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

Determinação de *club drugs* em sangue total por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas com analisador híbrido quadrupolo-tempo de voo (LC-QTOF)

Flávia Pine Leite

Dissertação para obtenção do título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Yonamine

São Paulo – SP

2018

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

Determinação de *club drugs* em sangue total por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas com analisador híbrido quadrupolo-tempo de voo (LC-QTOF)

Flávia Pine Leite

Versão Corrigida conforme Resolução CoPGr 6018
Original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF – USP

Dissertação para obtenção do título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Yonamine

São Paulo – SP
2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletronico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

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

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

Leite, Flávia Pine
L533d Determinação de *club drugs* em sangue total por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa com analisador híbrido quadrupolo-tempo de voo (LC-QTOF) / Flávia Pine Leite. -- São Paulo, 2018.
73p.

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

1. Toxicologia Forense. 2. Análise de drogas I. T. II. Yonamine, Mauricio, orientador.

615.9 CDD

"O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria, se aprende é com a vida e com os humildes".

Cora Coralina

Agradecimentos

Em primeiro lugar, à minha mãe Suely, pelo suporte emocional, incentivo, entusiasmo, e principalmente por me acolher com amor incondicional nas minhas falhas e limitações.

Ao meu pai, pelo amor, carinho e por ter me dado a oportunidade de vir a esse mundo com uma família tão incrível. Aos meus irmãos, por serem homens e mulheres honrados e que são motivo de orgulho para mim.

À minha família, em especial à minha tia Cristiane e tio Marquinhos, e tia Dase, por terem me recebido com tanto carinho em suas casinhas.

Às minhas irmãs de coração Joicy, Stéphanny e Sophia, por terem um abraço amigo para me dar nos momentos de dificuldades, e por compartilhar os momentos de alegria.

Ao Professor Mauricio, pela coragem de assumir este desafio e por me dar a oportunidade de voltar à Universidade de São Paulo, da qual me orgulho de ter feito parte como graduanda, funcionária, e agora como mestranda.

Ao professor Boniek Gontijo Vaz, da Universidade Federal de Goiás, pela disposição em me receber em seu laboratório e pela confiança depositada em mim.

Aos colegas da USP: Alexandre, Ana, Anax, Flávia, Gabi, Idylla, Jefferson, Kátia, Menck, Sarah, Tiago pela ajuda com minhas dúvidas e dificuldades na adaptação à vida de mestranda. Aos colegas da UFG, em especial à Verônica Vale e à Thays Colletes, pelos ensinamentos transmitidos e pela recepção calorosa.

À grande amiga Iolana Campestrini, por ter me ensinado tanto, sempre com muita competência, boa vontade e paciência. Esse trabalho não teria sido possível sem você.

À Beatriz, ao Ângelo e todos os demais funcionários, e especialmente à Samantha, pela paciência de tirar as mesmas dúvidas por muitas vezes.

Às grandes amigas que me acolheram com tanto carinho em São Paulo e em suas vidas, Maita, Elisa e Yeimy, pessoas incríveis que ampliaram meus horizontes culturais, humanos e até mesmo filosóficos com nossas conversas animadas no fim do dia.

À Superintendente Dra. Rejane Barcelos, por ter me dado um voto de confiança de que minha ausência valeria a pena para o engrandecimento da Instituição.

Aos amigos da SPTC-GO, em especial à Thatianne, ao Antônio Carlos e ao Rafael, pela fidelidade, amizade e carinho. Aos demais colegas da SPTC, em especial aos das Seções de Toxicologia e de Balística, seres humanos incríveis que fazem valer a pena cada dia de trabalho.

Às amigas do coração Eliz, Fran, Fany e Lika, por compreenderem minhas ausências, pelas palavras de incentivo e pelo carinho que têm por mim.

Apoio financeiro

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
Edital Pró-Forenses, AUXPE 3419/2014

RESUMO

LEITE, F. P. **Determinação de club drugs em sangue total por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas com analisador híbrido quadrupolo-tempo de voo (LC-QTOF).** 2018. 73f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

As chamadas *club drugs* compreendem um vasto grupo de substâncias frequentemente utilizadas em bares, festas e *raves*, com a finalidade de intensificar o contato social e a estimulação sensorial. Englobam desde substâncias sintéticas comumente conhecidas, como a anfetamina, a metanfetamina, o MDMA, até moléculas de surgimento mais recente, denominadas novas substâncias psicoativas. Isoladas ou associadas a outras drogas, é possível que sejam causa de morte *per se*, ou que predisponham o usuário a envolver-se em situações potencialmente fatais, sendo necessário que os órgãos de Perícia Criminal (Institutos Médico Legais e Institutos de Criminalística) estejam aptos a detectar e quantificar essas substâncias em amostras biológicas. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um método analítico para identificação e quantificação de *club drugs* em sangue total, utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas com analisador híbrido quadrupolo-tempo de voo (LC-QTOF). Após o desenvolvimento do método, este foi validado utilizando as diretrizes do guia de validação do *Scientific Working Group for Forensic Toxicology* (SWGTOX), sendo analisados de linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, efeito matriz, precisão intradia, precisão interdia, exatidão e integridade de diluição, além de recuperação e eficiência do processo. O método desenvolvido compreendeu a determinação de MDA, MDMA, 2C-B, DOB, cetamina, mCPP, cocaína e cocaetileno. Amostras provenientes de casos reais de morte não natural, oriundas do Instituto Médico Legal Aristoclides Teixeira de Goiânia – GO foram analisadas pelo método desenvolvido. 56 casos foram selecionados, em sua maioria com histórico de morte por projétil de arma de fogo e acidente de transito. Das 56 amostras analisadas, 28,5% (n=16) foram positivas para cocaína e/ou cocaetileno. As demais substâncias pesquisadas não foram encontradas nas amostras.

Palavras-chave: *club drugs*, novas substâncias psicoativas, toxicologia forense, sangue total, LC-MS, QTOF.

ABSTRACT

LEITE, F. P. **Determination of club drugs in whole blood by liquid chromatography coupled with mass spectrometry with hybrid quadrupole time-of-flight mass analyzer (LC-QTOF).** 2018. 73f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Club drugs are a large group of substances consumed in pubs, parties and raves, aiming to intensify social contact and sensorial stimulation. The term comprises largely known substances such as amphetamine, methamphetamine, 3,4-methylenodioxymethamphetamine (MDMA), as well as so-called new psychoactive substances, which are synthetic drugs recently developed or recently introduced in drug market. Club drugs can be taken alone, combined with each other or, most frequently, with alcohol or other commonly abused drugs such as cocaine. In any of these situations, club drugs can possibly be the cause of death or potentialize the involvement of the user with crime and potentially fatal behavior. Thus, official organisms in charge of criminal investigation must be capable of identifying and quantifying these substances in biological samples. The present work aimed the development of an analytical method to identify and quantify club drugs in whole blood, using liquid chromatography – mass spectrometry with hybrid analyzer quadrupole – time of flight (LC-QTOF). After analytical development, the method was validated according to do *Scientific Working Group for Forensic Toxicology* (SWGTOX) guidelines, evaluating linearity, limit of detection, limit of quantification, matrix effect, precision, intermediate precision, bias and dilution integrity, besides recovery and process efficiency. The developed method comprised MDA, MDMA, 2C-B, DOB, ketamine, mCPP, cocaine and cocaethylene determination. Real samples related to non-natural deaths were collected at Institute of the Legal Medicine Aristoclides Teixeira, Goiânia, Goiás, Brazil, and analyzed by the developed method. 56 cases were selected, most of them related to fire gun injury and traffic events, 28,5% (n=16) of them being positive for cocaine and/or cocaethylene. None of the other drugs comprised in the analysis were detected in these samples.

Keywords: club drugs, new psychoactive substances, forensic toxicology, whole blood, LC-MS, QTOF.

Lista de abreviaturas

AEME: anidroecgonina metil éster

AMP: anfetamina

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APCI: *atmospheric pressure chemical ionization* (ionização química à pressão atmosférica)

APPI: *atmospheric pressure photoionization* (fotoionização à pressão atmosférica)

AT: acidente de trânsito

ATS: *amphetamine-type stimulants* (estimulantes do tipo anfetamina)

BE: benzoilecgonina

CA: controle alto

2C-B: 4-bromo-2,5-dimetoxifenetilamina

CB: controle baixo

CI: *chemical ionization* (ionização química)

CLOB: clobenzorex

CM: controle médio

COC: cocaína

CV: coeficiente de variação

DLLME: *dispersive liquid-liquid microextraction* (microextração líquido-líquido dispersiva)

DOB: 2,5-dimetoxi-4-bromoanfetamina

EI: *electron ionization* (ionização por elétrons)

EIC: *extracted ion chromatogram* (cromatograma de íon extraído)

EME: ecgonina metil éster

ESI: *electrospray ionization* (ionização por eletrospray)

FAB: ferimento por arma branca

FPX: femproporex

GC: *gas chromatography* (cromatografia gasosa)

IC: Instituto de Criminalística

IML: Instituto Médico-Legal

KET: cetamina

LC: *liquid chromatography* (cromatografia líquida)

LOD: *limit of detection* (limite de detecção)

LOQ: *limit of quantification* (limite de quantificação)

LSD: dietilamida do ácido lisérgico

MAMP: metanfetamina

MAO: monoamino oxidase

mCPP: *meta*-clorofenilpiperazina

MDA: 3,4-metilenodioxianfetamina

MDAE: 3,4-metilenodioxietilanfetamina

MDMA: 3,4-metilenodioximetanfetamina

MEF: mefedrona

MS: *mass spectrometry* (espectrometria de massas)

min: minutos

NMDA: N-metil D-aspartato

NPS: *new psichoactive substances* (novas substâncias psicoativas)

ONU: Organização das Nações Unidas

PAF: projétil de arma de fogo

PP: precipitação de proteínas

psi: *pound force per square inch*

RDC: resolução de diretoria colegiada

rpm: rotações por minuto

SNC: sistema nervoso central

SPE: *solid-phase microextraction* (microextração em fase sólida)

TCLE: termo de consentimento livre e esclarecido

TOF: *time-of-flight* (tempo de voo)

QTOF: *quadrupole/time-of-flight* (quadrupolo/tempo de voo)

QqQ: triplo quadrupolo

u.m.a.: unidade(s) de massa atômica

UNODC: *United Nations Office on Drugs and Crime* (Escritório das Nações Unidas para Drogas e Crimes)

Lista de figuras

Figura 1 – Cocaína (benzoilmetilecgonina). 5
Figura 2 – Cocaetileno. 7
Figura 3 – Esqueleto β-fenetilamina. 8
Figura 4 – (a) Anfetamina, (b) metanfetamina e (c) femproporex. 10
Figura 5 – (a) MDMA e (b) MDA. 11
Figura 6 – Clobenzorex. 12
Figura 7 – (a) 2C-B e (b) mescalina. 13
Figura 8 – 2,5-dimetoxi-4-bromoanfetamina (DOB). 14
Figura 9 – Mefedrona. 15
Figura 10 – Cetamina. 16
Figura 11 – 1-(3-clorofenil)piperazina (mCPP). 17
Figura 12 – Etapas da análise toxicológica. 19
Figura 13 – Principais fontes de ionização utilizadas em cromatografia líquida (ESI, APPI e APCI) e gasosa (EI e CI). Adaptado de Lanças (2009). 22
Figura 14 – Representação esquemática de um cone de Taylor na extremidade da sonda. Retirado de HOFFMAN; STROOBANT, 2007b. 23
Figura 15 – Representação esquemática da ionização por eletrospray. Adaptado de Banerjee e Mazumdar, 2012. 23
Figura 16 – Trajeto dos íons desde o capilar metálico da sonda até o capilar aquecido de entrada do espectrômetro de massas. Adaptado de PARTICLE SCIENCES, 2009. 24
Figura 17 –Analisador híbrido QTOF. Adaptado de BRUKER DALTONICS, 2008. 26
Figura 18 - Cromatograma de íons extraídos das 10 *club drugs.* Modo positivo de ionização. Podem ser vistos os picos correspondentes às seguintes substâncias: MDA (1); MDMA (2); mefedrona (3); cetamina (4); mCPP (5); 2C-B (6); cocaína (7); DOB (8); cocaetileno (9); clobenzorex (10). 36
Figura 19 - Espectro de massas obtido de um padrão de 2C-B. O primeiro espectro corresponde a uma aquisição em modo *full scan*, e os demais, às fragmentações dos íons detectados (MS^2). 37
Figura 20 - Sobreposição de dois cromatogramas, ambos referentes à injeção de uma amostra de cocaína a 1 μg/mL, em modo *full scan* (em vermelho) e monitoramento de íon produto (em azul). 40

Lista de gráficos

Gráfico 1 – Influência da pressão do gás nebulizador sobre a ionização da AMP. 41
Gráfico 2 – Influência do fluxo do gás de secagem sobre a ionização da AMP. 41
Gráfico 3 – Influência da temperatura do gás de secagem sobre a ionização da AMP 42
Gráfico 4 – Influência da voltagem de *endplate offset* sobre a ionização da AMP. 43
Gráfico 5 – Influência da voltagem de *endplate offset* sobre a ionização da MAMP. 43
Gráfico 6 – Influência da voltagem de *endplate offset* sobre a ionização de CLOB. 44
Gráfico 7 – Influência da composição da fase móvel na ionização. 45

Lista de tabelas

Tabela 1 – Recuperação, efeito matriz e eficiência do processo para o método proposto..... 46

Tabela 2 – Coeficiente de determinação (r^2), somatório dos residuais percentuais ($\sum_{RE\%}$) e desvio padrão dos residuais ($s_{RE\%}$) obtidos para cada fator de ponderação avaliado 48

Tabela 3 – Equação da reta, fator de ponderação e coeficiente de determinação. 49

Tabela 4 – Limite de detecção e de quantificação calculados pelos coeficientes angular e linear, e limite de quantificação estipulado..... 50

Tabela 5 – Precisão intradia, precisão interdia e exatidão do método. 51

Tabela 6 - Exatidão e precisão intradia estimados para amostras diluídas. 52

Tabela 7 – Histórico e resultado dos casos analisados..... 53

Lista de quadros

Quadro 1 – Abreviatura, fórmula molecular, massa exata e fórmula estrutual dos analitos selecionados para o estudo. 3
Quadro 2 – Preparo de amostra, analisador de massas, substâncias e limites de detecção em métodos de análise de *club drugs* em amostras de sangue por LC-MS. 27
Quadro 3 – Gradiente de eluição do método. 31
Quadro 4 - Tempos de retenção. 38
Quadro 5 – Parâmetros utilizados em modo de monitoramento de íons produto. 39
Quadro 6 – Casos positivos com concentrações quantificáveis. 53

Sumário

1. Introdução 1
1.1. Substâncias de interesse 2
1.1.1. Cocaína e cocaetileno 5
1.1.2. Estimulantes anfetamínicos (ATS – *amphetamine-like stimulants*) 8
1.1.2.1. Anfetamina, metanfetamina e femproporex 9
1.1.2.2. MDA e MDMA 11
1.1.2.3. Clobenzorex 12
1.1.2.4. 2C-B 13
1.1.2.5. DOB 14
1.1.3. Mefedrona 15
1.1.4. Cetamina 16
1.1.6. mCPP 17
1.2. Etapas da análise toxicológica 18
1.3. Análise por espectrometria de massas 21
1.3.1. A fonte de ionização: eletrospray 21
1.3.2. O analisador: QTOF 25
1.3.3. Análise de *club drugs* em sangue total 26
2. Objetivos 28
2.1. Objetivos específicos 28
3. Material e métodos 29
3.1. Material 29
3.1.1. Equipamentos e acessórios 29
3.1.2. Reagentes e outros materiais 29
3.1.3. Padrões analíticos 29
3.1.4. Amostras 29
3.2. Métodos 30
3.2.1. Preparo de amostra 30
3.2.2. Condições cromatográficas 30
3.2.3. Espectrometria de massas com analisador híbrido QTOF 31
3.2.4. Validação analítica 31
3.2.4.1. Recuperação e efeito matriz 32
3.2.4.2. Linearidade 33
3.2.4.3. Limite de detecção e limite de quantificação 33
3.2.4.4. Precisão intra e interdia 34

3.2.4.5. Exatidão 34
3.2.4.6. Arraste 35
3.2.4.7. Integridade de diluição 35
3.2.5. Coleta das amostras 35
3.2.6. Aplicação do método 35
4. Resultados e discussão 36
4.1. Separação cromatográfica 36
4.2. Modos de operação 38
4.3. Otimização dos parâmetros da ESI 40
4.4. Composição da fase móvel 45
4.5. Validação analítica 46
4.5.1. Recuperação e efeito matriz 46
4.5.2. Linearidade, limite de detecção e limite de quantificação 47
4.5.3. Precisão intradia, precisão interdia e exatidão 50
4.5.4. Arraste 52
4.5.5. Integridade de diluição 52
4.6. Aplicação do método a casos reais 52
5. Conclusão 55
6. Referências 56
7. Anexos 65
I – Histórico Escolar (Ficha do Aluno Janus) 65
II – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa 68
III – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 71

1. Introdução

As chamadas c*lub drugs* compreendem um vasto grupo de substâncias frequentemente utilizadas em bares, boates, festas e *raves,* com a finalidade de intensificar o contato social e a estimulação sensorial. As *club drugs* englobam desde substâncias sintéticas comumente conhecidas, como a anfetamina, a metanfetamina, o MDMA, até moléculas de surgimento mais recente, denominadas *designer drugs* (GAHLINGER, 2004; NHS, 2012) ou novas substâncias psicoativas (*new psychoactive substances* – NPS) (UNODC, 2015). Essas novas substâncias sintéticas, desenhadas para permanecer fora do controle internacional, têm sido usadas, identificadas e reportadas mundialmente. São quimicamente divididas em grandes grupos, como feniletilaminas, catononas sintéticas, fenilpiperazinas, canabinoides sintéticos, dentre outras (UNODC, 2017). As *club drugs* são normalmente utilizadas por via oral, podendo ser utilizadas conjuntamente com álcool, com outras *club drugs* ou ainda com outras drogas de abuso (GAHLINGER, 2004).

Entre os anos de 2009 e 2016, 739 diferentes NPS já haviam sido reportadas por 106 países e territórios ao Escritório das Nações Unidas para Drogas e Crimes (UNODC). Apenas no ano de 2015, 100 NPS não identificadas anteriormente foram reportadas (UNODC, 2017). Esses dados mostram que realizar análises toxicológicas buscando tão somente as drogas de abuso mais comumente utilizadas nas últimas décadas, como cocaína e MDMA, é insuficiente. Um estudo realizado no Estado de São Paulo corrobora essa ideia, ao revelar que, em 150 lotes de comprimidos apreendidos pela Polícia de São Paulo, menos da metade (67) tratava-se de MDMA; os 83 outros lotes continham uma ou mais substâncias psicoativas, de naturezas químicas diversas, como 2C-B, femproporex, anfetamina, metanfetamina, mCPP, cetamina, TFMPP, fenciclidina e outras (TOGNI et al., 2014).

Nos Estados Unidos, 17 mil mortes foram relacionadas direta ou indiretamente ao uso de substâncias ilícitas no ano de 2000 (MOKDAD, 2004). Estima-se que entre 116 mil e 230 mil mortes ocorreram no mundo no ano de 2015 em decorrência do uso de drogas. Estas estimativas são baseadas em dados reportados por 86 países à UNODC, sendo que cada um deles possui seus próprios critérios para categorizar uma morte como relacionada ao uso de drogas. Este fato, somado à dificuldade em se estabelecer uma relação de causalidade entre o uso de drogas e o óbito, levam a crer que estes valores possivelmente estão subestimados (UNODC, 2017). Outro fator que agrava a subnotificação é que exames de triagem toxicológica normalmente não incluem todas as *club drugs* disponíveis (GAHLINGER, 2004).

Além das mortes por acidentes de trânsito, doenças decorrentes do uso de drogas, autoextermínio etc., o uso de drogas predispõe o usuário ao envolvimento com o crime na condição de agressor. Em 2008, dois em cada três agressores detidos pela polícia australiana tiveram resultado positivo para pelo menos uma droga ou fármaco, dentre maconha, cocaína, anfetamina, metanfetamina e benzodiazepínicos. No mesmo ano, constatou-se que 41% dos detentos australianos eram dependentes de drogas ilícitas (GAFFNEY et al., 2010).

A associação do uso de drogas com criminalidade e o surgimento de novas substâncias apontam para a necessidade de se identificar um número cada vez maior de drogas. No âmbito dos Institutos Médicos Legais (IML) e Institutos de Criminalística (IC), isso se traduz na necessidade de utilizar métodos abrangentes para análise de materiais biológicos de vítimas e agressores envolvidos em homicídios, suicídios, acidentes de trânsito, dentre outras ocorrências. O método analítico deverá ser abrangente o suficiente para contemplar desde as substâncias mais prováveis de serem encontradas, dada sua popularidade, até substâncias de surgimento recente e que ainda não tenham sido identificadas nos IMLs e ICs.

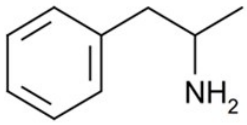
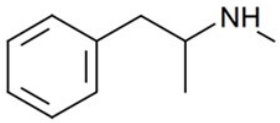
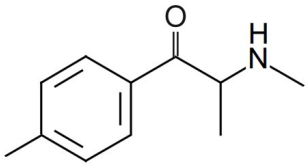
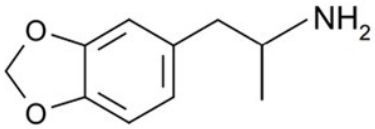
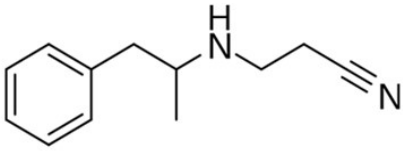
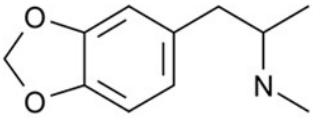
1.1. Substâncias de interesse

Dentre as várias substâncias utilizadas como *club drugs*, foram selecionadas aquelas que já foram reportadas no cenário atual brasileiro (seja por meio de relatório da UNODC, artigos científicos ou dados de apreensões policiais) bem como a disponibilidade de padrões analíticos. Por disponibilidade entende-se o acesso imediato a tais padrões, tendo em vista que a importação de padrões analíticos de substâncias proscritas – aquelas que constam na lista F da portaria 344 SVS/MS da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) – poderia implicar em atrasos significativos no início dos ensaios.

