UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Avaliação da exposição de crianças a substâncias psicoativas durante a lactação através da análise toxicológica em leite materno

Gabriela de Oliveira Silveira

Dissertação para obtenção do título de
MESTRE

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Yonamine

São Paulo (SP)

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Avaliação da exposição de crianças a substâncias psicoativas durante a lactação através da análise toxicológica em leite materno

Gabriela de Oliveira Silveira

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018.
O 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)

2016

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

S587a	<p data-bbox="384 1357 815 1384">Silveira, Gabriela de Oliveira</p> <p data-bbox="384 1391 1311 1525">Avaliação da exposição de crianças e substâncias psicoativas durante a lactação através da análise toxicológica em leite materno / Gabriela de Oliveira Silveira. -- São Paulo, 2016. 102p.</p> <p data-bbox="384 1592 1311 1720">Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Orientador: Yonamine, Mauricio</p> <p data-bbox="384 1794 1311 1890">1. Análise toxicológica 2. Leite materno 3. Cromatografia a gás 4. Espectrometria de massas 5. Cocaína 6. Canabinoides I. T. II. Yonamine, Mauricio, orientador.</p> <p data-bbox="986 1928 1230 1955">615.907 CDD</p>
-------	---

Gabriela de Oliveira Silveira

Avaliação da exposição de crianças a substâncias psicoativas durante a lactação
através da análise toxicológica em leite materno

Comissão julgadora da dissertação para obtenção do título de MESTRE

Prof. Dr. Maurício Yonamine

Orientador/Presidente

Prof. Dr. Raphael Caio Tamborelli Garcia

1º examinador

Dra. Karina Helena Moraes Cardozo

2º examinador

São Paulo, 13 de junho de 2016

APOIO FINANCEIRO

FAPESP – FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

Processo nº .: 2014/04107-7

Processo nº .: 2015/15700-3

Agradecimentos

Para a realização deste trabalho contei com muito apoio e incentivo durante e mesmo antes do ingresso no mestrado, dentro e fora da universidade, portanto jamais poderia deixar de mostrar minha gratidão. Sou grata em primeiro lugar à minha mãe, Maria Cremilde, que tomou como seus os sonhos dos filhos e graças a sua luta cá estou hoje. Ao meu pai Domingos e aos meus irmãos Bianca, Igor e Isabela pela disposição e apoio incondicionais. Aos meus avós Chico, Marilene e Leônia e as minhas tias Selma e Nivalda, fiéis escudeiros de mainha, sempre atentos, preocupados e a disposição em todos os momentos. A toda minha família, formadores do que sou hoje. Agradeço a Rafael Lanaro, Paula Souhbia e Sueli Melo, por confiar, abrir portas e me incentivar a seguir. Sou grata a Bia Bismara pela transmissão de conhecimento e paciência no meu ingresso no LAT-USP, bem como a toda sua equipe, estagiários, Angelo e D. Luzia. No início senti receio de não saber se haveria uma equipe e amigos ao meu lado com os quais contar, então agradeço a Flavia Roveri e Sarah Eller por acabarem com esse receio e serem essas amigas ... e a equipe cresceu: agradeço a Tiago, Menck, André, Marcelo, Ana Miguel, Maita, Idylla, Jefferson, Katia, Iolana, Alexandre, Tati e Anax, por serem a melhor equipe e os melhores amigos que poderia haver. Agradeço a Renato, meu companheiro, pelo amor e pela incrível capacidade de me fazer encarar medos e ter coragem. Agradeço a toda equipe do CCI de São Paulo, especialmente à Lígia, Carolina, Alexandre e Silvana, pelo entusiasmo com este projeto e coleta de amostras. Agradeço a FAPESP, a Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas pela infraestrutura, financiamento e oportunidade. Serei eternamente grata ao meu orientador, Dr. Mauricio Yonamine, pela confiança, paciência, orientação e por tornar possível trabalhar no que acredito. A todos que tornaram esse trabalho de algum modo possível, muito obrigada!

RESUMO

Silveira, G.O. **Avaliação da exposição de crianças a substâncias psicoativas durante a lactação através da análise toxicológica em leite materno.** 2016. 102f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

O aleitamento materno está associado a benefícios de ordem nutricional, imunológica, afetiva, econômica e social. Grande parte das drogas lícitas e ilícitas consumidas pela lactante pode ser transferida para o leite, o que pode representar potenciais efeitos nocivos para a criança em curto e longo prazos. Embora o conhecimento a respeito de substâncias psicoativas durante a lactação venha sendo ampliado, ainda há poucas informações sobre as concentrações de substâncias excretadas por essa via e muitas dúvidas sobre os efeitos delas em crianças durante o período de amamentação. O leite materno é uma matriz não convencional que pode ser usada para avaliar a exposição de crianças a substâncias durante o aleitamento e sua principal vantagem é a coleta simples e não-invasiva. Contudo, a extração destas a partir do leite materno é um desafio analítico devido ao seu alto conteúdo lipídico e proteico, bem como a alteração na sua composição durante o período pós-parto. No presente trabalho, técnicas analíticas miniaturizadas foram desenvolvidas visando a detecção das substâncias psicoativas cocaína, cocaetileno, norcocaína, tetraidrocanabinol, canabinol, canabidiol em amostras de leite materno, utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). A microextração em fase líquida (LPME) foi aplicada para analitos de cocaína e a microextração em fase sólida (SPME) para canabinoides. Após o desenvolvimento e validação dos métodos, as análises foram aplicadas em amostras de leite coletadas no hospital municipal Dr. Arthur Ribeiro de Saboya (n=109). Além das técnicas terem se mostrado adequadas à extração e detecção dos analitos, confirmou-se a excreção de cocaína no leite materno em quantidades moderadas com resultado positivo para uma amostra (138 ng/mL). Bem como foi detectado tetraidrocanabinol nas concentrações de 20 ng/mL e 31 ng/mL em amostras de leite humano.

Palavras-chave: microextração em fase líquida, microextração em fase sólida, leite materno, canabinoides, cocaína, cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

ABSTRACT

Silveira, G.O. **Evaluation of infant exposure to psychoactive substances during lactation by toxicological analysis in breast milk.** 2016. 102f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Maternal breastfeeding is related with nutritional, immunological, affective, economic, and social benefits. Most licit and illicit substances consumed by the nursing mother might be excreted in breast milk, which may cause potential harmful effects to the breastfed infant at short and long terms. Although the knowledge about the psychoactive substances during lactation is increasing, there is still few information on the levels in which these substances are excreted in breast milk and many questions about the possible effects of these substances in the infant during the nursing period still remain unanswered. Breast milk is an unconventional matrix that can be used to assess infant exposure to drugs, and its main advantage is its easy and non-invasive collection. However, the extraction of substances from breast milk is an analytical challenge because of its high protein and fat content and changing composition during the postpartum period. In this study, miniaturized analytical techniques will be carried out to determine psychoactive substances such as cocaine, cocaethylene, norcocaine, tetrahydrocannabinol, cannabinol, and cannabidiol in milk samples by using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Liquid-phase microextraction (LPME) was applied to cocaine analytes and solid-phase microextraction (SPME) was applied to cannabinoids. After the development and validation, the methods were applied in milk samples collected from municipal hospital Dr. Arthur Ribeiro de Saboya (n=109). These techniques have proved to be suitable for analyte extraction and detection. Cocaine excretion in breast milk has been confirmed given that one sample was positive to cocaine in moderate amounts (138 ng/mL), as well as, two samples could be confirmed positive to tetrahydrocannabinol at 20 ng/mL and 31 ng/mL.

Keywords: liquid-phase microextraction, solid-phase microextraction, breast milk, cannabinoids, cocaine, gas chromatography-mass spectrometry.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Principais canabinoides naturalmente presentes em *Cannabis sativa*: Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), Canabidiol (CBD) e Canabinol (CBN).....14
- Figura 2** - Cocaína (COC) e substâncias psicoativas relacionadas, norcocaína (NCOC) e cocaetileno (CE).....16
- Figura 3** - Representação esquemática da LPME de três fases. A) Sistema miniaturizado de extração em *ependorf*. B) Ampliação da imagem da fibra: um solvente é impregnado na fibra, e como fase aceptora é utilizada uma solução aquosa. Os analitos na forma molecular ("M") atravessam a fase orgânica e, ionizados ("+") na fase aceptora, são incapazes de retornar à fase doadora.....21
- Figura 4** - Figura esquemática representando HS-SPME. A fibra, fixada num suporte adequado, é exposta ao *headspace* acima da amostra aquecida. Ao atingir o equilíbrio os analitos são adsorvidos no revestimento polimérico da fibra e posteriormente dessorvidos no interior do injetor do cromatógrafo.....23
- Figura 5** - Cromatogramas obtidos com a análise de amostra negativa de LH adicionada dos analitos de cocaína e seus respectivos deuterados na concentração de 100 ng/mL. A – cocaína (COC) e cocaína-d3 (COC-d3); B – cocaetileno (CE) e cocaetileno-d3 (CE-d3); C – norcocaína (NCOC) e norcocaína-d3 (NCOC-d3).....42
- Figura 6** - Cromatogramas obtidos com a análise de amostra negativa de LH adicionada de canabinoides e seus respectivos deuterados na concentração de 150 ng/mL. A – Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) e Δ^9 -tetrahydrocannabinol-d3 (THC-d3); B – canabinol (CBN) e canabinol-d3 (CBN-d3); C – canabidiol (CBD) e canabidiol-d3 (CBD-d3).....55

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Recomendação quanto ao tempo de interrupção do aleitamento materno após consumo de drogas de abuso.....	10
Quadro 2 - Fatores que influenciam a transferência de substâncias para o leite materno.....	11
Tabela 1 - Íons utilizados na qualificação e quantificação dos analitos de cocaína e seus respectivos deuterados por GC-MS, após derivatização com BSTFA+1% TMCS.....	33
Tabela 2 - Íons utilizados na qualificação e quantificação dos canabinoides e seus respectivos deuterados por GC-MS.....	36
Tabela 3 - Limites de detecção (LoD), quantificação (LoQ), curvas de calibração e coeficientes de correlação linear para os analitos cocaína (COC), cocaetileno (CE) e norcocaína (NCOC) em amostras de leite humano.....	53
Tabela 4 - Precisão inter e intra ensaio, exatidão e recuperação para cocaína (COC), cocaetileno (CE) e norcocaína (NCOC) em amostras de leite humano.....	53
Tabela 5 - Curvas de calibração e coeficientes de correlação linear (r^2) para os analitos Δ^9 - tetrahydrocannabinol (THC), cannabinol (CBN) e canabidiol (CBD).....	60
Tabela 6 - Resultados de precisão e exatidão obtidos para os analitos Δ^9 - tereahydrocannabinol (THC), cannabinol (CBN) e canabidiol (CBD).....	61

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Influência de diferentes valores de pH das soluções tampão na extração de analitos de cocaína em leite humano por LPME.....	45
Gráfico 2 - Influência de diferentes concentrações da solução de HCl na extração de analitos de cocaína em leite humano por LPME.....	46
Gráfico 3 - Influência de diferentes frequências de agitação na extração de analitos de cocaína em leite humano por LPME.....	47
Gráfico 4 - Influência de diferentes tempos de agitação na extração de analitos de cocaína em leite humano por LPME.....	48
Gráfico 5 - Influência da adição de sal na extração de analitos de cocaína em leite humano por LPME.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSTFA + TMCS	bis-trimetil-sililtrifluoroacetamida com trimetilclorosilano 1%
CBD	Canabidiol
CBN	Canabinol
CE	Cocaetileno
COC	Cocaína
EI	Ionização Eletrônica
GC-MS	Cromatografia à gás acoplada a Espectrometria de Massas
LC-MS	Cromatografia Líquida acoplada a espectrometria de massas
LC-MS/MS	Cromatografia Líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial
LH	Leite Humano
LLE	Extração líquido-líquido
LoB	Limite do Branco
LoD	Limite de Detecção
LoQ	Limite de Quantificação
LPME	Microextração em fase líquida
MS	Ministério da Saúde
NCOC	Norcocaína
OMS	Organização Mundial da Saúde
PFP	Pentafluoropropanol
PFFA	Anidrido pentafluoropropiônico
RE%	% de Erro Relativo
SIM	<i>Selective Ion Monitoring</i>
SPE	Extração em fase sólida
SPME	Microextração em fase sólida
THC	Δ^9 -tetrahydrocannabinol
UNODC	United Nations Office on Drugs and Crime

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. Aleitamento materno	5
2.1.1. Importância do aleitamento materno	5
2.1.2. Produção e composição do leite materno	6
2.2. Recomendações quanto ao uso de substâncias psicoativas durante o aleitamento	8
2.3. Transferência de substâncias para o leite materno	10
2.4. Substâncias psicoativas e efeitos tóxicos da exposição do lactente via leite materno	13
2.4.1. Canabinoides	13
2.4.2. Cocaína	15
2.5. Métodos analíticos para determinação de substâncias psicoativas em leite materno	17
2.6. Técnicas de extração miniaturizadas	19
2.6.1. Microextração em fase líquida (LPME)	20
2.6.2. Microextração em fase sólida por headspace (HS-SPME)	22
3. OBJETIVOS	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1. Material	29
4.1.1. Equipamentos e acessórios:	29
4.1.2. Reagentes e outros materiais	29
4.1.3. Padrões	30
4.1.4. Amostras	31
4.2. Métodos	32
4.2.1. Ensaios para determinação de analitos de cocaína em leite humano	32

4.2.1.1. Condições cromatográficas	33
4.2.1.2. Otimização do método	34
4.2.2. Ensaio para determinação de canabinoides em leite humano	34
4.2.2.1. Condições cromatográficas	35
4.2.2.2. Otimização do método	36
4.2.3. Validação dos métodos	36
4.2.3.1 Limites do Branco (LoB), de Detecção (LoD) e de Quantificação (LoQ) ...	37
4.2.3.2 Linearidade.....	37
4.2.3.3 Precisão intra e inter-ensaio.....	38
4.2.3.4 Exatidão	39
4.2.3.5 Recuperação.....	39
4.2.3.6 Seletividade.....	40
4.2.3.7 Carryover	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1. Extração dos analitos de cocaína do leite humano por LPME/GC-MS.....	42
5.1.1. Cromatogramas	42
5.1.2. Otimização da extração dos analitos de cocaína por LPME	43
5.1.2.1. Estudo da fase doadora	44
5.1.2.2. Estudo da fase aceptora	46
5.1.2.3. Estudo da frequência de agitação do sistema.....	47
5.1.2.4. Estudo do tempo de agitação do sistema	48
5.1.2.5. Estudo do <i>salting out</i>	49
5.1.3. Validação da extração de analitos de cocaína por LPME	50
5.1.3.1. Limite do Branco, Limite de Detecção e Limite de Quantificação	50
5.1.3.2. Linearidade.....	51
5.1.3.3. Precisão, exatidão e recuperação.....	51
5.1.3.4. <i>Carryover</i> e seletividade	52
5.1.4. Análise de amostras reais.....	54

5.2. Extração dos canabinoides do leite humano por SPME/GC-MS	55
5.2.1. Cromatogramas	55
5.2.2. Otimização da extração dos canabinoides por SPME	56
5.2.3. Validação do método de extração de canabinoides por SPME/GC-MS	59
5.2.3.1. Limite do Branco, Limite de Detecção e Limite de Quantificação	59
5.2.3.2. Linearidade.....	59
5.2.3.3. Precisão e exatidão	61
5.2.3.4. <i>Carryover</i> e seletividade	62
5.2.4. Análise de amostras reais.....	62
6. CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
ANEXOS	78

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O consumo de substâncias psicoativas lícitas ou ilícitas afeta de maneira profunda diversos aspectos da vida das pessoas que as utilizam e dos grupos nos quais elas estão inseridas (SECRETARIA NACIONAL DE POLÍTICA SOBRE DROGAS - SENAD, 2009). A caracterização do cenário mundial em relação ao consumo de substâncias psicoativas, apresentada pelo Relatório Mundial Sobre Drogas, divulgado em 2015 pelas Nações Unidas (UNODC), estima que em 2013, uma média de 246 milhões de pessoas com idades entre 15 e 64 anos fizeram uso de alguma substância ilícita, 3 milhões a mais que no ano anterior. Além disso, o mesmo relatório aponta que o número de usuários dependentes ou com transtornos por uso de drogas é em média 27 milhões e apenas 1 a cada 6 desses usuários teve acesso ou recebeu algum tratamento para dependência a essas substâncias nos últimos anos (UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME - UNODC, 2015).

No Brasil, segundo o II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas de 2012, a droga ilícita de maior prevalência de uso na população brasileira é a maconha: 5,8% de toda a população adulta investigada neste relatório, ou seja, 7,8 milhões de pessoas já utilizaram essa droga e 2,8% é representado por mulheres, três vezes menos que o relatado entre homens. No que diz respeito à cocaína, a prevalência de uso na vida é de 3,8% (5 milhões de brasileiros com mais de 18 anos). Embora o número de usuários de cocaína do sexo masculino seja maior, o fenômeno da dependência acontece mais entre indivíduos do sexo feminino. De fato, 57% das mulheres que usam cocaína no Brasil são dependentes enquanto que o número entre os homens é de 46% (INSTITUTO NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA PARA POLÍTICAS PÚBLICAS DE ÁLCOOL E OUTRAS DROGAS - INPAD, 2014).

Dados sobre o uso de substâncias ilícitas por mulheres durante o período pós-parto são inexistentes no Brasil. Entretanto, nos Estados Unidos, de acordo com o

Levantamento Nacional em Uso de Drogas e Saúde lançado em 2013, 5,4% das mulheres grávidas com idade entre 15 e 44 anos eram usuárias de substâncias ilícitas (*SUBSTANCE ABUSE AND MENTAL HEALTH SERVICES ADMINISTRATION – SAMHSA*, 2014) muitas das quais desejam amamentar.

