UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Desenvolvimento de métodos analíticos para a identificação de drogas facilitadoras de crime em amostras de urina

André Valle de Bairros

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Mauricio Yonamine

São Paulo
2014

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

Bairros, André Valle de
B163d Desenvolvimento de métodos analíticos para a identificação de drogas facilitadoras de crime em amostras de urina / André Valle de Bairros. -- São Paulo, 2014.
169p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Yonamine, Maurício

1. Toxicologia forense 2. Medicina legal 3. Droga de abuso : Medicina I. T. II. Yonamine, Mauricio, orientador.

615.9 CDD

André Valle de Bairros

Desenvolvimento de métodos analíticos para identificação de drogas facilitadoras de crime em amostras de urina

Versão original

Comissão Julgadora da Tese para obtenção de grau de Doutor

Prof. Dr. Mauricio Yonamine
orientador/presidente

_____
1°. examinador

_____
2°. examinador

_____
3°. examinador

_____
4°. examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2014.

"A melhor herança que um pai pode deixar ao filho ou o educador ao discípulo é a firmeza de aspirar triunfos e a capacidade de assimilar derrotas."

Moacir Daiuto

Dedicatória

À minha mulher, Liliana de Los Santos Moraes, cujo apoio incondicional em todos os momentos sem jamais perder a ternura permitiu a finalização deste trabalho. Sem você, teria sido impossível!

Ao meu filho, Lorenzo Moraes de Bairros, uma luz de vida que inundou meu coração com amor e me incentiva a cada dia a ser uma pessoa melhor.

Agradeço a vocês por todo amor, carinho, compreensão, esforços, paciência, sacrifícios e renúncias. Amo vocês!

Agradecimentos

Aos meus pais, Vera Bairros e Selsso Bairros, que sempre demonstraram que o caminho em busca do conhecimento é único e ilimitado.

A minha irmã, Jacqueline Bairros, por sempre me acolher e ajudar diversos momentos, assim como sua crença no meu potencial.

Ao meu orientador Mauricio Yonamine pelas oportunidades oferecidas, amizade e principalmente paciência. Sua liderança pelo exemplo, sabedoria e a forma de maximizar o potencial de seus alunos são inspiradores para mim. É indescritível a minha gratidão. Obrigado por tudo, Mestre.

Ao pessoal do Laboratório de Análises Toxicológicas (LAT-USP) com quem tive o prazer de conviver durante 3 anos e meio. Em especial, Angelo Balestrin, Beatriz Paranhos, Carolina Dizioli, Cinthia Mantovani, Flávia Roveri, Gabriela Silveira, Guilherme Okai, Lívia Sanches, Lorena Pantaleão, Luma Flaiban, Marcelo Filonzi, Rafael Menck e Sarah Werner. Sinto falta de nossas conversas e discussões no bloco 13B desde meu retorno ao RS em outubro de 2013. A participação de vocês foi fundamental para o meu amadurecimento profissional e principalmente pessoal!

Aos colegas de pós-graduação em Toxicologia e Análises Clínicas: Ana Shimada, Antônio Anax, Carine Drews, Eric Barioni, Fabiane Dörr, Fabyane dos Anjos, Felipe Dörr, Isabel Machado, José Santin, Juliano Bertinato, Larisa Torres, Mariah Ultramari, Natália Guimarães, Raphael Garcia, Stephen Rodrigues, Thaísa Meira e Vania Rodríguez do qual dividíamos nossos sonhos e frustações ao longo do corredor do bloco 13B. Em especial, a Tiago Franco, pelo auxílio em diversas atividades e amizade.

Aos professores e funcionários da Universidade de São Paulo, em especial aos docentes do programa de Pós-Graduação em Toxicologia, cujo repasse do conhecimento e amor pela Toxicologia aumentou ainda mais minha paixão por esta ciência fascinante.

Ao pessoal da república Solar dos Príncipes: André Ribeiro, Alex Kanno, Daniel Andreguetti, Daniel Kazahaya, Ênio Fernandes, Fabriciano Pinheiro, Helder Oliveira, Henrique Rofatto, João Pinto, Kadu Matos, Rafael Zanetti, Rodrigo Spricigo, Thiago Barcellos e Tiago Peixe pelo acolhimento logo em minha chegada a SP. Valeu galera!

