lipossolubilidade e varia de cerca de 70% para o alprazolam a quase 99% para o diazepam. Nos tratamentos para sedação noturna, as taxas de redistribuição podem ter influência maior do que a taxa de biotransformação sobre o SNC (CHARNEY et al., 2007; HOFFMAN et al., 2011).

Os fármacos que agem sobre os receptores de benzodiazepínicos podem ser divididos em quatro categorias com base em sua meia vida de eliminação: (1) os benzodiazepínicos de ação ultra-rápida; (2) os de ação curta e com meias-vidas de menos de 6 horas incluindo o triazolam e o midazolam; (3) os de ação intermediária, com meias-vidas de 6 a 24 horas incluindo o oxazepam, alprazolam e o lorazepam e (4) os de longa duração, com meias-vidas maiores que 24 horas incluindo o diazepam e o clonazepam (CHARNEY et al., 2007).

A biotransformação dos benzodiazepínicos possui complexidade elevada (Figuras 2 e 3). A principal via consiste na oxidação (N-desalquilação e hidroxilação)

e alguns fármacos do grupo são metabolizados por nitrorredução (clonazepam). O processo de biotransformação dá origem a metabólitos ativos como o nordiazepam (com elevada meia vida plasmática de, aproximadamente 36 a 39 horas) (HOFFMAN *et al.*, 2011, SÁNCHEZ & HERNÁNDEZ, 1998).

Figura 3: Principais vias de biotransformação dos benzodiazepínicos

Geralmente, são encontradas na urina as formas glicuronadas das substâncias (SÁNCHEZ & HERNÁNDEZ, 1998).

Figura 4: Biotransformação do clonazepam (nitrorredução)

2.2.3 Uso Terapêutico

Os compostos desta classe possuem efeito ansiolítico, sedativo, hipnóticos, anticonvulsivantes e miorelaxantes (SÁNCHEZ & HERNÁNDEZ, 1998).

A maioria dos benzodiazepínicos possui efeito intercambiável, por exemplo, o diazepam pode ser utilizado no tratamento da abstinência alcoólica, e a maior parte dos benzodiazepínicos pode ser utilizada como hipnóticos. Em geral, o uso terapêutico dessa classe de fármacos depende de sua meia-vida. Os benzodiazepínicos úteis como anticonvulsivantes têm uma meia-vida longa e a entrada rápida no cérebro é necessária para a eficácia do tratamento do estado epilético. Uma meia-vida de eliminação curta é desejável para hipnóticos, embora isso traga a desvantagem de uma maior propensão ao uso abusivo e uma maior gravidade da abstinência após a retirada do fármaco. Os agentes utilizados contra a ansiedade, em contrapartida, devem ter meia vida longa, a despeito da desvantagem trazida pelo risco de déficit neuropsicológico causado pelo seu acúmulo (CHARNEY et al., 2007).

Quase todos os efeitos dos benzodiazepínicos resultam de suas ações sobre o SNC. Os mais proeminentes destes são a sedação, a hipnose, a redução da ansiedade, o relaxamento muscular, a amnésia anterógrada e a atividade anticonvulsivante. Apenas dois efeitos desses fármacos resultam de ações periféricas: a vasodilatação coronária, observada após administração intravenosa de

doses terapêuticas e o bloqueio neuromuscular, que se observa após doses elevadas (CHARNEY et al., 2007; HOFFMAN *et al.*, 2011)

2.2.4 Efeitos Tóxicos

O mecanismo de ação é comum para todos os benzodiazepínicos. Estes se ligam a receptores que se encontram no cérebro e medula espinhal formando um complexo macromolecular. Este complexo compreende várias estruturas dentre as quais se destacam os receptores GABA-érgicos adjacentes a canais de cloreto. Estes fármacos agem sobre a subunidade A dos receptores GABA. Os receptores ionotrópicos GABA-A são constituídos de cinco subunidades que se dispõem de modo a formar um canal de cloreto completo. Os benzodiazepínicos interagem com a subunidade alfa do receptor GABA-A potencializando sua ação inibitória a nível pré e pós-sináptico, facilitando a abertura do canal de cloreto. A abertura do canal acarreta hiperpolarização e, conseqüentemente, uma inibição da transmissão sináptica (SÁNCHEZ & HERNÁNDEZ, 1998; CHARNEY et al., 2007; HOFFMAN *et al.*, 2011).

Como reações indesejáveis dos benzodiazepínicos podem ser destacadas a sua capacidade de produzir sedação, sonolência e ataxia. Os benzodiazepínicos mais potentes podem produzir efeito de amnésia anterógrada. Os de ação curta podem gerar efeito rebote com surgimento de estados de ansiedade, agitação, confusão, amnésia, depressão, agressividade etc. (SÁNCHEZ & HERNÁNDEZ, 1998; HOFFMAN *et al.*, 2011).

A interrupção da administração de benzodiazepínicos, após uso prolongado, está associada a aparecimento de efeito rebote em cerca de um terço de pacientes em terapia crônica. Os sintomas variam, mas são caracterizados, sobretudo por ansiedade, irritabilidade, disforia, dificuldade de concentração, insônia, náusea, tremor, distorções na percepção, sudorese e dores de cabeça; quadros de convulsões são raros. O pico dos sintomas de abstinência ocorre poucos dias após a interrupção do uso do fármaco, mas podem ser observados por meses (WILLS, 2005).

Os benzodiazepínicos também têm sido utilizados para incapacitar vítimas com a finalidade de abuso sexual. Esses fármacos não são apenas sedativos: intoxicações também podem provocar desinibição além de um efeito de amnésia anterógrada (CHÈZE *et al.*, 2004; WILLS, 2005).

Em casos de intoxicação com benzodiazepínicos é recomendável utilizar flumazenil, um benzodiazepínico que age como um antagonista do receptor GABA (WILLS, 2005; SÁNCHEZ & HERNÁNDEZ, 1998).

Os processos envolvidos no desenvolvimento da dependência dos benzodiazepínicos não estão totalmente esclarecidos. São divididos entre aqueles mecanismos intrínsecos associados ao processo molecular benzodiazepínico-GABA-canal de cloreto e aqueles associados a vias vitais como a serotoninérgica. Acredita-se que há uma mudança na produção, liberação ou metabolismo de um ligante endógeno que atua como receptor dos benzodiazepínicos. Outra hipótese é a de alteração no número ou na afinidade dos receptores benzodiazepínicos ou ainda modificações estruturais desses receptores. Os compostos desta classe possuem efeito ansiolítico, sedativo, hipnóticos, anticonvulsivantes e miorrelaxantes (SÁNCHEZ & HERNÁNDEZ, 1998).

No momento em que a concentração plasmática atinge o pico é previsível que doses hipnóticas de benzodiazepínicos causem graus variáveis de delírio, lassidão, aumento de tempos de reação, incoordenação motora, comprometimento das funções mentais e motoras, confusão e amnésia anterógrada. A cognição parece ser menos afetada que o desempenho motor. Pode ocorrer também, sonolência diurna residual (CHARNEY *et al.*, 2007).

Outros efeitos colaterais relativamente comuns dos benzodiazepínicos são fraqueza, dores de cabeça, visão borrada, vertigem, náuseas e vômitos, desconforto epigástrico e diarreia. Às vezes, os benzodiazepínicos anticonvulsivantes aumentam a frequência das convulsões em pacientes com epilepsia (CHARNEY *et al.*, 2007; SÁNCHEZ & HERNÁNDEZ, 1998).

A tolerância aos efeitos hipnóticos dos benzodiazepínicos é desenvolvida rapidamente em, aproximadamente, uma semana de tratamento. Embora a tolerância aos efeitos ansiolíticos seja mais lenta, observa-se também tolerância

cruzada com álcool e outros sedativos (HOFFMAN *et al.*, 2011; SÁNCHEZ & HERNÁNDEZ, 1998). A intensidade e a incidência de toxicidade sobre o SNC geralmente aumentam com a idade e estão ao mesmo tempo envolvidos fatores farmacocinéticos e farmacodinâmicos (CHARNEY *et al.*, 2007).

Doses hipnóticas de benzodiazepínicos não possuem efeito sobre a respiração em indivíduos normais. Pacientes intoxicados por benzodiazepínicos requerem assistência respiratória apenas quando ingerirem outro fármaco depressor do SNC, mais comumente etanol ou em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (CHARNEY *et al.*, 2007; HOFFMAN *et al.*, 2011).

Os efeitos cardiovasculares dos benzodiazepínicos não possuem notoriedade em indivíduos normais, exceto na intoxicação grave. Os efeitos adversos são mais proeminentes em pacientes com distúrbios obstrutivos relacionados ao sono ou doenças cardíacas (CHARNEY *et al.*, 2007).

2.3 Matrizes não convencionais para análises toxicológicas

A análise toxicológica para a verificação do uso de drogas de abuso vem sendo requisitada com o objetivo de identificar o usuário, para que medidas de controle e prevenção sejam adotadas. Essas análises vêm sendo utilizadas por diversos segmentos da sociedade e aplicadas para verificar o uso de drogas no ambiente de trabalho, esporte, no auxílio e acompanhamento da recuperação de usuários em clínicas de tratamento e com finalidade forense (BULCÃO *et al.*, 2011; LIMA & SILVA, 2007).

É internacionalmente aceito para testes toxicológicos que se utilize imunoensaios para a triagem e a cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) como técnica confirmatória. Porém, alguns laboratórios utilizam tecnologia MS/MS ou cromatografia líquida (LC-MS ou LC-MS/MS) (VERSTRAETE & PEAT, 2011)

O aumento da sensibilidade nas técnicas analíticas tornou a detecção, a identificação e a quantificação de drogas em matrizes não convencionais mais

práticas. Historicamente, a urina e o sangue eram utilizados de forma majoritária. Porém, cabelos, unhas, saliva, suor e outras matrizes biológicas têm sido utilizados como amostras não convencionais preferenciais, em alguns casos, para a análise de drogas, ou para complementar as análises realizadas em outras amostras possuindo vantagens quanto ao tempo de detecção, facilidade de coleta e dificuldade de adulteração (Figura 4).

Deve-se ressaltar que as matrizes biológicas alternativas não devem ser vistas como substitutas das matrizes tradicionais (sangue e urina), mas como fornecedoras de informações complementares sobre o uso de drogas por parte do indivíduo (KINTZ, 2011; MARGALHO, 2011; ROUEN, 2001).

Figura 5: Tempo de detecção das drogas nas principais matrizes biológicas

Fonte: Adaptada de BULCÃO *et al*, 2011

Ao eleger uma determinada matriz biológica a ser analisada deve-se ter foco em quais questões se deseja responder, visto que, diferentes matrizes são importantes para responder questões diversas. As vantagens e desvantagens de cada uma também devem ser ponderadas a fim de ser obter a informação desejada. Segue abaixo uma breve descrição das principais matrizes:

Sangue: O sangue possui inúmeras vantagens, sendo uma das principais a possibilidade de correlacionar os níveis do xenobiótico encontrado com os efeitos desta substância. Esses achados, juntamente com dados sobre toxicocinética do xenobiótico, auxiliam na inferência sobre o momento de uso, quantidade de substância administrada e possíveis alterações fisiológicas e/ou psíquicas causadas pela substância (BULCÃO *et al*, 2011). Porém, esta matriz é pouco utilizada em análises toxicológicas por ser considerada muito invasiva (ROUEN, 2001).

Urina: A urina apresenta aproximadamente 98% de água em sua constituição, é a matriz biológica com menor número de interferentes endógenos, pois é constituída principalmente por água e só apresenta níveis significantes de proteína e lipídios (que poderiam interferir no processo de extração e identificação de fármacos) em estados patológicos. Além disso, quando comparada ao sangue, frequentemente apresenta concentrações mais altas de xenobióticos e/ou de seus produtos de biotransformação. Contudo, os resultados estabelecem apenas que a droga de abuso foi administrada, uma vez que a correlação com os efeitos é baixa, devido à grande variedade de fatores que afetam a taxa de excreção de determinado composto e o volume urinário. Fornece uma janela de detecção intermediária sendo uma matriz importante em muitas situações sendo bastante empregada (ROUEN, 2001).

Unhas: Nos últimos anos, a análise de fármacos em matrizes queratinizadas, como cabelo e unhas, tem recebido uma atenção considerável por causa de diversas vantagens sobre as metodologias de exames toxicológicos empregando fluidos biológicos, como urina ou sangue. Assim como o cabelo, este tecido queratinizado pode armazenar fármacos administrados por meses, podendo fornecer evidências retrospectivas do uso de drogas de abuso. As unhas são compostas por queratina, que absorve as drogas durante o crescimento resultando em um período mais longo de detecção. Porém, mais estudos são necessários para a correta interpretação dos dados obtidos (BULCÃO *et al*, 2011).

Suor: Vários mecanismos de incorporação de medicamentos em suor têm sido sugeridos, incluindo a difusão passiva do sangue, passagem transdérmica de fármacos através da pele, dentre outros. Diariamente são produzidos entre 300 e 700 mL de suor, e 2-4 L/h podem ser produzidos durante exercício físico exaustivo.

Em geral, as substâncias inalteradas são encontradas no suor, enquanto seus metabólitos polares normalmente são predominantes na urina.

Contudo, a análise de drogas no suor raramente é realizada, porque é extremamente difícil estimar o volume de suor e coletar quantidades adequadas. Nos últimos anos, este empecilho parece ter sido resolvido pelo desenvolvimento de adesivos *sweat patch*, para coleta.

O suor também possui a vantagem de não representar coleta invasiva e de facilitar o controle de indivíduos internados em clínica de tratamento e detentos em liberdade condicional (BULCÃO *et al*, 2011).

Saliva: a saliva é o fluido encontrado na cavidade oral e é produzida por glândulas presentes na cabeça e boca. Há pelo menos duas vantagens em realizar análise em saliva. A primeira, a concentração de substâncias em saliva é relacionada à concentração no plasma e, aos efeitos farmacológicos das substâncias. A segunda, a coleta de fluidos orais é simples e não invasiva e pode ser realizada sob observação evitando constrangimento. Porém, a manipulação desta matriz é mais complicada quando comparada à urina devido à presença de substâncias como mucopolissacarídeos e mucoproteínas além do que, algumas drogas bem como algumas doenças ou ainda condições de ansiedade podem causar “boca seca”, desta forma, a saliva pode não estar disponível em quantidade suficiente para todos os indivíduos em todos os momentos. Finalmente, substâncias que possuem meia vida plasmática curta só poderão ser detectáveis em saliva durante um curto intervalo de tempo (visto que a concentração das substâncias em saliva dependem da sua concentração plasmática) (SPIEHLER, 2011).

Cabelo: a estrutura do cabelo é majoritariamente composta por proteínas (65-95%, essencialmente queratina), água (15-35%) e lipídeos (1-9%). Como já mencionado a maior vantagem que esta matriz oferece é a ampla janela de detecção podendo oferecer distinção entre uso eventual ou crônico além de fornecer outras vantagens como facilidade na obtenção, coleta não invasiva, maior dificuldade para adulteração, janela de detecção ampla e raramente requer cuidados no transporte e no armazenamento, o que favorece a estabilidade dos analitos, porém, as análises nessa matriz são consideradas como complementares às análises de sangue e urina (BAUMGARTNER *et al.* 1979; KINTZ, 2011).

A verificação do uso de drogas de abuso por análise de cabelo é uma ferramenta útil para demonstrar ou excluir a suspeita de uso crônico (BAUMGARTNER *et al.* 1979).

2.4 Cabelo como espécime biológico para verificar a exposição a drogas de abuso.

Nos anos 1960 e 1970, as análises de cabelo já eram utilizadas para avaliar a exposição a substâncias com toxicidade conhecida como o arsênio, chumbo ou mercúrio, geralmente por absorção atômica. Nesta época, a análise de compostos orgânicos (como as contidas nas drogas de abuso, por exemplo) ainda não era possível devido à falta de disponibilidade de equipamentos com sensibilidade suficiente (LIMA & SILVA, 2007; SKENDER *et al.*, 2002; KINTZ, 2011)

Em 1979 foi que Baumgartner e colaboradores, conseguiram detectar morfina em cabelo de dependentes de heroína utilizando radioimunoensaio. Nos últimos anos, a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) tem se tornado o método de escolha para análise de cabelo e esta tecnologia tem sido rotineiramente aplicada para avaliar exposição a substâncias no campo de ciências forenses, médico legal, ocupacional, toxicologia clínica e, mais recentemente em controle de dopagem em esportes. A técnica de GC-MS é eficaz para separação e quantificação de substâncias em cabelo possuindo sensibilidade e especificidade adequadas para este propósito (KINTZ, 2011).

O cabelo é uma matriz biológica interessante para a determinação de drogas de abuso. Amostras de cabelo podem ser estocadas e transportadas sem cuidados especiais como refrigeração, controle de pH e adição de conservantes como é feito para amostras de sangue e urina. Outra vantagem consiste no fato de existir a possibilidade de obter uma segunda amostra, similar e correspondente à anteriormente coletada, para a realização de uma análise posterior em caso de necessidade (LIMA & SILVA, 2007; KINTZ, 2011).

O cabelo ganhou importância em sua utilização para controle do uso de drogas sendo já a terceira matriz mais utilizada para esta finalidade (PRAGST & BALIKOVÁ, 2006; NAKAHARA, 1999).

A maior vantagem do uso do cabelo em análises toxicológicas é a possibilidade de se avaliar um amplo período de tempo e diferenciar uso ocasional de uso contínuo devido ao grande período de detecção para os analitos que esta matriz fornece, principalmente quando comparada a outras matrizes sendo possível até mesmo uma estratificação da amostra o que permite avaliação do consumo histórico pelo indivíduo (KINTZ, 2011; MUSSHOF & MADEA, 2007; PRAGST & BALIKOVÁ, 2006).

Em países como os Estados Unidos, este tipo de análise já é aplicado a muitas situações como em investigações criminais e *postmortem*, por exemplo, apesar de ainda não existir uma correlação clara entre a dose da substância ingerida e sua concentração no cabelo (ROUEN *et al*, 2001; SKENDER *et al*, 2002; LIMA & SILVA, 2007; KINTZ, 2011).

Esta falta de uma clara relação individual bem definida entre a frequência de uso ou dose ingerida e a concentração em cabelo faz com que a interpretação de resultados obtidos nas análises seja foco de discussões. Além disso, as taxas individuais de biotransformação dos xenobióticos são variáveis, assim como a sua cinética e dinâmica (PRAGST & BALIKOVÁ, 2006; NAKAHARA, 1999; BALIKOVÁ, 2005). Outras fontes de variação nas taxas de incorporação de substâncias nesta matriz podem ser atribuídas ao crescimento variável do cabelo, região de coleta, idade do indivíduo, etnia, pigmentação do cabelo, entre outros (WENNING, 2000; MUSSHOF & MADEA, 2007).

