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

**A saliva como espécime biológico para
monitorar o uso de álcool, anfetamina,
metanfetamina, cocaína e maconha por
motoristas profissionais**

MAURÍCIO YONAMINE

**Tese para obtenção do grau de
DOUTOR**

Orientador: Prof. Dr. Ovandir Alves Silva

São Paulo

2004

Mauricio Yonamine

**A saliva como espécime biológico para monitorar o uso de álcool,
anfetamina, metanfetamina, cocaína e maconha por motoristas
profissionais**

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Ovandir Alves Silva
Orientador/presidente

Profa. Dra. Julia Maria D'Andrea Greve
1º Examinador

Profa. Dra. Vilma Leyton
2º Examinador

Prof. Dr. Dermeval de Carvalho
3º Examinador

Profa. Dra. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto
4º Examinador

São Paulo 24 de maio de 2004.

Aos meus pais

João Yoshio e Tie Tamashiro

Por me mostrarem que a honestidade,
o trabalho e a perseverança são os melhores caminhos

Ao Professor Ovandir Alves Silva

Pela orientação nesta tese,
pela apoio constante e pela amizade,
a quem devo grande parte do profissional que sou hoje

AGRADECIMENTOS

À Profa. *Regina Lúcia de Moraes Moreau* pelo incentivo, apoio e confiança em meu trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Análises Toxicológicas, funcionários e estagiários, *Alessandro, Paula, Carmen, Ângelo, Mônica, Daniela, Vânia, Sandra, Michele, Dalva e Luzia*, pela colaboração e amizade.

Aos parceiros da Viaoeste S/A *Guilherme Schibik, Fausto Camilotti* e Dr. *Antônio Onimaru* pela organização da coleta das amostras de motoristas de caminhão, fundamental para realização deste trabalho.

À *Eleny Regina Roncati* e à *Silze Morgado Roque* da Vila Serena e ao *Jefferson Lima* da Villa São José pela colaboração na coleta de amostras de pacientes em tratamento.

Aos Professores *Ronaldo Laranjeira* e *Dermeval de Carvalho* pelas importantes sugestões no exame de qualificação.

Ao Professor *Antônio Flávio Mídio* pelos conselhos, pelo apoio constante, pela revisão do *Summary* e por ser um exemplo profissional a ser seguido.

Ao 'time' de colegas toxicologistas do curso de pós-graduação, em especial ao *Daniel, Emerson, Humberto, Fábio, Danielle, Fernanda, Maria José, Carolina, Luciane, Cláudia Isabel, Cláudia Regina, Cláudia Esteban, Sílvio, Isarita, Patrícia, Michela, Jadson, Zé Luiz, Nádia* e *Simone*, pela amizade conquistada.

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

Aos meus melhores amigos *Cláudio, Ricardo, Roberto, Zuleika* e *Izumi*, por estarem sempre presentes, nos bons e maus momentos.

Meus agradecimentos

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	9
2.1. Aspectos toxicológicos dos fármacos pesquisados.....	10
2.1.1. Etanol (álcool).....	10
2.1.2. Anfetamina.....	16
2.1.3. Metanfetamina.....	21
2.1.4. Cocaína.....	22
2.1.5. Canabinóides (maconha).....	27
2.2. Matrizes biológicas utilizadas em análises toxicológicas para verificar a exposição a drogas de abuso.....	33
2.3. A saliva como espécime biológico para verificar a exposição a drogas de abuso.....	37
2.3.1. Etanol.....	39
2.3.2. Anfetamina/metanfetamina.....	40
2.3.3. Cocaína e produtos de biotransformação.....	41
2.3.4. Canabinóides.....	43
2.4. Aspectos analíticos da detecção de álcool e fármacos de abuso em saliva.....	44
2.4.1. Microextração em fase sólida (SPME).....	48
3. OBJETIVO.....	54
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	56
4.1. Material.....	57
4.1.1. Soluções-padrão.....	57
4.1.2. Reagentes e outros materiais.....	58
4.1.3. Equipamentos e acessórios.....	58
4.1.4. Amostras de saliva.....	59
4.1.4.1. Amostras de referência.....	59
4.1.4.1.1. Amostras de referência negativa.....	59
4.1.4.1.2. Amostras de referência positiva.....	59

4.1.4.2. Amostras provenientes dos grupos estudados.....	59
4.2. Métodos.....	61
4.2.1. Aplicação do questionário.....	61
4.2.2. Coleta das amostras.....	61
4.2.3. Análise toxicológica em saliva.....	62
4.2.3.1. Padronização de um método para determinação de etanol, anfetamina, metanfetamina, cocaína e delta-9-THC em amostras de saliva.....	62
4.2.3.1.1. Extração dos analitos da saliva.....	62
4.2.3.1.2. Condições cromatográficas.....	63
4.2.3.2 Validação do método.....	66
4.2.3.2.1. Recuperação.....	66
4.2.3.2.2. Linearidade.....	67
4.2.3.2.3. Precisão intra e interensaio.....	67
4.2.3.2.4. Limite de detecção e limite de quantificação.....	67
4.2.3.2.5. Estabilidade dos analitos na matriz.....	68
4.2.3.2.6. Correlação com situação clínica.....	68
4.2.4. Análise toxicológica em urina.....	68
4.2.4.1. Análise de triagem por enzimaímunoensaio.....	69
4.2.4.2. Análise de confirmação.....	69
4.2.4.2.1. Análise de confirmação de etanol por GC/FID....	69
4.2.4.2.2. Análise de confirmação de anfetamina/ metanfetamina por GC/MS.....	70
4.2.4.2.3. Análise de confirmação de benzoilecgonina por GC/MS.....	70
4.2.4.2.4. Análise de confirmação do ácido 11-nor-delta-9- tetraidrocanabinol carboxílico por GC/MS.....	71
5. RESULTADOS.....	73
5.1. Cromatogramas característicos da análise de etanol, anfetamina, metanfetamina, cocaína e delta-9-THC em saliva.....	74
5.2. Resultados da validação do método para determinação de etanol, anfetamina, metanfetamina, cocaína e delta-9-THC em saliva...	76

5.2.1. Recuperação.....	76
5.2.2. Linearidade.....	77
5.2.3. Precisão intra e interensaio.....	77
5.2.4. Limite de detecção e limite de quantificação.....	79
5.2.5. Estabilidade dos analitos na matriz.....	79
5.2.6. Correlação com situação clínica.....	81
5.3. Dados gerais da população estudada do Grupo 2 (motoristas de caminhão).....	82
5.3.1. Idade dos motoristas.....	82
5.3.2. Grau de escolaridade dos motoristas.....	83
5.3.3. Estado civil dos motoristas.....	84
5.3.4. Distribuição dos motoristas de acordo com acidentes que sofreram na rodovia.....	85
5.3.5. Distribuição dos motoristas de acordo com a propriedade do veículo.....	85
5.4. Resultados obtidos com a análise toxicológica em urina e saliva provenientes de motoristas de caminhão.....	86
6. DISCUSSÃO.....	88
7. CONCLUSÕES.....	100
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102
9. ANEXOS.....	118
Anexo A.....	119
Anexo B.....	120
Anexo C.....	122
Anexo D.....	125

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Estruturas de compostos análogos à anfetamina e as vias de biotransformação no organismo humano.....	18
FIGURA 2 – Principais vias de biotransformação da cocaína administrada em humanos.....	25
FIGURA 3 – Principais vias de biotransformação do delta-9-tetraidrocanabinol.....	30
FIGURA 4 – Estruturas químicas da anandamida e do 2-araquidonilglicerol, possíveis canabinóides endógenos.....	31
FIGURA 5 – Dispositivo de microextração em fase sólida (SPME).....	49
FIGURA 6 – Esquema de microextração em fase sólida.....	50
FIGURA 7 – Fluxograma do procedimento de preparação de amostras (saliva) para determinação de etanol, anfetamina, metanfetamina, cocaína e delta-9-THC.....	65
FIGURA 8 – Cromatograma obtido com a análise por <i>headspace</i> e GC/FID de saliva adicionada com etanol na concentração de 0,6g/L.....	75
FIGURA 9 – Cromatograma obtido com a análise por SPME e GC/MS de saliva adicionada com anfetamina, metanfetamina e cocaína na concentração de 50ng/mL.....	75
FIGURA 10 – Cromatograma obtido com a análise por SPME e GC/MS de saliva adicionada com delta-9-THC na concentração de 50ng/mL.....	76
FIGURA 11 – Gráfico de distribuição de idades da população estudada do Grupo 2 (motoristas de caminhão).....	83
FIGURA 12 – Gráfico de distribuição dos motoristas de caminhão de acordo com seu grau de escolaridade.....	84
FIGURA 13 – Gráfico de distribuição dos motoristas de caminhão de acordo com seu estado civil.....	85

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Conteúdo alcoólico de bebidas	10
TABELA 2 – Correlação entre a concentração sanguínea de etanol e alterações comportamentais.....	15
TABELA 3 – Valores de referência de concentração urinária <i>cut off</i> (ng/mL) para a fase de triagem recomendados pela Comunidade Européia e SAMHSA (EUA) para alguns grupos de fármacos de abuso.....	35
TABELA 4 – Valores de referência de concentração urinária <i>cut off</i> (ng/mL) para a fase de confirmação recomendados pela Comunidade Européia e SAMHSA (EUA) para alguns indicadores biológicos de fármacos de abuso.....	35
TABELA 5 – Valores de referência de concentração na saliva <i>cut off</i> (ng/mL) para a fase de triagem recomendados pela <i>Substance Abuse and Mental Health Service Administration</i> (EUA) para alguns grupos de fármacos de abuso.....	39
TABELA 6 – Valores de referência de concentração na saliva <i>cut off</i> (ng/mL) para a fase de confirmação recomendados pela <i>Substance Abuse and Mental Health Service Administration</i> (EUA) para alguns fármacos de abuso.....	39
TABELA 7 – Local de coleta de amostras de motoristas de caminhão realizada no período de janeiro a dezembro de 2003.....	60
TABELA 8 - Valores de recuperação obtidos com a aplicação do método proposto em amostras de saliva adicionadas com anfetamina, metanfetamina e cocaína em três concentrações (10, 50 e 75ng/mL).....	77
TABELA 9 – Valores de precisão intra-ensaio obtidos com a aplicação do método proposto em amostras de saliva adicionados com etanol, anfetamina, metanfetamina, cocaína e delta-9-THC.....	78

TABELA 10 – Valores de precisão interensaio obtidos com a aplicação do método proposto em amostras de saliva adicionados com etanol, anfetamina, metanfetamina, cocaína e delta-9-THC.....	78
TABELA 11 – Valores de limite de detecção e limite de quantificação de etanol, anfetamina, metanfetamina, cocaína e delta-9-THC para o método proposto.....	79
TABELA 12 – Estudo da estabilidade do etanol, anfetamina, metanfetamina, cocaína e delta-9-THC em amostra de saliva em condições de temperatura ambiente, a 4°C (geladeira) e a -20°C (freezer) em período de 48 e 96 horas.	80
TABELA 13 – Resultado das análises toxicológicas em urina e saliva de pacientes de uma clínica de tratamento de dependência de drogas, seu relato de uso e tempo decorrido entre o último uso e a coleta das amostras.....	81
TABELA 14 – Dados de distribuição de idades dos motoristas de caminhão (Grupo 2).....	82
TABELA 15 – Dados de distribuição dos motoristas de caminhão de acordo com o grau de escolaridade.....	83
TABELA 16 – Dados de distribuição dos motoristas de caminhão de acordo com seu estado civil.....	84
TABELA 17 – Resultados das análises toxicológicas em urina e saliva de motoristas de caminhão que apresentaram resultado positivo para as substâncias pesquisadas, seu relato de uso e tempo decorrido entre o último uso e a coleta das amostras.....	87

RESUMO

A saliva como espécime biológico para monitorar o uso de álcool, anfetamina, metanfetamina, cocaína e maconha por motoristas profissionais

O uso indiscriminado de substâncias psicoativas por motoristas e suas conseqüências no trânsito têm sido objeto de grande preocupação por parte de especialistas e da sociedade em geral. O Código de Trânsito Brasileiro de 1997 determina como infração gravíssima "dirigir sob a influência de álcool, em nível superior a seis decigramas por litro de sangue, ou de qualquer substância entorpecente ou que determine dependência física ou psíquica". Desta forma, o presente trabalho teve como intuito investigar a utilização da saliva como espécime biológico para verificar o uso de álcool e drogas (anfetamina, metanfetamina, cocaína e maconha) por motoristas no trânsito. Para alcançar esse objetivo, um método foi desenvolvido e validado para determinação seriada desses analitos em uma única alíquota de saliva, utilizando a técnica de headspace e a microextração em fase sólida (SPME). Amostras coletadas aleatoriamente de motoristas de caminhão (n=561) que trafegavam em rodovias de São Paulo foram submetidas ao método proposto. Do total de amostras de saliva analisadas, 17 (3,0%) apresentaram resultado positivo, sendo 8 para etanol, 4 para anfetamina, 2 para cocaína, 2 para tetraidrocanabinol (THC) e 1 para cocaína e THC. A pesquisa retrata de forma pioneira no Brasil a utilização da saliva como possível amostra biológica para monitorar motoristas que estariam dirigindo sob a influência de drogas.

SUMMARY

Saliva as a biological specimen for screening the use of alcohol, amphetamine, methamphetamine, cocaine and marijuana by professional drivers

The consequences of car accidents in the traffic when psychoactive drugs are abused by professional drivers are of great concern of specialists in the subject as well as of the general population. For the Brazilian Traffic Code of 1997 to drive under the influence of alcohol, with blood level superior to six decigrams per liter, or any other psychoactive drug which causes physical or psychic dependence is considered an infraction in which the transgressor is subject to heavy penalties. The objective of this work was to investigate the possibilities of using saliva as biological samples to screen the use of alcohol and drugs (amphetamine, methamphetamine, cocaine and marijuana) by traffic drivers. In order to achieve this aim, a method was developed and validated for the serial determination of those analites in a single aliquot of a saliva sample. Gas-chromatographic/ headspace for the determination of alcohol and solid phase microextraction (SPME) for the determination of the other drugs were used in the analyses. Samples collected at random from truck drivers (n=561) in public roads in the city of São Paulo were analyzed by the proposed method. The obtained results were: 17 (3.0%) of all analyzed saliva samples were found to be positive, being 8 for ethanol, 4 for amphetamine, 2 for cocaine, 2 for tetrahydrocannabinol (THC) and 1 for cocaine and THC simultaneously. This study pioneered in Brazil the use of saliva as a very convenient biological sample to screen individuals driving under the influence of drugs.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O uso indiscriminado de substâncias psicoativas em diversos segmentos da sociedade é fenômeno mundial que tem causado grande preocupação por parte de especialistas. Diferenças quanto ao padrão de uso e ao tipo de droga podem ser observadas de país para país, entretanto, os impactos sobre a saúde pública, a segurança individual e a estrutura social são universalmente negativos.

Atualmente, drogas lícitas como o álcool e o tabaco, e ilícitas, como a maconha, a cocaína e as anfetaminas, são utilizadas por milhões de pessoas em todo o mundo, geralmente com graves consequências para o usuário e a sociedade. Fatalidades ocorrem não somente em virtude da intoxicação aguda ou crônica, mas também devido às alterações comportamentais e psicomotoras que essas substâncias provocam em usuários.

Graves acidentes ocorridos no setor de transportes nos últimos anos foram relacionados ao uso de álcool ou drogas. Em 1989, um acidente envolvendo o petroleiro *Exxon Valdez*, cujo comandante encontrava-se alcoolizado, provocou o derramamento de mais de 250.000 barris de petróleo no Alasca (NORMAND, LEMPERT & O'BRIEN, 1994). Em 1987, um grave acidente de trens, possivelmente provocado pelo uso de maconha, foi registrado nos Estados Unidos. Após ultrapassar o sinal, um trem de carga colidiu com um trem de passageiros em *Maryland*. Verificou-se mais tarde que o maquinista e seu assistente, que eram usuários freqüentes de

maconha, estavam sob a influência da droga no momento do acidente. Como resultado, o maquinista e 15 passageiros morreram e 174 pessoas ficaram gravemente feridas (NORMAND, LEMPERT & O'BRIEN, 1994). Em 1981, o uso de canabinóides também foi detectado no piloto responsável pela queda de uma aeronave no porta-aviões *USS Nimitz*, em que 14 pessoas morreram (CROUCH *et al.*, 1993).

No setor de transporte rodoviário também observa-se uma grande preocupação quanto ao uso de drogas por motoristas. Em um estudo realizado em Oslo (Noruega) nos anos de 1978 e 1983, amostras de sangue foram coletadas de motoristas suspeitos de estarem dirigindo sob a influência de substâncias psicoativas. As análises toxicológicas demonstraram que canabinóides (maconha), diazepam e anfetaminas foram as substâncias mais freqüentemente utilizadas (BJORNBOE *et al.*, 1987). Em um estudo semelhante, PEEL, PERRIGO & MIKHAEL (1984) utilizaram a saliva como amostra para detecção do uso de drogas por motoristas. O álcool foi a droga mais comum, seguido por canabinóides e benzodiazepínicos (diazepam).

Nos Estados Unidos, o *National Transportation Safety Board* em colaboração com o *National Institute on Drug Abuse* (NIDA), investigaram acidentes fatais envolvendo motoristas de caminhão em oito estados americanos em um período de um ano. Amostras de sangue coletadas de 168 motoristas revelaram que as substâncias de maior prevalência eram os canabinóides e etanol (13% dos motoristas). Cocaína (8%), anfetaminas (7%) e efedrinas (7%) também foram detectadas (CROUCH *et al.*, 1993).

Análises toxicológicas em urina proveniente de motoristas suspeitos de estarem dirigindo sob a influência de cocaína e/ou canabinóides também foram conduzidas no *Tennessee*, EUA em 1992. Oitenta e oito amostras submetidas à análise (59% do total) apresentaram resultado positivo para as substâncias pesquisadas (BROOKOFF *et al.*, 1994).

No contexto do projeto europeu denominado “ROSITA” – *Roadside Testing Assessment*, O Instituto Médico Legal de *Homburg/Saar* (Alemanha), juntamente com a polícia de tráfego local, investigaram 254 casos nos períodos de junho a dezembro de 1999, para confirmar a suspeita inicial de que motoristas estariam usando drogas ilícitas. Amostras de saliva, suor ou urina foram utilizadas nas análises toxicológicas. Amostras positivas representaram cerca de 80% do total. O consumo de uma só droga foi verificado em 156 casos (113 para maconha, 38 para anfetaminas, 3 para opiáceos e 2 para cocaína). Em 47 casos, o consumo de duas ou mais drogas foi constatado (STEINMEYER *et al.*, 2001).

No Brasil, as informações a respeito da magnitude do problema, obtidas através de recentes levantamentos, têm indicado que o abuso de drogas vem alcançando níveis preocupantes. As condições socioculturais existentes, a vasta extensão territorial e a localização próxima a países produtores de drogas são fatores que contribuem para essa situação. Na sociedade em geral, segundo estimativa da *United Nations Office on Drug and Crime*, que traz dados dos anos de 2000-2001, 5,8% da população brasileira com mais de 15 anos usam regularmente maconha, 0,8% cocaína e 0,7% anfetaminas (UNITED NATIONS OFFICE ON DRUG AND CRIME, 2003).

Em um amplo levantamento realizado em 2001 (I Levantamento Domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil), abrangendo as 107 maiores cidades brasileiras, verificou-se que 11,2% da população pesquisada era dependente de álcool. Em relação ao uso de drogas ilícitas, 6,8% haviam relatado uso de maconha, 2,3% cocaína e 1,5% anfetaminas. No mesmo estudo, 2,0% dos entrevistados relataram que já haviam se envolvido em acidentes no trânsito quando estavam com o nível de consciência alterado pelo uso de substâncias psicoativas (CARLINI *et al.*, 2002).

Em um estudo coordenado pelo Departamento de Traumatologia e Ortopedia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da

Universidade de São Paulo, relacionando o uso de álcool e drogas em vítimas de causas externas (acidentes de trânsito, atropelamentos, agressões, quedas e acidentes no trabalho), verificou-se que 46% das vítimas de agressão estavam sob efeito de doses excessivas de álcool, assim como 24% das vítimas de trânsito e 20% das vítimas de quedas. Os dados também mostravam que 14% dos acidentados ou agredidos haviam utilizado maconha, cocaína ou anfetaminas poucas horas antes do incidente (ALCOOL..., 2000). GAZAL-CARVALHO *et al.* (2002), avaliando a prevalência de alcoolemia em vítimas de causas externas, encontraram índice de positividade de 28,9%.

Em uma pesquisa realizada pelo Instituto Médico Legal de São Paulo, verificou-se que 45,5% das vítimas de acidentes de trânsito apresentaram resultado positivo para álcool no sangue (LEYTON *et al.*, 1999). Em estudo semelhante realizado pela Associação Brasileira dos Departamentos de Trânsito (ABDETRAN) em quatro cidades brasileiras (Brasília, Curitiba, Recife e Salvador), verificou-se que do total de 831 vítimas não fatais de acidentes de trânsito, 61,4% apresentavam níveis de álcool no sangue. De 34 vítimas fatais incluídas, houve positividade em 52,9% dos casos (NERY *et al.*, 1997).

Quanto ao uso de drogas ilícitas no trânsito, um estudo realizado de forma anônima e voluntária entre motoristas de caminhão das regiões Nordeste, Sudeste e Sul do país demonstrou que 5,63% das amostras de urina (n=728) coletadas foram positivas para as drogas analisadas: cocaína, maconha e anfetaminas (SILVA *et al.*, 2003).

O Código de Trânsito Brasileiro de 1997 (BRASIL, 1998), em seu Artigo 165, determina como infração gravíssima "dirigir sob a influência de álcool, em nível superior a seis decigramas por litro de sangue (0,6g/L), ou de qualquer substância entorpecente ou que determine dependência física ou psíquica". Recentemente, foi aprovado pela Câmara dos Deputados, projeto de lei (PL-735/2003) que determina a obrigatoriedade dos motoristas envolvidos em acidentes de trânsito de se submeterem aos testes de

alcoolemia, além de determinar a redução do limite de álcool no sangue para 0,3g/L.

Atualmente, para a comprovação de que o condutor se encontra impedido de dirigir veículo automotor, sob suspeita de haver excedido o limite de alcoolemia permitido, o Conselho Nacional de Trânsito (CONTRAN) estabelece que aparelhos do tipo etilômetro ("bafômetro"), que analisam o ar exalado, devam ser utilizados juntamente com exame clínico realizado por um médico da Polícia Judiciária. Para outras drogas, mencionadas como "substâncias entorpecentes, tóxicas ou de efeitos análogos", na referida resolução do CONTRAN consta somente que os exames "deverão ser realizados por laboratórios especializados indicados pelo órgão de trânsito competente ou pela Polícia Judiciária de acordo com as características técnicas científicas" (CONSELHO NACIONAL DE TRÂNSITO, 1998). Portanto, não existe uma norma no Brasil especificando a amostra biológica a ser utilizada e muito menos o método analítico a ser empregado.

Em face ao exposto, o presente trabalho teve como intuito investigar a utilização da saliva como espécime biológico para verificar o uso de drogas por motoristas no trânsito. As substâncias psicoativas escolhidas para fazerem parte da pesquisa são aquelas de uso controlado em empresas que adotam programas de controle do uso de drogas no ambiente de trabalho no Brasil (álcool, anfetamina/metanfetamina, canabinóides e cocaína) que utilizam a urina como amostra biológica de escolha (SILVA, 1999; SILVA, YONAMINE & ODO, 1999; SILVA & YONAMINE, 2000).

A proposta do uso da saliva neste trabalho se baseia no fato desse espécime biológico fornecer a informação da exposição recente (algumas horas) a substâncias psicoativas, assim como a amostra de sangue, com a vantagem da coleta ser realizada de forma não-invasiva. A coleta pode ser realizada sob vigilância, em campo aberto (no trânsito), através de dispositivos comerciais existentes no mercado. Conseqüentemente, a detecção de fármacos psicoativos na saliva do indivíduo suspeito indicaria claramente se ele estaria dirigindo sob a influência de drogas.

Entretanto, apesar de apresentar inicialmente características bastante promissoras quanto a sua utilização para monitorar o uso de drogas por motoristas no trânsito, a saliva apresenta como desvantagem a possibilidade de coleta de apenas pequenos volumes de amostra (1-3 mL). Na literatura científica, alguns métodos são descritos para detecção de álcool e drogas de abuso em saliva, porém nenhum relata a identificação simultânea de compostos voláteis (como o etanol) e substâncias psicoativas (cocaína, delta-9-tetraidrocanabinol e anfetaminas) em um volume limitado de amostra. Frente a essa dificuldade analítica, foram investigadas técnicas de extração e identificação desses compostos em saliva. Com base em outros trabalhos científicos, diversos experimentos práticos foram realizados durante o desenvolvimento do método, privilegiando técnicas não-destrutivas de preparação de amostras, uma vez que se objetivou a identificação seriada de substâncias em uma mesma alíquota de amostra.