Aos moradores do apartamento 42C do prédio Altos do Butantã: Aramys Reis, Clóvis Paniz, Fabrício Dalmas e Tomás Roberto. Foi excelente o momento em que vivemos juntos. Considero-os como parte de minha família.

À Universidade de São Paulo, a agência de fomento CNPq e FAPERGS pelas respectivas bolsas de doutorado e de técnico industrial para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Pelotas (UFPel) e a seus docentes, funcionários e alunos. Em especial aos professores Claudio Pereira de Pereira e Rogério Freitag, e aos colegas de laboratório Marco Santos e Marina Ritter, pela confiança em meu trabalho.

Ao pessoal de Uruguaiana e Pelotas: Adriano Mangini, Géli Barcellos, Douglas Araújo, Edgard Malaguez, Edimara Moraes, Estelita Vieira (*in memoriam*), Fernanda Mangini, Marcela Vega, Maurício Seifert e Roberta Schmitz por toda ajuda durante o período em que o doutorado foi realizado.

A todas as pessoas não citadas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

INTRODUÇAO GERAL..... 1

1. ASPECTOS GERAIS..... 1

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 3

2.1. Histórico e conceitos..... 3

2.2. Perfil comportamental das vítimas de DFC..... 4

2.3. Dados relativos a estupros, roubos e DFC..... 5

2.4. Aspectos analíticos envolvendo DFC..... 8

2.4.1. Matriz biológica..... 8

2.4.2. Metodologias analíticas para DFC..... 10

2.5. Tratamento da amostra biológica..... 12

2.5.1. Hidrólise..... 12

2.5.2. Técnica de extração de DFC em matrizes biológicas..... 13

2.5.2.1. Microextração em fase líquida (LPME)..... 14

2.5.3. Derivatização para cromatografia gasosa..... 19

3. OBJETIVOS..... 22

3.1. Objetivo geral..... 22

3.2. Objetivos específicos..... 22

4. MATERIAL..... 23

4.1. Equipamentos..... 23

4.2. Reagentes e soluções..... 23

4.3. Amostras..... 24

4.4. Métodos..... 24

4.4.1. Aplicação do questionário..... 24

4.4.2. Coleta das amostras..... 24

CAPÍTULO I..... 25

1. INTRODUÇÃO..... 25

2. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE KT, NK E DHNK EM AMOSTRAS DE URINA..... 26

2.1. Otimização da derivatização de cetamina, norcetamina e deidronorcetamina..... 27

2.2. Condições cromatográficas para análise de cetamina, norcetamina e deidronorcetamina por GC-MS..... 27

2.3. Otimização da LPME para cetamina, norcetamina e deidronorcetamina..... 27
2.4. Determinação de cetamina, norcetamina e deidronorcetamina para LPME..... 28
2.5. Validação do método para determinação de cetamina, norcetamina e deidronorcetamina por LPME..... 29
3. RESULTADOS..... 31
3.1. Otimização da derivatização de cetamina, norcetamina e deidronorcetamina..... 31
3.2. Otimização do método proposto para cetamina, norcetamina e deidronorcetamina..... 34
3.2.1. Fase doadora, fase aceptora, efeito *salting out*, solventes, óleos naturais, frequência e tempo de agitação..... 34
3.3. Validação do método para cetamina, norcetamina e deidronorcetamina por LPME 38
4. DISCUSSÃO..... 41
5. CONCLUSÕES..... 45
CAPÍTULO II..... 46
1. INTRODUÇÃO..... 46
2. DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇAO DE BENZODIAZEPÍNICOS E SEUS PRODUTOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO EM AMOSTRAS DE URINA..... 53
2.1. Condições cromatográficas para análise dos benzodiazepínicos e seus produtos de biotransformação por GC-MS..... 53
2.2. Otimização da derivatização dos benzodiazepínicos e seus produtos de biotransformação..... 53
2.3. Otimização da hidrólise enzimática..... 54
2.4. Otimização dos benzodiazepínicos para LPME..... 54
2.5. Determinação dos benzodiazepínicos e seus produtos de biotransformação para LPME 55
2.6. Validação do método para determinação de benzodiazepínicos e seus produtos de biotransformação por LPME..... 57
3. RESULTADOS..... 58
3.1. Otimização da derivatização dos benzodiazepínicos e seus produtos de biotransformação..... 58
3.1.1. Temperatura e tempo para derivatização com TFAA..... 58
3.1.2. Derivatização com MTBSTFA..... 60
3.2. Otimização da hidrólise enzimática dos benzodiazepínicos e seus produtos de biotransformação..... 67