A coleta das amostras de cabelo é um processo simples e não invasivo, sendo difícil a sua adulteração. Não são necessárias condições especiais de transporte e armazenamento, pois as amostras de cabelo são estáveis por um longo período de tempo (LIMA & SILVA, 2007).

2.5 Estrutura do cabelo

Cada fio de cabelo é constituído de três estruturas celulares distintas: a cutícula, o córtex e a medula (Figura 5). A cutícula externa é composta por uma única camada de células alongadas justapostas. A cutícula envolve o córtex central composto por células queratinizadas longas, formando fibras alongadas, que se mantêm unidas através de um cimento químico especial. Nas células corticais, são encontrados grânulos pigmentares chamados de melanina, responsáveis pela coloração dos fios. A medula se localiza na região central do pelo e pode não estar presente se este for muito fino (LIMA & SILVA, 2007; PRAGST & BALIKOVÁ; 2006). Os fios são compostos primariamente de proteínas (65-95%; essencialmente queratina); água (15-35%) e lipídios (1-9%). Os minerais correspondem a algo entre 0,25% a 0,95% da composição. O número total de folículos de cabelo em um adulto gira em torno de 5 milhões, sendo 1 milhão correspondente a cabelo da cabeça. A incorporação das substâncias ocorre no intervalo entre 1.2 e 1.5 mm (ROUEN, 2001).

Figura 6: Estrutura do cabelo.

Fonte: Adaptado de: PRAGST & BALIKOVÁ; 2006.

Embora a cutícula forme uma camada protetora externa, ela pode ser transpassada por soluções aquosas além de sofrer dano por radiação ultravioleta, tratamentos químicos etc. (ROUEN, 2001).

O cabelo começa a se formar nas células localizadas no centro de germinação chamado matriz que se situa na base do folículo. O cabelo não cresce de forma contínua, mas em ciclos, alternando-se entre períodos de crescimento e quiescência. O ciclo de vida do fio de cabelo humano consiste de três fases: a anágena, a catágena e a telógena. (KINTZ, 2011; PRAGST & BALIKOVÁ; 2006).

A fase anágena é a de crescimento do fio de cabelo permanecendo por dois a três anos. Durante esse período a média de crescimento é de 0,3-0,4 mm/dia (0,9

– 1,2 cm/mês) e os capilares sanguíneos que envolvem o folículo fornecem nutrientes e outras substâncias exógenas, como traços de metais, drogas de abuso, etc. Essas substâncias exógenas são incorporadas ao fio de cabelo e pressupõe-se que com seu crescimento sejam transportadas ao longo dos fios (LIMA & SILVA, 2007; KINTZ, 2011).

A segunda fase chamada de catágena é de transição entre o crescimento ativo e a fase de repouso. Sua raiz torna-se queratinizada, formando uma única estrutura e começa a se separar do bulbo ou papila. Após esse estágio, cessa o crescimento dos pelos, sendo a fase de repouso, conhecida como telógena podendo durar de dois a três meses. Durante esse período, os pelos são facilmente removidos se puxados. Começa então a ocorrer o crescimento de um novo fio de cabelo, na papila pilosa, sendo expulso o fio em repouso (LIMA & SILVA; 2007). Fatores como raça, condições patológicas preexistentes, deficiências nutricionais e idade são fatores que reconhecidamente interferem na taxa de crescimento e comprimento do fio quiescente. Na proximidade do couro cabeludo de um adulto, cerca de 85% do cabelo se encontra na fase de crescimento (ROUEN, 2001).

Pelos pubianos, corporais e das axilas também podem ser utilizado como fontes alternativas de material para análise no caso de cabelo da cabeça não estar disponível; porém, as concentrações das substâncias costumam ser maiores que em cabelo da cabeça. Esta diferença na concentração pode ser devido a uma maior circulação sanguínea encontrada nessas áreas além de um número maior de glândulas apócrinas. Deve-se observar que a taxa de fios na fase anágena/catágena é totalmente diferente em pelos corporais. A barba também pode ser considerada fonte de material analítico adequado em caso de necessidade (KINTZ, 2011).

2.6 Mecanismo de incorporação de fármacos em cabelo

Alguns pesquisadores classificam o cabelo como um dosímetro biológico, filamento de registro e até mesmo como um espelho do ambiente onde o indivíduo foi exposto. Isto porque se houver considerável exposição a um determinado agente químico por contaminação externa ou através da ingestão, essa substância estará

presente no cabelo. O cabelo além de ser um adorno, tem a função de proteger a cabeça dos raios solares, o que é feito através da melanina presente nele, a qual também é responsável pela sua coloração (LIMA & SILVA, 2007).

Embora o cabelo pareça uma estrutura primitiva ele é, na verdade, uma parte do corpo humano bastante complexa e sua biologia continua pouco esclarecida. Os fios de cabelo crescem via síntese nas células da matriz do cabelo acompanhado de queratinização (NAKAHARA, 1999; PRAGST & BALIKOVÁ, 2006).

Em geral, aceita-se que substâncias possam ser incorporadas à matriz do cabelo por adsorção pelo ambiente externo ou a partir do sangue durante o crescimento do fio. Devido à sua alta porosidade, o cabelo pode incorporar até 18% em massa por absorção de líquidos. Fármacos também podem ser facilmente transportados para o interior da matriz através do suor ou ainda a partir de substâncias químicas presentes no ar (KINTZ, 2011; NAKAHARA, 1999; ROUEN, 2001).

O mecanismo exato que envolve a incorporação de drogas em cabelo não está completamente elucidado (BALIKOVÁ, 2005). Um dos modelos propostos para explicá-lo é a difusão passiva da droga através da corrente sanguínea durante seu crescimento na base do folículo. Ou ainda, as substâncias podem ser incorporadas ao cabelo através das secreções das glândulas apócrinas e sebáceas ou através da contaminação ambiental. O mecanismo pelo qual a substância é depositada nesta matriz e a estabilidade das ligações químicas do composto com os sítios ligantes é um dos fatores fundamentais para a interpretação dos resultados obtidos quando são analisadas amostras de cabelo. Em relação aos prováveis sítios de ligação de xenobióticos, três componentes da estrutura capilar podem ser considerados: proteínas, lipídeos e melanina. Em alguns estudos foi evidenciado que os principais responsáveis pela interação de substâncias nos cabelos são a melanina e as proteínas (PRAGST & BALIKOVÁ, 2006; LIMA & SILVA, 2007; KINTZ, 2011).

Em cabelos escuros encontra-se maior concentração de melanina, quando comparados a cabelos claros ou brancos. Outro fator importante a ser considerado é a estrutura molecular da substância estudada assim como suas propriedades físico-químicas. Forças eletrostáticas e forças de *Van Der Waals* também são significativas na interação xenobiótico/melanina. Supõe-se que formas catiônicas das substâncias

são atraídas pelos sítios aniônicos da melanina (possivelmente em grupos carboxílicos ionizados), porém, este parece não ser o único mecanismo de incorporação visto que estas substâncias também podem ser detectadas em pelos de animais albinos. (LIMA & SILVA, 2007, KINTZ, 2011).

Os conceitos da incorporação das substâncias e conservação de fármacos e seus produtos de biotransformação durante a formação das fibras capilares são baseados no transporte biológico através das membranas celulares, princípios de biotransformação de xenobióticos e afinidade da substância à melanina. A rápida proliferação celular é associada com a alta atividade metabólica no folículo capilar. Isso se deve à presença de inúmeras enzimas capazes de promover reações de biotransformação das substâncias presentes. A permanência dos fármacos na estrutura capilar pode ser explicada pela interação entre estas substâncias e as proteínas presentes na fibra queratinizada (LIMA & SILVA; 2007; ROUEN, 2001).

A natureza da análise em cabelo (utilizada sobremaneira em investigações criminal e forense) confere ao analista uma grande responsabilidade quanto à emissão dos resultados de forma correta, em virtude das graves consequências que podem ser geradas por eles. Devido a isso, todo o processo, desde a amostragem até a interpretação dos resultados e emissão do parecer final deve ser bem delineado a fim de se evitar algum erro potencial (PRAGST & BALIKOVÁ, 2006).

Todos os procedimentos relacionados à evidência, desde a coleta, o manuseio e análise, devem ter os devidos cuidados e sem a observação de condições mínimas de segurança, podem acarretar na falta de integridade dos resultados emitidos, provocando danos irreversíveis no material coletado, comprometendo a idoneidade do processo e prejudicando a sua rastreabilidade (USA, 2006).

2.7 Aspectos analíticos da detecção de anfetaminas e benzodiazepínicos em cabelo

Os analitos geralmente possuem estabilidade muito satisfatória em cabelo. Substâncias orgânicas podem permanecer na matriz por centenas de anos, se as condições forem favoráveis (KINTZ, 2011).

A primeira etapa que deve ser considerada quando se realiza análise em cabelo é a amostragem. Há um consenso entre os estudiosos na área que elegem como melhor local para a coleta a região do vértice posterior, situada na região distal da cabeça (região da nuca). Esta região é a escolhida para a coleta, pois o local é esteticamente menos aparente comparado com outras regiões da cabeça e possui menor variabilidade no crescimento capilar, o número de fios é mais constante e o cabelo está menos sujeito a interferências individuais, como sexo e idade. A coleta deve ser feita o mais próximo possível do couro cabeludo (LIMA & SILVA, 2007, KINTZ, 2011, SoHT, 2004).

A *Society of Hair Testing* (SoHT) aponta ainda o cabelo da cabeça como espécie de escolha para realização de análise, porém, fontes alternativas (axilas, perna etc) podem ser avaliadas em caso de indisponibilidade da matriz preferencial. Recomenda-se uma amostra de, no mínimo 200 mg para viabilizar a realização de uma análise (BALIKOVÁ, M., 2005).

A contaminação externa dos cabelos pode ser um problema no momento da interpretação dos resultados analíticos. Algumas abordagens para minimizar este tipo de problema consistem na descontaminação externa da matriz. A SoHT (2004) cita a contaminação externa da matriz como um dos fatores limitantes na identificação de uso de drogas, em caso de uma possível contaminação não ser adequadamente removida pode haver confusão entre exposição externa e uso efetivo prejudicando a interpretação do resultado final (KINTZ, 2011; ROUEN, 2001).

A descontaminação também é recomendada a fim de remover resíduos de cosméticos (xampu, sprays etc.), bem como suor e sebo que tipicamente se encontram em matrizes de cabelo autênticas sendo indesejáveis por terem a capacidade de aumentar o ruído e ser fonte de interferentes na detecção.

Encontram-se inúmeras abordagens na literatura quanto a esse procedimento incluindo sucessivas lavagens com xampu, água e/ou vários solventes. Em geral, é recomendável que sejam utilizados solventes apróticos como o diclorometano ou acetona por solubilizarem as substâncias indesejáveis e ainda não penetrarem na matriz do cabelo (MUSSHOFF & MADEA, 2007).

Após a etapa de lavagem ou descontaminação externa da matriz, é necessário preparar as amostras para análise o que implica em uma etapa de extração e/ou digestão da matriz anteriormente à etapa de *clean-up*.

O cabelo é uma matriz sólida queratinizada. Para retirar os analitos do seu interior as abordagens mais comuns na literatura científica são:

- extração metanólica – que possui como vantagem de ser aplicada universalmente e manter a integridade da maioria dos analitos, porém, possui a desvantagem de acarretar uma recuperação geralmente menor do que outras técnicas;
- extração alcalina – geralmente empregando NaOH 1 M sob aquecimento que possui a vantagem de digerir a matriz do cabelo e liberar os analitos por completo;
- extração ácida – utilizando meio levemente ácido (utilizando HCl aquoso ou metanólico) é capaz de extrair substâncias que não resistem às condições de digestão da fibra (MUSSHOFF & MADEA, 2007, KINTZ, 2011; NAKAHARA, 1999).

Vários trabalhos na literatura relatam a extração tanto de anfetaminas quanto de benzodiazepínicos em amostras de cabelo. Os métodos desenvolvidos se mostram heterogêneos desde a fase de preparação e extração das substâncias da fibra até a detecção.

Por exemplo, CHÈZE *et al.* (2007) desenvolveram e validaram um método para detecção de anfetamina e análogos em cabelo utilizando cromatografia líquida como método de detecção (LC-MS/MS); para tal utilizaram NaOH 1 M a 80°C por 15 minutos para incubação da amostra seguido de extração líquido-líquido (utilizando hexano:acetato de etila - 2:1).

LEE *et al.* (2010), quantificaram anfetamina e metanfetamina em cabelo utilizando GC-MS. Nesse método a extração dos analitos foi feita utilizando HCl 1% em metanol por 20 horas a 38°C sob agitação. Para derivatização foi utilizado TFAA/acetato de etila (1:1) procedendo-se incubação a 65°C por 15 minutos.

Outra referência para detecção de anfetaminas e derivados descreve uma etapa inicial de lavagem/descontaminação externa utilizando diclorometano com posterior incubação das amostras em metanol/TFA a 25°C. Os analitos de interesse foram então extraídos utilizando extração em fase sólida (SPE) como método de eleição. Posteriormente procedeu-se a derivatização com HFBA a 70°C por 30 minutos (WU *et al.*, 2008).

MENG *et al.* (2009) também desenvolveram um método para análise de anfetaminas e derivados por GC-MS procedendo a incubação com NaOH 1 M a 70°C por 30 minutos. Os analitos passaram por extração líquido-líquido e, posteriormente, derivatizados com MBTFA com ação de microondas, possibilitando detecção das anfetaminas por GC-MS.

BUCELLI *et al.* (2009) utilizaram LC-MS/MS para desenvolver um método de análise qualitativa de estimulantes (inclusive anfetamínicos) lançando mão de uma etapa de lavagem com diclorometano previamente seguida de incubação com tampão fosfato 0,1 N (pH 5,0) utilizando extração em fase sólida (SPE) para separação dos analitos de interesse. Enquanto HAN *et al.* (2006) utilizaram ácido clorídrico 1% em metanol por 20 horas para incubação das amostras com posterior derivatização com anidrido trifluoroacético. As amostras de cabelo foram digeridas com NaOH a 70°C por 15 minutos para os fármacos da classe das anfetaminas.

Existe um número um pouco mais restrito de métodos descrevendo análises de benzodiazepínicos em cabelo e, da mesma forma que para os anfetamínicos, não é observada na literatura um padrão no que diz respeito à análise desses fármacos em cabelo.

ANDERSON *et al.* (2008), também avaliaram a presença de benzodiazepínicos (diazepam, oxazepam, temazepam) em amostras de cabelo. Para tanto, utilizaram hidróxido de amônio 25% em metanol para incubação das amostras e para a extração dois métodos foram utilizados; a extração em fase sólida

(SPE) e a extração em fase sólida molecularmente impressa (MISPE) obtendo resultados satisfatórios em ambas, alguns exemplos de métodos utilizados estão expostos na Tabela 3.

Tabela 3: Alguns trabalhos desenvolvidos em amostras de cabelo – **LEGENDA:** SPE – extração em fase sólida; GC – cromatografia; MS – espectrometria de massas; HFBA – ácido heptafluorobutírico; HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência; MBTFA – N-metil-bis-trifluoroacetamida; MTBSTFA – N-tercbutildimetilsililtrifluoroacetamida; LC – cromatografia líquida.

REFERÊNCIA	SUBSTÂNCIAS	EXTRAÇÃO DA FIBRA	CLEAN-UP	DERIVAT.	DETECÇÃO
YEGLES <i>et al</i> , 1997	Diazepam, oxazepam, flunitrazepam, lorazepam	Hidrólise Enzimática (β - glicuronidase / arilsulfatase)	SPE	-----	GC-MS
NEGRUSZ <i>et al</i> , 2000	Clonazepam e metabólitos	Metanol em banho de ultra- som/1h → cabelo restante foi incubado em HCl 0,1N overnight a 55°C	SPE	HFBA 60°C / 30'	GC-MS
YEGLES <i>et al</i> , 2000	Diazepam e flunitrazepam	solução tioglicólica 2h	SPE	HFBA	GC-MS
MAHJOUB & STAUB; 2001	Clonazepam, diazepam, flunitrazepam, midazolam e oxazepam	Metanol:amônia (97,5:2,5) em banho de ultra-som por 1h e, posteriormente 45°C / 2h	alíquota centrifugada e fase metanólica evaporada sob N ₂ . resíduo ressuspendido com tampão fosfato	-----	HPLC
PATERSON <i>et al</i> , 2001	Anfetamina, metanfetamina, MDMA, MDA, diazepam, nordiazepam, oxazepam	Metanol 45°C/18h	SPE	MBTFA (anf) MTBSTFA (demais)	GC-MS

REFERÊNCIA	SUBSTÂNCIAS	EXTRAÇÃO DA FIBRA	CLEAN-UP	DERIVAT.	DETECÇÃO
CHÉZE et al, 2004	Clonazepam e bromazepam	Tampão fosfato pH 7.6	Extração líq-líq. (diclorometano)	-----	LC-MS/MS
MARTINS <i>et al</i> , 2005	Anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA, MDEA	NaOH 1M 100°C / 30'	SPE	(S)- heptafluorobutylpropyl chloride	GC-MS
CORDERO & PATERSON 2006	Metanfetamina, MDMA, MDA, diazepam e nordiazepam	HCl 0,1M (16h / 50°C)	SPE	MBTFA	GC-MS
TSANACLIS & WICKS, 2007	Anfetamina, metanfetamina MDEA, MDA, MDMA, diazepam, lorazepam, nordiazepam, oxazepam, temazepam.	Metanol em ultra-som 6h NaOH 1M	SPE	BSTFA 1% TCMS TFA (anf)	GC-MS e GC- MS/MS
ANDERSON <i>et</i> <i>al</i> , 2007	Diazepam, nordiazepam, oxazepam, temazepam e nitrazepam	Metanol:25% hidróxido de amônio aquoso (1:20)	SPE / MISPE	-----	LC-MS/MS

REFERÊNCIA	SUBSTÂNCIAS	EXTRAÇÃO DA FIBRA	CLEAN-UP	DERIVAT.	DETECÇÃO
IRVIN & DICKSON, 2007	Alprazolam, clobazam, clonazepam, diazepam, midazolam, oxazepam, temazepam, triazolam	TFAA : MeOH (1:50) 16- 18h	LLE	-----	LC-MS/MS
CHÈZE <i>et al</i> , 2007	Anfetamina Metanfetamina MDMA, MDA	NaOH 1M 15' / 80°C	LLE (hexano:acetato de etia 2:1)	-----	LC-MS/MS
MILLER <i>et al</i> , 2008	Anfetaminas, diazepam, cocaína e opiáceos	Tampão fosfato pH 5.0	SPE	-----	LC-MS/MS
LEE <i>et al</i> , 2008b	Anfetamina e metanfetamina	HCl 1% em MeOH (sob agitação 18h)	LLE	TFAA	GC-MS
LEE <i>et al</i> , 2010	Anfetamina e metanfetamina	HCl 1% em MeOH (20h)	Extratos evaporados até secura; derivatizados e injetados	TFAA + acetato de etila	GC-MS

REFERÊNCIA	SUBSTÂNCIAS	EXTRAÇÃO DA FIBRA	CLEAN-UP	DERIVAT.	DETECÇÃO
VOGLIARDI et al, 2011	Amino e clonazepam, clordiazepóxido, oxazepam, lorazepam, nordiazepam, diazepam	Incubação tampão fosfato pH 8.4	LLE diclorometano:éter (9:1)	---	LC-MS
FAVRETTO et al 2011	Anfetamina, metanfetamina, MDMA, MDA, alprazolam, aminoclonazepam, oxazepam, nordiazepam	H ₂ O:acetonitrila:TFA 1M (80:10:10) sonicação 1h - 45°C overnight	SPE Bond Elut	---	LC-MS/MS
LENDIRO et al 2012	MDA, MDMA, oxazepam, lorazepam, bromazepam, clonazepam, diazepam, alprazolam, nordiazepam,	acetonitrila 12h a 50°C	LLE (hexano : acetato de etila) seguida por SPE	-----	LC-MS/MS

2.8 Extração em fase sólida

A extração em fase sólida (SPE) é uma técnica que foi introduzida nos anos 1970 e se tornou bastante empregada para matrizes complexas utilizando os mesmos materiais adsorventes aplicados para a cromatografia líquida sendo que seus mecanismos de retenção são semelhantes. Quanto ao mecanismo de separação, pode ser dividida em modo reverso, normal e troca iônica (CALDAS et al 2001; ORLANDO et al, 2009). É uma técnica de fácil execução com capacidade de produzir extratos bastante limpos (LANÇAS, 2004).