Tendo em vista o panorama supracitado, prevê-se a preocupação com uso de drogas em mulheres em idade reprodutiva, devido não só a exposição fetal, mas também a continuidade da exposição durante o período da lactação, no qual a criança ainda se encontra suscetível aos diversos efeitos provenientes da ingestão de substâncias excretadas no leite materno. A exposição de crianças a substâncias psicoativas durante o aleitamento materno representa importante preocupação para especialistas e é demanda crescente em hospitais. Neste contexto, a falta de evidências na literatura sobre as concentrações de substâncias psicoativas que podem ser excretadas por essa via e a magnitude dos efeitos adversos da exposição de lactentes dificulta a conduta da equipe de saúde e pode induzir a interrupção precoce e não justificada da amamentação.

Por se tratar de amostra biológica complexa, relativamente poucos métodos foram desenvolvidos visando à detecção de substâncias psicoativas em amostras de leite humano. Além disso, a maior parte dos métodos analíticos é baseada em extração líquido-líquido (LLE) ou extração em fase sólida (SPE), os quais apresentam uma série de desvantagens capazes de ser superadas através do uso de técnicas miniaturizadas.

De fato tem sido uma tendência em análises toxicológicas o emprego de técnicas de preparação de amostras que valorizem a simplicidade e praticidade, a menor manipulação da amostra e a pouca ou nenhuma necessidade de uso de solventes orgânicos, a exemplo da microextração em fase líquida (LPME) e microextração em fase sólida (SPME).

REVISÃO DA **LITERATURA**

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Aleitamento materno

2.1.1. Importância do aleitamento materno

Do ponto de vista evolutivo, nutricional e econômico, o leite humano é o alimento ideal para a criança nos primeiros meses de vida, sendo reconhecido como padrão normativo em nutrição infantil (BALLARD; MORROW, 2013; OMS, 2009b). Portanto, torna-se fundamental a identificação dos fatores que levam a cessação precoce da amamentação, a fim de proporcionar o maior tempo possível de aleitamento às crianças (CHAVES; LAMOUNIER, 2004).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda aleitamento materno exclusivo por seis meses e complementado até os dois anos ou mais. Se a técnica de aleitamento é satisfatória, o aleitamento exclusivo pelos primeiros 6 meses de vida é compatível com as necessidades nutricionais e energéticas da maioria das crianças, tornando completamente desnecessários outros alimentos e líquidos, inclusive água (o leite humano é 88% água). Mesmo após o início da alimentação complementar, o leite materno continua a ser importante fonte energética para o bebê, contribuindo com cerca de metade das necessidades dessa natureza no primeiro ano de vida e um terço no segundo ano (OMS, 2009b).

Ressalta-se também a importância do início da amamentação já nas primeiras horas de vida da criança, ou seja, o mais precoce possível. A importância desse início precoce parece residir vários fatores, tais como: (1) as mães que amamentam logo após o parto têm maior chance de serem bem sucedidas na prática da amamentação; (2) os alimentos pré-lácteos, comumente oferecidos aos bebês antes da amamentação, podem ocasionar lesões no intestino imaturo; (3) o colostro acelera a

maturação do epitélio intestinal e protege contra agentes patogênicos; (4) o contato pele a pele previne a ocorrência de hipotermia (TOMA; REA, 2008).

Além destes, há vários argumentos em favor da prática do aleitamento que incluem vantagens na saúde da criança (diminui a ocorrência de síndrome de morte súbita no primeiro ano de vida; diminui a ocorrência ou severidade de doenças infecciosas; diminui o risco de asma, hipertensão, hipercolesterolemia, diabetes e sobrepeso; proporciona melhor nutrição, tem efeito positivo na cognição), da mãe (diminuição do risco de desenvolvimento de câncer de mama e ovários, aumento do intervalo intergestacional, melhora da involução uterina no pós-parto e diminui risco de osteoporose pós-menopausal) e para a sociedade (possui menores custos financeiros, promove o vínculo afetivo entre mãe e filho) (*AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS*, 2005; AGUIAR; SILVA, 2011; OMS, 1994).

2.1.2. Produção e composição do leite materno

A mama é uma estrutura formada pela glândula mamária, tecido adiposo e tecido conjuntivo. A glândula mamária é formada por um conjunto de até 20 lobos, compostos por lóbulos, onde se encontram os alvéolos. Nos alvéolos estão as células produtoras de leite; este é conduzido ao longo de pequenos dutos que se unem em um duto principal (duto lactífero), estes seguem em direção ao centro da mama e desembocam no mamilo. Debaxo da aréola, os canais formam ampolas, que acumulam parte do leite produzido nos intervalos das mamadas (MATUHARA; NAGAMURA, 2006).

A habilidade da mama em secretar o leite é desenvolvida ainda durante a gravidez quando a glândula mamária é transformada de uma simples estrutura ramificada a um complexo órgão exócrino, processo que é regulado por diversos hormônios, sendo os mais importantes o progestogênio e estrogênio; esse momento é chamado de fase de iniciação e é seguido pela fase de ativação. A fase de ativação é

marcada pela queda nas concentrações de progesterona causada pela retirada de seu principal órgão produtor, a placenta. Com a cessação do bloqueio da liberação de prolactina antes causada pela progesterona, há a estimulação das células alveolares e consequente produção de leite. Outro hormônio importante no mecanismo de liberação do leite é a ocitocina. Esta é responsável pela contração das células mioepiteliais ao redor dos alvéolos e ejeção do leite (chamado “reflexo de ejeção do leite”) (MCMANAMAN; NEVILLE, 2003; OMS, 2009b).

A composição do leite humano é extremamente variável, tanto entre as mulheres quanto entre grupos étnicos, diferentes períodos de lactação ou durante a mesma mamada (TRENTO, 2012). A lactação progride por três períodos bem identificados; são eles os estágios de colostro, leite de transição e leite maduro (NASCIMENTO; ISSLER, 2003).

O primeiro estágio, o colostro, é um alimento de alta densidade e pequeno volume. Contém menos lactose, gordura e vitaminas hidrossolúveis e mais proteínas, vitaminas lipossolúveis (incluindo E, A e K) e minerais como sódio e zinco e tem concentrações altas de imunoglobulinas e uma série de outros fatores protetores (OMS, 1994).

A fase transicional compreende do sétimo dia até duas semanas pós-parto, quando o colostro tem sua composição progressivamente alterada, com redução da concentração de imunoglobulinas e proteínas, aumento de lactose e lipídeos, até atingir as características de leite maduro (MATUHARA; NAGAMURA, 2006). Este, por sua vez, é produzido após o décimo quinto dia pós-parto. Sua composição é variável em cada mãe e durante a mamada. Além disso, a composição do leite maduro varia de acordo com as necessidades da idade em que se encontra o bebê. Este leite é rico em lactose e relativamente pobre em proteínas e minerais (TRENTO, 2012).

O leite humano é, portanto, um fluido complexo, contendo proteínas, carboidratos, vitaminas, minerais, substâncias imunocompetentes (IgA, enzimas, interferón), além de fatores tróficos ou moduladores de crescimento (BUTS, 1998;

JENSEN, 1999; EUCLYDES, 2000; COSTA, 2006). A IgA secretória é a imunoglobulina mais predominante no início da lactação seguida da IgG secretória; ambas protegem o recém-nascido enquanto seu próprio sistema imune amadurece. Além desses, o leite materno contém IgM, macrófagos, neutrófilos, linfócitos e outros (ANDREAS; KAMPMANN; LE-DOARE, 2015).

2.2. Recomendações quanto ao uso de substâncias psicoativas durante o aleitamento

A maior parte das drogas lícitas e ilícitas consumidas pela lactante pode passar para o leite e modificar a produção, volume e composição deste, assim como, pode causar efeitos nocivos para a criança a longo e curto prazo (FRÍGULS et al., 2010).

No entanto, muitas mulheres são aconselhadas a interromper a amamentação ou a evitar o uso de substâncias necessárias devido a preocupações em relação a possíveis efeitos adversos em seus filhos. Tal conselho muitas vezes não é baseado em evidências, pois as informações a respeito da quantidade de substância excretada no leite humano podem estar indisponíveis, e, para muitas dessas substâncias, a informação é limitada aos dados de estudos em animais que podem não se correlacionar com a experiência humana. Além disso, nem todas as substâncias são excretadas em quantidades significativas no leite e a sua presença no leite materno pode não necessariamente representar risco para a criança (SACHS, 2013).

Um banco de dados abrangente e atual está disponível no LactMed (<http://toxnet.nlm.nih.gov>). O LactMed inclui informações atualizadas sobre as concentrações de fármacos e drogas encontrados no leite e no soro da criança, possíveis efeitos adversos nas crianças amamentadas, potenciais efeitos na lactação e outras recomendações (SACHS, 2013).

A Organização Mundial da Saúde (OMS), enquadra o uso de nicotina, álcool, *ecstasy*, anfetaminas, cocaína e estimulantes relacionados, opiáceos,

benzodiazepínicos e maconha como 'condição materna durante a qual amamentar não é contra-indicado, embora represente problemas de saúde que causam preocupação' (OMS, 2009a). Em outro guia, a OMS recomenda que mulheres em período de aleitamento e que fazem o uso de álcool e drogas sejam aconselhadas e apoiadas a cessar o uso dessas substâncias mesmo não sendo esta condição uma contraindicação à prática do aleitamento (OMS, 2014). A Academia Americana de Pediatria (*AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS* - AAP), em posicionamento similar à OMS, afirma que o abuso dessas substâncias não representa uma contraindicação categórica à amamentação. De forma semelhante, sugere que hábito de fumar também não é uma contraindicação absoluta, mas que deve ser fortemente desencorajado (*AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS*, 2012).

A Academia de Medicina do Aleitamento Materno (*The Academy of Breastfeeding Medicine – ABM*), uma organização mundial de médicos dedicados à promoção, proteção e apoio ao aleitamento e lactação humana, lançou em 2009 um protocolo para mães dependentes de drogas, segundo o qual mãe e bebê devem ser cuidadosamente e individualmente avaliados antes da instituição do aleitamento. As recomendações são direcionadas para mães enquadradas numa série de critérios que as classifica como (1) mulheres que devem ser apoiadas a amamentar, (2) mulheres que devem ser desencorajadas a amamentar e (3) mulheres que devem ser avaliadas com cuidado, e uma recomendação para aptidão ou falta de aptidão para a amamentação deve ser determinada por planos de saúde coordenados entre as equipes de saúde. Assim, as variações no tratamento devem ser apropriadas de acordo com as necessidades de cada indivíduo (*THE ACADEMY OF BREASTFEEDING MEDICINE PROTOCOL COMMITTEE*, 2009).

O Ministério da Saúde indica a interrupção temporária do aleitamento materno durante o consumo de drogas de abuso, sendo que o tempo de interrupção da amamentação varia dependendo da droga (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009), de acordo com o **Quadro 1**:

Quadro 1 - Recomendação quanto ao tempo de interrupção do aleitamento materno após consumo de drogas de abuso.

Droga	Período recomendado de interrupção da amamentação
Anfetamina, ecstasy	24–36 horas
Barbitúricos	48 horas
Cocaína, <i>crack</i>	24 horas
Etanol	1 hora por dose ou até estar sóbria
Heroína, morfina	24 horas
LSD	48 horas
Maconha	24 horas
Fenciclidina	1–2 semanas

Fonte: Adaptado de MINISTÉRIO DA SAÚDE. Departamento de Atenção Básica. **Saúde da criança - nutrição infantil: aleitamento materno e alimentação complementar**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2009.

2.3. Transferência de substâncias para o leite materno

O fato de o leite estar contido nos alvéolos altamente vascularizados da glândula mamária, que possuem alta área de superfície, permite a rápida transferência bidirecional entre leite e plasma (FLEISHAKER, 2003). Essa transferência através das células alveolares pode ocorrer por vários processos, os mais comuns são a difusão transcelular (moléculas muito pequenas) e a difusão intercelular (no caso de moléculas maiores) (BERLIN; BRIGGS, 2005). Há ainda fortes evidências de que a transferência de substâncias na glândula mamária possa acontecer por processos mediados por transportadores (ITO; ALCORN, 2003).

A excreção de substâncias psicoativas para o leite humano e a sua absorção pelo lactente são influenciadas por fatores relacionados à lactante, ao lactente, a substância e ao próprio leite, como listado no **Quadro 2**.

Quadro 2 - Fatores que influenciam a transferência de substâncias para o leite materno.

Fatores relacionados ao leite materno	Composição do leite (pH, teor de lipídios e proteínas)
Fatores relacionados à lactante	Eliminação hepática e renal Dose e duração do uso Via de administração
Fatores relacionados ao lactente	Idade Absorção da droga Eliminação hepática e renal Volume de leite ingerido Segurança da droga para o lactente
Fatores relacionados à substância	PKa Solubilidade em água e lipídeos Tamanho da molécula Biodisponibilidade oral Toxicidade Efeito no suprimento lácteo Drogas de ação curta x longa

Fonte: Adaptado de CHAVES R. G., LAMOUNIER J. A. Uso de medicamentos durante a lactação. **Jornal de Pediatria**, v. 80 (5 Supl), p. 189 - 198, 2004.

Em geral, baixa ligação a proteínas plasmáticas, baixo peso molecular, alta lipofilicidade, baixo pH e alto conteúdo lipídico contribuem para o fenômeno de excreção (FRIGULS et al., 2010). A presença de proteínas e lipídios no leite humano pode influenciar a concentração de substância nele contida, não só pelo fato de que eles podem funcionar como transportadores como também pela variação na sua concentração (leite anterior, leite posterior, colostro) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Mecanismos de aprisionamento iônico podem ocorrer na transferência de uma substância do plasma para o leite, visto que o leite humano é ligeiramente ácido (medidas sucessivas realizadas em nosso laboratório indicam pH por volta de 6,5) quando comparado ao plasma (em média pH 7,4) o que pode determinar/ favorecer a quantidade de substância (bases fracas) encontrada no leite (BERLIN; BRIGGS, 2005).

A criança ingere uma dose enquanto é amamentada e a concentração sérica resultante é uma função dos processos de absorção e eliminação e esses processos mudam conforme o bebê se desenvolve (McNAMARA, 2003). Ao se avaliar a possibilidade de haver efeitos nocivos à criança durante o período de aleitamento, deve-se considerar a idade em que ela se encontra. Lactentes com mais tempo de vida apresentam funções hepática e renal mais eficazes, de modo que o efeitos das substâncias serão menores do que em neonatos. Além disso, em crianças pré-termo a meia-vida das drogas pode ser prolongada, causando acúmulo após exposição constante/repetida. Por outro lado, lactentes de menor tempo de vida consomem menor volume de leite, o que diminuiria a magnitude da exposição a substâncias nocivas. Assim, aqueles que mamam com maior frequência e um volume maior de leite estão mais expostos às drogas consumidas pela mãe do que aqueles que mamam menos frequentemente e um volume menor (CHAVES; LAMOUNIER, 2004).

A concentração da substância no plasma materno é um importante determinante da quantidade que será excretada no leite. Visto que a difusão ocorre de acordo com o gradiente de concentração, altas concentrações no plasma levarão a altas concentrações no leite. Entretanto, a quantidade de substância é determinada não só de acordo com a dose administrada pela mãe, mas também com a habilidade dela em biotransformá-la (BERLIN & BRIGGS, 2005). Além disso, a ocorrência de doenças hepáticas ou renais tende a levar ao aumento do tempo em que quantidades elevadas das substâncias permanecem na circulação sanguínea (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Tendo vista os argumentos supracitados, a equipe médica precisa considerar estes múltiplos fatores no momento de pesar os riscos e benefícios da amamentação.

2.4. Substâncias psicoativas e efeitos tóxicos da exposição do lactente via leite materno

Embora o conhecimento a respeito de substâncias psicoativas durante a lactação venha sendo ampliado, ainda não há consenso sobre os efeitos de muitas destas substâncias em crianças durante este período. Além disso, os efeitos de muitas substâncias novas ainda não foram devidamente estudados ou apresentam divergências na literatura quando utilizados na lactação (CHAVES; LAMOUNIER, 2004).

2.4.1. Canabinoides

A *Cannabis* contém mais de 460 substâncias químicas conhecidas, mais de 60 das quais são agrupadas sob o nome de canabinoides (BEN AMAR, 2004). Há três compostos que tem sido isolados e identificados como os mais potentes: Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), canabidiol (CBD) e cannabinol (CBN), exibidos na **Figura 1** (BENBADIS et al., 2014). O THC é a principal fonte dos efeitos farmacológicos causados pelo consumo desta planta (GROTENHERMEN, 2003). O THC é altamente lipossolúvel, rapidamente distribuído para o sistema nervoso central (SNC) e tecido adiposo e é altamente ligado a proteínas plasmáticas. O THC é também excretado no leite materno, onde se acumula. Esta substância é biotransformada no fígado, e devido à circulação entero-hepática e lipossolubilidade, tem uma meia vida de eliminação de 20 – 36 horas (FRIGULS et al., 2010).

Há poucos relatos na literatura sobre os efeitos da exposição de crianças ao THC via aleitamento materno. A maior parte dos relatos baseia-se em exposições por inalação passiva ou ingestão. Os sinais clínicos da ingestão incluem taquicardia, hiperemia das conjuntivas, palidez, ataxia, nistagmo, tremor fino, instabilidade emocional e estupor (ZARFIN et al., 2012). A exposição do lactente via leite materno é

de particular importância tendo em vista o fato de que o THC é transferido para o leite em quantidades relatadas como oito vezes maiores que no sangue materno (PEREZ-REYES, 1982; ASTLEY; LITTLE, 1990) e que este poder afetar a qualidade e quantidade do leite (LISTON, 1998; GARRY et al., 2009). De fato, estudos em animais sugerem que esta substância psicoativa pode inibir a lactação por inibição da

produção de prolactina, possivelmente, por ação direta nas glândulas mamárias (HALE, 2006; GARRY et al., 2009). Além dos lactentes absorverem e biotransformarem o THC, a exposição ocorre em um momento que o crescimento e desenvolvimento, particularmente a formação das células da glia e da mielina no sistema nervoso central está progredindo a altas taxas (ASTLEY; LITTLE, 1990).

Figura 1 - Principais canabinoides naturalmente presentes em *Cannabis sativa*: Δ9-tetrahydrocannabinol (THC), Canabidiol (CBD) e Canabinol (CBN).