3.2.1. Tempo e unidades de enzima β-glicuronidase..... 67
3.3. Otimização da LPME para benzodiazepínicos e seus produtos de biotransformação..... 67
3.3.1. Fase doadora, fase aceptora, solventes, combinação de solventes, efeito *salting out*, frequência e tempo de agitação..... 67
3.4. Validação do método para benzodiazepínicos e seus produtos de biotransformação..... 75
4. DISCUSSÃO..... 80
5. CONCLUSÃO..... 91
CAPÍTULO III..... 93
1. INTRODUÇÃO..... 93
2. DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE GHB EM AMOSTRAS DE URINA..... 97
2.1. Condições cromatográficas para análise de GHB por GC-MS..... 97
2.2. Otimização da derivatização do GHB..... 97
2.3. Otimização da extração líquido-líquido (LLE) para GHB..... 97
2.4. Determinação dos GHB para LLE..... 98
2.5. Validação de GHB para LLE em GC-MS..... 98
3. RESULTADOS..... 99
3.1. Otimização da temperatura e do tempo de derivatização do GHB..... 99
3.2. Otimização da LLE para GHB em amostra de urina..... 101
3.2.1. Otimização do solvente extrator, combinação de solventes, pH da matriz biológica, efeito *salting out* (%), frequência de agitação (rpm) e tempo de agitação (seg)..... 101
3.3. Validação do método para determinação de GHB em urina por LLE..... 104
4. DISCUSSÃO..... 106
5. CONCLUSÃO..... 109
CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 110
REFERÊNCIAS..... 112

FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1- R-O-glicuronideo; R-N-glicuronideo; R-S-glicuronideo 12

Figura 2 – Sistema bifásico da LPME e seus princípios de funcionamento..... 16

Figura 3 – Sistema trifásico da LPME e seus princípios de funcionamento..... 17

CAPÍTULO I

Figura 4 - Estrutura química da cetamina e sua biotransformação..... 26

Figura 5 – Etapas de extração de cetamina, norcetamina e deidronorcetamina por LPME..... 29

Figura 6 – Fragmentação de massas de cetamina, norcetamina e deidronorcetamina após derivatização com TFAA..... 33

Figura 7 – Cromatograma obtido através da análise de cetamina, norcetamina e deidronorcetamina em urina usando LPME..... 40

CAPÍTULO II

Figura 8 – Estrutura química dos 1,4-benzodiazepínicos, triazolobenzodiazepínicos e 1,5-benzodiazepínico..... 46

Figura 9 - Biotransformação do medazepam, diazepam, temazepam, clordiazepóxido, oxazepam e lorazepam..... 50

Figura 10 – Biotransformação do clonazepam, nitrazepam e bromazepam..... 51

Figura 11 – Biotransformação do flunitrazepam..... 52

Figura 12 – Etapas da extração dos benzodiazepínicos e produtos de biotransformação por LPME..... 57

Figura 13 - Fragmentação de massa dos aminobenzodiazepínicos após dupla derivatização com diferentes energias de ionização..... 61

Figura 14 – Fragmentação de massas dos benzodiazepínicos e seus produtos de biotransformação após derivatização com TFAA e MTBSTFA usando 70 eV..... 63

Figura 15 – Cromatograma obtido no modo SIM para benzodiazepínicos após LPME em amostras de urina..... 79

Figura 16 – Proposta para reação de MTBSTFA a partir de derivados de trifluoroacetamidas oriundos da primeira etapa de derivatização com TFAA..... 82