Fases reversas C_8 e C_{18} exibem retenção principalmente devido a interações de Van der Waals não polares entre as ligações de alcanos do analito e grupos funcionais da superfície da sílica. Fases desse tipo são mais indicadas para amostras cuja matriz é composta predominantemente de água, tampões ou fluidos biológicos.

No modo normal as interações se dão entre grupos polares (ligação de hidrogênio, ligações π - π e interações dipolo). Fases com interações hidrofílicas são mais indicadas para analitos contendo heteroátomos (S, O, N) em matrizes não aquosas (solventes orgânicos, óleos e lipídeos).

As fases de troca iônica consistem em interações eletrostáticas que extraem o analito de modo seletivo. Essas fases são indicadas para extração de compostos que formam cátions ou ânions em matrizes aquosas.

As fases mistas são mais indicadas para drogas de natureza básica contidos em matrizes biológicas (sobremaneira compostos hidrofóbicos com grupos funcionais tipo amina (CALDAS et al 2001; LANÇAS, 2004; ORLANDO et al, 2009).

A instrumentação básica empregada é bem simples, podendo, porém, ser sofisticada, dependendo do problema a ser resolvido e do grau de automatização desejado. As etapas da extração resumem-se ao condicionamento do cartucho (1); percolação da amostra (2); eliminação dos interferentes da matriz (clean up) (3); eluição dos analitos com posterior concentração do composto de interesse (CALDAS et al 2001). As etapas envolvidas na SPE estão ilustradas na Figura 6.

Figura 7: Representação esquemática da extração em fase sólida (SPE).

2.9 Microextração em fase líquida

As técnicas de separação, tais como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), a cromatografia gasosa (GC) e a eletroforese capilar (CE), são muito utilizadas para a análise de amostras complexas. Porém, a determinação de analitos presentes nessas matrizes, geralmente requer processos prévios de preparação de amostras bem elaborados que permitam isolá-los e concentrá-los. As técnicas mais comumente utilizadas para extração e/ou pré-concentração de compostos presentes em fluidos biológicos são a extração líquido-líquido (LLE) e a extração em fase sólida (SPE). Contudo, as tendências atuais apontam para a utilização de menores quantidades de amostras, até mesmo para análises de traços; obtenção de maior seletividade e especificidade na extração; desenvolvimento de métodos menos agressivos ao meio ambiente, com menor desperdício e o uso de quantidade mínima de solventes orgânicos (FLANAGAN *et al*, 2006; LEE, J *et al*, 2008; OLIVEIRA *et al*, 2008).

Dentro deste contexto, técnicas de microextração que utilizam quantidades reduzidas de solventes orgânicos e menos etapas na preparação das amostras vêm sendo desenvolvidas. Entre as principais técnicas de microextração existentes

destacam-se a microextração em fase sólida (SPME), a microextração em gota suspensa (SDME) e a extração em membranas (SLM), extração em membrana microporosa (MMLLE), microextração em fase líquida (LPME) (LEE, J *et al*, 2008; OLIVEIRA *et al*, 2008; HYÖTYLÄINEN, T. & RIEKKOLA, M.; 2008).

Uma tendência recente na busca por novas técnicas de preparação de amostras é a miniaturização do método tradicional de LLE com o objetivo de reduzir a razão volumétrica entre a fase aquosa, chamada de doadora, e a fase orgânica, denominada de aceptora e favorecer a transferência dos analitos da fase aquosa para a fase orgânica (elevado fator de enriquecimento). Isto pode ser obtido usando tanto fases líquidas imiscíveis (microextração em gota suspensa) quanto membranas separando as fases aceptora e doadora (extração em membrana) (PEDERSEN-BJERGAARD & RASMUSSEN, 2005; OLIVEIRA *et al*, 2008).

O conceito de microextração em gota suspensa (*single drop microextraction* – SDME) foi introduzido em 1996 por Jeannot e Cantwell, a partir do desenvolvimento de uma técnica em que uma microgota de solvente orgânico imiscível em água era acomodada na porção final de um dispositivo de politetrafluoretileno (PTFE), sendo então imerso na solução contendo a amostra.

No entanto, a microextração em gota suspensa, é um tanto problemática tanto no sistema de duas quanto no sistema de três fases (neste caso, microlitros de fase aquosa estão contidos no interior da seringa – anterior à gota de solvente orgânico).

Neste modo de extração é comum ocorrer perda de solvente, especialmente quando é aplicada agitação para acelerar o processo extrator. Outro inconveniente é necessidade de pré-tratamento de amostras bastante viscosas ou contendo material particulado. Ainda há incompatibilidade entre os solventes orgânicos utilizados na SDME com as fases móveis utilizadas em HPLC (PEDERSEN-BJERGAARD & RASMUSSEN, 2005; OLIVEIRA *et al*, 2008; ZHANG *et al*, 2008).

A extração em membranas, por sua vez, é mais robusta e apresenta como características mais importantes: o alto grau de seletividade, que possibilita a obtenção de extratos livres de interferentes, a capacidade de concentrar os analitos, permitindo a análise de substâncias em níveis de traços em matrizes complexas e a

significativa redução no consumo de solventes orgânicos. A técnica denominada extração com fase líquida suportada em membranas (*supported liquid membrane* – SLM) pode ser considerada uma extração líquido-líquido em duas etapas e baseia-se em um sistema de três fases, no qual a fase orgânica se encontra entre duas fases aquosas. A fase orgânica é imobilizada em uma membrana hidrofóbica porosa, a qual forma uma barreira entre as fases aquosas. Solventes tipicamente usados incluem hidrocarbonetos de cadeia longa, como n-dodecano, ou ainda mais polares como éter diexílico (PEDERSEN-BJERGAARD & RASMUSSEN, 2005; OLIVEIRA *et al*, 2008).

Na SLM, os analitos de interesse presentes na fase doadora são mantidos na sua forma não-ionizada através de ajustes no pH e, dessa forma, são transferidos através da membrana impregnada de solvente orgânico para a fase aceptora também aquosa que, por sua vez, apresenta um pH contrário àquele da fase doadora, o que favorece a formação de moléculas ionizadas do analito, impedindo seu regresso para a fase orgânica. Porém, na SLM cada membrana é reutilizada diversas vezes favorecendo ocorrência de *carry over* (PEDERSEN-BJERGAARD & RASMUSSEN, 2005; OLIVEIRA *et al*, 2008).

Pedersen-Bjergaard e Rasmussen idealizaram uma nova metodologia que combina o conceito de extrações com membranas (SLM) com o uso reduzido da razão solvente orgânico/fase aquosa. Esta técnica (microextração em fase líquida com fibras ocas, (*hollow fiber liquid-phase microextraction* – HF-LPME, ou simplesmente, LPME) pode ser considerada uma evolução dos métodos de microextração com solventes. Utiliza-se um solvente orgânico imiscível em água para impregnar os poros de uma membrana capilar hidrofóbica de polipropileno e o seu lúmen é preenchido com uma pequena quantidade (microlitros) de uma fase aceptora. Com isso, a fase aceptora não entra em contato direto com a matriz aquosa (fase doadora), permitindo aplicar agitação constante durante a extração. Além disso, o baixo custo de cada unidade de extração possibilita o seu uso uma única vez, evitando problemas de *carry-over*, efeito normalmente observado em outras técnicas de extração com membranas (TAO *et al*, 2009; PEDERSEN-BJERGAARD & RASMUSSEN, 2005; PEDERSEN-BJERGAARD & RASMUSSEN, 2008; ZHANG *et al*, 2008; OLIVEIRA *et al*, 2008; LEE, J *et al*, 2008).

A LPME pode ser utilizada em dois modos: duas ou três fases, de acordo com as características do analito em questão (Figura 7). No sistema de duas fases, o analito é extraído da amostra aquosa (fase doadora) através de um solvente orgânico imiscível em água imobilizado nos poros da membrana passando para o mesmo solvente orgânico (fase aceptora), presente no lúmen da fibra. Para obtenção de resultados favoráveis neste modo de extração, o analito deverá ser moderada ou altamente hidrofóbico, podendo conter grupos ionizáveis ácidos ou básicos (efeito normalmente observado em outras técnicas de extração com membranas) (TAO *et al*, 2009; OLIVEIRA *et al*, 2008).

Figura 8: Modos de extração utilizados na microextração em fase líquida (LPME): duas fases (A) e três fases (B).

Fonte: Adaptado de: OLIVEIRA *et al*, 2008 e PEDERSEN-BJERGAARD & RASMUSSEN, 2005

No modo de três fases, o analito é extraído de uma amostra aquosa (fase doadora) através de um solvente orgânico imiscível em água imobilizado nos poros da membrana, passando para outra solução aquosa (fase aceptora) presente no lúmen da fibra. A fase orgânica atua como uma barreira entre as fases aceptora e

doadora (ambas aquosas), impedindo o contato entre as duas fases. Para analitos altamente hidrofílicos, que encontrariam dificuldades em serem extraídos na membrana orgânica apenas pelo processo de difusão, ao atingir a fase aceptora, o analito é ionizado o que impede seu retorno às fases orgânica e/ou doadora (OLIVEIRA *et al*, 2008; PEDERSEN-BJERGAARD & RASMUSSEN, 2008).

OBJETIVOS

3. OBJETIVO DO TRABALHO

Os objetivos do trabalho é a determinação de anfetaminas e benzodiazepínicos em amostra de cabelo utilizando a cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas.

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

- Desenvolvimento, otimização e validação de um método com sensibilidade adequada para permitir detecção nesta matriz.
- Coleta de amostras de cabelo de voluntários que relataram uso das substâncias em estudo.
- Aplicação do método validado em amostras reais de cabelo de voluntários.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Reagentes

- hidróxido de sódio, cloreto de sódio, acetato de etila, metanol, fosfato de potássio monobásico, ácido clorídrico, diclorometano, isopropanol, hidróxido de amônio e acetonitrila foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha).
- éter diexílico, anidrido trifluoroacético (TFAA) e N-methyl-N-tert-butyltrimethylsilyltrifluoroacetamide (MTBSTFA) foram obtidos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

4.1.2 Soluções Padrão

Soluções-padrão dos derivados anfetamínicos (anfetamina, femproporex, metanfetamina, MDMA, MDA) e os deuterados anfetamina-d5 e MDMA-d5 foram obtidas da Cerilliant Corporation (Round Rock, Texas, EUA) na concentração de 1,0 mg/mL em metanol. Da mesma forma, as soluções-padrão da classe dos benzodiazepínicos (diazepam, oxazepam, nordiazepam, 7-aminoclonazepam e clonazepam) e o deuterado diazepam-d5 foram também obtidas da Cerilliant Corporation na concentração de 1 mg/mL em metanol, exceto a solução de 7-aminoclonazepam que foi adquirida diluída em acetonitrila.

A partir dessas soluções, foram preparadas soluções de trabalho utilizando o mesmo solvente de origem (metanol ou acetonitrila) para fazer as diluições.

4.1.3 Instrumentos

Cartuchos de extração em fase sólida (SPE) de fase mista (C_8 + ácido benzenossulfônico) modelo Bond Elut Certify® (130 mg; 3 mL) foram adquiridos da empresa Agilent Technologies, Inc. (California, USA)

Fibras ocas de polipropileno para microextração em fase líquida (LPME) modelo Q3/2 Accurel® KM (600 μ m diâmetro interno, 200 μ m parede da fibra and 0.2 μ m tamanho de poro) foram adquiridas da Membrana (Wuppertal, Germany).

4.1.4 Equipamentos

Para análise das anfetaminas utilizou-se um equipamento de cromatografia gasosa modelo *Focus GC* acoplado a espectrômetro de massas do tipo *Ion Trap* modelo *Focus Polaris Q* ambos da marca Thermo Fischer Scientific (Bremen, Alemanha).

Para análise dos benzodiazepínicos utilizou-se um equipamento de cromatografia gasosa modelo 6850 acoplado a espectrômetro de massas do tipo Quadrupolo modelo 5875 da marca Agilent Technologies (California, EUA). Da mesma forma que o equipamento utilizado para as anfetaminas, este cromatógrafo foi equipado com uma coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (30m x 0,25mm x 0,25 μ m).

Cada um dos equipamentos foi equipado com uma coluna capilar de sílica fundida HP-5MS com as seguintes dimensões 30m x 0,25mm x 0,25 μ m.

4.1.5 Amostras

Amostras de cabelo de referência negativa foram obtidas de voluntários que não fizeram uso de nenhuma das substâncias em estudo.

Foram coletadas amostras de cabelo de voluntários/usuários em que se suspeita de que houve uso das substâncias psicoativas em estudo (anfetamínicos ou benzodiazepínicos) proveniente de pacientes internos no Centro para Tratamento para Dependência Química Vila Serena. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (Parecer CEP/FCF/67) – ANEXO 1.

4.2 Métodos

4.2.1 Aplicação do questionário

Todos os voluntários que participaram da pesquisa responderam o formulário (ANEXO 02) a fim de permitir que se verifique o padrão de consumo da substância.

4.2.2 Coleta de amostras

A coleta de amostras é realizada de acordo com recomendações internacionais. Os voluntários foram selecionados no momento da internação durante a entrevista inicial do Centro de Tratamento de Dependência Química Vila Serena.

Mediante a confirmação de exposição recente (período menor ou igual a 30 dias) do paciente a alguma das substâncias em estudo e ele concorda em participar

do estudo (Através da assinatura do termo de esclarecimento livre e esclarecido – ANEXO 3), coletou-se uma amostra de cabelo no momento da internação.

4.2.3 Preparo da amostra (descontaminação)

Antes do início das análises propriamente ditas, as amostras de cabelo foram lavadas a fim de evitar que algum eventual contaminante externo possa interferir no resultado da análise. Para realizar esta etapa, utilizou-se diclorometano como solvente, devido às suas propriedades de remover os analitos da parte externa do cabelo sem, contudo penetrar em sua matriz.

Utiliza-se 2 mL de diclorometano para cada 50 mg de cabelo. O solvente orgânico é recolhido após agitação por 5 minutos e a matriz é seca em estufa.

4.2.4 Análise das anfetaminas

4.2.4.1 LPME para anfetaminas

Conforme já mencionado, técnicas recentes de extração de fármacos em matrizes biológicas como a microextração em fase sólida (SPME) e a microextração em fase líquida (LPME) possuem grandes vantagens quando comparadas às técnicas tradicionais de extração como a extração líquido-líquido (LLE) e a extração em fase sólida (SPE). Elas se destacam destas últimas por utilizarem quantidade mínima de solvente e apresentarem um elevado fator de enriquecimento. Neste contexto, a LPME demonstra ainda vantagens interessantes decorrentes da possibilidade de se utilizar uma ampla faixa de solventes, condições que não são atingidas com a SPME devido à fragilidade da fibra utilizada na extração (HYÖTYLÄINEN & RIEKKOLA, 2008; FLANAGAN *et al*, 2006). Adicionalmente, nenhuma etapa de pré-condicionamento é necessária, ao contrário da SPME, na qual a fibra precisa de um pré-tratamento para a sua utilização. Outra vantagem é a eliminação do *carry over* já que as fibras podem ser descartadas após o uso em

função de seu baixo custo. As elevadas taxas de enriquecimento obtidas quando comparadas à SPME também tornam esta técnica atrativa além de fornecer extratos bastante limpos (a fibra de LPME se mostra compatível com uma grande diversidade de matrizes biológicas) (PEDERSEN-BJERGAARD & RASMUSSEN, 2005; OLIVEIRA *et al*, 2008).

Seguindo esta linha de pensamento, foi desenvolvido um método de microextração em fase líquida (LPME) para as anfetaminas. Para tanto, seguiu-se o seguinte procedimento:

Alíquotas de 50 mg das amostras em estudo foram transferidas para tubos de centrífuga de 15 mL, e adicionadas de 100 ng dos padrões internos (derivados anfetamínicos deuterados) e 1 mL de NaOH 1 M foram adicionados na amostra para possibilitar a digestão da fibra capilar e liberação dos analitos da matriz. Em seguida, os tubos foram fechados e as amostras foram aquecidas em banho Maria a 70°C por aproximadamente 15 minutos.

Neste momento a solução é transferida para um eppendorf com capacidade de 2 mL contendo 10 mg de NaCl. Para cada amostra utilizou-se uma fibra de microextração de 9 cm impregnada com éter diexílico (fase estacionária) e preenchida com HCl 0,1N (fase aceptora) (Figura 8). O sistema é agitado em agitador de eppendorf em temperatura ambiente durante 45 minutos a 1000 rpm.

Figura 9: Representação esquemática do sistema de HF-LPME para anfetaminas em cabelo.