Relata-se que os efeitos em curto prazo após a exposição de lactentes ao THC por ingestão do leite materno são sedação, letargia, fraqueza, tônus muscular reduzido e dificuldade de sucção. Crianças expostas a canabinoides via leite materno poderão excretar THC em sua urina durante 2 ou 3 semanas (LISTON, 1998; FRIGULS et al.,

2010). Não há muito conhecimento dos efeitos em longo prazo da exposição, mas a ingestão de THC por essa via poderia, teoricamente, afetar o desenvolvimento do SNC de crianças expostas (FRIGULS et al., 2010).

2.4.2. Cocaína

A cocaína é uma substância naturalmente encontrada nas folhas da planta do gênero *Erythroxylum coca* (GOLDSTEIN et al., 2009) e é um potente estimulante do sistema nervoso central que leva a um estado aumentado de alerta e euforia (LANGMAN et al., 2009). Assim que entra no organismo, a cocaína é biotransformada em dois principais produtos: benzoilecgonina e ecgonina metil éster e em produtos secundários, como a norcocaína. Outra substância, o cocaetileno, pode ser produzido quando há uso concomitante de álcool (**Figura 2**). Já foi demonstrado que a biotransformação hepática da cocaína em norcocaína representa papel importante nos efeitos hepatotóxicos (VALENTE et al., 2010). O cocaetileno é um produto ativo que compartilha muitas propriedades neuroquímicas e farmacológicas com a cocaína (HERBST et al., 2011). Na administração simultânea de cocaína e etanol, pode haver um aumento na produção de norcocaína e potencial aumento da toxicidade (LANGMAN et al., 2009).

Há poucos relatos sobre a quantificação de cocaína no leite materno após uso por parte da mãe; entretanto, dadas suas propriedades físico-químicas (pKa de aproximadamente 8,6), é esperado que a cocaína presente na circulação da mãe possa passar para o leite materno em quantidades significantes, exibindo uma alta taxa de transferência do plasma para o leite. A cocaína presente no leite seria então oralmente absorvida pela criança num grau limitado já que é normalmente degradada no intestino pelo sistema das colinesterases, ainda imaturo ou relativamente deficiente nesta idade. Assim, a criança poderia estar exposta a quantidades restritas da droga,

entretanto, a exposição a pequenas quantidades pode persistir e causar danos consideráveis (CHASNOFF et al., 1987; CRESSMAN et al., 2012).

Figura 2 – Cocaína (COC) e substâncias psicoativas relacionadas, norcocaína (NCOC) e cocaetileno (CE).

Num relato de caso feito por Carrazza et al. (2013) uma criança de doze meses de idade deu entrada no Pronto Atendimento apresentando regular estado geral, com redução do turgor da pele (indicativo de leve desidratação), movimentos coreicos, torpor e olhar vago evoluindo com agitação psicomotora durante a internação. De fato, a análise toxicológica da urina do lactente confirmou a presença de benzoilecgonina (principal produto de biotransformação da cocaína).

Em outro relato de caso, um bebê de duas semanas de idade desenvolveu taquicardia, taquipneia, hipertensão e irritabilidade 3h após ser amamentado. A mãe era usuária de cocaína e os sintomas retrocederam 48h após a amamentação ser interrompida. Cocaína e benzoilecgonina foram detectadas no leite materno por 36h após o último uso relatado e na urina do bebê por 60h após a amamentação ser

interrompida (CHASNOFF et al., 1987; WINECKER et al., 2001). Em outra ocorrência, cocaína e cocaetileno foram determinados no leite materno em concentrações estimadas em 20 vezes a concentração da droga no sangue (DICKSON, 1994; WINECKER et al., 2001).

Winecker et al. (2001) detectou a presença de 12,1 µg de cocaína por mililitro de leite materno em um dos indivíduos do seu estudo. O autor calculou que uma refeição de 100 mL de leite materno ofereceria uma dose oral de 1,21 mg de cocaína. Estimando-se sua biodisponibilidade oral em 60%, a dose absorvida seria de 0,726 mg. Se uma criança de 4 kg consumisse essa dose a cada 3 horas, com um *clearance* de 20 mL de sangue por minuto, a concentração sanguínea de cocaína no estado de equilíbrio poderia alcançar 200 ng/mL. Esta quantidade é comparável a concentrações sanguíneas de cocaína encontradas em adultos após a administração de uma dose intranasal de 1,5 mg/kg ou intravenosa de 16 mg (WINECKER et al., 2001).

2.5. Métodos analíticos para determinação de substâncias psicoativas em leite materno

O leite materno é uma matriz que pode ser utilizada para avaliar exposição de crianças a substâncias psicoativas e sua principal vantagem é a coleta simples e não invasiva. Entretanto, a extração de drogas do leite materno é um desafio analítico devido ao seu alto conteúdo proteico e lipídico e devido à mudança na composição durante o período pós-parto. Como anteriormente citado, a quantidade de substância transferida do plasma para o leite materno depende de suas características, como ligação a proteínas plasmáticas, grau de ionização, lipofilicidade e peso molecular. Em geral, baixa ligação a proteínas plasmáticas, baixo peso molecular, alta lipofilicidade, baixo pH e alto conteúdo lipídico contribuem para o fenômeno de excreção (FRÍGULS et al., 2010).

O pH do leite humano é ligeiramente mais ácido que o do plasma e essa diferença exerce influência na transferência de substâncias (BEGG; ATKINSON, 1993; BEGG et al., 2002), particularmente para bases fracas com valores de pKa que favorecem este processo. Allen et al. (1991) demonstraram que o pH pode ser menor no início da lactação mas é relativamente estável a partir do 100º dia ao 450º dia (BEGG et al., 2002).

Estas variáveis podem afetar a recuperação da substância extraída e também a precisão do método, exatidão e compatibilidade com a técnica cromatográfica subsequente. Em suma, o leite é uma matriz biológica complexa que contém quase tantos diferentes componentes quanto o plasma (ROSSI; WRIGHT, 1997).

No que se refere aos poucos métodos analíticos já publicados para detecção de cocaína em leite humano, Winecker et al. (2001) desenvolveram um método aplicável para cocaína e seus produtos de biotransformação (benzoilecgonina, ecgonina metil éster, norcocaína, ecgonina etil éster e m-hidroxibenzoilecgonina) utilizando extração em fase sólida (SPE) e detecção por GC-MS. Os autores coletaram amostras de 11 mães que admitiram o uso e chegaram a detectar 12 µg/mL de cocaína em uma das amostras, o que configura significativa exposição da criança amamentada.

Marchei et al. (2011) desenvolveram um método baseado em cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas no modo tandem (LC-MS/MS) para quantificação de cafeína, nicotina, cotinina, opiáceos, cocaína, canabinoides e anfetaminas. Neste, as amostras foram submetidas à precipitação de proteínas seguida de extração em fase sólida (SPE). O método foi aplicado em três amostras provenientes de mães com confirmação do uso de cocaína, maconha (THC) e metadona, as concentrações encontradas foram de 5 ng/mL, 86 ng/mL e 97 ng/mL, respectivamente. Além desses, foram detectados cafeína (539 ng/mL), cotinina (51 ng/mL) e morfina (7ng/mL).

Recentemente, D'Avila et al. (2015), desenvolveram um método para detecção de biomarcadores do uso de cocaína/ *crack* (cocaína, benzoilecgonina, ecgonina metil ester e anidroecgonina) em colostro utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS). Os autores conseguiram limites de detecção de até 2,5 ng/mL praticamente sem necessidade de preparo da amostra (apenas precipitação de proteínas). O método foi aplicado somente a 4 amostras de colostro reais, duas das quais havia suspeita de uso de cocaína; nestas, encontrou-se este analito na quantidade de 8 e 10,3 ng/mL.

2.6. Técnicas de extração miniaturizadas

Os tipos de extração de amostras biológicas mais comumente utilizados são as tradicionais extração líquido-líquido (LLE) e extração em fase sólida (SPE), visto que estas são capazes de resolver uma série de problemas analíticos e por isso consideradas universais do ponto de vista técnico e científico. Entretanto, em ambos os casos uma série de desvantagens podem ser observadas: alto consumo de solventes orgânicos com consequente produção de alto volume de resíduos, necessidade de relativamente alto volume de amostra, seletividade limitada devido à extração concomitante de interferentes da matriz (no caso da LLE) e muitas etapas de execução (especialmente na SPE) (ULRICH, 2000; KATAOKA; SAITO; 2011; OCAÑA-GONZALEZ et al., 2016).

Dessa forma, as tendências mais modernas em química analítica são no sentido de simplificar e miniaturizar o preparo da amostra, bem como, minimizar o uso de solventes e seu impacto ambiental. Tendo isto em vista, diversas novas técnicas de microextração estão sendo desenvolvidas a fim de reduzir o tempo de análise, aumentar o rendimento da amostra, promover a segurança do analista e do meio ambiente e melhorar a qualidade e sensibilidade dos métodos analíticos (PSILLAKIS, KALOGERAKIS, 2003; SPIETELUN, 2014).

2.6.1. Microextração em fase líquida (LPME)

Uma das técnicas emergentes nesta área é a microextração em fase líquida (LPME). Esta é a aplicação da convencional extração líquido-líquido na forma miniaturizada, na qual são usados apenas microlitros de solvente, ao invés das centenas de mililitros da LLE (LAMBROUPOULOU; ALBANIS, 2007).

Pedersen-Bjergaard e Rasmussen (2005) introduziram um conceito alternativo de LPME baseado no uso de fibras ocas porosas descartáveis feitas de polipropileno. Neste dispositivo de LPME, o microextrato está contido no lúmen da fibra, e consequentemente não está em contato direto com a solução da amostra. Os analitos são extraídos através de um líquido orgânico imobilizado nos poros da fibra antes que eles estejam presos no microextrato. As amostras podem ser agitadas ou vibradas efetivamente sem nenhuma perda (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2005). A fibra mais comum utilizada tem uma porosidade de 70%, o tamanho do poro é 0,2 μm , a espessura da parede é 200 μm e um diâmetro interno de 600 μm (GHAMBARIAN et al., 2012).

A LPME pode ser utilizada em dois modos: duas ou três fases, de acordo com as características do analito em questão. No sistema de duas fases, o analito é extraído da amostra aquosa (fase doadora) através de um solvente orgânico imiscível em água imobilizado nos poros da membrana passando para o mesmo solvente orgânico (fase aceptora), presente no lúmen da fibra. No modo de três fases (**Figura 3**), o analito é extraído de uma amostra aquosa (fase doadora) através de um solvente orgânico imiscível em água imobilizado nos poros da membrana, passando para uma solução aquosa (fase aceptora) presente no lúmen da fibra. A fase orgânica atua como uma barreira entre as fases aceptora e doadora (ambas aquosas), impedindo o contato entre as duas fases sistema (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003; OLIVEIRA et al., 2008).

Figura 3 - Representação esquemática da LPME de três fases. A) Sistema miniaturizado de extração em *eppendorf*. B) Ampliação da imagem da fibra exibindo a LPME de três fases: um solvente é impregnado na fibra, e como fase acceptora é utilizada uma solução aquosa. Os analitos na forma molecular ("M") atravessam a fase orgânica e, ionizados ("+") na fase acceptora, são incapazes de retornar à fase doadora.

Este tipo de extração é limitada a analitos ácidos ou básicos com funções ionizáveis. Para a extração de compostos básicos, o pH da amostra deve ser alcalino a fim de promover sua extração para a fase orgânica, enquanto o pH da solução acceptora deve ser baixo, para promover alta eficiência de extração a partir da fase orgânica para a fase acceptora. Para os analitos de caráter ácido, em contraste, o pH da amostra deve ser baixo e uma solução acceptora alcalina deve ser empregada no lúmen da fibra (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2005).

Assim, além das características inerentes do analito (coeficientes de ionização e partição) e da razão das fases acceptora e doadora, alguns outros parâmetros devem

ser considerados durante o desenvolvimento do método, tais como ajuste do pH da amostra, força iônica, membrana hidrofóbica, tipo de solvente orgânico, tempo e temperatura de extração, composição da solução aceptora e agitação do sistema (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003; OLIVEIRA et al., 2008).

Bjørhovde et al. (2003) mostraram o emprego da LPME para a extração de quatro substâncias antidepressivas básicas no leite materno (paroxetina, fluvoxamina, miaserina e citalopram). Neste caso, um processo de acidificação da amostra seguido de centrifugação e alcalinização do sobrenadante foi necessário para reduzir a interação dos analitos com a porção lipídica da matriz e assim aumentar a recuperação (42 – 69%). Os autores obtiveram ainda excelente *clean-up* e linearidade ($r = 0,99$), demonstrando o potencial do emprego desta técnica para o leite humano.

Por fim, a LPME representa uma técnica de extração emergente com potencial de aplicação em matrizes biológicas diversas. Esta nova metodologia é extremamente simples, de baixo custo e praticamente livre de solvente para o preparo de amostras, o que proporciona um alto grau de seletividade e enriquecimento por adicionalmente eliminar a possibilidade de *carryover* entre as corridas (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003), provando assim, ser uma técnica promissora para o alcance dos objetivos deste trabalho.

2.6.2. Microextração em fase sólida por headspace (HS-SPME)

Outra técnica miniaturizada de interesse neste trabalho é a microextração em fase sólida (SPME), forma miniaturizada da extração em fase sólida (SPE), que foi primeiramente proposta por Arthur e Pawliszyn (1990) e é capaz de eliminar completamente o uso de solventes (SPIETELUN et al., 2013). O aparato tradicional de SPME consiste de uma fibra de sílica fundida revestida com uma fina camada do adsorvente de extração que pode ser diretamente imersa na amostra líquida (DI-SPME) ou posicionada num *headspace*, neste último caso é chamada de SPME por

headspace (HS-SPME) (SPIETELUN et al., 2013). Em ambos os casos, assim que o equilíbrio de extração é atingido, o processo é encerrado, a fibra é introduzida no injetor e os analitos são termicamente desorvidos (no caso de separação por cromatografia à gas) (**Figura 4**) (DE ALBUQUERQUE; BORTOLETO; DE OLIVEIRA 2013).

Figura 4 - Figura esquemática representando HS-SPME. A fibra, fixada num suporte adequado, é exposta ao *headspace* acima da amostra aquecida. Ao atingir o equilíbrio os analitos são adsorvidos no revestimento polimérico da fibra e posteriormente desorvidos no interior do injetor do cromatógrafo.

A HS-SPME é aplicada na extração de compostos voláteis e semi-voláteis a partir da fase gasosa sobre amostras líquidas, sólidas ou propriamente gasosas. Além da separação eficiente dos componentes não voláteis indesejados presentes na matriz, no modo *headspace* a fibra está protegida de danos causados pela adsorção irreversível ou agressiva de componentes da matriz já que não há contato direto com a amostra (LORD; PAWLISZYN, 2000; KATAOKA; SAITO, 2011).

Por outro lado, a DI-SPME é usada quando os analitos são pouco ou não voláteis, assim a fibra é diretamente imersa na amostra líquida. Em termos de termodinâmica, os princípios da DI-SPME e HS-SPME são os mesmos. Há também a possibilidade de utilizar uma fibra oca para proteger a fibra de SPME dos compostos insolúveis da amostra (PRAGST, 2007; KATAOKA; SAITO, 2011).

A extração dos analitos na SPME ocorre, portanto, numa fina camada de polímero normalmente na superfície de uma fibra de sílica fundida. As fibras estão arranjadas em um suporte no qual a fibra está fixada numa haste de aço que pode ser exposta ou retraída dentro de um tipo de agulha. Esta agulha protege a fibra e permite a penetração do septo do frasco que contém a amostra ou do injetor do cromatógrafo sem que haja danos à fibra (PRAGST, 2007).

Há diversos tipos de revestimento polimérico comercialmente disponíveis com espessura entre 7 e 100 μm (PRAGST, 2007). Dentre os revestimentos mais comuns, pode-se citar o polidimetilsiloxano (PDMS), PDMS-divinilbenzeno (PDMS/DVB), DVB/carboxeno/PDMS (DVB/Car/PDMS) e poliacrilato (PA) (CARASEK; MERIB, 2015; LAMBROPOULOU; KONSTANTINOU; ALBANIS, 2007). A escolha das fibras é baseada tanto na compatibilidade com as propriedades físico-químicas do analito quanto na resistência à matriz da amostra (DE ALBUQUERQUE; BORTOLETO; DE OLIVEIRA 2013).

Visto que a extração depende, além das características físico-químicas do analito e da amostra, também do polímero extrator, a escolha da fibra é o primeiro passo no desenvolvimento do método de SPME. Em seguida, parâmetros como: adição de sal, pH do meio, temperaturas de extração (adsorção e dessorção), agitação do sistema, razão amostra/*headspace* e tempo de aquecimento devem ser considerados no intuito de se obter máxima eficiência de extração (LAMBROPOULOU; KONSTANTINOU; ALBANIS, 2007; ULRICH, 2000).

A aplicação da SPME para determinação de substâncias psicoativas em leite materno não é relatada. Por outro lado, a técnica tem sido aplicada para determinação

de compostos organoclorados (RÖHRIG; MEISCH, 2000), aminas monocíclicas (DEBRUIN; JOSEPHY; PAWLISZYN, 1998), bifenilas policloradas – PCBs (KOWALSKI et al., 2007, 2010, 2013), compostos orgânicos voláteis – tolueno, clorofórmio, benzeno (KIM; HALDEN; BUCKLEY, 2007) e diversos agroquímicos (GONZALEZ-RODRIGUEZ et al., 2005) em leite humano.

Por fim, a SPME demonstra ser uma técnica de excelente *clean up*, capaz de eliminar o uso de solventes orgânicos, de simples execução devido às poucas etapas do processo, com necessidade de baixo volume de amostra e possibilidade de automação (RISTICEVIC, 2009; VUCKOVIC et al., 2010; SPIETELUN et al., 2013).

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo é a determinação das substâncias psicoativas cocaína, cocaetileno, norcocaína, tetraidrocanabinol, canabinol, canabidiol em amostras de leite materno provenientes do Hospital Municipal Dr. Arthur Ribeiro de Saboya utilizando técnicas de microextração. Para atingir esse objetivo, a cromatografia em fase gasosa associada à espectrometria de massas (GC-MS) foi empregada para detecção das substâncias de interesse. Para o preparo das amostras empregou-se as técnicas de microextração em fase líquida (LPME) e microextração em fase sólida (SPME). Os métodos desenvolvidos foram aplicados em amostras de leite materno provenientes do hospital supracitado, de modo a possibilitar a identificação do risco a que crianças poderiam estar expostas.