Para a determinação de etanol foi estudada a técnica de *headspace*, devido a sua especificidade, simplicidade e praticabilidade (CORREA & PEDROSO, 1997). Nessa técnica, os vapores obtidos de uma amostra submetida a um aquecimento prévio são recolhidos em uma seringa e injetados no equipamento de cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama (GC/FID).

A microextração em fase sólida (SPME) foi escolhida como técnica de extração de anfetamina, metanfetamina, cocaína e delta-9-THC do líquido remanescente do *headspace*, por apresentar um número de vantagens sobre outras técnicas de extração como a líquido-líquido ou a extração em fase sólida (SPE). Dentre essas vantagens, pode-se citar a maior simplicidade, menor necessidade de manipulação de amostra, menor tempo de análise e a extração sem necessidade de solventes orgânicos.

Após o desenvolvimento e validação do método analítico, amostras de urina e saliva foram coletadas de forma voluntária de caminhoneiros (não suspeitos de estarem dirigindo sob a influência de drogas) que trafegavam nas Rodovias Castelo Branco, Raposo Tavares e Sen. José Ermírio de

Moraes (sob administração da Concessionária de Rodovias do Oeste de São Paulo Viaoeste S/A), para realização de análises toxicológicas. Os resultados da pesquisa são apresentados neste trabalho e discutidos. Os dados obtidos, além de fornecerem indícios da magnitude do problema do abuso de álcool e drogas por motoristas, poderão servir de parâmetro para que medidas de fiscalização e controle possam ser adotadas pelos órgãos competentes.

REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Aspectos toxicológicos dos fármacos pesquisados

2.1.1. Etanol (álcool)

Por se tratar de droga lícita, ser amplamente disponível e apresentar baixo custo, o álcool é, sem dúvida, uma das substâncias psicoativas mais consumidas pela sociedade. O conteúdo alcoólico em bebidas varia muito, algumas apresentam níveis inferiores a 1% enquanto outras podem chegar a 50%. As concentrações típicas de bebidas alcoólicas são apresentadas na TABELA 1 (DRUMMER & ODELL, 2001).

TABELA 1 – Conteúdo alcoólico de bebidas.

Bebidas	Concentração alcoólica (%v/v)
Cerveja	2-6
Vinho tinto, branco, champanhe	8-12
Vinho do porto, vermute	14-22
Licores	15-40
Destilados (uísque, rum, aguardente)	35-45

O álcool é uma substância polar, miscível em água, solúvel no tecido adiposo e que apresenta rápida absorção e distribuição a todos os tecidos e fluidos do organismo, pois atravessa facilmente as membranas biológicas. Muitos fatores como o peso, a composição corporal e a taxa de absorção do trato gastrointestinal determinam a concentração de etanol no sangue após a ingestão. Em uma pessoa com o estômago vazio, aproximadamente 20% da dose é absorvida no próprio estômago. Os 80% remanescentes são absorvidos rapidamente e completamente no duodeno e jejuno. Se o indivíduo ingere álcool com o estômago cheio, o esvaziamento gástrico é atrasado e a rápida absorção que geralmente ocorreria no intestino se torna mais lenta. O tempo de concentração sanguínea máxima situa-se na faixa de 30 a 90 minutos (JULIEN, 1997), entretanto, este tempo pode ser prolongado até 2 horas se grandes quantidades forem consumidas ou se o esvaziamento gástrico for retardado (DRUMMER & ODELL, 2001).

Em mulheres, as concentrações de álcool sanguíneas são geralmente maiores do que no homem, considerando a mesma quantidade consumida, devido ao menor volume de água por peso corporal e à menor atividade da álcool desidrogenase gástrica (FLEMING, MIHIC & HARRIS, 2001).

Em geral, uma relação matemática simples pode ser aplicada, relacionando a dose oral de etanol com a concentração de pico no sangue (DRUMMER & ODELL, 2001):

$$C_{\text{máx}} \text{ (g/L)} = 0,02 \times \text{dose (g por 70Kg de peso corporal)}$$

Isso significa que se uma pessoa de 70Kg consumisse 30g de etanol (cerca de 3 copos de 200mL de cerveja) com o estômago vazio, uma alcoolemia de 0,6g/L (0,06%) seria rapidamente obtida. Essa relação não inclui uma série de variáveis possíveis, mas pode ser utilizada como referência para estimar concentrações de álcool no sangue.

Da quantidade total de etanol absorvido, 5 a 10% é eliminada no ar exalado, urina e suor. O restante é biotransformado principalmente no fígado. A oxidação do etanol é relativamente independente da concentração sangüínea e é constante com o tempo (cinética de ordem zero). Em um indivíduo sadio, consumidor não habitual de álcool, a velocidade de biotransformação oscila entre 60 a 150mg/Kg/hora (QUESADA, 1998).

Praticamente todo o álcool que se biotransforma no organismo sofre um processo oxidativo que ocorre em duas fases. A primeira fase é iniciada pela enzima álcool desidrogenase (ADH) que converte o etanol à acetaldeído. Em uma segunda fase, a enzima aldeído desidrogenase (ALDH) converte o aldeído em ácido acético, que é finalmente convertido em dióxido de carbono e água, liberando energia (MOAK & ANTON, 1999).

Quando o consumo de álcool supera determinado limite, e especialmente se é freqüente, entra em funcionamento um sistema enzimático denominado MEOS (*microsomal ethanol oxidizing system*) cuja atividade é desempenhada pela citocromo P450 isoforma 2E1. A indução dessa isoenzima gera desequilíbrios metabólicos pela formação de radicais livres que são de grande importância na hepatotoxicidade induzida pelo etanol (QUESADA, 1998; MOAK & ANTON, 1999).

Há uma terceira via de pouca importância, intermediada pela enzima catalase, cuja atividade depende da disponibilidade de peróxido de hidrogênio no citossol (QUESADA, 1998; DRUMMER & ODELL, 2001; PARKINSON, 2001).

Apesar de ser uma substância quimicamente simples, o etanol apresenta uma farmacologia complexa. Por muitos anos era presumido que o álcool agia somente através de uma depressão geral em funções do cérebro com a desestabilização de membranas de células nervosas. Isto resultaria em uma alteração inespecífica na transmissão de impulsos elétricos e liberação de neurotransmissores na fenda sináptica.

Apesar dessa hipótese poder explicar os efeitos observados em altas doses ou as propriedades anestésicas do etanol, novos conceitos sobre as ações específicas nos sistemas excitatório, mediado pelo glutamato, e inibitório mediado pelo ácido gama amino butírico (GABA), foram incluídos. Considerando os receptores glutamatérgicos, HOFFMAN & TABAKOFF (1993) observaram que o etanol é um potente e seletivo inibidor de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA). Ele parece exercer ação inibitória por decaimento da frequência de abertura dos canais de íons sódio.

O etanol também favorece a entrada de cloro por estímulo de receptores gabaérgicos. Esta ação explica a tolerância cruzada que apresenta o álcool com outros depressores que atuam no complexo GABA-canal de cloro, como os benzodiazepínicos e barbitúricos (QUESADA, 1998). Entretanto, o etanol tem menor especificidade a esses receptores que os benzodiazepínicos (DRUMMER & ODELL, 2001).

Outros sistemas neurotransmissores também são afetados pelo etanol. Esta substância inibe a liberação de acetilcolina no sistema nervoso central, produzindo efeitos anticolinérgicos. Esta ação pode contribuir para os prejuízos nos processos cognitivos pois os mecanismos colinérgicos são necessários para o aprendizado e memória (JULIEN, 1997).

O etanol também aumenta a liberação de dopamina em algumas regiões do sistema nervoso central, particularmente no núcleo *accumbens* e córtex frontal. Igualmente, o consumo de álcool produz um aumento da atividade serotoninérgica no cérebro (QUESADA, 1998; MOAK & ANTON, 1999; DRUMMER & ODELL, 2001).

Por último, o etanol também está envolvido no estímulo de receptores opióides e liberação de endorfinas, desencadeando uma sensação de bem-estar no usuário (QUESADA, 1998). Esse fenômeno, juntamente com a ação agonista GABA do etanol e aumento da dopamina, contribuem para os efeitos de reforço positivo e dependência alcoólica observados em alguns indivíduos (HARRIS, BRODIE & DUNWIDDIE, 1992). Com o consumo

freqüente de etanol, contudo, ocorre decréscimo da liberação de serotonina, observada também pela diminuição de seus metabólitos no fluido cerebrospinal de indivíduos dependentes (MOAK & ANTON, 1999)

A reação comportamental que ocorre em baixas doses é imprevisível. É determinada pela pessoa, sua expectativa mental e as características do ambiente. Em um ambiente, a pessoa pode se tornar eufórica, agressiva ou violenta; em outro, pode se tornar sonolenta, introvertida ou deprimida (JULIEN, 1997; DRUMMER & ODELL, 2001). Qualquer que seja o comportamento que o etanol cause, as funções cognitivas (memória e julgamento) são prejudicadas junto com as atividades psicomotoras. Na Tabela 2 é apresentada a correlação dos níveis sangüíneos de etanol com as alterações comportamentais observadas (QUESADA, 1998).

A ingestão de álcool causa uma sensação de aquecimento do corpo devido à dilatação dos vasos sangüíneos da pele (ruborização), provocando, na realidade, uma diminuição da temperatura corporal. Com o consumo de grandes quantidades, o mecanismo de regulação da temperatura corporal deprime-se, atingindo uma condição de hipotermia que pode se tornar ainda mais perigosa (FLEMING, MIHIC & HARRIS, 2001).

A circulação sangüínea e o coração também são afetados com o uso de álcool. O consumo diário de cerca de 30g é associado a um aumento de 1,5 a 2,3mmHg na pressão arterial (FLEMING, MIHIC & HARRIS, 2001). Arritmias cardíacas, com fibrilação atrial e elevação do intervalo Q-T no eletrocardiograma, também são observadas (DRUMMER & ODELL, 2001). A taquicardia ventricular é a responsável pelo alto risco de morte súbita observada em pessoas dependentes de álcool (FLEMING, MIHIC & HARRIS, 2001).

TABELA 2 - Correlação entre a concentração sangüínea de etanol e alterações comportamentais (QUESADA, 1998).

Concentração sangüínea de etanol	Alterações comportamentais
Menor que 0,5g/L	- Habitualmente não há alterações detectáveis. Pode haver ligeira incoordenação motora.
Entre 0,50 e 0,75g/L	-Efeito ansiolítico, sensação de relaxamento, ligeira mas evidente incoordenação motora.
Entre 0,75 e 1,0g/L	-Aumento da loquacidade
Entre 1,0 e 1,5g/L	-Alteração evidente no estado de ânimo e conduta. Perda de autocrítica. Ataxia.
Entre 1,5 e 2,0g/L	-Desinibição, agressividade. Alterações no curso do pensamento.
Acima de 3,0g/L	-Há um estado de estupor crescente, perda de equilíbrio, fala ininteligível e evolução até o coma.

O sistema digestivo também pode ser afetado. O etanol provoca irritação na mucosa gástrica e aumenta a secreção de gastrina e histamina, podendo causar gastrite e úlcera péptica. Diarréia crônica como resultado de má absorção no intestino delgado e pancreatite também podem ocorrer (JULIEN, 1997; FLEMING, MIHIC & HARRIS, 2001; DRUMMER & ODELL, 2001)

Danos hepáticos são a mais séria consequência do consumo excessivo e prolongado de álcool. Os efeitos principais são o acúmulo de lipídios no fígado, hepatite e cirrose. A significância dessa disfunção é

atestada pelo fato que cerca de 75% das mortes atribuídas ao alcoolismo serem causadas por cirrose hepática (JULIEN, 1997).

O etanol também interfere em um número de reações metabólicas críticas pela utilização de grandes quantidades de cofator NAD^+ e produção de NADH. A crescente produção de NADH desloca a reação catalisada pela enzima lactato desidrogenase no sentido de produzir lactato a partir de piruvato. Esse fenômeno favorece a acidose, além de inibir a gliconeogênese. Casos de hipoglicemia são comuns quando o elevado consumo de álcool não é acompanhado da ingestão adequada de alimentos. Além disso, a alta produção de acetato a partir da biotransformação do etanol, associada à baixa reserva de glicose, leva à formação de ácidos graxos e corpos cetônicos.

Aproximadamente 10% dos consumidores regulares de álcool progridem a níveis de uso que inevitavelmente causam algum tipo de detrimento físico ou social (FLEMING, MIHIC & HARRIS, 2001; DRUMMER, 2001). O uso freqüente é acompanhado por tolerância, dependência e síndrome de abstinência. Quando a dependência é instalada, a abstinência da droga resulta em um período de hiperexcitabilidade caracterizada por taquicardia, tremores, agitação psicomotora, confusão mental, distúrbios no sono, episódios de alucinações e uma variedade de desconfortos físicos – uma síndrome muitas vezes referida como “*delirius tremens*” (LARANJEIRA *et al.*, 2000; FLEMING, MIHIC & HARRIS, 2001; LARANJEIRA, 2003).

2.1.2. Anfetamina

A anfetamina foi primeiramente sintetizada em 1887, entretanto, sua atividade psicoestimulante só foi identificada em 1927. Foi introduzida na terapêutica na década de 30, principalmente como descongestionante nasal. Entre 1935 e 1946, a anfetamina era utilizada para uma série de indicações, incluindo tratamento para esquizofrenia, dependência de morfina, de nicotina

(tabaco) ou de cafeína, hipotensão, enjoos e soluços intensos (JULIEN, 1997).

Durante a Segunda Guerra Mundial, seu potencial de abuso foi conhecido. Soldados alemães, japoneses e das forças aliadas usavam anfetamina para aumentar a vigília e a agressividade e para diminuir a fadiga (HERNANDEZ & FERNANDEZ, 1998; DRUMMER & ODELL, 2001). De uso militar, rapidamente tornou-se droga difundida por toda a sociedade no pós-guerra. No meio esportivo, atletas começaram a utilizar anfetaminas devido à crença em suas propriedades ergogênicas. Estudantes e motoristas de caminhão também começaram a utilizar esse recurso com o objetivo de manter o estado de alerta por maior período de tempo e aumentar a capacidade de atenção, concentração e raciocínio.

A anfetamina pertence à classe das feniletilaminas, com uma substituição de um grupo metila na posição do carbono alfa. Diversas substituições na estrutura química da feniletilamina foram realizadas, gerando outros fármacos com propriedades anorexígenas como o femproporex e o clobenzorex. Esses derivados biotransformam-se em anfetamina no organismo humano, o que explicaria efeitos similares (MOFFAT, OSSELTON & WIDDOP, 2004; CODY & VALTIER, 1996; VALTIER & CODY, 1999). O anti-parkinsoniano selegilina é biotransformado em metanfetamina, que por sua vez também biotransforma-se em anfetamina (DRUMMER & ODELL, 2001). Na Figura 1 são apresentadas as estruturas químicas e as vias de biotransformação desses compostos.

No Brasil, o femproporex tem apresentado especial importância, pois apesar de ser um fármaco inibidor do apetite de uso controlado por legislação específica, há diversos relatos de uso indiscriminado devido às suas propriedades estimulantes. Segundo relatórios do *International Narcotic Control Board* (INTERNATIONAL NARCOTIC CONTROL BOARD, 1996), o Brasil está entre os quatro países com maior consumo de inibidores de apetite do mundo. Parte desse consumo pode ser explicado pelo grande **apelo social à utilização desses fármacos para o controle da obesidade**. De

fato, em um estudo realizado em São Paulo, analisando-se 108.215 prescrições de medicamentos psicotrópicos, 26.930 foram de substâncias anorexígenas, principalmente dietilpropiona e femproporex (NOTO *et al.*, 2002). Entretanto, também tem se verificado nos últimos anos o abuso de femproporex por caminhoneiros, que adquirem de forma ilícita a droga (conhecida no meio como “rebite”) em diversos locais das estradas, inclusive em postos de gasolina (SILVA *et al.*, 1998).

Figura 1 – Estruturas de compostos análogos à anfetamina e as vias de biotransformação no organismo humano.

A anfetamina é geralmente bem absorvida por via oral, sendo sua principal via de administração, atravessando rapidamente as membranas

biológicas devido à sua lipossolubilidade. A administração oral de 0,25mg/kg de *d*-anfetamina produz efeitos cardiovasculares máximos em aproximadamente 1 hora, enquanto efeitos subjetivos e comportamentais acontecem em 2 horas. A concentração plasmática de pico ocorre geralmente entre 1 e 2 horas (DRUMMER & ODELL, 2001).

A velocidade de eliminação da anfetamina é acentuadamente dependente do pH urinário. Em condições normais, aproximadamente 30% da dose é excretada inalterada na urina em 24 horas e após 3 a 4 dias, 90% da dose é excretada. Em condições de acidez da urina, a quantidade de anfetamina eliminada por via renal aumenta para 74% em 24 horas; com a alcalinização da urina esse valor diminui para cerca de 1 a 4% (MOFFAT, OSSELTON & WIDDOP, 2004).

A anfetamina e os compostos estruturalmente semelhantes produzem uma variedade de efeitos no sistema nervoso central e no sistema nervoso autônomo. Esses fármacos são chamados de agentes simpatomiméticos pois mimetizam os efeitos da adrenalina. O mecanismo de ação dominante se baseia na facilitação da liberação de catecolaminas (especialmente dopamina) dos sítios de estocagem dos terminais dos neurônios pré-sinápticos. Em menor extensão, a anfetamina estimula diretamente os receptores pós-sinápticos das catecolaminas. O aumento da atividade psicomotora parece ser resultado do excesso de estimulação dos receptores dopaminérgicos no sistema mesolímbico (incluindo o núcleo *accumbens*). O comportamento estereotipado parece estar relacionado com a estimulação de neurônios dopaminérgicos existentes no núcleo caudado e gânglio basal (JULIEN, 1997). A forma dextrógira da anfetamina é mais ativa sobre o sistema nervoso central enquanto a forma levógira possui efeitos mais periféricos (HERNANDEZ & FERNANDEZ, 1998).

Em baixas doses, a anfetamina aumenta a pressão arterial e causa relaxamento dos brônquios. É um potente estimulante, aumentando o estado de alerta, a autoconfiança e a sensação de força física e mental. Apesar desses efeitos sugerirem melhora de desempenho, a destreza e a

coordenação motora fina podem ser prejudicados (HERNANDEZ & FERNANDEZ, 1998). Além disso, após cessarem os efeitos estimulantes, observa-se aumento da fadiga e depressão.

Em doses moderadas (20 a 50mg), os efeitos adicionais da anfetamina incluem estimulação da respiração, tremores, aumento da atividade motora, insônia e agitação.

As doses tóxicas de anfetamina são difíceis de determinar, uma vez que existe o fenômeno de tolerância. Reações severas podem ocorrer com doses de 20 a 30mg. Por outro lado, há relatos de pessoas que desenvolveram tolerância e que sobreviveram a doses de 400 a 500mg (JULIEN, 1997).

A anfetamina é neurotóxica e pode causar lesões irreversíveis em neurônios dopaminérgicos ou serotoninérgicos do cérebro. O mecanismo dessa neurotoxicidade ainda não é inteiramente conhecido, mas envolve a formação de subprodutos tóxicos.

Em alguns usuários, a anfetamina pode causar miocardite, uma condição que pode ser potencialmente fatal. Complicações vasculares incluem vasoespasmos, edema, necrose, dores e parestesia. A estimulação excessiva do coração pode causar hipertensão, arritmia, colapso cardiovascular e morte súbita (DRUMMER & ODELL, 2001).

A anfetamina apresenta grande potencial de induzir dependência. Pessoas que utilizam freqüentemente altas doses de anfetamina experimentam um diferente conjunto de efeitos como comportamento estereotipado, repentinos ataques de agressão e violência, paranóia e psicose (JULIEN, 1997). Mudanças na percepção sensorial e alucinações também podem ocorrer. Isso varia desde a visão de um objeto, animal ou pessoa inexistente até a um estado onírico em que espaço e tempo são alterados. A maioria dos usuários freqüentes apresentam uma progressiva deterioração de seu ambiente familiar, social e ocupacional.

Uma vez que o uso da droga é descontinuado, o usuário pode experimentar a síndrome de abstinência caracterizada por aumento no apetite, aumento de peso, letargia e sonolência (que pode levar o indivíduo a dormir intermitentemente por dias). Dependendo do estado psiquiátrico da pessoa, um estado de depressão severa e tendências suicidas podem ocorrer (JULIEN, 1997; DRUMMER & ODELL, 2001).

2.1.3 Metanfetamina

A metanfetamina é um fármaco mais potente que a *d*-anfetamina e é facilmente sintetizada em laboratórios clandestinos através de reagentes químicos facilmente obtidos. Como droga de abuso, a metanfetamina também é conhecida pelos nomes de *speed*, *cristal*, *crank*, *meth*, *go* e *ice*. O cloridrato de metanfetamina é usado por via oral, por injeção intravenosa e por via intranasal. A forma básica (*ice* ou *cristal*) é administrada pela via pulmonar (JULIEN, 1997).

Doses orais de metanfetamina produzem concentração plasmática máxima em aproximadamente 3 horas após a administração. Seguindo dose de 18mg e 30mg, concentrações de pico de 20ng/mL e 40ng/mL são obtidas, respectivamente.

Quando a metanfetamina é fumada, inalando-se o vapor do cachimbo aquecido de 200 a 400°C, a eficiência desse processo é alta, com rendimento de cerca de 70%. Essa forma de uso produz rápida absorção, com perfil de concentração plasmática similar à administração intravenosa. A concentração plasmática de metanfetamina alcança seu pico perto de 100ng/mL após fumar-se cerca de 30mg (DRUMMER & ODELL, 2001).

Seus efeitos estimulantes são análogos aos produzidos pela anfetamina, entretanto, a metanfetamina atravessa a barreira hematoencefálica mais rapidamente devido à sua maior lipossolubilidade. Esses efeitos incluem: insônia, anorexia, taquicardia, hipertensão arterial,

hemorragia cerebral, convulsões e morte. Quando a dependência se instala, quadros de alucinações e paranóia geralmente ocorrem (HERNANDEZ & FERNANDEZ, 1998).

2.1.4 Cocaína

A cocaína é o principal constituinte ativo encontrado nas folhas da *Erythroxylon coca*, planta originária da zona tropical dos Andes, que cresce principalmente em regiões de clima quente e úmido. Suas propriedades estimulantes já eram conhecidas há mais de 4.000 anos na história da humanidade, quando as pessoas mascavam suas folhas. Nas culturas indígenas das regiões onde hoje se localizam Bolívia e Peru, esse hábito também era praticado há 1.200 anos. Os incas achavam que a coca tinha origem divina e chamavam-na de “presente do Rei Sol” (JOHANSON & FISHMAN, 1989).

A partir de 1855, quando a cocaína foi quimicamente isolada, seu uso aumentou drasticamente pelas pessoas que acreditavam que a substância tinha poderes especiais. Sigmund Freud, em 1884, sugeria diversas aplicações terapêuticas para a cocaína, incluindo tratamento para asma, depressão e alívio da fadiga crônica (JOHANSON & FISHMAN, 1989). Mais tarde, após observar seus efeitos adversos como tolerância e dependência, Freud, em suas últimas escrituras, chamava a cocaína de “terceiro flagelo da humanidade”, após o álcool e a heroína.

Em 1885, nos Estados Unidos, a cocaína era componente de diversas formulações farmacêuticas comerciais, além de ser ingrediente do refrigerante “Coca-cola”, que até 1903 continha cerca de 60mg de cocaína por 250mL de bebida.

No final do século XIX, entretanto, o interesse sobre a toxicidade da cocaína aumentou devido aos crescentes casos de intoxicação e morte relacionados ao uso da droga. Em 1914, foi constituído nos EUA o *Harrison*

Narcotic Law, primeiro instrumento legal de controle do uso de drogas, incluindo o ópio e a cocaína (JULIEN, 1997). No Brasil, lei semelhante só foi introduzida em 1921 através do Decreto 4.294.