Terminada esta etapa, a fase aceptora é retirada do interior da fibra e transferida para um frasco silanizado onde é evaporada até secura a 40°C sob corrente de N₂. Os resíduos foram reconstituídos com 50 µL de TFAA e 50 µL de acetato de etila e derivatizados por 30 minutos a 70°C. O produto obtido é novamente evaporado até secura a 40°C sob corrente de N₂ e ressuspendido com 50 µL de acetato de etila. Terminado esse procedimento, 1 µL de cada extrato foi injetado automaticamente em sistema de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) (Figura 9).

Figura 10: Extração e detecção das anfetamina (HF-LPME)

4.2.4.2 Condições cromatográficas

Um equipamento de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) foi utilizado. O método cromatográfico desenvolvido teve as seguintes condições selecionadas:

- Modo de injeção: *splitless*
- Gás de arraste: Hélio a um fluxo constante de 0,7 mL/min
- Temperatura do injetor: 270°C
- Temperatura do detector: 280°C
- Programação da temperatura do forno: 70°C (1 min), 10°C/min até 250°C (8 min).
Tempo total de corrida: 21 minutos.

O espectrômetro de massas foi operado nas seguintes condições:

- Modo de ionização: ionização eletrônica (EI)
- Modo de operação: *full scan*, com seleção de massas de 50 a 550
- Temperatura da fonte de ionização: 220°C
- Íons utilizados para identificação dos analitos:

anfetamina (140, 118, 105);

femproporex (193, 140, 118);

metanfetamina (154, 118, 110);

MDMA (289, 162, 154);

MDA (275, 162, 135).

Os íons sublinhados foram utilizados para quantificação das substâncias. Esses íons são correspondentes às formas derivatizadas dos analitos, ou seja, derivados trifluoroacéticos.

4.2.4.3 Otimização da microextração

A etapa seguinte, imediatamente anterior à etapa de validação do método de análise, envolveu a otimização do procedimento de extração de anfetaminas em cabelo utilizando LPME em três fases. Este procedimento foi realizado baseando-se na abordagem monovariada, que envolve a modificação de apenas uma variável independente em cada experimento, enquanto as demais são mantidas constantes.

Dessa forma, foram avaliados os tempos de agitação (15, 30 e 45 minutos); diferentes fases estacionárias (xilol, éter diexílico e n-octanol); fases aceptoras (tampão fosfato 0,1 M pH 4.7; tampão acetato 0,1 M pH 4.0 e HCl nas concentrações de 2.0 M; 1.0 M; 0.1 M e 10 mM; tipo e a velocidade de agitação (1000 e 1400 rpm além do uso de ultra som de forma alternativa); e o efeito *salting out* avaliado pela adição ou ausência de NaCl no sistema.

4.2.4.3.1 Estudo da influência do tempo de extração

Alíquotas de 50 mg de cabelo já descontaminadas com diclorometano e adicionadas de 100 ng de cada uma das anfetaminas (bem como seus respectivos padrões internos) foram submetidas ao método descrito em 4.2.4.1, variando-se o tempo de extração de 15 a 45 minutos. Para cada tempo proposto, as análises foram realizadas em triplicata.

4.2.4.3.2 Estudo da influência da fase estacionária

O estudo foi conduzido da mesma forma descrita no item 4.2.4.3.1, variando, desta vez o solvente com o qual a fibra foi contaminada, a saber: xilol, éter diexílico e n-octanol.

4.2.4.3.3 Estudo da influência da fase aceptora

O estudo foi conduzido da mesma forma descrita no item 4.2.4.3.1, variando, desta vez a fase aceptora utilizada, a saber: tampão fosfato 0,1 M pH 4.7; tampão acetato 0,1 M pH 4.0; e HCl nas concentrações de 2,0 M; 1,0 M; 0,1 M e 10mM.

4.2.4.3.4 Estudo da influência do tipo e velocidade de agitação

O estudo foi conduzido da mesma forma descrita no item 4.2.4.3.1, variando, desta vez a velocidade da agitação de 1000 e 1400 rpm (no agitador de eppendorf – lateralmente). Neste mesmo estudo foi avaliado o efeito da agitação por barra magnética (1000 rpm) e utilizando ultra som ao invés de agitação por 5 e 10 minutos.

4.2.4.3.5 Estudo do efeito *salting out*

O estudo foi conduzido da mesma forma descrita no item 4.2.4.3.1, avaliando, desta vez a influência do efeito *salting out*, para tanto foi avaliada a eficiência do processo extrativo na presença e ausência de 10 mg de NaCl (adicionados à fase doadora).

4.2.5 Análise dos benzodiazepínicos

4.2.5.1 SPE para benzodiazepínicos

O procedimento de extração escolhido para desenvolvimento do método foi a técnica de extração em fase sólida. Cartuchos de fase mista, compostos de uma fase de troca iônica (benzenossufonilpropilsilano) e uma fase apolar (C8), foram nossa opção de escolha. Assim, o pH da fase aquosa é ajustado, através da adição de tampão, para completa ionização de pelo menos um dos grupos funcionais das moléculas, ocorrendo a captura dos analitos ionizados pela fase sólida assim que a amostra passa através dos cartuchos, desta forma, as perdas sofridas em LLE decorrentes do caráter anfótero dos benzodiazepínicos são minimizadas com o uso da SPE. Além disso, os extratos obtidos são bastante limpos, pois a utilização das duas fases em combinação permite remover interferentes endógenos de caráter apolar com etapas de lavagem bastante eficientes, com menor risco de eluição prematura excessiva dos analitos de interesse.

A detecção dos analitos em estudo utilizando a técnica de GC-MS foi escolhida por ser a técnica com sensibilidade e especificidade adequadas para as necessidades analíticas (ROUEN, 2001).

Para determinação dos derivados benzodiazepínicos (diazepam, oxazepam, nordiazepam, 7-aminoclonazepam, clordiazepóxido e temazepam), uma segunda alíquota de 50 mg de cada amostra foi transferida para tubos de centrífuga de 15 mL e adicionadas de padrão interno e de 2 mL de uma mistura de metanol:acetonitrila:NH₄OH (10:10:1). Em seguida foi realizada a incubação dessas amostras a 40°C por 7 horas. Após digestão da matriz e resfriamento, as amostras foram aplicadas a cartuchos de extração em fase sólida com fibra mista (Bond Elut®), previamente condicionados pela adição sequencial de 2 mL de metanol e 2 mL de solução tampão fosfato pH 6,0 0,1 M. Terminada a passagem das amostras pelos cartuchos, a etapa de lavagem foi realizada pela adição de 2 mL de água deionizada, 1 mL de ácido clorídrico 0,1 M, e então os cartuchos foram secos sob vácuo por 15 minutos. A etapa de lavagem dos cartuchos (*clean up*) foi concluída pela passagem de 1 mL de metanol. Os analitos foram eluídos com 2 mL de solução

recém preparada de diclorometano/isopropanol/hidróxido de amônio (80:20:3) em tubos para derivatização previamente silanizados. Os extratos foram evaporados sob fluxo de nitrogênio à temperatura ambiente. Os resíduos foram reconstituídos com 50 µL de MTBSTFA com 1% de TBDMS e derivatizados por 45 minutos a 90°C. Terminado esse procedimento, 2 µL de cada extrato foram injetados automaticamente em sistema de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) (Figura 10).

Figura 11: Extração e detecção dos benzodiazepínicos (SPE)

4.2.5.2 Condições cromatográficas

Foi utilizado um equipamento de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). O método cromatográfico desenvolvido teve as seguintes condições selecionadas:

-Modo de injeção: *splitless*

-Gás de arraste: Hélio a um fluxo constante de 0,9 mL/min

-Temperatura do injetor: 260°C

-Temperatura do detector: 280°C

-Programação da temperatura do forno: 150°C (1 min), 30°C/min até 220°C (1 min); 20°C/min até 300°C (5 min). Tempo total de corrida: 14 minutos.

O espectrômetro de massas foi operado nas seguintes condições:

-Modo de ionização: ionização eletrônica (EI)

-Modo de operação: *full scan*, com seleção de massas de 50 a 550

-Temperatura da fonte de ionização: 220°C

-Íons utilizados para identificação dos analitos:

diazepam (284, 256, 221);

nordiazepam (327, 329, 253);

oxazepam (514, 513, 457);

aminoclonazepam (342, 344, 399);

temazepam (357, 358, 283);

clordiazepóxido (356, 282, 283).

Os íons sublinhados foram utilizados para quantificação das substâncias. Esses íons são correspondentes às formas derivatizadas dos analitos, ou seja, derivados terc-butildimetilsilil (TBDMS).

4.2.5.3 Otimização do método

Diferente das anfetaminas, a extração dos benzodiazepínicos em amostras de cabelo não pode ser realizada através da digestão alcalina da matriz visto que esta condição é demasiadamente lesiva a essas substâncias. Em virtude disso, outras estratégias devem ser utilizadas como incubação da matriz em solventes orgânicos utilizando temperatura ou outros recursos como aplicação de ultrassom. Como não existe certeza de que os analitos sejam completamente liberados da fibra nestas condições, é de grande interesse que esta etapa seja otimizada a fim de obter as melhores condições possíveis.

Dessa forma, utilizou-se a técnica de análise de superfície (multivariada) para avaliar a influência de três fatores (concentração de acetonitrila em porcentagem; tempo de incubação e tempo de ultrassom) sobre a taxas de extração do diazepam, nordiazepam e clonazepam em cabelo. A vantagem desta técnica sobre a abordagem monovariada é que vários fatores podem ser avaliados de uma só vez, além do que, é possível verificar se há interação entre os fatores em estudo. As respostas foram avaliadas em termos de área absoluta. Para o planejamento do experimento bem como as análises estatísticas utilizou-se o programa computacional DesignExpert®.

4.2.5.3.1 Preparação de material de referência

O material de referência utilizado (com os analitos de interesse previamente incorporados à matriz do cabelo) foi preparado a partir do procedimento do *National Institute of Standards and Technology* (NIST) (WELCH et al, 2003) com pequenas alterações no método conforme descrito abaixo:

Inicialmente, 10 mg de cada padrão foi dissolvido em 3 mL de água e sonificados por 3 minutos em um Becker de 800 mL. À mistura anterior, adicionou-se 250 mL de HCl 0,02 mol/L em DMSO. Após homogeneização, 250 mL de água foi adicionada em banho de gelo a fim de evitar aquecimento excessivo da mistura. O cabelo livre de drogas é então adicionado (10 g) e esta mistura foi mantida sob agitação ao abrigo da luz por 20 dias.

Ao final, o cabelo é cortado em pequenos segmentos e lavado várias vezes com diclorometano (a última água de lavagem foi analisada e se mostrou negativa para os analitos evidenciando que os resultados obtidos na otimização são referentes à extração efetiva das substâncias de interesse).

4.2.5.3.2 Análise de superfície de resposta

Ao propor uma modelagem inicial o primeiro passo é investigar a superfície de resposta em torno das variáveis inicialmente propostas. Para este projeto experimental foi utilizado o Delineamento Box-Behnken (delineamento com três níveis) geometricamente planejado que fica (Figura 11):

Figura 12: Gráfico de cubo ilustrando o planejamento da extração dos benzodiazepínicos realizado para as variáveis geometricamente.

Onde: ACN (concentração do solvente acetonitrila na mistura extratora em porcentagem); tempo (tempo de incubação em horas); ultra-som (aplicação de ultra-som, em minutos).

Foram realizados 17 ensaios, sendo que 5 deles são repetições nos pontos centrais. Como variável resposta foi escolhida a área do pico correspondente aos analitos de interesse observada no cromatograma. O modelo experimental está esquematizado abaixo:

Tabela 04: Variáveis avaliadas na otimização da extração dos benzodiazepínicos da matriz

Variável	Nível		
	-1	0	+1
ACN %	0	25	50
Tempo (horas)	2	7	12
Ultra-som (min)	0	30	60

4.2.6 Validação dos métodos

A validação dos métodos analíticos é um aspecto importante da qualidade dos processos em laboratórios analíticos. Ela é essencial para assegurar que os parâmetros analíticos estão de acordo com uma especificação pré-determinada, para tanto, os métodos devem ser testados a fim de demonstrar seu funcionamento adequado (UNODC, 2009b; EURACHEM, 1998).

Para validar cada método foram avaliados os parâmetros: Limite de detecção e quantificação, linearidade, recuperação, precisão intra e interensaio e exatidão.

4.2.6.1 Limite do Branco, de Detecção e de Quantificação

O limite de detecção (LoD) é definido como a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (UNODC, 2009b). Acredita-se que, se o analito está presente, ele irá produzir um sinal maior do que o ruído. Sendo que o limite de detecção também pode ser definido com a menor concentração do analito que pode ser distinguida do sinal gerado por uma amostra branco de maneira confiável (ARMBRUSTER & PRY, 2008; PETERS, 2007).

O limite do branco (LoB) é a maior concentração aparente de analito que deve ser encontrada quando replicatas de amostra branca são testadas. Segundo a EP17 este parâmetro admite que uma amostra branco possa produzir um sinal analítico que pode ser confundido com uma concentração baixa de analito (ARMBRUSTER & PRY, 2008).

O limite de quantificação (LoQ) representa a menor concentração do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão, aceitáveis, utilizando um determinado procedimento experimental. Os critérios de aceitação para esses parâmetros são, o coeficiente de variação de, no máximo, 20% entre as replicatas testadas (STÖCKL *et al*, 2009).

O LoB foi estimado medindo-se várias replicatas de uma amostra branco e calculando o resultado médio e seu desvio padrão. Pode ser definida pela expressão matemática (ARMBRUSTER & PRY, 2008):

$$\text{LoB} = \bar{x}_{\text{branco}} + 1,645\text{SD}_{\text{branco}}$$

Onde:

X: média das áreas obtidas pelo ruído das amostras bco

SD: desvio das áreas

Admitindo-se a distribuição como sendo uma gaussiana o LoB representa 95% dos valores observados.

O LoD costuma estar em uma faixa de concentração que não é abrangida pelo intervalo linear do método, portanto, especificações determinando valores nessa faixa devem ser evitadas. Pode ser definida pela expressão (ARMBRUSTER & PRY, 2008):

$$\text{LoD} = \text{LoB} + 1,645\text{SD}_{\text{amostra}}$$

Onde:

LoB: limite do branco

SD: desvio obtido para as amostras de baixa concentração

A estimativa do LoD foi feita medindo-se baixas concentrações dos analitos em estudo em sextuplicata a uma baixa concentração.

Figura 13: Diagrama esquemático mostrando a relação entre as concentrações medidas em amostras branco e a estimativa do limite de detecção

FONTE: Adaptado de ARMBRUSTER & PRY, 2008.

Já o limite de quantificação (LoQ) é definido como a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (UNODC, 2009b). Assim como o limite de detecção este parâmetro foi avaliado em sextuplicata e o coeficiente de variação entre as replicatas não deve ser maior que 15%.

4.2.6.2 Linearidade

A linearidade avalia a capacidade do método analítico em gerar resultados proporcionais à concentração do analito na amostra, em determinada faixa de concentração (UNODC, 2009b).

O estudo é feito avaliando 5 concentrações em sextuplicata dentro da faixa de trabalho. Foram avaliadas as concentrações de 0,2 (*cut off* da SoHT); 3,0; 5,0; 7,0 e 10 ng/mg para todas as anfetaminas. Para os benzodiazepínicos, duas faixas

de linearidade foram testadas em função das diferenças nos limites encontrados para os analitos em estudo; assim sendo, para dizepam, nordiazepam e aminoclonazepam foram avaliadas as concentrações de 0,05; 3,0; 5,0; 7,0 e 10 ng/mg de analito; enquanto que para o oxazepam, clordiazepóxido e temazepam as concentrações forma de 0,1; 3,0; 5,0; 7,0 e 10,0 ng/mg.

As concentrações foram inseridas no eixo das abscissas e a razão obtida entre as áreas do fármaco e seu respectivo padrão interno nas ordenadas; utilizando regressão linear e coeficientes de correlação linear (r^2) acima 0,98 foram considerados satisfatórios.

Após realizados os testes, verificou-se a condição de homo ou heteroscedasticidade da curva obtida. Caso o critério de homoscedasticidade não seja atingido, há uma evidência de possível discrepância entre os valores reais obtidos pela análise e os valores de concentração teóricos quando comparados à curva obtida (a discrepância é geralmente mais acentuada, e, portanto mais críticas, nas concentrações mais baixas) (ALMEIDA *et al.*, 2002). Neste caso é recomendável que sejam utilizados fatores de correção estabelecidos de forma empírica sobre a regressão linear obtida a fim de adequar a curva aos critérios desejados.

A homoscedasticidade de um método é avaliada pelo teste F (distribuição F de Snedecor) dentro de um intervalo de confiança de 99%, o cálculo realizado para se realizar o teste F encontra-se abaixo:

$$F_{\text{exp}} = s_2^2 / s_1^2 \quad F_{\text{tab}}(f_1, f_2; 0,01)$$

Onde:

s_2^2 : variância entre as amostras do ponto mais alto da curva

s_1^2 : variância entre as amostras do ponto mais alto da curva

$f_1 = f_2$: considerando-se (n-1) graus de liberdade

Se $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$ fica evidenciado que as variâncias não são uniformes ao longo de toda a curva podendo-se considerar o método heteroscedástico.

4.2.6.3 Precisão intraensaio e interensaio

A precisão é a expressão da concordância entre vários resultados analíticos obtidos para uma mesma amostra (LANÇAS, 2004b).

A precisão intra e interensaio é avaliada utilizando amostras de cabelo negativas adicionadas de padrão em triplicata. São preparadas três concentrações e as amostras foram avaliadas em três dias diferentes e consecutivos nas concentrações de 1, 4 e 6 ng/mg de cabelo tanto para os fármacos do grupo das anfetaminas quanto para os do grupo dos benzodiazepínicos. Para realização do teste, novas soluções padrão dos derivados anfetamínicos, bem como novos padrões internos foram preparados.

Valores de coeficiente de variação entre as replicatas menores ou iguais a 20% para as amostras na concentração mais baixa e de 15% para as concentrações mais elevadas foram considerados satisfatórios.

4.2.6.4 Exatidão

A exatidão expressa a concordância entre o valor encontrado e o valor aceito como verdadeiro ou aceito como referência (LANÇAS, 2004b). Ou, em outras palavras, a exatidão é a diferença entre o resultado obtido e o resultado real atribuída a erros sistemáticos e falhas analíticas. É geralmente expressa em porcentagem. A exatidão, juntamente com a precisão, determinam o erro do processo (UNODC, 2009b).

A exatidão foi determinada indiretamente através dos resultados obtidos para cada amostra adicionada no ensaio de precisão.