MATERIAL E **MÉTODOS**

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Equipamentos e acessórios:

- Equipamento de cromatografia em fase gasosa modelo 6850 acoplado a espectrômetro de massas quadrupolo modelo 5975, ambos da Agilent Technologies (Santa Clara, CA, EUA), disponível no Laboratório de Análises Toxicológicas - USP.
- O cromatógrafo gasoso foi equipado com coluna capilar de sílica fundida HP-5MS com as seguintes dimensões: 30m x 0,25mm x 0,25 μ m.
- Para confecção dos cromatogramas os dados brutos foram extraídos do software do equipamento e plotados no programa Microsoft Excel[®] 2010.
- Termobloco com função de aquecimento e secagem de amostras Reacti-Therm III da Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, EUA).
- Agitador estilo vortex multi-tubo modelo VX-2500 da empresa VWR (Thorofare, NJ, USA).
- Agitador magnético com aquecimento Isotemp[®] da Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, EUA).

4.1.2. Reagentes e outros materiais

- Reagentes acetonitrila (CH_3CN), metanol (CH_3OH), acetato de etila ($\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), n-octanol ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{OH}$), hidróxido de sódio (NaOH), ácido clorídrico (HCl), fosfato de potássio monobásico (Na_2HPO_4), bicarbonato de sódio (NaHCO_3), carbonato de sódio (Na_2CO_3), sulfato de sódio (Na_2SO_4),

sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) e cloreto de sódio (NaCl) foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha);

- Fibras de LPME Q3/2 Accurel KM de polipropileno 600 µm i.d., 200 µm espessura da parede e 0.2 µm de tamanho de poros da Membrana (Wuppertal, Alemanha);
- Ponteira de eletroforese em gel modelo Round CC 4853 nas dimensões de 0,5mm com capacidade de 1-200 µL obtidos da empresa Costar (Corning, NY, USA);
- Agentes derivatizantes: bis-trimetil-sililtrifluoroacetamida com trimetilclorosilano 1% (BSTFA+ TMCS 1%), pentafluoropropanol (PFP) e anidrido pentafluoropropiônico (PFPA) foram obtidos da Sigma (St. Louis, EUA).
- Fibras de microextração em fase sólida (SPME) de polidimetilsiloxano (PDMS) 100 µm, 24 Ga, sílica fundida para suporte manual da Supelco (Bellefonte, PA, USA).

4.1.3. Padrões

Os padrões de referência: cocaína (COC), norcocaína (NCOC), cocaetileno (CE), delta-9-tetraidrocanabinol (THC), canabinol (CBN), canabidiol (CBD), e o seus respectivos deuterados (COC-d₃, NCOC-d₃, CE-d₃, THC-d₃, CBN-d₃, CBD-d₃) utilizados como padrão interno, na concentração de 1 mg/mL em metanol ou acetonitrila, foram obtidos da Cerilliant Corporation (Round Rock, Texas, EUA).

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

4.1.4. Amostras

Cento e nove amostras de leite humano foram coletadas de lactentes com idade entre 18 e 40 anos, no Hospital Dr. Arthur Ribeiro de Saboya, pela equipe de saúde sob responsabilidade da Dra. Ligia Veras Gimenez Fruchtengarten durante o período de aleitamento, de forma consecutiva e aleatória entre julho de 2014 e fevereiro de 2016. Uma vez coletado da lactante, o material foi armazenado em frasco plástico sem conservante e encaminhado ao laboratório de Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, onde foi mantido sob refrigeração (- 20 °C). A equipe de saúde também foi responsável pela aplicação de questionário ASSIST adaptado (HENRIQUE *et al.*, 2004) (**ANEXO I**) para a mãe com o objetivo de obter as seguintes informações: idade, tipo de parto, padrão de uso de drogas de abuso durante e após gestação, uso de medicamentos.

A Dra. Ligia Veras Gimenez Fruchtengarten, responsabilizou-se, junto à farmacêutica Gabriela de Oliveira Silveira, por aplicar o questionário e fornecer as amostras de leite materno. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Bioética em Medicina do Hospital participante (**ANEXO III**) e também pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP (**ANEXO II**).

4.2. Métodos

4.2.1. Ensaios para determinação de analitos de cocaína em leite humano

Foram realizados ensaios utilizando como técnica de separação a microextração em fase líquida (LPME), método descrito por Pedersen-Bjergaard e Rasmussen (2005). De acordo com a técnica de LPME, uma pequena fibra porosa oca foi mantida em contato direto com a amostra liquefeita. Os poros da fibra foram preenchidos com solvente orgânico imiscível em água enquanto no interior da fibra foi colocado o líquido acceptor. Em seguida as amostras foram injetadas automaticamente em sistema de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS).

O preparo da amostra consistiu de adicionar em tubos *ependorf* o volume de 0,5 mL de LH adicionado dos padrões de COC, NCOC e CE (quando necessário) e seus respectivos padrões deuterados, seguindo-se o ajuste de pH entre 8,0 e 9,0 com NaOH 0,1M, e então, a adição 0,5 mL de tampão borato pH 9,0. Feito isto, acrescenta-se 0,25 mg de NaCl. Os padrões deuterados foram adicionados para uma concentração final de 100 ng/mL, ou seja, 50 µL do padrão de 1µg/mL. Independentemente do modo de preparo da amostra, o procedimento seguiu-se como descrito abaixo.

Uma fibra oca de LPME com 8 cm de comprimento é imersa em n-octanol por 30 segundos para impregnação dos poros deste material e posteriormente submetida a banho de ultrassom em água destilada por 10 segundos para retirar o excesso de solvente. O lúmen da fibra é preenchido com uma solução de HCl 0,4 M com auxílio de uma ponteira de eletroforese em gel e as pontas da fibra são fechadas com auxílio de um alicate para evitar a contaminação da matriz na fase acceptora durante a agitação.

Então a fibra é introduzida no tubo na forma de 'U' e submetida à agitação. Após esta etapa, a fibra é retirada do tubo, tem suas pontas cortadas com uma

tesoura e a fase aceptora é retirada do lúmen da fibra com auxílio da ponteira de eletroforese em gel e colocada em um vial para secagem a 40°C sob fluxo de N₂. Após secagem, os analitos foram derivatizados com 25 µL BSTFA + 1%TMCS e 25 µL de acetonitrila por 30 minutos à 60°C. Finalmente, uma alíquota de 2 µL da solução final derivatizada foi injetada em GC-MS.

4.2.1.1. Condições cromatográficas

As seguintes condições cromatográficas foram aplicadas para separação dos analitos de cocaína:

- Temperatura do injetor: 250°C.
- Temperatura da linha de transferência: 280°C.
- Fluxo do gás de arraste (He): fluxo constante de 0,6 mL/min.
- Temperatura do Forno ("Rampa"): 150°C (1min.); 10°C/min. até 180°C; 15°C/min. até 250°C; 8°C/min. até 260°C (1min.).

O modo de injeção foi *splitless*. O espectrômetro de massas operou no modo de ionização eletrônica (EI) e o monitoramento dos íons no modo *Selective Ion Monitoring* (SIM). Os íons utilizados na identificação dos analitos estão descritos na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Íons utilizados na qualificação e quantificação dos analitos de cocaína e seus respectivos deuterados por GC-MS, após derivatização com BSTFA+1% TMCS.

Analito	COC	COC-d3	CE	CE-d3	NCOC	NCOC-d3
Íon (<i>m/z</i>)	<u>182</u>	<u>185</u>	<u>196</u>	<u>199</u>	140	140
	272	275	272	275	<u>240</u>	<u>243</u>
	303	306	317	320	346	349

* Os íons sublinhados foram utilizados na quantificação dos analitos. COC – cocaína, COC-d3 - cocaína-d3, CE – cocaetileno, CE-d3 - cocaetileno-d3, NCOC -norcocaína e NCOC-d3 - norcocaína-d3. *m/z* – razão massa /carga.

4.2.1.2. Otimização do método

O estudo de otimização do método avaliou os parâmetros: pH da fase doadora (solução tampão), concentração da solução aceptora (HCl), velocidade da agitação, tempo de agitação e adição de sal sobre o rendimento da extração. Amostras de leite humano foram fortificadas a uma concentração de 400 ng/mL submetidas ao método de LPME. O padrão interno de cada um dos analitos foi adicionado após a extração na concentração de 100 ng/mL. A eficiência da extração foi avaliada pela área relativa produzida por cada analito e seu padrão interno em todas as condições testadas. Os seguintes parâmetros foram estudados:

- pH do tampão da fase doadora (pH 8, 10 e 12);
- Concentração da solução aceptora (0,4; 0,7 e 1,0 mol/L);
- Velocidade de agitação (1200, 1800 e 2400 rpm);
- Tempo de agitação (10, 30 e 50 min.);
- O efeito *salting out* (adição ou não adição de NaCl).

4.2.2. Ensaios para determinação de canabinoides em leite humano

Para determinação de THC, CBN e CBD, realizaram-se ensaios utilizando como técnica de extração a microextração em fase sólida (SPME), a partir de modificações no método proposto por Oliveira, Yonamine e Moreau (2007).

O preparo da amostra consistiu de adicionar em frascos de vidro (4 mL) o volume de 50 µL de LH adicionado dos padrões de THC, CBN e CBD e seus respectivos padrões deuterados, seguindo-se o ajuste para pH 10,0 com 10 µL de NaOH 1,0 M e 940 µL de tampão bicarbonato de sódio 0,1 M pH 10,0. Para promoção do efeito *salting out*, acrescenta-se 0,25 mg de NaCl. Os padrões deuterados foram

adicionados para uma concentração final de 150 ng/mL. Insere-se uma barra magnética no interior do frasco que é então fechado com uma válvula *mininert*.

A seguir, a fibra de sílica fundida revestida com polidimetilsiloxano (PDMS) acoplada a um dispositivo manual é inserida através do septo da válvula. A fibra inserida é exposta ao *headspace* por 40 min, a 70 °C, sob agitação magnética. Após o período de exposição no qual acontece a adsorção dos analitos na fibra, há a dessorção deles por exposição ao injetor do cromatógrafo à gas.

4.2.2.1. Condições cromatográficas

As seguintes condições cromatográficas foram aplicadas para separação dos canabinoides:

- Temperatura do injetor: 250°C.
- Temperatura da linha de transferência: 280°C.
- Fluxo do gás de arraste (He): fluxo constante de 0,6 mL/min.
- Temperatura do Forno (“Rampa”): 150°C (1min.); 10°C/min. até 280°C; (9 min.).

O modo de injeção foi *splitless*. O espectrômetro de massas operou no modo de ionização eletrônica (EI) e o monitoramento dos íons no modo *Selective Ion Monitoring* (SIM). Os íons utilizados na identificação dos analitos estão descritos na **Tabela 2.**

Tabela 2 - Íons utilizados na qualificação e quantificação dos canabinoides e seus respectivos deuterados por GC-MS.

Analito	THC	THC-d3	CBN	CBN-d3	CBD	CBD-d3
Íon (<i>m/z</i>)	231	234	238	241	<u>231</u>	<u>234</u>
	<u>299</u>	<u>302</u>	<u>295</u>	<u>298</u>	246	249
	314	317	310	313	314	317

* Os íons sublinhados foram utilizados na quantificação dos analitos. THC – delta-9-tetrahidrocanabinol, THC-d3 - delta-9-tetrahidrocanabinol-d3, CBN – canabinol, CBN-d3 - canabinol-d3, CBD - canabidiol e CBD-d3 - canabidiol-d3. *m/z* – razão massa /carga.

4.2.2.2. Otimização do método

A otimização do método consistiu numa série de testes preliminares para determinação das variáveis:

- Temperatura de aquecimento;
- Volume de amostra;
- Razão de volume *headspace*/volume da amostra (volume do frasco);
- Tipo de sal.

Em todos os casos o parâmetro escolhido foi aquele que permitiu a manutenção da integridade do sistema extrator, estabilidade do *headspace*, e manutenção do pH da amostra.

4.2.3. Validação dos métodos

Após o desenvolvimento e otimização, o método foi validado, estabelecendo-se os parâmetros de limite do branco (LoB), limite de detecção (LoD), limite de quantificação (LoQ), linearidade, seletividade, precisão intra e interensaio, exatidão, recuperação e *carryover* dos analitos nas amostras de leite humano. Os métodos foram validados conforme guias nacionais e internacionais de validação (ANVISA, 2003; PETERS et al., 2007; UNODC, 2009; SWGTOX, 2013; ARMBRUSTER; PRY, 2008).

4.2.4.1 Limites do Branco (LoB), de Detecção (LoD) e de Quantificação (LoQ)

Limite do branco (LoB) é a maior concentração aparente que deve ser encontrada quando repetições de amostras em branco não contendo os analitos são testadas. O LoB é calculado com a seguinte equação:

$$\text{LoB} = \text{média}_{\text{Amostras Negativas}} + (1.645 \times \text{DP}_{\text{Amostras Negativas}})$$

Onde,

Média: Média da Área Relativa de 20 replicatas;

DP: Desvio Padrão da Área Relativa de 20 replicatas.

Limite de detecção (LoD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser seguramente diferenciado do LoB, na qual a detecção é possível (ARMBRUSTER; PRY, 2008). O LoD é obtido por meio da seguinte equação:

$$\text{LoD} = \text{LoB} + (1.645 \times \text{DP}_{\text{Concentração Baixa}})$$

Dessa vez, o DP é o desvio padrão obtido da análise de replicatas de amostras adicionadas dos padrões em concentrações baixas.

O limite de quantificação (LoQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. O LoQ é estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do analito até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis. Para precisão e exatidão, o coeficiente de variação entre as replicatas considerado aceitável foi de no máximo 20%.

4.2.4.2 Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela

análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes com entre 2 a 6 replicatas por concentração. A relação matemática entre a resposta medida e a concentração do analito nestes casos (modelo linear) pode ser descrita pela equação da reta:

$$y = ax + b$$

Onde:

y = resposta medida (absorbância, área do pico, etc)

x = concentração

a = inclinação da curva de calibração (sensibilidade)

b = intersecção com eixo y, quando x = 0.

Assim, a linearidade para analitos de cocaína foi avaliada entre o LoQ e 1000 ng/mL. Foram analisadas 6 concentrações diferentes ao longo da faixa (12, 100, 250, 500, 750 e 1000 ng/mL) em sextuplicata.

No que diz respeito aos canabinoides, a faixa estudada foi do LoQ a 200 ng/mL. Nesse caso, foram analisadas 5 concentrações (20, 50, 100, 150 e 200 ng/mL) em quintuplicata.

Além disso, realizou-se o estudo da homoscedasticidade, pelo qual, após a comparação do valor de $F_{\text{experimental}}$ e F_{tabelado} , empregou-se a regressão dos mínimos quadrados ponderados. Os coeficientes de ponderação (w_i) estudados foram $1/x^{1/2}$, $1/x$, $1/x^2$, $1/y^{1/2}$, $1/y$ e $1/y^2$. A escolha de w_i foi feita de acordo com a somatória dos erros relativos (%RE) e o valor do coeficiente de correlação (r^2) igual a 0,99.

4.2.4.3 Precisão intra e inter-ensaio

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A precisão é geralmente expressa em termos de repetitividade e precisão intermediária. A precisão intermediária (precisão inter-dia) define a habilidade do método em fornecer os

mesmos resultados quando as análises são conduzidas no mesmo laboratório, mas em diferentes dias, por diferentes analistas e /ou diferentes equipamentos.

Nos ensaios de precisão deve-se contemplar o intervalo linear do método, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta (CB, CM e CA, respectivamente). O critério de aceitação para este parâmetro foi o desvio padrão de até 20% para a concentração baixa e de até 15% para as concentrações altas. Todos os cálculos de precisão foram feitos pelo ANOVA fator único.

4.2.4.4 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro.

Para avaliação deste parâmetro, amostras em três diferentes concentrações (CB, CM e CA) devem ser analisadas pelo menos em triplicata. A diferença entre a média do resultado obtido e o resultado esperado deve ser expressa em percentagem. Os ensaios de exatidão foram realizados em sextuplicata e todos os resultados devem estar entre $\pm 20\%$ do valor previsto para o CB e $\pm 15\%$ para os CM e CA.

4.2.4.5 Recuperação

A recuperação mede a eficiência do procedimento de extração de um método analítico dentro de um limite de variação. Porcentagens de recuperação do analito e do padrão interno próximos a 100% são desejáveis, porém, admite-se valores menores, desde que a recuperação seja precisa e exata. Este parâmetro deve ser realizado comparando-se os resultados analíticos de amostras extraídas a partir de três concentrações (CB, CM e CA), contemplando a faixa de linearidade do método, com os resultados obtidos com soluções padrão não extraídas, que representam 100% de recuperação.

4.2.4.6 Seletividade

A seletividade do método foi determinada pela análise de 20 amostras de leite humano negativas. A presença de interferentes endógenos foi avaliada comparando-se os picos presentes no tempo de retenção dos analitos com aqueles obtidos da análise de amostras negativas adicionadas dos analitos na concentração do limite de quantificação.

Ainda, 10 amostras contendo os analitos estudados foram adicionadas de 1000 ng/mL de anfetamina, metanfetamina, efedrina, delta-9-tetrahidrocanabinol, diazepam, lorazepam, clonazepam, oxazepam, morfina, codeína, cafeína, nicotina e cocaína a fim de avaliar possível interferência destes compostos nas análises.

4.2.4.7 Carryover

O efeito *carryover* (contaminação de amostras subsequentes à injeção de amostras em alta concentração) foi investigado pela análise de amostras de LH negativas logo após a injeção de uma amostra adicionada do analito a 1200 ng/mL no caso dos analitos de cocaína e 200 ng/mL para canabinoides.

Tanto as amostras negativas quanto as amostras adicionadas continham o padrão interno na concentração de 100 ng/mL (analitos de cocaína) ou 150 ng/mL (canabinoides).