As substâncias selecionadas correspondem à droga inalterada, com exceção do cocaetileno. Como explicado adiante, o cocaetileno pode ser encontrado no sangue quando há uso simultâneo de cocaína e etanol. Considerando-se o consumo significativo de etanol na população brasileira, espera-se que seja detectado o cocaetileno em parte das amostras onde a cocaína estiver presente. Por sua importância toxicológica e pelo fato de a cocaína ser uma das drogas selecionadas para este estudo, o cocaetileno foi incluído também, apesar de não se tratar propriamente de uma droga de abuso ou *club drug*.

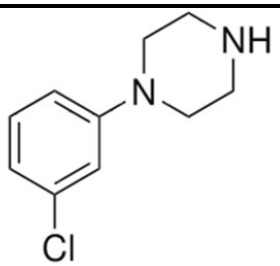
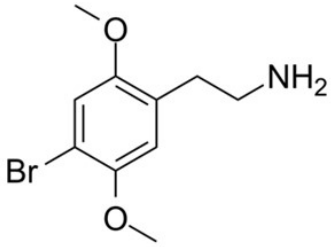
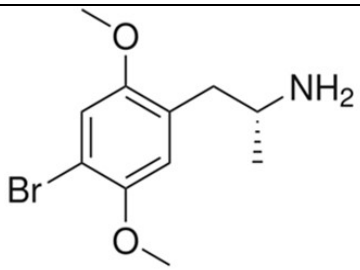
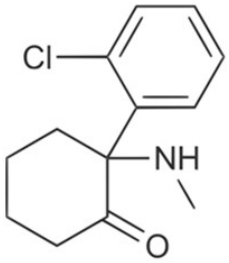
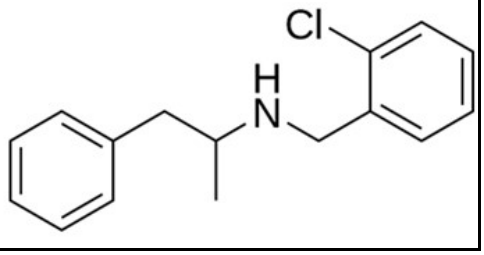
Quadro 1 – Abreviatura, fórmula molecular, massa exata e fórmula estrutual dos analitos selecionados para o estudo.

(continua)

Analito	Fórmula molecular	Massa exata (Da)	Fórmula estrutural
AMP	$C_9H_{13}N$	135,10480	
MAMP	$C_{10}H_{15}N$	149,12045	
MEF	$C_{11}H_{15}NO$	177,11536	
MDA	$C_{10}H_{13}NO_2$	179,09463	
FPX	$C_{12}H_{16}N_2$	188,13135	
MDMA	$C_{11}H_{15}NO_2$	193,11028	

Quadro 1 – Abreviatura, fórmula molecular, massa exata e fórmula estrutual dos analitos selecionados para o estudo.

(continuação)

Analito	Fórmula molecular	Massa exata (Da)	Fórmula estrutural
mCPP	$C_{10}H_{13}ClN_2$	196,07673	
2C-B	$C_{10}H_{14}BrNO_2$	259,02079	
DOB	$C_{11}H_{16}BrNO_2$	273,03644	
KET	$C_{13}H_{16}NClO$	237,09204	
CLOB	$C_{16}H_{18}ClN$	259,11278	

Quadro 1 – Abreviatura, fórmula molecular, massa exata e fórmula estrutual dos analitos selecionados para o estudo.

(conclusão)

Analito	Fórmula molecular	Massa exata (Da)	Fórmula estrutural
COC	$C_{17}H_{21}NO_4$	303,14706	
COCAET	$C_{18}H_{23}NO_4$	317,16271	

2C-B: 4-bromo-2,5-dimetoxifenetilamina; COCA: cocaína; COCAET: cocaetileno; CLOB: clobenzorex; DOB: 2,5-dimetoxi-4-bromoanfetamina; KET: cetamina; mCPP: 1-(3-clorofenil)piperazina; MEF: mefedrona; MDA: 3,4-metilenodioximetanfetamina; MDMA: 3,4-metilenodioximetanfetamina.

1.1.1. Cocaína e cocaetileno

A cocaína (benzoilmetilecgonina) (Fig. 1), alcaloide extraído das folhas de *Erythroxylum coca* L., é uma das substâncias proscritas mais utilizadas no mundo, com um número de usuários estimado em aproximadamente 17,1 milhões de pessoas (0,27 - 0,46 % da população adulta mundial) (UNODC, 2017).

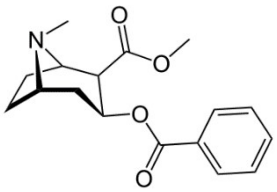


Figura 1 – Cocaína (benzoilmetilecgonina).

A cocaína atua inibindo a recaptação pré-sináptica de noradrenalina, dopamina e serotonina, resultando no aumento do tempo de permanência desses neurotransmissores na

fenda sináptica (CLAUWAERT et al., 1996; JENKINS, 2007a; SILVA et al., 2010). Por inibir a recaptação de noradrenalina, atua como um agente simpatomimético, tendo como efeitos periféricos taquicardia, hipertensão, vasoconstrição, midríase e hipertermia. A estimulação do sistema nervoso central resulta em aumento do estado de alerta, anorexia, euforia, elevação da autoconfiança e agitação, sendo tais efeitos atribuídos principalmente à atuação da dopamina (JENKINS, 2007a; ZIMMERMAN, 2012). Ainda, possui efeito anestésico local, causada pelo bloqueio do influxo de sódio para as células (JENKINS, 2007a; WETLI, 2007a).

Um dos principais efeitos observados em longo prazo em usuários de cocaína é a toxicidade cardíaca, podendo levar à morte mesmo os usuários mais jovens (WETLI, 2007a). Os mecanismos de toxicidade são muitos, envolvendo o aumento da demanda de oxigênio para o miocárdio, aceleração do processo de aterosclerose, eventos trombóticos, disfunções endoteliais, alterações hemodinâmicas, dentre outros. A combinação de todos esses fatores levará, em última instância, à isquemia e infarto do miocárdio. Estas alterações cardíacas podem ser vistas no exame necroscópico, evidenciadas pela dilatação das câmaras cardíacas, diminuição da espessura das paredes cardíacas, lesões necróticas, cicatrizes subendocárdicas etc, além de outras alterações microscópicas (POTT JUNIOR; FERREIRA, 2009).

A autoadministração da cocaína pode ocorrer por via respiratória (intranasal e pulmonar), injeção intravenosa ou via oral (CONE, 1995; SILVA et al., 2010; ZIMMERMAN, 2012). A absorção e, consequentemente, o início dos efeitos dependerão da via de exposição utilizada, sendo que a concentração plasmática máxima (C_{max}) é alcançada em menos de 5 minutos pelas vias pulmonar e intravenosa. Já a mucosa bucal, via de exposição utilizada no ato de mascar as folhas de coca, é a via que propicia a absorção mais lenta, com C_{max} atingida entre 0,4 a 2,0 horas (JENKINS, 2007a).

A cocaína é excretada na urina, principalmente na forma de seus produtos de biotransformação: 1 a 9% corresponde à droga inalterada; 35 a 54% é excretado como benzoilecgonina (BE) e 32 a 49% na forma de éster metil ecgonina (EME), sendo estes dois últimos seus principais produtos de biotransformação (JENKINS, 2007a; WETLI, 2007a). Outro marcador, subproduto da pirólise da cocaína, é a anidroecgonina metil éster (AEME), encontrada quando o uso se fizer pela via pulmonar, através da queima do crack (JENKINS, 2007a).

A cocaína é muito instável em amostras não preservadas, sendo hidrolisada a EME e BE (PETERS, 2007). A formação de BE *in vitro* ocorre por hidrólise alcalina, enquanto a EME é formada enzimaticamente pela ação da butirilcolinesterase plasmática (REES et al., 2012;

WARNER; NORMAN, 2000); adicionalmente, BE e EME são hidrolisadas a ecgonina (SKOPP et al., 2001).

Embora a cocaína seja estável em urina em pH menor que 7, em amostras de sangue, mesmo em meio ácido, a hidrólise de cocaína continua a ocorrer devido à atividade residual de esterases (SKOPP, 2004). O uso de fluoreto como conservante e o armazenamento em baixas temperaturas reduz a degradação da cocaína *in vitro*, porém não para o processo completamente (PETERS, 2007; SKOPP, 2004). Deste modo, para análise de cocaína em sangue, deve-se levar em consideração tanto as condições de armazenamento da amostra (temperatura e uso de conservante), como o tempo decorrido entre a coleta e a análise – devendo esta ser realizada o mais rápido possível para uma melhor interpretação dos resultados.

Quando administrada concomitantemente ao álcool, o produto de transesterificação cocaetileno será encontrado, resultado da ação de metilesterases hepáticas (figura 2). O cocaetileno é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, sendo também ativa no sistema nervoso central. Tal combinação é frequente entre usuários da droga, que relatam a ocorrência de grande euforia, porém com menos efeitos indesejados, como paranoia e agitação (BAILEY, 1993; MCCANCE-KATZ; KOSTEN; JATLOW, 1998).

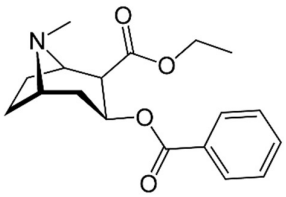


Figura 2 – Cocaetileno.

A presença de cocaetileno aumenta a concentração plasmática da cocaína e está associada a mais efeitos tóxicos do que o álcool ou a cocaína utilizadas isoladamente (LAIZURE; PARKER, 2009). A despeito de possuir efeito farmacologicamente semelhante ao da cocaína, o cocaetileno possui meia-vida mais longa e é associada a uma maior letalidade do que a própria cocaína, aumentando em 40 vezes o risco de evento cardíaco agudo e em 25 vezes o risco de morte súbita (KATZ; TERRY; WITKIN, 1992).

Em um levantamento realizado através do Sistema Nacional de Informações Médico-Legais da Austrália (*National Coroners Information System*), 49 mortes relacionadas ao uso de cocaína foram registradas no estado de Victória, no período de 2000 a 2011. Dentre estes 49 óbitos, o cocaetileno estava presente em 8 deles (16,3%) (PILGRIM; WOODFORD; DRUMMER, 2013). Em um estudo caso-controle prospectivo que analisou casos de morte súbita no Instituto de Medicina Legal de Sevilha, de 21 casos relacionados ao uso de cocaína,

em 16 foi confirmado o uso concomitante de álcool (LUCENA et al., 2010). Com grande prevalência de uso de cocaína e de álcool no Brasil, espera-se que o cocaetileno possa estar presente em um número considerável de amostras de natureza forense.

1.1.2. Estimulantes anfetamínicos (ATS – *amphetamine-like stimulants*)

Estimulantes anfetamínicos ou estimulantes tipo anfetamina (ATS) são um grupo de substâncias, em sua maioria de origem sintética, derivadas do esqueleto β-fenetilamina (Fig. 3) (CHASIN; SILVA; CARVALHO, 2014). Trata-se de uma classe extensa de substâncias, formada pelos derivados oriundos de modificações na cadeia lateral ou de substituições no anel aromático. São as substituições no anel aromático as responsáveis pelas maiores alterações qualitativas nos efeitos farmacológicos observados (UNODC, 2006) .

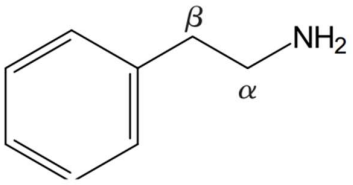


Figura 3 – Esqueleto β-fenetilamina.

As anfetaminas são substâncias simpatomiméticas, de ação estimulante central e periférica; estes efeitos são causados pelo aumento da concentração sináptica dos neurotransmissores noradrenalina e dopamina, causado pela inibição da recaptação, estímulo à liberação ou ambos mecanismos combinados (JENKINS, 2007b). Além disso, os anfetamínicos são inibidores da monoaminooxidase (MAO), enzima responsável pela oxidação da noradrenalina e serotonina (CHASIN; SILVA; CARVALHO, 2014).

Dentre os efeitos centrais, podemos citar aumento do estado de alerta, agitação, aumento da temperatura corporal e supressão de apetite. Perifericamente, observa-se aumento da frequência cardíaca, da pressão arterial e da frequência respiratória. Em altas doses, os anfetamínicos provocam um quadro acentuado das manifestações citadas, havendo também delírios, hipertensão pronunciada, arritmia, podendo inclusive haver falência renal, convulsões, colapso circulatório e morte. Entretanto, ocorrências fatais não são comuns devido à grande tolerância que ocorre com o uso de compostos anfetamínicos (CHASIN; SILVA; CARVALHO, 2014).

Os efeitos cardiovasculares das anfetaminas assemelham-se aos observados com as aminas simpatomiméticas (como a efedrina e fenilpropanolamina) e cocaína. O uso crônico de anfetaminas pode desencadear vasoespasmo arterial coronário e sistêmico, resultando em

sobrecarga do coração, deficiência no aporte de sangue ao miocárdio e falência congestiva, quadro semelhante aos estágios avançados de hipertensão. Morte súbita por complicação cardíaca pode ocorrer, e os eventos cardiovasculares lembram aqueles observados em usuários crônicos de cocaína (WETLI, 2007b).

Os ATS são encontrados no mercado ilegal em diversas formas de apresentação (pós, cápsulas, comprimidos), podendo ser utilizados pelas vias oral, intranasal, intravenosa ou pulmonar (UNODC, 2006), sendo a última via de exposição mais comum para a metanfetamina (JENKINS, 2007b).

Atualmente, estima-se que existam aproximadamente 58 milhões de usuários de ATS no mundo, sendo que 21 milhões destes são usuários de 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) (UNODC, 2017).

Dentre os ATS existentes, o presente trabalho tem como objetivo identificar aquelas substâncias cujo uso tem sido reportado com maior frequência no Brasil. Deste modo, fazem parte do presente trabalho: anfetamina, metanfetamina, MDMA, 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA), 4-bromo-2,5-dimetoxifenetilamina (2C-B) e femproporex.

1.1.2.1. Anfetamina, metanfetamina e femproporex

A substância anfetamina (Fig. 4a), protótipo do grupo das anfetaminas, foi sintetizada em 1887, por Lazar Edeleanu, porém seus efeitos farmacológicos só começaram a ser investigados na década de 1930 (BONO, 2007; CHASIN; SILVA; CARVALHO, 2014; MOORE, 1999). Foi nessa época em que se tornou evidente o potencial de abuso dessa substância, e desde então seu uso não terapêutico tem sido observado (MOORE, 1999). Dentre os efeitos resultantes de sua atividade estimulante, podemos destacar inquietação, tontura, tremor, reflexos hiperativos, loquacidade, tensão, irritabilidade, fraqueza, insônia, febre e euforia. Em geral, a hiperestimulação central é seguida por fadiga e depressão. Os efeitos cardiovasculares são comuns e incluem cefaleia, calafrios, palidez ou rubor, palpitação, arritmias cardíacas, angina, hipertensão ou hipotensão e colapso circulatório. Pode ocorrer sudorese excessiva. Os sintomas gastrintestinais incluem boca seca, gosto metálico, anorexia, náuseas, vômitos, diarreia e cólicas abdominais (WESTFALL; WESTFALL, 2006). Em quadros de intoxicação severa, são observados com frequência agitação, ideação suicida, alucinações, delírios, confusão e dor no peito (HEISHMAN, 2007).

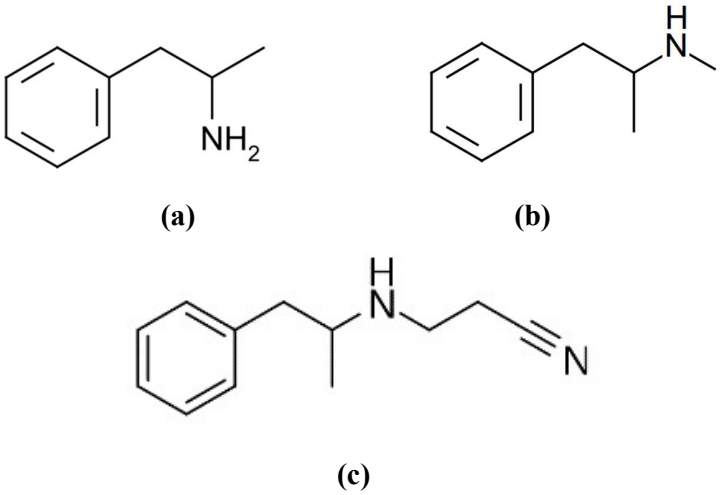


Figura 4 – (a) Anfetamina, (b) metanfetamina e (c) femproporex.

É importante notar que nas análises toxicológicas forenses a simples presença de anfetamina e seus produtos de biotransformação não é suficiente para assegurar que a pessoa fez uso da anfetamina em si. A anfetamina é produto de biotransformação de outras substâncias, lícitas ou ilícitas, como por exemplo metanfetamina, femproporex e selegilina (KRAEMER; MAURER, 2002).

A metanfetamina (Fig. 4b), um dos principais derivados da anfetamina, foi sintetizada pela primeira vez em 1919 no Japão, patenteada em 1920 e em seguida comercializada como o anorexígeno Methadrine® (LOGAN, 2002). Os efeitos estimulantes centrais e periféricos são semelhantes aos observados para a anfetamina, podendo ser utilizado por via oral, via pulmonar (aspirado ou fumado) e via intravenosa (LOGAN, 2002). Independentemente da via de administração, a metanfetamina é biotransformada em anfetamina (POTT JUNIOR; FERREIRA, 2009).

Dentre as anfetaminas utilizadas clinicamente como anorexígenos, o femproporex (Fig. 4c) foi uma das mais utilizadas. No final de 2011, o femproporex, juntamente com a amfepramona e o mazindol, teve sua comercialização proibida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2011a). Entretanto, este decreto foi revogado em 2014, regulamentando a venda de medicamentos anorexígenos à base de femproporex, amfepramona, mazindol e sibutramina (BRASIL, 2014a). A despeito do período em que teve sua comercialização proibida, o femproporex nunca deixou de ser comercializado, principalmente na forma de comprimidos de “rebite”, vendidos a caminhoneiros e profissionais cuja atividade exija concentração por longos períodos.

Em um estudo realizado com 2235 condutores, em 26 estados e no Distrito Federal do Brasil, ATS e seus metabólitos foram encontrados nas amostras de 60 condutores, sendo o femproporex a substância mais frequentemente encontrada dentre os ATS pesquisados (25 amostras) (ZANCANARO et al., 2012). Em outro estudo, realizado nas rodovias do estado de São Paulo, 75 de 452 caminhoneiros entrevistados admitiram já terem feito uso de estimulantes anfetamínicos em algum momento de suas vidas, sendo o principal objetivo do uso (70%) permanecer acordado. Dentre os caminhoneiros que souberam dizer qual ATS faziam (ou já fizeram) uso, 67% citaram o femproporex (LEYTON et al., 2012).

1.1.2.2. MDA e MDMA

Club drugs como MDMA, MDA, 3,4-metilenodioxietilanfetamina (MDEA) e outras, ganharam popularidade nas festas *raves*; elas produzem sentimentos de euforia, energia e um desejo de socializar, motivo pelo qual são chamadas de drogas entactógena (KRAEMER; MAURER, 2002).

A MDMA (Fig.5a) foi sintetizado em 1914 com o objetivo de obter um fármaco anorexígeno. Como os testes em animais mostraram resultados inexpressivos, a substância não chegou a ser testada em humanos. Em 1965, a MDMA começou a ser prescrito por alguns psiquiatras como agente empatógeno. Mas foi no meio da década de 80 que a substância começou a ser sintetizada em laboratórios clandestinos para uso recreacional (GAHLINGER, 2004). A MDMA é normalmente utilizado por via oral, encontrado na forma de comprimidos (HEISHMAN, 2007) .

(a) (b)

Figura 5 – (a) MDMA e (b) MDA.

A MDMA aumenta a concentração sináptica de neurotransmissores como serotonina, noradrenalina e dopamina, tanto pelo aumento da liberação destes pelos neurônios pré-sinápticos, como pela inibição da MAO (GAHLINGER, 2004). Os efeitos cardiovasculares são similares àqueles observados com outros estimulantes, como aumento da frequência cardíaca e pressão arterial, como consequência da liberação periférica de noradrenalina (HEISHMAN,

2007). Dentre as sensações reportadas por usuários, temos agitação, percepção distorcida do tempo, diminuição da fome e da sede, um profundo *insight,* bem estar (GAHLINGER, 2004), exacerbação da emotividade, aumento da intimidade com outras pessoas e alucinações moderadas, sendo este último efeito relacionado à interação com receptores pós sinápticos 5-HT_2 (HEISHMAN, 2007). Dentre os sintomas relacionados à hiperestimulação simpática podemos citar ainda a midríase, diaforese, tremores, arritmias e acentuada hipertermia (GAHLINGER, 2004).

Além da MDMA, outra anfetamina alucinógena que pode ser encontrada como *club drug* é a MDA (Fig. 5b), que difere da MDMA apenas pela ausência de uma metila na função amina e que possui propriedades farmaco e toxicológicas semelhantes às da MDMA. A MDA não possui aplicação clínica, sendo usada exclusivamente como droga de abuso por via oral ou intravenosa e é também produto de biotransformação da MDMA (JENKINS, 2007b).

1.1.2.3. Clobenzorex

O clobenzorex (N-(2-clorobenzil)anfetamina) é uma droga anorexígena, comercializada em alguns países da América do Norte e Central sob o nome comercial de Asenlix®, contudo banida na maioria dos países, incluindo o Brasil (BRASIL, 2017; CODY; VALTIER, 2001).