Valores de desvio entre os valores obtidos e os esperados menores que 20% para as amostras na concentração mais baixa e de 15% para as concentrações mais elevadas foram considerados satisfatórios. As determinações são realizadas por ANOVA.

4.2.6.5 Recuperação

A recuperação avalia a eficiência do método de tratamento da amostra. Toda amostra que recebe tratamento de análise indireta (extração) deve ter calculado experimentalmente a perda do analito decorrente desse tratamento. Este parâmetro expressa a variação de resposta obtida entre a quantidade de analito adicionada antes da extração e aquela decorrente da adição da mesma quantidade do analito após o processo de extração (ANVISA, 2003; UNODC, 2009b).

Segundo o Guia de Validação de Métodos analíticos da UNODC, a quantidade de analito recuperada não é fator crítico para aprovação do teste; porém, os limites de detecção e quantificação devem atingir os propósitos desejados.

O teste foi realizado em quintuplicata utilizando-se três concentrações diferentes (1, 4 e 6 ng/mg de cabelo – controles baixo, médio e alto, respectivamente) para todos os fármacos tanto do grupo das anfetaminas quanto para o grupo dos benzodiazepínicos. Valores de coeficiente de variação menores que 15% entre as replicatas de mesma concentração foram considerados satisfatórios.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Anfetaminas

5.1.1 Resultados da otimização do método

Para a otimização do método, alguns fatores avaliados como críticos por diversos autores são a fase estacionária, o tempo de extração, a velocidade de agitação, o pH da fase aceptora e o efeito *salting out*. A escolha do solvente utilizado como fase estacionária é um dos parâmetros críticos do processo quando se trabalha com um sistema LPME trifásico. Este precisa estar fortemente imobilizado nos poros da membrana, ser suficientemente hidrofóbico e possuir volatilidade adequada a fim de fornecer os resultados desejados.

Outros fatores que podem afetar a LLE convencional também interferem na HF-LPME como a adição de sal (efeito *salting out*) pode aumentar a eficiência da extração, particularmente para analitos mais polares por reduzir a interação destes com as moléculas de água (OLIVEIRA *et al.*, 2008; HYÖTYLÄINEN & RIEKKOLA, 2008; FLANAGAN *et al.*, 2006).

5.1.1.1 Estudo do tempo de extração

O Gráfico 1 mostra o comportamento dos fármacos em diferentes tempos de extração.

Gráfico 1: Estudo da influência do tempo de agitação na análise das anfetaminas.

Conforme demonstrado no gráfico, uma maior eficiência extrativa para todos os fármacos foi observada com maiores tempos de extração.

5.1.1.2 Estudo da fase estacionária

Já para o estudo da fase estacionária foi observado um efeito “tudo-ou-nada” obtendo-se eficiência na extração apenas quando se utilizou o éter diexílico como fase orgânica; este efeito pode ser atribuído à elevada volatilidade dos outros solventes utilizados (xilol e octanol) que podem não permanecer na fibra por tempo suficiente para permitir a preparação do sistema de análise apesar de serem substâncias bastante apolares.

5.1.1.3 Estudo da fase aceptora

O Gráfico 2 mostra o comportamento dos fármacos variando-se as fases aceptoras propostas.

Gráfico 2: Estudo da influência da fase acceptora na análise das anfetaminas.

As outras fases testadas (tampão fosfato 0,1 M pH 4,7 e tampão acetato 0,1 M pH 4,0) forneceram resposta pobre e irregular não fornecendo uma reprodutibilidade desejável, por este motivo, os valores obtidos não puderam ser plotados no gráfico.

Podemos observar no Gráfico 2 que ao se aumentar a concentração do HCl na fase acceptora a níveis acima de 0,1 M, não há ganhos significativos em termos de eficiência analítica (isto é observado sobremaneira para o femproporex).

A proposta de utilizar de HCl 0,1 N como fase acceptora e NaOH 1N como fase doadora é bastante interessante para as substâncias do grupo das anfetaminas visto que, sendo elas classificadas como bases fracas, elas se encontram na forma molecular quando na fase aquosa (alcalina); sendo lipossolúveis nesse meio possuindo maior afinidade pela fase orgânica imobilizada nos poros (éter diexílico), ao passar para a fase acceptora (HCl 0,1 N), as anfetaminas se protonam não sendo mais solúveis no éter e, assim, elas ficam “trapeadas” nesta fase o que permite uma maior capacidade extrativa. Esta situação está ilustrada na Figura 13:

Figura 14: HF-LPME proposta para as substâncias do grupo das anfetaminas

Além disso, é importante observar que as anfetaminas, quando em sua forma molecular, possuem caráter semi-volátil, conforme observado por ABULLAH & MISKELLY (2010). Porém, essa característica não é observada quando estas substâncias estão protonadas (em meio ácido). Portanto, utilizar HCl 0,1 N como fase aceptora ainda pode evitar perdas eventuais do analito em função de sua volatilização.

Esse sistema de extração permite até mesmo o uso de temperaturas mais elevadas em etapas críticas como a secagem da amostra (antes da derivatização) o que confere robustez ao método e dá ao analista maior segurança para trabalhar com esses fármacos.

5.1.1.4 Estudo da intensidade de agitação

O Gráfico 3 mostra o comportamento dos fármacos variando-se a intensidade e procedimento de agitação / extração proposto.

Gráfico 3: Estudo da velocidade de agitação / sonicação na análise das anfetaminas.

Conforme pode ser observado, existe interferência da intensidade e dos tipos de agitação sobre a eficiência do método, a escolha de 1000 rpm em agitador lateral se mostrou bastante eficiente para todos os fármacos em geral (especialmente para o femproporex, que mostrou detecção mais problemática). Estes resultados podem ser em decorrência de uma mobilização da fase estacionária que pode ser causada pelo uso do ultra som ou de velocidades mais elevadas de agitação. A agitação com barras magnéticas, apesar de ser o método mais comum para este tipo de análise, pode provocar a formação de bolhas ou ainda agitação irregular (OLIVEIRA *et al.*, 2008), o que pode ter levado ao resultado obtido.

5.1.1.5 Estudo de efeito *salting out*

A adição de 10 mg de NaCl ao sistema não promoveu uma melhora significativa no que diz respeito à intensidade das áreas obtidas, porém, a variabilidade entre as replicatas (desvio padrão relativo – DPR) foi reduzida como mostra o Gráfico 4.

Gráfico 4: Estudo da influência da adição de NaCl na análise das anfetaminas.

A adição de sal à fase doadora não provocou melhora perceptível nos níveis de fármaco detectado, porém, observou-se uma redução da variabilidade entre as replicatas, o que pode ser constatado ao se observar os resultados no gráfico.

A carência de material de referência específico para este estudo torna difícil a comparação dos resultados obtidos expondo a necessidade de mais estudos nesta área.

Cada um dos parâmetros avaliados se mostrou de grande importância para o bom desenvolvimento do método motivo pelo qual estes devem ser controlados a fim de que a condição mais adequada para seu desempenho seja mantida.

5.1.2 Cromatogramas característicos da análise de anfetaminas em cabelo

O cromatograma a seguir (Figura 14) exhibe o perfil cromatográfico das amostras adicionadas dos derivados anfetamínicos em estudo.

Figura 15: Cromatograma obtido pela análise de cabelo por HF-LPME adicionado dos padrões de anfetaminas na concentração de 5,0 ng/mg (**A**: Anfetamina; **B**: Anfetamina D5, **C**: Metanfetamina, **D**: MDA; **E**: Femproporex; **F**: MDMA, **G**: MDMA D5)

Abaixo encontram-se os espectros de massa de cada um dos analitos após a derivatização (Figuras 15 a 19):

Figura 16: Espectro de massa da anfetamina derivatizada.

Figura 17: Espectro de massa da metanfetamina derivatizada.

Figura 18: Espectro de massa da MDA derivatizada.

Figura 19: Espectro de massa do femproporex derivatizado.

Figura 20: Espectro de massa da MDMA derivatizada

As anfetaminas, no geral, são derivatizadas com maior eficiência utilizando-se agentes acilantes, desta forma testamos dois agentes mais promissores, a saber: o MBTFA (N-metilbistrifluoroacetamida) e o TFAA (anidrido trifluoroacético) foram utilizados em temperaturas variando de 70 a 90°C, ambos produzindo derivados trifluoroacéticos.

Os dois agentes se mostraram eficientes para ambos os grupos, exceto o femproporex que apresentou resposta mais uniforme e consistente (com menor variação entre as replicatas) quando o agente aplicado era o TFAA, motivo pelo qual este foi escolhido para o estudo.

5.1.3 Resultados da validação do método de análise das anfetaminas

Para a quantificação de substâncias por GC-MS, é recomendável o uso de padrões internos deuterados para correção de possíveis perdas no processo. Estas substâncias, devido à sua semelhança com os analitos submetidos à investigação, apresentam as mesmas propriedades analíticas.

Antes de escolher as substâncias mais adequadas. Foram testados vários padrões internos deuterados disponíveis comercialmente, entre eles o padrão de “anfetamina-d5”, “metanfetamina-d5”, “MDMA-d5” e “MDA-d5”.

Para análise das substâncias do grupo das anfetaminas (anfetamina, femproporex e metanfetamina) foi utilizado padrão interno “anfetamina-d5” e para as substâncias do grupo ecstasy (MDMA e MDA) foi utilizado como padrão interno “MDMA-d5”.

O objetivo de utilizar de um único padrão interno que atendesse às necessidades de todos os analitos com a confiabilidade desejada não foi alcançado, os padrões “anfetamina-d5” e “MDMA-d5” foram escolhidos por atenderem as expectativas analíticas de forma consistente. Os outros padrões internos propostos inicialmente (“metanfetamina-d5” e “MDA-d5”) que se apresentaram instáveis, o que poderia comprometer a reprodutibilidade do método quando na necessidade de sua aplicação em amostras verdadeiras. Esta discrepância quanto à adequabilidade dos padrões fica mais evidente durante os testes de linearidade, visto que várias concentrações são testadas sendo possível observar o comportamento das substâncias ao longo de toda a faixa de interesse.

5.1.3.1. Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção para todos os fármacos avaliados se mantiveram abaixo de 0,05 ng/mg enquanto o limite de quantificação medido foi de 0,1 ng/mg. Os limites encontrados para cada analito encontram-se listados na Tabela 5:

Tabela 5: Limites obtidos para cada analito do grupo das anfetaminas

ANALITO	LoB (ng/mg)	LoD (ng/mg)	LoQ (ng/mg)
Anfetamina	0,013	0,018	0,1
Femproporex	0,006	0,013	0,1
Metanfetamina	0,029	0,039	0,1
MDMA	0,006	0,008	0,1
MDA	0,013	0,017	0,1

As condições obtidas no desenvolvimento e otimização do método foram capazes de fornecer reprodutibilidade aceitável para o procedimento com limites de quantificação abaixo do que preconiza a SoHT (0,2 ng/mg de anfetaminas em cabelo).

5.1.3.2. Linearidade

Os valores de *cut off* estabelecidos pela SoHT foram utilizados como ponto de partida para delineamento da curva utilizada para a avaliação da linearidade, as curvas de calibração foram desenvolvidas utilizando amostra de referência negativa adicionadas de concentração conhecida de soluções-padrão antes do processo de digestão e extração.

As curvas foram construídas utilizando amostras de cabelo negativas adicionadas de padrão nas concentrações dentro da faixa de trabalho de 0,2 a 10,0 ng/mg de cabelo. Foram obtidas curvas com valores de coeficientes de correlação (r^2) maiores que 0,98.

Após aplicação do teste F sobre as equações obtidas originalmente para as curvas de cada um dos analitos ficou evidenciado a condição de heteroscedasticidade do método para todos os analitos em estudo, sendo assim, suas curvas necessitaram da aplicação de um fator de ponderação ($1/x^2$) previamente à continuidade dos testes a fim de corrigir possíveis desvios que seriam

impactantes sobremaneira em concentrações mais baixas, nas proximidades do valor de *cut off*.

Foram testados os fatores de ponderação empíricos $1/x$; $1/x^2$; $1/x^{1/2}$; $1/y$; $1/y^2$ e $1/y^{1/2}$ sobre a regressão linear ponderada de cada analito a fim de se adequar a curva aos parâmetros desejados.

Aplicou-se o fator $1/x^2$ para o tratamento das curvas de todos os analitos assumindo as seguintes equações:

- Anfetamina:

$$y = 0,7111622x + 0,096792 \quad r^2 = 0,9979$$

- Femproporex:

$$y = 0,544854x + 0,014203 \quad r^2 = 0,9975$$

- Metanfetamina:

$$y = 0,754073x + 0,095792 \quad r^2 = 0,9982$$

- MDMA:

$$y = 1,82664x + 0,096254 \quad r^2 = 0,9977$$

- MDA:

$$y = 2,633269x + 0,18615 \quad r^2 = 0,9970$$

As equações das curvas de correlação para todos os analitos mostraram coeficientes de correlação linear maiores que 0,99 na faixa de concentração avaliada (após aplicação do fator de ponderação), o que nos permite considerar o resultado satisfatório.

5.1.3.3. Precisão intraensaio e interensaio

A precisão foi estimada através do coeficiente de variação exibido entre as replicatas preparadas para uma mesma concentração e calculado por ANOVA. Os resultados estão apresentados na Tabela 6:

Tabela 6: Coeficiente de Variação (CV%) correspondente às precisões intra e interensaio das anfetaminas.

Analito	Precisão Intra-ensaio (%)			Precisão Inter-ensaio (%)		
	CQbaixo 1ng/mg	CQmédio 4ng/mg	CQalto 6ng/mg	CQbaixo 1ng/mg	CQmédio 4ng/mg	CQalto 6ng/mg
Anfetamina	4,2	2,9	9,5	8,9	6,1	8,9
Femproporex	6,4	8,5	6,9	7,1	6,1	9,1
Metanfetamina	5,0	5,3	6,6	5,5	9,2	7,7
MDMA	5,2	10,6	9,7	11,4	8,5	8,4
MDA	6,1	7,7	9,9	5,9	6,5	8,1

5.1.3.4. Exatidão

A exatidão foi estimada através do desvio médio entre os valores obtidos para as replicatas e o valor esperado (calculado através das curvas após tratamento). Os resultados estão apresentados na Tabela 07:

Tabela 7: Exatidão atribuída às anfetaminas.

Analito	Concentração obtida (ng/mg)			Exatidão em relação ao valor esperado (%)		
	CQbaixo 1ng/mg	CQmédio 4ng/mg	CQalto 6ng/mg	CQbaixo 1ng/mg	CQmédio 4ng/mg	CQalto 6ng/mg
Anfetamina	0,9	3,8	6,2	91,1	95,1	96,6
Femproporex	0,9	3,7	5,9	88,5	91,8	97,9
Metanfetamina	0,9	3,6	5,4	87,0	89,4	90,1
MDMA	0,9	4,4	6,3	91,6	89,2	94,8
MDA	1,1	4,4	6,2	88,0	89,8	96,0

As precisões intra e interensaio além da exatidão encontradas também estavam em concordância com o esperado (Tabelas 6 e 7) no qual obtivemos coeficientes de variação menores que 20% para as concentrações mais baixas e menores que 15% para as concentrações mais elevadas o que fornece segurança para utilizar o método.

5.1.3.5. Recuperação

O método apresentou recuperação média de 63,5% para a anfetamina; 40,33% para o femproporex; 56,40% para a metanfetamina; 76,91% para o MDMA e 62,68% para o MDA.

Os resultados estão apresentados de uma forma mais detalhada na Tabela 8:

Tabela 8: Recuperação das anfetaminas

Analito	CQbaixo 1ng/mg	CQmédio 4ng/mg	CQalto 6ng/mg
Anfetamina	56,2%	59,7%	64,2%
Femproporex	38,3%	36,0%	40,5%
Metanfetamina	51,4%	56,1%	51,7%
MDMA	77,0%	89,6%	78,8%
MDA	61,8%	58,2%	77,6%

Os índices de recuperação observados ficaram abaixo de 50% para o femproporex (Tabela 8). Apesar dos índices estarem abaixo do desejado, o limite de quantificação e o limite de detecção obtidos são coerentes com o método pretendido permitindo detecção e quantificação dos fármacos em estudo em níveis que estão de acordo com o que preconizam os protocolos internacionais (UNODC, 2009b) e a SoHT.

O monitoramento seletivo de íons (SIM) é apontado como o modo de operação que permite uma maior sensibilidade analítica (YONAMINE, 2000). Apesar disso, neste trabalho, o método de eleição para detecção dos analitos em se tratando da análise de anfetaminas foi o *Full Scan* visto que, em virtude das características do equipamento utilizado (*ion trap*), não foi observado ganho significativo em comparação ao modo de operação padrão, permitindo, da mesma forma, avaliar baixas concentrações das substâncias em estudo.

5.1.4. Resultados obtidos com análises toxicológicas de amostras de usuários de anfetaminas.

As amostras de cabelo dos voluntários que relataram uso de anfetaminas foram submetidas ao método desenvolvido e validado. Os resultados das análises encontram-se na Tabela 9:

Tabela 9: Resultados da análise das amostras de cabelo de voluntários que relataram consumo de anfetaminas – **LEGENDA:** Anf – anfetamina; Femp – femproporex; S1, S2, S3, S4 – segmentos de cabelo do mesmo voluntário equivalentes a 0 a 3 cm, 3 a 6 cm, 6 a 9 cm e 9 a 12 cm, respectivamente, contados a partir da raiz.

Voluntário	Sexo	Cor do cabelo	Tratamento cosmético	Resultados			
01	M	preto	N	Anf: 0,12 ng/mg Femp: < LoQ			
02	F	castanho	N	Anf: 0,78 ng/mg Femp: 0,21 ng/mg			
03	F	loiro	Tingimento	S1 Anf: 0,33 ng/mg Femp: 0,24 ng/mg	S2 Anf: 0,17 ng/mg Femp: < LoQ	S3 -	S4 -
04	M	castanho	N	-			
05	F	castanho	N	Anf: 0,18 ng/mg			
06	M	preto	N	Anf: 6,79 ng/mg			
07	M	preto	N	Anf: 0,41 ng/mg			

As amostras coletadas de voluntários provenientes do Centro de Tratamento de Dependência Química foram selecionadas de pacientes que relataram uso das substâncias em estudo. Vale ressaltar que nesta clínica, há poucos casos de internação pela dependência de derivados anfetamínicos, sendo que a causa de internação predominante é em decorrência da dependência de cocaína e álcool.