RESULTADOS E **DISCUSSÃO**

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Extração dos analitos de cocaína do leite humano por LPME/GC-MS

5.1.1. Cromatogramas

Na **Figura 5** estão representados os cromatogramas de amostra negativa de LH adicionada de COC, NCOC, CE e seus respectivos deuterados após ter sido submetida ao método de extração proposto neste trabalho.

Figura 5 - Cromatogramas obtidos com a análise de amostra negativa de LH adicionada dos analitos de cocaína e seus respectivos deuterados na concentração de 100 ng/mL. A – cocaína

(COC) e cocaína-d3 (COC-d3); B – cocaetileno (CE) e cocaetileno-d3 (CE-d3); C – norcocaína (NCOC) e norcocaína-d3 (NCOC-d3). T.R.: Tempo de retenção (min.).

A GC-MS é considerada técnica “padrão ouro” para análises confirmatórias de drogas de abuso em matrizes biológicas e para diversos tipos de analitos, apresentando especificidade, seletividade e robustez adequadas às análises a que se destina. Além disto, este trabalho objetiva ser reproduzido nos hospitais e Centros de Controle de Intoxicações de todo o Brasil, de modo que, equipamentos mais sensíveis (e também mais caros), como o LC-MS e LC-MS/MS não se enquadram na realidade dos laboratórios.

O método cromatográfico empregado é adequado à qualificação e quantificação dos analitos da cocaína com a rapidez esperada. Entretanto, a norcocaína teve de ser submetida ao processo de derivatização na intenção de gerar um derivado com melhor detectabilidade por GC-MS. Para tanto, utilizou-se o agente derivatizante BSTFA+1%TMCS, capaz de promover a detecção de norcocaína, mesmo em baixas concentrações. Os agentes PFP e PFPA também foram testados, mas nesta ocasião a NCOC se sobrepunha ao CE. Assim, o BSTFA+1%TMCS foi estabelecido como agente derivatizante.

Como explicado anteriormente, este trabalho visa a detecção de substâncias psicoativas que possam ser excretadas no leite materno. Por este motivo, produtos de biotransformação da cocaína, tais como benzoilecgonina, ecgonina metil éster e anidroecgonina metil éster não foram incluídos por não serem capazes de causar efeitos tóxicos ao lactente.

5.1.2. Otimização da extração dos analitos de cocaína por LPME

Como previamente dito neste trabalho, a escolha da LPME levou em conta o fato desta metodologia ser extremamente simples, de baixo custo e praticamente livre

de solvente para o preparo de amostras, bem como da possibilidade de uso de um pequeno volume da matriz biológica.

O método conta com uma série de etapas e parâmetros importantes ao sucesso da extração. Além das características inerentes do analito, alguns outros parâmetros devem ser considerados durante o desenvolvimento do método, tais como ajuste do pH da fase doadora, efeito da adição de sal, tipo de solvente orgânico, tempo e frequência de agitação e composição da solução aceptora.

Todos estes parâmetros, exceto o tipo de solvente orgânico, foram otimizados e seus resultados serão discutidos a seguir. A otimização não incluiu o solvente orgânico, visto que desde os testes preliminares (não exibidos neste texto) a escolha foi voltada ao n-octanol, pois outros solventes comumente utilizados em LPME (éter diexílico, decanol, nonanol e undecano) não foram capazes de promover extração dos analitos de cocaína já nessas etapas iniciais de desenvolvimento.

Todos os resultados de otimização são expressos em área relativa entre padrão e padrão interno, sendo que este último foi adicionado somente no final da extração com o intuito de minimizar as variações provenientes da injeção no equipamento.

5.1.2.1. Estudo da fase doadora

O primeiro parâmetro avaliado foi o pH do tampão da fase doadora. Os tampões foram escolhidos de acordo com sua faixa especificada de tamponamento, foram eles: tampão fosfato de potássio 0,1M pH 8,0; tampão borato 0,25M pH 9,0 e tampão bicarbonato de sódio 0,1M pH 10,0. O **Gráfico 1**, a seguir, exhibe os resultados obtidos:

Gráfico 1 - Influência de diferentes valores de pH das soluções tampão na extração de analitos de cocaína em leite humano por LPME. Os resultados estão expressos com média da área relativa $\pm$ desvio padrão.

Para promover extração através da fase orgânica, o pH da fase que contém a amostra é ajustado a um valor no qual os analitos não possuam carga antes da extração (UGLAND et al., 2003). A cocaína, norcocaína e cocaetileno são bases fracas de pK_a entre 8,0 e 8,6 (VALENTE et al., 2012), de modo que a faixa de pH estudada na otimização da fase doadora é adequada para a manutenção dos analitos na forma molecular, permitindo a passagem desses através da fase orgânica para a fase aceptora. Além disso, a cocaína é inativada por hidrólise dos grupamentos éster quando exposta a valores de pH muito alcalinos, por este motivo o maior valor de pH estudado foi 10,0.

Como indicado no gráfico acima, o tampão borato 0,25 M pH 9,0 foi o mais adequado para extração dos analitos. Mesmo com o ajuste prévio do pH utilizando NaOH 0,1M, o uso do tampão garante que o pH será mantido durante todo o processo de extração.

5.1.2.2. Estudo da fase aceptora

Seguinte ao pH da fase doadora, testou-se a concentração ideal da fase aceptora. Soluções de HCl em diferentes concentrações foram estudadas, a saber: HCl 0,4M, 0,7M e 1,0 M. A menor concentração avaliada (0,4 M) foi determinada em testes prévios que mostraram que concentrações abaixo desta não permitiam a extração dos analitos. Assim, obteve-se os resultados exibidos no **Gráfico 2**.

Gráfico 2 - Influência de diferentes concentrações da solução de HCl na extração de analitos de cocaína em leite humano por LPME. Os resultados estão expressos com média da área relativa $\pm$ desvio padrão.

O gráfico acima justifica a escolha do HCl 0,4M como solução aceptora. Como citado anteriormente, os analitos de cocaína aqui estudados são bases fracas, assim, para que permaneçam “aprisionados” na fase aceptora, esta solução deve ser de caráter ácido, permitindo que os analitos estejam ionizados e impedindo-os de voltar à fase doadora.

A escolha de um ácido forte, o HCl, é baseada no fato de que este tipo de ácido resulta em melhores valores de recuperação quando comparados com soluções aceptoras contendo ácidos fracos. Tal melhora é atribuída principalmente ao menor pH

e eficaz protonação dos analitos obtidos no emprego dessas soluções (OLIVEIRA et al., 2008).

5.1.2.3. Estudo da frequência de agitação do sistema

Durante o procedimento de LPME a amostra passa por uma fase de agitação que promove a passagem dos analitos da fase doadora para a fase aceptora. Com estes dois parâmetros já estabelecidos, é possível testar qual frequência durante a agitação do sistema (fase doadora + fibra + fase aceptora) que melhor resultará. No **Gráfico 3** estão exibidos os resultados obtidos para as frequências de 1200, 1800 e 2400 rpm.

Gráfico 3 - Influência de diferentes frequências de agitação na extração de analitos de cocaína em leite humano por LPME. Os resultados estão expressos com média da área relativa $\pm$ desvio padrão.

Normalmente, a agitação da amostra é aplicada para acelerar a cinética de extração, facilitando a difusão dos analitos através da interface fase doadora – solvente orgânico. Logo, diminui-se o tempo necessário para o sistema atingir o equilíbrio (LAMBROPOULOU; ALBANIS, 2005; OLIVEIRA et al., 2008). Na LPME, a solução aceptora está confinada no interior da fibra e pode tolerar velocidades de

agitação muito altas (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003). Dessa forma, a escolha da frequência de 2400 rpm mostrou-se adequada ao propósito do trabalho proporcionando ótimos resultados para a extração.

5.1.2.4. Estudo do tempo de agitação do sistema

Até esta etapa da otimização, o sistema havia sido submetido a agitação por 30 minutos. Entretanto, visando garantir que esta era a melhor escolha, três tempos de agitação foram avaliados: 10, 30 e 50 minutos, como demonstrado no **Gráfico 4**.

Gráfico 4 - Influência de diferentes tempos de agitação na extração de analitos de cocaína em leite humano por LPME. Os resultados estão expressos com média da área relativa $\pm$ desvio padrão.

A eficiência da extração na LPME depende da transferência de massa do analito da fase aquosa para a orgânica e desta para a fase aceptora. É um processo de equilíbrio e a recuperação do analito pode aumentar com o tempo de extração. Neste caso, 30 minutos foi o tempo escolhido ao qual o sistema deve ser submetido a agitação.

5.1.2.5. Estudo do *salting out*

Finalmente, avaliou-se se a adição de sal (NaCl) à amostra, previamente a agitação, com o intuito de estabelecer se o efeito de *salting out* era uma etapa necessária ao processo. Portanto, utilizando os parâmetros anteriormente estabelecidos, um grupo de amostras sofreu extração com a adição de 0,25 mg de NaCl e um outro grupo foi submetido a extração sem a adição do sal. O resultado no rendimento do processo é exibido no **Gráfico 5**, a seguir:

Gráfico 5 - Influência da adição de sal na extração de analitos de cocaína em leite humano por LPME. Os resultados estão expressos com média da área relativa $\pm$ desvio padrão.

A depender da natureza dos analitos estudados, a adição de sal na amostra pode diminuir a sua solubilidade e então melhorar a extração devido ao efeito *salting out*. Resultados da investigação do efeito da adição de sal na solução doadora mostram que, a depender do analito, o aumento na força iônica da solução pode ter vários efeitos na extração: pode melhorar, não influenciar ou, até mesmo, limitar o processo (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003). Por este motivo, é importante determinar a validade desta etapa na LPME. Neste caso, a adição de sal demonstrou resultados positivos na extração.

5.1.3. Validação da extração de analitos de cocaína por LPME/GC-MS

5.1.3.1. Limite do Branco, Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Os limites de detecção e quantificação obtidos no método são apresentados na **Tabela 3**.

Dentre as várias abordagens existentes para a determinação do LoD, neste trabalho, a abordagem escolhida leva em conta o cálculo prévio do LoB. Os valores de LoB aqui obtidos variaram entre 5 e 9 vezes menores do que os LoDs.

Quando comparados aos métodos descritos na literatura, os LoDs e LoQs aqui expressos mostram-se sensíveis para a detecção da exposição de crianças a COC, CE e NCOC em leite materno. Nenhum dos trabalhos publicados para detecção de analitos de cocaína em leite humano utilizou, até agora, a LPME em conjunto a GC-MS. Winecker et al. (2001) obtiveram limites de detecção entre 2,5 e 5,0 ng/mL e limites de quantificação de 10 ng/mL para COC, CE e NCOC, empregando SPE como método de extração. Ainda, Marchei et al. (2011) e D'Avila et al. (2015), utilizaram LC-MS/MS e LC-MS, respectivamente, nas análises de leite humano. O primeiro valeu-se da técnica de SPE para alcançar LoDs de 1,0 e 2,0 ng/mL e LoQs de 5,0 e 7,0 ng/mL para COC e CE. Já D'Avila, obteve LoD de 2,5 ng/mL e LoQ de 5,0 ng/mL para COC, única substância ativa investigada neste estudo.

Apesar dos valores alcançados nestes dois últimos trabalhos serem ligeiramente inferiores aos obtidos no presente estudo, é importante ressaltar que eles se voltaram mais à pesquisa de biomarcadores de exposição, do que necessariamente, de substâncias ativas passíveis de causar a intoxicação. O mais recente, especialmente, pesquisou apenas COC como substância ativa. Além disso, estes estudos empregaram a LC-MS, técnica que, nesse caso, possui sensibilidade superior à GC-MS, mas que não é viável, especialmente pelo alto custo, na maior parte dos laboratórios brasileiros.

5.1.3.2. Linearidade

Uma ampla faixa de concentrações foi avaliada no estudo de linearidade, contemplando concentrações que partiram do LoQ (12 ng/mL) até 1000 ng/mL. Como observado na **Tabela 3**, o método foi linear para todos os analitos estudados nessa faixa.

Visto que amplitude das concentrações da linearidade excede uma ordem de magnitude, ou seja, abrange de décimos a milésimos, o estudo da homoscedasticidade foi realizado. Inicialmente avaliou-se o valor de $F_{exp.}$, e tendo em vista que este foi superior ao $F_{tabelado}$, para todos os analitos, conclui-se que o método em questão é heteroscedástico, fazendo-se necessário o emprego da regressão dos mínimos quadrados ponderados. Para cada analito obteve-se diferente ponderação, a saber: $1/y^{1/2}$ para COC, $1/x^2$ para CE e $1/y^2$ para NCOC. O coeficiente de correlação obtido com o modelo de regressão linear ponderada está representado na Tabela 4, bem como as equações da reta.

Apesar das concentrações de COC em amostras reais de leite humano encontradas nos trabalhos já publicados na literatura possam alcançar 12 µg/mL (WINECKER et al., 2001), a ordem de concentrações usualmente encontrada está na faixa de 5,0 a 25,0 ng/mL. Além disso, Marchei et al. (2011) e D'Avila et al. (2015) estudaram faixas menores, que partiam do LoQ até 750 e 300 ng/mL, respectivamente. Neste contexto, a faixa escolhida neste trabalho se mostra adequada à quantificação dos analitos de cocaína em leite humano.

5.1.3.3. Precisão, exatidão e recuperação

A **Tabela 4** apresenta os resultados obtidos nos ensaios de precisão intra-ensaio, interensaio, exatidão e recuperação. Todos os valores obtidos, tanto para precisão intra-ensaio quanto para a precisão interensaio estão adequados ao objetivo

deste estudo e atendem aos critérios de aceitação, ou seja, 20% para CB e 15% para CM e CA.

Os resultados do parâmetro exatidão foram calculados multiplicando-se a razão concentração média experimental/ concentração teórica por 100. Visto que os valores obtidos não ultrapassaram a variação aceitável de 80 a 120% para o CB e 85 a 115% para os CM e CA o método é considerado exato.

De acordo com a UNODC (2009), a recuperação não é crítica desde que seja reprodutível e forneça LoQ adequado. Assim, os valores de recuperação obtidos nos métodos são considerados satisfatórios visto que o LoQ está adequado e o método é preciso e exato. Além disso, Pedersen-Bjergaard e Rasmussen (2008) consideram que valores de recuperação acima de 80% na técnica de LPME, são raros.

5.1.3.4. Carryover e seletividade

Nos estudos de seletividade nenhum interferente endógeno ou exógeno foi encontrado nos tempos de retenção de interesse. Esse estudo incluiu uma gama considerável de substâncias que podem ter sido administradas a mãe no período pré e pós-parto, bem como substâncias que podem ter sido auto-administradas com fins recreativos. O método mostrou-se, portanto, seletivo para a análise dos analitos de cocaína aos quais se propõe.

No que diz respeito ao estudo de *carry over*, a injeção prévia de uma amostra contendo uma concentração de 1200 ng/mL (acima do maior ponto da curva) não gerou picos dos analitos nos tempos de retenção de interesse nas amostras negativas subsequentes, como esperado.

Tabela 3 - Limites de detecção (LoD), quantificação (LoQ), curvas de calibração e coeficientes de correlação linear para os analitos cocaína (COC), cocaetileno (CE) e norcocaína (NCOC) em amostras de leite humano.

Analito	LoD (ng/mL)	LoQ (ng/mL)	Curva de calibração	Coeficiente de correlação linear (r^2)
COC	6	10	$y = 0,0071x + 0,1394$	0,9921
CE	7	12	$y = 0,0156x + 0,0217$	0,9956
NCOC	5	12	$y = 0,0107x + 0,0261$	0,9932

Tabela 4 - Precisão inter e intra ensaio, exatidão e recuperação para cocaína (COC), cocaetileno (CE) e norcocaína (NCOC) em amostras de leite humano.

Analito	Concentração (ng/mL)	Precisão		Exatidão (% , n = 6)	Recuperação (%)
		Inter ensaio (RSD%, n = 6, dias = 3)	Intra ensaio (RSD%, n= 6)		
COC	40	13,6	11,0	98,0	55,7
	400	5,4	7,0	87,2	43,7
	850	5,7	7,6	92,5	42,4
CE	40	15,1	7,3	113,2	52,8
	400	4,1	3,8	92,4	55,3
	850	12,4	10,4	93,2	67,4
NCOC	40	15,9	9,5	113,9	49,5
	400	9,2	6,0	102,2	35,1
	850	13,8	10,1	99,9	32,0

Resultados de precisão expressos como porcentagem de desvio padrão relativo (RSD%).

5.1.4. Análise de amostras reais

Das cento e nove amostras de leite humano aleatoriamente coletadas no Hospital Dr. Arthur Ribeiro de Saboya, oitenta e oito apresentaram volume suficiente para análise dos analitos de cocaína.

Apenas uma das amostras foi confirmada positiva para cocaína, na concentração de 138 ng/mL. Outra amostra apresentou COC em concentração próxima ao LoD do método (6 ng/mL) e por isso não pôde ser quantificada. Nas duas amostras, NCOC e CE não foram detectados. Atribui-se esse resultado ao fato da NCOC ser um produto de biotransformação minoritário e ao CE ser produzido apenas com ingestão concomitante de cocaína e etanol.

A maior parte das amostras foi coletada de mulheres que não admitiram o uso de qualquer substância ilícita durante a vida e a gravidez. No total, apenas 19 mulheres citaram o uso de alguma dessas substâncias nos questionários. Dentre essas estava a amostra positiva para cocaína (138 ng/mL), cuja mãe havia admitido o uso de *crack*.

Esse caso pode ser descrito da seguinte maneira: paciente do sexo feminino, 25 anos de idade, 2 filhos e nenhum aborto, não realizou acompanhamento pré-natal. Relata uso de maconha e *crack* por dois anos. O parto aconteceu 24 horas antes da coleta da amostra e a paciente nega uso recente de substâncias ilícitas. A triagem em urina detectou presença de produtos de biotransformação de cocaína e canabinoides.

Considerando uma refeição de 100 mL de leite materno, uma dose absoluta de 13.8 µg de cocaína seria ingerida pela criança. Visto que a biodisponibilidade oral da cocaína é de 60%, 8.3 µg dessa substância seria absorvida pela criança após uma refeição. Os efeitos nocivos que podem ser causados por essa dose são difíceis de ser estimados, especialmente os efeitos em longo prazo. Por esse motivo, mãe e filho devem ser acompanhados pela equipe de saúde e a mãe deve ser aconselhada sobre a cessação do uso dessa substância.