O clobenzorex é uma das várias substâncias que são biotransformadas e excretadas na urina como anfetamina. Assim como outros anfetamínicos utilizados na perda de peso, como sibutramina, fenfluramina e dexfenfluramina, tem sido implicada no surgimento de efeitos colaterais do sistema cardiovascular, como hipertensão arterial sistêmica e hipertensão pulmonar arterial (LOZANO-CUENCA et al., 2017).

A despeito de ser substância de uso proscrito no Brasil, comprimidos contendo clobenzorex continuam sendo apreendidos pelas Polícias Civis (TOGNI et al., 2014).

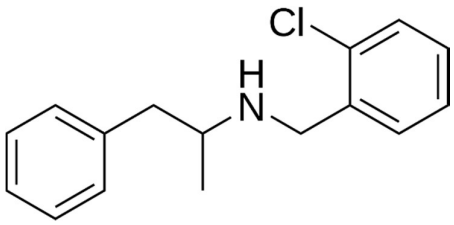
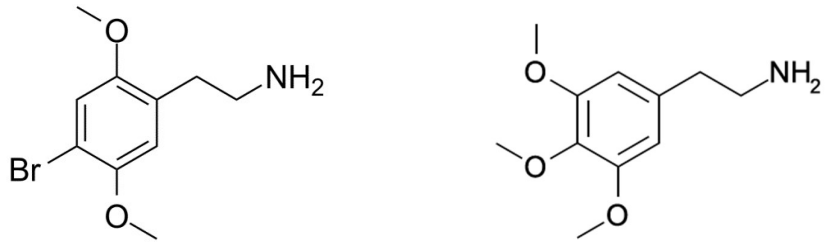


Figura 6 – Clobenzorex.

1.1.2.4. 2C-B

A 4-bromo-2,5-dimetoxifenetilamina (2C-B) (Fig. 7a) é um dos derivados de fenetilamina disponíveis no mercado de *club drugs*. O 2C-B, estruturalmente relacionado à mescalina (Fig. 7b), surgiu no final da década de 70, mas começou a ganhar popularidade apenas em 1985, após a proibição do MDMA nos EUA (BOUSO et al., 2008; SHULGIN; CARTER, 1975).



(a) (b)

Figura 7 – (a) 2C-B e (b) mescalina.

Normalmente, o 2C-B é consumido pela via oral, embora também possa ser utilizado por via intranasal. Estudos em modelo animal demonstram que o 2C-B distribui-se por vários tecidos, sendo encontrado em maiores concentrações no cérebro e nos pulmões.

A exposição a 2C-B leva a um aumento no nível cerebral de dopamina, e provavelmente também de serotonina e noradrenalina. Estudos em modelos animais indicam que, além da liberação de dopamina, ocorre também inibição da MAO; em altas concentrações ocorre inibição da recaptação de serotonina e noradrenalina através da inibição dos transportadores de serotonina e noradrenalina. Em nível de receptores, o 2C-B ativa os receptores 5-HT_{2C} e provavelmente, o α_1 adrenoceptor. Interessante notar que, a despeito do seu potente efeito alucinógeno, o 2C-B não ativa o receptor 5-HT_{2A}, o qual considera-se responsável por tais manifestações (NUGTEREN-VAN LONKHUYZEN et al., 2015).

O 2C-B causa tanto efeitos estimulantes similares aos dos ATS, bem como alucinações similares às causadas por mescalina. Em pequenas doses (<10 mg), são relatados euforia, aumento dos sentidos (tato, olfato, visão e audição) e estimulação geral. Com doses moderadas (10-20 mg) observa-se alucinações visuais, com exacerbação de cores e distorção de objetos. Em doses altas (>20 mg) há intensificação das alucinações, podendo gerar ansiedade, além de efeitos simpatomiméticos como taquicardia, hipertensão e hipertermia. Dificuldade de focalização visual, tremor, sudorese, náusea, dentre outros efeitos desagradáveis foram

relatados por usuários de 2C-B (CAUDEVILLA-GÁLLIGO et al., 2012; NUGTEREN-VAN LONKHUYZEN et al., 2015; SHULGIN; CARTER, 1975).

A despeito do uso recreacional relativamente antigo, o 2C-B passou a ser considerado substância de uso proscrito no Brasil apenas em 2014, quando foi incluído na lista F da portaria 344 SVS/MS ANVISA, através da resolução de diretoria colegiada (RDC) n° 06, de 18/02/2014 (BRASIL, 2014b).

1.1.2.5.DOB

O 2,5-dimetoxi-4-bromoanfetamina (DOB ou brolanfetamina) (Fig. 8), é uma fenilalquilamina modificada, derivada do 2,5-dimetoxianfetamina (2,5-DMA). Difere do MDMA, principal representante do grupo das fenilalquilaminas, pelo tipo e intensidade de efeitos produzidos no usuário. Possui ação agonista sobre os receptores 5-HT_2, causando alucinações intensas e potencial para causar tolerância em usuários crônicos. É comercializada na forma de cápsulas ou impregnada em selos, à semelhança da dietilamida do ácido lisérgico (LSD). Os efeitos experimentados incluem sensação de bem-estar, aumento da vigília, da atividade auditiva e visual. Com o aumento da dose, efeitos desagradáveis começam a surgir, como cãibra, *flashes* de alucinação, perda de memória e comportamento violento. A dose na qual as sensações desejadas são experimentadas e a dose tóxica são muito próximas. Somado a este fato, o tempo para o início das sensações é longo; a combinação destes dois fatores pode levar o usuário a ingerir altas doses, imaginando não ter ingerido o suficiente, correndo o risco de sofrer uma *overdose* (DA COSTA *et al.*, 2007).

No Brasil, existem registros de apreensão de DOB na forma de comprimidos e de "selos" (ou *blotter paper*) (DA COSTA et al., 2007; SOUZA et al., 2016).

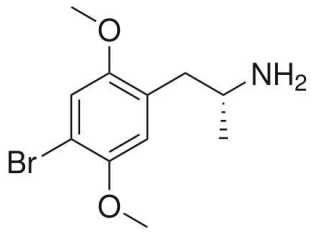


Figura 8 – 2,5-dimetoxi-4-bromoanfetamina (DOB).

1.1.3. Mefedrona

A mefedrona (MEF) ou 4-metil-metcatinona (fig. 9) é uma catinona substituída de efeito estimulante, usada em substituição ao MDMA em comprimidos vendidos como *ecstasy* (BRUNT et al., 2011). O análogo natural da mefedrona, a catinona, é o componente ativo presente no vegetal khat (*Catha edulis*), cujas folhas eram mascadas em países da África devido às suas propriedades estimulantes. A catinona sintética mefedrona é produzida pela substituição do hidrogênio na posição 4 do anel aromático por uma metila (DYBDAL-HARGREAVES et al., 2013).

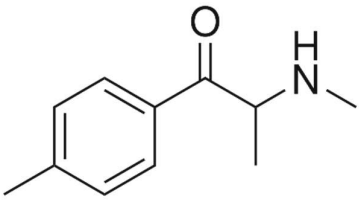


Figura 9 – Mefedrona.

Sintetizada pela primeira vez em 1929, começou a ganhar popularidade apenas em 2007, quando começou a ser comercializada pela internet sob os nomes “MMCat”, “Meow/Miaow”, “Meph”, “Bubbles” e “Diablo XXX”, dentre outros, tendo sido apreendida pela primeira vez na Europa, no mesmo ano. Pode ser encontrada na forma de comprimidos, cápsulas ou pó branco cristalino ou levemente amarelado. Além do uso por via oral, há relatos de uso por via intranasal e intravenosa. Entretanto, há relatos de que o uso por essa última via causa intenso ardor durante a injeção (DA COSTA; LANARO; CAZENAVE, 2014).

Por causa da semelhança física entre os comprimidos, usuários têm adquirido comprimidos contendo mefedrona, pensando se tratar de *ecstasy*. Os efeitos desejados pelo usuário incluem euforia, estimulação geral, maior harmonia e prazer ao ouvir música, aumento do humor, da função mental e da libido (DA COSTA; LANARO; CAZENAVE, 2014). Manifestações clínicas como agitação, taquicardia, confusão ou psicose, dor no peito, náuseas, palpitações, vasoconstricção periférica e dor de cabeça foram reportadas, bem como casos de morte (DICKSON et al., 2010; JAMES et al., 2011; LUSTHOF et al., 2011; MASKELL et al., 2011).

Estudos em ratos demonstraram que a mefedrona induz liberação de serotonina e dopamina no núcleo *accumbens*. Interessante notar que a liberação de serotonina é semelhante, em magnitude, àquela produzida por administração de MDMA; entretanto, com relação à

liberação de dopamina, a quantidade liberada é aproximadamente o dobro daquela observada para o uso de MDMA. Estudos demonstram que mefedrona inibe a recaptação de dopamina, noradrenalina e serotonina em tecido cerebral, além de possuir afinidade com o receptor serotoninérgico 5-HT_{2A} e adrenérgico α_{2A} (GREEN et al., 2014).

A mefedrona já foi identificada em comprimidos apreendidos no Brasil, tendo sido incluída na portaria SVS/MS nº 344 da ANVISA em 2011 (BRASIL, 2011b).

1.1.4. Cetamina

A cetamina (2-(2-clorofenil)-2-(metilamino)-cicloexanona) (fig. 10) foi sintetizada na década de 1960 a partir da fenciclidina (PCP) para ser utilizada como anestésico. Causa anestesia sem depressão respiratória pela inibição da captação dos neurotransmissores norepinefrina, serotonina, glutamato e dopamina pelos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA). Devido aos efeitos colaterais – dentre eles alucinações – seu uso médico ficou limitado, estando disponível principalmente em apresentações de uso veterinário (GAHLINGER, 2004).

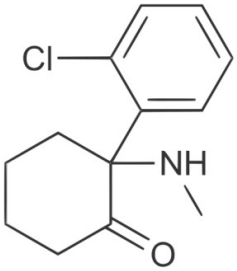


Figura 10 – Cetamina.

O usuário de cetamina experimenta distorções da realidade, como a sensação de corpo e mente flutuando separadamente. Pode reduzir a sensibilidade, causando a incapacidade de se movimentar enquanto sob influência da droga. Altas doses, especialmente quando combinadas com álcool, benzodiazepínicos ou opioides, afetam a respiração e o funcionamento cardíaco, podendo levar a um estado de inconsciência. Usuários crônicos podem desenvolver sérios problemas de bexiga, com fortes dores e dificuldade para urinar, podendo inclusive ser necessária a remoção cirúrgica da bexiga (NHS, 2012). São também efeitos comuns confusão, amnésia anterógrada e delírio (GAHLINGER, 2004).

Como a cetamina é difícil de ser sintetizada, normalmente ela é obtida a partir das preparações de uso animal, encontrada na forma de soluções, que podem ser ingeridas, injetadas ou reduzidas a pó. Na forma de pó, a cetamina pode então ser misturada a tabaco ou maconha

e fumada em cigarros, ou usada por via intranasal. Pode ser encontrada em *mixes*, juntamente com anfetamina, cocaína, sildenafila ou heroína (GAHLINGER, 2004).

1.1.6. mCPP

Dentre as NPS surgidas a partir da década de 90, encontra-se o grupo de substâncias derivadas de piperazina. Estes podem ser divididos em dois principais grupos: as benzilpiperazinas, como a N-benzilpiperazina (BZP) e 1-(3,4-metilenodioxibenzil)piperazina (MDBP); e as fenilpiperazinas, como a 1-(3-clorofenil)piperazina (mCPP) e a 1-(3-trifluorometilfenil)piperazina (TFMPP) (ARBO; BASTOS; CARMO, 2012; STAACK et al., 2007). A mCPP (fig. 11) é o derivado de piperazina mais estudado dentre estes, uma vez que é um metabólito ativo de substâncias clinicamente utilizadas – os antidepressivos trazodona, nefazodona e etoperidona (DA COSTA; LANARO; CAZENAVE, 2014; STAACK; MAURER, 2003).

Os derivados de piperazina são vendidos na forma de cápsulas, comprimidos ou drágeas, ou ainda na forma de pó ou líquido, e são consumidas como uma alternativa aos NPS derivados de anfetaminas (ARBO; BASTOS; CARMO, 2012; STAACK; MAURER, 2003). Ainda, podem aparecer como adulterantes de MDMA e cocaína (ARBO; BASTOS; CARMO, 2012; STAACK et al., 2007). A mCPP, conhecido em alguns países como X4, *rainbow*, *regenboogies* e *arc-em-ciel*, foi identificado pela primeira vez na Suécia, em 2004, e no Brasil, a primeira apreensão se deu em 2007, em uma agência de Correios no Estado de Goiás (DA COSTA; LANARO; CAZENAVE, 2014). No Brasil, e especialmente no Estado de São Paulo, a principal forma de apresentação encontrada é a de comprimidos. Estes comprimidos, quando submetidos ao teste de Scott – teste colorimétrico amplamente utilizado na triagem de cocaína – desenvolvem coloração azul, diferenciando-os de comprimidos de MDMA (LANARO et al., 2010).

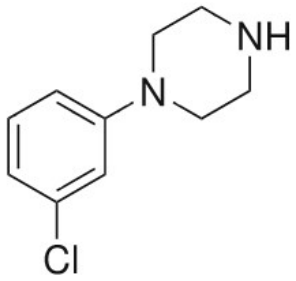


Figura 11 – 1-(3-clorofenil)piperazina (mCPP).

O uso recreacional da mCPP está relacionado aos efeitos estimulantes e alucinógenos, similares aos efeitos do MDMA, LSD (dietilamida do ácido lisérgico) e mescalina, além do efeito entactógeno, também observado no uso do MDMA (DA COSTA; LANARO; CAZENAVE, 2014).

Estudos *in vitro* demonstraram que a mCPP induz liberação de serotonina e possui ação agonista sobre receptores 5-HT_{2C} e propriedades antagonistas em receptores 5-HT_{2B}. Ainda, a mCPP produz discreta liberação de dopamina, o que resulta em menor potencial de reforço quando comparado a outras drogas, como as anfetaminas. A mCPP não possui potencial neurotóxico, tendo em vista que a serotonina liberada é a citoplasmática apenas, e não a vesicular, de modo que não leva à depleção deste neurotransmissor no longo prazo (ARBO; BASTOS; CARMO, 2012; STAACK et al., 2007). Os efeitos subjetivos da mCPP assemelham-se àqueles causados pelo MDMA, incluindo ansiedade, tonturas, alucinações, náusea, ondas de frio e calor, enxaquecas e ataques de pânico (ARBO; BASTOS; CARMO, 2012). Em pacientes em abstinência de álcool, os efeitos produzidos são semelhantes aos efeitos euforizantes iniciais produzidos pelo álcool. Em alguns casos, um aumento de ansiedade é reportado, sendo que em usuários de MDMA a ocorrência desse efeito indesejado é menor (STAACK; MAURER, 2003). Além da liberação de neurotransmissores, a mCPP demonstrou propriedades neuroendócrinas, com liberação de ACTH, prolactina e cortisol na corrente sanguínea (FEUCHTL et al., 2004; KLAASSEN et al., 2002), levando, como consequência, ao aumento da temperatura corporal, ansiedade, aumento das pressões sistólica e diastólica, taquicardia e aumento do metabolismo cerebral de glicose (DA COSTA; LANARO; CAZENAVE, 2014).

Em análises toxicológicas, a identificação do mCPP deve ser capaz de diferenciar o consumo de mCPP do consumo de fármacos como trazodona, nefazodona, etoperidona e mepiprazol. A diferenciação pode ser realizada pela identificação das substâncias parentais e de metabólitos únicos, como hidroxi-trazodona e desamino-hidroxi-nefazodona (STAACK; MAURER, 2003).

1.2. Etapas da análise toxicológica

A realização de um exame toxicológico envolve diversas etapas, e em cada etapa do processo é necessário tomar uma série de cuidados e estar ciente das variáveis que podem interferir no resultado final. O processo analítico pode ser dividido em três fases: pré-analítica, analítica e pós-analítica (figura 13). Compreendem a fase pré-analítica: levantamento do histórico do caso, coleta de material biológico e armazenamento. A fase analítica constitui-se

no preparo da amostra e na realização da análise química em si, e a pós-analítica consiste e na interpretação e discussão dos resultados obtidos (FLANAGAN et al., 2007; SKOPP, 2004).

Figura 12 – Etapas da análise toxicológica.

Para a realização da coleta, é necessário saber qual matriz biológica (ou quais matrizes) deverão ser coletadas – escolha essa orientada por fatores como: probabilidade de se identificar o analito naquela matriz; relevância de dados quali e quantitativos obtidos a partir da análise daquela matriz; disponibilidade de metodologias do laboratório que irá executar o exame; disponibilidade da matriz; etc. É importante documentar o estado de conservação do cadáver (se putrefeito ou não); a região anatômica da coleta; e o tempo estimado decorrido entre a morte e a coleta do material. Além disso, é essencial a correta identificação da amostra com todos elementos necessários para a individualização da amostra, como nome da vítima (ou outro elemento identificador), número de registro interno, data de coleta, natureza da amostra etc (DINIS-OLIVEIRA et al., 2010). A identificação correta é o primeiro passo para a preservação da cadeia de custódia.

Em se tratando de sangue, é importante que uma alíquota coletada seja preservada (preferencialmente, com fluoreto de sódio) e que outra seja coletada sem uso de conservantes – tendo em vista que pode haver, para alguns analitos de interesse, degradação na presença do

conservante. A amostra deverá ser armazenada a -20 ºC (ou, preferencialmente, a -80ºC) quando o exame não for ser realizado imediatamente. Ainda, o tempo decorrido entre a coleta e a realização da análise é fator relevante no resultado encontrado, levando-se em consideração a estabilidade dos analitos. Em alguns casos, como o que ocorre com a cocaína, mesmo com o uso de conservante a degradação não é completamente impedida, mas apenas retardada (DINIS-OLIVEIRA et al., 2010; SKOPP, 2004). A maioria dos estudos sobre estabilidade de substâncias de interesse toxicológico não avalia períodos tão longos quanto aqueles que muitas vezes ocorrem na prática nos diversos institutos forenses oficiais no Brasil.

Na fase analítica, o preparo de amostra tem como principais objetivos: extrair o analito de interesse da matriz biológica, transferindo-o para um meio compatível com a técnica analítica a ser empregada; promover o *clean-up* da amostra – através do qual interferentes são removidos, preservando a vida útil do equipamento, bem como facilitando a interpretação dos resultados; e promover a concentração do analito, já que muitas vezes este se encontra na matriz em concentrações mais baixas do que a técnica analítica empregada é capaz de identificar e quantificar (SIQUEIRA, 2008).

Após a realização da análise – utilizando-se da técnica considerada mais adequada para a identificação e quantificação do analito (ou analitos) em questão – os resultados encontrados deverão ser interpretados e discutidos, em equipe multidisciplinar, à luz dos dados colhidos na fase pré-analítica, como histórico do caso, região anatômica da coleta, qualidade da amostra etc.

Diversas matrizes biológicas podem ser utilizadas em análise toxicológica forense, como sangue, urina, conteúdo estomacal, humor vítreo, dentre outras. Entretanto, o sangue constitui-se a matriz de primeira escolha em casos forenses, uma vez que são os dados quantitativos em sangue que possibilitarão inferir se o indivíduo encontrava-se sob efeito da substância e se o agente detectado poderia ter contribuído diretamente para a causa de morte. Em amostras *post mortem*, normalmente não é possível separar as células vermelhas, devido à hemólise que ocorre após a morte do indivíduo. Tendo em vista a abrangência da metodologia a ser desenvolvida, que deverá ser aplicada a casos forenses *in vivo* e *post mortem*, o presente estudo será desenvolvido utilizando sangue total como matriz de escolha (DRUMMER, 2004; FLANAGAN et al., 2007; SKOPP, 2004).

1.3. Análise por espectrometria de massas

A espectrometria de massas (MS) tem sido a técnica analítica mais utilizada em análises toxicológicas e análises forenses, normalmente acoplada a cromatografia líquida (LC) ou a cromatografia gasosa (GC). As fontes de ionização e os analisadores disponíveis são de variados tipos, o que gera diferentes configurações possíveis para esses equipamentos, cada um com suas peculiaridades, vantagens e limitações. Assim, faz-se necessária uma breve explanação acerca da técnica analítica empregada no presente trabalho.

O primeiro passo em uma análise por espectrometria de massas é a formação de íons no estado gasoso. O íon molecular pode sofrer fragmentações, gerando íons radicalares e moleculares que também podem ser fragmentados, e assim sucessivamente. Os íons produzidos são analisados no espectrômetro de massas de acordo com a razão massa/carga (*m/z*) que possuem, e são determinados proporcionalmente à sua abundância. A partir da análise dos espectros de massas obtidos é possível obter informações sobre a natureza e a estrutura da molécula precursora (HOFFMAN; STROOBANT, 2007a).

O primeiro espectrômetro de massas foi construído em 1912, por Thomson. Desde então, a espectrometria de massas tem evoluído década após década, exibindo um acelerado aprimoramento dos anos 90 até os dias de hoje. Se no início do século passado o espectrômetro construído por Thomson era capaz de analisar apenas moléculas pequenas, com até 100 Da, hoje é possível analisar macromoléculas como proteínas, ácido desoxirribonucleico (DNA) e até mesmo partículas virais intactas, na ordem de MDa (HOFFMAN; STROOBANT, 2007a).

1.3.1. A fonte de ionização: eletrospray

Diferentes fontes de ionização encontram-se disponíveis, sendo empregadas de acordo com as propriedades físico-químicas das substâncias a serem investigadas. A ionização por elétrons (EI) e a ionização química (CI) são adequadas apenas para ionização em meio gasoso, restringindo seus usos a moléculas suficientemente voláteis e termoestáveis. Moléculas termolábeis e com baixa pressão de vapor necessitam ser extraídas da fase condensada (sólida ou líquida) para a fase gasosa (HOFFMAN; STROOBANT, 2007b). Dentre as fontes disponíveis para a análise destas moléculas, estão MALDI (*matrix-assisted laser desorption/ionization*), APCI (*atmospheric pressure chemical ionization*), APPI (*atmospheric pressure chemical ionization*), eletrospray (ESI) etc (fig. 13) (HOFFMAN; STROOBANT, 2007b).