CAPÍTULO III

Figura 17 – Estrutura química do GHB e sua biotransformação..... 94

Figura 18 - GHB derivatizado com BSTFA e seu respectivo espectro de massas..... 101

Figura 19 - Cromatograma obtido através da análise de GHB em urina após LLE..... 106

TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 – Principais agentes sililantes..... 20

Tabela 2 – Principais agentes acilantes..... 21

Tabela 3 – Principais agentes derivatizantes e seus respectivos sítios de ação..... 21

CAPÍTULO I

Tabela 4 – Estudo da derivatização da cetamina, norcetamina e deidronorcetamina com TFAA..... 27

Tabela 5 – Íons qualificadores e quantificadores de cetamina, norcetamina e deidronorcetamina e seus respectivos padrões internos deuterados (*m/z*) obtidos após derivatização com TFAA..... 33

Tabela 6 – Parâmetros de confiança do método validado para determinação de cetamina, norcetamina e deidronorcetamina em amostras de urina..... 38

Tabela 7 – Determinação de cetamina, norcetamina e deidronorcetamina em urina de casos reais..... 40

Tabela 8 – Resumo das metodologias analíticas para determinação de cetamina, norcetamina e deidronorcetamina em urina..... 44

CAPÍTULO II

Tabela 9 – Valores de pKa e log P para benzodiazepínicos..... 49

Tabela 10 – Íons qualificadores e quantificadores dos benzodiazepínicos e de seus respectivos produtos de biotransformação (*m/z*) obtidos após derivatização com TFAA e MTBSTFA..... 63

Tabela 11 – Parâmetros de confiança do método validado para determinação de benzodiazepínicos e seus produtos de biotransformação em amostra de urina..... 77

Tabela 12 – Valores de benzodiazepínicos e seus produtos de biotransformação em amostras de casos reais..... 80

Tabela 13 – Resumo das técnicas miniaturizadas para determinação de benzodiazepínicos e seus produtos de biotransformação em amostras de urina..... 89

CAPÍTULO III

Tabela 14 - Resumo dos valores endógenos de GHB excretados em urina e os *cut offs* sugeridos..... 95

Tabela 15 - Parâmetros de confiança do método validado para a determinação de GHB em amostras de urina (sextuplicata para cada ponto)..... 104

GRÁFICOS

CAPÍTULO I

Gráfico 1 – Temperatura de incubação para derivatização de cetamina, norcetamina e deidronorcetamina com TFAA..... 32

Gráfico 2 – Tempo de incubação para derivatização de cetamina, norcetamina e deidronorcetamina com TFAA..... 32

Gráfico 3 – Fase doadora para cetamina, norcetamina e deidronorcetamina..... 35

Gráfico 4 – Fase aceptora para cetamina, norcetamina e deidronorcetamina..... 35

Gráfico 5 – Efeito *salting out* para cetamina, norcetamina e deidronorcetamina..... 36

Gráfico 6 – Solvente orgânico para cetamina, norcetamina e deidronorcetamina para LPME..... 36

Gráfico 7 – Óleo natural para cetamina, norcetamina e deidronorcetamina para LPME..... 37

Gráfico 8 – Frequência de agitação para cetamina, norcetamina e deidronorcetamina... 37

Gráfico 9 – Tempo de agitação para cetamina, norcetamina e deidronorcetamina..... 38

CAPÍTULO II

Gráfico 10 – Temperatura de reação do TFAA sobre benzodiazepínicos e produtos de biotransformação..... 59

Gráfico 11 – Tempo de reação do TFAA sobre benzodiazepínicos e produtos de biotransformação..... 59

Gráfico 12 - Estabilidade de 7-aminoclonazepam e 7-aminoflunitrazepam após dupla derivatização..... 62

Gráfico 13 – Tempo de hidrólise enzimática para oxazepam-glicuronídeo..... 66

Gráfico 14 – Fase doadora para benzodiazepínicos e produtos de biotransformação..... 68

Gráfico 15 – Fase aceptora para benzodiazepínicos e produtos de biotransformação.... 69

Gráfico 16 – Solvente orgânico para benzodiazepínicos e produtos de biotransformação..... 70