5.2. Extração dos canabinoides do leite humano por SPME/GC-MS

5.2.1. Cromatogramas

Na **Figura 6** estão representados os cromatogramas de amostra negativa de LH adicionada de THC, CBN, CBD e seus respectivos deuterados após ter sido submetida ao método de extração para canabinoides proposto neste trabalho.

Figura 6- Cromatogramas obtidos com a análise de amostra negativa de LH adicionada de canabinoides e seus respectivos deuterados na concentração de 150 ng/mL. A – Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) e Δ^9 -tetrahydrocannabinol-d3 (THC-d3); B – canabinol (CBN) e canabinol-d3 (CBN-d3); C – canabidiol (CBD) e canabidiol-d3 (CBD-d3). T.R.: Tempo de retenção (min.).

O método cromatográfico empregado é adequado à identificação e quantificação aos canabinoides estudados com a rapidez esperada. Não houve necessidade de submeter nenhum destes analitos ao processo de derivatização visto que todos apresentavam suficiente detectabilidade. Isto torna o procedimento mais rápido, mais barato e diminui a geração de resíduos tóxicos.

Os canabinoides escolhidos para realização desse trabalho (THC, CBN e CBD) são substâncias psicoativas que porventura possam causar algum tipo de efeito nocivo ao lactente após ingestão durante o aleitamento. Por este motivo, produtos de biotransformação inativos relacionados ao uso de maconha comumente incluídos em análises toxicológicas, tais como 11-hidroxi- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC-OH) e 11-nor-9-carboxi- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC-COOH), não fazem parte do escopo deste estudo, visto que há baixo potencial destes em causar efeitos tóxicos ao lactente.

5.2.2. Otimização da extração dos canabinoides por SPME

Assim como para a LPME, a etapa de otimização do procedimento de SPME tem grande importância no desenvolvimento do método e alcance de sua máxima eficiência. Entretanto, diferentemente do que foi visto no primeiro caso, a otimização do método de HS-SPME para canabinoides foi extremamente simplificada devido à existência de diversos fatores limitantes, permanecendo quase todos os experimentos na fase de estudo preliminar, de modo que, na maior parte dos casos, o parâmetro escolhido foi aquele que possibilitou a manutenção da integridade da amostra e do sistema extrator como um todo. O uso de SPME para determinação de canabinoides teve como base o método previamente desenvolvido por Oliveira, Yonamine e Moreau (2007).

a) *Escolha do revestimento da fibra*: a escolha do material que compõe a fibra é o primeiro passo no desenvolvimento do método de SPME. Vários fatores foram considerados na escolha imediata da fibra de PDMS: 1) o material da fibra deve ter

polaridade similar à do analito a ser extraído; 2) deve ser resistente a adição de sais, alteração de pH e temperatura elevada; 3) compostos apolares costumam ter alta afinidade pela fibra de polidimetilsiloxano (PDMS); 4) PDMS é considerado o material mais robusto dentre os comercialmente disponíveis, e 5) fibras de PDMS são consideradas as mais apropriadas para extração de canabinoides devido a lipofilicidade desses analitos (OLIVEIRA; YONAMINE; MOREAU, 2007, ULRICH, 2000; PRAGST, 2007).

b) *Escolha da temperatura de aquecimento do sistema*: considera-se que em HS-SPME o aumento da temperatura do sistema possa aumentar a volatilização dos analitos para o *headspace* e consequentemente melhorar a eficiência de extração. Testes preliminares realizados mostraram que temperaturas acima de 70°C levavam a intensa ebulição da amostra, causando alta instabilidade do *headspace*. Visto que a 70°C o resultado obtido na extração se mostrava satisfatório, esta foi mantida em todos os experimentos, por ser a maior temperatura capaz de manter o sistema estável.

c) *Escolha do volume da amostra*: testes preliminares aplicados para avaliar o volume da amostra indicaram que volumes acima de 200 µL de leite causavam intensa ebulição da amostra e instabilidade do *headspace*, como previamente observado nos experimentos para escolha da temperatura. Assim, testes posteriores com volumes menores ou iguais a 200 µL mostraram que com 50 µL havia mínima interferência da matriz e melhores cromatogramas, portanto este foi o volume de amostra mantido em todo o estudo.

d) *Escolha da razão volume da amostra/volume do headspace*: a razão entre o volume da amostra e volume do *headspace* é parâmetro importante no que diz respeito ao alcance do estado de equilíbrio entre as duas fases. Esta razão é também dependente do volume do frasco que é utilizado. Com o intuito de estudar o efeito da razão dos volumes *headspace*/amostra foram avaliados: frasco de rosca com volume de 4 mL (fechado com válvula *mininert*) e frascos próprios de *headspace* de 5 e 10 mL

(fechados com lacre de alumínio). Não houve extração de qualquer dos analitos nos testes com frasco de 10 mL. Com frascos de 5 mL aconteceu, por diversas vezes em variadas temperaturas, o rompimento do frasco de vidro. Assim, a integridade do sistema e extração dos analitos só foi alcançada com o emprego dos frascos de rosca de 4 mL.

e) *Escolha do sal*: a adição de sal para promoção do efeito *salting out* é considerada importante em HS-SPME por acelerar a transferência dos analitos para o *headspace*. Neste trabalho foram testados $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Na_2SO_4 , Na_2CO_3 e NaCl . Dentre outros, o maior empecilho à adição de sal foi a alteração do pH da amostra, mesmo com a utilização de solução tampão. Assim, o NaCl foi escolhido por ser o único sal testado que possibilitou a manutenção do pH e total estabilidade do sistema.

f) *Escolha do pH da amostra*: O pH da amostra foi mantido de acordo com a faixa de utilização da fibra aconselhada pelo fabricante (pH 2,0 a 10,0). Neste caso, o pH foi mantido em 10,0 com a utilização de tampão bicarbonato de sódio 0,1 M. A escolha do pH foi feita de acordo com o observado por Oliveira, Yonamine e Moreau (2007). Os autores atentaram para a ocorrência de um fenômeno incomum, pois o esperado é que maior eficiência de extração fosse alcançada em meio ácido, visto que em meio alcalino deveria ocorrer desprotonação das hidroxilas fenólicas dos analitos, tornando-os hidrossolúveis e, portanto, pouco voláteis; além de diminuir a afinidade pela fibra de PDMS (apolar). No entanto, desempenho ideal desse procedimento de extração se deu justamente em pH alcalino. Por outro lado, entende-se que a SPME é controlada pelo estado de equilíbrio, de modo que, supõe-se que em pH 10,0 a quantidade de analito na forma dissociada é suficiente para atender o estado de equilíbrio e consequentemente obter máxima eficiência de extração.

5.2.3. Validação do método de extração de canabinoides por SPME/GC-MS

5.2.3.1. Limite do Branco, Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Mais uma vez, a abordagem utilizada para o cálculo do limite de detecção (LoD) foi aquela que leva em consideração o cálculo prévio do limite do branco (LoB), através da análise do sinal obtido em 20 amostras negativas adicionadas apenas do padrão interno. Neste caso, o sinal obtido no LoB esteve entre 2 e 3 vezes abaixo do que foi encontrado para o LoD.

Para todos os analitos, os limites de detecção e quantificação (LoQ) foram respectivamente, 10 ng/mL e 20 ng/mL. Até a presente data, apenas uma publicação apresenta os dados da validação de um método para determinação de canabinoides (THC, THC-OH e THC-COOH) em leite humano. Neste caso, Marchei et al. (2011) obtiveram LoD de 1,5 ng/mL e LoQ de 5,0 ng/mL num método baseado em precipitação de proteínas seguida de SPE/LC-MS/MS, o que justifica esses baixos valores .

A nosso ver, os valores de LoD e LoQ obtidos no nosso estudo são suficientes para alcance do objetivo a que se destina, especialmente, quando da aplicação de uma técnica de extração miniaturizada (baixos valores de recuperação esperados) e detecção por GC-MS.

5.2.3.2. Linearidade

O estudo de linearidade contemplou concentrações que partiram do LoQ (20 ng/mL) até 200 ng/ mL, com intuito de valorizar a quantificação de baixas concentrações de canabinoides. Como observado na **Tabela 5**, o método foi linear para todos os analitos estudados nessa faixa.

Mesmo com menor amplitude entre as concentrações, a linearidade excedeu uma ordem de magnitude, ou seja, abrange de décimos a centésimos, levando a necessidade da realização do estudo da homoscedasticidade.

Inicialmente avaliou-se o valor de $F_{exp.}$, e tendo em vista que este foi superior ao $F_{tabelado}$, para todos os analitos, conclui-se que o método em questão é heteroscedástico. O emprego da regressão dos mínimos quadrados ponderados levou a obtenção das seguintes ponderações: $1/y^{1/2}$ para THC e CBD e $1/x$ para CBN. O coeficiente de correlação obtido com o modelo de regressão linear ponderada e as equações da reta estão representados na **Tabela 5**, abaixo:

Tabela 5 - Curvas de calibração e coeficientes de correlação linear (r^2) para os analitos Δ^9 - tetrahydrocannabinol (THC), cannabinol (CBN) e canabidiol (CBD).

Analito	Curva de calibração	Coeficiente de correlação linear (r^2)
THC	$y = 0,0072x + 0,1608$	0,9906
CBN	$y = 0,0065x + 0,1596$	0,9913
CBD	$y = 0,0084x + 0,0489$	0,9906

A faixa de concentrações estudadas na linearidade dos canabinoides (20, 50, 100, 150 e 200 ng/ mL) é consideravelmente mais estreita do que aquela vista no estudo dos analitos de cocaína; isto se deve ao fato de não haver justificativa para aplicação de uma faixa mais ampla para canabinoides. Marchei et al. (2011) quantificaram 86 ng/mL em uma amostra de leite humano, enquanto que em nosso estudo as concentrações encontradas (como será visto detalhadamente adiante) foram de 20 ng/mL e 31 ng/mL, todas respeitam a faixa aqui aplicada.

5.2.3.3. Precisão e exatidão

A **Tabela 6** apresenta os resultados obtidos nos ensaios de precisão e exatidão deste estudo.

Todos os resultados de precisão, tanto inter quanto intra-ensaio, atendem aos critérios de aceitação, ou seja, 20% para CB e 15% para CM e CA. Os resultados do parâmetro exatidão foram calculados multiplicando-se a razão concentração média experimental/ concentração teórica por 100. Visto que os valores obtidos não ultrapassaram a variação aceitável de 80 a 120% para o CB e 85 a 115% para os CM e CA o método é também considerado exato.

Ressalta-se aqui a importância da manutenção de todas as condições de extração exatamente como indicadas na metodologia deste trabalho, o controle cuidadoso da temperatura (70°C) é importante para evitar fervura e evaporação da amostra e consequentemente diminuir a possibilidade de geração de replicatas *outlier*, favorecendo a precisão e exatidão do método.

Tabela 6 - Resultados de precisão e exatidão obtidos para os analitos Δ^9 -tereahidrocanabinol (THC), canabinol (CBN) e canabidiol (CBD) .

Analito	Concentração (ng/mL)	Precisão		Exatidão (%, n = 6)
		Inter ensaio (RSD%, n = 6, dias = 3)	Intra ensaio (RSD%, n= 6)	
THC	40	7,4	9,2	117,9
	90	12,9	7,6	98,9
	160	6,5	6,6	85,7
CBN	40	13,3	5,9	94,5
	90	6,9	4,6	113,4
	160	8,1	6,4	91,1
CBD	40	10,0	5,4	106,6
	90	6,5	2,1	113,8
	160	6,0	2,2	90,9

Resultados de precisão expressos como porcentagem de desvio padrão relativo (%RSD).

5.2.3.4. *Carryover* e seletividade

O estudo de *carryover* em SPME é de grande importância, visto que uma das principais desvantagens dessa técnica é a possibilidade de *carryover* devido ao uso repetido da fibra (há fibras que suportam cerca de 100 injeções). A injeção prévia de uma amostra contendo canabinoides numa concentração de 200 ng/mL (maior ponto da curva) não gerou picos dos analitos nos tempos de retenção de interesse nas amostras negativas subsequentes, como esperado.

Nos testes de seletividade nenhum interferente endógeno ou exógeno foi encontrado nos tempos de retenção de interesse. Esse estudo incluiu diversas substâncias que podem ter sido administradas a mãe no período pré e pós-parto, bem como substâncias que podem ter sido auto-administradas com fins recreativos. O método mostrou-se, portanto, seletivo para THC, CBN e CBD.

5.2.4. Análise de amostras reais

As cento e nove amostras de leite humano coletadas do Hospital Dr. Arthur Ribeiro de Saboya foram submetidas à HS-SPME para determinação de canabinoides. Das 19 amostras com uso de drogas relatado no questionário uma pôde ser confirmada positiva para THC. A concentração encontrada foi de 20 ng/mL de leite materno. CBN e CBD não foram detectados nessa amostra. Triagem em urina realizada no hospital havia indicado a presença de canabinoides.

Além desta, uma amostra sem relato prévio de uso de drogas na vida ou durante a gravidez foi confirmada positiva para THC na concentração de 31 ng/mL. Neste caso, o CBD foi detectado, mas não pôde ser quantificado por estar abaixo do LoQ.

Se aplicarmos para estas amostras os mesmos cálculos utilizados para cocaína, considerando uma refeição de 100 mL de leite materno e biodisponibilidade

oral máxima do THC em 12%, a cada refeição, as crianças poderiam estar expostas a doses de 0,24 µg no primeiro caso e 0,37 µg no segundo.

Novamente, a gravidade dos efeitos causados por essa quantidade de THC ingerida algumas vezes por dia durante vários meses é difícil de ser avaliada. Independentemente da quantidade de THC ser consideravelmente baixa, a quantificação desta e outras substâncias psicoativas no leite materno é importante por ser a alternativa mais objetiva na avaliação da magnitude da exposição. Além disso, essa poderia ser uma fonte de exposição a mais para criança, caso os pais façam uso de maconha dentro de casa, haverá também exposição através de fumaça.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Como visto nos resultados apresentados e discutidos, conclui-se que as técnicas miniaturizadas de extração aqui empregadas apresentam seletividade, precisão, exatidão, recuperação, linearidade e limites em conformidade ao objetivo a que são destinadas.

O emprego tanto da LPME quanto da SPME se mostrou uma ótima alternativa à LLE e SPE, comumente utilizadas nos processos de extração em leite materno e outras matrizes.

O uso de pequeno volume de amostra (500 μ L e 50 μ L), a possibilidade do uso de pouco ou nenhum volume de solventes e a facilidade de execução, são algumas das características dessas técnicas que as torna extremamente atrativas, e como observado em todo o trabalho, são ainda eficientes e fornecem maior segurança para o analista. Além disso, a GC-MS provou ser apropriada para a análise das substâncias estudadas; de modo que, os métodos aqui apresentados se mostram viáveis e passíveis de ser estabelecidos nos hospitais e Centros de Controle de Intoxicações nos quais a pesquisa de analitos de cocaína e canabinoides em leite materno represente uma demanda importante.

Ademais, a excreção de analitos de cocaína e canabinoides em leite materno se mostrou fato real, ainda que suas possíveis consequências sejam difíceis de medir. A obtenção de poucas amostras positivas foi um importante fator limitante da avaliação da exposição de crianças neste estudo. Em todo caso, cabe a equipe de saúde aconselhar a mãe sobre o risco do uso de drogas ilícitas como *crack*, cocaína e maconha durante todo o período de pré e pós-parto.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA. **Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003.** Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. 2003.

AGUIAR, H., SILVA, A. I. Aleitamento Materno: A importância de Intervir. **Acta Médica Portuguesa.** v. 24, p. 889-896, 2011.

ALLEN, J. C., KELLER, R. P., ARCHER, P., NEVILLE, M. C. Studies in human lactation: milk composition and daily secretion rates of macronutrients in the first year of lactation. **The American journal of clinical nutrition.** v. 54(1), p. 69-80, 1991.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Committee on drugs. The Transfer of Drugs and Other Chemicals Into Human Milk. **Pediatrics.** v. 108, p. 776-789, 2001.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS (AAP). Committee on drugs. Breastfeeding and the Use of Human Milk. **Pediatrics.** v. 115 (2), p. 4096-506, 2005.

ANDREAS, N. J., KAMPMANN, B., LE-DOARE, K. M. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. **Early human development.** v. 91(11), p. 629-635, 2015.

ARMBRUSTER, D. A., PRY, T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. **The Clinical Biochemist Reviews.** v. 29 (1), p. 49-52, 2008.

ARTHUR, C. L., PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical chemistry.** v. 62(19), p. 2145-2148, 1990.

ASTLEY S. J., LITTLE R. E. Maternal marijuana use during lactation and infant development at one year. **Neurotoxicology and Teratology.** v. 12(2), p. 161-168, 1990.

BAIROS, A. V. D., LANARO, R., ALMEIDA, R. M. D., YONAMINE, M. Determination of ketamine, norketamine and dehydronorketamine in urine by hollow-fiber liquid-phase microextraction using an essential oil as supported liquid membrane. **Forensic Science International.** v. 243, p. 47-54, 2014.

BALLARD, O., MORROW, A. L. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. **Pediatric Clinics of North America.** v. 60(1), p. 49-74, 2013.

BEGG E. J., ATKINSON H.C. Modelling of the passage of drugs into milk. **Pharmacology & Therapeutics.** v. 59(3), p. 301-310, 1993.

BEGG E. J., DUFFULL S. B., HACKETT L. P., ILETT K. F. Studying Drugs in Human Milk: Time to Unify the Approach. **Journal of Human Lactation**. v. 18, p. 323 - 332, 2002.

BEN AMAR, M. Pharmacologie du cannabis et synthese des analyses des principaux comités d'experts. In: Ben Amar, M. (Ed.), **Cannabis**. Drogues, Santé et Société. v. 2(2), p. 9 - 60, 2004.

BENBADIS, S.R., SANCHEZ-RAMOS, J., BOZORG, A., GIARRATANO, M., KALIDAS, K., KATZIN, L., ROBERTSON, D., VU, T., SMITH, A., ZESIEWICZ, T. Medical marijuana in neurology. **Expert Review of Neurotherapeutics**. v. 14(12), p. 1453–1465, 2014.