Até recentemente, o cloridrato de cocaína era a forma mais comum de abuso, utilizado principalmente pela via intranasal ou intravenosa. No começo dos anos 90, contudo, a forma fumada da cocaína ganhou popularidade entre os usuários devido à maior facilidade de uso, maior disponibilidade e início de efeitos quase imediato (NAPPO, GALDURÓZ & NOTO, 1996; SILVA & ODO, 1999). Nessa forma, o sal de cocaína é alterado para sua forma livre por aquecimento da droga em uma solução de bicarbonato de sódio até evaporação da água. O resultado desse procedimento é a formação de pedras, conhecidas como "crack", devido ao som que produzem durante o aquecimento (JULIEN, 1997).

Estudos realizados com usuários de cocaína em São Paulo também mostraram esta tendência de mudança da via de administração, de intranasal e intravenosa para a via respiratória ("crack"). DUNN *et al.* (1996), analisando o perfil de uso de 245 pacientes em tratamento, verificaram que a forma fumada da cocaína aumentara de 17%, em 1990, para 64%, em 1993. Em estudo semelhante, realizado nos períodos de 1996-1997, verificou-se que 82% dos usuários de cocaína tinham utilizado a droga na forma de "crack" (DUNN & LARANJEIRA, 1999). A observação desse fenômeno é de extrema importância, uma vez que o uso da cocaína nessa forma pode levar à condição de dependência em um período menor de tempo (NAPPO, GALDURÓZ & NOTO, 1996).

Quando a cocaína é fumada na forma de "crack", a velocidade de absorção é alta devido à extensa área de superfície pulmonar. O início dos efeitos é imediato (alguns segundos), alcançando sua máxima intensidade em cerca de 5 minutos, com duração aproximada de 30 minutos (JULIEN, 1997). Essa via de administração é equivalente à via intravenosa quanto à rapidez e intensidade dos efeitos farmacológicos (JATLOW, 1987; JOHANSON & FISHMAN, 1989; CHASIN & MÍDIO, 1991).

Administrada pela via intranasal, a velocidade de absorção da cocaína através das membranas mucosas é baixa. Os motivos do retardamento da absorção estão relacionados principalmente à baixa taxa de difusão pela mucosa nasoorofaríngea, às propriedades vasoconstritoras do fármaco e à possibilidade de deglutição parcial da dose (BUSTO, BENDAYAN & SELLERS, 1989; CONE, 1995). Somente 20 a 30% da cocaína administrada pela via intranasal é absorvida, com pico plasmático ocorrendo entre 30 a 60 minutos (JULIEN, 1997).

A cocaína administrada em humanos é convertida, quase em sua totalidade, em produtos de biotransformação e eliminada na urina como benzoilecgonina (15 a 50%), ecgonina metil éster (15 a 35%), ecgonina (1 a 8%), norcocaína (2-6%) e na forma inalterada (cerca de 3%) (Figura 2) (SILVA & ODO, 1999; YONAMINE, 2000). A norcocaína é o único produto de biotransformação da cocaína reconhecidamente ativo e é formada pela atuação do citocromo P450 (JATLOW, 1987). A ecgonina é formada pela consecutiva hidrólise de pequenas quantidades de benzoilecgonina e éster metilecgonina e representa cerca de 2 a 8% do total excretado na urina.

A cocaína potencializa as ações da dopamina, noradrenalina e serotonina, bloqueando a recaptura desses neurotransmissores nos terminais nervosos pré-sinápticos. As altas concentrações de monoaminas (especialmente dopamina) na fenda sináptica estão estreitamente relacionadas com as propriedades psicoestimulantes e de reforço positivo para o uso da cocaína.

Baixas doses de cocaína (25 a 100mg) produzem uma série de efeitos como: aumento do estado de alerta, hiperatividade motora, taquicardia, vasoconstrição, hipertensão, broncodilatação, aumento da temperatura corporal e midríase. Os efeitos psicológicos incluem euforia imediata, sensação de bem-estar e vertigem que dura cerca de 30 minutos. Esse período é seguido de euforia mais branda misturada com ansiedade que dura de 60 a 90 minutos. Entretanto, a sensação de ansiedade pode persistir por horas (JULIEN, 1997).

Figura 2 – Principais vias de biotransformação da cocaína administrada em humanos.

Com o passar do tempo, os efeitos prazerosos dão lugar à depressão, fadiga, desconforto físico e paranóia. Essa mudança repentina causa ao usuário o desejo de usar mais cocaína na tentativa de obter a euforia sentida anteriormente. Essa constante busca da droga caracteriza a farmacodependência.

Com doses mais elevadas, a loquacidade aumenta, geralmente com discursos incoerentes ou incompreensíveis. Há também a intensificação dos efeitos desagradáveis, com o aparecimento de progressiva incoordenação motora, agitação, inquietação, tremores e convulsões (SILVA & ODO, 1999). Uma dose de 1,2g pode ser letal na maioria dos casos, entretanto, farmacodependentes podem fazer uso de 5 a 10g diariamente. Em contrapartida, doses de 30mg podem ser fatais em pessoas susceptíveis (MOFFAT, OSSELTON & WIDDOP, 2004).

Algumas complicações específicas estão diretamente associadas à via de administração. Após aspiração freqüente do cloridrato de cocaína, rinite crônica, perfuração do septo nasal e perda de olfato podem ocorrer. Quando a cocaína é administrada por via intravenosa, doenças infecciosas como hepatite e AIDS podem ser transmitidas. O uso freqüente de “crack” pode acarretar efeitos como bronquite obstrutiva, infiltração alveolar difusa, edemas pulmonares e síndrome associada à dores torácicas (GUIMARÃES, 1999).

A intoxicação aguda de cocaína também provoca danos cardiovasculares e neurovasculares. A elevação aguda da pressão arterial decorrente da atividade simpatomimética da cocaína tem sido apontada como responsável pela ocorrência de acidente vascular cerebral (AVC). Áreas imperfeitas de fluxo sanguíneo foram observadas em usuários freqüentes devido à ação vasoconstritora do fármaco (MADDEN & POWERS, 1990). Os complexos efeitos tóxicos no coração envolvem tanto a ação anestésica local como a inibição da recaptação de monoaminas (RITZ, CONE & KUCHAR, 1990). Como anestésico local, a cocaína impede a condução do impulso nervoso por diminuir a permeabilidade da membrana

celular aos íons sódio. No coração, esse efeito gera arritmia, enquanto ações da noradrenalina, dopamina e serotonina no sistema nervoso central produzem taquicardia e vasoconstrição periférica. A vasoconstrição da artéria coronária reduz o fluxo de sangue para o miocárdio, privando o coração de oxigênio. A combinação de vasoconstrição e hipertensão, associada à inadequada oxigenação do músculo cardíaco pode levar a infartos, que têm sido observados mesmo em pacientes com artéria coronarianas normais (RITZ, CONE & KUCHAR, 1990).

2.1.5 Canabinóides (maconha)

A planta *Cannabis sativa*, a fonte da maconha, floresce principalmente nas regiões tropicais. O principal constituinte ativo da planta é o delta-9-tetraidrocanabinol (delta-9-THC). Outras 400 substâncias foram isoladas da planta, das quais mais de 60 são canabinóides. Desses canabinóides, além do delta-9-THC, os outros três compostos que apresentam atividade farmacológica são o delta-8-THC, o delta-9-tetraidrocanabivariol e o canabinol. Entretanto, o delta-8-THC e o delta-9-tetraidrocanabivariol são constituintes minoritários e provavelmente não contribuem muito para a ação psicoativa da planta. O canabinol é um produto da degradação da *Cannabis* e não é encontrado na planta fresca e sua atividade é somente uma fração do delta-9-THC (DRUMMER & ODELL, 2001).

Além da maconha, outros nomes para os produtos da *Cannabis* incluem: *marijuana*, *skunk*, haxixe, *charas*, óleo de haxixe, *bharg*, *ganja* e *sinsemilla*. Haxixe e *charas*, que consistem da resina seca das inflorescências da planta fêmea, apresentam conteúdo de delta-9-THC ao redor de 10 a 20% (STEPHENS, 1999). O óleo de haxixe, um extrato oleoso obtido das inflorescências da *Cannabis*, contém entre 15 a 60% de delta-9-THC. *Ganja* e *sinsemilla* referem-se ao material seco encontrado no topo das plantas fêmeas, com conteúdo de delta-9-THC variando entre 5 a 8%. *Bhang*, *marijuana* e maconha são as preparações obtidas da planta inteira e

seu conteúdo varia de 2 a 5% (JULIEN, 1997). O *skunk* é a chamada “maconha de laboratório”, produzida a partir de modernos processos de hibridização, gerando preparações com conteúdo de delta-9-THC em torno de 20%.

As vias de administração mais utilizadas no ser humano são a oral e a inalatória (pulmonar), sendo esta última a mais popular e mais efetiva em relação à absorção do delta-9-THC.

A administração por via oral ocorre através do consumo de produtos da *Cannabis* misturados com alimentos, bebidas ou cápsulas de gelatina. Por essa via, a absorção do delta-9-THC é lenta e incompleta. O começo dos efeitos geralmente leva de 30 a 60 minutos, com sua máxima intensidade ocorrendo de 2 a 3 horas após a ingestão (JULIEN, 1997).

Pela via inalatória, os efeitos subjetivos do delta-9-THC são imediatos, alcançando o máximo em 20-30 minutos após o uso da maconha, podendo durar por 2-3 horas (CERRO, 1998). O ato de fumar um cigarro de maconha contendo 16mg de delta-9-THC fornece uma concentração plasmática de pico de aproximadamente 80ng/mL, com uma variação de 50 a 130ng/mL, em 15 minutos (DRUMMER & ODELL, 2001).

Uma vez absorvido, o delta-9-THC é rapidamente distribuído aos vários órgãos do corpo, concentrando-se no tecido adiposo devido à sua alta lipossolubilidade (JULIEN, 1997; DRUMMER & ODELL, 2001). Somente cerca de 3% do fármaco circula livre no plasma; a maior proporção circula unida a lipoproteínas (97%), principalmente LDL. Esta é a razão porque somente uma pequena fração alcança o sistema nervoso central (ao redor de 1%), concentrando-se principalmente no tálamo, amígdala, hipocampo e córtex cerebral (CERRO, 1998).

O delta-9-THC é rapidamente biotransformado por reações de hidroxilação, oxidação e conjugação com ácido glicurônico ou glutathione através de enzimas hepáticas, pulmonares e cerebrais (CERRO, 1998).

Atualmente, mais de 80 produtos de biotransformação do delta-9-THC já foram identificados. Os principais são: o 11-hidroxitetraidrocanabinol (11-OH-THC), o ácido 11-nor-delta-9-tetraidrocanabinol carboxílico e o ácido 11-nor-delta-9-tetraidrocanabinol carboxílico conjugado com ácido glicurônico. Este último é o principal produto de biotransformação excretado na urina. Na Figura 3 são apresentadas as principais vias de biotransformação do delta-9-THC (DRUMMER & ODELL, 2001).

Além da via renal, que representa cerca de 20% do total, a excreção de canabinóides também ocorre pela via biliar e fecal (65 a 70%). Os produtos de biotransformação excretados na bile podem ser reabsorvidos (por circulação entero-hepática), o que aumenta o tempo de permanência dos canabinóides no organismo (CERRO, 1998).

O delta-9-THC age no sistema nervoso central em receptores localizados em regiões específicas do cérebro. Estes receptores foram denominados de CB1 e foram identificados no hipocampo, córtex cerebral (responsáveis pela memória e aprendizado), gânglios basais e cerebelo (que controlam o equilíbrio e a coordenação motora) (CERRO, 1998; DRUMMER & ODELL, 2001; CAMPOS, YONAMINE & MOREAU, 2003). Tem se observado também que agonistas de receptores CB1 estimulam a área tegmental ventral, uma importante área de recompensa do cérebro, e que o delta-9-THC aumenta seletivamente os níveis de dopamina no núcleo *accumbens*, região identificada como “chave” para o efeito de reforço positivo para as drogas de abuso (CERRO, 1998). A falta de receptores para canabinóides no tronco encefálico pode explicar a pouca letalidade verificada pelo delta-9-THC, uma vez que o tronco encefálico regula a respiração e outras funções vitais (JULIEN, 1997, DRUMMER & ODELL, 2001). Estima-se que a dose letal em humanos seja aproximadamente 1.000 vezes a dose necessária para produzir os efeitos psicoativos. Até hoje, não há relatos de casos de morte seguida pela administração aguda de *Cannabis* (STEPHENS, 1999).

Figura 3 – Principais vias de biotransformação do delta-9-tetraidrocanabinol.

Receptores canabinóides periféricos, denominados CB2, também foram identificados em células não maduras do sistema linfóide e podem ter papel importante na regulação da resposta imune e inflamação (DRUMMER & ODELL, 2001).

Substâncias endógenas derivadas do ácido araquidônico foram identificadas e parecem se ligar a esses receptores canabinóides. Essas

substâncias incluem a anandamida (do sânscrito, ananda = felicidade) e o 2-araquidonilglicerol (Figura 4). A função dessas substâncias no organismo e se são realmente canabinóides endógenos ainda aguardam completo esclarecimento científico (DRUMMER & ODELL, 2001).

Anandamida

2-araquidonilglicerol

Figura 4 – Estruturas químicas da anandamida e do 2-araquidonilglicerol, possíveis canabinóides endógenos.

Outros estudos sugerem que a administração prolongada de delta-9-THC produz um aumento na síntese de noradrenalina e dopamina no sistema nervoso central. Os dados sobre alterações que ocorrem na neurotransmissão serotoninérgica não são conclusivos, entretanto, predominam os estudos que indicam um aumento na liberação de serotonina. A administração freqüente de delta-9-THC também produz uma diminuição da síntese e liberação de acetilcolina (CERRO, 1998).

Os efeitos comportamentais da inalação da fumaça da *Cannabis* em humanos são complexos e dependem de muitas variáveis (personalidade, ambiente, expectativa do usuário, etc). De maneira geral, pode-se dizer que

os efeitos comportamentais desses compostos em baixas doses são do tipo depressor, mas pode se tornar excitatório se estimulado pelo ambiente (CERRO, 1998).

Em geral, todos os sentidos podem parecer aumentados e a percepção de tempo é alterada. Usuários reportam uma sensação aumentada de bem-estar, euforia, relaxamento e alívio da ansiedade. Um aumento da loquacidade e intensa hilaridade espontânea também podem ocorrer. Efeitos subjetivos incluem dissociação de idéias, ilusões e leve alucinação (JULIEN, 1997; CERRO, 1998).

A capacidade cognitiva, como a recordação de números e fatos, os cálculos simples e as tarefas que exigem atenção são significativamente prejudicados pelo uso da *Cannabis*, mesmo com a exposição a baixas doses de delta-9-THC. A coordenação motora também é afetada e pode ser observada mesmo após 4 horas do uso da maconha (DRUMMER & ODELL, 2001; CAMPOS, YONAMINE & MOREAU, 2003).

Doses elevadas de delta-9-THC podem induzir a alucinações mais intensas e sentimentos paranóicos. A desorganização do pensamento, a despersonalização e a perda de noção de tempo e espaço pode converter a euforia inicial em um estado de ansiedade que pode levar ao pânico (CERRO, 1998).

Tem sido demonstrado que o uso freqüente de maconha precipita disfunções pulmonares como tosse, dificuldade de respiração e formação excessiva de muco que pode levar à doença crônica obstrutiva. Além disso, durante o ato de fumar a maconha, grande quantidade de produtos formados pela pirólise são inalados pelo usuário. Estes incluem os hidrocarbonetos policíclicos, compostos reconhecidamente carcinogênicos (DRUMMER & ODELL, 2001).

Um aumento na freqüência cardíaca e pressão sangüínea são comumente relatados. Os vasos sangüíneos da córnea dilatam-se,

resultando em hiperemia (vermelhidão dos olhos), que é característico em pessoas que acabaram de fumar maconha. Usuários também relatam freqüentemente aumento no apetite, boca seca, vertigens ocasionais e leve náusea (JULIEN, 1997).

A tolerância ao delta-9-THC ocorre como resultado da adaptação ao cérebro à contínua presença do fármaco. A tolerância se desenvolve rapidamente, mas também desaparece com a mesma velocidade. É estimado também que cerca de 10% das pessoas que usam freqüentemente maconha desenvolvam algum grau de dependência da droga. Sintomas característicos da síndrome de abstinência são: ansiedade, disforia, irritabilidade, insônia, náuseas, cólicas, sudorese, fotofobia e desejo de consumir mais droga. Geralmente, sintomas da abstinência são considerados relativamente brandos, começando em poucas horas após o término da administração da droga e durando cerca de 4 a 6 dias (JULIEN, 1997, DRUMER & ODELL, 2001).

2.2. Matrizes biológicas utilizadas em análises toxicológicas para verificar a exposição a drogas de abuso

A análise toxicológica é, sem dúvida nenhuma, recurso indispensável para confirmar a exposição a drogas de abuso e de grande importância para profissionais envolvidos no tratamento da dependência e no controle e prevenção ao uso de drogas lícitas e ilícitas. Dependendo da finalidade da análise, diversos espécimes biológicos podem ser utilizados. Na maioria dos casos, a urina é a amostra biológica de escolha para se verificar a exposição a drogas de abuso e tem sido amplamente empregada em programas de prevenção e controle do uso de drogas no ambiente de trabalho (CROUCH, 1998; SILVA, YONAMINE & ODO, 1999; SILVA & YONAMINE, 2000). As concentrações dos fármacos e seus produtos de biotransformação são relativamente altas quando comparadas com outros espécimes biológicos. Além disso, trata-se de amostra quase sempre disponível e grandes volumes

podem ser obtidos durante a coleta para se realizar a análise (SILVA & ODO, 1999). As principais desvantagens em relação a essa amostra são: a possibilidade de adulteração, exigindo-se que a coleta seja feita sob vigilância e a dificuldade de se coletar amostras em campo aberto, como por exemplo, quando se deseja monitorar o uso de drogas por motoristas no trânsito.

É prática comum nesse tipo de análise o estabelecimento de limites de concentração na urina para categorização de resultados como indicativo ou não do consumo de drogas. Esses valores de referência, denominados *cut offs*, são valores estabelecidos para um grupo de fármacos na fase analítica de triagem e para um determinado indicador biológico específico na fase confirmatória. Nas Tabelas 3 e 4 são apresentados os valores de *cut off* recomendados pela Comunidade Européia (DE LA TORRE *et al.*, 1997) e pelo *Substance Abuse and Mental Health Service Administration* (SAMHSA, 2001) dos Estados Unidos (VERSTRAETE & PIERCE, 2001) para as fases de triagem e confirmação, respectivamente.

Para análise em urina, as técnicas imunológicas são as mais utilizadas para triagem (OSTERLOCH & BECKER, 1990; DE LA TORRE *et al.*, 1997) por apresentarem as seguintes características: necessidade de pouco volume de amostra; utilização de sistemas automatizados que diminuem a probabilidade de erros operacionais; processamento de várias amostras simultaneamente, com resultados rápidos e sem necessidade de procedimentos de extração do analito da amostra. Entretanto, há a necessidade de aparelhos específicos e reagentes importados e há a possibilidade de ocorrer interferência em reações cruzadas (falsos positivos). Por essa razão, resultados positivos provenientes da fase de triagem devem ser confirmados por técnicas mais específicas como a espectrometria de massa associada à cromatografia em fase gasosa (DE LA TORRE *et al.*, 1997).

TABELA 3 - Valores de referência de concentração urinária *cut off* (ng/mL) para a fase de triagem recomendados pela Comunidade Européia e SAMHSA (EUA) para alguns grupos de fármacos de abuso.

	Comunidade Européia	Estados Unidos
Anfetaminas	300	500
Canabinóides	50	50
Produtos de biotransformação da Cocaína	300	150
Opiáceos	300	2000

TABELA 4 - Valores de referência de concentração urinária *cut off* (ng/mL) para a fase de confirmação recomendados pela Comunidade Européia e SAMHSA (EUA) para alguns indicadores biológicos de fármacos de abuso.

	Comunidade Européia	Estados Unidos
Anfetamina	200	250
Metanfetamina	200	250
Ácido 11-nor-delta-9-tetraidrocanabinol carboxílico	15	15
Benzoilecgonina	150	100
Morfina	200	2000

A amostra de sangue pode ser utilizada quando se deseja verificar a exposição recente a drogas (algumas horas), havendo a possibilidade de se estabelecer correlação entre a concentração plasmática e o estado clínico do indivíduo. Contudo, a coleta é invasiva e requer profissional treinado para sua execução. Além disso, trata-se de matriz complexa em relação aos constituintes normalmente presentes, dificultando a análise toxicológica. (CHRISTOPHERSEN & MORLAND, 1994; CROUCH, 1998).

Estudos também têm sido conduzidos no sentido de avaliar a utilização do suor para a monitorização da exposição a drogas de abuso. Para a coleta de amostras foram desenvolvidos adesivos especiais denominados *patches*, que quando aderidos à pele, absorvem o suor

liberado pelo corpo (HUESTIS & CONE, 1998). O suor tem sido sugerido como amostra biológica a ser utilizada para monitorar pacientes em tratamento de dependência de drogas. A desvantagem da análise de suor é que pouco ainda é conhecido sobre a deposição de fármacos nesse espécime biológico, o que dificulta a interpretação dos resultados.

Quando o intuito é verificar a exposição de drogas a longo prazo, a análise toxicológica em cabelo pode ser utilizada. Se for levado em consideração que o cabelo humano cresce em média de 1,0 a 1,5cm por mês, é possível fazer a correlação do segmento analisado com o período em que houve a exposição, sendo o segmento mais próximo à raiz correspondente ao último mês de exposição (ENDERSON, 1993; TOLEDO, 1999). Contudo, a detecção de fármacos de abuso no cabelo só é possível se houver exposição freqüente à droga.

Nos últimos anos, tem se observado um crescente interesse mundial do uso da saliva para monitorar o uso de drogas por motoristas (PEEL, PERRIGO & MIKHAEL, 1984; CAMPIGLIA & VO-DINH, 1998; STEINMEYER *et al.*, 2001). A saliva pode ser facilmente coletada de forma não-invasiva e sob observação direta, o que dificulta a possibilidade de adulteração da amostra pelo doador (SCHRAMM, SMITH & CRAIG, 1992; CAMPIGLIA & VO-DINH, 1998; CROUCH, 1998). A coleta pode ser realizada permitindo-se o livre fluxo da saliva para um reservatório, aspirando a amostra através de um tubo sob vácuo ou colocando um pequeno rolo de algodão na boca para absorver o líquido (CONE & JENKINS, 1997; HUESTIS & CONE, 1998). Alternativamente, cristais de ácido cítrico podem ser utilizados para estimular a salivação.

Os fármacos são transferidos da corrente sangüínea para essa amostra biológica através de mecanismos de transporte ativo, difusão passiva e ultrafiltração (HUESTIS & CONE, 1998). Por ser um filtrado do sangue, a concentração dos fármacos deve refletir a concentração sangüínea. A maioria dos fármacos desaparecem na saliva e no sangue de 12 a 24 horas após a exposição e portanto há uma relação temporal entre o

desaparecimento do fármaco na saliva e a duração de efeitos farmacológicos (HUESTIS & CONE, 1998). Alternativamente ao sangue, a detecção na saliva poderia indicar se um motorista estaria dirigindo sob a influência de drogas.

2.3. A saliva como espécime biológico para verificar a exposição a drogas de abuso

A saliva é um fluido incolor, formada pelas secreções das células serosas e mucosas de três principais glândulas: 1) glândula parótida, situada na parte superior da boca, 2) glândula sublingual, situada em ambos os lados da boca e 3) glândula submandibular, situada na base da língua (KIDWELL *et al.*, 1998). A secreção submandibular contribui com 71% do total da saliva, a secreção parótida com 25% e sublingual com 4%. As células serosas secretam um fluido aquoso com alto conteúdo de eletrólitos e as células mucosas secretam um fluido mais viscoso contendo amilases, mucoproteínas e mucopolissacarídeos. O fluxo salivar pode variar de 0 a 10mL/min com produção diária de cerca de 500 a 1500mL (HUESTIS & CONE, 1998).

A composição da saliva também se altera de acordo com o fluxo, mas basicamente consiste de 99% água, 0,3% proteínas (principalmente enzimas) e 0,3% mucopolissacarídeos e eletrólitos (KIDWELL, HOLLAND & ATHANASELIS, 1998). O pH da saliva coletada de forma não-estimulada está na faixa de 5,6 a 7,0 e aumenta com a estimulação até um máximo de 8,0.