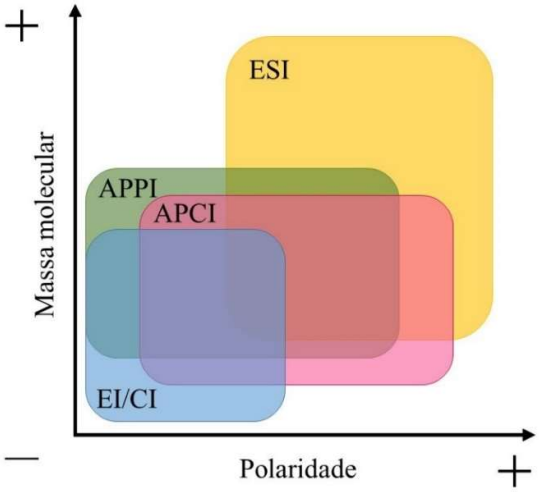


Figura 13 – Principais fontes de ionização utilizadas em cromatografia líquida (ESI, APPI e APCI) e gasosa (EI e CI). Adaptado de Lanças (2009).

Os fundamentos da ESI começaram a ser investigados no final do século XIX por Lorde Rayleigh, e continuou a ser estudado ao longo do século XX (DOLE et al., 1968; GEOFFREY TAYLOR, 1964; RAYLEIGH, 1882; ZELENY, 1914). Entretanto, foi apenas na década de 1980 que a ESI ganhou notoriedade, por meio dos trabalhos de John Bennet Fenn que, inspirado por Dole *et al.* (1968), aprimorou a técnica e a aplicou na análise de proteínas e oligopeptídeos. Fenn analisou proteínas de até 130 kDa utilizando um analisador quadrupolo, cujo limite superior é de aproximadamente 400 *m/z* (FENN et al., 1989; YAMASHITA; FENN, 1984a, 1984b). Estes avanços representaram uma quebra de paradigma por dois motivos: por permitir a aplicação da espectrometria de massas a moléculas não-voláteis ou termolábeis, e pela possibilidade de acoplamento eficaz com a cromatografia líquida. A partir de então, o uso de ESI foi progressivamente estendido a moléculas polares de baixo peso molecular, uma vez que com ESI pode-se alcançar baixos limites de detecção, além da facilidade de acoplamento com sistemas de cromatografia líquida e eletroforese capilar (HOFFMAN; STROOBANT, 2007b).

Substâncias passíveis de análise por GC-MS podem também ser analisadas por LC-ESI-MS. A escolha entre uma ou outra técnica dependerá, dentre outros fatores, da disponibilidade dos recursos.

Na ESI, o eletrospray é produzido pela aplicação de um campo elétrico a um líquido que flui continuamente por um capilar a uma baixa velocidade (na ordem de µL/min), sob pressão atmosférica. Conforme o líquido flui, a gota formada na saída do capilar se deforma, uma vez que o campo elétrico aplicado induz a concentração de carga na superfície do líquido. Assim, a gota passa de um formato esférico para um elíptico, que com o aumento da diferença de

potencial deforma-se a tal ponto que a sua tensão superficial é quebrada, dando origem a um cone (denominado cone de Taylor), de cuja extremidade saem as gotículas eletricamente carregadas que formam o eletrospray (fig. 14) (BANERJEE; MAZUMDAR, 2012; HOFFMAN; STROOBANT, 2007b).

Figura 14 – Representação esquemática de um cone de Taylor na extremidade da sonda. Retirado de HOFFMAN; STROOBANT, 2007b.

As gotículas de primeira geração irão, à semelhança da gota presente na extremidade do capilar, ser deformadas e gerar novos cones de Taylor, dando origem a gotículas ainda menores. Além da influência do campo elétrico, a passagem de um gás inerte aquecido (como nitrogênio) irá promover a evaporação do solvente das gotículas, aumentando a densidade de carga e consequentemente a repulsão entre os íons de mesma carga ali presentes. Quando a tensão superficial é superada pelas repulsões coulômbicas no interior da gota (limite Rayleigh), uma explosão coulômbica (ou fissão coulômbica) ocorre, dando origem a novas e menores gotículas (fig. 15) (BANERJEE; MAZUMDAR, 2012; CECH; ENKE, 2001; HOFFMAN; STROOBANT, 2007b). Na prática, como as gotículas sofrem vibrações elásticas (oscilando entre os formatos esferoide oblato e esferoide prolato), a carga não está uniformemente distribuída na superfície da gotícula. Assim, a fissão ocorre ligeiramente abaixo do limite Rayleigh (a aproximadamente 80% deste) (BANERJEE; MAZUMDAR, 2012).

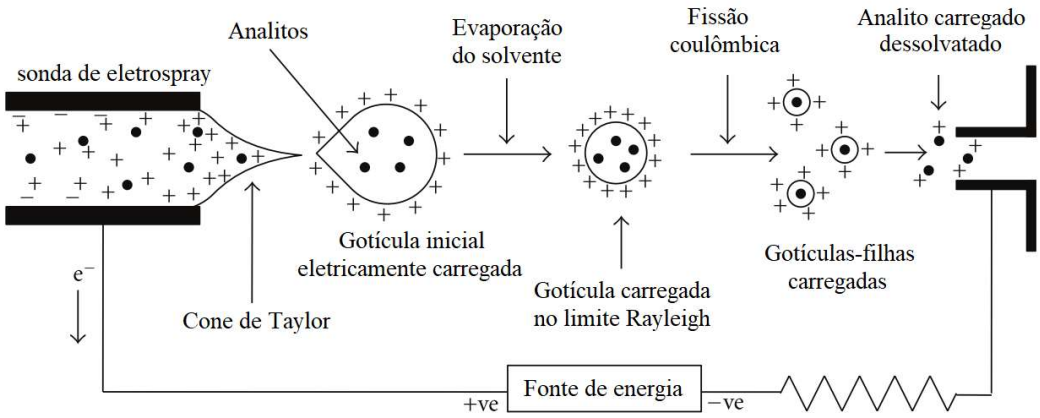


Figura 15 – Representação esquemática da ionização por eletrospray. Adaptado de Banerjee e Mazumdar, 2012.

Há dois modelos principais que explicam como são gerados os íons dessolvatados. Segundo o modelo de carga residual, proposto por Dole *et al.* (1968), as fissões e evaporações ocorrem até que uma única molécula esteja presente na gotícula. Com a evaporação do solvente, a carga presente na superfície da gotícula é transferida para o analito. Já o modelo de evaporação do íon, elaborado por Iribarne e Thomson (1976), propõe que quando a gotícula atinge um raio muito pequeno (<10 nm) e encontra-se altamente carregada, o analito é ejetado da gotícula sem que haja fissão (BANERJEE; MAZUMDAR, 2012).

Existem várias formas de direcionar os íons do analito, presentes na câmara de nebulização e à pressão atmosférica, para dentro do espectrômetro de massas. Uma delas consiste em criar uma cortina de gás aquecido (nitrogênio, por exemplo) que flui em direção contrária ao fluxo de íons. Os analitos neutros são empurrados pelo fluxo de gás, enquanto que os íons atravessam a cortina, eletrostaticamente atraídos até o orifício de entrada para o primeiro estágio de vácuo do equipamento (fig. 16). Uma vez dentro do espectrômetro de massas, os íons são transferidos através de orifícios que interligam câmaras com pressões progressivamente menores. Desta forma os íons, que são produzidos à pressão atmosférica, são direcionados à região de alto vácuo necessária para a análise (BANERJEE; MAZUMDAR, 2012).

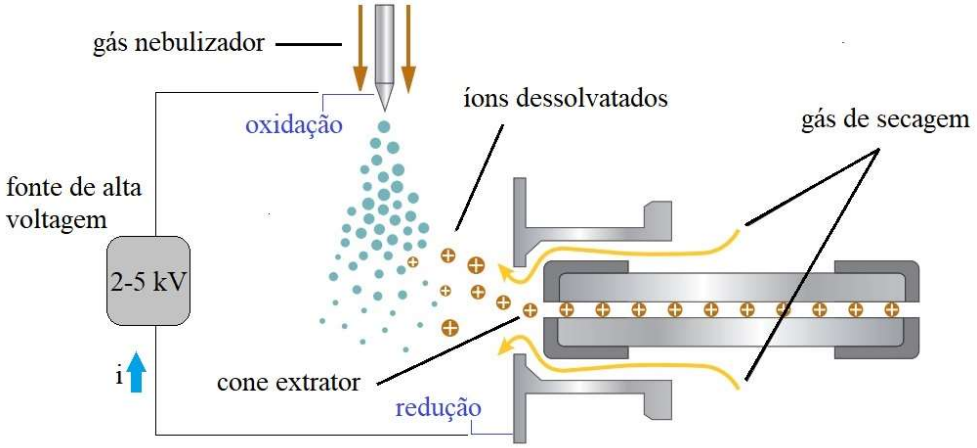


Figura 16 – Trajeto dos íons desde o capilar metálico da sonda até o capilar aquecido de entrada do espectrômetro de massas. Adaptado de PARTICLE SCIENCES, 2009.

A ESI opera em dois modos, a depender do sinal da tensão aplicada. No modo positivo, as gotículas do eletrospray possuem carga positiva, e no modo negativo, carga negativa. As espécies carregadas são produzidas de três formas distintas: reações eletroquímicas, reações ácido-base e coordenação com cátions ou ânions. Formados os íons, uma corrente contínua é estabelecida entre o capilar metálico da sonda e o cone extrator (entrada dos íons no

espectrômetro) (BANERJEE; MAZUMDAR, 2012; CROTTI et al., 2006; HOFFMAN; STROOBANT, 2007b; LANÇAS, 2009).

1.3.2. O analisador: QTOF

O analisador é o componente do espectrômetro de massas que seleciona a *m/z* de um íon. Desta forma, íons multiplamente carregados terão uma *m/z* que representa uma fração da sua massa total. Existem vários analisadores disponíveis, baseados em diferentes princípios, como estabilidade de trajetória, velocidade, frequência de ressonância, dentre outros (Hoffman e Stroobant, 2007b).

Uma tendência no desenvolvimentos de analisadores de massas é a combinação de mais de um analisador, com vistas a versatilizar as análises. O triplo quadrupolo (QqQ) e mais recentemente os analisadores híbridos, como quadrupolo/tempo de vôo (QTOF) e *ion trap/*ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier (IT-FTICR), permitem que seja obtido um espectro de massas oriundo da fragmentação de um íon selecionado no primeiro analisador (Hoffman e Stroobant, 2007b). A espectrometria de massas sequencial pode ser no espaço, quando é proveniente da justaposição de analisadores (como QqQ e QTOF), ou no tempo, quando as seleções de massas e fragmentações sequenciais são realizadas dentro de um mesmo analisador (*e.g. ion trap*) (HOFFMAN; STROOBANT, 2007c).

O analisador TOF baseia-se na medida do "tempo de voo" de um íon acelerado dentro de um tubo de voo e sob campo eletromagnético. Os íons produzidos na fonte de ionização são extraídos e acelerados dentro do tubo, e a velocidade alcançada por ele é inversamente proporcional à sua *m/z*. Assim, quanto menor a massa do íon, menor o tempo necessário para ele chegar ao detector (HOFFMAN; STROOBANT, 2007c).

Diferentemente dos primeiros analisadores TOF (do tipo linear), o TOF com extração ortogonal confere alta resolução de massas às análises. A geometria do analisador faz com que seja necessária a aceleração dos íons de forma pulsada. Os íons são acumulados por uma fração de segundos, para serem acelerados pelo tubo de voo em "pacotes". O acoplamento do quadrupolo ao analisador tempo de voo permite realizar a interface entre a produção contínua de íons provenientes do ESI com a aceleração pulsada do TOF (HOFFMAN; STROOBANT, 2007c; WATSON; SPARKMAN, 2007).

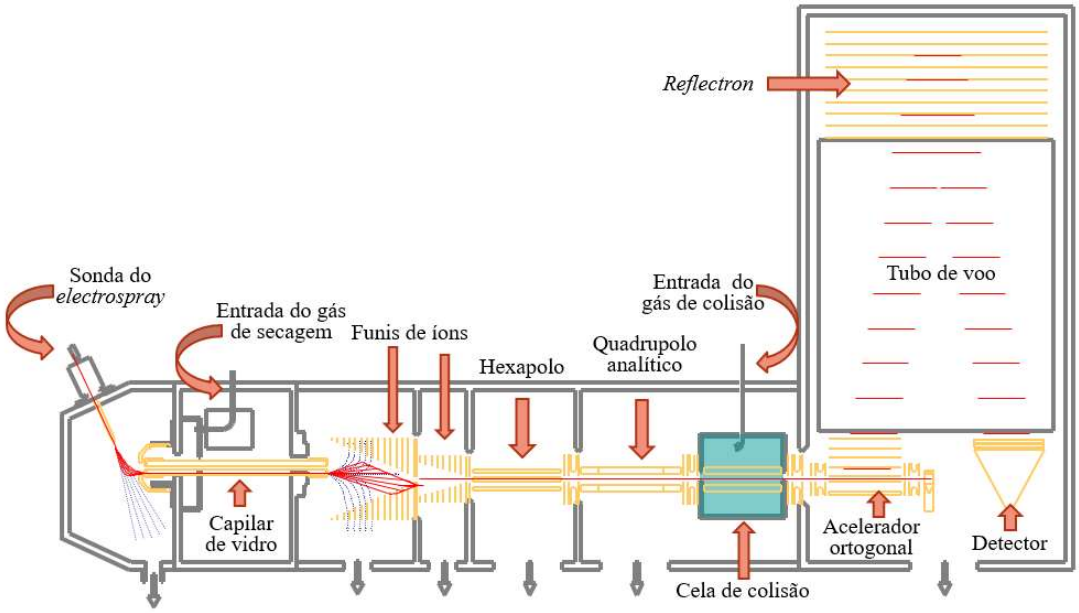


Figura 17 –Analisador híbrido QTOF. Adaptado de BRUKER DALTONICS, 2008.

Como pode ser visto na figura 17, o quadrupolo analítico é separado do TOF por uma cela de colisão, na qual ocorrem as fragmentações do íon (ou íons) selecionados no quadrupolo analítico. Os sucessivos compartimentos possuem pressões decrescentes: a ionização ocorre em condições ambientes e a pressão vai sendo reduzida até que no tubo de voo o estágio mais próximo do vácuo é alcançado. As setas cinzas apontadas para baixo representam as saídas de ar, por meio das quais é feita descompressão. O *reflectron* é responsável pela deflexão dos íons para o detector. Além de aumentar a distância percorrida pelos íons, o *reflectron* corrige diferenças nos tempos de voos de íons de mesma massa, decorrentes de diferenças mínimas na posição dos íons quando partem do acelerador.

1.3.3. Análise de *club drugs* em sangue total

Diversos trabalhos descrevem métodos para a determinação de *club drugs* utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas. Em uma breve revisão bibliográfica de análise destes compostos em sangue foi identificado que o analisador de massas triplo quadrupolo é o mais frequentemente utilizado, alcançando-se baixos limites de detecção. Quanto ao preparo de amostra, foram utilizadas desde técnicas de maior custo, como microextração em fase sólida, até técnicas mais baratas, como precipitação de proteínas com solvente orgânico e microextração líquido-líquido dispersiva – mas sempre priorizando o uso de pequenos volumes de amostra, com volumes variando entre 200 µL e 500 µL (quadro 2).

Quadro 2 – Preparo de amostra, analisador de massas, substâncias e limites de detecção em métodos de análise de *club drugs* em amostras de sangue por LC-MS.

Referência	Preparo de amostra	Analisador	Substâncias	LOD (ng/mL)
CHÈZE et al., 2007	Toxi Tube A ®	QqQ	AMP, MAMP, MDMA	0,08
ODOARDI et al., 2015	DLLME	QqQ	mCPP	2,0
			KET	0,5
			MEF	0,2
VAIANO et al., 2016	PP	QqQ	AMP	0,3
			MAMP	0,3
			MDA	0,3
			MDMA	0,3
			KET	0,3
			MEF	0,1
			mCPP	0,3
SWORTWOOD; BOLAND; DECAPRIO, 2013	SPE	QqQ	AMP, MAMP, MDA, MDMA, MEF, mCPP, 2C-B, DOB	0,010-0,100
ADAMOWICZ; TOKARCZYK, 2016	PP	QqQ	MEF	0,10
			mCPP	0,24
			2C-B	0,20
BIDNY et al., 2016	PP	QTOF	COCA, COCAET, MAMP, MDA, MDMA, MEF, 2C-B	1,0 – 50,0
GLICKSBERG; BRYAND; KERRIGAN, 2016	SPE	QTOF	MEF	2,0

2C-B: 4-bromo-2,5-dimetoxifenetilamina; COCA: cocaína; COCAET: cocaetileno; CLOB: clobenzorex; DLLME: microextração líquido-líquido dispersiva; DOB: 2,5-dimetoxi-4-bromoanfetamina; KET: cetamina; LC-MS: cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas; LOD: limite de detecção; mCPP: 1-(3-clorofenil)piperazina; MEF: mefedrona; MDA: 3,4-metilenodioximetanfetamina; MDMA: 3,4-metilenodioximetanfetamina; PP: precipitação de proteínas; SPE: extração em fase sólida.

2. Objetivos

Este trabalho teve como objetivo geral o desenvolvimento e a validação analítica da determinação de *club drugs* em amostras de sangue total, utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas com analisador híbrido quadrupolo-tempo de voo (LC-QTOF), e a aplicação do método a amostras provenientes de casos reais de interesse forense, oriundas do Instituto Médico-Legal Aristoclides Teixeira (Goiânia – GO), da Polícia Técnico Científica do Estado de Goiás (SPTC – GO).

2.1. Objetivos específicos

- Desenvolvimento e otimização de método de separação por cromatografia líquida
- Desenvolvimento e otimização de análise por espectrometria de massas com analisador QTOF
- Desenvolvimento de método de preparo de amostra aplicado a sangue
- Validação analítica, com avaliação de linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, efeito matriz, precisão intradia, precisão interdia, exatidão e integridade de diluição, de acordo com as diretrizes do SWGTOX.
- Avaliação da recuperação e da eficiência do processo
- Coleta de amostras de sangue provenientes de casos reais de morte não natural ocorridas no IML Aristoclides Teixeira, de Goiânia – GO.
- Aplicação e avaliação do método desenvolvido às amostras coletadas.

3. Material e métodos

3.1. Material

3.1.1. Equipamentos e acessórios

- Cromatógrafo líquido ultrarrápido UFLC Prominence, provido de bombas modelo LC-20AD, auto-amostrador refrigerado SIL-20AC HT, forno para coluna CTO-20A e unidade degaseificante DGU-20A 3R, Shimadzu (Kioto, Japão).
- Coluna cromatográfica de fase reversa Zorbax Eclipse Plus C18 (2,1 mm x 50 mm x 1,8 µm), Agilent (Santa Clara, EUA).
- Espectrômetro de massas híbrido quadrupolo/tempo de vôo (QTOF) com fonte de ionização por *eletrospray* (ESI), modelo micrOTOF – Q III, Bruker (Billerica, EUA).
- Agitador tipo vórtex, modelo AV-1, Gehaka (São Paulo, Brasil).
- Centrífuga de bancada, modelo Mikro 120, Hettich (Kirchlengern, Alemanha).

3.1.2. Reagentes e outros materiais

- Solventes foram obtidos da J.T. Baker (Phillipsburg, EUA).
- Sais foram obtidos da Sigma/Merck (Darmstadt, Alemanha).

3.1.3. Padrões analíticos

- Soluções-padrão das substâncias de interesse (AMP, MAMP, MEF, MDA, FPX, MDMA, mCPP, DOB, 2C-B, KET, CLOB, COCA, COCAET) e de deuterados (COC-D3, MDMA-D5 e KET-D4), a serem utilizados como padrão interno (PI), na concentração inicial de 1 mg/mL (substância de interesse) ou 100 µg/mL (deuterados) em metanol, foram obtidas da Cerilliant Corporation (Round Rock, EUA).

3.1.4. Amostras

- Alíquotas de sangue total provenientes de vítimas de morte com causa violenta, necropsiadas no Instituto Médico Legal Aristoclides Teixeira, Goiânia – GO.

3.2. Métodos

3.2.1. Preparo de amostra

Para extração dos analitos da matriz, o seguinte protocolo foi utilizado: 200 µL de sangue são aliquotados e transferidos para um microtubo de plástico de 2 mL. São adicionados à amostra 10 µL de PI (*pool* de COC-D_3, MDMA-D_5 e KET-D_4 a 20 µg/mL), obtendo-se uma concentração final de 100 ng/mL de cada padrão interno deuterado.

Para *clean up* das amostras de sangue, foram adicionados 600 µL de acetonitrila, divididos da seguinte forma: 4 adições de 50 µL cada, e 2 adições de 200 µL cada. Após cada uma das adições, a amostra é homogeneizada em vórtex por 10 segundos. Após os 6 ciclos de adição de acetonitrila e homogeneização, as amostras são centrifugadas por 5 minutos a 14.000 rpm.

Do sobrenadante, 700 µL são transferidos para um novo microtubo, e este é levado ao congelador (-20ºC) por 30 minutos. Em seguida, os microtubos são novamente centrifugados por 5 minutos a 14.000 rpm. Do sobrenadante, 600 µL são recuperados, secos sob fluxo de ar aquecido e por fim ressuspendidos em 200 µL de fase móvel A (10% de B).

A COC-D_3 serviu de padrão interno para COCA, COCAET, DOB, 2C-B, CLOB e mCPP; o MDMA-D_5 para AMP, MAMP, FPX, MDA e MDMA e KET-D_4 para KET.