BERLIN, C. M., BRIGGS, G. G. Drugs and chemicals in human milk. In **Seminars in fetal and neonatal medicine**. v. 10 (2), p. 149-159, 2005.

BJØRHOVDE, A., HALVORSEN, T. G., RASMUSSEN, K. E., PEDERSEN-BJERGAARD, S. Liquid-phase microextraction of drugs from human breast milk. **Analytica Chimica Acta**. v. 491(2), p. 155-161, 2003.

BUTS J. P. Les facteurs trophiques du lait. **Archives de pédiatrie**. v. 5(3), p. 298-306, 1998.

CARASEK, E., MERIB, J. Membrane-based microextraction techniques in analytical chemistry: A review. **Analytica chimica acta**. v. 880, p. 8-25, 2015.

CARRAZZA M.Z.N., ZUCOLOTO A.D., ERRA A.L., FRUCHTENGARTEN L. V. G., GARDINO F. H., MIGUEL F. F. G., MANTOVANI C. C., YONAMINE M. Exposição à cocaína via leite materno. **Acta Pediátrica Portuguesa**. v. 44(2), p. 80 - 82, 2013.

CHASNOFF I. J., LEWIS D. E., SQUIRES L. Cocaine Intoxication in a Breast-Fed Infant. **Pediatrics**. v. 80, p. 836-838, 1987.

CHAVES R. G., LAMOUNIER J. A. Uso de medicamentos durante a lactação. **Jornal de Pediatria**. v. 80(5), p. 189 - 198, 2004.

COSTA A. G. V. **Composição nutricional do leite humano e sua correlação com variáveis maternas: estudo prospectivo**. Dissertação (Ciência da Nutrição), Universidade Federal de Viçosa, 2006.

CRESSMAN A. M., KOREN G., PUPCO A., KIM E., ITO S., BOZO P. Maternal cocaine use during breastfeeding. **Canadian Family Physician**. v. 58(11), p. 1218-1219, 2012.

D'AVILA, F. B., PEREIRA, A. G., SALAZAR, F. R., FERREIRA, P. L., SALAZAR, C. R., LIMBERGER, R. P., FRÖHLICH, P. E. Determination of cocaine/*crack* biomarkers in colostrum by LC–MS following protein precipitation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 103, p. 67-72, 2015.

DE ALBUQUERQUE, N. C. P., BORTOLETO, M. A., DE OLIVEIRA, A. R. M. Análise enantiosseletiva de fármacos e metabólitos em matrizes biológicas empregando técnicas miniaturizadas de preparação de amostras. **Scientia Chromatographica**. 5(3), p. 214-228, 2013.

DEBRUIN, L. S., JOSEPHY, P. D., PAWLISZYN, J. B. Solid-phase microextraction of monocyclic aromatic amines from biological fluids. **Analytical chemistry**. v. 70(9), p. 1986-1992, 1998.

DICKSON, P.H., LIND, A., STUDTS, P., NIPPER, H.C., MAKOID, M., THERKILDSEN D. The routine analysis of breast milk for drugs of abuse in a clinical toxicology laboratory. **Journal of Forensic Science**. v. 39(1), p. 207 - 214, 1994.

EUCLYDES MP. Aleitamento materno. In: Euclides MP. **Nutrição do lactente: base científica para uma alimentação adequada**. 2ª ed. Viçosa: Suprema; p. 259-346, 2000.

FLEISHAKER, J. C. Models and methods for predicting drug transfer into human milk. **Advanced drug delivery reviews**. v. 55(5), p. 643-652, 2003.

FRÍGULS B., JOYA X., GARCÍA-ALGAR O., PLLÁS C. R., VALL O., PICHINI S. A comprehensive review of assay methods to determine drugs in breast milk and the safety of breastfeeding when taking drugs. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v. 397(3), p 1157- 1179, 2010.

GARRY A., RIGOURD V., AMOROUCHÉ A., FAUROUX V., AUBRY S., SERREAU R. Cannabis and Breastfeeding. **Journal of Toxicology**, p.1 - 5, 2009.

GHAMBARIAN, M., YAMINI, Y., ESRAFILI, A. Developments in hollow fiber based liquid-phase microextraction: principles and applications. **Microchimica Acta**. v. 177, p. 271-294, 2012.

GOLDSTEIN, R. A., DESLAURIERS, C., BURDA, A. M. Cocaine: History, Social Implications, and Toxicity - A Review. **Dis Mon**. v. 55, p. 6-38, 2009.

GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, M. J., LIÉBANAS, F. A., FRENICH, A. G., VIDAL, J. M., LÓPEZ, F. S. Determination of pesticides and some metabolites in different kinds of milk by solid-phase microextraction and low-pressure gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical and bioanalytical chemistry**. v. 382(1), p. 164-172, 2005.

GROTENHERMEN, F. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cannabinoids. **Clinical Pharmacokinetics**. v. 42(4), p. 327-360, 2003.

HALE T. W. **Medications and Mother's Milk**. Pharmasoft Medical Publishing, 2006.

HERBST, E. D., EVERHART, E. T. JACOB, P., HARRIS, D. S., MENDELSON, J., TONES, R. T. Cocaethylene Formation Following Ethanol and Cocaine Administration by Different Routes. **Experimental and Clinical Psychopharmacology**. v. 19(2), p. 95–104, 2011.

HENRIQUE, I. F .S; DE MICHELI, D.; DE LACERDA, R. B.; DE LACERDA, L.A; FORMIGONI, M. L. O. S. Validação da versão brasileira do teste de triagem do envolvimento com álcool, cigarro e outras substâncias (ASSIST). **Revista da Associação Médica Brasileira**. v. 50(2), p. 199-206, 2004.

HOWARD, C. R., LAWRENCE, R. A. Drugs and breastfeeding. **Clinics in Perinatology**. v. 26(2), p. 447 - 478, 1999.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre Validação de Métodos de Métodos Analíticos**, DOG-CGCRE-008. Revisão 3, 2010.

INSTITUTO NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA PARA POLÍTICAS PÚBLICAS DE ÁLCOOL E OUTRAS DROGAS (INPAD). **Levantamento Nacional de Álcool e Drogas II (LENAD II)** – 2012. Ronaldo Laranjeira (Supervisão) [et al.], São Paulo, UNIFESP, 2014.

ITO, S., ALCORN, J. Xenobiotic transporter expression and function in the human mammary gland. **Advanced drug delivery reviews**. v. 55(5), p. 653-665, 2003.

IWAI, M., OGAWA, T., HATTORI, H., ZAITSU, K., ISHII, A., SUZUKI, O., SENO, H. Simple and Rapid Assay Method for Simultaneous Quantification of Urinary Nicotine and Cotinine Using Micro-Extraction by Packed Sorbent and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Nagoya Journal of Medical Science**. v. 75(3-4), p. 255 - 261, 2013.

JENSEN R. G. Lipids in human milk. **Lipids**. v. 34(2), p. 1243 - 1271, 1999.

KATAOKA, H., SAITO, K. Recent advances in SPME techniques in biomedical analysis. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 54(5), p. 926-950, 2011.

KIM, S. R., HALDEN, R. U., BUCKLEY, T. J. Volatile organic compounds in human milk: methods and measurements. **Environmental science & technology**. v. 41(5), p. 1662-1667, 2007.

KOWALSKI, C. H., DA SILVA, G. A., POPPI, R. J., GODOY, H. T., AUGUSTO, F. Neuro-genetic multioptimization of the determination of polychlorinated biphenyl congeners in human milk by headspace solid phase microextraction coupled to gas chromatography with electron capture detection. **Analytica chimica acta**. v. 585(1), p. 66-75, 2007.

KOWALSKI, C. H., COSTA, J. G., GODOY, H. T., AUGUSTO, F. Determination of polychlorinated biphenyls in brazilian breast milk samples using solid-phase microextraction and gas chromatography-electron capture detection. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 21(3), p. 502-509, 2010.

KOWALSKI, C. H., DA SILVA, G. A., GODOY, H. T., POPPI, R. J., AUGUSTO, F. Application of Kohonen neural network for evaluation of the contamination of Brazilian breast milk with polychlorinated biphenyls. **Talanta**. v. 116, p. 315-321, 2013.

LAMBROPOULOU, D. A.; ALBANIS, T. A. Application of hollow fiber liquid phase microextraction for the determination of insecticides in water. **Journal of Chromatography A**. v. 1072(1), p. 55-61, 2005.

LAMBROPOULOU, D. A., ALBANIS, T. A. Liquid-phase micro-extraction techniques in pesticide residue analysis. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**. v. 70(2), p. 195-228, 2007.

LAMBROPOULOU, D. A., KONSTANTINOY, I. K., ALBANIS, T. A. Recent developments in headspace microextraction techniques for the analysis of environmental contaminants in different matrices. **Journal of chromatography A**. v. 1152(1), p. 70-96, 2007.

LANGMAN, L. J., BJERGUM, M. W. WILLIAMSON, C. L., CROW, F. W. Sensitive Method for Detection of Cocaine and Associated Analytes by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry in Urine. **Journal of Analytical Toxicology**. v. 33(8), p. 447 – 455, 2009.

LISTON J. Breastfeeding and the use of recreational drugs-alcohol, caffeine, nicotine and marijuana. **Breastfeeding Review**. v. 6(2), p. 27–30, 1998.

LIU, X., LIANG, S., PAN, J., GUO, Y., LUO, H., ZHAO, Q., GUAN, S. High-Throughput Determination of Nicotine in Plasma by Ultrasonication Enhanced Hollow Fiber Liquid-Phase Microextraction Prior to Gas Chromatography. **Journal of Chromatographic Science**. v. 52(6), p. 553-558, 2014.

LORD, H., PAWLISZYN, J. Evolution of solid-phase microextraction technology. **Journal of Chromatography A**. v. 885(1), p. 153-193, 2000.

LUCK W., NAU H. Nicotine, and cotinine concentrations in serum and milk of nursing smokers. **British Journal of Clinical Pharmacology**. v. 18(1), p. 9-15, 1984.

MCMANAMAN, J. L., NEVILLE, M. C. Mammary physiology and milk secretion. **Advanced drug delivery reviews**. v. 55(5), p. 629-641, 2003.

MAURER, H. H., SAUER, C., THEOBALD, D. S. Toxicokinetics of drugs of abuse: current knowledge of the isoenzymes involved in the human metabolism of tetrahydrocannabinol, cocaine, heroin, morphine, and codeine. **Therapeutic Drug Monitoring**. v. 28(3), p. 447-453, 2006.

MATUHARA, A.M., NAGAMURA, M. Manual instrucional para aleitamento materno de recém-nascidos pré-termo. **Pediatria**. v. 28(2), p. 81 - 90, 2006.

McNAMARA, P. J. Drug Excretion in Breast Milk: Mechanisms, Models and Drug Delivery Implications for the Infant. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 55(5), p. 615 - 616, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Departamento de Ações Programáticas e Estratégicas. **Amamentação e uso de medicamentos e outras substâncias**. 2. ed. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Departamento de Atenção Básica. **Saúde da criança - nutrição infantil: aleitamento materno e alimentação complementar**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2009.

NASCIMENTO, M. B. R., ISSLER, H. Breastfeeding: making the difference in the development, health and nutrition of term and preterm newborns. **Revista do Hospital das Clínicas**. v. 58(1), p. 49-60, 2003.

OCAÑA-GONZÁLEZ, J. A., FERNÁNDEZ-TORRES, R., BELLO-LÓPEZ, M. Á., RAMOS-PAYÁN, M. New developments in microextraction techniques in bioanalysis. A review. **Analytica chimica acta**. v. 905, p. 8-23, 2016.

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

OLIVEIRA, C. R. D., YONAMINE, M., MOREAU, R. L. M. Headspace solid-phase microextraction of cannabinoids in human head hair samples. **Journal of separation science**. v. 30(1), p. 128-134, 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Alimentação Infantil: Bases Fisiológicas**. (2ª ed.). Genebra, 1994.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Razões médicas aceitáveis para uso de substitutos do leite materno**. Genebra, 2009a.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Infant and young child feeding: model chapter for textbooks for medical students and allied health professionals.** Genebra, 2009b.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Global status report on noncommunicable diseases.** Genebra, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS. **Guidelines for the Identification and Management of Substance Use and Substance Use Disorders in Pregnancy.** Genebra, 2014.

PAGE-SHARP M., HALE T. W., HACKETT L. P., KRISTENSEN J. H., ILETT K. F. Measurement of nicotine and cotinine in human milk by high-performance liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. **Journal of Chromatography B.** v. 796, p. 173 - 180, 2003.

PEDERSEN-BJERGAARD, S., RASMUSSEN, K. E. Bioanalysis of drugs by liquid-phase microextraction coupled to separation techniques. **Journal of Chromatography B.** v. 817(1), p. 3-12, 2005.

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

PELLEGRINI M., MARCHEI E., ROSSI S., VAGNARELLI F., DURGBANSHI A., GARCIA-ALGAR O., VALL O., PICHINI S. Liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry assay for determination of nicotine and metabolites, caffeine and arecoline in breast milk. **Rapid Communications in Mass Spectrometry.** v. 21, p. 2693–2703, 2007.

PEREZ-REYES, M.; WALL, M. E. Presence of delta-9-tetrahydrocannabinol in human milk. **The New England Journal of Medicine.** v. 307, p. 819-820, 1982.

PETERS, F. T., DRUMMER, O. H., MUSSHOFF, F. Validation of new methods. **Forensic Science International.** v. 165, p. 216-224, 2007.

PETERS S. A. E., HUXLEY R.R., WOODWARD M. Smoking as a Risk Factor for Stroke in Women Compared With Men: A Systematic Review and Meta-analysis of 81 Cohorts, Including 3,980,359 Individuals and 42,401 Strokes. **Stroke**, v. 44, p. 2821-2828, 2013.

PRAGST, F. Application of solid-phase microextraction in analytical toxicology. **Analytical and bioanalytical chemistry.** v. 388(7), p. 1393-1414, 2007.

PSILLAKIS, E., KALOGERAKIS, N. Developments in liquid-phase microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 22(9), p. 565 - 574, 2003.

RISTICEVIC, S., NIRI, V. H., VUCKOVIC, D., PAWLISZYN, J. Recent developments in solid-phase microextraction. **Analytical and bioanalytical chemistry**. v. 393(3), p. 781-795. 2009.

RÖHRIG, L., MEISCH, H. U. Application of solid phase micro extraction for the rapid analysis of chlorinated organics in breast milk. **Fresenius' journal of analytical chemistry**. v. 366(1), p. 106-111, 2000.

ROSSI D. T., WRIGHT D. S. Analytical considerations for trace determinations of drugs in breast milk. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.15, p. 495 - 504, 1997.

SACHS H. C., COMMITTEE ON DRUGS. The Transfer of Drugs and Therapeutics Into Human Breast Milk: An Update on Selected Topics. **Pediatrics**. v. 132, p.796 - 809, 2013.

SCIENTIFIC WORKING GROUP FOR FORENSIC TOXICOLOGY – SWGTOX. **Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology**. Rev. 1, 2013.

SECRETARIA NACIONAL DE POLÍTICAS SOBRE DROGAS. **Relatório brasileiro sobre drogas** – Brasília: SENAD, 2009.

SPIETELUN, A., MARCINKOWSKI, Ł., DE LA GUARDIA, M., NAMIEŚNIK, J. Recent developments and future trends in solid phase microextraction techniques towards green analytical chemistry. **Journal of Chromatography A**. v. 1321, p. 1-13, 2013.

SUBSTANCE ABUSE AND MENTAL HEALTH SERVICES ADMINISTRATION (SAMHSA). **Results from the 2013 National Survey on Drug Use and Health: Summary of National Findings**. Substance Abuse and Mental Health Services Administration, 2014.

THE ACADEMY OF BREASTFEEDING MEDICINE PROTOCOL COMMITTEE. ABM Clinical Protocol #21: Guidelines for Breastfeeding and the Drug-Dependent Woman. **Breastfeeding Medicine**. v. 4(4), p. 225-228, 2009.

TOMA, T. S.; REA, M. F. Benefícios da amamentação para a saúde da mulher e da criança: um ensaio sobre as evidências. **Caderno de Saúde Pública**. v. 24(2), p. 235 - 246, 2008.

TRENTO, F. K. H. S. **Leite humano como fonte de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas e com potencial probiótico**. Dissertação (Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade de São Paulo (Piracicaba), 2012.

UGLAND, H. G., KROGH, M., REUBSAET, L. Three-phase liquid-phase microextraction of weakly basic drugs from whole blood. **Journal of Chromatography B**. v. 798(1), p. 127-135, 2003.

ULRICH, S. Solid-phase microextraction in biomedical analysis. **Journal of Chromatography A**. v. 902(1), p. 167-194, 2000.

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME (UNODC). **Guidance for the validation of analytical methodology and calibration of equipment used for testing of illicit drugs in seized materials and biological specimens**. 2009. Disponível em: http://www.unodc.org/documents/scientific/validation_E.pdf. Acesso em 28 de outubro de 2013.

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME (UNODC). **World Drug Report 2015**. United Nations: New York. 2015.

VALENTE, M. J., CARVALHO, F. BASTOS, M. L., CARVALHO, M., PINHO, P. G. Development and validation of a gas chromatography/ion trap-mass spectrometry method for simultaneous quantification of cocaine and its metabolites benzoylecgonine and norcocaine: Application to the study of cocaine metabolism in human primary cultured renal cells. **Journal of Chromatography B**. v. 878, p. 3083 - 3088, 2010.

VALENTE, M. J., CARVALHO, F., DE LOURDES BASTOS, M., CARVALHO, M., DE PINHO, P. G. Chromatographic Methodologies for Analysis of Cocaine and its Metabolites in Biological Matrices. **Gas Chromatography–Biochemicals, Narcotics and Essential Oils**. v. 163, p. 163 – 194, 2012.

VAN THUYNE, W.; VAN EENOO P.; DELBEKE, F. T. Implementation of gas chromatography combined with simultaneously selected ion monitoring and full scan mass spectrometry in doping analysis. **Journal of Chromatography A**. v.1210, p. 193 - 202, 2008.