Uma fina camada de células epiteliais separa os ductos salivares da circulação sistêmica. Substâncias podem ser transportadas do sangue para a saliva através de transporte ativo (secreção ativa), difusão através dos poros das membranas (ultrafiltração) ou por difusão passiva a favor de gradiente de concentração. Moléculas com massa molecular menor que

100Da (p.ex. etanol) podem se difundir através dos poros das membranas. Entretanto, para a maioria das substâncias com maior massa molecular, a difusão passiva através das membranas celulares constitui o principal mecanismo de transporte do sangue para a saliva e ocorre quando a molécula se encontra na forma lipossolúvel. Formas ionizadas e fármacos ligados a proteínas plasmáticas têm o transporte dificultado (HUESTIS & CONE, 1998).

Se o pKa de um fármaco é maior que 8,5 para substâncias de caráter básico ou menor que 5,5 para substâncias de caráter ácido, ou ainda, se o fármaco não for ionizável, o pH salivar pouco interferirá na concentração do fármaco na saliva (KIDWELL, HOLLAND & ATHANASELIS, 1998). Para esses casos, geralmente existe uma relação entre a concentração salivar do fármaco e a concentração do fármaco livre encontrado na corrente sangüínea, denominada razão saliva/plasma (HUESTIS & CONE, 1998). Entretanto, muitos fármacos de abuso apresentam valores de pKa próximos de 8,5 e, portanto, sua concentração na saliva é influenciada em alguma extensão por alterações no pH (KIDWELL, HOLLAND & ATHANASELIS, 1998). Uma vez que o fluxo salivar também influencia o pH, esse fenômeno também deve influenciar a razão saliva/plasma. Outro fator que pode alterar a razão saliva/plasma é a contaminação da cavidade bucal, que pode ocorrer pela administração da droga pela via oral, intranasal e inalatória (pulmonar).

Valores de referência de concentração de fármacos de abuso em saliva (*cut-off*) foram estabelecidos pela *Substance Abuse and Mental Health Service Administration* (SAMHSA) dos Estados Unidos na fase de triagem e confirmação (SUBSTANCE ABUSE AND MENTAL HEALTH SERVICE ADMINISTRATION, 2001) (Tabela 5 e 6). Estes valores, entretanto, ainda estão sendo discutidos pela comunidade científica (CONE *et al.*, 2002; MOORE & LEWIS, 2003).

TABELA 5 – Valores de referência de concentração na saliva *cut off* (ng/mL) para a fase de triagem recomendados pela *Substance Abuse and Mental Health Service Administration* (EUA) para alguns grupos de fármacos de abuso.

	Valor de referência (triagem)
Anfetaminas	50
Canabinóides	20
Cocaína e produtos de biotransformação	20
Opiáceos	40

TABELA 6 – Valores de referência de concentração na saliva *cut off* (ng/mL) para a fase de confirmação recomendados pela *Substance Abuse and Mental Health Service Administration* (EUA) para alguns fármacos de abuso.

	Valor de referência (confirmação)
Anfetamina	50
Metanfetamina	50
Delta-9-THC	4
Cocaína ou benzoilecgonina	8
Morfina	40

2.3.1. Etanol

A concentração de etanol na saliva é geralmente um pouco maior do que aquela encontrada no sangue pois essa substância é distribuída uniformemente no organismo humano de acordo com o conteúdo de água (HUESTIS & CONE, 1998). JONES (1993) encontrou uma razão média saliva/plasma de 1,094 (n=166) no intervalo de 40 a 400 minutos após o

início do consumo de álcool. Esta razão era constante durante as fases de absorção, distribuição e eliminação do etanol no organismo.

HAECKEL & BUCKLITSCH (1987) verificaram que amostras de saliva coletadas sob estimulação com ácido cítrico e sem estimulação não apresentavam alteração significativa quanto a concentração de etanol. Neste estudo, uma razão saliva/plasma de 1,032 foi encontrada na fase pós-absorção.

Um modelo estatístico foi desenvolvido por RUZ *et al.* (1989) para a inferência da concentração alcoólica no sangue em um certo tempo com a determinação posterior da concentração de etanol na saliva. Na aplicação prática, o erro encontrado foi menor que 20%.

2.3.2. Anfetamina/metanfetamina

Poucos trabalhos foram publicados até o presente momento estudando a farmacocinética da anfetamina e/ou metanfetamina em saliva. Em um destes estudos, WAN, MATIN & AZARNOFF (1978) reportaram maiores concentrações de anfetamina na saliva do que no plasma e detecção de até 48 horas após administração oral de 10mg de cloridrato de anfetamina em 4 indivíduos sadios. A média da razão saliva/plasma durante a fase pós-absorção foi de 2,76.

Em uma investigação forense, SMITH (1981) detectou anfetamina por radioimunoensaio em saliva de um indivíduo que estava sob tratamento com esse fármaco. A concentração de anfetamina na saliva era similar àquela encontrada no sangue para o mesmo indivíduo.

Mais recentemente, SCHEPERS *et al.* (2003) estudaram a farmacocinética da anfetamina e metanfetamina na saliva e no plasma após administração oral de 10 ou 20mg de cloridrato de metanfetamina em 8 voluntários. A metanfetamina foi detectada na saliva de 0,08 a 2,0 horas

após a administração oral de 10mg e alcançou concentração de pico entre 25 a 312ng/mL, ocorrendo de 4 a 8 horas após a dose. A anfetamina apresentou concentração máxima variando de 4 a 21ng/mL, ocorrendo de 4 a 12 horas após a administração da mesma dose do cloridrato de metanfetamina. As razões saliva/plasma para metanfetamina variaram consideravelmente entre os participantes, exibindo uma média de 2,0, sendo que 95% dos valores ocorreram entre 2,3 e 4,3.

2.3.3. Cocaína e produtos de biotransformação

Estudos têm demonstrado que a cocaína inalterada pode ser detectada na saliva após administração intravenosa, indicando que esse fármaco pode atingir as glândulas salivares através da corrente sanguínea, não sendo somente produto de contaminação proveniente da administração intranasal ou inalatória (THOMPSON *et al.*, 1987; CONE *et al.*, 1988; SCHRAMM, SMITH & CRAIG, 1992; JENKINS, OYLER & CONE, 1995; CONE, OYLER & DARWIN, 1997).

JENKINS, OYLER & CONE (1995) reportaram concentração de pico na saliva de 428 a 1.927ng/mL após administração intravenosa de 44,8mg de cloridrato de cocaína. O período de detecção (limite de detecção de 1ng/mL) foi maior na saliva do que no plasma, com uma média de 7,4 horas após administração inalatória e 8,6 horas após administração intravenosa comparada com 4,0 e 6,3 horas no plasma, respectivamente.

CONE, OYLER & DARWIN (1997), avaliando a concentração de cocaína em saliva, verificaram que a contaminação da cavidade bucal proveniente da administração intranasal ou inalatória produzia elevada razão saliva/plasma em um breve período após o consumo da droga. Aproximadamente 2 horas após a exposição, a razão saliva/plasma tornava-se equivalente àquela encontrada na administração intravenosa. As concentrações máximas na saliva de indivíduos que receberam 25mg de

cloridrato de cocaína por via intravenosa variaram de 258 a 1.303ng/mL e as razões saliva/plasma variaram de 1,3 a 10,1. A cocaína foi detectada na saliva cerca de 3-6 horas após administração de uma única dose, utilizando um limite de detecção de 25ng/mL. A benzoilecgonina e a ecgonina metil éster (principais produtos de biotransformação da cocaína) foram detectadas na saliva em concentrações bem menores que o produto inalterado.

Essa diferença de concentração da cocaína e da benzoilecgonina encontrada na saliva pode ser explicada pelas características físico-químicas dessas substâncias. A cocaína é um fármaco de caráter básico ($pK_a = 8,6$) enquanto a benzoilecgonina tem caráter anfótero, isto é, contém grupamentos funcionais ácido e básico em sua molécula ($pK_a = 2,25$ e $11,2$). Enquanto a razão saliva/plasma da cocaína é alta em pH salivar baixo e diminui com o aumento do pH, a concentração de benzoilecgonina é insignificamente alterada com variações de pH da saliva (SCHRAMM *et al.*, 1992). Em contrapartida, a capacidade da benzoilecgonina em atravessar membranas é dificultada por se encontrar em qualquer pH, na forma ionizada (polar) e, portanto, pouco lipossolúvel. SCHRAMM *et al.* (1993), em um estudo com 69 pacientes, verificaram que as concentrações de cocaína eram cerca de 4,9 vezes maiores na saliva do que no soro enquanto as concentrações de benzoilecgonina eram 2,5 vezes maiores no soro.

KATO *et al.* (1993) observaram que o aumento no fluxo salivar por estimulação durante a coleta diminuía substancialmente as concentrações de cocaína na saliva. As concentrações de cocaína obtidas da coleta não estimulada após administração intravenosa resultava em média em um aumento de 6,5 vezes do que na saliva obtida com estimulação. Apesar do pH da saliva não ter sido medido neste estudo, as diferenças observadas são provavelmente devido às variações de pH entre a saliva coletada de forma estimulada e aquela coletada sem estimulação (HUESTIS & CONE, 1998).

A ocorrência prolongada de cocaína na saliva após uso freqüente foi primeiramente verificada por CONE & WEDDINGTON (1989). As concentrações de cocaína na saliva foram determinadas por radioimunoensaio. Inicialmente, os níveis de cocaína estavam na faixa de 5-50ng/mL, mas declinava rapidamente de 1 a 10ng/mL nas 12 a 24 horas seguintes. Após este período, mantinha-se ao nível do limite de detecção do método (0,5ng/mL) de 5 a 10 dias após a abstinência. Os autores concluíram que o acúmulo do fármaco em compartimentos mais profundos, provavelmente no tecido adiposo e sistema nervoso central, era a causa da maior permanência da cocaína na saliva.

Em um estudo similar, MOOLCHAM *et al.* (2000) mediram a meia-vida da cocaína no plasma e saliva de usuários freqüentes da droga. Amostras foram coletadas em um período de até 12 horas durante a abstinência e analisadas por espectrometria de massa associada à cromatografia em fase gasosa (GC/MS). Os resultados indicaram uma meia-vida de 3,8 horas no plasma e 7,9 horas na saliva.

2.3.3. Canabinóides

A presença do delta-9-THC na saliva parece ser devido principalmente à contaminação da cavidade oral após o ato de fumar maconha ou ingerir produtos da *Cannabis* (NIEBDALA *et al.*, 2001). O delta-9-THC liga-se amplamente às proteínas plasmáticas e não ultrapassa prontamente do sangue para a saliva. Isso pode ser constatado pelo fato que essa substância não é detectada na saliva após administração intravenosa (HUESTIS & CONE, 1998). Entretanto, apesar das concentrações de delta-9-THC não se correlacionarem muito bem com as concentrações plasmáticas, a presença deste na saliva ainda pode ser razoavelmente interpretada como uso recente da droga (MENKES *et al.*, 1991). Produtos de biotransformação do delta-9-THC como o 11-

hidroxitetraidrocanabinol e o ácido 11-nor-delta-9-tetraidrocanabinol carboxílico também não são detectados na saliva (KINTZ *et al.*, 2000).

Em um estudo realizado por GROSS *et al.* (1985), amostras de saliva de voluntários que fumaram de meio a 2 cigarros de maconha (27mg de delta-9-THC/cigarro) foram analisadas por radioimunoensaio para detectar a presença de delta-9-THC. A concentração média encontrada na saliva, meia hora após o uso, foi de 329ng/mL. Após esse período, as concentrações declinavam gradualmente até chegarem aos níveis de 6,3ng/mL, 5 horas após o uso.

Em um estudo semelhante (NIEBDALA *et al.*, 2001), voluntários fizeram uso de maconha ou produtos da *Cannabis*, administrados pela via inalatória ou oral. Amostras de saliva foram coletadas e analisadas por enzimaímunoensaio e dupla espectrometria de massa associada à cromatografia em fase gasosa (GC/MS/MS), visando a detecção de delta-9-THC. Resultados positivos na saliva, utilizando um valor de referência de 0,5ng/mL, foram obtidos em média até 34 horas após o uso de um cigarro de maconha. Após administração oral, concentrações menores foram obtidas e resultados positivos foram verificados até 16 horas após o consumo. Apesar das grandes variações individuais observadas, em geral, a concentração máxima de delta-9-THC na saliva ocorria entre 0,25 a 1 hora após a exposição e declinava rapidamente nas 2 a 4 horas seguintes.

2.4. Aspectos analíticos da detecção de álcool e fármacos de abuso em saliva

Geralmente fármacos inalterados e não seus produtos de biotransformação são encontrados na saliva. Isto pode ser uma vantagem ou uma desvantagem em termos analíticos. É uma desvantagem uma vez que os anticorpos presentes na maioria dos imunoensaios disponíveis comercialmente são específicos para os produtos de biotransformação e não

para os fármacos inalterados. A vantagem é que os fármacos inalterados são menos polares, mais facilmente extraídos e mais voláteis para serem analisados por cromatografia em fase gasosa (GC) ou cromatografia em fase gasosa associada à espectrometria de massa (GC/MS) (YONAMINE, 2000; FARINA, YONAMINE & SILVA, 2002).

Recentemente, alguns imunoensaios foram desenvolvidos para rápida detecção de álcool e de fármacos de abuso em saliva como técnica de triagem (JONES, 1995; ENGELHART & JENKINS, 2001; DE GIOVANNI *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2003). Um desses imunoensaios é o sistema eletrônico denominado *Cozart Rapiscan* (Cozart Bioscience Ltd., Oxford, Reino Unido) que permite a simultânea análise de pelo menos cinco classes de drogas: opiáceos, benzodiazepínicos, metadona, cocaína e anfetaminas. Para determinação dos níveis de etanol na saliva, um dispositivo imunoenzimático denominado *Q.E.D. Saliva Alcohol Test* (Orasure Technologies, Inc., PA, EUA) foi desenvolvido, apresentando resultados satisfatórios (JONES, 1995). Além destes métodos imunológicos, um outro método de triagem para detecção de cocaína e benzoilecgonina presentes em saliva foi descrito por CAMPIGLIA & VO-DINH (1998). O método utiliza a técnica de fosforimetria e apresenta como vantagens a simplicidade, rapidez, baixo custo e necessidade de pouco volume de amostra.

Outros métodos de detecção de anfetamina, metanfetamina, cocaína, delta-9-THC e etanol em amostras de saliva foram descritas na literatura científica, utilizando as técnicas de cromatografia em fase gasosa (GC), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e espectrometria de massa (MATIN, WAN & KNIGHT, 1977; MASEDA *et al.*, 1986; THOMPSON & CONE, 1987; MACCHIA *et al.*, 1995; KIRCHER & PARLAR, 1996; HALL *et al.*, 1998; KINTZ, CIRIMELLE & LUDS, 2000; NIEBDALA *et al.*, 2001; FUCCI *et al.*, 2001; MORTIER *et al.*, 2002; FUCCI, DE GIOVANNI & CHIAROTTI, 2003; CAMPORA *et al.*, 2003; YONAMINE *et al.*, 2003; WOOD *et al.*, 2003).

Para determinação de etanol, MACCHIA *et al.* (1995) propuseram um método simples e rápido utilizando a técnica de *headspace* e cromatografia em fase gasosa como detector de ionização por chama (GC/FID) em várias matrizes biológicas como sangue, plasma, urina e saliva. Os autores sugerem que o método pode ser aplicado como análise confirmatória para a presença de etanol em diversos espécimes biológicos.

Para determinação de cocaína e produtos de biotransformação em saliva, CAMPORA *et al.* (2003) desenvolveram um método utilizando a espectrometria de massa associada à cromatografia em fase gasosa (GC/MS) como técnica de detecção dos analitos. O espectrômetro de massa foi selecionado para operar no modo de ionização química positiva. O método se baseia na aplicação da extração em fase sólida (SPE) e derivação dos analitos com *bis*-trimetilsililtrifluoroacetamida/trimetilclorosilano (BSTFA/TMCS). O método foi aplicado em 48 amostras de saliva provenientes de usuários de cocaína, nas quais 96% foram positivas para a presença do fármaco e seus produtos de biotransformação.

A ionização química também foi selecionada como modo de operação do GC/MS em método desenvolvido por MATIN, WAN & KNIGHT (1977) para determinação de isômeros ópticos da anfetamina em saliva. As anfetaminas foram extraídas da saliva alcalinizada utilizando-se hexano como solvente extrator e posteriormente submetidas à reação de derivação com *n*-pentafluorobenzoil-propil-imidazolida.

Um método mais simples quanto à preparação de amostras foi desenvolvido por WOOD *et al.* (2003) para determinação de anfetaminas em saliva. As anfetaminas foram isoladas da amostra usando uma simples precipitação com metanol e subsequente analisadas por dupla espectrometria de massa associada à cromatografia líquida (LC/MS/MS). O método possibilita a quantificação simultânea de anfetamina, metanfetamina, efedrina, 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA) e 3,4-metilenodioxietilanfetamina (MDEA).

Para determinação de canabinóides em saliva, diversos métodos foram relatados na literatura. MASEDA *et al.* (1986) detectaram delta-9-THC por cromatografia em fase gasosa com detector de captura de elétrons (GC/ECD) após obtenção do pentafluoropropil derivado do analito. Em outro método desenvolvido por THOMPSON & CONE (1987), a cromatografia líquida de alta eficiência com detector eletroquímico foi utilizada como técnica de detecção do delta-9-THC em amostras de soro, plasma e saliva. Amostras foram inicialmente desproteinizadas e submetidas à extração líquido-líquido. Entretanto, a maioria dos trabalhos publicados utiliza a espectrometria de massa associada à cromatografia em fase gasosa (GC/MS) para determinação de canabinóides em saliva. HALL *et al.* (1998) desenvolveram um método utilizando a microextração em fase sólida (SPME) e a GC/MS para determinação de quatro canabinóides (canabidiol, delta-9-THC, delta-8-THC e canabinol) em água e saliva humana. A SPME e a GC/MS também foram utilizadas no método desenvolvido por FUCCI *et al.* (2001) para a detecção de delta-9-THC, canabinol e canabidiol em saliva. Amostras provenientes de 24 usuários de maconha foram submetidas ao método proposto. Este demonstrou ser prático, rápido e eficiente e nenhuma interferência foi observada nas amostras analisadas.

Nos últimos anos, alguns métodos foram desenvolvidos possibilitando a identificação simultânea de diversos fármacos de abuso presentes em saliva. MORTIER *et al.* (2002) descreveram um método capaz de quantificar anfetaminas (anfetamina, metanfetamina, MDA, MDMA e MDEA), opiáceos (morfina e codeína), cocaína e benzoilecgonina. Os analitos foram extraídos da amostra pela técnica de extração em fase sólida (SPE) e identificados por dupla espectrometria de massa associada à cromatografia líquida (LC/MS/MS). Do mesmo modo, FUCCI, DE GIOVANNI & CHIAROTTI (2003) desenvolveram um método para determinação simultânea de alguns fármacos de abuso em saliva utilizando a microextração em fase sólida (SPME) por imersão direta na amostra ou pelo método de *headspace* (HS-SPME). Os fármacos pesquisados foram: metadona, perclorato de 2-etil-1,5-diemtil-3,3-difenilpirrolinium (EDDP), cocaína, cocaetileno, anfetamina,

metanfetamina, MDMA, MDEA, *n*-metil-1-(3,4-metilenodioxifenil)-2-butanamida (MBDB), canabidiol, delta-9-THC e canabinol. Um método também foi desenvolvido por YONAMINE *et al.* (2003), possibilitando a seriada detecção de etanol, delta-9-THC, anfetamina, metanfetamina e cocaína em uma mesma alíquota de saliva. As amostras foram submetidas a um procedimento inicial de *headspace* para determinação de etanol por cromatografia em fase gasosa com detector de ionização por chama (GC/FID). Em seguida, os outros analitos foram extraídos por SPME e identificados por GC/MS no modo de monitoramento seletivo de íons (SIM). Este foi o método aplicado na presente tese para as análises de saliva provenientes de motoristas de caminhão.

2.4.1. Microextração em fase sólida (SPME)

A microextração em fase sólida (SPME) foi introduzida em 1990 por Arthur e Pawlinszyn (LORD & PAWLINSZYN, 2000) e atualmente tem se observado um crescente aumento no interesse nessa técnica na área analítica, incluindo os campos da toxicologia, forense, clínica, bioquímica, farmacêutica e de produtos naturais. A técnica utiliza uma pequena fibra de sílica fundida coberta com um filme polimérico adaptada em um dispositivo semelhante a uma seringa (Figura 5).

Durante a extração, a fibra é exposta à amostra, pressionando-se o êmbolo do dispositivo. Analitos são adsorvidos na fibra, por contato direto. O rendimento de extração é determinado pelo fenômeno de partição do analito entre a amostra e a fase de extração (fibra). Quanto maior afinidade o analito tem pela fase de extração em relação à amostra, maior a quantidade de analito extraída (LORD & PAWLINSZYN, 2000). Em muitos casos, a quantidade absoluta extraída é muito pequena em relação à quantidade inicial presente na amostra (<1%). Isso permite que outras extrações possam ser realizadas no mesmo meio, se uma reanálise for necessária (LORD & PAWLINSZYN, 2000).

Figura 5 – Dispositivo de microextração em fase sólida (SPME). (1) Fibra revestida com filme polimérico; (2) agulha de aço; (3) corpo do dispositivo; (4) guia do êmbolo e (5) êmbolo do dispositivo.

Após um tempo pré-estabelecido de extração, a fibra é retraída e a agulha de aço do dispositivo de SPME é inserida diretamente no injetor do equipamento de cromatografia em fase gasosa. Neste compartimento, a fibra é exposta ao calor e os analitos são dessorvidos e introduzidos na coluna cromatográfica. Um *liner* de menor diâmetro interno é utilizado para uma dessorção mais rápida. Geralmente a fibra é mantida no injetor por um certo período de tempo suficiente para evitar o efeito de *carry-over*, pois a fibra é reutilizada para análises posteriores (THEODORIDIS, KOSTER & JONG, 2000). Na Figura 6 é apresentado o esquema de extração por SPME e injeção direta no equipamento de cromatografia em fase gasosa. Atualmente, interfaces foram desenvolvidas no sentido de possibilitar o acoplamento da SPME com a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a eletroforese capilar.

Figura 6 – Esquema de microextração em fase sólida (SPME). (1) Preparação do dispositivo de SPME; (2) Imersão da fibra na amostra e adsorção dos analitos à fibra; (3) Retração da fibra; (4) Introdução da agulha do dispositivo de SPME no injetor do equipamento de cromatografia em fase gasosa; (5) Exposição da fibra no interior do injetor e dessorção dos analitos e (6) Retirada do dispositivo do injetor.

Há dois tipos de extração por SPME: a direta imersão da fibra na fase aquosa e a extração por *headspace* (HS-SPME). Neste último tipo, a fibra fica exposta aos vapores da amostra em sistema fechado. Neste sistema, a

amostra é submetida a uma certa temperatura capaz de volatilizar os analitos de interesse que, por sua vez, entram em contato direto com a fibra de extração (SNOW, 2000; MILLS & WALKER, 2000). A HS-SPME foi primeiramente descrita em 1993. Esse tipo de extração é preferível para compostos voláteis e proporciona maior seletividade, maior tempo de duração da fibra e menor possibilidade de contaminação, uma vez que não há contato direto com a amostra líquida (THEODORIDIS, KOSTER & JONG, 2000; ULRICH, 2000; SNOW, 2000). Na HS-SPME, três fases estão envolvidas no processo de extração: a fibra, os vapores da amostra (*headspace*) e a matriz (amostra). Portanto, a afinidade do analito pelas três fases determina o rendimento de extração.

Qualquer que seja o tipo de extração escolhido (imersão direta da fibra ou *headspace*), as propriedades físico-químicas da fibra são essenciais para favorecer o processo de partição. As principais fibras disponíveis comercialmente são: o polidimetilsiloxano (PDMS), com diferentes espessuras do filme (7, 30 e 100 μ m); o poliácrlato (PA), com 85 μ m; o polidimetilsiloxano-divinilbenzeno (PDMS-DVB), com 60 e 65 μ m; o carboxeno-polidimetilsiloxano, com 75 μ m; o carbowax-divinilbenzeno (CW-DVB), com 75 μ m e a carbowax-resina, com 50 μ m (THEODORIDIS, KOSTER & JONG, 2000; ULRICH, 2000).

Analitos não polares têm relativa afinidade pela fase apolar PDMS. A fase constituída de poliácrlato é mais polar e pode ser utilizada para compostos mais polares como compostos fenólicos. Fases combinadas são principalmente utilizadas para a extração de compostos voláteis (THEODORIDIS, KOSTER & JONG, 2000).

A espessura do filme que recobre a fibra de SPME é selecionada de acordo com a eficiência desejada, o tempo de extração e a natureza do analito. Quanto mais delgada for a espessura do filme, mais rápido o equilíbrio de partição pode ser alcançado. Entretanto, os maiores

rendimentos de extração geralmente estão associados com a utilização de filmes mais espessos.