Gráfico 17 – Combinação entre éter dihexílico e 1-nonanol e suas diferentes proporções para benzodiazepínicos e produtos de biotransformação..... 71

Gráfico 18 – Efeito *salting out* para benzodiazepínicos e produtos de biotransformação. 72

Gráfico 19 – Frequência de agitação para benzodiazepínicos e produtos de biotransformação..... 73

Gráfico 20 – Tempo de agitação para benzodiazepínicos e produtos de

biotransformação..... 74

CAPÍTULO III

Gráfico 21 - Excreção urinária após uma dose de 50 mg/kg de GHB..... 96

Gráfico 22 – Temperatura de derivatização para GHB..... 100

Gráfico 23 – Tempo de derivatização para GHB..... 100

Gráfico 24 – Solvente extrator para GHB..... 101

Gráfico 25 – Combinação de solventes acetato de etila:acetonitrila para GHB..... 102

Gráfico 26 – pH da matriz biológica para GHB..... 102

Gráfico 27 – Efeito *salting out* para GHB..... 103

Gráfico 28 – Frequência de agitação para GHB..... 103

Gráfico 29 – Tempo de agitação para GHB..... 103

ANEXOS

ANEXO 1 – Manuscrito aceito no periódico científico internacional **Forensic Science International** intitulado "*Determination of ketamine, norketamine and dehydronorketamine in urine by hollow-fiber liquid-phase microextraction using an essential oil as supported liquid membrane*" publicado em abril de 2014.

ANEXO 2 – Manuscrito aceito no periódico científico internacional **Journal of Chromatography B** intitulado "*Determination of low levels of benzodiazepines and their metabolites in urine by hollow-fiber liquid-phase microextraction (LPME) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)*" com publicação para janeiro de 2015.

ANEXO 3 - Lista adaptada da SOFT e UNODC contendo os limites mínimos recomendados para detecção dos analitos alvos em amostras de urina.

ANEXO 4 – Parecer consubstanciado do projeto.

ANEXO 5 – Ficha do aluno.

GLOSSÁRIO

ADH	Álcool desidrogenase
ALDH	Aldeído desidrogenase
ANOVA	Análise de variância
AZ	Alprazolam
BSTFA	*N,O*-Bis-(trimetilsilil)trifluoroacetamida
BZ	Bromazepam
BZD	Benzodiazepínicos
KT	Cetamina
CDZ	Clordiazepóxido
CV%	Coeficiente de variação
CZ	Clonazepam
DFC	Droga facilitadora de crime
DHNK	Deidronorcetamina
DZ	Diazepam
EtG	Etilglicuronídeo
FID	Detector de ionização em chama
FZ	Flunitrazepam
GABA	Ácido gama aminobutírico
GC	Cromatografia gasosa
HF	Fibra oca
Hs	Horas
LB	Limite do branco
LC	Cromatografia líquida
LD	Limite de detecção
LLE	Extração líquido-líquido
Log P	Coeficiente de partição octanol/água
LPME	Microextração em fase líquida
LQ	Limite de quantificação
LZ	Lorazepam
Min	Minutos
MS	Espectrometria de massas
MZ	Medazepam

MIZ	Midazolam
MTBSTFA	*N*-metil-*N*-(*t*-butildimetilsilil)trifluoroacetamida
7-NHCZ	7-aminoclonazepam
7-NHFZ	7-aminoflunitrazepam
NMDA	N-metil-D-aspartato
NPD	Detector de nitrogênio-fósforo
NZ	Nitrazepam
NK	Norcetamina
ND	Nordiazepam
OXZ	Oxazepam
PCP	Fenciclidina
PI	Padrão interno
pKa	Constante de acidez
RSD	Desvio padrão relativo
RPM	Rotação por minuto
Seg	Segundos
SIM	Monitoramento seletivo de íons
SOFT	Sociedade de Toxicologistas Forenses
SPE	Extração em fase sólida
SPME	Microextração em fase sólida
TFAA	Ácido trifluoroacético anidrido
TZ	Temazepam
UNODC	Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crimes

RESUMO

BAIRROS, A.V. **Desenvolvimento de métodos analíticos para a identificação de drogas facilitadoras de crime em amostras de urina**. 2014. (Tese de Doutorado). Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2014.