3.2.2. Condições cromatográficas

Dois protocolos principais de análise cromatográfica foram testados: um utilizando acetonitrila como solvente orgânico, e outro utilizando metanol. Por tratar-se de método destinado a detecção de drogas de abuso de caráter básico, fez-se necessário acrescentar um aditivo à fase móvel para formação de íons positivamente carregados. Dentre as diferentes composições testadas, escolheu-se ácido fórmico 0,1% como fase móvel A. São as condições cromatográficas: coluna de fase reversa C-18 (Zorbax Eclipse Plus 50 mm); fluxo de 0,3 ml/min; forno da coluna a 35 ºC, volume de injeção 10 µL, tempo total de análise 10,2 minutos e gradiente de eluição mostrado no quadro 3.

Quadro 3 – Gradiente de eluição do método.

Tempo (min)	% fase móvel B
0	10
4,0	40
4,1	90
8,0	90
8,1	10
10,1	10

3.2.3. Espectrometria de massas com analisador híbrido QTOF

O método foi desenvolvido e validado utilizando o modo positivo de ionização, com modo de operação *full scan.* Para as amostras positivas, foi realizada uma reanálise em modo de monitoramento de íons produto.

São as condições da fonte de ionização (ESI): *end plate offset*: 500 V; capilar: 4500 V; pressão do gás nebulizador (N_2): 3 bar; fluxo do gás de secagem: 8 l/min; temperatura do gás de secagem (N_2): 200 ºC.

São as condições de tune: RF funil 1: 200 vpp; RF funil 2: 200 vpp; energia isCID: 0 eV; RF hexapolo: 200 vpp; energia iônica do quadrupolo: 5 eV; *low mass*: 100 *m/z*; energia de colisão: 10 eV; tempo de transferência: 10 µs; armazenamento pré pulso: 5 µs; RF de colisão: 150 vpp.

A calibração de massas foi feita com formiato de sódio, em modo positivo, utilizando *high precision calibration* (HPC), alcançando-se um desvio-padrão de erro de massas inferior a 1 ppm.

Para as análises em modo de monitoramento de íon produto, a otimização das energias de colisão foi realizada manualmente, com o objetivo de manter a intensidade relativa do íon precursor em aproximadamente 30%.

3.2.4. Validação analítica

Foram avaliadas as figuras analíticas de mérito: linearidade, limites de detecção e de quantificação, precisão intra e interdia, exatidão, efeito matriz, integridade de diluição e arraste (*carryover*), além dos parâmetros de recuperação e eficiência do processo. Foram adotadas as diretrizes e valores previstos pela da SWGDRUG (*Scientific Working Group for the Analysis*

of Seized Drugs), e para escolha do fator de ponderação (para o modelo de calibração), literatura adicional foi utilizada (ALMEIDA; CASTEL-BRANCO; FALCÃO, 2002; SWGTOX, 2013).

3.2.4.1. Recuperação e efeito matriz

Para avaliação do efeito de matriz, várias abordagens podem ser utilizadas. Foi escolhida uma das formas preconizadas pelo guia de validação analítica do SWGTOX (item 7.5.2. do referido documento). Apesar deste guia não prever o cálculo de recuperação, este parâmetro também foi avaliado, tendo em vista que baixas recuperações podem impactar na detectabilidade do método. Para tanto, três conjuntos de amostras foi preparado:

(i) Amostras fortificadas antes do preparo de amostra (*spike* pré): amostras de sangue em dois níveis (50 ng/mL e 250 ng/mL); adição dos padrões antes da realização do protocolo de preparo; 4 replicatas; cada replicata injetada 2 vezes.

(ii) Amostras fortificadas após o preparo de amostra (*spike* pós): amostras de sangue em dois níveis (50 ng/mL e 250 ng/mL); adição dos padrões no último passo do protocolo de preparo (ressuspensão do material em fase móvel inicial); 4 replicatas; cada replicata injetada 2 vezes.

(iii) Fase móvel fortificada (*spike* F.M.): fase móvel preparada em dois níveis (correspondentes a 50 e 250 ng/mL); 2 replicatas; cada replicata injetada 3 vezes.

O *spike* pré e o *spike* pós foram preparados em um *pool* de sangue humano coletado por punção venosa, de onze voluntários de ambos os sexos e de diferentes etnias.

Tendo em vista que no protocolo de preparo de amostra empregado apenas ¾ do volume são recuperados (600 µL de 800 µL – 200 µL dos quais provenientes da amostra de sangue e 600 µL de acetonitrila), os *spikes* F.M. foram preparados nas concentrações de 37,5 ng/mL e 187,5 ng/mL, respectivamente.

A recuperação foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{\bar{x}\ \text{Área spike pré}}{\bar{x}\ \text{Área spike pós}}\right)\ x\ 100$$

O efeito matriz (EM) foi calculado com a fórmula:

$$\text{Supressão ou aumento de ionização (\%)} = \left(\frac{\bar{x}\ \text{Área spike F.M.}}{\bar{x}\ \text{Área spike pós}} - 1\right)\ x\ 100$$

A eficiência do processo foi calculada com a fórmula:

$$\text{Eficiência do processo (\%)} = \left(\frac{\bar{x}\ \text{Área spike pré}}{\bar{x}\ \text{Área spike F.M.}}\right)\ x\ 100$$

3.2.4.2. Linearidade

Para construção da curva de calibração foram preparados 7 níveis (25, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 ng/mL), em sextuplicata. Cada replicata fora injetada duas vezes. Em seguida, a homocedasticidade das curvas (para cada um dos analitos) foi verificada através do cálculo das variâncias no nível mais baixo e no nível mais alto da curva, obtendo-se F experimental:

$$F_{exp} = \frac{s_2^2}{s_1^2}$$

Se $F_{exp} > F_{tab}$ (sendo o F tabelado obtido de uma tabela F para intervalo de confiança de 0,99 e n-1 graus de liberdade), a curva será considerada heterocedástica, e um fator de ponderação deverá ser utilizado. A escolha do fator de ponderação deverá levar em consideração o somatório dos erros relativos, a distribuição dos erros, bem como o coeficiente de correlação linear. Para construção da curva, o ponto zero foi excluído, conforme preconizado pelo guia da SWGTOX.

3.2.4.3. Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) serão determinados a partir das equações de reta para cada analito. O LOD é estimado através do desvio-padrão do intercepto em y e da inclinação média da reta, utilizando-se a fórmula:

$$LOD = \frac{3{,}3\sigma_y}{Avg_m}$$

e o LOQ, a partir do LOD:

$$LOQ = 3{,}3LOD$$

Para tais cálculos, foram utilizadas 5 curvas de calibração.

3.2.4.4. Precisão intra e interdia

Para estes parâmetros, foram preparadas amostras fortificadas em três níveis: controle alto (CA – 250 ng/mL), controle médio (CM – 150 ng/mL) e controle baixo (CB – 50 ng/mL).

Cada nível foi preparado em sextuplicata, e cada replicata injetada 5 vezes. Com as áreas relativas encontradas (média das 5 injeções), foi calculada a precisão intradia.

O procedimento foi repetido por mais dois dias, e com os resultados obtidos a precisão interdia foi calculada. Os valores de precisão foram calculados utilizando-se análise de variância (ANOVA) fator único, utilizando as fórmulas:

$$\text{Precisão intradia (\%)} = \left[\frac{\sqrt{QM_{intra}}}{\bar{x}_{área\ relativa}}\right] x\ 100$$

$$\text{Precisão interdia (\%)} = \left[\frac{\sqrt{\frac{QM_{inter} + (n-1)\ x\ QM_{intra}}{n}}}{\bar{x}_{área\ relativa}}\right] x\ 100$$

nas quais QM_{intra} e QM_{inter} são os quadrados médios dentro dos grupos e entre os grupos, respectivamente, e *n* é o número de observações.

O critério de aceitação foi de 20% para o CB e 15% para CM e CA.

3.2.4.5. Exatidão

Seis replicatas em três níveis (os mesmos utilizados na precisão) foram preparadas, e cada replicata injetada 5 vezes. As amostras foram quantificadas de acordo com as equações obtidas na linearidade e a exatidão foi calculada como:

$$Exatidão\ (\%) = \frac{(\bar{x}_{conc.calculada} - conc.real)}{concentração\ real} \times 100$$

A concentração nominal foi considerada como sendo a concentração real. O critério de aceitação foi de ±20% para o CB e ±15% para CM e CA.

3.2.4.6. Arraste

Para análise de arraste uma amostra a 6000 ng/mL foi extraída em duplicata, e cada duplicata foi injetada 3 vezes. Imediatamente após cada uma das 6 injeções, foi injetado um branco. Os cromatogramas de branco resultantes foram analisados quanto à presença dos analitos em estudo.

3.2.4.7. Integridade de diluição

Amostras em três concentrações distintas (750, 3000 e 6000 ng/mL) foram extraídas em triplicata. As amostras foram diluídas nas razões de 1:5, 1:20 e 1:40, respectivamente, obtendo-se uma concentração final de 150 ng/mL para todas. Cada replicata fora injetada 5 vezes.

Para cada conjunto de replicatas foi calculada a precisão intradia, bem como a exatidão, sendo 15% o coeficiente de variação máximo aceito para precisão, e ±15% para exatidão.

3.2.5. Coleta das amostras

As amostras de sangue total foram obtidas no Instituto Médico Legal Aristoclides Teixeira de Goiânia – GO (IML – GO). A seleção dos casos foi realizada durante o exame necroscópico, levando-se em consideração o histórico do óbito. As coletas foram feitas mediante prévia autorização do responsável legal, concedida através da assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Foram critérios de inclusão da amostra: vítimas de morte não-natural, de ambos os sexos, maiores de 18 anos, cujo responsável legal assinta a participação mediante assinatura do TCLE. São critérios de exclusão: a não concordância do responsável legal em participar do referido projeto; vítimas menores de 18 anos e causa de morte natural. O projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, tendo sido aprovado mediante parecer consubstanciado nº 1.209.146 (Anexo II).

As amostras foram coletadas em tubo plástico coletor contendo fluoreto de sódio e EDTA, e armazenadas a – 20º C, tendo sido identificadas com código numérico, de modo a preservar a identidade dos envolvidos na pesquisa.

3.2.6. Aplicação do método

As amostras coletadas foram submetidas a análise pelo método validado, identificando e quantificando as *club drugs* de interesse, quando presentes.

4. Resultados e discussão

4.1. Separação cromatográfica

Várias condições cromatográficas foram testadas. As melhores condições cromatográficas encontradas estão descritas no item 3.2.2, nas quais foi obtida resolução cromatográfica satisfatória para a maioria dos compostos (figura 18). A exceção é o 2C-B, que coelui parcialmente com a cocaína. Entretanto, os íons precursores dos dois analitos possuem massas muito distintas, além do que o espectro do 2C-B é bastante característico devido à presença de um átomo de bromo, que confere a peculiaridade da presença de isotopólogos (figura 19).

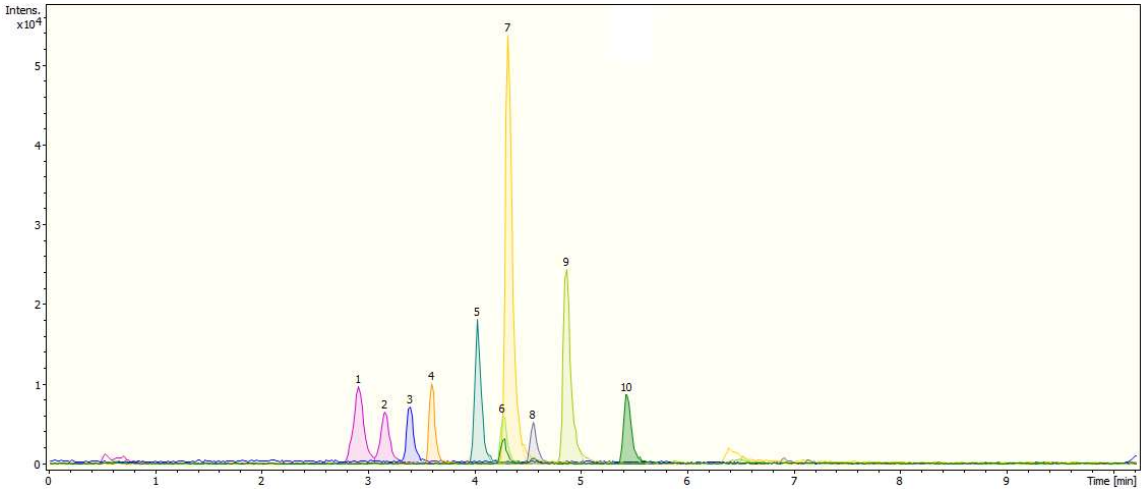


Figura 18 - Cromatograma de íons extraídos das 10 *club drugs.* Modo positivo de ionização. Podem ser vistos os picos correspondentes às seguintes substâncias: MDA (1); MDMA (2); mefedrona (3); cetamina (4); mCPP (5); 2C-B (6); cocaína (7); DOB (8); cocaetileno (9); clobenzorex (10).

Como pode ser observado na figura 18, estão ausentes os picos referentes à anfetamina, metanfetamina e femproporex. Desde as primeiras análises, estes compostos foram identificados com uma intensidade extremamente baixa quando comparados aos demais analitos. Conforme será visto adiante, vários testes foram feitos na tentativa de tentar melhorar a detectabilidade de tais anfetamínicos.

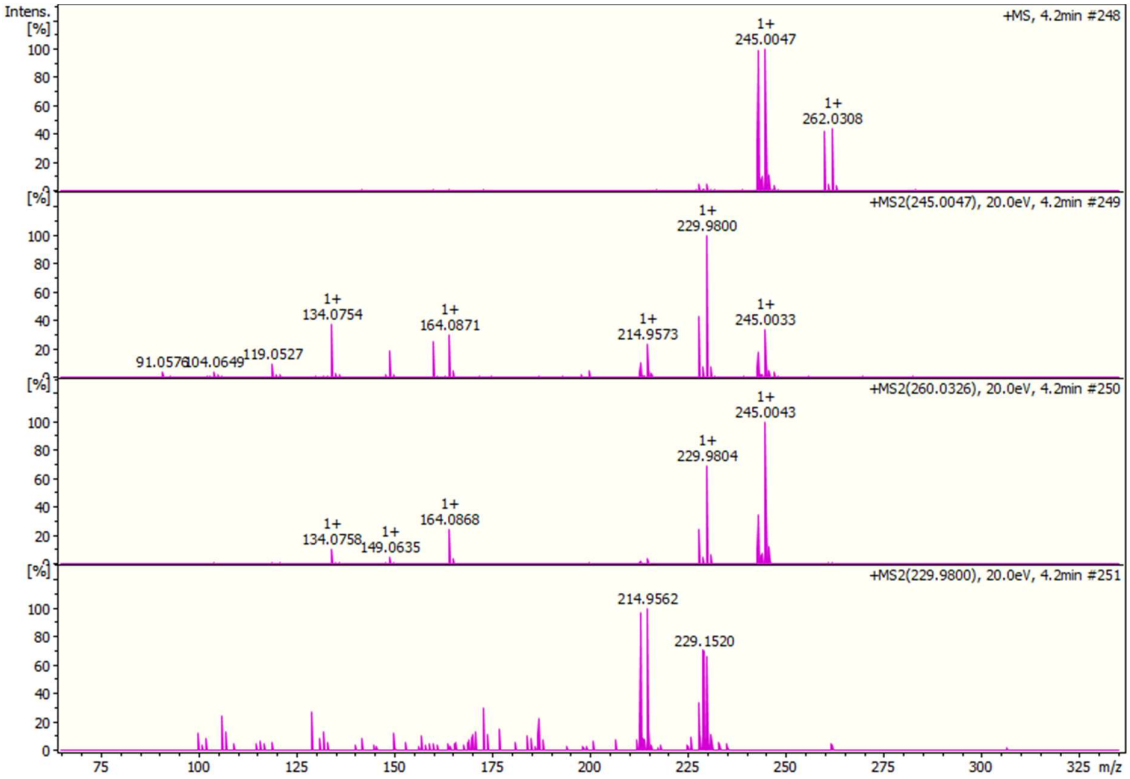


Figura 19 - Espectro de massas obtido de um padrão de 2C-B. O primeiro espectro corresponde a uma aquisição em modo *full scan*, e os demais, às fragmentações dos íons detectados (MS^2).

O quadro 4 mostra os tempos de retenção encontrados. Para obtenção dos dados, foi analisada uma mistura de padrões analíticos em fase móvel inicial, a 200 ng/mL, com injeção de 10 µL. Os cromatogramas de íon extraído (EIC) foram obtidos com as massas indicadas no quadro 5.

Quadro 4 - Tempos de retenção.

Analito	Tempo (min)
MDA	2,9
MDMA	3,2
MEF	3,4
KET	3,6
mCPP	4,0
2C-B	4,2
COCA	4,3
DOB	4,6
COCAET	4,9
CLOB	5,4

2C-B: 4-bromo-2,5-dimetoxifenetilamina; CLOB: clobenzorex; COCA: cocaína; COCAET: cocaetileno; DOB: 2,5-dimetoxi-4-bromoanfetamina; KET: cetamina; mCPP: 1-(3-clorofenil)piperazina; MEF: mefedrona; MDA: 3,4-metilenodioximetanfetamina; MDMA: 3,4-metilenodioximetanfetamina.

4.2. Modos de operação

Foram testados três modos de operação dos dados: *full scan*, auto MS e monitoramento de íons produto (*product ion scan*).

No primeiro modo, o quadrupolo funciona meramente como um focalizador para os íons, transferindo os mesmos ao analisador TOF sem que haja fragmentação. Entretanto, algumas moléculas sofrem fragmentação no modo *full scan*, a despeito de o equipamento não estar ajustado para tal (umas em maior e outras em menor extensão). No segundo modo (auto MS), o equipamento utiliza uma energia de colisão única para promover a fragmentação de todos analitos que entram no quadrupolo. No terceiro modo (monitoramento de íons produto), é possível ajustar o equipamento para promover a fragmentação de íons de *m/z* pré-estabelecidas, com energias de colisão também previamente definidas.

A princípio, optou-se por trabalhar com o monitoramento de íons produto, tendo em vista a possibilidade de ajustar a energia de colisão individualmente para cada uma das dez *m/z* referentes aos íons moleculares dos analitos em questão. Desta forma, foi realizada uma otimização manual da energia de colisão, tendo sido encontrados os valores mostrados no quadro 5.

Quadro 5 – Parâmetros utilizados em modo de monitoramento de íons produto.

Analito	*m/z* precursor	*m/z* extraída	Energia de colisão (eV)	*Width* (Da)
AMP	136,1138	136	5	2
MAMP	150,1272	150	13	2
FPX	189,1405	189	10	2
MDA	180,1045	180	7	2
MDMA	194,1187	194	12	2
MEF	178,1225	178	12	2
KET	260,0261	260	10,5	2
mCPP	197,0838	197	26	6
2C-B	260,0309	260	20	6
COCA	304,1548	304	20,5	2
DOB	274,0407	274	11	6
COCAET	318,1715	318	21,4	2
CLOB	260,1224	260	20	6

AMP: anfetamina; 2C-B: 4-bromo-2,5-dimetoxifenetilamina; CLOB: clobenzorex; COCA: cocaína; COCAET: cocaetileno; DOB: 2,5-dimetoxi-4-bromoanfetamina; FPX: femproporex KET: cetamina; MAMP: metanfetamina; mCPP: 1-(3-clorofenil)piperazina; MEF: mefedrona; MDA: 3,4-metilenodioximetanfetamina; MDMA: 3,4-metilenodioximetanfetamina.

Entretanto, quando da aquisição dos cromatogramas, e utilizando o modo de monitoramento de íons produtos, não foram obtidos resultados satisfatórios. Como pode ser visto na figura 20, que demonstra a sobreposição de dois cromatogramas obtidos de um mesmo padrão, em modo de monitoramento de íon produto o equipamento não foi capaz de detectar o composto durante toda sua eluição. Levantamos a hipótese de que tal problema possa decorrer do fato de o método ajustado no equipamento selecionar doze íons precursores de *m/z* distintas, o que importa em um tempo para que o quadrupolo possa ir de uma *m/z* a outra e promover a fragmentação com a energia de colisão estabelecida. Embora os quadrupolos utilizados nos equipamentos atuais tenham a capacidade de mudar a seleção de *m/z* muito rapidamente, há que se considerar que ajustes nos parâmetros do TOF também devem ser feitos. Vários testes foram realizados com este objetivo, sem êxito. Desta forma, optou-se por abandonar esse modo de operação.

Assim, todas as análises quantitativas serão realizadas em modo *full scan*, e para uma confirmação da identidade da molécula, proceder-se-á a uma análise em modo auto MS, utilizando os parâmetros ótimos encontrados para cada analito, dispostos no quadro 5.

As áreas integradas serão aquelas correspondentes ao íon mais abundante em modo *full scan*. Como explicado anteriormente, algumas moléculas mais instáveis sofrem fragmentação neste modo de operação.

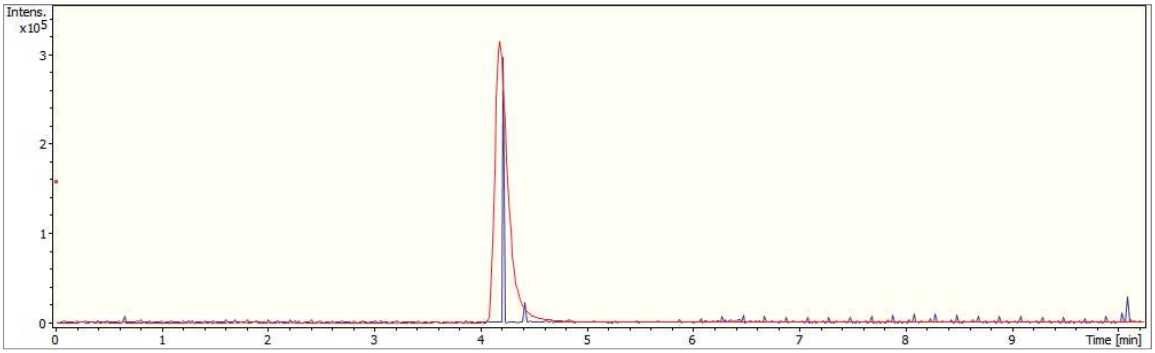


Figura 20 - Sobreposição de dois cromatogramas, ambos referentes à injeção de uma amostra de cocaína a 1 µg/mL, em modo *full scan* (em vermelho) e monitoramento de íon produto (em azul).