O rendimento também pode ser otimizado alternando-se as condições da amostra como pH, concentração de sal, temperatura e tempo de extração. A concentração de sal e o pH afetam a SPME do mesmo modo que a maioria dos procedimentos de extração líquido-líquido ou em fase sólida (SPE). O pH do meio de extração é particularmente importante para substâncias que possuem um grupamento químico dissociável dependente de pH como as substâncias de caráter ácido ou básico. O ajuste de pH é realizado com o objetivo de obter o analito na forma neutra, possibilitando maior afinidade com a fibra apolar. Um cuidado especial deve ser tomado quando a imersão direta de fibra de SPME é utilizada, uma vez que valores extremos de pH (menores que 2 ou maiores que 10) podem danificar a fibra em curto prazo (THEODORIDIS, KOSTER & JONG, 2000).

A adição de sal como NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e Na_2CO_3 também pode melhorar a eficiência de extração através do fenômeno conhecido como “*salting out*” (JUNTING, PENG & SUZUKI, 1998; THEODORIDIS, KOSTER & JONG, 2000; LORD & PAWLINSZYN, 2000; SNOW, 2000). O que se observa normalmente é que o rendimento de extração aumenta com a concentração de sal na amostra até um certo limite, seguida da diminuição da quantidade extraída com o posterior aumento na concentração de sal (LORD & PAWLINSZYN, 2000).

A eficiência também é melhorada com o aumento do tempo de permanência da fibra em contato com a amostra. Entretanto, o tempo de extração de diversos métodos desenvolvidos por SPME citados na literatura situa-se em torno de 1 a 60 minutos e é pré-estabelecido antes do sistema atingir o equilíbrio, uma vez que este pode demorar horas para ser alcançado (THEODORIDIS, KOSTER & JONG, 2000). Com relação à temperatura, geralmente observa-se que seu aumento causa diminuição do coeficiente de partição para a fase de extração (LORD & PAWLINSZYN, 2000).

Durante a fase de extração por SPME, a agitação da amostra é recomendada, pois tende a diminuir o tempo de equilíbrio. Métodos de homogeneização incluem a agitação magnética e a aplicação de ultra-som. Essa última deve ser usada com cautela pois também pode danificar a fibra, diminuindo sua vida útil (THEODORIDIS, KOSTER & JONG, 2000).

OBJETIVO

3. OBJETIVO / PLANO DE TRABALHO

O objetivo do trabalho foi avaliar a utilização da saliva em análises toxicológicas para verificar o uso de anfetaminas, cocaína, maconha e álcool por motoristas no trânsito. Os resultados da pesquisa poderão servir de parâmetro para que medidas de fiscalização e controle do abuso de drogas por motoristas possam ser adotadas por órgãos competentes.

Para obtenção deste objetivo seguiu-se o seguinte plano de trabalho:

- Desenvolvimento e validação de um método analítico para determinação seriada de etanol, anfetamina, metanfetamina, cocaína e THC em uma única amostra de saliva;
- Coleta de amostras de saliva e urina de pacientes de uma clínica de tratamento para dependentes;
- Análise das amostras de saliva dos pacientes de acordo com o método validado;
- Análise das amostras de urina de acordo com o procedimento de triagem e confirmação do Laboratório de Análises Toxicológicas/USP;
- Coleta e análise de amostras de saliva e urina provenientes de motoristas de caminhão em trânsito;
- Avaliação dos resultados obtidos nas análises de saliva e urina.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Soluções-padrão

Soluções-padrão de anfetamina, metanfetamina, delta-9-THC e seus respectivos deuterados (anfetamina-d5, metanfetamina-d5 e delta-9-THC-d3) foram obtidas da Radian International (Austin, EUA) na concentração de 1mg/mL em metanol. Soluções-padrão de cocaína e cocaína-d3 foram obtidas da Radian International na concentração de 1mg/mL em acetonitrila.

A partir dessas soluções, foram preparadas soluções de trabalho, utilizando o mesmo solvente de origem (metanol ou acetonitrila) nas concentrações de 1µg/mL de cada substância. As soluções foram armazenadas a -20°C.

Soluções-padrão de etanol (10,3% v/v) foram obtidas da Sigma (St Louis, EUA). N-propanol (99,5%) foi obtido da Aldrich (Milwaukee, EUA). Soluções de trabalho nas concentrações de 15g/L (etanol) e 0,6g/L (n-propanol) foram preparadas em água destilada.

4.1.2. Reagentes e outros materiais

Metanol, acetonitrila, ácido acético, hidróxido de sódio, bicarbonato de sódio e carbonato de potássio foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Butilcloroformato foi obtido da Aldrich (Milwaukee, EUA).

Dispositivos coletores de saliva *Salivette* contendo ácido cítrico foram obtidos da Sarstedt (Nümbrecht, Alemanha). Dispositivos de microextração em fase sólida (SPME) equipados com fibra de polidimetilsiloxano (PDMS) com espessura do filme de 100µm foram obtidos da Supelco (Bellefonte, EUA).

4.1.3. Equipamentos e acessórios

-Espectrômetro de massa modelo 5972 associado a um equipamento de cromatografia em fase gasosa modelo 6890 (GC/MS), ambos da Hewlett Packard (Little Falls, EUA), equipado com coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (Hewlett Packard) com as seguintes dimensões: 30m x 0,25mm x 0,25µm.

-Aparelho de cromatografia em fase gasosa Hewlett Packard modelo 6890, equipado com detector de ionização por chama (GC/FID) e coluna capilar de sílica fundida Poraplot-Q (Varian, Holanda) com as dimensões de 10m x 0,32mm.

-Equipamento de enzimaímunoensaio ETS Plus (Dade Behring).

-Centrífuga Universal 16A (Hettich, Alemanha).

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

4.1.4. Amostras de saliva

4.1.4.1. Amostras de referência

4.1.4.1.1. Amostras de referência negativa

Amostras de saliva de referência negativa foram obtidas de voluntários que não fizeram uso das substâncias pesquisadas: etanol, anfetamina, metanfetamina, cocaína e canabinóides.

4.1.4.1.2. Amostras de referência positiva

Para o estudo de validação do método foram utilizadas como referência positiva amostras de saliva de referência negativa adicionadas dos padrões de etanol, anfetamina, metanfetamina, cocaína e THC.

4.1.4.2. Amostras provenientes dos grupos estudados

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (Anexo A). Após o desenvolvimento e validação do método para determinação de etanol, anfetamina, metanfetamina, cocaína e delta-9-THC em saliva, as amostras foram coletadas de dois grupos:

Grupo 1: As amostras de urina e saliva foram obtidas de voluntários acima de 21 anos, de ambos os sexos, pacientes de uma clínica de tratamento de dependência de drogas de abuso (n=12). A coleta foi realizada no momento da admissão na clínica.

Grupo 2: As amostras de urina e saliva foram coletadas aleatoriamente em rodovias de São Paulo (Rod. Raposo Tavares, Rod. Castelo Branco e Rod.

Sen. José Ermírio de Moraes) de voluntários motoristas de caminhão, com idade acima de 21 anos (n=561).

Amostras de 195 motoristas foram coletadas em abril de 2002 na Rodovia Raposo Tavares Km 111, sentido interior-capital. Amostras de 366 motoristas foram coletadas de forma sistemática de janeiro a dezembro de 2003 em diversos locais, sendo aproximadamente 30 motoristas por mês, conforme a Tabela 7.

Tabela 7 – Local da coleta de amostras de motoristas de caminhão realizada no período de janeiro a dezembro de 2003.

Mês	Local de coleta (base operacional de balança)
Janeiro	Km 60 da Rod. Castelo Branco, sentido capital-interior
Fevereiro	Km 108 da Rod. Raposo Tavares, sentido capital-interior
Março	Km 8,5 da Rod. Sen. José Ermírio de Moraes, sentido Itu
Abril	Km 39 da Rod. Castelo Branco, sentido interior-capital
Maio	Km 111 da Rod. Raposo Tavares, sentido interior-capital
Junho	Km 8,5 da Rod. Sen. José Ermírio de Moraes, sentido Sorocaba
Julho	Km 60 da Rod. Castelo Branco, sentido capital-interior
Agosto	Km 108 da Rod. Castelo Branco, sentido capital-interior
Setembro	Km 8,5 da Rod. Sen. José Ermírio de Moraes, sentido Itu
Outubro	Km 39 da Rod. Castelo Branco, sentido interior-capital
Novembro	Km 111 da Rod. Raposo Tavares, sentido interior-capital
Dezembro	Km 8,5 da Rod. Sen. José Ermírio de Moraes, sentido Sorocaba

4.2. Métodos

4.2.1. Aplicação do questionário

Voluntários do Grupo 1 e do Grupo 2 da pesquisa responderam questionário visando a obtenção de dados pessoais e outras informações como relato de uso recente de álcool e drogas, relato de acidentes e propriedade do veículo. Somente a parte 1 do questionário (ANEXO B) foi aplicada aos voluntários do Grupo 1, enquanto voluntários de Grupo 2 responderam as partes 1 e 2. Ambos assinaram termo de consentimento, cujo modelo está no Anexo C.

4.2.2. Coleta das amostras

As coletas das amostras de urina e saliva dos Grupos 1 e 2 foram realizadas sob vigilância de um profissional da saúde que foi responsável pela coleta (enfermeiro da equipe da Viaoeste S/A). As amostras foram acondicionadas em frascos e dispositivos (*Salivette*) numerados, mantidos sob refrigeração (4°C) e enviados para o Laboratório de Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. As instruções e procedimentos para a realização da coleta de urina e saliva estão apresentados no Anexo D.

4.2.3. Análise toxicológica em saliva

4.2.3.1. Padronização de um método para determinação de etanol, anfetamina, metanfetamina, cocaína e delta-9-THC em amostras de saliva

Um método foi desenvolvido e validado para determinação de etanol, anfetamina, metanfetamina, cocaína e delta-9-THC em uma mesma alíquota de saliva (YONAMINE *et al.*, 2003).

4.2.3.1.1. Extração dos analitos da saliva

O dispositivo coletor de saliva (*Salivette*) foi centrifugado a 700g durante 10 minutos para obtenção da amostra líquida em seu reservatório. Inicialmente, um procedimento de *headspace* foi realizado para extração de etanol da saliva. Uma alíquota de 1mL de saliva foi transferida para um *vial* de 10mL juntamente com 1ml de solução de *n*-propanol 0,6g/L (padrão interno). O *vial* foi lacrado e incubado a 70°C durante 30 minutos. Após esse período, uma alíquota de 250µL do vapor foi retirada com auxílio de uma seringa *gas-tight* e injetada diretamente no GC/FID. A solução de saliva remanescente foi transferida para outro *vial* de 4mL e adicionada com os padrões internos deuterados de anfetamina, metanfetamina e cocaína (50ng de cada) para realização da microextração em fase sólida (SPME).

As anfetaminas foram submetidas a derivação direta em solução aquosa através da adição de 2µL de butilcloroformato e 20mg de $\text{NaHCO}_3/\text{K}_2\text{CO}_3$ (2:1). As anfetaminas derivadas e a cocaína foram extraídas por SPME através da imersão da fibra na solução durante 20 minutos sob agitação magnética. Após o tempo de extração desejado, o dispositivo de SPME foi transferido para o injetor do GC/MS, permanecendo durante 15 minutos.

Para a extração do delta-9-THC retido no algodão do dispositivo *Salivette*, 2mL de solução NaOH foram colocados em contato com esse algodão para serem absorvidos. Após 10 minutos, o dispositivo *Salivette* foi centrifugado novamente a 700g por 10 minutos e a fase líquida foi transferida para um *vial* de 4ml e acidificado com 0,5mL de ácido acético glacial. O padrão interno deuterado delta-9-THC-d3 (50ng) foi adicionado à solução. O THC foi extraído por SPME através da imersão da fibra na solução durante 20 minutos sob agitação magnética. Após o tempo de extração desejado, o dispositivo de SPME foi transferido para o injetor do GC/MS, permanecendo durante 15 minutos. Um fluxograma da preparação das amostras de saliva pode ser visualizado na Figura 7.

4.2.3.1.2. Condições cromatográficas

Para análise de etanol em saliva, um equipamento de cromatografia em fase gasosa, equipado com detector de ionização por chama (GC/FID), foi utilizado. As seguintes condições foram utilizadas:

- Gás de arraste: Hidrogênio, a um fluxo de 2,6mL/min
- Temperatura do injetor: 250°C
- Temperatura do detector: 250°C
- Temperatura do Forno: 130°C (modo de operação isotérmica)

Para a análise de anfetamina, metanfetamina, cocaína e delta-9-THC, um espectrômetro de massa associado a um equipamento de cromatografia em fase gasosa (GC/MS) foi utilizado. As seguintes condições foram selecionadas para análise de anfetamina, metanfetamina e cocaína:

- Gás de arraste: Hélio, a um fluxo constante de 0,6mL/min
- Temperatura do injetor: 250°C

- Temperatura da interface: 250°C

- Programação da Temperatura do Forno: 150°C (2min); 15°C/min até 220°C; 20°C/min até 250°C (5min)

- Modo de operação do espectrômetro de massa: impacto de elétrons e monitoramento seletivo de íons (SIM). Os seguintes íons foram selecionados: anfetamina (144, 145 e 162); anfetamina-d5 (148 e 167); metanfetamina (158, 159 e 102); metanfetamina-d5 (162 e 106); cocaína (182, 272 e 303) e cocaína-d3 (185 e 306). Os íons sublinhados foram utilizados para quantificação das substâncias pesquisadas.

Para a análise de delta-9-THC, as seguintes condições de operação foram selecionadas:

- Gás de arraste: Hélio, a um fluxo constante de 0,6mL/min

- Temperatura do injetor: 280°C

- Temperatura da interface: 280°C

- Programação da Temperatura do Forno: 150°C (2min); 15°C/min até 250°C (5min)

- Modo de operação do espectrômetro de massa: impacto de elétrons e monitoramento seletivo de íons (SIM). Os seguintes íons foram selecionados: delta-9-THC (231, 299 e 314) e delta-9-THC-d3 (302 e 317). Os íons sublinhados foram utilizados para quantificação.

Figura 7 – Fluxograma do procedimento de preparação de amostras (saliva) para determinação de etanol, anfetamina, metanfetamina, cocaína e delta-9-THC.

4.2.3.2. Validação do método

A validação do método foi realizada estabelecendo-se os valores de recuperação, linearidade, precisão intra e interensaio, limite de detecção, limite de quantificação, estabilidade dos analitos na matriz e ensaio *in vivo*.

4.2.3.2.1. Recuperação

O estudo de recuperação de anfetamina, metanfetamina e cocaína foi conduzido levando-se em consideração as possíveis perdas de analitos devido à decomposição térmica, à volatilização após o procedimento de *headspace* e/ou à retenção dos fármacos no algodão do dispositivo coletor de saliva. O estudo de recuperação do delta-9-THC foi conduzido levando-se em consideração a possível perda de analito retido no algodão do dispositivo.

Para ambos os estudos, dois conjuntos de amostras de saliva de diferentes concentrações foram analisados. No conjunto A, consistindo de três concentrações das substâncias pesquisadas (10, 50 e 75ng/mL), analitos foram adicionados em 2mL de saliva absorvida no algodão do dispositivo e analisados de acordo com o método descrito na seções **4.2.3.1.1.** e **4.2.3.1.2.** em seis replicatas para cada concentração. No conjunto B, também consistindo de seis replicatas para cada concentração (10, 50 e 75ng/mL), os padrões dos analitos foram adicionados às amostras imediatamente antes do procedimento de SPME. A recuperação absoluta foi avaliada pela resposta média obtida no conjunto A em relação à resposta média obtida no conjunto B.

4.2.3.2.2. Linearidade

O estudo de linearidade foi realizado pela análise das amostras de saliva submetidas ao método em triplicata nas seguintes concentrações: etanol (0,01; 0,06; 0,15; 0,60; 1,50 e 3,0g/L); anfetamina, metanfetamina, cocaína e delta-9-THC (5,0; 20; 40; 60; 80 e 100ng/mL). Curvas de calibração foram construídas e os coeficientes de correlação foram calculados.

4.2.3.2.3. Precisão intra e interensaio

A precisão intra e interensaio foi determinada indiretamente pelo cálculo de imprecisão através da determinação do coeficiente de variação do método (CV). O estudo foi conduzido analisando-se amostras de saliva em três dias diferentes, contendo as seguintes concentrações: para etanol (0,03; 0,30 e 1,2g/L) e para anfetamina, metanfetamina, cocaína e delta-9-THC (10; 50 e 75ng/mL). As análises foram realizadas em sextuplicata para cada concentração.

4.2.3.2.4. Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) do método foram determinados pelo método empírico que consiste em analisar uma série de amostras de saliva contendo quantidades decrescentes do analito (AMBRUSTER, TILLMAN & HUBBS, 1994). O limite de detecção foi a menor concentração que apresentou um coeficiente de variação que não excedeu 20% e o limite de quantificação a menor concentração que apresentou um coeficiente de variação que não excedeu 10%. Para as análises por GC/MS, o LOD e o LOQ deveriam ainda satisfazer um critério de aceitação de qualificação pré-determinado (tempos de retenção com

variação menor que 1% e razão de íons com variação menor que 20%, quando comparados com os padrões dos analitos) (PEAT & DAVIS., 1998).

4.2.3.2.5. Estabilidade dos analitos na matriz

Amostras de saliva contendo etanol nas concentrações de 0,03; 0,30 e 1,2g/L e anfetamina, metanfetamina, cocaína e delta-9-THC nas concentrações de 10; 50 e 75ng/mL foram armazenadas em alíquotas de 2mL, absorvidas em dispositivos *Salivette* e analisadas de acordo com o método descrito em 4.2.3.1.1 e 4.2.3.1.2 em três replicatas para cada concentração.

A estabilidade dos analitos em saliva foi avaliada por meio da comparação da resposta obtida no tempo zero com a resposta obtida após o período de armazenamento (48 e 96 horas) em condições de temperatura ambiente, a 4°C (geladeira) e a -20°C (*freezer*).

4.2.3.2.6. Correlação com situação clínica

Para comprovar a eficiência do método, amostras de saliva coletadas de pacientes (n=12) de uma clínica de tratamento com idades entre 22 e 52 anos (Grupo 1, descrito em 4.1.4.2), que relataram consumo de álcool e/ou drogas, foram analisadas para verificação da presença de etanol, anfetamina, metanfetamina, cocaína e delta-9-THC.

4.2.4. Análise toxicológica em urina

As análises toxicológicas em urina foram realizadas de acordo com procedimento de rotina utilizado no Laboratório de Análises Toxicológicas/

USP em Programas de Controle e Prevenção do Uso de Drogas no Ambiente de Trabalho, descrito a seguir:

4.2.4.1. Análise de triagem por enzimaímunoensaio (EMIT)

As amostras de urina foram submetidas a um procedimento inicial de triagem por enzimaímunoensaio conforme recomendações do fabricante (Dade Behring). Os seguintes valores de referência (*cut off*) foram adotados na fase de triagem: etanol (0,1g/L - limite de detecção do método), anfetamina/metanfetamina (300ng/mL), produtos de biotransformação da cocaína (300ng/mL) e canabinóides (50ng/mL).

4.2.4.2. Análise de confirmação

Amostras de urina que apresentaram resultado positivo na fase de triagem foram submetidas à confirmação, conforme descrito a seguir. Os seguintes valores de referência foram adotados na fase de confirmação: anfetamina/metanfetamina (200ng/mL), benzoilecgonina (150ng/mL) e ácido 11-nor-delta-9-tetraidrocanabinol carboxílico (15ng/mL). O etanol foi quantificado na urina.

4.2.4.2.1. Análise de confirmação de etanol por GC/FID

A presença de etanol na urina foi confirmada através do método de *headspace*, semelhante ao descrito anteriormente para análise em saliva. Em um *vial* de 10mL, uma alíquota de 1mL de urina foi adicionada juntamente com 1ml de solução de *n*-propanol 0,6g/L (padrão interno). O *vial* foi lacrado e incubado a 70°C durante 30 minutos. Após esse período, uma

alíquota de 250 μ L do vapor foi retirada com auxílio de uma seringa *gas-tight* e injetada diretamente no GC/FID.

4.2.4.2.2. Análise de confirmação de anfetamina/metanfetamina por GC/MS

As amostras de urina que apresentaram resultado positivo para anfetamina/ metanfetamina na fase de triagem foram submetidas ao método modificado de PFLEGER, MAURER & WEBER (1992). Uma alíquota de 2,5mL de urina foi adicionada com 1g de cloreto de sódio e 0,5mL de solução de hidróxido de potássio 5M. Em seguida, os analitos foram extraídos com 3mL de éter etílico recém destilado através de agitação (10 minutos) e centrifugação a 500g por 5 minutos. A fase orgânica foi separada e evaporada sob fluxo de nitrogênio à temperatura ambiente. O extrato foi submetido à derivação com 40 μ L de acetato de etila e 40 μ L de anidrido trifluoroacético durante 15 minutos a 60°C. O extrato foi evaporado novamente sob fluxo de nitrogênio e ressuspendido com 50 μ L de acetato de etila. Do extrato final, 1 μ L foi injetado no GC/MS. Os seguintes fragmentos foram selecionados para identificação das substâncias: anfetamina (140, 118 e 115) e metanfetamina (154, 110 e 118).

4.2.4.2.3. Análise de confirmação de benzoilecgonina por GC/MS

As amostras de urina que apresentaram resultado positivo para produtos de biotransformação da cocaína na fase de triagem foram submetidas a um procedimento de confirmação conforme descrito por YONAMINE & SILVA (2002). Uma alíquota de 2,5mL da amostra foi adicionada com 2,5ml de água deionizada e 2mL de tampão fosfato 0,1M pH 6,0. As colunas de extração em fase sólida foram condicionadas com 2mL

de metanol seguidos de 2mL de tampão fosfato 0,1M. O vácuo foi desligado assim que a solução tampão alcançou o topo da camada do material da coluna. Imediatamente, as amostras foram aplicadas sob fluxo de 1mL/min, aproximadamente. A lavagem foi realizada aplicando-se 2 volumes de 3mL de água deionizada e 3 mL de ácido clorídrico 0,1M. Em seguida, as colunas foram submetidas à secagem com vácuo durante 5 minutos e nova lavagem foi realizada, passando-se 3 volumes de 3mL de metanol. A eluição foi feita com 2mL de uma solução de diclorometano/isopropanol/amônia na proporção de 80:20:2. O eluato foi coletado em frasco de derivação silanizado e em seguida evaporado sob fluxo de nitrogênio a 40°C. A benzoilecgonina presente foi metilada com a adição de 100µL da solução de diazometano transformando-se em cocaína. Em seguida, o diazometano foi evaporado novamente sob fluxo de nitrogênio a 40°C e o extrato ressuspensionado com 100µL de metanol. Dessa solução, 1µL foi injetado no GC/MS. Os fragmentos selecionados para identificação da cocaína foram: 82, 182 e 303.

4.2.4.2.4. Análise de confirmação do ácido 11-nor-delta-9-tetraidrocanabinol carboxílico por GC/MS

Amostras de urina que apresentaram resultado positivo para canabinóides na fase de triagem foram submetidas à análise confirmatória por espectrometria de massa associada à cromatografia em fase gasosa (GC/MS). A extração do analito foi realizada conforme descrito por MEATHERALL & GARRIOT (1988). Um alíquota de 5mL de amostra foi adicionada com 0,5mL de solução de hidróxido de sódio 0,1M e incubada a 56°C em banho de água quente para hidrólise. Em seguida, 5mL de *n*-hexano foi adicionado e o sistema foi agitado durante 15 minutos e centrifugado a 500g por 5 minutos. A fase orgânica foi separada e evaporada sob fluxo de nitrogênio a 40°C. O extrato foi submetido à derivação com 50µL de *bis*-trimetilsililtrifluoroacetamida (BSTFA) com 1% de

trimetilclorosilano (TMCS), incubado a 90°C durante 15 minutos. Do extrato final, 1µL foi injetado no GC/MS. Os seguintes fragmentos foram selecionados para identificação do ácido 11-nor-tetraidrocanabinol carboxílico: 371, 473 e 488 (MULÉ & CASELLA, 1988).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

Nessa seção são apresentados, inicialmente, resultados da validação do método analítico desenvolvido para determinação de etanol, anfetamina, metanfetamina, cocaína e delta-9-THC em saliva, além de cromatogramas característicos da análise desses compostos. Os parâmetros de validação estudados (recuperação, linearidade, precisão intra e interensaio, limite de detecção e limite de quantificação, estabilidade e ensaio *in vivo*) asseguram a qualidade do trabalho analítico e, conseqüentemente, a obtenção de resultados laboratoriais confiáveis.