As drogas facilitadoras de crime (DFC) são uma série de substâncias químicas que permitem o ato sexual e/ou roubo com pouca ou nenhuma resistência da vítima. Benzodiazepínicos, gama-hidroxibutirato (GHB), cetamina e etanol são clássicas DFC, porém outras substâncias também têm sido utilizadas. Devido às diferentes classes de DFC e a necessidade de métodos sensíveis, a determinação dessas substâncias é um desafio aos toxicologistas forenses. A proposta do estudo foi desenvolver métodos analíticos para determinação principais analitos alvos de DFC para benzodiazepínicos, cetamina e GHB em amostras de urina. Esta matriz biológica é considerada uma amostra não-invasiva e apresenta um período de detecção maior que o sangue. A preparação das amostras foi avaliada através de microextração em fase líquida (LPME) e extração líquido-líquido (LLE). A LPME é uma técnica de extração de drogas que utiliza menor quantidade de solventes orgânicos, maior praticidade e possibilidade de obtenção de altos valores de recuperação. Os analitos foram determinados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). A LPME validada para benzodiazepínicos e seus produtos de biotransformação exigiu uma combinação de solventes e dupla derivatização para atingir a sensibilidade exigida, enquanto o método para determinação de cetamina, norcetamina e deidronorcetamina utilizou óleo essencial de eucalipto como meio extrator, caracterizando-se um procedimento ecologicamente correto com alta sensibilidade. A extração de GHB foi efetiva por LLE com redução da quantidade de solvente e tempo de análise sem o prejuízo na sensibilidade. Em geral, os métodos desenvolvidos neste trabalho são sensíveis e confiáveis para todos os analitos relatados e conclui-se que a LPME é uma técnica de preparo de amostra eficiente, versátil de baixo custo. Estas condições permitem que sua implementação em qualquer laboratório de análises toxicológicas, podendo ser aplicada em situações de DFC ou de qualquer outra natureza.

Palavras-chaves: Droga facilitadora de crime. Microextração em fase líquida. Cromatografia gasosa. Espectrometria de massas. Urina.

ABSTRACT

BAIRROS, A. V. **Developing analytical methods for identification of drug-facilitated crime in urine samples**. 2014. (Tese de Doutorado). Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2014.

Drug-facilitated crime (DFC) are a series of chemicals that allow the sexual act and/or theft with little or no resistance from the victim. Benzodiazepines, gamma-hydroxybutyrate (GHB) and ketamine and ethanol are considered classic DFC, however other substances were also used as the DFC. Due to the different classes of DFC and the need for sensitive methods, the determination of these substances is a challenge to forensic toxicologists. The purpose of this study was to develop analytical methods for determination of the main target analytes of DFC for benzodiazepines, ketamine and GHB in urine samples. This biological matrix is considered a non-invasive sample and shows a larger window of detection than blood. Sample preparation was assessed using liquid phase microextraction (LPME) and liquid-liquid extraction (LLE). The LPME is a drug extraction technique that uses less organic solvents, greater practicality and possibility of obtaining high recovery values. The analytes were determined by gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS). The validated LPME technique for benzodiazepines and their metabolites required a combination of solvents and double derivatization to achieve the required sensitivity, while the ketamine, norketamine and dehydronorketamine method used essential oil of eucalyptus as solvent, characterizing a green chemistry approach with high sensitivity. The extraction of GHB was effective by LLE with a reduced amount of solvent and the analysis time without loss in sensitivity. In general, the methods developed in this work using GC-MS are sensitive and reliable for all analytes reported and LPME technique showed to be an efficient sample preparation, versatile and low cost. These conditions allow LPME implementation in any laboratory of toxicological analysis and it can be applied in situations of DFC or any other kind of analysis.

Keywords: Drug-facilitated crime. Liquid phase microextraction. Gas chromatography. Mass spectrometry. Urine.