4.3. Otimização dos parâmetros da ESI

Com o intuito de melhorar a detectabilidade dos analitos, em especial dos anfetamínicos (AMP, MAMP e FPX), foram realizados testes nos parâmetros da fonte de ionização (ESI). A otimização foi realizada em duas etapas.

Na primeira etapa, foram testados os parâmetros pressão do gás nebulizador (3, 4,5 e 5 Bar), fluxo do gás de secagem (8, 10 e 12 l/min) e temperatura do gás de secagem (200, 240 e 280 ºC), tendo sido mantidos constantes as voltagens do capilar e do *endplate offset* (500 e 4500 V, respectivamente). Os três parâmetros foram combinados em um planejamento fatorial completo (três variáveis em três níveis: 3^3), resultando em 27 diferentes métodos e 27 respectivas análises (uma replicata para cada método), todas aplicadas a um mesmo padrão de AMP a uma concentração de 1 µg/ml (com volume de injeção de 10 µL), em corridas consecutivas. Os resultados estão apresentados nos gráficos 1, 2 e 3.

Gráfico 1 – Influência da pressão do gás nebulizador sobre a ionização da AMP.

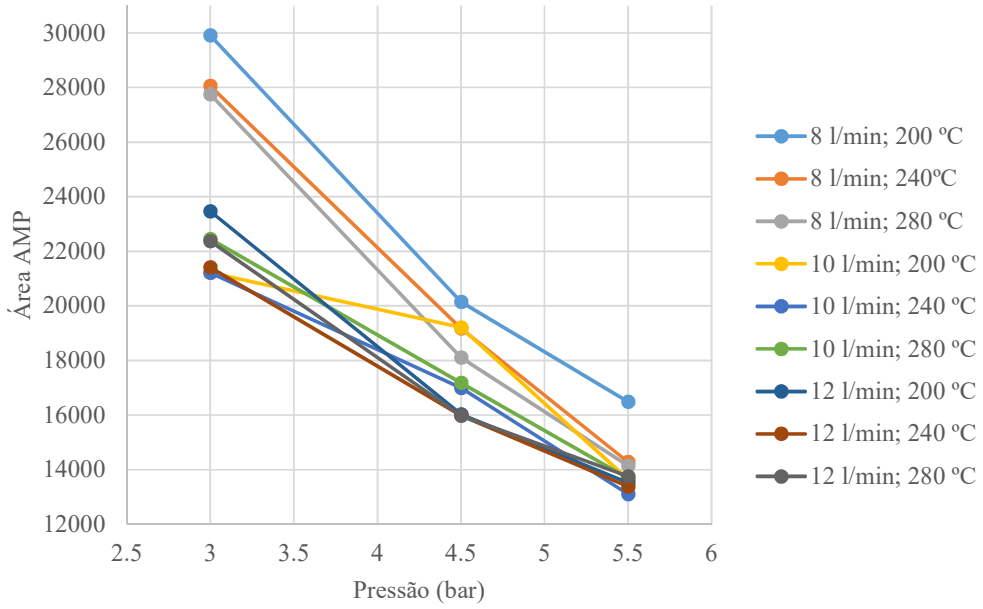


Gráfico 2 – Influência do fluxo do gás de secagem sobre a ionização da AMP.

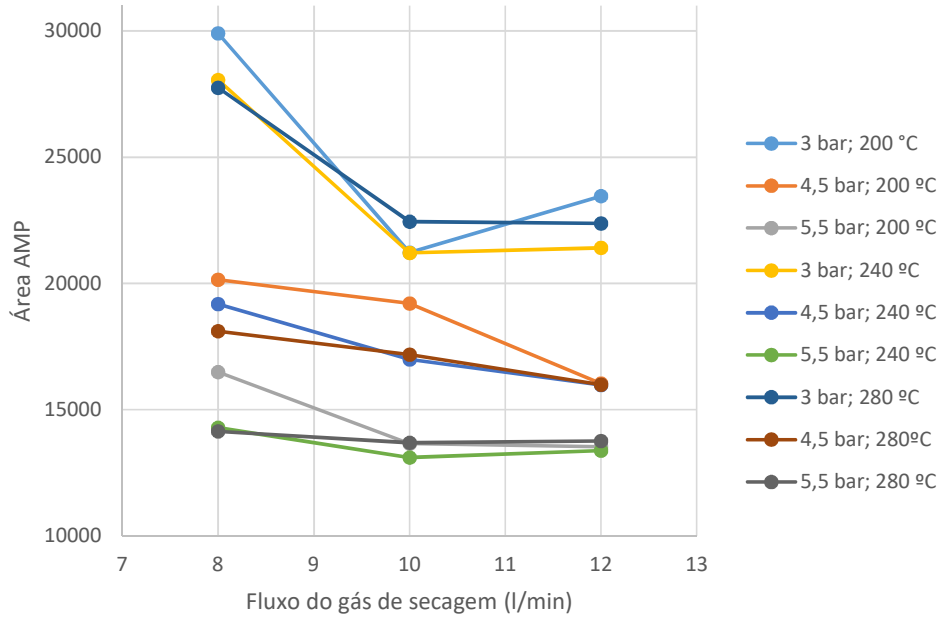
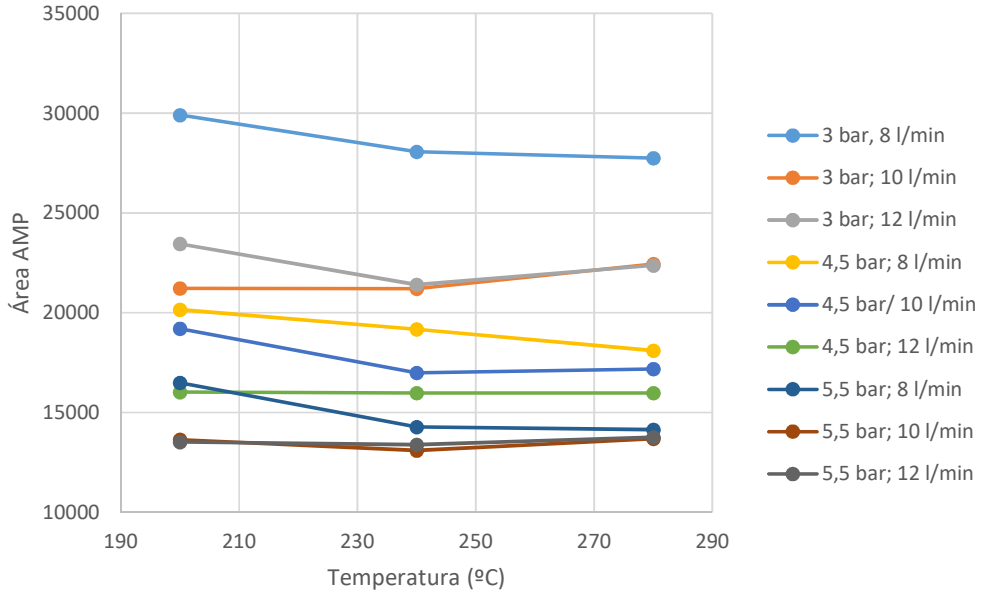


Gráfico 3 – Influência da temperatura do gás de secagem sobre a ionização da AMP



Na segunda etapa, as voltagens do capilar e do *endplate offset* foram testadas em três diferentes níveis (3500, 4000 e 4500 V, e 500, 650 e 800 V, respectivamente), mantendo-se constantes os valores de pressão do nebulizador, fluxo do gás de secagem e temperatura do gás de secagem (3 bar, 8 l/min e 200 ºC). As combinações foram oriundas de um planejamento fatorial completo, resultando em 9 diferentes métodos (duas variáveis em três níveis: 3^2). Os métodos foram aplicados a três padrões analíticos (AMP, MAMP e CLOB), todos a uma concentração de 1 µg/ml (com volume de injeção de 10 µL), em corridas consecutivas. Os resultados estão apresentados nos gráficos 4, 5 e 6.

Gráfico 4 – Influência da voltagem de *endplate offset* sobre a ionização da AMP.

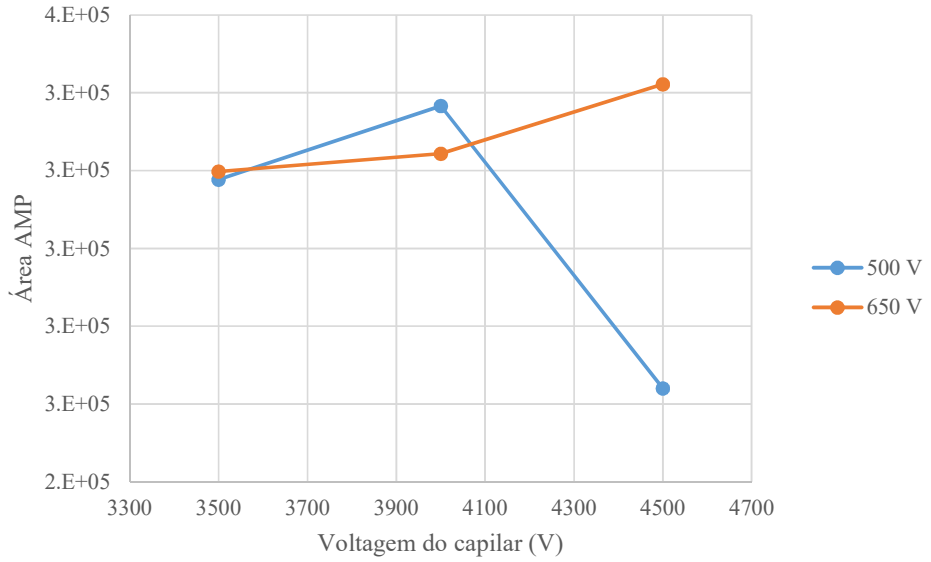


Gráfico 5 – Influência da voltagem de *endplate offset* sobre a ionização da MAMP.

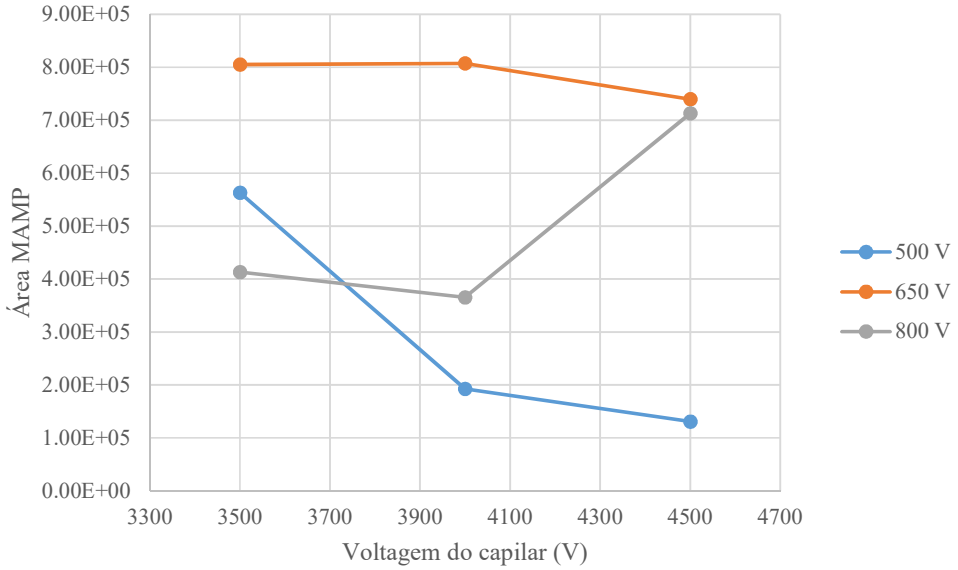
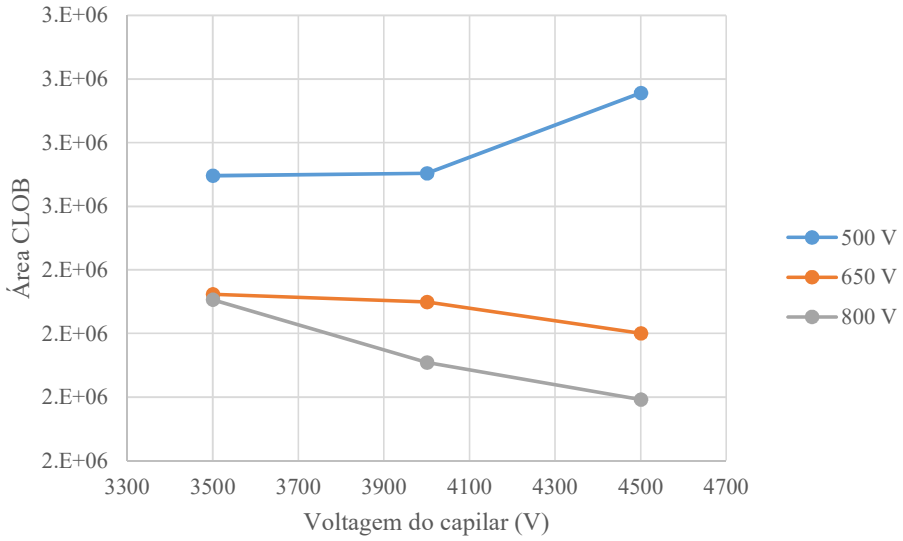


Gráfico 6 – Influência da voltagem de *endplate offset* sobre a ionização de CLOB.



Na primeira etapa dos testes, pôde ser observado que a pressão do gás nebulizador teve uma grande influência sobre a detectabilidade da anfetamina, sendo apreciavelmente maior quando utilizada a pressão de 3 bar (gráfico 1). Quanto ao fluxo, a melhor condição observada foi a de 8 l/min (gráfico 2). Ainda no gráfico 2, observa-se claramente que a combinação de 3 bar com 8 l/min é a melhor dentre as nove condições testadas (para a detectabilidade da anfetamina). Tanto o gráfico 2 como o 3 evidenciam que a temperatura teve pouca influência sobre a ionização. Ainda assim, a condição de 200 ºC foi ligeiramente melhor. Desta forma, entendeu-se que 3 bar, 8 l/min e 200 ºC seriam as melhores condições de análise.

É importante destacar que os parâmetros encontrados não necessariamente são ótimos para os demais analitos no método. Entretanto, como os anfetamínicos estavam com uma detectabilidade muito abaixo dos demais analitos, priorizou-se otimizar os parâmetros para estes, em detrimento dos demais, como uma forma de tentar mantê-los no método em desenvolvimento.

Com relação às voltagens, tanto a AMP como a MAMP geraram sinais mais intensos quando utilizados 650 V de *endplate offset.* A voltagem do capilar teve uma menor influência dentro dos limites testados. Ainda assim, optou-se por escolher 4500 V para o capilar, que foi a voltagem na qual a AMP gerou sinal mais intenso. A AMP foi priorizada em face da MAMP, tendo em vista que é o analito que gerou menor sinal.

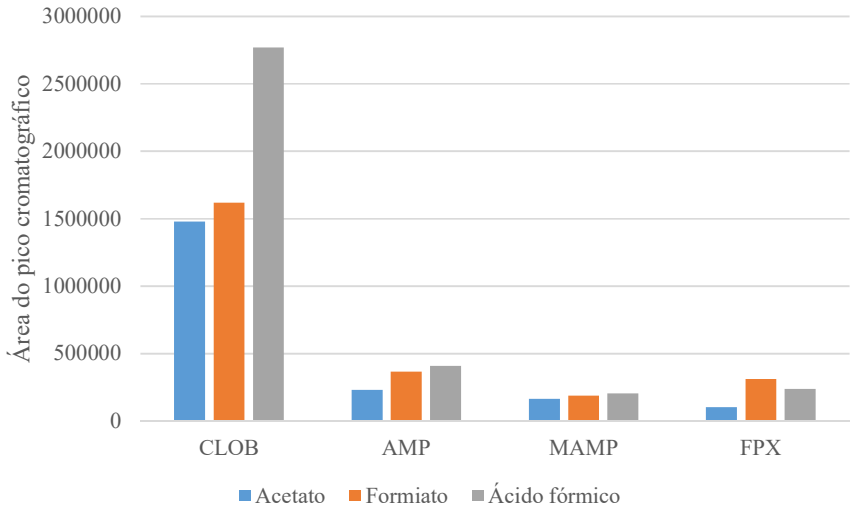
A condição de 650 V não foi favorável para a ionização do clobenzorex. Ainda assim, este fator não foi levado em consideração tendo em vista que esse composto já apresenta um sinal intenso frente aos demais.

Considerando os testes realizados, é importante notar que, embora o sinal das anfetaminas tenha melhorado, a área dos picos dos demais analitos continua sendo uma ordem de grandeza acima. Deste modo, o problema da detectabilidade dos analitos foi apenas parcialmente resolvido com esta bateria de experimentos. É possível que haja algum outro parâmetro, ainda desconhecido, que esteja prejudicando a análise destes compostos (AMP, MAMP e FPX), que coincidentemente são os compostos de massa molecular mais baixa dentre os treze analitos propostos no trabalho.

4.4. Composição da fase móvel

Ainda com a finalidade de investigar formas de melhorar a ionização das anfetaminas, foram testadas três diferentes fases móveis A: acetato de amônio 5 mM pH 5; formiato de amônio 5 mM e ácido fórmico 0,1%. A fase móvel B (ACN), bem como todas as demais condições do método foram mantidas inalteradas. As três condições foram testadas em quatro analitos: AMP, MAMP, FPX e CLOB, todos uma concentração de 1 µg/ml (com volume de injeção de 10 µL), em corridas consecutivas (gráfico 7).

Gráfico 7 – Influência da composição da fase móvel na ionização.



O ácido fórmico a 0,1% mostrou-se favorável para a maioria dos analitos, motivo pelo qual foi mantido como fase móvel A.

Diante de todos os esforços feitos no intuito de melhorar a detectabilidade das anfetaminas, não foram observadas melhorias consideráveis com as mudanças propostas no método. Tal dificuldade é inconsistente com a literatura científica, na qual não foram encontradas quaisquer referências nesse sentido. Assim, optou-se por retirar as anfetaminas (AMP, MAMP e FPX) do estudo.

4.5. Validação analítica

4.5.1. Recuperação e efeito matriz

A recuperação, o efeito matriz e a eficiência do processo estão resumidos na tabela 1.

Tabela 1 – Recuperação, efeito matriz e eficiência do processo para o método proposto.

Analito	Nível	Recuperação (%)	Efeito matriz (%)	Eficiência do processo (%)
MDA	1	94,0	-14,2	80,7
	2	94,9	-12,5	83,1
MDMA	1	97,6	-14,7	80,6
	2	99,9	-13,7	86,2
MEF	1	37,0	-2,1	36,2
	2	52,4	-4,1	50,2
KET	1	71,2	-6,3	66,7
	2	77,7	-5,1	73,7
mCPP	1	62,0	1,3	62,8
	2	66,2	-6,0	62,2
2C-B	1	79,9	-4,0	76,7
	2	87,5	-8,2	80,3
COCA	1	97,9	-17,2	81,1
	2	93,8	-3,3	90,7
DOB	1	93,5	-2,6	94,0
	2	97,7	-5,8	92,1
COCAET	1	93,9	-5,6	88,6
	2	94,3	-3,9	90,7
CLOB	1	44,5	-12,7	38,9
	2	55,5	-8,7	50,7

2C-B: 4-bromo-2,5-dimetoxifenetilamina; CLOB: clobenzorex; COCA: cocaína; COCAET: cocaetileno; DOB: 2,5-dimetoxi-4-bromoanfetamina; KET: cetamina; mCPP: 1-(3-clorofenil)piperazina; MEF: mefedrona; MDA: 3,4-metilenodioximetanfetamina; MDMA: 3,4-metilenodioximetanfetamina.

Como pode ser observado, a MEF, o mCPP e o CLOB tiveram recuperações baixas. Todos os analitos sofreram supressão de ionização em alguma extensão, entretanto esta pode ser considerada moderada. Quando são analisados os dados de eficiência do processo, a MEF, o CLOB e o mCPP apresentaram valores muito baixos. *A priori*, a baixa eficiência por si só não é critério suficiente para considerar o método de preparo inadequado. Desta forma, os demais parâmetros de validação continuaram a ser avaliados para um melhor entendimento sobre a adequação do método para estes analitos.

4.5.2. Linearidade, limite de detecção e limite de quantificação

Aos dados de linearidade obtidos foi aplicado o teste F para verificar se a variância entre as replicatas se mantinha constante para os diferentes níveis da curva de calibração. Para todos os analitos, $F_{exp} > F_{tab}$, ou seja, todas as curvas são heterocedásticas. Desta forma, seis fatores de ponderação foram testados: $1/x$, $1/x^2$, $1/x^{1/2}$, $1/y$, $1/y^2$, $1/y^{1/2}$ (além da curva sem fator de ponderação). Para cada uma das sete condições, foram calculados o coeficiente de determinação (r^2), a porcentagem de erro residual para cada nível (diferença entre o x obtido pela regressão e o x esperado), somatório dos erros residuais da regressão ($\sum_{RE\%}$) e o desvio padrão dos erros residuais ($s_{RE\%}$).

Assim, foi possível escolher o fator de ponderação que tivesse o maior r^2, o menor $\sum_{RE\%}$ e o menor $s_{RE\%}$. Este último parâmetro foi utilizado no lugar do gráfico de residuais, no qual analisa-se visualmente os fatores de ponderação, buscando identificar aquele que gera uma melhor distribuição dos erros ao longo da curva de calibração. Optou-se por analisar a distribuição dos erros desta forma pela simplicidade de se comparar os dados numéricos (tabela 2).