Em seguida, são apresentados os resultados da aplicação prática do método em amostras de 561 motoristas de caminhão coletadas em rodovias de São Paulo e os dados pessoais desses indivíduos obtidos através da aplicação de questionário.

5.1. Cromatogramas característicos da análise de etanol, anfetamina, metanfetamina, cocaína e delta-9-THC em saliva

Na Figura 8 é apresentado um perfil cromatográfico (GC/FID) obtido com a análise de uma amostra de saliva adicionada com etanol na concentração de 0,6g/L submetida ao método proposto. Na Figura 9 é apresentado um perfil cromatográfico (GC/MS) obtido com a análise de uma amostra de saliva adicionada com anfetamina, metanfetamina e cocaína na concentração de 50ng/mL cada. Na Figura 10 um cromatograma (GC/MS)

obtido com a análise de saliva adicionada com 50ng/mL de delta-9-THC pode ser visualizado.

Figura 8 – Cromatograma obtido com a análise por *headspace* e GC/FID de saliva adicionada com etanol na concentração de 0,6g/L. (A) etanol, (B) n-propanol.

Figura 9 – Cromatograma obtido com a análise por SPME e GC/MS de saliva adicionada com anfetamina, metanfetamina e cocaína na concentração de 50ng/mL. (A) anfetamina, (B) metanfetamina e (C) cocaína.

Figura 10 – Cromatograma obtido com a análise por SPME e GC/MS de saliva adicionada com delta-9-THC na concentração de 50ng/mL. (A) delta-9-THC.

5.2. Resultados da validação do método para determinação de etanol, anfetamina, metanfetamina, cocaína e delta-9-THC em saliva

5.2.1. Recuperação

Na Tabela 8 são apresentados os valores de recuperação (%) obtidos para análise de anfetamina, metanfetamina, cocaína e delta-9-THC em saliva.

TABELA 8 – Valores de recuperação obtidos com a aplicação do método proposto em amostras de saliva adicionadas com anfetamina, metanfetamina e cocaína em três concentrações (10, 50 e 75ng/mL).

Amostras	Recuperação (%)			
	Anfetamina	Metanfetamina	Cocaína	Delta-9-THC
CQ1	104,4	90,5	93,5	28,7
CQ2	82,5	86,3	83,2	51,7
CQ3	68,2	75,4	73,4	57,7

CQ = amostras de controle de qualidade, CQ1=10ng/mL; CQ2=50ng/mL e CQ3=75ng/mL.

5.2.2. Linearidade

O método demonstrou ser linear na faixa de concentração estudada para todos os analitos. Curvas de calibração foram obtidas de 0,01g/L a 3,0g/L para o etanol e de 5,0 a 100ng/mL para os outros fármacos de abuso. As equações de regressão linear e os coeficientes de correlação obtidos foram: etanol ($y = 0,7724x + 0,0037$, $r^2 = 0,999$); anfetamina ($y = 0,0172x + 0,0227$, $r^2 = 0,998$); metanfetamina ($y = 0,016x + 0,0287$, $r^2 = 0,998$); cocaína ($y = 0,0167x + 0,0095$, $r^2 = 0,998$) e delta-9-THC ($y = 0,0692x + 0,0823$; $r^2 = 0,996$).

5.2.3. Precisão intra e interensaio

Nas Tabelas 9 e 10 são apresentados os valores de precisão intra e intraensaio, definido pelo coeficiente de variação do método (CV), obtidos para análise de etanol, anfetamina, metanfetamina, cocaína e delta-9-THC em saliva.

TABELA 9 – Valores de precisão intra-ensaio obtidos com a aplicação do método proposto em amostras de saliva adicionadas com etanol, anfetamina, metanfetamina, cocaína e delta-9-THC.

Precisão intra-ensaio (CV%)					
Amostras	ETOH	ANF	MET	COC	THC
CQ1	7,7	4,0	4,0	5,2	5,1
CQ2	2,8	2,4	4,6	6,3	3,5
CQ3	1,7	5,1	1,6	3,9	2,4

ETOH = etanol, ANF = anfetamina, MET = metanfetamina, COC = cocaína, THC = delta-9-tetraidrocanabinol, CQ = amostras de controle de qualidade. Para análise de etanol: CQ1 = 0,03g/L; CQ2 = 0,3g/L e CQ3 = 1,2g/L; para outros fármacos: CQ1 = 10ng/mL; CQ2 = 50ng/mL e CQ3 = 75ng/mL.

TABELA 10 – Valores de precisão interensaio obtidos com a aplicação do método proposto em amostras de saliva adicionadas com etanol, anfetamina, metanfetamina, cocaína e delta-9-THC.

Precisão interensaio (CV%)					
Amostras	ETOH	ANF	MET	COC	THC
CQ1	3,2	1,0	4,8	2,7	2,0
CQ2	4,0	2,7	1,5	6,3	5,4
CQ3	3,1	5,2	3,3	2,6	5,0

ETOH = etanol, ANF = anfetamina, MET = metanfetamina, COC = cocaína, THC = delta-9-tetraidrocanabinol, CQ = amostras de controle de qualidade. Para análise de etanol: CQ1 = 0,03g/L; CQ2 = 0,3g/L e CQ3 = 1,2g/L; para outros fármacos: CQ1 = 10ng/mL; CQ2 = 50ng/mL e CQ3 = 75ng/mL.

5.2.4. Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) dos analitos obtidos para o método proposto para determinação de etanol e fármacos de abuso em saliva estão apresentados na Tabela 11.

TABELA 11 – Valores de limite de detecção e limite de quantificação de etanol, anfetamina, metanfetamina, cocaína e delta-9-THC para o método proposto.

	ETOH	ANF	MET	COC	THC
LOD	0,006g/L	5,0ng/mL	0,5ng/mL	5,0ng/mL	3,0ng/mL
LOQ	0,010g/L	5,0ng/mL	0,5ng/mL	5,0ng/mL	5,0ng/mL

ETOH = etanol, ANF = anfetamina, MET = metanfetamina, COC = cocaína, THC = delta-9-tetraidrocanabinol, LOD = limite de detecção, LOQ = limite de quantificação.

5.2.5. Estabilidade dos analitos na matriz

A estabilidade dos analitos na matriz foi avaliada pela diferença (%) encontrada na resposta obtida nas condições de armazenamento (temperatura ambiente, 4°C e -20°C) e período estipulados (48 e 96 horas), comparada com a resposta obtida no tempo zero. Os resultados são apresentados na Tabela 12.

Os resultados demonstram que não houve perda significativa de analitos nas condições estudadas (diferença < 20%).

Tabela 12 – Estudo da estabilidade do etanol, anfetamina, metanfetamina, cocaína e delta-9-THC em amostra de saliva em condições de temperatura ambiente, a 4°C (geladeira) e a -20°C (*freezer*) em período de 48 e 96 horas.

	Diferença (%)					
	Temp. ambiente		Geladeira (4°C)		Freezer (-20°C)	
	48h	96h	48h	96h	48h	96h
Etanol						
CQ1	-9,6	+3,2	+9,7	+9,7	0,0	-6,4
CQ2	-2,9	+9,4	+8,8	+11,1	-6,1	-2,0
CQ3	-4,3	-7,1	+3,3	+5,5	-9,6	-6,8
Anfetamina						
CQ1	-6,8	+9,2	-2,8	+6,3	-12,6	-9,2
CQ2	-3,5	+5,0	-8,7	+5,5	-0,4	+5,4
CQ3	+2,1	+5,9	-5,1	-1,5	-0,4	+3,9
Metanfetamina						
CQ1	+5,0	-3,9	+3,2	+6,4	-6,1	-0,7
CQ2	-13,1	+1,9	-8,5	-5,4	-2,9	-6,3
CQ3	-1,6	+3,7	+4,4	+3,7	-8,4	-1,8
Cocaína						
CQ1	-0,6	+2,8	+7,3	+5,1	+4,5	+5,6
CQ2	-3,1	+2,1	-2,6	+5,2	+2,6	+4,8
CQ3	+2,4	+5,7	+1,4	+2,8	+4,3	-1,2
Delta-9-THC						
CQ1	-10,7	-8,6	-6,4	-12,8	-0,5	+0,7
CQ2	-2,8	-4,1	+6,6	+15,3	+3,3	+3,3
CQ3	+2,6	-1,5	+7,9	+2,3	+2,3	-3,3

CQ = Amostras de controle de qualidade; para análise de etanol: CQ1 = 0,03g/L; CQ2 = 0,3g/L e CQ3 = 1,2g/L; para outros fármacos: CQ1 = 10ng/mL; CQ2 = 50ng/mL e CQ3 = 75ng/mL.

5.2.6. Correlação com situação clínica

Os resultados das análises toxicológicas em urina e saliva, o relato de uso de drogas pelo paciente e o tempo decorrido entre o último uso e a coleta estão apresentados na Tabela 13.

TABELA 13 - Resultados das análises toxicológicas em urina e saliva de pacientes de uma clínica de tratamento de dependência de drogas, seu relato de uso e tempo decorrido entre o último uso e a coleta das amostras.

Identificação da amostra	Relato de uso	Tempo decorrido	Resultado (concentração)*	
			Urina	Saliva
F27433	ETOH COC THC	16 horas	COC THC	NEG
F27435	ETOH COC	5 horas	COC	COC (69ng/mL)
F27432	ETOH	8 horas	NEG	NEG
F27434	ETOH	Urina-48 hs Saliva-3 hs	NEG	ETOH (0,28g/L)
F27436	ETOH COC THC	14 horas	THC	NEG
F27440	ETOH COC	COC-48 hs ETOH-24 hs	COC	COC (64ng/mL)
F27441	ETOH	20 horas	ETOH (0,28g/L)	NEG
F27439	ETOH	6 horas	ETOH (0,64g/L)	ETOH (2,7g/L)
F27438	ETOH	7 horas	NEG	NEG
F27437	ETOH COC	168 hs	COC	NEG
F27866	ETOH	Não informado	ETOH (4,80g/L)	ETOH (2,63g/L)
F27868	ETOH	12 horas	ETOH (0,20g/L)	ETOH (0,42g/L)

ETOH = etanol; COC = cocaína, THC = delta-9-tetraidrocanabinol, N/C = não coletada

* Amostras de urina foram consideradas positivas se a concentração estivesse acima do valor de referência adotado (*cut off*). Amostras de saliva foram consideradas positivas se a concentração estivesse acima do limite de quantificação do método.

5.3. Dados gerais da população estudada do Grupo 2 (motoristas de caminhão)

Os dados gerais dos motoristas de caminhão (n=561) foram obtidos através da aplicação de questionário (Anexo A), momento antes da coleta das amostras e são apresentados a seguir. Todos os motoristas são do sexo masculino.

5.3.1. Idade dos motoristas

Na Tabela 14 é apresentada a distribuição de idades da população estudada. Um motorista não informou a idade. Essa distribuição pode ser visualizada graficamente na Figura 11.

TABELA 14 – Dados de distribuição de idades dos motoristas de caminhão (Grupo 2).

Idade (anos)	21-30	31-40	41-50	51-60	61-70	71-80	Total
Quantidade	159	150	179	58	12	2	560
Porcentagem	28,39%	26,79%	31,96%	10,36%	2,14%	0,36%	100%

Figura 11- Gráfico de distribuição de idades da população estudada do Grupo 2 (motoristas de caminhão).

5.3.2. Grau de escolaridade dos motoristas

Na Tabela 15 é apresentada a distribuição de motoristas de caminhão de acordo com a escolaridade. Quatro motoristas não informaram seu grau de escolaridade. Essa distribuição pode ser visualizada graficamente na Figura 12.

TABELA 15 – Dados de distribuição dos motoristas de caminhão (Grupo 2) de acordo com o grau de escolaridade.

Grau de escolaridade	Alfabetizado	Fundamental	Médio	Superior	Total
Quantidade	143	299	110	5	557
Porcentagem	25,67%	53,68%	19,75%	0,90%	100%

Figura 12 - Gráfico de distribuição dos motoristas de caminhão de acordo com seu grau de escolaridade.

5.3.3. Estado civil dos motoristas

Na Tabela 16 é apresentada a distribuição de motoristas de caminhão de acordo com seu estado civil. Quatro motoristas não forneceram essa informação. Essa distribuição pode ser visualizada graficamente na Figura 13.

TABELA 16 – Dados de distribuição dos motoristas de caminhão (Grupo 2) de acordo com seu estado civil.

Estado civil	Casado	Solteiro	Separado	Amasiado	Viúvo	Total
Quantidade	401	90	27	34	5	557
Porcentagem	71,99%	16,16%	4,86%	6,10%	0,90%	100%

Figura 13 - Gráfico de distribuição dos motoristas de caminhão de acordo com seu estado civil.

5.3.4. Distribuição dos motoristas de acordo com acidentes que sofreram na rodovia

Do total de motoristas participantes da pesquisa que responderam o questionário ($n=557$), 120 (21,54%) relataram que já haviam sofrido acidente no trânsito. Outros 437 (78,46%) relataram que nunca haviam sofrido acidente. Quatro motoristas não forneceram essa informação.

5.3.5. Distribuição dos motoristas de acordo com a propriedade do veículo

Do total de motoristas participantes da pesquisa que responderam o questionário ($n=557$), 150 (26,93%) relataram que eram proprietários do próprio veículo. Outros 407 (73,07%) dirigiam caminhão da empresa onde trabalhavam. Quatro motoristas não forneceram essa informação.

5.4. Resultados obtidos com a análise toxicológica de urina e saliva provenientes de motoristas de caminhão

Do total de amostras de urina analisadas (n=558), 39 (7,0%) foram positivas para a presença das substâncias pesquisadas, sendo 16 para etanol, 7 para anfetamina, 3 para benzoilecgonina (produto de biotransformação de cocaína), 9 para o ácido 11-nor-delta-9-tetraidrocanabinol carboxílico (produto de biotransformação do delta-9-THC) e 4 para benzoilecgonina e ácido 11-nor-delta-9-tetraidrocanabinol carboxílico. Três motoristas não coletaram amostras de urina. Em relação às amostras de saliva (n=559), 17 (3,0%) apresentaram resultado positivo, sendo 8 para etanol, 4 para anfetamina, 2 para cocaína, 2 para delta-9-THC e 1 para cocaína e delta-9-THC. Dois motoristas não coletaram amostras de saliva. Nenhuma amostra (saliva ou urina) acusou a presença de metanfetamina. Na Tabela 17 são apresentados esses resultados e o relato de uso dos motoristas de caminhão.

TABELA 17 – Resultados das análises toxicológicas em urina e saliva de motoristas de caminhão que apresentaram resultado positivo para as substâncias pesquisadas, seu relato de uso e tempo decorrido entre o último uso e a coleta das amostras.

Identificação da amostra	Relato de uso	Tempo decorrido	Resultado (concentração)*	
			Urina	Saliva
F23212	-	-	THC	NEG
F23231	-	-	ANF	ANF (29ng/mL)
F23238	-	-	THC	NEG
F23246	-	-	COC	COC (5,8ng/mL)
F23249	ETOH	1 dia	THC COC	COC (8,6ng/mL)
F23286	-	-	ANF	NEG
F23297	ETOH	2 dias	THC	NEG
F23304	ETOH	16 horas	ETOH (0,17g/L)	ETOH (0,06g/L)
F23328	-	-	ANF	NEG
F23355	-	-	THC	NEG
F23365	ETOH	12 horas	ETOH (0,24g/L)	ETOH (0,13g/L)
F23369	ETOH	4 horas	ETOH (1,48g/L)	ETOH (0,97g/L)
F23379	ETOH	4 horas	ETOH (0,72g/L)	ETOH (0,60g/L)
F23408	-	-	THC	NEG
F23409	-	-	THC	NEG
F25251	-	-	ANF	NEG
F25268	THC COC	0,5 hora	THC COC	THC (5,0ng/mL)
F25271	ETOH	14 horas	ETOH (0,16g/L)	ETOH (0,33g/L)
F25643	-	-	ANF	ANF (33ng/mL)
F25802	ETOH	20 horas	ETOH (2,06g/L)	ETOH (1,29g/L)
F26443	-	-	ETOH (0,19g/L)	NEG
F26455	-	-	THC	NEG
F25295	ETOH	16 horas	ETOH (1,06g/L)	ETOH (0,61g/L)
F25309	ETOH	15 horas	ETOH (0,21g/L)	NEG
F25325	ETOH	1 dia	ETOH (0,22g/L)	NEG
F25343	ETOH	1 dia	ETOH (0,22g/L)	NEG
F25805	-	-	ETOH (0,42g/L)	NEG
F26872	ETOH	4 dias	COC	NEG
F26881	ETOH	1,5 hora	ETOH (0,11g/L)	NEG
F26885	ETOH	18 horas	THC	NEG
F26886	ETOH	1,5 hora	ETOH (0,20g/L)	NEG
F26615	-	-	ETOH (0,57g/L)	ETOH (0,51g/L)
F27583	-	-	THC	NEG
F27590	THC	12 horas	THC	NEG
F27858	-	-	THC COC	THC (60,2ng/mL) COC (6,6ng/mL)
F27918	ETOH	12 horas	ETOH (0,24g/L)	NEG
F27923	-	-	ANF	ANF (62,7ng/mL)
F27927	-	-	ANF	ANF (23,4ng/mL)
F27901	ETOH	15 horas	THC COC	THC (5,8ng/mL)

ANF = anfetamina; THC = delta-9-tetraidrocanabinol, COC = cocaína, ETOH = etanol, NEG = resultado negativo.

* Amostras de urina foram consideradas positivas se a concentração estivesse acima do valor de referência adotado (*cut off*). Amostras de saliva foram consideradas positivas se a concentração estivesse acima do limite de quantificação do método.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Segundo dados do Departamento Nacional de Trânsito, o número de acidentes que ocorrem no trânsito brasileiro é alarmante: mais de 360.000 veículos estiveram envolvidos em acidentes no Brasil, ocasionando 374.557 vítimas não-fatais e 20.039 vítimas fatais em 2001 (DEPARTAMENTO NACIONAL DE TRÂNSITO, 2001). As causas desse fenômeno podem ser as mais diversas, incluindo a má conservação de ruas, avenidas e rodovias, a má conservação de veículos, a pesada carga de trabalho na qual muitos motoristas profissionais são submetidos e a imprudência e inabilidade de muitos motoristas brasileiros. Outro fator determinante para a ocorrência de acidentes pode ser o uso de álcool e outras substâncias psicoativas pelos condutores de veículos.

Os efeitos negativos que essas substâncias exercem sobre o desempenho psicomotor e velocidade de reação de indivíduos usuários são incontestáveis. Entretanto, a real dimensão e contribuição do uso de drogas para a ocorrência de acidentes nas ruas e rodovias brasileiras ainda são desconhecidas. Os dados existentes se referem ao uso de álcool no trânsito urbano. Por outro lado, quando o tema é a prevenção ou a monitorização do uso de álcool e drogas por motoristas, a situação é ainda mais complicada. Pouco tem sido realizado neste sentido, a não ser algumas campanhas de conscientização da população através da imprensa ou folhetos explicativos.

Apesar do Código Brasileiro de Trânsito de 1997 (BRASIL, 1998) constar em seu artigo 165 que o uso de álcool e substâncias psicoativas no

trânsito é considerado infração gravíssima, ainda há muita dificuldade em se monitorar ou mesmo constatar o uso destes por motoristas. Uma análise clínica, avaliando-se efeitos subjetivos e comportamentais deve ser realizada por profissional especializado; porém não constitui prova inequívoca de que o indivíduo estaria dirigindo sob influência de alguma substância psicoativa.

O teste em ar alveolar realizado por aparelhos denominados etilômetros ("bafômetros") é o método reconhecido pelo Conselho Nacional de Trânsito (CONTRAN) para constatar o consumo de álcool. Entretanto, são equipamentos de custo elevado que requerem aferição freqüente, manutenção e devem ser manipulados por profissionais treinados. Para outras substâncias psicoativas não existe qualquer método reconhecido e regulamentado para detecção. Além disso, nas leis de trânsito não consta de maneira clara quais amostras biológicas devam ser empregadas para constatação do uso dessas substâncias proibidas.

Desta forma, a escolha do material biológico a ser analisado é crítica, uma vez que cada tipo de espécime pode contribuir para uma determinada informação. Por exemplo, a presença de benzoilecgonina na urina pode ser interpretada como evidência de uso de cocaína horas ou dias antes da coleta da amostra, mas não significa necessariamente que o indivíduo estaria sob influência dessa substância no momento da coleta da amostra. Por outro lado, a presença de cocaína na saliva ou sangue pode ser interpretada como um forte indicativo de que o indivíduo doador da amostra estava sob os efeitos farmacológicos da droga no instante da coleta.

Entretanto, o sangue só pode ser coletado por profissional de saúde especializado, muitas vezes não disponível no local da autuação. Além disso, a coleta é realizada por meio invasivo, fator a mais para que o indivíduo suspeito se recuse a fornecer amostra para averiguação. Por outro lado, a saliva pode ser coletada por método não-invasivo em campo aberto e sob vigilância, tendendo a oferecer, portanto, menor resistência por parte do doador da amostra.

Nos últimos anos, alguns dispositivos coletores de saliva foram desenvolvidos e estão disponíveis no mercado. No presente trabalho foi escolhida a utilização do dispositivo *Salivette* comercializado pela *Sartstedt* (Alemanha), devido à maior praticidade (pois possibilita a centrifugação do dispositivo e recolhimento da amostra líquida) e por conter ácido cítrico (usado para estimular a salivação). Apesar do conhecimento de que a saliva coletada de forma estimulada pode alterar a razão saliva/plasma de muitos fármacos de abuso como a cocaína, essa foi a forma escolhida na tentativa de se coletar pelo menos o volume necessário (1mL) para realização das análises. Um outro motivo foi que a coleta de saliva de indivíduos usuários de maconha também poderia ser prejudicada se fosse feita sem estimulação, uma vez que um dos efeitos do uso da droga é o de diminuir a produção de saliva (boca seca). Neste dispositivo, um pequeno rolo de algodão é colocado na boca do doador da amostra por cerca de um minuto, permitindo a absorção da saliva no algodão.

Utilizando-se esse dispositivo de coleta de saliva, somente dois motoristas, de um total de 561, recusaram o fornecimento de amostras. Entretanto, apesar da coleta ter sido realizada por estimulação com ácido cítrico, o volume de saliva coletado dos voluntários da pesquisa foi muito variável (0,2 a 3mL), o que de certa forma pode ter influenciado o resultado das análises.

Como o volume de saliva coletado é geralmente limitado, foi desenvolvido um método para determinação seriada da concentração de etanol e outros fármacos de abuso, utilizando-se uma única alíquota (1mL) de saliva (YONAMINE *et al.*, 2003). Nesse método, um procedimento inicial de *headspace* e detecção por cromatografia em fase gasosa com detector de ionização por chama (GC-FID) foi utilizado para determinação de etanol.

Após algumas tentativas de extração e identificação dos outros fármacos no líquido remanescente do *headspace*, investigou-se a possibilidade da aplicação da microextração em fase sólida (SPME), uma técnica relativamente recente e que apresenta uma série de vantagens

sobre outras técnicas de preparo de amostras como a extração líquido-líquido e a extração em fase sólida (SPE). Na SPME não se utiliza solventes orgânicos, os procedimentos são mais simples e rápidos e os extratos geralmente são mais “limpos” para análise. Consiste de um dispositivo amostrador (uma espécie de seringa modificada) contendo uma fibra revestida de um filme fino de polímero que, quando em contato com a amostra adsorve os analitos em condições adequadas de extração. A eficiência de extração depende da partição dos analitos de interesse entre a fase extratora (fibra) e a matriz biológica e o tempo em que a fibra fica em contato com a amostra (SNOW, 2000; LORD & PAWLISZYN, 2000; THEODORIDIS, KOSTER & JONG, 2000; ULRICH, 2000).

Contudo, a SPME não é uma técnica universal de preparação de amostras pois há um número restrito de tipos de fibras, não aplicável para todos os grupos químicos. Além disso, o mais significativo problema encontrado na análise por SPME é que alguns fatores, como as diferentes composições da amostra, podem interferir no coeficiente de partição do analito ou competir com a fase de extração (fibra), alterando a proporção do analito extraído. Para minimizar esse problema, que poderia prejudicar principalmente a precisão do método, utilizou-se a adição de padrões internos deuterados. O uso de padrão interno (PI) para quantificação é comum e geralmente fornece bons resultados quando utilizado com a SPME. É preferível que o PI escolhido seja quimicamente semelhante ao analito de interesse, particularmente em termos de coeficiente de partição para a fase de extração. Se o PI é extraído diferentemente em extensão em relação ao analito, erros na quantificação certamente surgirão. No presente trabalho, a utilização de padrões internos deuterados possibilitou excelentes valores de precisão intra e interensaio ($CV < 7\%$ para todos os fármacos de abuso pesquisados em saliva).