APRESENTAÇÃO DA TESE

A presente tese descreve estudos sobre o desenvolvimento de métodos de identificação de drogas facilitadoras de crime como cetamina, benzodiazepínicos, gama-hidroxibutirato e seus respectivos produtos de biotransformação em amostras de urina através da análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.

Com o objetivo de melhor visualização do trabalho, optou-se pela divisão em três capítulos que representam cada grupo de droga facilitadora de crime e seus respectivos analitos alvos. Os capítulos são precedidos por uma introdução geral no intuito de contextualizar o assunto e demonstrar os objetivos. Posteriormente, cada capítulo é apresentado da seguinte maneira: 1. Introdução; 2. Desenvolvimento do método; 3. Resultados; 4. Discussão; 5. Conclusão.

Assim, o primeiro capítulo descreve a cetamina, norcetamina e deidronorcetamina e os passos realizados para o desenvolvimento de um método de microextração em fase líquida com alta sensibilidade e ecologicamente correto. O segundo capítulo relata a utilização da microextração em fase líquida de medazepam, diazepam, nordiazepam, clordiazepóxido, oxazepam, lorazepam, nitrazepam, flunitrazepam, 7-aminoflunitrazepam, clonazepam e 7-aminoclonazepam com uma combinação de solventes e uma dupla derivatização para assegurar os valores de corte da maioria dos analitos já previamente estabelecidos por órgãos e sociedades de toxicologia forense. O terceiro capítulo narra o rápido procedimento de uma extração líquido-líquido para gama-hidroxibutirato que foi desenvolvido neste trabalho.

Considerações finais encerram a apresentação da tese.

INTRODUÇÃO GERAL

1. ASPECTOS GERAIS

A utilização de substâncias psicoativas para obtenção de algum bem e/ou benefício de natureza humana sem consentimento e/ou resistência da vítima é descrito desde tempos remotos (AGGRAWAL, 2009). Elas já foram conhecidas como *date rape drugs* ou drogas facilitadoras de abuso sexual, mas recentemente a nomenclatura droga facilitadora de crime (DFC) tem sido mais utilizada (SHBAIR & LHERMITTE, 2010; UNODC, 2012). No Brasil, a utilização de recursos químicos para cometer algum delito é conhecida popularmente como o golpe "Boa Noite, Cinderela".

Não há uma legislação específica no Código Penal Brasileiro para situações que envolvem o uso de DFC, mas este crime pode ser enquadrado como roubo pelo artigo 157 e/ou estupro pelo artigo 213 conforme o caso (BRASIL, 2009a; BRASIL, 2009b). Em relação à vítima, as lesões causadas pelas DFC são consideradas graves, podendo ser de origem psicológica e física, como traumas e até intoxicações (LEBEAU & MOZAYANI, 2001; MARC, 2008). Isto se deve a dose e droga administrada, pois a gama de substâncias que podem promover a submissão química de um índividuo é imensa com diferentes classes de compostos que podem levar a sedação (HURLEY *et al.*, 2006; KINTZ, 2007; SHBAIR & LHERMITTE, 2010; UNODC, 2012). Entre as drogas consideradas DFC, as principais são os benzodiazepínicos, a cetamina, o gama-hidroxibutirato (GHB) e o etanol.

Os benzodiazepínicos são medicamentos ansiolíticos utilizados como sedativos, hipnóticos, relaxantes musculares e apresentam atividade anticonvulsivante e estão entre os mais consumidos do mundo (ALMEIDA & LIMA, 2008). Nesta classe de fármaco, destaca-se o flunitrazepam (Rohypnol®), considerado uma clássica DFC devido ao seu rápido início de ação e longo tempo de sedação (PAPADODIMA *et al.*, 2007). No fim dos anos 90, a cetamina foi considerada uma tradicional DFC. Trata-se de um analgésico e anestésico dissociativo que pode ser administrado via intramuscular, intravenosa, intranasal, oral e retal (LEBEAU & MOZAYANI, 2001). Apesar de esta substância estar enquadrada na lista de controle especial no Brasil (ANVISA, 2011), é possível obter ilicitamente esta droga, o que garantiria a perpetuação do golpe "Boa noite Cinderela" com este composto. Estas características também estão associadas ao GHB e entre seus principais aspectos estão à rapidez de seus efeitos farmacológicos após ingestão oral e sua alta velocidade de excreção