Outra dificuldade foi encontrada no procedimento da coleta. É comum que usuários de anfetamina utilizem estas substâncias inicialmente para controle de peso se mostrando, em geral, pessoas vaidosas e resistentes em fornecer amostras de cabelo temendo algum prejuízo estético (já que as amostras devem ser coletadas o mais próximo possível do couro cabeludo); concordando em fornecer amostras às vezes insuficientes para a análise, mesmo após esclarecimento do procedimento.

Muitos voluntários, também se mostram receosos em fornecer as informações do questionário, gerando uma lacuna no estudo no que diz respeito à avaliação comparativa entre as concentrações obtidas no estudo e a exposição à droga. Mesmo assim, as amostras obtidas foram analisadas devido à dificuldade de obtenção de amostras verdadeiras.

Foram analisadas 7 amostras de cabelo proveniente dos pacientes selecionados (Tabela 9) de acordo com o procedimento descrito no item 4.2.3.7. Somente a amostra do voluntário número 4 não apresentou nenhum dos analitos em estudo. As amostras dos voluntários 1 e 5 mostraram valores de concentração abaixo do *cut off* estabelecido (0,2 ng/mg). Apenas a amostra 3 permitiu avaliação do consumo histórico em função do seu comprimento sugerindo um aumento de uso nos últimos meses em função de uma maior concentração tanto do femproporex quanto da anfetamina (fármacos observados após análise). A amostra 6 apresentou uma maior concentração do fármaco (6,79 ng/mg) porém, surpreendentemente, foi observada apenas a presença de anfetamina sem nenhum dos seus precursores.

Os resultados obtidos sugerem que o femproporex parece ser incorporado na matriz de uma maneira menos eficiente que a anfetamina. Esse resultado já havia sido observado por Nakahara & Kikura em 1996 quando avaliaram a incorporação de diversas anfetaminas em pelo de rato.

Nenhuma das amostras avaliadas apresentou derivados metilenodioxí (MDMA e MDA).

O método desenvolvido e validado para detecção e quantificação de anfetaminas se mostrou adequado às necessidades analíticas, sendo prático e eficiente para o que se propõe. Curiosamente não havia na bibliografia científica material que mencionasse a análise de anfetaminas em cabelo por LPME apesar do grande potencial da técnica utilizando fibras ocas (HF-LPME) para a análise de matrizes nas quais se dispõe de pequenas quantidades de amostras e baixas concentrações de analitos. A grande desvantagem é a carência de automatização do processo por este ser um método relativamente novo.

Os resultados obtidos para as anfetaminas foram publicados na forma de artigo no *Journal of Chromatography A* (ANEXO 4).

5.2 Benzodiazepínicos

5.2.1 Resultados da otimização do método

Como mencionado anteriormente, a etapa que foi otimizada (considerada mais crítica) foi a extração dos analitos da fibra do cabelo.

Antes da eleição dos fatores que seriam avaliados na otimização, vários testes preliminares foram desenvolvidos a fim de se obter indicativos, ainda que superficiais, da melhor técnica a ser utilizada para extrair as substâncias da matriz. Sendo assim, inicialmente, utilizou-se tampão fosfato pH 5,0; mistura de metanol : hidróxido de amônio (10:1); metanol : TFA (10:1); metanol : acetonitrila : hidróxido de amônio (5 :5:1); formiato de amônio em metanol e acetato de amônio em metanol (estes dois últimos foram testados em concentrações que variaram de 2 mM a 2 M). Todos estes foram testados em diferentes tempos de incubação e aplicação de ultrassom para avaliar a capacidade extrativa.

Dessa forma, ficou evidenciado que a melhor situação extrativa seria a que utiliza hidróxido de amônio em solvente orgânico (sendo a proporção dos solventes

utilizados poderia ser significativa). Outros fatores que pareciam ter importância para este método específico foram o tempo de incubação e a aplicação de ultrassom ao sistema.

O planejamento proposto para o ensaio após estas evidências foi (Tabela 10):

Tabela 10: Planejamento fatorial 2^3 completo, com 5 pontos centrais realizado para os benzodiazepínicos

Ensaio	Variáveis codificadas			Variáveis decodificadas			Resposta Área		
	X1	X2	X3	ACN (%)	Tempo (h)	Ultra-som (min)	Diazepam	Nordiazepam	Clonazepam
1	-1	-1	-1	0	0	0	5.2890E+07	2.0260E+08	997416
2	+1	-1	-1	50	0	0	1.053E+07	3.3464E+07	946234
3	-1	+1	-1	0	12	0	8.0801E+06	3.2055E+07	948740
4	+1	+1	-1	50	12	0	2.5626E+07	2.0177E+08	1.3619E+06
5	-1	0	0	0	7	30	1.2754E+07	1.0834E+07	684704
6	+1	0	0	50	7	30	1.0736E+07	4.0639E+07	1.2384E+06
7	-1	0	+1	0	7	60	7.0308E+06	5.4010E+07	1.5275E+06
8	+1	0	+1	50	7	60	2.2095E+07	7.3662E+07	1.2835E+06
9	0	-1	0	25	0	30	9.0338E+06	3.3764E+07	745679
10	0	+1	0	25	12	30	1.0029E+06	1.032E+06	455112
11	0	-1	+1	25	0	60	2.0220E+07	9.7299E+07	486445
12	0	+1	+1	25	12	60	6.0788E+06	2.3342E+07	759972
13	0	0	0	25	7	30	2.4592E+07	2.1653E+08	1.1263E+06
14	0	0	0	25	7	30	2.1015E+06	1.0163E+07	615866
15	0	0	0	25	7	30	7.9015E+06	2.9836E+07	544411
16	0	0	0	25	7	30	3.0562E+07	2.0720E+08	595318
17	0	0	0	25	7	30	3.0233E+06	1.0273E+07	868132

Os ensaios propostos acima foram realizados de maneira aleatória.

De posse dos resultados, verificou-se por ANOVA que os dados eram significativos ($p > 0,5$) e obedeciam a uma distribuição quadrática. Assim sendo, foi possível traçar a superfície de resposta para os três analitos em avaliação como pode ser observado na Figura 20:

Figura 21: Análise de superfície para os benzodiazepínicos.

Diazepam

Nordiazepam

Clonazepam

A partir dos resultados obtidos, optou-se por utilizar as condições nas quais o clonazepam (cuja detecção é mais problemática) apresenta melhores resultados, a saber: 50% de acetonitrila na solução extratora, 7 horas de extração (todas as avaliações da superfície foram realizadas considerando 30 minutos de tempo de ultrassom).

5.2.2 Cromatogramas característicos da análise de benzodiazepínicos em cabelo

O cromatograma a seguir (Figura 21) exibe o perfil cromatográfico das amostras adicionadas dos derivados anfetamínicos em estudo.

Figura 22: Cromatograma obtido pela análise de cabelo por SPE adicionado dos padrões de benzodiazepínicos na concentração de 5,0 ng/mg (**A**: diazepam; **B**: diazepam-d5; **C**: nordiazepam, **D**: oxazepam; **E**: aminoclonazepam; **F**: clordiazepóxido e **G**: temazepam)

Abaixo encontram-se os espectros de massa de cada um dos benzodiazepínicos após a derivatização (Figuras 22 a 27):

Figura 23: Espectro de massa do diazepam.

Figura 24: Espectro de massa do nordiazepam derivatizado.

Figura 25: Espectro de massa do oxazepam derivativizado.

Figura 26: Espectro de massa do aminoclonazepam derivativizado.

Figura 27: Espectro de massa do clordiazepóxido derivatizado.

Figura 28: Espectro de massa do temazepam derivatizado.

Para os benzodiazepínicos, os agentes sililantes são usados para derivatização com maior eficiência. Neste trabalho, foram testados: BSTFA + 1% TCMS (N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida + 1% trimetilclorosilano) e MSTFA + 1% TCMS (N-metiltrimetilsililtrifluoroacetamida + 1% trimetilclorosilano), ambos produzindo derivados trimetilsilil.

Além destes, foi testado o MTBSTFA + 1% TBDCMS (N-metil-N-(*t*-butildimetilsilil)trifluoroacetamida + 1% *t*-butildimetilclorosilano).

Este último gera derivados *t*-bultildimetilsilil que apresentam fragmentos maiores e mais específicos melhorando a detecção por GC-MS. Possuem também como vantagem uma maior resistência à umidade gerando derivados mais estáveis (GUNNAR et al, 2004). Ainda, o MTBSTFA foi mais eficiente para promover a detecção do clonazepam e de seu produto de biotransformação, o 7-aminoclonazepam.

5.2.3 Resultados da validação do método

Da mesma forma que para as anfetaminas, vários padrões deuterados disponíveis comercialmente foram avaliados quanto à sua adequabilidade para os analitos em estudo, a saber: diazepam-d5, oxazepam-d5, nordiazepam-d5 e aminoclonazepam-d5.

No caso dos benzodiazepínicos, tanto o diazepam-d5 quanto o nordiazepam-d5 atenderam às expectativas de desempenho esperadas para todas as substâncias em estudo. Os padrões de oxazepam-d5 e clonazepam-d5, parecem ser menos estáveis e, ao contrário dos todos os outros padrões que podem ser armazenados em geladeira (2 a 8°C), estes dois últimos devem ser armazenados em freezer (-20°C) denotando menor robustez que os outros avaliados.

A escolha de um padrão interno único é preferível, sempre que possível, pois confere maior praticidade à análise além de ser economicamente mais viável.

Dessa forma, no caso dos benzodiazepínicos, foi possível utilizar um único padrão interno para todos os fármacos em análise, neste caso o diazepam-d5 foi

escolhido visto que o diazepam é considerado o composto protótipo da classe dos benzodiazepínicos, sendo bastante promissor tanto para as substâncias em análise quanto para outros compostos da classe que possam ser de interesse.

5.2.3.1 Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção para todos os fármacos avaliados se mantiveram em torno de 0,01 ng/mg enquanto os limites de quantificação ficaram abaixo de 0,05 ng/mg. Os limites encontrados para cada analito encontram-se listados na Tabela 11:

Tabela 11: Limites encontrados para cada analito do grupo dos benzodiazepínicos

ANALITO	LoB (ng/mg)	LoD (ng/mg)	LoQ (ng/mg)
Diazepam	0,0001	0,0113	0,030
Oxazepam	0,0015	0,0146	0,050
Nordiazepam	0,0001	0,0112	0,030
Clordiazepóxido	0,0004	0,0132	0,050
Aminoclonazepam	0,0002	0,0051	0,030
Temazepam	0,0009	0,0152	0,050

5.2.3.2 Linearidade

As curvas foram construídas utilizando amostras de cabelo negativas adicionadas de padrão nas concentrações dentro da faixa de trabalho de 0,05 ou 0,1 a 10,0 ng/mg de cabelo. Foram obtidas curvas com valores de coeficientes de correlação (r^2) maiores que 0,98. Para as substâncias: diazepam, nordiazepam e aminoclonazepam, o ponto mais baixo da curva correspondeu à concentração de 0,05 ng/mg enquanto que para o oxazepam, clordiazepóxido e temazepam, a

concentração do ponto mais baixo da curva foi de 0,1 ng/mg. Esta diferença foi observada em virtude dos diferentes limites de quantificação encontrados para os fármacos.

Também aqui, o fenômeno de heteroscedasticidade também ficou evidenciado após aplicação do teste F.

Dessa forma, foram testados os fatores de ponderação empíricos $1/x$; $1/x^2$; $1/x^{1/2}$; $1/y$; $1/y^2$ e $1/y^{1/2}$ sobre a regressão linear ponderada de cada analito a fim de se adequar a curva aos parâmetros desejados.

O fator $1/x^2$ apresentou os melhores resultados e foi aplicado para o tratamento das curvas de todos os analitos assumindo as seguintes equações:

- Diazepam:

$$y = 0,637999x + 0,060297 \quad r^2 = 0,9967$$

- Oxazepam:

$$y = 0,094646x + 0,00375 \quad r^2 = 0,9988$$

- Nordiazepam:

$$y = 1,663027x - 0,02054 \quad r^2 = 0,9922$$

- Clordiazepóxido:

$$y = 0,297499x + 0,026848 \quad r^2 = 0,9987$$

- Aminoclonazepam:

$$y = 0,277006x + 0,000179 \quad r^2 = 0,9987$$

- Temazepam:

$$y = 0,153028x + 0,001014 \quad r^2 = 0,9976$$

5.2.3.3 Precisão intraensaio e interensaio

A precisão foi estimada através do coeficiente de variação exibido entre as replicatas preparadas a uma mesma concentração calculados por ANOVA. Os resultados estão apresentados na Tabela 12:

Tabela 12: Coeficiente de Variação (CV%) correspondente às precisões intra e interensaio dos benzodiazepínicos.

Analito	Precisão Intra-ensaio (%)			Precisão Inter-ensaio (%)		
	CQbaixo 1ng/mg	CQmédio 4ng/mg	CQalto 6ng/mg	CQbaixo 1ng/mg	CQmédio 4ng/mg	CQalto 6ng/mg
Diazepam	9,6	9,4	10,3	14,5	12,0	11,2
Oxazepam	9,3	8,6	8,7	10,2	10,6	11,9
Nordiazepam	9,2	11,7	10,6	14,7	12,1	12,7
Clordiazepóxido	10,4	10,7	9,7	14,2	12,2	10,3
Aminoclonazepam	9,4	8,6	8,5	11,5	12,6	11,2
Temazepam	10,4	11,0	9,4	14,7	10,8	12,6

5.2.3.4 Exatidão

A exatidão foi estimada através do desvio médio entre os valores obtidos exibido entre as replicatas e o valor esperado (calculado através das curvas após tratamento). Os resultados estão apresentados na Tabela 13:

Tabela 13: Exatidão atribuída aos benzodiazepínicos.

Analito	Concentração obtida (ng/mg)			Exatidão em relação ao valor esperado (%)		
	CQbaixo 0,5ng/mg	CQmédio 3ng/mg	CQalto 7ng/mg	CQbaixo 1ng/mg	CQmédio 4ng/mg	CQalto 6ng/mg
Diazepam	0,45	3,31	6,41	89,4	89,8	93,1
Oxazepam	0,58	3,36	6,48	84,0	87,7	91,9
Nordiazepam	0,43	3,34	5,39	86,3	89,4	90,0
Clordiazepóxido	0,45	2,84	5,89	89,9	94,6	98,2
Aminoclonazepam	0,45	3,14	5,78	90,9	95,3	96,4
Temazepam	0,41	3,22	5,73	83,4	92,4	95,5

A avaliação dos dados referentes à precisão e à exatidão permite constatar que o método pode ser aplicado com segurança já que os parâmetros avaliados estão todos dentro das especificações pré-estabelecidas (coeficientes de variação menor que 20% para as concentrações mais baixas e menor que 15% para concentrações médias e altas).

5.2.3.5 Recuperação

O método apresentou recuperação média de 66,03% para o diazepam; 27,38% para o oxazepam; 56,49% para o nordiazepam; 47,53% para o clordiazepóxido, 43,41% para o aminoclonazepam e 57,94% para o temazepam.

Os resultados estão apresentados de uma forma mais detalhada na Tabela 14:

Tabela 14: Recuperação dos benzodiazepínicos

Analito	CQbaixo	CQmédio	CQalto
	1ng/mg	4ng/mg	6ng/mg
Diazepam	68,42%	62,42%	67,26%
Oxazepam	25,08%	27,57%	29,46%
Nordiazepam	51,83%	54,19%	63,45%
Clordiazepóxido	53,15%	44,76%	44,69%
Aminoclonazepam	39,82%	43,51%	46,91%
Temazepam	63,55%	54,86%	55,42%

O resultados variaram bastante entre os fármacos em função da grande diferença de pKa observada entre as moléculas do grupo, sendo assim, é complicado estabelecer uma condição ideal para todos os fármacos de forma simultânea. As condições escolhidas para a extração foram as que melhor se adequaram a todas as substâncias ao mesmo tempo.

5.2.4 Resultados obtidos com análises toxicológicas de amostras de usuários de benzodiazepínicos.

As amostras de cabelo dos voluntários que relataram uso de benzodiazepínicos foram submetidas ao método desenvolvido e validado. Os resultados das análises encontram-se na Tabela 15:

Tabela 15: Resultados da análise das amostras de cabelo de voluntários que relataram uso de benzodiazepínicos – **LEGENDA:** AMIN - aminoclonazepam; DZP – diazepam; NZP: nordiazepam, S1, S2, S3 – segmentos de cabelo do mesmo voluntário equivalentes a 0 a 3 cm, 3 a 6 cm, 6 a 9 cm, respectivamente, contados a partir da raiz.

Voluntário	Sexo	Cor do cabelo	Tratamento cosmético	Resultados		
01	M	loiro	N	Amin: 1,058 ng/mg		
02	F	preto	tingimento	Amin: 0,548 ng/mg		
03	M	castanho	N	Amin: 0,162 ng/mg		
04	F	loiro	tingimento	S1 Amin: 0,358 ng/mg	S2 -	S3 -
05	M	castanho	N	Amin: <LoQ		
06	M	grisalho	N	Amin: 0,062 ng/mg		
07	F	preto	tingimento	-		
08	F	castanho	N	S1 Dzp: 0,978 ng/mg Nzp: 0,019 ng/mg	S2 Dzp: 0,238 ng/mg Nzp: -	S3 -
09	F	loiro	tingimento	-		

As mesmas dificuldades quanto à coleta de amostras observada para os fármacos tipo anfetaminas se aplicam aos benzodiazepínicos.

A relativa escassez de amostras positivas e o receio dos voluntários em fornecer informações (sobre as condições de consumo) ou responder o questionário, mais uma vez impossibilitaram qualquer relação que se queira fazer sobre os padrões de consumo e a quantidade da substância que é incorporada no cabelo.

Foram analisadas 9 amostras de cabelo provenientes dos pacientes selecionados (Tabela 15) de acordo com o procedimento previamente descrito (item 4.2.5.1). Apenas a amostra do voluntário 07 não apresentou nenhum dos analitos pesquisados. Duas amostras permitiram avaliar seu consumo histórico em função do seu comprimento. Essas amostras (ambas tingidas) exibiram uma redução muito grande nas concentrações observadas entre os segmentos, possivelmente devido a tratamentos cosméticos. Este comportamento das substâncias já havia sido descrito por Martins *et al.* (2008) para as anfetaminas.

O tratamento cosmético, principalmente a descoloração, causa a abertura das escamas presentes na cutícula expondo as partes mais internas do cabelo, o que favorece a perda tanto de umidade, quanto de substâncias que estivessem incorporadas à matriz (desde vitaminas até xenobióticos, entre eles as drogas de abuso).