Tabela 2 – Coeficiente de determinação (r^2), somatório dos residuais percentuais ($\sum_{RE\%}$) e desvio padrão dos residuais ($s_{RE\%}$) obtidos para cada fator de ponderação avaliado

Analito		1	1/x	$1/x^2$	$1/x^{1/2}$	1/y	$1/y^2$	$1/y^{1/2}$
MDA	r^2	0,9953	0,9967	0,9970	0,9962	0,9965	0,9970	0,9963
	$\sum_{RE\%}$	13,2	13,1	12,1	13,3	12,9	11,6	13,2
	$s_{RE\%}$	3,32	3,30	3,28	3,32	3,30	3,30	3,32
MDMA	r^2	0,9965	0,9980	0,9987	0,9974	0,9965	0,9988	0,9975
	$\sum_{RE\%}$	9,2	7,0	6,6	7,7	6,9	6,4	7,6
	$s_{RE\%}$	2,48	2,17	2,14	2,25	2,18	2,15	2,25
MEF	r^2	0,9497	0,9350	0,9137	0,9428	0,9497	0,8406	0,9326
	$\sum_{RE\%}$	240	246	276	240	285	456	250
	$s_{RE\%}$	-	-	-	-	-	-	-
KET	r^2	0,9921	0,9903	0,9867	0,9914	0,9921	0,9840	0,9911
	$\sum_{RE\%}$	29,7	27,2	27,0	28,0	27,7	28,0	28,2
	$s_{RE\%}$	8,42	7,17	6,95	7,68	7,24	7,02	7,75
mCPP	r^2	0,9847	0,9833	0,9784	0,9844	0,9847	0,9715	0,9837
	$\sum_{RE\%}$	39,4	35,3	33,7	37,1	36,2	35,6	37,5
	$s_{RE\%}$	10,72	9,06	8,91	9,67	9,13	9,12	9,73
2C-B	r^2	0,9952	0,9961	0,9961	0,9958	0,9952	0,9960	0,9959
	$\sum_{RE\%}$	55,1	54,6	55,0	54,8	55,2	56,4	55,1
	$s_{RE\%}$	7,11	6,89	6,66	7,00	6,89	6,61	7,01
COCA	r^2	0,9954	0,9951	0,9941	0,9954	0,9954	0,9946	0,9955
	$\sum_{RE\%}$	20,9	17,8	16,2	19,5	17,5	15,8	19,2
	$s_{RE\%}$	5,77	4,98	4,63	5,35	4,90	4,64	5,27
DOB	r^2	0,9970	0,9956	0,9934	0,9963	0,9970	0,9918	0,9962
	$\sum_{RE\%}$	17,9	16,4	17,0	17,0	16,5	18,7	17,1
	$s_{RE\%}$	6,10	5,09	4,87	5,50	5,07	4,93	5,49
COCAET	r^2	0,9990	0,9986	0,9981	0,9988	0,9990	0,9979	0,9988
	$\sum_{RE\%}$	11,0	10,0	9,6	10,4	10,0	9,7	10,5
	$s_{RE\%}$	3,51	2,82	2,65	3,10	2,83	2,65	3,11
CLOB	r^2	0,9264	0,8975	0,8411	0,9147	0,9264	0,8053	0,9125
	$\sum_{RE\%}$	94,4	93,7	101,9	92,6	98,1	111,4	94,8
	$s_{RE\%}$	-	-	-	-	-	-	-

2C-B: 4-bromo-2,5-dimetoxifenetilamina; CLOB: clobenzorex; COCA: cocaína; COCAET: cocaetileno; DOB: 2,5-dimetoxi-4-bromoanfetamina; KET: cetamina; mCPP: 1-(3-clorofenil)piperazina; MEF: mefedrona; MDA: 3,4-metilenodioximetanfetamina; MDMA: 3,4-metilenodioximetanfetamina.

Como pode ser visto na tabela acima, para a MEF e o CLOB não foram obtidos um coeficiente de determinação satisfatório, além de o $\sum_{RE\%}$ estar muito alto, o que certamente interferiria de modo significativo a exatidão e a precisão do método. Assim, o método proposto não é adequado para a quantificação destes analitos, motivo pelo qual não serão avaliados nos parâmetros de validação posteriores. Interessante notar que justamente estes dois analitos foram afetados por uma recuperação global muito baixa.

Avaliados os dados da tabela acima, foram escolhidas as ponderações mais adequadas e determinadas as equações de reta para cada analito (tabela 3). a partir dos coeficientes angular e linear encontrados, foram calculados os limites de detecção e quantificação.

Tabela 3 – Equação da reta, fator de ponderação e coeficiente de determinação.

Analito	Equação da reta	Fator de ponderação	r^2
MDA	y = 0,02911x – 0,1880	$1/y^2$	0,9970
MDMA	y = 0,03385x – 0,2456	$1/y^2$	0,9988
KET	y = 0,00818x – 0,0553	1/x	0,9903
mCPP	y = 0,00268x – 0,0312	1/x	0,9833
2C-B	y = 0,001553x – 0,0084	$1/x^2$	0,9961
COCA	y = 0,01422x – 0,09595	$1/y^2$	0,9946
DOB	y = 0,03840x – 0,0462	1/x	0,9956
COCAET	y = 0,01589x – 0,0225	$1/x^2$	0,9981

2C-B: 4-bromo-2,5-dimetoxifenetilamina; CLOB: clobenzorex; COCA: cocaína; COCAET: cocaetileno; DOB: 2,5-dimetoxi-4-bromoanfetamina; KET: cetamina; mCPP: 1-(3-clorofenil)piperazina; MEF: mefedrona; MDA: 3,4-metilenodioximetanfetamina; MDMA: 3,4-metilenodioximetanfetamina.

A partir dos coeficientes angular e linear encontrados, foram calculados os limites de detecção e quantificação (tabela 4). Como o LOQ calculado para alguns dos analitos ficou ligeiramente abaixo do menor ponto da curva de calibração, ficou estipulado que para estas substâncias seria adotado como LOQ o valor correspondente ao primeiro nível, 25 ng/mL.

Tabela 4 – Limite de detecção e de quantificação calculados pelos coeficientes angular e linear, e limite de quantificação estipulado.

Analito	LOD (ng/mL)	LOQ calculado (ng/mL)	LOQ estipulado (ng/mL)
MDA	6,1	20,1	25,0
MDMA	7,2	23,8	25,0
KET	5,9	19,5	25,0
mCPP	7,1	23,4	25,0
2C-B	13,4	44,2	44,2
COCA	9,9	32,7	32,7
DOB	13,1	43,2	
COCAET	6,9	22,8	

2C-B: 4-bromo-2,5-dimetoxifenetilamina; CLOB: clobenzorex; COCA: cocaína; COCAET: cocaetileno; DOB: 2,5-dimetoxi-4-bromoanfetamina; KET: cetamina; LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação; mCPP: 1-(3-clorofenil)piperazina; MEF: mefedrona; MDA: 3,4-metilenodioximetanfetamina; MDMA: 3,4-metilenodioximetanfetamina.

4.5.3. Precisão intradia, precisão interdia e exatidão

A precisão intradia e interdia, expressas em coeficiente de variação (CV), foram estimadas através de cálculos de ANOVA fator único e podem ser vistas na tabela 5. Os valores encontrados estão dentro dos limites estabelecidos (até 20% para CB; 15% para CM e CA), assim como os de exatidão. Apesar de os fatores de ponderação para o modelo de calibração terem sido escolhidos em função da distribuição dos erros residuais nos diferentes níveis da curva (além do $\sum_{RE\%}$ e r^2), nota-se que para a maioria dos analitos a exatidão é menor no ponto mais baixo (CB – 50 ng/mL). Ainda assim, a inexatidão no CB é tolerável, estando de acordo com diretrizes da SWGTOX (até ±20% em cada nível).

Tabela 5 – Precisão intradia, precisão interdia e exatidão do método.

Analito	Nível	Precisão (%)		Exatidão (%)
		Intradia	Interdia	
MDA	CB	4,4	5,5	109,7
	CM	3,1	4,1	101,8
	CA	2,4	4,1	98,7
MDMA	CB	4,0	5,0	109,8
	CM	3,5	4,1	99,9
	CA	3,5	6,1	97,4
KET	CB	1,3	4,5	115,3
	CM	2,8	9,1	96,6
	CA	2,0	3,9	100,8
mCPP	CB	3,1	3,3	116,6
	CM	3,5	6,1	110,9
	CA	3,8	4,8	105,3
2C-B	CB	3,4	4,3	99,7
	CM	4,0	7,6	95,8
	CA	5,6	13,3	90,0
COCA	CB	3,0	7,1	115,1
	CM	3,5	6,5	105,7
	CA	2,3	5,2	99,2
DOB	CB	6,3	9,9	116,3
	CM	6,3	5,9	100,5
	CA	2,6	5,1	101,6
COCAET	CB	3,2	3,4	109,6
	CM	5,7	9,6	103,6
	CA	2,6	4,0	101,9

2C-B: 4-bromo-2,5-dimetoxifenetilamina; CA: controle baixo; CB: controle alto; CM: controle médio; COCA: cocaína; COCAET: cocaetileno; DOB: 2,5-dimetoxi-4-bromoanfetamina; KET: cetamina; mCPP: 1-(3-clorofenil)piperazina; MDA: 3,4-metilenodioximetanfetamina; MDMA: 3,4-metilenodioximetanfetamina.

4.5.4. Arraste

A análise dos cromatogramas dos brancos injetados após o extrato da amostra a 6000 ng/mL não apresentou picos com os íons correspondentes aos dos analitos do presente estudo, quando analisadas as janelas de tempo de retenção correspondentes. Desta forma, assegura-se que abaixo de 6000 ng/mL a análise está livre da ocorrência de contaminação por arraste.

4.5.5. Integridade de diluição

Para verificação de integridade de diluição, amostras nas concentrações de 750 ng/mL e 3000 ng/mL foram diluídas em sangue branco, nas razões de 1:5 e 1:20 respectivamente, e os valores de concentração encontrados foram comparados àqueles obtidos para a injeção de uma amostra de referência a 150 ng/mL. Tanto as diluições como a referência foram realizadas em triplicata (tabela 6).

Tabela 6 - Exatidão e precisão intradia estimados para amostras diluídas.

Analito	Fator de diluição	Exatidão (%)	Precisão (%)	Analito	Fator de diluição	Exatidão (%)	Precisão (%)
MDA	1:5	90,55	8,47	MDMA	1:5	101,95	11,44
	1:20	92,94	4,70		1:20	99,18	10,71
KET	1:5	93,34	8,57	mCPP	1:5	86,54	5,62
	1:20	102,08	6,86		1:20	91,48	13,70
2C-B	1:5	85,47	11,48	COCA	1:5	90,63	6,90
	1:20	101,85	14,70		1:20	104,60	5,02
DOB	1:5	111,62	13,65	COCAET	1:5	102,19	9,93
	1:20	85,27	13,77		1:20	91,57	4,58

2C-B: 4-bromo-2,5-dimetoxifenetilamina; COCA: cocaína; COCAET: cocaetileno; DOB: 2,5-dimetoxi-4-bromoanfetamina; KET: cetamina; mCPP: 1-(3-clorofenil)piperazina; MDA: 3,4-metilenodioximetanfetamina; MDMA: 3,4-metilenodioximetanfetamina.

4.6. Aplicação do método a casos reais

No total, foram coletadas amostras provenientes de 56 cadáveres que preenchiam os critérios de inclusão de amostra. Dos 56 casos, 37 tinham como causa mediata do óbito ferimento por projétil de arma de fogo (PAF), representando 66% das amostras. A segunda causa mediata mais recorrente foi acidente de trânsito, com 16% dos casos (n=9). 5 amostras

eram provenientes de cadáveres do sexo feminino, e 51 do sexo masculino (8,9 e 91,1%, respectivamente).

28,6% das amostras foram positivas (n=16), 5 delas para cocaína e cocaetileno e 11 para cocaína apenas. Não foram detectadas as demais substâncias.

Metade dos positivos foi referente a morte por PAF (n=8). Os 8 outros casos tinham causas de óbito diversas, como pode ser visto na tabela 7.

Tabela 7 – Histórico e resultado dos casos analisados.

Histórico	Não detectados (n)	Positivos (n; %)	Total (n)
PAF	29	8; 21,6	37
FAB	3	1; 25,0	4
AT – colisão	5	1; 16,6	6
AT – atropelamento	1	2; 66,6	3
Cadáver encontrado	0	2; 100	2
Espancamento	0	1; 100	1
Afogamento	0	1; 100	1
Suicídio – enforcamento	1	0; 0,0	1
Suicídio – FAB	1	0; 0,0	1
Total	40	16; 28,6	56

AT: acidente de trânsito; PAF: projétil de arma de fogo; FAB: ferimento por arma branca.

Dentre os 16 casos positivos para cocaína, 12 ficaram abaixo do limite de quantificação, 1 acima do nível mais alto da curva de calibração, e 4 dentro da faixa linear. Dos 5 casos positivos para cocaetileno, 2 ficaram abaixo do limite de quantificação e 3 dentro da faixa linear. Estes três casos são também positivos para cocaína, com valores acima do limite de quantificação (quadro 6).

Quadro 6 – Casos positivos com concentrações quantificáveis.

Caso	Histórico	Cocaína (ng/mL)	Cocaetileno (ng/mL)
24	Cadáver encontrado	71,4	0
26	PAF	1810,0	161,9
29	FAB	75,9	43,6
42	PAF	285,7	39,8

PAF: projétil de arma de fogo; FAB: ferimento por arma branca.

Nos casos 26, 29 e 42 a presença das substâncias no sangue das vítimas pode ajudar as autoridades policial e judiciária a compreenderem a dinâmica dos fatos, mas provavelmente seriam excluídas como *causa mortis*. Já no caso 24, cujo histórico é de "cadáver encontrado caído na rua", a ausência de lesões ou achados anatomopatológicos que justifiquem o óbito sugerem que a presença da droga no organismo possa ser a *causa mortis*. Embora a concentração plasmática média após o uso de cocaína possa estar muito acima do valor encontrado, é necessário levar em consideração fatores como a pré-existência de patologias (especialmente as cardíacas), a possibilidade de haver outras drogas no sangue (incluindo medicamentos), entre outros. O pico plasmático após o uso de cocaína é muito variável, podendo ir de 60 ng/mL a 350 ng/mL, dependendo das quantidades utilizadas e da via de exposição (CONE, 1995; PILGRIM; WOODFORD; DRUMMER, 2013).

É importante notar que os valores encontrados caso 26 são valores aproximados, uma vez que para realização da análise foi utilizado o protocolo de diluição pós preparo de amostra, com correção da concentração de padrão interno – protocolo que, como discutido anteriormente, mostrou ser inadequado por não atingir os critérios de exatidão.

Um dos problemas encontrados durante as análises por monitoramento de íon produto foi o fato de que a fragmentação da cocaína, gerando um íon de *m/z* 182, foi difícil de ser observada quando esta substância estava presente em concentrações muito baixas. Isso pode se dever ao fato de que os picos cromatográficos serem muito estreitos (vide figura 19, que ilustra a aquisição de dados intervalada em modo de monitoramento de íons produto).

5. Conclusão

O método desenvolvido no presente trabalho é adequado para identificação e quantificação de *club drugs* (MDA, MDMA, 2C-B, DOB, KET, mCPP, COCA e COCAET) em amostras de sangue total. Apresentou linearidade, precisão, exatidão e efeito matriz dentro dos critérios estabelecidos pelos principais guias de validação analítica utilizados em análises toxicológicas. Os limites e a recuperação foram adequados à necessidade das análises. Foi certificada a ausência de *carryover* em concentrações até 20 vezes maiores que o nível mais alto da faixa linear.

O método de extração utilizado, embora constituído de muitas etapas, traz a vantagem de ser extremamente simples, estando de acordo com os recursos materiais disponíveis na maioria dos laboratórios de Toxicologia Forense no país.

A utilização de pequenos volumes de solvente orgânico também foi um ponto positivo, além do pequeno volume de amostra necessário. A coleta de sangue das veias femoral e subclávia fornece quantidades diminutas de sangue. Assim, o método é de grande utilidade para análises confirmatórias, sendo que a triagem poderá ser realizada com sangue de regiões anatômicas que forneçam maior volume, como a cavidade cardíaca.

A análise de amostras provenientes de casos reais demonstrou a aplicabilidade do método. Entretanto, a maioria das substâncias pesquisadas não foi detectada em nenhuma das amostras – apesar de algumas delas serem relativamente conhecidas (como MDMA e cetamina). Os limites de detecção e de quantificação alcançados pelo método são suficientes para detectar e quantificar estas drogas nas faixas de concentrações em que produzem seus efeitos, de modo que é muito provável que de fato elas estivessem ausentes nas amostras. Como esperado, a cocaína e o cocaetileno foram as substâncias mais frequentes, e o percentual de casos positivos para cocaetileno demonstra a necessidade de se ter métodos qualitativos e quantitativos para este analito em todos os laboratórios de Toxicologia Forense.

Apesar de não terem sido identificadas nas amostras todas as substâncias incluídas no método desenvolvido, os resultados encontrados são de suma importância para o aprimoramento do trabalho pericial no Brasil, uma vez que evidencia a necessidade de se estabelecer métodos quantitativos para drogas de abuso nos laboratórios de Toxicologia Forense – uma prática que ainda não é adotada em todas as unidades federativas do país.

Por fim, os resultados encontrados fornecerão, ainda que de forma exordial, informações sobre a prevalência do uso de drogas entre as vítimas de morte não natural no Estado de Goiás, uma vez que não existem dados publicados e este é o primeiro trabalho que versa sobre o tema.

6. Referências

ADAMOWICZ, P.; TOKARCZYK, B. Simple and rapid screening procedure for 143 new psychoactive substances by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Drug Testing and Analysis**, v. 8, n. 7, p. 652–667, 2016.

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

ARBO, M. D.; BASTOS, M. L.; CARMO, H. F. Piperazine compounds as drugs of abuse. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 122, n. 3, p. 174–185, 2012.

BAILEY, D. N. Plasma cocaethylene concentrations in patients treated in the emergency room or trauma unit. **American journal of clinical pathology**, v. 99, n. 2, p. 123–7, fev. 1993.

BANERJEE, S.; MAZUMDAR, S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2012, p. 1–40, 2012.

BIDNY, S. et al. Simultaneous screening and quantification of basic, neutral and acidic drugs in blood using UPLC-QTOF-MS. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 41, n. 3, p. 181–195, 2017.

BONO, J. P. Criminalistics: Introduction to controlled substances. In: KARCH, S. B. (Ed.). . **Drug abuse handbook**. 2nd. ed. Boca Raton: CRC Press, 2007. p. 1–69.

BOUSO, J. C. et al. MDMA-assisted psychotherapy using low doses in a small sample of women with chronic posttraumatic stress disorder. **Journal of psychoactive drugs**, v. 40, n. 3, p. 225–236, 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 52, de 06 de outubro de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF. 2011a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 36, de 03 de agosto de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF. 2011b.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 50, de 25 de setembro de 2014. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF. 2014a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 06, de 18 de fevereiro de 2014. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF. 2014b.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 192 de dezembro de 2017. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF. 2017.

BRUKER DALTONICS. **micrOTOF II user manual**. 1.2 ed. Bremen: Bruker Daltonics, 2008.

BRUNT, T. M. et al. Instability of the ecstasy market and a new kid on the block: mephedrone. **Journal of Psychopharmacology**, v. 25, n. 11, p. 1543–1547, 2011.

CAUDEVILLA-GÁLLIGO, F. et al. 4-Bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B): presence in the recreational drug market in Spain, pattern of use and subjective effects. **Journal of psychopharmacology (Oxford, England)**, v. 26, n. 7, p. 1026–35, 2012.

CECH, N. B.; ENKE, C. G. Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 20, n. 6, p. 362–387, 2001.

CHASIN, A. A. DA M.; SILVA, E. S.; CARVALHO, V. M. Estimulantes do Sistema Nervoso Central. In: OGA, S.; CAMARGO, M.; BATISTUZZO, J. (Eds.). . **Fundamentos de Toxicologia**. 4ª ed. São Paulo: Atheneu, 2014. p. 365–383.

CHÈZE, M. et al. Simultaneous analysis of six amphetamines and analogues in hair, blood and urine by LC-ESI-MS/MS. **Forensic Science International**, v. 170, n. 2–3, p. 100–104, 2007.

CLAUWAERT, K. M. et al. Analysis of cocaine, benzoylecgonine, and cocaethylene in urine by HPLC with diode array detection. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 17, p. 3021–3028, 1996.

CODY, J. T.; VALTIER, S. Amphetamine, clobenzorex, and 4-hydroxyclobenzorex levels following multidose administration of clobenzorex. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 25, n. 3, p. 158–65, abr. 2001.

CONE, E. J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cocaine. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 19, n. 6, p. 459–478, 1995.

CROTTI, A. E. M. et al. Espectrometria de massas com ionização por "electrospray": processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 287–292, abr. 2006.

DA COSTA, J. L. et al. Chemical identification of 2,5-dimethoxy-4-bromoamphetamine (DOB). **Forensic Science International**, v. 173, n. 2–3, p. 130–136, 2007.

DA COSTA, J. L.; LANARO, R.; CAZENAVE, S. O. S. Drogas Sintéticas. In: OGA, S.; CAMARGO, M.; BATISTUZZO, J. (Eds.). . **Fundamentos de Toxicologia**. 4ª ed. [s.l.] Atheneu, 2014. p. 459–475.

DICKSON, A. J. et al. Multiple-drug toxicity caused by the coadministration of 4-methylmethcathinone (mephedrone) and heroin. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 34, n. 3, p. 162–8, abr. 2010.

DINIS-OLIVEIRA, R. J. et al. Collection of biological samples in forensic toxicology. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 20, n. 7, p. 363–414, set. 2010.

DOLE, M. et al. Molecular Beams of Macroions. **The Journal of Chemical Physics**, v. 49, n. 5, p. 2240–2249, 1 set. 1968.

DRUMMER, O. H. Postmortem toxicology of drugs of abuse. **Forensic Science International**, v. 142, n. 2–3, p. 101–113, 2004.

DYBDAL-HARGREAVES, N. F. et al. Mephedrone: Public health risk, mechanisms of action, and behavioral effects. **European Journal of Pharmacology**, v. 714, n. 1–3, p. 32–40, 2013.