Uma das preocupações iniciais era a possibilidade de ocorrer perda de analitos por evaporação quando a amostra fosse submetida a 70°C (principalmente as anfetaminas, devido à sua volatilidade). Todavia, o estudo

de recuperação da anfetamina, metanfetamina e cocaína demonstrou que o procedimento prévio de *headspace* para determinação de etanol não causou perdas de analitos. O mesmo foi observado quanto a retenção destes no algodão do dispositivo *Salivette*. A centrifugação do dispositivo a 700g por 10 minutos para recolher a amostra líquida demonstrou ser suficiente para liberar os analitos do algodão (com a exceção do delta-9-THC).

Como na saliva são encontradas maiores concentrações de fármacos inalterados do que produtos de biotransformação, procedimentos de derivação para determinação de cocaína e delta-9-THC não foram necessários. Entretanto, para a análise de anfetamina e metanfetamina, a derivação foi fundamental, não para produzir derivados mais voláteis ou termicamente estáveis, mas sim para gerar espectros com fragmentos mais específicos do que o composto original. Para essas análises foi escolhido o butilcloroformato como agente de derivação. A maioria dos reagentes utilizados com essa finalidade não são compatíveis com meio aquoso, enquanto cloroformatos convertem rapidamente aminas (como a anfetamina e a metanfetamina) em carbamatos nas condições de temperatura ambiente e solução aquosa tamponada (pH 9-10) (HUSEK, 1998).

O procedimento proposto, baseado na simultânea derivação com butilcloroformato e extração dos produtos formados por SPME foi adaptado de UGLAND, KROGH & RASMUSSEN (1997) que descreveu um método para determinação de anfetaminas em urina.

Em experimentos prévios durante o desenvolvimento do método de análise de fármacos de abuso em saliva, foi observado que a cocaína poderia ser extraída e determinada nas mesmas condições que aquelas padronizadas para anfetaminas. Para evitar a hidrólise da cocaína em solução alcalina, o tampão sólido ($\text{NaHCO}_3/\text{K}_2\text{CO}_3$) e o agente de derivação (butilcloroformato) foram adicionados à amostra somente a poucos instantes do procedimento de SPME.

KINTZ, CIRIMELLE & LUDES (2000) relataram que grande parte do delta-9-THC coletado na saliva era retido no algodão do *Salivette* e a clássica centrifugação do dispositivo para recolher a amostra líquida não era suficiente para liberar o fármaco. Esses autores utilizaram 5mL de solução de hexano/acetato de etila na proporção de 9:1 (v/v) para remover o delta-9-THC do algodão, obtendo uma recuperação de aproximadamente 82%. Contudo, a tentativa de reproduzir esse resultado em nosso laboratório não foi bem sucedida; observou-se que a quantidade recuperada do analito era muito pequena. Esse fato nos levou à investigação e desenvolvimento de um novo método de remoção do delta-9-THC do algodão.

Após alguns experimentos com outros solventes e soluções aquosas, o melhor resultado foi obtido utilizando-se de uma solução de NaOH 1M para remover o delta-9-THC do algodão do *Salivette*, obtendo uma média de recuperação de 46%. Apesar da menor recuperação obtida, quando comparada com os resultados relatados por KINTZ, CIRIMELLE & LUDES (2000), esse procedimento tem a vantagem de não utilizar solventes orgânicos para remover o analito do algodão.

A técnica analítica proposta para a determinação de etanol e fármacos de abuso (anfetamina, metanfetamina, cocaína e delta-9-THC) em saliva demonstrou ser rápida e fácil de se manipular. De fato, com a utilização desse método, mais de 20 amostras de saliva puderam ser extraídas, injetadas e analisadas por um analista no período de aproximadamente 8 horas.

O estudo de estabilidade realizado nas condições de temperatura ambiente, 4°C (geladeira) e -20°C (*freezer*) demonstrou que não houve perdas de analitos nessas condições mesmo após 96 horas de acondicionamento da amostra no dispositivo *Salivette*. Pequena diferença (<20%) foi encontrada na resposta obtida nas condições de armazenamento e período estipulados, comparada com a resposta obtida no tempo zero.

Nas amostras provenientes de pacientes de uma clínica de tratamento, resultados compatíveis com o relato de uso foram observados o que comprova a eficiência do método. Em um paciente, detectou-se cocaína na saliva mesmo após 48 horas do uso, de acordo com seu relato. Essa ocorrência prolongada de cocaína na saliva provavelmente deveu-se ao consumo freqüente da droga, fenômeno observado anteriormente por CONE & WEDDINGTON (1989) e MOOLCHAM *et al.* (2000).

Quanto aos motoristas de caminhão, através da aplicação dos questionários, pôde-se traçar o perfil da população estudada. A grande maioria tinha idades entre 21 e 50 anos (87,1%), era casada (71,99%) e tinha baixo grau de escolaridade (79,35% eram somente alfabetizados ou tinham o ensino fundamental). Todos os motoristas eram do sexo masculino. Os 39 motoristas que apresentaram resultado positivo para as substâncias pesquisadas tinham idade entre 21 e 53 anos. Destes, 25 possuíam o ensino fundamental ou eram alfabetizados e a maioria era casada (22 motoristas).

O relato quanto ao consumo de álcool geralmente não foi omitido, possivelmente por se tratar de droga lícita e de certa aceitação pela sociedade. Cerca de 41% dos caminhoneiros relataram consumo de álcool pelo menos até 4 dias antes da coleta das amostras. Nesses casos, o relato de uso também foi compatível com os resultados das análises toxicológicas. Em sua maioria, amostras de urina e saliva provenientes de caminhoneiros que relataram uso de álcool de 12 horas até 4 dias antes da coleta apresentaram resultado negativo para etanol. Entretanto, em alguns poucos casos, amostras apresentaram resultado positivo para etanol mesmo quando o relato de uso apontava consumo até 1 dia antes da coleta das amostras. Variações nos resultados podem ser consequência do falso relato do motorista, diferenças quanto à quantidade de álcool consumido e características individuais de eliminação e excreção da substância.

Por outro lado, somente dois motoristas relataram uso de drogas ilícitas (um relatou uso de maconha e outro relatou uso concomitante de maconha e cocaína), confirmada pela análise em urina (amostras "F27590" e

"F25268" - Tabela 17). Entretanto, resultados positivos para substâncias de uso ilícito foram detectados na urina em 21 outros casos, sendo 8 para canabinóides, 7 para anfetamina, 3 para cocaína e 3 para cocaína e canabinóides simultaneamente. Para alguns desses caminhoneiros, fármacos de abuso também foram detectados em saliva em nove casos, sendo 4 para anfetamina, 2 para cocaína, 2 para delta-9-THC e 1 para cocaína e delta-9-THC, indicando que fizeram uso recente e que provavelmente estavam sob influência de drogas no momento da coleta. Inclusive, um dos casos positivos para a presença de delta-9-THC na saliva foi para o motorista que relatou uso de drogas (cocaína e maconha) meia hora antes da coleta de amostras.

Em pesquisas similares realizadas em outros países, as análises toxicológicas foram conduzidas somente em motoristas suspeitos de estarem dirigindo sob a influência de drogas (BJORNBOE *et al.*, 1987; PEEL, PERRIGO & MIKHAEL *et al.*, 1984; CROUCH *et al.*, 1993; BROOKOFF *et al.*, 1994; STEINMEYER *et al.*, 2001). No presente trabalho, optou-se por realizar análises de forma aleatória de voluntários não suspeitos, a fim de que se pudesse obter indícios da dimensão do problema do uso de álcool e drogas ilícitas por motoristas profissionais. Os resultados das análises de urina demonstraram que 4,12% foram positivas para drogas ilícitas. Esses dados são condizentes com aqueles obtidos por SILVA *et al.* (2003) onde se verificou um índice de positividade de 5,63% do uso de cocaína, maconha e anfetaminas por motoristas de caminhão.

Muitos estados norte-americanos tem leis que estabelecem tolerância zero para os níveis de drogas em motoristas. Por exemplo: a presença de delta-9-THC no sangue ou seus produtos de biotransformação na urina, juntamente com medidas subjetivas de alteração comportamental feitas em campo, constituiria evidência suficiente de que a pessoa estaria dirigindo sob a influência de drogas (KIDWELL, HOLLAND & ATHANASELIS, 1998).

No Brasil, com a exceção dos índices de alcoolemia, não há valor de referência estabelecido por lei da concentração de etanol ou fármacos de

abuso em qualquer outro material biológico fornecido pelo motorista. Se fossem considerados que a razão saliva/sangue é aproximadamente 1,0 e que o valor limite de álcool no sangue segundo o Código Brasileiro de Trânsito é 0,6g/L, em quatro casos se observaria extrapolação desse limite (amostras "F23369", "F23379", "F25802", "F25295" – TABELA 17). Se esse limite fosse reduzido para 0,3g/L, conforme propõe projeto de lei aprovado na Câmara dos Deputados, mais duas amostras seriam consideradas acima do limite (amostra "F25271" e "F26615").

Para as análises de fármacos de abuso/produtos de biotransformação em urina estabeleceu-se, como critério para resultados positivos, valores de referência de concentração (*cut-off*) recomendados pela Comunidade Européia (DE LA TORRE *et al.*, 1997) para as fases analíticas de triagem e confirmação. Para a análise de etanol na urina, como também não existe valor de referência, optou-se por fazer uma análise quantitativa.

A concentração de *cut-off*, embora bastante aceita e recomendada para programas de controle e prevenção do uso de drogas no ambiente de trabalho, tem sido motivo de discussão devido à sua aparente arbitrariedade quanto ao estabelecimento do seu valor e a dificuldade quanto à interpretação de resultados baseada neste critério. No controle da dopagem no esporte, por exemplo, com a exceção de algumas substâncias, não se adotam valores de referência para considerar um resultado positivo. A simples presença da substância proibida em amostra fornecida pelo atleta (urina), em qualquer quantidade, constitui evidência de dopagem (WORLD ANTI-DOPING AGENCY, 2003). De fato, as concentrações de substâncias proibidas encontradas na urina não fornecem grandes informações a respeito do uso da droga, uma vez que são dependentes de diversos fatores como fluxo urinário, características individuais de eliminação, pureza da droga, quantidade e frequência de uso e principalmente do tempo de coleta após o uso da droga. Portanto, a quantificação de fármacos de abuso ou seus produtos de biotransformação na urina acaba sendo desnecessária.

Os valores de *cut-off* foram estabelecidos baseados principalmente na sensibilidade de métodos analíticos disponíveis e para diferenciar o uso ativo da droga com a exposição passiva (por exemplo, a inalação passiva da fumaça da maconha). Quando valores de *cut-off* são adotados como critério de positividade, a análise toxicológica, por ser semiquantitativa, torna-se mais simples e prática. Além disso, oferece a oportunidade de uma uniformização de critérios, se todos os laboratórios de toxicologia adotarem os mesmos valores.

A principal desvantagem da adoção desse critério é que uma amostra de urina que apresentar valor de concentração de fármacos de abuso ou seus produtos de biotransformação abaixo do valor de *cut-off* será considerada negativa, mas não significa necessariamente que o doador da amostra não tivesse feito uso da droga horas ou dias antes da coleta.

Em relação às análises em saliva, apesar de existirem valores de *cut-off's* recomendados pelo *Substance Abuse and Mental Health Service Administration* dos Estados Unidos (SUBSTANCE ABUSE AND MENTAL HEALTH SERVICE ADMINISTRATION, 2001), estes ainda são muito recentes e ainda estão sendo discutidos pela comunidade científica (CONE *et al.*, 2002; MOORE & LEWIS, 2003). Desta forma, optou-se por fazer também a análise quantitativa para as amostras de saliva obtidas dos voluntários da pesquisa. Além disso, ao contrário da urina, concentrações de fármacos de abuso na saliva correlacionam-se com as concentrações plasmáticas e, desta forma, poderiam fornecer importantes informações quanto à intensidade de efeitos farmacológicos produzidos pela droga no momento da coleta.

Indiscutivelmente, campanhas de prevenção ao uso de álcool e drogas e a conscientização da população quanto aos riscos associados à esse hábito são fundamentais na tentativa de reduzir o número de acidentes de trânsito. Entretanto, se não forem acompanhadas de medidas disciplinares e fiscalização mais rigorosa para o cumprimento da lei, iniciativas desse tipo poderão não ter a mesma eficiência.

O método desenvolvido permitiu a determinação de uma série de substâncias psicoativas em uma única amostra, facilmente coletada em situações encontradas no trânsito urbano e rodoviário. Neste aspecto, foi demonstrado neste trabalho que a análise toxicológica em saliva seria de grande utilidade na fiscalização e constatação do uso de álcool e drogas no trânsito. Sua aplicação futura poderia contribuir na prevenção e redução do número de acidentes em ruas e estradas brasileiras.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

De acordo com os dados obtidos foi possível concluir que:

- O procedimento de *headspace* e a sucessiva utilização da microextração em fase sólida (SPME) possibilitou o desenvolvimento de um método capaz de quantificar etanol, anfetamina, metanfetamina, cocaína e delta-9-THC em uma única alíquota de saliva.
- O método desenvolvido e validado para determinação seriada de etanol, anfetamina, metanfetamina, cocaína e delta-9-THC em saliva demonstrou ser rápido, prático e eficiente, atendendo satisfatoriamente os objetivos desse trabalho.
- Nas análises toxicológicas realizadas em amostras de motoristas, um índice maior de resultados positivos foi observado nas amostras de urina, devido ao maior período de detecção em relação à saliva, que fornece a informação de uso recente.
- Com a aplicação do método em um número considerável de amostras obtidas de caminhoneiros que trafegavam em rodovias de São Paulo, foi demonstrado que a saliva é uma amostra que pode ser utilizada para verificar se motoristas estariam dirigindo sob efeito de substâncias psicoativas, com a vantagem de não necessitar de método invasivo de coleta como o sangue.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ÁLCOOL amplia os acidentes e a violência geral. *Pesqui. FAPESP*, São Paulo, v.57, n.9, p.38-39, 2000.
- ARMBRUSTER, D.A.; TILLMAN, M.D.; HUBBS, L.M. Limit of detection (LOD) /Limit of quantitation (LOQ): comparison of the empirical and the statistical methods exemplified with GC-MS assays of abused drugs. *Clin. Chem.*, Washington, v.40, p.1233-1238, 1994.
- BJORNEBOE, A.; BJORNEBOE, G.E.A.A.; GJERDE, H.; BUGGE, A.; DREVON, C.A.; MORLAND, J.. A retrospective study of drugged driving in Norway. *Forensic Sci. Int.*, Amsterdam, v.33, p.243-251, 1987.
- BRASIL. *Código de trânsito brasileiro*: lei n.9.503 de 23 de setembro de 1997. São Paulo: LTr, 1998. 373p. (LTr Biblioteca Básica).
- BROOKOFF, D.; COOK, C.S.; WILLIAMS, C.; MANN, C.S. Testing reckless drivers for cocaine and marijuana. *N. Engl. J. Med.*, Waltham, v.331, p.518-522, 1994.
- BUSTO, U.; BENDAYAN, R.; SELLERS, E.M. Clinical pharmacokinetics of non-opiate abuse drugs. *Clin. Pharmacokinet.*, Auckland, v.16, p.1-26, 1989.
- CAMPIGLIA, A.D.; VO-DINH, T. Rapid screening method for cocaine and benzoylecgonine in saliva samples. *Anal. Chim. Acta*, Amsterdam, v.372, p.349-350, 1998.

- CAMPORA, P.; BERMEJO, A.M.; TABERNERO, M.J.; FERNANDEZ, P. Quantitation of cocaine and its major metabolites in human saliva using gas chromatography-positive chemical ionization-mass spectrometry (GC-PCI-MS). *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.27, p.270-274, 2003.
- CAMPOS, D.R.; YONAMINE, M.; MOREAU, R.L.M. Marijuana as doping in sports. *Sports Med.*, Baltimore, v.33, n.6, p.395-399, 2003.
- CARLINI, E.A.; GALDURÓZ, J.C.F.; NOTO, A.R.; NAPPO, S.A.; BARBOSA, M.T.S.; FARIAS, A.M.L. *Primeiro levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 107 maiores cidades do país: 2001*. São Paulo: CEBRID, UNIFESP, 2002. 380p.
- CERRO, J.C.L. Cannabis. In: LORENZO, P.; LADERO, J.M.; LEZA, J.C.; LIZASOAIN, I. *Drogodependencias*. Madri: Panamericana, 1998. p.191-214.
- CHASIN, A.A.M.; MIDIO, A.F. Exposição humana à cocaína e ao cocaetileno: disposição e parâmetros toxicocinéticos. *Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo*, São Paulo, v.33, n.1, p.1-12, 1997.
- CHRISTOPHERSEN, A.S.; MORLAND, J. Drug analysis for control purposes in forensic toxicology, workplace testing, sports medicine and related areas. *Pharmacol. Toxicol.*, Copenhagen, v.74, p.202-210, 1994.
- CODY, J.T.; VALTIER, S. Detection of amphetamine following administration of femproporex. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.20, p.425-431, 1996.
- CONE, E.J.; KUMOR, K.; THOMPSON, L.K.; SHERER, M. Correlation of saliva cocaine levels with plasma levels and with pharmacological effects after intravenous cocaine administration in human subjects. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.12, p.200-206, 1988.
- CONE, E.J.; WEDDINGTON, W.W. Prolonged occurrence of cocaine in human saliva and urine after chronic use. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.13, p.64-68, 1989.

- CONE, E.J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cocaine. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.19, p.459-478, 1995.
- CONE, E.J.; JENKINS, A.J. Saliva drug analysis. In: WONG, S.H.Y.; SUNSHINE, I., eds. *Handbook of analytical therapeutic drug monitoring and toxicology*. Boca Raton: CRC Press, 1997. p.303-334.
- CONE, E.J.; OYLER, J.; DARWIN, W.D. Cocaine disposition in saliva following intravenous, intranasal, and smoked administration. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.21, p.465-475, 1997.
- CONE, E.J.; PRESLEY, L.; LEHRER, M.; SEITER, W.; SMITH, M.; KARDOS, K.W.; FRITCH, D.; SALAMONE, S.; NIEBDALA, R.S. Oral fluid testing for drugs of abuse: positive prevalence rates by Intercept immunoassay screening and GC/MS/MS confirmation and suggested cutoff concentration. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.26, p.541-546, 2002.
- CONSELHO NACIONAL DE TRÂNSITO – CONTRAN. Resolução n. 81 de 19 de novembro de 1998. Disponível em http://www.denatran.gov.br/download/Resolucoes/resolucao081_98.doc. Acesso em 10 nov. 2003.
- CORREA, C.L.; PEDROSO, R.C.P. Headspace gas chromatography with capillary column for urine alcohol determination. *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.*, Amsterdam, v.704, n.1/2, p.365-368, 1997.
- CROUCH, D.J.; BIRKY, M.M.; GUST, S.W.; ROLLINS, D.E.; WALSH, J.M.; MOULDEN, J.V.; QUINLAN, K.E.; BECKEL, R.W. The prevalence of drugs and alcohol in fatally injured truck drivers. *J. Forensic Sci.*, West Conshohocken, v.38, p.1342-1353, 1993.
- CROUCH, D. Alternative drugs, specimens and approaches for non-regulated drug testing. In: KARCH, S.B., ed. *Drug abuse handbook*. Boca Raton: CRC Press, 1998. p.776-793.

- DE GIOVANNI, N.; FUCCI, N.; CHIAROTTI, M.; SCARLATA, S. Cozart Rapiscan system: our experience with saliva tests. *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, Amsterdam, v.773, n.1, p.1-6, 2002.
- DE LA TORRE, R.; SEGURA, J.; DE ZEEUW, R.; EILLIANS, J. Recommendation for the reliable detection of illicit drugs in urine in the European Union, with special attention to the workplace. EU Toxicology Experts working Group. *Ann. Clin. Biochem.*, London, v.34, p.339-344, 1997.
- DEPARTAMENTO NACIONAL DE TRÂNSITO. Estatísticas. Acidentes de Trânsito. Anuário Estatístico de Acidentes de Trânsito - 2001. *Anuário estatístico: acidentes de trânsito: DENATRAN 2001*. Disponível em: <http://www.denatran.gov.br/acidentes.htm>. Acesso em: 25 out. 2003.
- DRUMMER, O.H.; ODELL, M. *The forensic pharmacology of drugs of abuse*. London: Arnold, 2001. 462p.
- DUNN, J.; LARANJEIRA, R.R.; DA SILVEIRA, D.X.; FORMIGONI, M.L.; FERRI, C.P. Crack-cocaine: an increase in use among patients attending clinics in São Paulo: 1990-1993. *Subst. Use Misuse*, Monticello, v.31, p.519-527, 1996.
- DUNN, J.; LARANJEIRA, R.R. Cocaine-profiles, drug histories, and patterns of use of patients from Brazil. *Subst. Use Misuse*, Monticello, v.34, p.1527-1546, 1999.
- ENGELHART, D.A.; JENKINS, A.J. Evaluation of an onsite alcohol testing device for use in postmortem forensic toxicology. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.25, p.612-615, 2001.
- FARINA, M.; YONAMINE, M.; SILVA, O.A. One-step liquid-liquid extraction of cocaine from urine samples for gas chromatographic analysis. *Forensic Sci. Int.*, Amsterdam, v.127, p.204-207, 2002.

- FLEMING, M.; MIHIC, S.J.; HARRIS, R.A. Ethanol. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E., GILMAN, A.G., eds. *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 10.ed. New York: McGraw-Hill, 2001. p.429-446.
- FUCCI, N.; DE GIOVANNI, N.; CHIAROTTI, M.; SCARLATTA, S. SPME-GC analysis of THC in saliva samples collected with "Epitope" device. *Forensic Sci. Int.*, Amsterdam, v.119, p.318-321, 2001.
- FUCCI, N.; DE GIOVANNI, N.; CHIAROTTI, M. Simultaneous detection of some drugs of abuse in saliva samples by SPME technique. *Forensic Sci. Int.*, Amsterdam, v.134, p.40-45, 2003.
- GAZAL-CARVALHO, C.; CARLINI-COTRIM, B.; SILVA, O.A.; SAUAIA, N. Prevalência de alcoolemia em vítimas de causas externas admitidas em centro urbano de atenção ao trauma. *Rev. Saúde Pública*, São Paulo, v.36, p.47-54, 2002.
- GROSS, S.J.; WORTHY, T.E.; NERDER, L.; ZIMMERMANN, E.G.; SOARES, J.R.; LOMAX, P. Detection of recent cannabis use by saliva delta-9-THC radioimmunoassay. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.9, p.1-5, 1985.
- GUIMARÃES, I.M. *Determinação do período de detecção de benzoilecgonina urinária em usuários de cocaína por imunofluorescência polarizada*. São Paulo, 1998. 107p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- HAECKEL, R.; BUCKLITSCH, I. The comparability of ethanol concentrations in peripheral blood and saliva: the phenomenon of variation in saliva to blood concentration ratios. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, Berlin, v.25, p.199-204, 1987.
- HALL, B.J.; SATTERFIELD-DOERR, M.; PARIKH, A.R.; BRODBELT, J.S. Determination of cannabinoids in water and human saliva by solid-phase

microextraction and quadrupole ion trap gas chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.*, Washington, v.70, p.1788-1796, 1998.

HARRIS, R.A.; BRODIE, M.S.; DUNWIDDIE, T.V. Possible substrates of ethanol reinforcement: GABA and dopamine. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, New York, v.654, p.61-69, 1992.

HENDERSON, G.L. Mechanisms of drug incorporation into hair. *Forensic Sci. Int.*, Amsterdam, v.63, p.19-29, 1993.

HERNANDEZ, I.L.; FERNANDEZ, P.L. Anfetaminas. In: LORENZO, P.; LADERO, J.M.; LEZA, J.C.; LIZASOAIN, I. *Drogodependencias*. Madrid: Panamericana, 1998. p.149-156.

HOFFMAN, P.L.; TABAKOFF, B. Ethanol, sedative-hypnotics, and glutamate receptor function in Brain and cultured cells. *Alcohol Alcohol.*, Oxford, suppl.2, p.345-351, 1993.