A maioria das amostras obtidas apresentava aminoclonazepam devido às características de consumo do Brasil. Apenas uma das amostras continha diazepam e nesta foi observada tanto a presença do diazepam quanto a do seu principal produto de biotransformação, o nordiazepam; este se apresentou em concentração mais baixa que a de seu precursor, estes achados já haviam sido observados por Kim *et al.* (2011) em pelos de rato.

O clonazepam pode ser extraído e detectado em amostras de cabelo, porém, a sensibilidade do método proposto não se mostrou satisfatória com limites mais elevados que o desejável. O método descrito foi eficiente apenas em concentrações mais elevadas e inadequadas para a finalidade proposta.

Contudo, amostras provenientes de usuários de clonazepam ainda podem ser analisadas detectando-se seu produto de biotransformação (7-aminoclonazepam) ao invés do fármaco inalterado em si.

Um dos fatores que motivou a realização deste trabalho foi a demanda crescente por este tipo de análise somado à carência de dados na literatura de técnicas de fácil aplicação em laboratórios forense. Foram analisadas diversas técnicas desenvolvidas para quantificação de anfetaminas e benzodiazepínicos em cabelo disponíveis na literatura (Tabela 3), com o intuito de avaliar as melhores condições, vantagens e desvantagens, de cada procedimento. Ao desenvolver o método, a praticidade, simplicidade, rapidez e sensibilidade foram alguns aspectos levados em consideração, por se tratar de uma aplicação em rotinas laboratoriais que exigem a obtenção de resultados de forma rápida e precisa.

A proposta inicial do trabalho era realizar análise simultânea de todas as substâncias em estudo (anfetaminas e benzodiazepínicos) em uma amostra única de cabelo.

Neste sentido, várias dificuldades foram encontradas a começar pela extração desses xenobióticos da matriz biológica em estudo. O procedimento utilizado para as anfetaminas, que utiliza hidrólise alcalina, parece ser muito lesivo para os benzodiazepínicos, o que é crítico, sobretudo em baixas concentrações do analito.

É importante ressaltar que, em análises desse tipo, é desejável que se realize a hidrólise completa do cabelo, pois, dessa forma, obtém-se a segurança de que os analitos incorporados à estrutura do cabelo são completamente liberados para o meio extrator. Porém, os benzodiazepínicos não permitem este tipo de digestão para extração do cabelo o que reduz a taxa de extração desses fármacos.

As possíveis dúvidas que poderiam surgir quanto à eficiência da extração sem a digestão completa da fibra foram contornadas com a “produção” de um cabelo com os analitos adicionados internamente (item 4.2.5.3.1). Este método desenvolvido possui potencial para ser utilizado para diversos compostos dessa classe.

A preparação de amostras utilizada para as anfetaminas (HF-LPME) também não foi aplicável aos benzodiazepínicos de forma satisfatória. Provavelmente, em

função da grande variação das propriedades intrínsecas de cada fármaco desta classe (pKa, polaridade, caráter ácido-base etc).

Outra razão que inviabiliza a aplicação da LPME neste caso específico, é o fato dos benzodiazepínicos serem extraídos do cabelo em uma fase orgânica (metanol : acetonitrila : hidróxido de amônio) e não aquosa como seria desejável para a aplicação da microextração. Neste caso, seria necessária a evaporação do solvente que compõe a fase extratora com sua posterior ressuspensão, o que tornaria o método dispendioso em termos de tempo de análise, além de forçar a uma maior manipulação da amostra (condições que não são interessantes para o analista). Por outro lado, o procedimento desenvolvido para os benzodiazepínicos (SPE de fase mista) parece ser eficiente também para as anfetaminas.

Tanto os benzodiazepínicos quanto a anfetaminas necessitam de uma etapa de derivatização que vai permitir que esses fármacos adquiram características favoráveis para análise por cromatografia gasosa como volatilidade e estabilidade térmica, baixa polaridade etc. Vale ressaltar aqui, que os dois grupos de fármacos não reagem de forma satisfatória com um mesmo agente derivatizante.

Para atingir o objetivo de detectar simultaneamente os dois grupos, alguns procedimentos foram testados, incluindo uso de PFPOH : PFPA (pentafluoropropanol : anidrido pentafluoropropiônico) conforme MOELLER et al (2003) ou de MBTFA : MTBSTFA (PRAGST & BALIKOVÁ, 2006). Infelizmente, não se obteve resultados satisfatórios em nenhuma das alternativas.

A primeira (PFPOH : PFPA), não se mostrou eficiente para derivatizar os benzodiazepínicos em geral. A segunda alternativa (MBTFA : MTBSTFA) falhou em derivatizar de forma eficiente o clonazepam e seu produto de biotransformação (7-aminoclonazepam), além de não derivatizar o femproporex de forma robusta, apresentando grande variabilidade entre as replicatas avaliadas.

Na realidade, mesmo para os analitos para os quais essas estratégias se mostram funcionais, observamos uma significativa perda de sensibilidade analítica, o que é extremamente indesejável, já que o objetivo do método era detectar concentrações as mais baixas possíveis. Caso se optasse por utilizar algum dos esquemas descritos, teríamos limites muito elevados para o método desenvolvido, o

que inviabilizaria o processo de detecção em níveis usuais (que é o esperado de ser encontrado em amostras reais de cabelo).

Tentou-se ainda dividir os extratos obtidos ao final da etapa de clean up como fizeram CORDERO E PATERSON (2006), porém, mais uma vez, a redução drástica na sensibilidade analítica impediu que o método fosse conduzido de maneira satisfatória.

Em virtude desses fatos, optamos por realizar as análises em separado para cada um dos grupos envolvidos no projeto inicial obtendo sucesso dessa forma.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos preliminarmente neste trabalho pode-se concluir que:

- A técnica de microextração em fase líquida utilizando fibras ocas (HF-LPME) se mostra eficiente para análise de anfetaminas em amostras de cabelo.
- O femproporex parece ter menores taxas de incorporação na fibra capilar do que o seu produto de biotransformação anfetamina.
- Os métodos desenvolvidos e validados para a detecção e quantificação tanto das anfetaminas quanto dos benzodiazepínicos se mostraram adequados às necessidades sendo eficientes para o que se propõe.
- Tratamentos cosméticos parecem reduzir a quantidade de substâncias incorporadas em cabelo o que pode prejudicar a detecção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAH, A.; MISKELLY, G. Recoveries of trace pseudoephedrine and methamphetamine residues from impermeable household surfaces: Implication for sampling methods used during remediation of clandestine methamphetamine laboratories. *Talanta*, v.81, p.455-461, 2010.

ALMEIDA, A.; CASTEL-BRANCO, M.M.; FALCÃO, A.C. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v.774, n.2, p.215-222, 2002.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. *Portaria n.344, de 12 de maio de 1998*. Aprova o Regulamento Técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/344_98.htm Acesso em: 30 out. 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. *Resolução RDC n.52, de 6 de outubro de 2011*. Dispõe sobre a proibição do uso das substâncias anfepramona, femproporex e mazindol, seus sais e isômeros, bem como intermediários e medidas de controle da prescrição e dispensação de medicamentos que contenham a substância sibutramina, seus sais e isômeros, bem como intermediários e dá outras providências. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/anorexigenos/pdf/RDC%2052-2011%20DOU%2010%20de%20outubro%20de%202011.pdf>. Acesso em: 01 nov. 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. *Resolução RE n.899, de 28 de maio de 2003*. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm. Acesso em: 09 nov. 2011.

ANDERSON, R.; ARIFFIN, M.; CORMACK, P.; MILLER, E. Comparison of molecularly imprinted solid-phase extraction (MISPE) with classical solid-phase extraction (SPE) for the detection of benzodiazepines in post-mortem hair samples. *Forensic Science International*, v.174, p.40-46, 2008.

ARMBRUSTER, D.A.; PRY, T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *Clinical Biochemist Reviews*, v.29, suppl.1, p.S49-S52, 2008.

AUCHEWSKI, L.; ANDREATINI, R.; GALDURÓZ, J.C.; LACERDA, R.B. Avaliação da orientação médica sobre os efeitos colaterais de benzodiazepínicos. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v.1, p.24-31, 2004.

BALIKOVÁ, M. Hair analysis for drugs of abuse: plausibility of interpretation. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia*, v.149, n.2, p.199-207, 2005.

BAUMGARTNER, A.M.; JONES, P.F.; BAUMGARTNER, W.A.; BLACK, C.T. Radioimmunoassay of hair for determining opiate-abuse histories. *Journal of Nuclear Medicine*, v.20, p.748–752, 1979.

BAYLEN, C.A.; ROSENBERG, H. A review of the acute subjective effects of MDMA/ecstasy. *Addiction*, v.101, n.7, p.933-947, 2006.

BONO, J.P. Criminalistics: Introduction to controlled substances. In: KARCH, S.B., ed. *Drug abuse handbook*. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 2007. p.147-205.

BOOT, B.P.; MCGREGOR, I.S.; HALL, W. MDMA (Ecstasy) neurotoxicity: assessing and communication the risks. *Lancet*, v.355, p.1818-1821, 2000.

BRASIL. Câmara dos Deputados. *Decreto n.54.216, de 27 de agosto de 1964*. Promulga a Convenção única sobre entropécentes. Disponível em: <http://www2.camara.leg.br/legin/fed/decret/1960-1969/decreto-54216-27-agosto-1964-394342-publicacaooriginal-1-pe.html> Acesso em: 12 nov 2012.

BUCELLI, F.; FRATINI, A.; BAVAZZANO, P.; COMODO, N. Quantification of drugs of abuse and some stimulants in hair samples by liquid chromatography–electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v.877, n.31, p.3931-3936, 2009.

BULCÃO, R.; GARCIA, S.; LIMBERGER, R.; BAIERLE, M.; ARBO, M.; CHASIN, A.; THIESEN, F.; TAVARES, R. Designer drugs: aspectos analíticos e biológicos. *Química Nova*, v.15, p.1-10, 2011.

CAPELA, J.P.; CARMO, H.; REMIÃO, F.; BASTOS, M.; MEISEL, A.; CARVALHO, F. Molecular and cellular mechanisms of ecstasy-induced neurotoxicity: na overview. *Molecular Neurobiology*, v.39, p.210-271, 2009.

CENTRO BRASILEIRO DE INFORMAÇÕES SOBRE DROGAS PSICOTRÓPICAS (CEBRID). II Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil. São Paulo: Departamento de Psicobiologia/UNIFESP, 2005.

CHARNEY, D.; MIHIC, S.; HARRIS, R. Hipnóticos e sedativos. In: GOODMAN, L.S.; GILMAN, A.; BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L., eds. *Goodman & Gilman as bases farmacológicas da terapêutica*. 11.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2007. p.5359-382.

CHÈZE, M.; VILLAIN, M.; PÉPIN, G. Determination of bromazepam, clonazepam and metabolites after a single intake in urine and hair by LC–MS/MS application to forensic cases of drug facilitated crimes. *Forensic Science International*, v.145, p.123-130, 2004.

CHÈZE, M.; DEVEAUX, M.; CLAIRE, M.; LHERMITTE, M.; PÉPIN, G. Simultaneous analysis of six amphetamines and analogues in hair, blood and urine by LC-ESI-MS/MS: application to the determination of MDMA after low ecstasy intake. *Forensic Science International*, v.170, p.100-104, 2007.

CHIANG, W. Amphetamines. In: NELSON, L.; GOLDFRANK, L.R.; LEWIN, N.; HOWLAND, M.; HOFFMAN, R.; GOLDFRANK, L.; FLOMENBAUM, N., eds.

Goldfrank's toxicologic emergencies. 9.ed. Maidenhead: McGraw-Hill Medical, 2011. p.1078-1090.

CHUNG, L.W.; LIU, G.J.; LI, Z.G.; CHANG, Y.Z.; LEE, M.R. Solvent-enhanced microwave-assisted derivatization following solid-phase extraction combined with gas chromatography-mass spectrometry for determination of amphetamines in urine. *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v.874, n.1/2, p.115-118, 2008.

CODY, J. Precursor medications as a source of methamphetamine and/or amphetamine positive drug testing results. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, v.44, n.5, p.435-450, 2002.

CORDERO, R.; PATERSON, S. Simultaneous quantification of opiates, amphetamines, cocaine and metabolites and diazepam and metabolite in a single hair sample using GC-MS. *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v.850, n.1/2, p.423-431, 2006.

COSTA, J.L.; CHASIN, A.A.M. Determination of MDMA, MDEA and MDA in urine by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v.811, n.1, p.41-45, 2004.

RIO DE JANEIRO (Prefeitura). Secretaria da Saúde. Subsecretaria de Ações e Serviços da Saúde. Coordenação de Programa de Saúde Mental. *Uso racional de psicofármacos*, ano.1, v.1, p.1-6, 2006. Disponível em: <http://www.ensp.fiocruz.br/portal-ensp/judicializacao/pdfs/289.pdf> Acesso em: 12 nov 2012.

DE LA TORRE, R.; SEGURA, J.; DE ZEEUM, R.; WILLIAMS, 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. *Annals of Clinical Biochemistry*, v.34, pt.4, p.339-344, 1997.

DE LA TORRE, R.; FARRÉ, M.; NAVARRO, M.; PACIFICI, R.; ZUCCARO, P.; PICHINI, S. Clinical pharmacokinetics of amphetamine and related substances. *Clinical Pharmacokinetics*, v.43, n.3, p.157-185, 2004.

DOWNES, M.; WHYTE, I. Amphetamine-induced movement disorder. *Emergency Medicine Australasia*, v.17, p.277-280, 2005.

EURACHEM. Publications. Guides: See All Guides. *The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics*. 1998. Disponível em: <http://www.eurachem.org/guides/pdf/valid.pdf> Acesso em: 09 nov. 2011.

FLANAGAN, R.; MORGAN, P.; SPENCER, E.; WHELPTON, R. Micro-extraction techniques in analytical toxicology: short review. *Biomedical Chromatography*, v.20, p.530-538, 2006.

GHONEIM, M.M. Drugs and human memory (part 2): clinical, theoretical, and methodologic issues. *Anesthesiology*, v.100, n.5, p.1277-1297, 2004.

GJERDE, H.; DAHLIN, E.; CHRISTOPHERSEN, A. Simultaneous determination of common benzodiazepines in blood using capillary gas chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.10, n.5, p.317-322, 1992.

GUNNAR, T.; MYKKÄNEN, S.; ARINIEMI, K.; LILLSUNDE, P. Validated semiquantitative/quantitative screening of 51 drugs in whole blood as silylated derivatives by gas chromatography-selected ion monitoring mass spectrometry and gas chromatography electron capture detection. *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v.806, n.2, p.205-219, 2004.

GUNNAR, T.; ARINIEMI, K.; LILLSUNDE, P.; Determination of 14 benzodiazepines and hydroxy metabolites, zaleplon and zolpidem as *tert*-butyldimethylsilyl derivatives compared with other common silylating reagents in whole blood by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v.818, n.2, p.175-189, 2005.

HAN, E.; MILLER, E.; LEE, J.; PARK, Y.; LIM, M.; CHUNG, H.; WYLIE, F.M.; OLIVER, J.S. Validation of the immunalysis® microplate ELISA for the detection of methamphetamine in hair. *Journal of Analytical Toxicology*, v.30, n.6, p.380-385, 2006.

HERNÁNDEZ, I.; FERNÁNDEZ, M. Anfetaminas. In: LORENZO, P.; LADERO, J.; LEZA, J.; LIZASOAIN, I. *Drogodependencias: farmacología, patología, psicología e legislación*. Madrid: Panamericana, 1998. p149-156.

HOFFMAN, R.; NELSON, L.; HOWLAND, M. Benzodiazepines. In: NELSON, L.; GOLDFRANK, L.R.; LEWIN, N.; HOWLAND, M.; HOFFMAN, R.; GOLDFRANK, L.; FLOMENBAUM, N., eds. *Goldfrank's toxicologic emergencies*. 9.ed. Maidenhead: McGraw-Hill Medical, 2011. p.1109-1114.

HYÖTYLÄINEN, T.; RIEKKOLA, M. Sorbent- and liquid-phase microextraction techniques and membrane-assisted extraction in combination with gas chromatographic analysis: a review. *Analytica Chimica Acta*, v.614, p.27-37, 2008.

IRVING, R.; DICKSON, S. The detection of sedatives in hair and nail samples using tandem LC-MS-MS. *Forensic Science International*, v.166, p.58-67, 2007.

JENKINS, A.J. Pharmacokinetics: drug absorption, distribution, and elimination. In: KARCH, S.B., ed. *Drug abuse handbook*. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 2007. p.149-205.

KIM, J.; LEE, S.; IN, S.; CHOI, H.; CHUNG, H.; Validation of a simultaneous method for the detection of 27 benzodiazepines and metabolites and zolpidem in hair using LC-MS/MS and its application to human and rat hair. *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v.879, n.13/14, p.878-886, 2011.

KINTZ, P. Hair analysis. In: MOFFAT, A.C.; OSSELTON, M.D.; WIDDOP, B.; WATTS, J., eds. *Clarke's analysis of drugs and poisons: in pharmaceuticals, body*

fluids and postmortem material. 4.ed. London, Chicago: Pharmaceutical Press, 2011. p.323-333.

KRAEMER, T.; MAURER, H. Toxicokinetics of amphetamines: metabolism and toxicokinetic data of designer drugs, amphetamine, methamphetamine, and their n-alkyl derivatives. *Therapeutic Drug Monitoring*, v.24, p.277-289, 2002.

KRAEMER, T.; MAURER, H. Determination of amphetamine, methamphetamine and amphetamine-derived designer drugs or medicaments in blood and urine. *Journal of Chromatography, B: Biomedical Sciences and Applications*, v.713, n.1, p.163-187, 1998.

KRAEMER, T.; PFLUGMANN, T.; BOSSMANN, M.; KNELLER, N.; PETER, F.; PAUL, L.; SPRINGER, D.; STAACK, R.; MAURER, H. Fenproporex N-dealkylation to amphetamine – enantioselective *in vitro* studies in human liver microsomes as well as enantioselective *in vivo* studies in Wistar and Dark Agouti rats. *Biochemical Pharmacology*, v.68, p.947-957, 2004.

LANÇAS, F.M. *Extração em fase sólida (SPE)*. São Carlos: RiMa, 2004. p.1-17. (Métodos cromatográficos de análise, 4).

LANÇAS, F.M. *Validação de métodos cromatográficos de análise*. São Carlos: RiMa, 2004. p.9-28. (**Métodos cromatográficos de análise**, 6).

LEE, J.; LEE, H.; RASMUSSEN, K.; PEDERSEN-BJERGAARD, S. Environmental and bioanalytical applications of hollow fiber membrane liquid-phase microextraction: a review. *Analytica Chimica Acta*, v.624, p.253-268, 2008.