FENN, J. B. et al. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**, v. 246, n. 4926, p. 64 LP-71, 6 out. 1989.

FLANAGAN, R. J. et al. **Fundamentals of Analytical Toxicology**. 1st. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2007.

GAFFNEY, A. et al. Drug use monitoring in Australia: 2008 annual report on drug use among police detainees. **Monitoring Reports**, n. 9, 2010.

GAHLINGER, P. M. Club Drugs: MDMA, Gamma-Hydroxybutyrate (GHB), Rohypnol, and Ketamine. **American Family Physician**, v. 69, n. 11, p. 2620–2626, 2004.

GEOFFREY TAYLOR, F. Disintegration of water drops in an electric field. **Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences**, v. 280, n. 1382, p. 383–397, 28 jul. 1964.

GLICKSBERG, L.; BRYAND, K.; KERRIGAN, S. Identification and quantification of synthetic cathinones in blood and urine using liquid chromatography-quadrupole/time of flight (LC-Q/TOF) mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 1035, p. 91–103, 2016.

GREEN, A. R. et al. The preclinical pharmacology of mephedrone; not just MDMA by another name. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 9, p. 2251–2268, 2014.

HEISHMAN, S. J. Pharmacodinamics. In: KARCH, S. B. (Ed.). . **Handbook of drug abuse**. Boca Raton: CRC Press, 2007. p. 210–214.

HOFFMAN, E. DE; STROOBANT, V. Introduction. In: HOFFMAN, E. DE; STROOBANT, V. (Eds.). . **Mass spectrometry: principles and applications**. 3rd. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2007a. p. 1–11.

HOFFMAN, E. DE; STROOBANT, V. (EDS.). Electrospray. In: **Mass spectrometry: principles and applications**. 3rd. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2007b. p. 43–55.

HOFFMAN, E. DE; STROOBANT, V. Mass analysers. In: HOFFMAN, E. DE; STROOBANT, V. (Eds.). . **Mass spectrometry: principles and applications**. 3rd. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2007c. p. 85–143.

JAMES, D. et al. Clinical characteristics of mephedrone toxicity reported to the UK National Poisons Information Service. **Emergency Medicine Journal**, v. 28, n. 8, p. 686–689, 2011.

JENKINS, A. J. Pharmacokinetics: drug absorption, dristribution and elimination. In: KARCH, S. B. (Ed.). . **Handbook of drug abuse**. 2nd. ed. Boca Raton: CRC Press, 2007a. p. 205.

JENKINS, A. J. Pharmacokinetics: drug absorption, distribution and elimination. In: KARCH, S. B. (Ed.). . **Handbook of drug abuse**. 2nd. ed. Boca Raton: CRC Press, 2007b. p. 169–173.

KATZ, J. L.; TERRY, P.; WITKIN, J. M. Comparative behavioral pharmacology and toxicology of cocaine and its ethhanol-derived metabolite, cocaine ethyl-ester (cocaethylene). **Life Sciences**, v. 50, n. 18, p. 1351–1361, jan. 1992.

KRAEMER, T.; MAURER, H. H. Toxicokinetics of amphetamines: metabolism and toxicokinetic data of designer drugs, amphetamine, methamphetamine, and their N-alkyl derivatives. **Therapeutic drug monitoring**, v. 24, n. 2, p. 277–289, 2002.

LAIZURE, S. C.; PARKER, R. B. Pharmacodynamic Evaluation of the Cardiovascular Effects after the Coadministration of Cocaine and Ethanol. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 37, n. 2, p. 310–314, 1 fev. 2009.

LANARO, R. et al. Identificação química da clorofenilpiperazina (CPP) em comprimidos apreendidos. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 725–729, 2010.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas : finalmente "compatíveis"? **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35–61, 2009.

LEYTON, V. et al. Amphetamine, cocaine and cannabinoids use among truck drivers on the roads in the State of Sao Paulo, Brazil. **Forensic Science International**, v. 215, n. 1–3, p. 25–27, 2012.

LOGAN, B. K. Methamphetamine — Effects on Human Performance and Behavior. **Forensic Science Review**, v. 14, p. 133–151, 2002.

LOZANO-CUENCA, J. et al. Possible mechanisms involved in the vasorelaxant effect produced by clobenzorex in aortic segments of rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 50, n. 9, 7 ago. 2017.

LUCENA, J. et al. Cocaine-related sudden death: a prospective investigation in south-west Spain. **European Heart Journal**, v. 31, n. 3, p. 318–329, 1 fev. 2010.

LUSTHOF, K. J. et al. A case of extreme agitation and death after the use of mephedrone in The Netherlands. **Forensic science international**, v. 206, n. 1–3, p. e93-5, 2011.

MASKELL, P. D. et al. Mephedrone (4-methylmethcathinone)-related deaths. **Journal of analytical toxicology**, v. 35, n. 3, p. 188–191, 2011.

MCCANCE-KATZ, E. F.; KOSTEN, T. R.; JATLOW, P. Concurrent use of cocaine and alcohol is more potent and potentially more toxic than use of either alone a multiple-dose study. **Biological Psychiatry**, v. 44, n. 4, p. 250–259, 1998.

MOKDAD, A. H. Actual Causes of Death in the United States, 2000. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 291, n. 10, p. 1238, 10 mar. 2004.

MOORE, K. Amphetamines/Sympathomimetic Amines. In: LEVINE, B. (Ed.). . **Principles of Forensic Toxicology**. 1st. ed. [s.l.] AACC Press, 1999. p. 265–285.

NHS. Club Drugs: Emerging Trends and Risks. p. 1–8, 2012.

NUGTEREN-VAN LONKHUYZEN, J. J. et al. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and toxicology of new psychoactive substances (NPS): 2C-B, 4-fluoroamphetamine and benzofurans. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 157, p. 18–27, 2015.

ODOARDI, S. et al. High-throughput screening for new psychoactive substances (NPS) in whole blood by DLLME extraction and UHPLC–MS/MS analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 1000, p. 57–68, set. 2015.

PARTICLE SCIENCES. **Mass Spectrometry in Bioanalysis**. Disponível em: <http://www.particlesciences.com/news/technical-briefs/2009/mass-spectrometry-bioanalysis.html>. Acesso em: 20 nov. 2017.

PETERS, F. F. T. Stability of analytes in biosamples - an important issue in clinical and forensic toxicology? **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 388, n. 7, p. 1505–19, 2007.

PILGRIM, J. L.; WOODFORD, N.; DRUMMER, O. H. Cocaine in sudden and unexpected death: A review of 49 post-mortem cases. **Forensic Science International**, v. 227, n. 1–3, p. 52–59, 2013.

POTT JUNIOR, H.; FERREIRA, M. C. F. Infarto do miocárdio induzido por cocaína. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 5, p. 385–388, 2009.

RAYLEIGH, F. On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity. **The London, Edinburgh and Dublin Phylosophical Magazine and Journal of Sciences**, v. 14, n. 87, p. 184–186, 1882.

REES, K. A. et al. The effect of sodium fluoride preservative and storage temperature on the stability of cocaine in horse blood, sheep vitreous and deer muscle. **Forensic Science International**, v. 217, n. 1–3, p. 182–188, 2012.

SHULGIN, A. T.; CARTER, M. F. Centrally active phenethylamines. **Psychopharmacology Communications**, v. 1, n. 1, p. 93–98, 1975.

SILVA, M. I. et al. Cocaine: historical background, neurobiology of the addiction and relapse and therapeutic perspectives. **Acta Médica Portuguesa**, v. 23, n. 2, p. 247–258, 2010.

SIQUEIRA, M. E. P. B. Fundamentos do preparo de amostras. In: MOREAU, R. L. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B. (Eds.). . **Toxicologia analítica**. 1ª Ed. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 135–141.

SKOPP, G. et al. In vitro stability of cocaine in whole blood and plasma including ecgonine as a target analyte. **Therapeutic drug monitoring**, v. 23, n. 2, p. 174–81, 2001.

SKOPP, G. Preanalytic aspects in postmortem toxicology. **Forensic Science International**, v. 142, n. 2–3, p. 75–100, 2004.

SOUZA, L. F. et al. HR-MAS NMR for Rapid Identification of Illicit Substances in Tablets and Blotter Papers Seized by Police Department. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2016.

STAACK, R. F. et al. Proof of a 1-(3-chlorophenyl)piperazine (mCPP) intake: use as adulterant of cocaine resulting in drug-drug interactions? **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 855, n. 2, p. 127–33, 2007.

STAACK, R. F.; MAURER, H. H. Piperazine-derived designer drug 1-(3-chlorophenyl)piperazine (mCPP): GC-MS studies on its metabolism and its toxicological detection in rat urine including analytical differentiation from its precursor drugs trazodone and nefazodone. **Journal of analytical toxicology**, v. 27, n. December, p. 560–568, 2003.

SWGTOX. Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) standard practices for method validation in forensic toxicology. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 37, n. 7, p. 452–74, set. 2013.

SWORTWOOD, M. J.; BOLAND, D. M.; DECAPRIO, A. P. Determination of 32 cathinone derivatives and other designer drugs in serum by comprehensive LC-QQQ-MS/MS analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 4, p. 1383–1397, 2013.

TOGNI, L. R. et al. The Variability of Ecstasy Tablets Composition in Brazil. **Journal of Forensic Sciences**, v. 60, n. 1, p. 10–14, 2014.

UNODC. **Recommended methods for the identification and analysis of amphetamine, methamphetamine, and their ring-substituted analogues in seized materials**. ST/NAR/34 ed. New York: United Nation Publication, 2006.

UNODC. **World Drug Report 2015**. New York: [s.n.].

UNODC. **World Drug Report 2017**. New York: [s.n.].

VAIANO, F. et al. A novel screening method for 64 new psychoactive substances and 5 amphetamines in blood by LC-MS/MS and application to real cases. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 129, p. 441–449, 2016.

WARNER, A.; NORMAN, A. B. Mechanisms of Cocaine Hydrolysis and Metabolism In Vitro and In Vivo: A Clarification. **Therapeutic drug monitoring**, v. 3, n. 22, p. 266–270, 2000.

WATSON, J. T.; SPARKMAN, O. D. **Introduction to mass spectrometry**. 4th. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2007.

WESTFALL, T. C.; WESTFALL, D. P. Agonistas e antagonistas adrenérgicos. In: GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. G. (Eds.). . **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Mc Graw-Hill, 2006. p. 215–264.

WETLI, C. V. Pathology of drug abuse. In: KARCH, S. B. (Ed.). . **Handbook of drug abuse**. 2nd. ed. Boca Raton: CRC Press, 2007a. p. 100.

WETLI, C. V. Pathology of drug abse. In: KARCH, S. B. (Ed.). . **Handbook of drug abuse**. 2nd. ed. Boca Raton: CRC Press, 2007b. p. 104.

YAMASHITA, M.; FENN, J. B. Negative Ion Productlon with the Electrospray Ion Source. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 88, n. 20, p. 4671–4675, 1984a.

YAMASHITA, M.; FENN, J. B. Electrospray Ion Source. Another Variation on the Free-Jet Theme. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 434, n. 20, p. 4451–4459, 1984b.

ZANCANARO, I. et al. Prescription and illicit psychoactive drugs in oral fluid--LC-MS/MS method development and analysis of samples from Brazilian drivers. **Forensic science international**, v. 223, n. 1–3, p. 208–16, 2012.

ZELENY, J. The Electrical Discharge from Liquid Points, and a Hydrostatic Method of Measuring the Electric Intensity at Their Surfaces. **Phys. Rev.**, v. 3, n. 2, p. 69–91, 1914.

ZIMMERMAN, J. L. Cocaine intoxication. **Critical Care Clinics**, v. 28, n. 4, p. 517–526, 2012.

7. Anexos

I – Histórico Escolar (Ficha do Aluno Janus)

06/02/2018

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9141 - 5372526/1 - Flávia Pine Leite

Email:	flavia.leite@usp.br
Data de Nascimento:	20/09/1986
Cédula de Identidade:	RG - 44.014.602-1 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Farmacêutica-Bioquímica - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2010

Curso:	Mestrado
Programa:	Toxicologia e Análises Toxicológicas
Data de Matrícula:	20/01/2015
Início da Contagem de Prazo:	20/01/2015
Data Limite para o Depósito:	15/02/2018
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Maurício Yonamine - 20/01/2015 até o presente. Email: yonamine@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 20/01/2015
Trancamento(s):	90 dias Período de 08/05/2017 até 05/08/2017
Prorrogação(ões):	120 dias Período de 18/10/2017 até 15/02/2018
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 11/03/2016
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 20/01/2015 Trancado em 08/05/2017 Prorrogação em 11/09/2017

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).
Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 05/02/2018
Impresso em: 06/02/2018 05:50:25

06/02/2018

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9141 - 5372526/1 - Flávia Pine Leite

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
6045850-2/1	Introdução à Proteômica (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo)	02/03/2015	08/03/2015	30	2	100	A	N	Concluída
6045841-2/1	Tópicos Avançados em Toxicologia Ambiental (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo)	02/03/2015	08/03/2015	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5747-2/1	Toxicologia Forense	11/05/2015	14/06/2015	60	4	100	A	N	Concluída
6045854-1/1	Tópicos em Toxicologia (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo)	03/08/2015	23/08/2015	90	6	90	A	N	Concluída
6045825-3/3	Métodos Analíticos para a Determinação de Drogas Lícitas e Ilícitas em Toxicologia Forense (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo)	03/11/2015	19/11/2015	30	2	100	A	N	Concluída
Crédito Externo	Espectrometria de Massas: Fundamentos e Aplicações (1)	04/04/2016	25/07/2016	-	4	100	T	-	-
FBC5802-3/9	Tópicos Avançados em Toxicologia I	02/08/2016	14/11/2016	15	1	100	A	N	Concluída
FBC5758-3/1	Toxicologia dos Praguicidas	13/09/2016	24/10/2016	90	6	100	A	N	Concluída
FBC5803-3/9	Sistemas de Garantia da Qualidade em Laboratórios de Ensaio	14/03/2017	27/03/2017	30	2	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	29
Estágios:			
Total:	0	25	29

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Observações:

1) Disciplinas(s) cursada(s) na(o) Universidade Federal de Goiás. Atribuição de créditos aprovada pelo(a) Comissão de Pós-Graduação em Sessão de 14/09/2016.

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 05/02/2018

Impresso em: 06/02/2018 05:50:25

06/02/2018

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9141 - 5372526/1 - Flávia Pine Leite

Comissão julgadora da dissertação de mestrado:

NUSP	Nome	Vínculo	Função
1618543	Maurício Yonamine	FCF - USP	Presidente

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 05/02/2018
Impresso em: 06/02/2018 05:50:25

II – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA UNIVERSIDADE DE SÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise toxicológica simultânea de club drugs em amostras de sangue total
Pesquisador: Mauricio Yonamine
Área Temática:
Versão: 2
CAAE: 45151715.8.0000.0067
Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo
Patrocinador Principal: FUND COORD DE APERFEICOAMENTO DE PESSOAL DE NIVEL SUP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.209.146

Apresentação do Projeto:
Trata-se de projeto destinado ao desenvolvimento de nova metodologia de avaliação toxicológica de substancias de abuso (club drugs), utilizadas principalmente por adolescentes e jovens. Para o estudo serão utilizadas amostras de sangue de 20 participantes, que morreram de causas não naturais e que serão submetidos a necrópsia no Instituto Médico Legal de Goiânia. Além da amostra a ser coletada rotineiramente para a elaboração do laudo necroscópico serão coletados 5 ml de sangue, que serão utilizados apenas para o presente estudo. Será obtido um termo de consentimento do responsável legal pelo corpo, e só serão avaliados cadáveres de pessoas com mais de 18 anos de idade. Serão pesquisadas doze substâncias através de técnica de cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC -MS).

Objetivo da Pesquisa:
Os objetivos são o desenvolvimento e validação de uma nova técnica de detecção de drogas recreacionais e aplicação do novo método em casos reais avaliados por Instituto Médico Legal.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:
Os riscos são mínimos e decorrentes da coleta de sangue em cadáver, e os benefícios não são diretos, porém potenciais para toda a comunidade se o método estudado se mostrar efetivo.

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfcf@usp.br

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 1.209.146

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é clara, objetiva, com critérios de inclusão e exclusão bem definidos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O Termo de Consentimento pós esclarecido foi reformulado, atendendo às recomendações feitas anteriormente, e estando adequado às necessidades de entendimento/emocionais dos responsáveis pelos participantes na pesquisa.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este CEP entende que o projeto de pesquisa pode ser aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	Anuencia FCF.pdf	13/05/2015 13:46:38		Aceito
Outros	Anuencia IML.pdf	13/05/2015 13:47:07		Aceito
Outros	Declaracao de Participacao Flavia.pdf	13/05/2015 13:47:22		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	15/05/2015 12:01:23		Aceito
Folha de Rosto	Folha de rosto.pdf	15/05/2015 12:05:39		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto Club drugs LPME CEP.pdf	15/05/2015 14:46:33		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_515833.pdf	15/05/2015 14:49:09		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE 2.doc	26/06/2015 11:22:09		Aceito

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfcf@usp.br

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 1.209.146

Outros	Carta Resposta I.pdf	26/06/2015 11:22:49		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_515833.pdf	26/06/2015 11:23:10		Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

SAO PAULO, 01 de Setembro de 2015

Assinado por:
Valentina Porta
(Coordenador)

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfcf@usp.br

III – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

ESTADO DE GOIÁS
SECRETARIA DA SEGURANÇA PÚBLICA
Superintendência de Polícia Técnico-Científica
Instituto Médico Legal Aristoclides Teixeira

1. Informações do Participante da Pesquisa

Nome:	
Local de Nascimento:	
Sexo: ( ) M ( ) F	Data de Nascimento: / /

2. Informações do Responsável Legal

Nome:		
Documento de Identidade (tipo):	Nº.:	Sexo: ( ) M ( ) F
Local de Nascimento:	Data de Nascimento: / /	
Endereço:	Nº.:	
Complementos:	Bairro:	
Cidade:	Estado:	
CEP:	Telefones:	

3. Título do Projeto de Pesquisa

Análise toxicológica simultânea de *club drugs* em amostras de sangue total

4. Duração da Pesquisa

2 anos

5. Nome do Pesquisador Responsável

Prof. Dr. Mauricio Yonamine	
Cargo/ Função: Farmacêutico	CRF 21507

6. Instituição/Instituições

Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP – Análises Clínicas e Toxicológicas e Instituto Médico Legal Aristoclides Teixeira de Goiânia – GO.

Meu nome é Mauricio Yonamine, sou professor da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e junto com a aluna de mestrado Flávia Pine Leite e Dr. Marcellus Sousa Arantes do Instituto Médico Legal (IML), gostaríamos de pedir a sua colaboração no projeto intitulado "Análise toxicológica simultânea de club drugs em amostras de sangue total" que visa desenvolver um método para identificação de substâncias psicoativas em sangue.

Nesta pesquisa serão incluídas vítimas de morte não-natural, de indivíduos do ambos os sexos, acima de 18 anos e que as respectivas famílias consintam em aderir voluntariamente ao estudo. Caso você permita a utilização, nesta pesquisa, de material proveniente da pessoa sob sua responsabilidade, a amostra necessária será sangue e será coletada durante a necropsia. Para o estudo será necessário 5 mL de sangue. Essa amostra será utilizada para fazer análise de substâncias psicoativas. A coleta de sangue será feita por profissional qualificado, preservando a integridade física da pessoa sob sua responsabilidade.

ESTADO DE GOIÁS
SECRETARIA DA SEGURANÇA PÚBLICA
Superintendência de Polícia Técnico-Científica
Instituto Médico Legal Aristoclides Teixeira

A pesquisa envolve risco mínimo. A identidade da vítima será mantida em sigilo durante todo o processo, inclusive quando os resultados desse estudo forem publicados em artigos de revistas cientificas ou forem apresentados em temas de aulas e debates. Contudo, também haverá coleta de informações relativas à vítima como idade, sexo e histórico. Não haverá benefícios diretos, mas o estudo será importante para contribuir para a melhoria dos serviços prestados pela Polícia Técnico Científica, pois será estudada uma técnica que auxiliará as investigações sobre a causa da morte, além de produzir conhecimento científico. As amostras serão acondicionadas em embalagens apropriadas, identificadas apenas com numeração por questões de sigilo. Ao final da pesquisa as amostras serão descartadas em lixo adequado.

Você tem garantido o direito de não aceitar ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa. Mesmo que você não concorde em aderir, os exames médico-legal e toxicológico serão realizados, ou seja, você (e a pessoa pelo qual é responsável) não serão prejudicados caso você decida não aderir. Você não receberá pagamento, portanto, a sua adesão e permissão são voluntários. Entretanto, caso haja despesas em virtude da referida adesão e permissão nesta pesquisa, esses gastos serão ressarcidos. Da mesma forma, haverá indenização no caso de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

Após ler com atenção este documento e ser esclarecido(a) sobre as informações, no caso de aceitar ceder a amostra para este estudo, **rubrique** (**assine) em todas as folhas e ao final do documento**, que está em **duas vias** e também será assinado por mim, pesquisador, em todas as folhas. Uma via ficará com o pesquisador e uma com o responsável legal. Em caso de dúvidas, entrar em contato com: Flávia Pine Leite (fone 62 3201-9521) e e-mail: flavia.pine@gmail.com; ou com o Prof. Dr. Mauricio Yonamine (fone 11 3091-2194) e e-mail: yonamine@usp.br. Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em aderir ao presente Protocolo de Pesquisa.

Consentimento Pós-Esclarecido

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

Goiânia, _____ de _____ de _____.

_____ _____
Assinatura do Responsável Legal Assinatura do Pesquisador

Para qualquer questão, dúvida, esclarecimento ou reclamação sobre aspectos éticos relativos a este protocolo de pesquisa, favor entrar em contato com o **Comitê de Ética em Pesquisa** da **Faculdade de Ciências Farmacêuticas** da **Universidade de São Paulo**: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A, Butantã, São Paulo, CEP 05508-000, Telefones 3091-3622 e 3091-3677, e-mail: **cepfcf@usp.br**.