HUESTIS, M.A.; CONE, E.J. Alternative testing matrices. In KARCH, S.B., ed. *Drug abuse handbook*. Boca Raton: CRC Press, 1998. p.799-857.

HUSEK, P. Chloroformates in gas chromatography as general purpose derivatizing agents. *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.*, Amsterdam, v.717, n.1/2, p.57-91, 1998.

INTERNATIONAL NARCOTIC CONTROL BOARD. *Psychotropic substances: statistics for 1996*. s.n.t. 258p.

JATLOW, P.I. Drug of abuse profile: cocaine. *Clin. Chem.*, Washington, v.3, n.11B, p.66B-71B, 1987.

JENKINS, A.J.; OYLER, J.M.; CONE, E.J. Comparison of heroin and cocaine concentrations in saliva with concentrations in blood and plasma. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.19, p.359-374, 1995.

- JOHANSON, C.E.; FISCHMAN, M.W. The pharmacology of cocaine related to its abuse. *Pharmacol. Rev.*, Bethesda, v.41, p.3-52, 1989.
- JONES, A.W. Pharmacokinetics of ethanol in saliva: comparison with blood and breath alcohol profiles, subjective feeling of intoxication, and diminished performance. *Clin. Chem.*, Washington, v.39, 1837-1844, 1993.
- JONES, A.W. Measuring ethanol in saliva with the QED enzymatic test device: comparison of results with blood and breath alcohol concentrations. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.19, p.169-174, 1995.
- JULIEN, R.M. *A primer of drug action: a concise, nontechnical guide to the actions, uses, and side effects of psychoactive drugs*. 8.ed. New York: W.H. Freeman, 1997. 548p.
- JUNTING, L.; PENG, C.; SUZUKI, O. Solid-phase microextraction (SPME) of drugs and poisons from biological samples. *Forensic Sci. Int.*, Amsterdam, v.97, p.93-100, 1998.
- KATO, K.; HILLSGROVE, M.; WEINHOLD, L.; GORELICK, D.A.; DARWIN, W.D.; CONE, E.J. Cocaine and metabolite excretion in saliva under stimulated and nonstimulated conditions. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.17, p.338-341, 1993.
- KIDWELL, D.A.; HOLLAND, J.C.; ATHANASELIS, S. Testing for drugs of abuse in saliva and sweat. *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.*, Amsterdam, v.713, n.1, p.111-135, 1998.
- KIM, I.; BARNES, A.J.; SCHEPERS, R.; MOOLCHAM, E.T.; WILSON, L.; COOPER, G.; REID, C.; HAND, C.; HUESTIS, M.A. Sensitivity and specificity of the Cozart microplate EIA cocaine oral fluid at proposed screening and confirmation cutoffs. *Clin. Chem.*, Washington, v.49, p.1498-1503, 2003.

- KINTZ, P.; CIRIMELE, V.; LUDES, B. Detection of cannabis in oral fluid (saliva) and forehead wipes (sweat) from impaired drivers. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.24, p.557-561, 2000.
- KIRCHER, V.; PARLAR, H. Determination of Δ^9 -tetrahydrocannabinol from human saliva by tandem immunoaffinity chromatography-high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.*, Amsterdam, v.677, n.2, p.245-255, 1996.
- LARANJEIRA, R.; NICASTRI, S.; JERÔNIMO, C.; MARQUES, A.C. Consenso sobre a síndrome de abstinência do álcool (SAA) e o seu tratamento. *Rev. Bras. Psiquiatr.*, São Paulo, v.22, p.62-71, 2000.
- LARANJEIRA, R. *Usuários de substâncias psicoativas: abordagem, diagnóstico e tratamento*. 2.ed. São Paulo: Conselho Regional de Medicina do Estado de São Paulo, Associação Médica Brasileira, 2003. 120p.
- LEYTON, V.; COELHO, C.A.S.; REINHARDT, V.E.; CLARO, F. Análise retrospectiva da alcoolemia em vítimas de morte violenta no estado de São Paulo. In: SIMPÓSIO ÁLCOOL E SUAS REPERCUSSÕES MÉDICO-SOCIAIS, São Paulo, 1999. *Anais*. São Paulo: Hospital das Clínicas/Faculdade de Medicina/USP, p.55-57, 1999.
- LORD, H.; PAWLISZYN, J. Microextraction of drugs. *J. Chromatogr., A*, Amsterdam, v.902, p.17-63, 2000.
- MACCHIA, T.; MANCINELLI, R.; GENTILI, S.; LUGAESI, E.C.; RAPONI, A.; TAGGI, F. Ethanol in biological fluids: headspace GC measurement. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.19, p.241-246, 1995.
- MADDEN, J.A.; POWERS, P.H. Effect of cocaine and cocaine metabolites on cerebral arteries *in vitro*. *Life Sci.*, New York, v.47, p.1109-1114, 1990.
- MASEDA, C.; HAMA, K.; FUKUI, Y.; MATSUBARA, K.; TAKAHASHI, S.; AKANE, A. Detection of delta-9-THC in saliva by capillary GC/ECD after

- marijuana smoking. *Forensic Sci. Int.*, Amsterdam, v.32, n.4, p.259-266, 1986.
- MATIN, S.B.; WAN, S.H.; KNIGHT, J.B. Quantitative determination of enantiomeric compounds: simultaneous measurement of the optical isomers of amphetamine in human plasma and saliva using chemical ionization mass spectrometry. *Biomed. Mass Spectrom.*, London, v.4, p.118-121, 1977.
- MEATHERAL, R.C.; GARRIOTT, J.C. A sensitive thin-layer chromatographic procedure for the detection of urinary 11-nor-delta-9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.12, p.136-140, 1988.
- MENKES, D.B.; HOWARD, R.C.; SPEARS, G.F.; CAIRNS, E.R. Salivary THC following cannabis smoking correlates with subjective intoxication and heart rate. *Psychopharmacology*, Berlin, v.103, p.277-279, 1991.
- MILLS, G.A.; WALKER, V. Headspace solid-phase microextraction procedures for gas chromatographic analysis of biological fluids and materials. *J. Chromatogr., A*, Amsterdam, v.902, p.267-287, 2000.
- MOAK, D.H.; ANTON, R.F. Alcohol. In: McCRADY, B.S.; EPSTEIN, E.E., eds. *Addictions: a comprehensive guidebook*. New York, Oxford: Oxford University Press, 1999. p.75-94.
- MOFFAT, A.C.; OSSELTON, M.D.; WIDDOP, B. *Clarke's analysis of drug and poisons*. 3.ed., v.2. London: Pharmaceutical Press, 2004. 1935p.
- MOOLCHAM, E.T.; CONE, E.J.; WSTADIK, A.; HUESTIS, M.A.; PRESTON, K.L. Cocaine and metabolite elimination patterns in chronic cocaine users during cessation: plasma and saliva analysis. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.24, p.458-466, 2000.
- MOORE, C.; LEWIS, D. Comment on oral fluid testing for drugs of abuse: positive prevalence rates by Intercept immunoassay screening and GC-

- MS-MS confirmation and suggested cutoff concentrations. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.27, p.169, 2003.
- MORTIER, K.A.; MAUDENS, K.E.; LAMBERT, W.E.; CLAUWAERT, K.M.; VAN BOCXLAER, J.F.; DEFORCE, D.L.; VAN PETEGHEM, C.H.; DE LEENHEER, A.P. Simultaneous, quantitative determination of opiates, amphetamines, cocaine and benzoylecgonine in oral fluid by liquid chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, Amsterdam, v.779, n.2, p.321-330, 2002.
- MULÉ, S.J.; CASELLA, G.A. Confirmation of marijuana, cocaine, morphine, codeine, amphetamine, methamphetamine, phencyclidine by GC/MS in urine following immunoassay screening. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.12, p.102-107, 1988.
- NAPPO, S.A.; GALDURÓZ, J.C.F.; NOTO, A.R. Crack use in São Paulo. *Subst. Use Misuse*, Monticello, v.31, p.565-579, 1996.
- NERY FILHO, A.; MEDINA, M.G.; MELCOP, A.G.; OLIVEIRA, E.M., eds. *Impacto do uso de álcool e outras drogas em vítimas de acidentes de trânsito*. Brasília: ABDETRAN, 1997.
- NIEBDALA, R.A.; KARDOS, K.W.; FRITCH, D.F.; KARDOS, S.; FRIES, T.; WAGA, J.; ROBB, J.; CONE, E.J. Detection of marijuana use by oral fluid and urine analysis following single-dose administration of smoked and oral marijuana. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.25, p.289-303, 2001.
- NORMAND, J.; LEMPERT, R.O.; O'BRIEN, C.P., eds. *Under the influence? drugs and the American work force*. Washington: National Academy Press, 1994. 321p.
- NOTO, A.R.; CARLINI, E.A.; MASTROIANNI, P.C.; ALVES, V.C.; GALDURÓZ, J.C.F.; KUROIWA, W.; CSIZMAR, J.; COSTA, A.; FARIA, M.A.; HIDALGO, S.R.; ASSIS, D.; NAPPO, S.A. Analysis of prescription

and dispensation of psycotropic medications in two cities in the State of São Paulo, Brazil. *Rev. Bras. Psiquiatr.*, São Paulo, v.24, p.68-73, 2002.

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

PARKINSON, A. Biotransformation of xenobiotics. In: KLAASSEN, C.D., ed. *Casarett & Doull's toxicology: the basic science of poisons*. 6.ed. New York: Mcgraw-Hill, 2001. p.133-224.

PEAT, M.; DAVIS, A. Analytical considerations and approaches for drugs. In: KARCH, S.B., ed. *Drug abuse handbook*. Boca Raton: CRC Press, 1998. p.751-764.

PEEL, H.W.; PERRIGO, B.J.; MIKHAEL, N.Z. Detection of drugs in saliva of impaired drivers. *J. Forensic Sci.*, West Conshohocken, v.29, p.185, 1984.

PFLEGER, K.; MAURER, H.H.; WEBER, A. *Mass spectral and GC data of drugs, poisons, pesticides, pollutants, and their metabolites*. 2.ed. Weinheim, New York: VCH, 1992. part.1, p.7-13.

QUESADA, J.M.L. Alcohol (I). *Farmacología del alcohol. Intoxicación aguda*. In: LORENZO, P.; LADERO, J.M.; LEZA, J.C.; LIZASOAIN, I. *Drogodependencias*. Madri: Panamericana, 1998. p.233-248.

RITZ, M.C.; CONE, E.J.; KUCHAR, M.J. Cocaine inhibition of ligand binding at dopamine, norepinephrine and serotonin transporters: a structure activity study. *Life Sci.*, New York, v.46, p.635-645, 1990.

RUZ, J.; LINARES, P.; LUQUE DE CASTRO, M.D.; CARIDAD, J.M.; VALCARCEL, M. Development of a statistical model for prediciting the ethanol content of blood from measurement on saliva or breath samples. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, Amsterdam, v.7, p.1225-1238, 1989.

- SCHEPERS, R.J.; OYLER, J.M.; JOSEPH, R.E.; CONE, E.J.; MOOLCHAM, E.T.; HUESTIS, M.A. Methamphetamine and amphetamine pharmacokinetics in oral fluid and plasma after controlled oral methamphetamine administration to human volunteers. *Clin. Chem.*, Washington, v.49, p.121-132, 2003.
- SCHRAMM, W.; SMITH, R.H.; CRAIG, P.A. Drug abuse in saliva: a review. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.16, p.1-9, 1992.
- SCHRAMM, W.; CRAIG, P.A.; SMITH, R.H.; BERGER, G.E. Cocaine and benzoilecgonine in saliva, serum, and urine. *Clin. Chem.*, Washington, v.39, p.481-487, 1993.
- SILVA, O.A.; YONAMINE, M.; ANTUNES, C.L.G.; GREVE, J.M.D. Femproporex abuse by truck drivers in Brazil. In: TIAFT, 36, New Mexico, 1998. *Proceedings*. New Mexico: Society of Forensic Toxicologists and The International Association of Forensic Toxicologists, 1998. p.336-339.
- SILVA, O.A. Consumo de drogas de abuso no ambiente de trabalho no Brasil. *Rev. Bras. Toxicol.*, São Paulo, v.11, suppl.1, p.7-10, 1999.
- SILVA, O.A.; ODO, S.A. Toxicologia da cocaína. In: LEITE, M.C.; ANDRADE, A.G. *Cocaína e crack: dos fundamentos ao tratamento*. Porto Alegre: Artmed, 1999. p.88-95.
- SILVA, O.A.; YONAMINE, M.; ODO, S.A. Drug abuse testing in the workplace: the Brazilian experience. In: CONGRESS OF TOXICOLOGY IN DEVELOPMENT COUNTRIES, 4, Antalya, 1999. *Abstracts*. Antalya: Turkish Society of Toxicology, 1999. p.211.
- SILVA, O.A.; YONAMINE, M. Drug abuse among Brazilian workers. In: SYMPOSIUM ON WORKPLACE DRUG TESTING, 2, Rimini, 2000. *Abstracts*. Rimini: European Workplace Drug Testing Society, 2000. p.56.

- SILVA, O.A.; GREVE, J.M.D.; YONAMINE, M.; LEYTON, V. Drug use by truck drivers in Brazil. *Drugs: Educ., Prev. Policy*, Abingdon, v.10, n.2, p.135-139, 2003.
- SMITH, F.P. Detection of amphetamine in bloodstains, semen, seminal stains, saliva, and saliva stains. *Forensic Sci Int.*, Lausanne, v.17, p.225-228, 1981.
- SMITH, F.P.; KIDWELL, D.A. Cocaine in hair, saliva, skin swabs, and urine of cocaine user's children. *Forensic Sci. Int.*, Amsterdam, v.83, p.179-189, 1996.
- SNOW, N.H. Solid-phase micro-extraction of drugs from biological matrices. *J. Chromatogr., A*, Amsterdam, v.885, n.1/2, p.445-455, 2000.
- STEINMEYER, S.; OHR, H.; MAURER, H.J.; MOELLER, M.R. Practical aspects of roadside tests for administrative traffic offences in Germany. *Forensic Sci. Int.*, Amsterdam, v.121, p.33-36, 2001.
- STEPHENS, R.S. Cannabis and hallucinogens. In: McCRADY, B.S.; EPSTEIN, E.E. *Addictions: a comprehensive guidebook*. Oxford: Oxford Univerity Press, 1999. p.121-139.
- SUBSTANCE ABUSE AND MENTAL HEALTH SERVICE ADMINISTRATION (SAMHSA). Mandatory Guidelines for federal workplace drug testing programs – Draft#4, 2001. Disponível em : <http://www.workplace.samhsa.gov/ResourceCenter/Dt/FA/GuidelinesDraft4.htm>. Acesso em: 20 out. 2003.
- THEODORIDIS, G.; KOSTER, E.H.M.; JONG, G.J. Solid-phase microextraction for the analysis of biological samples. *J. Chromatogr., A*, Amsterdam, v.745, p.49-82, 2000.
- THOMPSON, L.K.; CONE, E.J. Determination of delta-9-tetrahydrocannabinol in human blood and saliva by high-performance

- liquid chromatography with amperometric detection. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.421, p.91-97, 1987.
- THOMPSON, L.K.; YOUSEFNEJAD, D.; KUMOR, K.; SHERER, M.; CONE, E.J. Confirmation of cocaine in human saliva after intravenous use. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.11, p.36-38, 1987.
- TOLEDO, F.C.P. *Identificação de benzoilecgonina por imunofluorescência polarizada em cabelo de usuários de cocaína*. São Paulo, 1999. 97p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- UGLAND, H.G.; KROGH, M.; RASMUSSEN, K.E. Aqueous alkylchloroformate derivatisation and solid-phase microextraction: determination of amphetamines in urine by capillary gas chromatography. *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.*, Amsterdam, v.701, n.1, p.29-38, 1997.
- ULRICH, S. Solid-phase micro-extraction in biomedical analysis. *J. Chromatogr., A*, Amsterdam, v.902, p.167-194, 2000.
- UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. *Global illicit drug trend 2003*. United Nations, 2003, 347p. Disponível em: http://www.unodc.org/pdf/trends2003/www_E.pdf. Acesso em 15 jul. 2004.
- VALTIER, S.; CODY, J.T. Metabolic production of amphetamine following administration of clobenzorex. *J. Forensic Sci.*, West Conshohocken, v.44, p.17-42, 1999.
- VERSTRAETE, A.G.; PIERCE, A. Workplace drug testing in Europe. *Forensic Sci. Int.*, Amsterdam, v.121, p.2-6, 2001.
- WAN, S.H.; MATIN, S.B.; AZARNOFF, D.L. Kinetics, salivary excretion of amphetamine isomers, and effect of urinary pH. *Clin Pharmacol. Ther.*, Saint Louis, v.23, p.585-590, 1978.

- WOOD, M.; DE BOECK, G.; SAMYN, N.; MORRIS, M.; COOPER, D.P.; MAES, R.A.; DE BRUIJN, E.A. Development of a rapid and sensitive method for the quantitation of amphetamines in human plasma and oral fluid by LC-MS-MS. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.27, p.78-87, 2003.
- WORLD ANTI-DOPING AGENCY (WADA). World anti-doping code, 2003, 78p. Disponível em : http://www.wada-ama.org/docs/web/standards_harmonization/code/code_v3.pdf. Acesso em 15 jul. 2004.
- YONAMINE, M. *Derivação de benzoilecgonina urinária com diazometano para verificação da exposição à cocaína por técnicas cromatográficas*. São Paulo, 2000. 96p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- YONAMINE, M.; SILVA, O.A. Confirmation of cocaine exposure by gas chromatography-mass spectrometry of urine extracts after methylation of benzoylecgonine. *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, Amsterdam, v.773, n.1, p.83-87, 2002.
- YONAMINE, M.; TAWIL, N.; MOREAU, R.L.M.; SILVA, O.A. Solid-phase micro-extraction-gas chromatography-mass spectrometry and headspace-gas-chromatography of tetrahydrocannabinol, amphetamine, methamphetamine, cocaine and ethanol in saliva samples. *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, Amsterdam, v.789, p.73-78, 2003.

ANEXOS

ANEXO A

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 113

São Paulo, 03 de novembro de 2002.

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 02 do corrente, **aprovou** o projeto "Avaliação do uso da saliva como espécime biológico para verificar o consumo de cocaína, maconha, anfetamina, metanfetamina e álcool por motoristas", apresentado por Vossa Senhoria.

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 - item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Prof. Tit. Dulcinéia Saes Parra Abdalla
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP

Ilmo(a) Sr(a).
Maurício Yonamine
Orientador: Prof. Ovandir Alves Silva
FBC

ANEXO B –parte 1

Identificação da amostra: N°.....

QUESTIONÁRIO**1. Dados pessoais:**

Sexo:

☐ Masculino ☐ Feminino

Idade:.....anos

2. Medicamentos utilizados nos últimos 5 dias (remédios para gripe, resfriados, remédios para emagrecimento etc):

3. Você usou recentemente:☐ bebidas alcoólicas (etanol).☐ cocaína, “crack”.☐ maconha, haxixe.☐ anfetamina (“rebite”), metanfetamina (“ice”).

Caso afirmativo, data (dia e hora) do último uso: _____

Data da coleta da amostra: ____/____/2003. ____: ____

ANEXO B - parte 2

4) Grau de estudo do motorista:

- ☐ alfabetizado
- ☐ fundamental
- ☐ médio
- ☐ superior

5) Estado civil do motorista:

- ☐ casado
- ☐ solteiro
- ☐ separado
- ☐ amasiado
- ☐ viúvo

6) Já sofreu algum acidente dirigindo?

- ☐ sim
- ☐ não

7) É proprietário do próprio veículo?

- ☐ sim
- ☐ não

ANEXO C

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU LEGAL RESPONSÁVEL

1. Nome :

.....

Documento de Identidade Nº : Sexo: ()M ()F

Data de Nascimento:/...../.....

Endereço: Nº: Apto:

Bairro: Cidade:

CEP: Telefone:

2. Responsável

Legal:

Natureza (grau de parentesco, tutor, curador, etc.):

Documento de Identidade Nº: Sexo: ()M ()F

Data de Nascimento:/...../.....

Endereço: Nº: Apto:

Bairro: Cidade: CEP: Tel:

II – DADOS SOBRE A PESQUISA

1. Título do Protocolo de Pesquisa: *“Avaliação do uso da saliva como espécime biológico para verificar o consumo de cocaína, maconha, anfetamina, metanfetamina e álcool por motoristas”*

2. Pesquisador: Mauricio Yonamine.

Cargo/Função: Farmacêutico-Bioquímico.

Inscrição Conselho Regional Nº 21. 507

Departamento FCF/USP: Análises Clínicas e Toxicológicas.

3. Avaliação do risco da pesquisa:

Sem Risco () Risco Mínimo (x) Risco Médio ()
Risco Baixo () *Risco Maior* ()

Obtenção de amostra de saliva considerada não invasiva.

4. Duração da Pesquisa: pesquisa considerada de curta duração, pois consta de uma única coleta de amostra.

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO VOLUNTÁRIO OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

O voluntário irá fornecer uma amostra de saliva, coletada em dispositivo específico fornecido pelo pesquisador responsável. Este tipo de coleta não apresenta risco ou desconforto para o voluntário, por se tratar de um procedimento seguro e não invasivo. A amostra fornecida será submetida a uma técnica chamada cromatografia em fase gasosa ou a cromatografia em fase gasosa associada à espectrometria de massa, que irá fornecer quantidade de etanol, anfetamina, metanfetamina, cocaína ou THC presentes. Os resultados obtidos serão analisados juntamente com as respostas dos questionários.

IV – ESCLARECIMENTOS DADO PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA

1. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
 2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
 3. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
-

V – INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA:

Pesquisadores responsáveis: Prof. Dr. Ovandir Alves Silva

Mauricio Yonamine

Endereço: Universidade de São Paulo

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 Bloco 13B- São Paulo - SP

CEP: 05508-900

Fone: 3091-2194 / 3031-9055

VI – OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

VII – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Assinatura do sujeito de pesquisa
ou responsável legal

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

ANEXO D

LABORATÓRIO DE ANÁLISES TOXICOLÓGICAS-FCF/USP

INSTRUÇÕES PARA O RESPONSÁVEL PELA COLETA

1. Verificar a identidade do doador da amostra através de documento oficial.
2. Preencher a ficha de custódia e o questionário do número do "kit" de coleta correspondente a ser utilizado e o termo de consentimento. O responsável pela coleta deverá assinar a ficha de custódia. O doador da amostra deverá assinar o termo de consentimento.

PROCEDIMENTO PARA COLETA DE URINA

3. Entregar o copo coletor para o doador da amostra, que deverá retirar a tampa e colher urina até, no mínimo, na marca de 25 mL. **ATENÇÃO: é necessário manter vigilância durante a coleta.**
4. Após a coleta, o doador deverá fechar o copo coletor e entregar para o responsável pela coleta.
5. O Responsável pela coleta, na presença do doador da amostra, deve:
 - colocar as luvas e verificar se a tampa do copo coletor está **bem fechada**. Transferir a amostra do copo coletor para o frasco até a marca existente, pressionando **levemente** o copo coletor de modo a fluir a amostra através de seu "bico dosador".
 - fechar o frasco com a tampa/lacre. **Verificar se a tampa está bem fechada, para evitar derramamento da amostra**
 - descartar o copo coletor e as luvas e o excedente da amostra.
 - retirar o papel branco da fita/lacre e colocar a parte prateada com a identificação do Laboratório no frasco (conforme o desenho)

atenção: a fita/lacre não pode ser retirada após ter sido colada!

Não colocar a fita sobre o número

6. Colocar o frasco dentro do "isopor" junto com o 'gelo reutilizável' (previamente congelado).

PROCEDIMENTO PARA COLETA DE SALIVA

ATENÇÃO: é necessário manter vigilância durante a coleta.

7. Solicitar ao doador da amostra:
 - Abrir o dispositivo coletor de saliva e retirar o algodão existente em seu interior.
 - Colocar o algodão na boca e mascá-lo durante cerca de 1 minuto, permitindo que o algodão absorva a saliva produzida. Obs: o algodão de coleta contém ácido cítrico, que irá estimular a salivação.
 - Devolver o algodão para o dispositivo coletor e fechar bem.
 - Lacrar com a fita/lacre, tomando cuidado para não colocar sobre o número de identificação da amostra.
 - Colocar o dispositivo coletor de saliva dentro do "isopor" junto com o 'gelo reutilizável' (previamente congelado).
8. Colocar nos envelopes apropriados, a ficha de custódia (via branca), o questionário e o termo de consentimento. A via azul da ficha de custódia permanece com o responsável pela coleta.
9. Encaminhar as amostras e os documentos para o Laboratório de Análises Toxicológicas.