LEE, S.; PARK, Y.; YANG, W.; HAN, E.; CHOE, S.; IN, S.; LIM, M.; CHUNG, H. Development of a reference material using methamphetamine abusers' hair samples for the determination of methamphetamine and amphetamine in hair. *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v.865, n.1/2, p.33-39, 2008.

LEE, S.; HAN, E.; PARK, Y.; CHOI, H.; CHUNG, H. Distribution of methamphetamine and amphetamine in drug abusers' head hair. *Forensic Science International*, v.190, p.16-18, 2010.

LENDIRO, E.; QUINTELA, Ó.; CASTRO, A.; CRUZ, A.; LÓPEZ-RIVADULLA, M. CONCHEIRO, M. Target screening and confirmation of 35 licit and illicit drugs and metabolites in hair by LC-MSMS. *Forensic Science International*, v.217, p.207-215, 2012.

LEYTON, V.; CARVALHO, D.; JESUS, M.; MUÑOZ, D. Uso de anfetamínicos por motoristas profissionais brasileiros: aspectos gerais. *Saúde, Ética e Justiça*, v.5/7, n.1/2, p.36-36, 2000/2002.

LIMA, E.C.; SILVA, C.L. Cabelo como matriz analítica alternativa para a determinação de drogas de abuso. *NewsLab*, v.82, p.156-196, 2007.

MAHJOUR, A.; STAUB, C. Determination of benzodiazepines in human hair by on-line high-performance liquid chromatography using a restricted access extraction column. *Forensic Science International*, v.123, p.17-25, 2001.

MARGALHO, C.; FRANCO, J.; VIEIRA, D. Illicit drugs in alternative biological specimens: a case report. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, v.18, p.132-135, 2011.

MARTINS, L.F.; YEGLES, M.; CHUNG, H.; WENNIG, R. Simultaneous enantioselective determination of amphetamine and congeners in hair specimens by negative chemical ionization gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v.825, n.1, p.57-62, 2005.

MARTINS, L.F.; YEGLES, M.; THIEME, D.; THIEME, D.; WENNIG, R. Influence of bleaching on the enantiomeric disposition of amphetamine-type stimulants in hair. *Forensic Science International*, v.176, p.38-41, 2008.

McDERMOTT, S. Drugs of abuse. In: MOFFAT, A.C.; OSSELTON, M.D.; WIDDOP, B.; WATTS, J., eds. *Clarke's analysis of drugs and poisons: in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material*. 4.ed. London, Chicago: Pharmaceutical Press, 2011. p.190-207.

MENG, P.; ZHU, D.; HE, H.; WANG, Y.; GUO, F.; ZHANG, L. Determination of amphetamines in hair by GC-MS after small-volume liquid extraction and microwave derivatization. *Analytical Sciences*, v.25, n.9, p.1115-1118, 2009.

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

MINTZER, M.Z.; GRIFFITHS, R.R. A triazolam/amphetamine dose-effect interaction study: dissociation of effects on memory versus arousal. *Psychopharmacology*, v.192, n.3, p.425-440, 2007.

MOELLER, R.; FEY, P.; WENNIG, R. Simultaneous determination of drugs of abuse (opiates, cocaine and amphetamine) in human hair by GC/MS and its application to a methadone treatment program. *Forensic Science International*, v.63, p.185-206, 1993.

MOELLER, K.; LEE, K.; KISSACK, J. Urine drug screening: practical guide for clinicians. *Mayo Clinic Proceedings*, v.83, n.1, p.66-76, 2008.

MUSSHOFF, F.; MADEA, B. Analytical pitfalls in hair testing. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v.388, p.1475-1494, 2007.

NAKAHARA, Y. Hair analysis for abused and therapeutic drugs. *Journal of Chromatography, B: Biomedical Sciences and Applications*, v.733, n.1/2, p.161-180, 1999.

NAKAHARA, Y.; KIKURA, R. hair analysis for drug of abuse. XIII. Effect of structural factors on incorporation of drugs into hair: the incorporation rates of amphetamine analogs. *Archives of Toxicology*, v.70, n.12, p.841-849, 1996.

NEGRUZ, A.; MOORE, C.; KERN, J.; JANICAK, P.; STRONG, M.; LEVY, N. Quantitation of clonazepam and its major metabolite 7-aminoclonazepam in hair. *Journal of Analytical Toxicology*, v.24, n.7, p.614-620, 2000.

NEGRUSZ, A.; GAENSSLEN, R. Analytical developments in toxicological investigation of drug-facilitated sexual assault. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v.376, p.1192-1197, 2003.

NOTO, A.R.; GALDUROZ, J.C.F. O uso de drogas psicotrópicas e a prevenção no Brasil. *Ciência e Saúde Coletiva*, v.4, n.1, p.145-151, 1999.

O'BRIEN, C.P. Drogação e uso abusivo de drogas In: GOODMAN, L.S.; GILMAN, A.; BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L., eds. *Goodman & Gilman as bases farmacológicas da terapêutica*. 11.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2007. p.543-562.

OLIVEIRA, A.; MAGALHÃES, I.; SANTANA, F.; BONATO, P. Microextração em fase líquida (LPME): fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. *Química Nova*, v.31, n.3, p.637-644, 2008.

PAPOUTSIS, I.; ATHANASELIS, S.; NIKOLAOU, P.; PISTOS, C.; SPILIOPOULOU, C. MARAVELIAS, C. Development and validation of as EI-GC-MS method for the determination of benzodiazepine drugs and their metabolites in blood: applications in clinical and forensic toxicology. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.52, p.609-614, 2010.

PATERSON, S.; McLANCHLAN-TROUP, N.; CORDERO, R.; DOHNAL, M.; CARMAN, S. Qualitative screening for drugs of abuse in hair using GC-MS. *Journal of Analytical Toxicology*, v.25, n.3, p.203-208, 2001.

PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. Bioanalysis of drugs by liquid-phase microextraction coupled to separation techniques. *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v.817, n.1, p.3-12, 2005.

PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid-liquid extraction. *Journal of Chromatography, A*, v.1184, p.132-142, 2008.

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

RIDDLE, M.; FLECKENSTEIN, A.; HANSON, G. Role of monoamine transporters in mediating psychostimulant effects. *AAPS Journal*, v.7, n.4 Article 81, 2005.

ROISER, J.P.; ROGERS, R.D.; SAHAKIAN, B.J. Neuropsychological function in ecstasy users: a study controlling for polydrug use. *Psychopharmacology*, v.189, p.505-516, 2007.

ROUEN, D.; DOLAN, K.; KIMBER, J. *A review of drug detection testing and a examination of urine, hair, saliva and sweat*. Sydney: University of New South Wales, 2001. pag 1-53(National Drug and Alcohol Research Centre Technical Report, n.120).

SÁNCHEZ, M.; HERNÁNDEZ, I. Benzodicepinas y barbitúricos. In: LORENZO, P.; LADERO, J.; LEZA, J.; LIZASOAIN, I. *Drogodependencias: farmacología, patologia, psicologia e legislación*. Madrid: Panamericana, 1998. p149-156.

BRASIL. Presidência da República. Gabinete de Segurança Institucional. Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas. I Levantamento Nacional sobre o uso de álcool, tabaco e outras drogas entre universitários das 27 capitais brasileiras. Brasília: SNPD; São Paulo: Faculdade de Medicina/USP, 2010. 145p.

SHIFANO, F. A bitter pill: overview of ecstasy (MDMA, MDA) related fatalities. *Psychopharmacology*, v.173, p.242-248, 2004.

SILVA, O.A.; YONAMINE, M. Uso de drogas entre trabalhadores de regiões do Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v.38, p.552-556, 2004.

SILVA, R.; OLIVEIRA, L.; SOARES, A.; ALMEIDA, A.; AGUIAR, C.; LEÃO, D.; SILVA, E.; MAGALHÃES, H.; MORAES, C. Dispensação de benzodiazepínicos em quatro drogarias no setor central do município de Goiânia – GO. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v.2, n.2, supl., p.187-189, 2005.

SKENDER, L.; KARAČIĆ, V.; BRČIĆ, I.; BAGARIĆ, A. Quantitative determination of amphetamines, cocaine, and opiates in human hair by gas chromatography/mass spectrometry. *Forensic Science International*, v.125, p.120-126, 2002.

SPIEHLER, V. Drugs in saliva. In: MOFFAT, A.C.; OSSELTON, M.D.; WIDDOP, B.; WATTS, J., eds. *Clarke's analysis of drugs and poisons: in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material*. 4.ed. London, Chicago: Pharmaceutical Press, 2011. p.308-322.

TSANACLIS, L.; WICKS, J. Patterns in drug use in the United Kingdom as revealed through analysis of hair in a large population sample. *Forensic Science International*, v.170, p.121-128, 2007.

TAO, Y.; LIU, J.; WANG, T.; JIANG, G. Simultaneous conduction of two- and three-phase hollow-fiber-based liquid-phase microextraction for the determination of aromatic amines in environmental water samples. *Journal of Chromatography, A*, v.1216, p.756-762, 2009.

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. *Word Drug Report 2012*. New York: UNODC, 2012. pag. 1-76.

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME (UNODC). *Guidance for de validation of analytical methodology and calibration of equipment used for testing of illicit drugs in seized materials and biological specimens*. Disponível em <http://www.unodc.org/unodc/en/scientists/guidance-for-the-validation-of-analytical-methodology.html>. Acesso em 12/03/2009. Acesso em: 12 nov 2012.

MURPHY, C.; BRIGGS, P.; ADRIAN, B.; WILSON, S.; HAGEMAN, P.; THEODORAKOS, P. *Chain of custody: recommendations for acceptance and analysis of evidentiary geochemical samples*. Washington: United States Government Printing Office, 1997. 33p. (U.S. Geological Survey Circular, 1138). Disponível em: <http://pubs.usgs.gov/circ/c1138/c1138.pdf>. Acesso em: 29 set. 2012.

VERTRAETE, A.; PEAT, M. Workplace drug testing. In: MOFFAT, A.C.; OSSELTON, M.D.; WIDDOP, B.; WATTS, J., eds. *Clarke's analysis of drugs and poisons: in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material*. 4.ed. London, Chicago: Pharmaceutical Press, 2011.p.73-85.

VILLAMOR, J.; BERMEJO, A.; FERNÁNDEZ, P. TABERNERO, M. A new GC-MS method for the determination of five amphetamines in human hair. *Journal of Analytical Toxicology*, v.29, n.2, p.135-139, 2009.

WELCH, M.J.; SNIEGOSKI, L.T.; TAI, S. Two new standard reference materials for determination of drugs of abuse in human hair. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v.376, p.1205-1211, 2003.

WENNIG, R. Potential problems with the interpretation of hair analysis results. *Forensic Science International*, v.107, p.5-12, 2000.

WESTFALL, T.C.; WESTFALL, D.P. Agonistas e antagonistas adrenérgicos. In: GOODMAN, L.S.; GILMAN, A.; BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L., eds. *Goodman & Gilman as bases farmacológicas da terapêutica*. 11.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2007. p.215-264.

WILLS, S. *Drugs of abuse*. 2.ed. London, Chicago: Pharmacetical Press, 2005. p.115-140.

WIN, M.M.L.; JAGER, G.; BOOIJ, J.; RENEMAN, L.; SCHILT, T.; LAVINI, C.; OLABARRIAGA, S.D.; RAMSEY, N.F.; HEETEN, G.J.; BRINK, W.V. Neurotoxic effects of ecstasy on the thalamus. *British Journal of Psychiatry*, v.193, n.4, p.298-296, 2008.

WU, Y.H.; LIN, K.L.; CHEN, S.C.; CHANG, Y.Z. Integration of GC/EI-MS and GC/NCI-MS for simultaneous quantitative determination of opiates, amphetamines, MDMA, ketamine, and metabolites in human hair. *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v.870, n.2, p.192-202, 2008.

XAVIER, C.A.C.; LOBO, P.L.D.; FONTELES, M.M.F.; VASCONCELOS, S.M.M.; VIANA, G.S.B.; SOUSA, F.C.F. Êxtase (MDMA): efeitos farmacológicos e tóxicos, mecanismo de ação e abordagem clínica. *Revista de Psiquiatria Clínica*, v.35, n.3, p.96-103, 2007.

YAMAMOTO, B.; MOSZCZYNSKA, A.; GUDELSKY, G. Amphetamine toxicities: classical and emerging mechanisms. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.1187, p.101-121, 2010.

YEGLES, M.; MERSCH, F.; WENNIG, R. Detection of benzodiazepines and other psychotropic drugs in human hair by GC-MS. *Forensic Science International*, v.84, p.211-218, 1997.

YEGLES, M.; MARSON, Y.; WENNIG, R. Influence of bleaching on stability of benzodiazepines in hair. *Forensic Science International*, v.107, p.87-92, 2000.

YONAMINE, M. *Derivação de benzoilecgonina urinária com diazometano para a verificação da exposição à cocaína por técnicas cromatográficas*. São Paulo, 2000. 96p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

YUKDO, E. MDMA. In: YUKDO, E.; HALL, H.V.; McPEHERSON, S.B. *Methamphetamine use: clinical e forensic aspects*. Boca Raton: CRC Press, 2003. p.25-34. (Pacific Institute series on forensic psychology).

ZHANG, Z.; ZHANG, C.; SU, X.; MA, M.; CHEN, B.; YAO, S. Carrier-mediated liquid phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography for determination of illicit drugs in human urine. *Analytica Chimica Acta*, v.621, p.185-192, 2008.

ANEXOS

8 ANEXOS

Anexo 1:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO PROJETO

Parecer CEP/FCF/67
Protocolo CEP/FCF/550
CAAE: 0007.0.018.000-10

I - Identificação

Projeto de Pesquisa:	Análise Toxicológica simultânea de anfetaminas e benzodiazepínicos em amostras de cabelo.
Pesquisador Responsável:	Prof. Dr. Maurício Yonamine
Instituição:	FCF-USP e Centro de Tratamento de Dependência Química Vila Serena
Área Temática Especial:	Não se aplica
Patrocinadores:	Aplicado na FAPESP

II - Sumário Geral do Protocolo

O presente estudo pretende desenvolver e validar um método analítico para determinação simultânea de anfetaminas e benzodiazepínicos em amostras de cabelo. Serão avaliadas as técnicas de microextração em fase líquida (LPME) e microextração em fase sólida (SPME) e detecção dos analitos por cromatografia em fase gasosa associada à espectrometria de massas (GS-MS).

Os objetivos do presente estudo são:

- 1) Desenvolvimento e otimização dos métodos analíticos;
- 2) Validação dos métodos cromatográficos de acordo com normas vigentes (RE 899 de 2003).
- 3) Aplicação da metodologia nas amostras obtidas.
- 4) Avaliação de possível correlação entre exposição e incorporação das substâncias no cabelo (apresenta questionário que será aplicado).

Tipo de estudo: amostras de cabelo serão coletadas e analisadas *in vitro* por técnicas laboratoriais. Em seguida serão descartadas de maneira apropriada.

Descrição da Casuística:

Pretende-se utilizar amostras de cabelo de 10 a 20 voluntários, pacientes atendidos no Centro de Tratamento de Dependência Química Vila Serena com histórico de uso das drogas de interesse (anfetaminas e benzodiazepínicos). A quantidade de amostra cabelo será de 100 a 200g (coletada com tesoura).

Os critérios de inclusão dos participantes são:

O paciente deve ter histórico de uso de anfetaminas e/ou benzodiazepínicos e mais de 18 anos.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Serão critérios de exclusão:

Pacientes com menos de 18 anos e sem uso de anfetaminas e/ou benzodiazepínicos.

III – Situação do Projeto: APROVADO em reunião de 31/05/2010.

O pesquisador deverá:

- Comunicar ao CEP:
 - Eventuais modificações no projeto aguardando a apreciação e aprovação do CEP;
 - A interrupção do projeto;
- Apresentar relatório parcial e relatório final.

São Paulo, 7 de junho de 2010.

Prof. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP/FCF/USP

Anexo 2:
QUESTIONÁRIO

1. Dados pessoais

- Idade: _____ anos
- Sexo: () Masculino () Feminino

2. Medicamentos utilizados recentemente (remédios para gripe, resfriados, emagrecimento, calmantes, etc)

3. Você utiliza:

- () anfetamina (rebite);
- () benzodiazapínicos (calmantes: diazepam, clonazepam, clordiazepóxido);
- () bebidas alcoólicas (etanol);
- () cocaína, crack;
- () maconha, haxixe;

Outros: _____

4. Caso a resposta “3” seja afirmativa. Quando utilizou a substância pela última vez?

5. Com que frequência a substância é consumida?

6. Há quanto tempo utiliza a substância?

7. Cor do cabelo: _____

8. Tratamentos cosméticos realizados (tintura, alisamento, permanente etc)

9. Outros comentários:

Anexo 3

Manuscrito publicado:

- *Hollow-fiber liquid-phase microextraction of amphetamine-type stimulants in human hair samples* PANTALEÃO, L. N.; PARANHOS, B. A. P. B.; YONAMINE, M. **Journal of Chromatography A**, 1254 (2012) 1-7.

Journal of Chromatography A, 1254 (2012) 1–7

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma

Hollow-fiber liquid-phase microextraction of amphetamine-type stimulants in human hair samples

Lorena do Nascimento Pantaleão, Beatriz Aparecida Passos Bismara Paranhos, Mauricio Yonamine*

Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 26 April 2012
Received in revised form 4 July 2012
Accepted 5 July 2012
Available online 14 July 2012

Keywords:
Amphetamines
Hair
LPME
GC–MS

ABSTRACT

A fast method was optimized and validated in order to quantify amphetamine-type stimulants (amphetamine, AMP; methamphetamine, MAMP; fenproporex, FPX; 3,4-methylenedioxymethamphetamine, MDMA; and 3,4-methylenedioxyamphetamine, MDA) in human hair samples. The method was based in an initial procedure of decontamination of hair samples (50 mg) with dichloromethane, followed by alkaline hydrolysis and extraction of the amphetamines using hollow-fiber liquid-phase micro extraction (HF-LPME) in the three-phase mode. Gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) was used for identification and quantification of the analytes. The LoQs obtained for all amphetamines (around 0.05 ng/mg) were below the cut-off value (0.2 ng/mg) established by the Society of Hair Testing (SoHT). The method showed to be simple and precise. The intra-day and inter-day precisions were within 10.6% and 11.4%, respectively, with the use of only two deuterated internal standards (AMP-d5 and MDMA-d5). By using the weighted least squares linear regression ($1/x^2$), the accuracy of the method was satisfied in the lower concentration levels (accuracy values better than 87%). Hair samples collected from six volunteers who reported regular use of amphetamines were submitted to the developed method. Drug detection was observed in all samples of the volunteers.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.