VUCKOVIC, D., ZHANG, X., CUDJOE, E., & PAWLISZYN, J. Solid-phase microextraction in bioanalysis: New devices and directions. **Journal of Chromatography A**. v. 1217(25), p. 4041-4060, 2010.

WANG G. S., NARANG S. K., WELLS K., CHUANG R. A case series of marijuana exposures in pediatric patients less than 5 years of age. **Child Abuse & Neglect**. v. 35, p. 563 - 565, 2011.

WINECKER R. E., GOLDBERGER B. A., TEBBETT I. R., BEHNKE M., EYLER F. D., KARLIX J. L., WOBIE K., CONLON M., PHILLIPS D., BERTHOLF R. L. Detection of cocaine and its metabolites in breast milk. **Journal of Forensic Science**. v. 46(5), p. 1221 - 1223, 2001.

ZARFIN Y., YEFET E., ABOZAID S., NASSER W., MOR T., FINKELSTEIN Y. Infant with altered consciousness after cannabis passive inhalation. **Child Abuse & Neglect**, v. 36, p. 81 - 83, 2012.

ANEXOS

ANEXO I

ASSIST 2.0 ADAPTADO

Identificação no.: _____ Idade: _____ Data da internação: _____

Alcohol Smoking Substance Involvement Test – ASSIST

Teste para triagem do envolvimento com o fumo, álcool e outras drogas

1- Na sua vida, qual (is) dessas substâncias você já usou? (SOMENTE USO NÃO-MÉDICO)	Não	Sim
a. Derivados do tabaco (cigarros, charuto, cachimbo, fumo de corda...)	0	1
b. Bebidas alcoólicas (cerveja, vinho, pinga, uísque, vodka, vermouths...)	0	1
c. Maconha (baseado, erva, haxixe...)	0	1
d. Cocaína, <i>crack</i> (pó, pedra, branquinha, nuvem...)	0	1
e. Estimulantes como anfetaminas ou ecstasy (bolinhas, rebites...)	0	1
f. Outras, Especificar: _____	0	1

2- Alguma vez você já usou drogas por injeção (Apenas uso não-médico)?	NÃO, nunca	SIM, mas não durante a gravidez	SIM, mas não nos últimos 3 meses	SIM, nos últimos 3 meses
	0	1	1	2

3A- Durante os três últimos meses, com que frequência você utilizou essas(s) substâncias? (Primeira droga, depois a segunda droga, etc)	Nunca	1 ou 2 vezes	Todo mês	Toda semana	Todo dia (ou quase todo)
a. Derivados do tabaco (cigarros, charuto, cachimbo, fumo de corda...)	0	1	2	3	4
b. Bebidas alcoólicas (cerveja, vinho, pinga, uísque, vodka, vermouths...)	0	1	2	3	4
c. Maconha (baseado, erva, haxixe...)	0	1	2	3	4
d. Cocaína, <i>crack</i> (pó, pedra, branquinha, nuvem...)	0	1	2	3	4
e. Estimulantes como anfetaminas ou ecstasy (bolinhas, rebites...)	0	1	2	3	4
f. Outras, Especificar: _____	0	1	2	3	4

3B- Durante a gravidez, com que frequência você utilizou essas(s) substâncias? (Primeira droga, depois a segunda droga, etc)	Nunca	1 ou 2 vezes	Todo mês	Toda semana	Todo dia (ou quase todo)
a. Derivados do tabaco (cigarros, charuto, cachimbo, fumo de corda...)	0	1	2	3	4
b. Bebidas alcoólicas (cerveja, vinho, pinga, uísque, vodka, vermouths...)	0	1	2	3	4
c. Maconha (baseado, erva, haxixe...)	0	1	2	3	4
d. Cocaína, <i>crack</i> (pó, pedra, branquinha, nuvem...)	0	1	2	3	4
e. Estimulantes como anfetaminas ou ecstasy (bolinhas, rebites...)	0	1	2	3	4
f. Outras, Especificar: _____	0	1	2	3	4

4- Durante os três últimos meses, com que frequência você teve forte desejo ou urgência em consumir? (Primeira droga, depois a segunda droga, etc)	Nunca	1 ou 2 vezes	Todo mês	Toda semana	Todo dia (ou quase todo)
a. Derivados do tabaco (cigarros, charuto, cachimbo, fumo de corda...)	0	1	2	3	4
b. Bebidas alcoólicas (cerveja, vinho, pinga, uísque, vodka, vermouthes...)	0	1	2	3	4
c. Maconha (baseado, erva, haxixe...)	0	1	2	3	4
d. Cocaína, <i>crack</i> (pó, pedra, branquinha, nuvem...)	0	1	2	3	4
e. Estimulantes como anfetaminas ou ecstasy (bolinhas, rebites...)	0	1	2	3	4
f. Outras, Especificar: _____	0	1	2	3	4

5- Durante os três últimos meses, com que frequência o seu consumo de (Primeira droga, depois a segunda droga, etc) resultou em problemas de saúde, social, legal ou financeiro?	Nunca	1 ou 2 vezes	Todo mês	Toda semana	Todo dia (ou quase todo)
a. Derivados do tabaco (cigarros, charuto, cachimbo, fumo de corda...)	0	1	2	3	4
b. Bebidas alcoólicas (cerveja, vinho, pinga, uísque, vodka, vermouthes...)	0	1	2	3	4
c. Maconha (baseado, erva, haxixe...)	0	1	2	3	4
d. Cocaína, <i>crack</i> (pó, pedra, branquinha, nuvem...)	0	1	2	3	4
e. Estimulantes como anfetaminas ou ecstasy (bolinhas, rebites...)	0	1	2	3	4
f. Outras, Especificar: _____	0	1	2	3	4

6- Durante os três últimos meses, com que frequência por causa do seu	Nunca	1 ou 2	Todo	Toda	Todo dia (ou
--	--------------	---------------	-------------	-------------	---------------------

uso de (Primeira droga, depois a segunda droga, etc) você deixou de fazer coisas que eram normalmente esperadas por você?		vezes	mês	semana	quase todo)
a. Derivados do tabaco (cigarros, charuto, cachimbo, fumo de corda...)	0	1	2	3	4
b. Bebidas alcoólicas (cerveja, vinho, pinga, uísque, vodka, vermouths...)	0	1	2	3	4
c. Maconha (baseado, erva, haxixe...)	0	1	2	3	4
d. Cocaína, <i>crack</i> (pó, pedra, branquinha, nuvem...)	0	1	2	3	4
e. Estimulantes como anfetaminas ou ecstasy (bolinhas, rebites...)	0	1	2	3	4
f. Outras, Especificar: _____	0	1	2	3	4

7- Há amigos, parentes ou outra pessoa que tenha demonstrado preocupação com o seu uso de (Primeira droga, depois a segunda droga, etc)?	Nunca	1 ou 2 vezes	Todo mês	Toda semana	Todo dia (ou quase todo)
a. Derivados do tabaco (cigarros, charuto, cachimbo, fumo de corda...)	0	1	2	3	4
b. Bebidas alcoólicas (cerveja, vinho, pinga, uísque, vodka, vermouths...)	0	1	2	3	4
c. Maconha (baseado, erva, haxixe...)	0	1	2	3	4
d. Cocaína, <i>crack</i> (pó, pedra, branquinha, nuvem...)	0	1	2	3	4
e. Estimulantes como anfetaminas ou ecstasy (bolinhas, rebites...)	0	1	2	3	4
f. Outras, Especificar: _____	0	1	2	3	4

8- Alguma vez você já tentou controlar, diminuir ou parar o uso de (Primeira droga, depois a segunda droga, etc)?	Nunca	1 ou 2 vezes	Todo mês	Toda semana	Todo dia (ou quase todo)
--	--------------	---------------------	-----------------	--------------------	---------------------------------

a. Derivados do tabaco (cigarros, charuto, cachimbo, fumo de corda...)	0	1	2	3	4
b. Bebidas alcoólicas (cerveja, vinho, pinga, uísque, vodka, vermouths...)	0	1	2	3	4
c. Maconha (baseado, erva, haxixe...)	0	1	2	3	4
d. Cocaína, <i>crack</i> (pó, pedra, branquinha, nuvem...)	0	1	2	3	4
e. Estimulantes como anfetaminas ou ecstasy (bolinhas, rebites...)	0	1	2	3	4
f. Outras, Especificar: _____	0	1	2	3	4

ANEXO II
(PARTE 1)

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da exposição de crianças a substâncias psicoativas durante a lactação através da análise toxicológica em leite materno

Pesquisador: Mauricio Yonamine

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 31938714.0.0000.0067

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 732.402

Data da Relatoria: 28/07/2014

Apresentação do Projeto:

O aleitamento materno está associado a benefícios de ordem nutricional, imunológica, afetiva, econômica e social. A maior parte das drogas lícitas e ilícitas consumidas pela lactante pode ser transferida para o leite, o que pode representar potenciais efeitos nocivos para a criança a curto e longo prazos. Embora o conhecimento a respeito de substâncias psicoativas durante a lactação venha sendo ampliado, ainda há poucas informações sobre os níveis de substâncias excretadas por essa via e muitas dúvidas sobre os efeitos destas substâncias em crianças durante o período de amamentação permanecem. O leite materno é uma matriz não convencional que pode ser usada para avaliar a exposição de crianças a substâncias químicas durante o aleitamento e sua principal vantagem é a coleta simples e não-invasiva. Contudo, a extração destas a partir do leite materno é um desafio analítico devido ao seu alto conteúdo lipídico e proteico, bem como sua alteração na composição durante o período pós-parto. No presente projeto, métodos analíticos serão desenvolvidos visando à detecção de substâncias psicoativas (cocaína, cocaetileno, norcocaína, tetraidrocannabinol, canabinol, canabidiol e nicotina) em amostras de leite materno, utilizando técnicas cromatográficas. Após o desenvolvimento e validação dos métodos, as análises serão aplicadas em amostras de leite coletadas no Hospital Dr. Arthur Ribeiro de Saboya. Com os resultados da incidência da presença dessas substâncias em leite e suas respectivas concentrações

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

ANEXO II

(PARTE 2)

Continuação do Parecer: 732.402

será possível avaliar o grau de risco que lactentes poderiam estar expostos ao serem amamentados.

Objetivo da Pesquisa:

Determinar a presença de substâncias psicoativas (cocaína, cocaetileno, norcocaína, tetraidrocannabinol, canabinol, canabidiol e nicotina) em amostras de leite materno coletadas de um hospital municipal de São Paulo, para avaliação do potencial em causar efeitos tóxicos ao lactente.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo o proponente, os riscos são mínimos, pois a coleta de leite realizado pela própria mãe não deverá trazer desconfortos. O volume de amostra necessário para a pesquisa também será pequeno (5 mL). Não haverá benefícios diretos às mães doadoras de amostra, nem às suas crianças, mas os novos exames laboratoriais desenvolvidos poderão colaborar no entendimento da quantidade de substâncias psicoativas que passam da mãe para o leite e se esses níveis poderiam ter algum efeito ou não em crianças amamentadas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo observacional sobre a presença de substâncias no leite materno. Não é um estudo multicêntrico. Não haverá envio de material biológico ao exterior. Mulheres com idades entre 18 e 40 anos que receberam trabalho de parto no Hospital Dr. Arthur Ribeiro de Saboya serão convidadas aproximadamente 24 horas após o nascimento da criança para participar da pesquisa. O questionário ASSIST adaptado (HENRIQUE et al. 2004) será aplicado com o objetivo de obter as seguintes informações: idade, padrão de uso de substâncias psicoativas durante e após gestação. Informações a respeito do lactente também serão obtidas: sexo, idade, peso, estatura e defeitos congênitos. Amostras de leite humano (n=100) serão coletadas pela própria lactente através de retirada manual, sendo acompanhada pela equipe de saúde sob responsabilidade da Dra. Ligia Veras Gimenez Fruchtengarten. Uma vez coletado da lactante (volume de cerca de 5 mL), o material será armazenado em frasco plástico sem conservante e encaminhado ao Laboratório de Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, onde será mantido sob refrigeração até análise. Após, as amostras deverão ser descartadas. Os frascos coletores e questionários serão identificados somente por números com o objetivo de preservar a

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

ANEXO II
(PARTE 3)

**FACULDADE DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO**

Continuação do Parecer: 732.402

confidencialidade da participante da pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE é claro e de fácil compreensão para sujeito da pesquisa. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Dr. Arthur Ribeiro de Saboya, que faz parte do Sistema Único de Saúde no município de São Paulo. É acompanhado de toda a documentação necessária.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sugiro aprovação do projeto.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Este CEP entende que o projeto pode ser aprovado.

SAO PAULO, 30 de Julho de 2014

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

ANEXO III

Prefeitura do Município de São Paulo
Secretaria Municipal da Saúde
Autarquia Hospitalar Municipal
Hospital Municipal Dr Arthur Ribeiro de Saboya

São Paulo, 21 de Maio de 2.014.

Ofício nº 012/CEM/HMARS-2014

Prezada Doutora,

A Comissão de Ética do Hospital entende que a pesquisa intitulada "Avaliação da exposição de crianças a substância psicoativas durante a lactação através da análise toxicológica em leite materno" proposta pelo pesquisador, Farmacêutico – Bioquímico Dr. Mauricio Yonamine, do Departamento de Análise Clínicas e Toxicológicas da USP e pesquisadores corresponsáveis Dra. Ligia Veras Gimenez Fruchtengarten e Dra. Carolina Diziole Rodrigues de Oliveira com a colaboração de Profissionais desse nosocômio, pode colaborar no manejo do aleitamento materno (exposição de crianças a substância psicoativas no leite materno). Cabe salientar a alta prevalência das intoxicações por drogas de abuso na nossa região.

A pesquisa é de risco baixo, pois a coleta de leite materno não implica em risco ao sujeito da pesquisa por se tratar de procedimento não invasivo.

Sendo assim essa Comissão considera relevante o desenvolvimento da pesquisa e de seu aceite.

Aproveito a oportunidade para renovar protestos de elevada e distinta consideração.

Dra. Mª de Lourdes J. Fernandes
Médica
CRM 45.900

Dra. Maria de Lourdes de Jesus Fernandes
Presidente
Comissão de Ética - HMARS

Ilustríssima Senhora
Dra Ligia Veras Gimenez Fruchtengarten
Coordenadora Clínica
Centro de Controle de Intoxicações
Hospital Municipal Dr. Arthur Ribeiro de Saboya

MLJF/acpls

Av. Francisco de Paula Quintanilha Ribeiro, 860 – Jabaquara
CEP 04330-020 – São Paulo/SP
Fone (11) 3394-8380

ANEXO IV (PUBLICAÇÃO)

Forensic Science International 265 (2016) 22–28

Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International

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

Development of a method for the determination of cocaine, cocaethylene and norcocaine in human breast milk using liquid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry

Gabriela de Oliveira Silveira^{a,*}, Íris Tikkanen Belitsky^a, Silvana Loddi^b,
Carolina Dizioli Rodrigues de Oliveira^b, Alexandre Dias Zucoloto^b,
Ligia Veras Gimenez Fruchtergarten^b, Mauricio Yonamine^a

^a Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Brazil

^b Poison Control Center of Sao Paulo, Hospital Dr. Arthur Ribeiro de Saboya, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Available online 15 January 2016

Keywords:
Breast milk
Liquid phase microextraction
Infant
Gas chromatography mass spectrometry
Cocaine

ABSTRACT

Most licit and illicit substances consumed by the nursing mother might be excreted in breast milk, which may cause potential short and long term harmful effects for the breastfed infant. The extraction of substances from this matrix represents an analytical challenge due to its high protein and fat content as well as the fact that its composition changes during postpartum period. The aim of the present study was to develop a liquid phase microextraction (LPME) method for detection of the active substances: cocaine (COC), cocaethylene (CE) and norcocaine (NCOC) in human breast milk using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Validation was performed working on spiked human breast milk samples. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were of 6 and 12 ng/mL, respectively, for all analytes. Calibration curves were linear over a concentration range of 12.0 ng/mL–1000 ng/mL ($r^2 = 0.99$). No interferences were noticed at the retention times of interest. Within-run and between-run precision was always less or equal to 15 as % relative standard deviation, and bias ranged from 3 to 18%. Forty six milk samples were analyzed. Only one sample was confirmed to be COC positive (138 ng/mL) and another one presented COC concentration near the LOD (6 ng/mL). This method has shown to be a reliable alternative for the determination of cocaine, cocaethylene and norcocaine in human breast milk in the fields of clinical and forensic toxicology. LPME extraction procedure demonstrated to be a rather promising, low cost and environmental-friendly technique for the purpose of this study.

© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Human breast milk is a highly complex biological fluid which contains proteins, lipids, carbohydrates, minerals and non-nutritive bioactive substances, such as immunological factors, that promote a healthy development to the infant [1–5]. Breast milk represents the normative standard for providing protective nutrients for the newborn [2,6]. In fact, exclusive human milk feeding for the first 6 months of life, with supplemented breastfeeding for 2 years of life or longer, is globally recommended by the World Health Organization [5,7,8].

Although there is no available data on the number of lactating women who uses illicit drugs, according to the 2013 National Survey on Drug Use and Health, 5.4% of the pregnant women aged 15–44 were current illicit drug users in the U.S. [9], many of whom might wish to breastfeed. Breastfeeding by a woman with a history of previous drug abuse is a matter of concern for the health care team as it is known that a percentage of the substance consumed by the mother might be excreted into the breast milk and cause potential harmful effects to the infant [10–15]. In a report, a 12-month-old infant showed chorea, inebriated walk, hyperactivity and irritability after being breastfed. Toxicological analysis resulted in the detection of benzoilecgonine (cocaine metabolite) in the infant's urine [16]. In a more severe case, a full term male infant was found dead on his 13th day of life. Breast milk analysis found a morphine concentration of at least 4 times higher (87 ng/mL) than the typical concentration after repeated maternal prescribed codeine use [17]. The transfer of drugs into breast

* Corresponding author at: Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, (Brazil), 580 Professor Lineu Prestes Avenue, Block 13B, Sao Paulo, Brazil. Tel.: +55 19983188977.

E-mail address: silveirago@usp.br (G.d.O. Silveira).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.forensiint.2016.01.007>

0379-0738/© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.