em compostos endógenos (HALLER *et al.*, 2006; ANDRESEN *et al.*, 2008). A rápida eliminação também é peculiar ao etanol, considerada uma DFC quando ingerida isoladamente. Ela também potencializa os efeitos sedativos das demais drogas. Durante sua biotransformação, uma pequena fração desta substância sofre reação de fase II formando etilglicuronídeo, um típico biomarcador do consumo de etanol com uma janela maior de detecção (LEBEAU & MOZAYANI, 2001; SARKOLA *et al*., 2003).

No Brasil e em vários países do mundo não há dados referentes a eventos que envolvam DFC, o que é um fato preocupante. Isto se deve ao sentimento de vergonha que padece sobre a vítima, a capacidade da substância em promover amnésia, os baixos níveis que uma droga e seus produtos de biotransformação são excretados na urina, o deficiente registro de casos em órgãos públicos de segurança e métodos analíticos com baixa sensibilidade utilizados em situações suspeitas do envolvimento de DFC (PAPADODIMA *et al.*, 2007; UNODC, 2012). Diante das adversidades impostas por este tipo de crime, o Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crimes (UNODC) lançou um guia com diversas diretrizes visando identificação das principais DFC e seus limites máximos recomendados para detecção para amostras de urina (UNODC, 2012).

A urina é uma amostra biológica que pode ser coletada de forma não invasiva na qual a maioria os fármacos e/ou produtos de biotransformação são geralmente excretados em altas concentrações. Além disso, a urina possibilita um período relativamente longo de detecção. A urina é considerada a matriz biológica de escolha para análises em vítimas de estupro e/ou roubo com suspeita do uso de DFC (LEBEAU & MOZAYANI, 2001; UNODC, 2012). Em relação às técnicas analíticas utilizadas na determinação de DFC, a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) e a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) são as ferramentas de análise utilizadas pelos laboratórios forenses como referência para confirmação de DFC devido à seletividade e sensibilidade (LEBEAU & MOZAYANI, 2001; BETCHEL & HOLSTEGE, 2007; ADAMOWICZ & KALA, 2010; UNODC, 2012).

Apesar da capacidade de detecção do GC-MS e LC-MS, resultados negativos não eliminam a possibilidade da administração de uma DFC em um caso suspeito. Além disso, as vítimas de DFC sofrem danos físicos e psicológicos que podem ser irreparáveis na vida deste indivíduo (HEINSE *et al.*, 1994). Devido à alta incidência e consequências biopsicossociais deste crime, este delito adquiriu as proporções de um problema de saúde pública (DREZZETT *et al.*, 1999; CAMPBELL *et al.*, 2004). Diante dos fatores apresentados, as DFC são um desafio para um toxicologista forense, o que promove a necessidade de estudos deste

caráter para a determinação do(s) analito(s) de interesse. Os trabalhos relatados para extração destas substâncias em uma matriz biológica necessitam de grandes quantidades de solventes e/ou de múltiplas etapas. Por isso, novas técnicas extrativas estão sendo desenvolvidas, entre elas a LPME, que apresenta um alto potencial de extração de um analito utilizando pouco volume de solvente (PEDERSEN-BJERGAARD & RASMUSSEN, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2008). Entretanto, há poucas referências para este tipo de extração em relação às drogas que serão estudadas.

A proposta deste estudo foi desenvolver e validar métodos analíticos capazes de determinar benzodiazepínicos, cetamina, gama-hidroxibutirato em amostras de urina, tendo como foco principal a detecção dos principais fármacos e seus produtos de biotransformação de importância forense. Os analitos foram analisados por GC-MS e as metodologias validadas conforme os protocolos internacionais (UNODC, 2009).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Histórico e conceitos

A utilização de substâncias psicoativas para obtenção de algum bem e/ou benefício de natureza humana sem consentimento e/ou resistência da vítima é descrito desde tempos remotos. Em uma passagem da Bíblia, após a destruição de Sodoma e Gomorra, a mulher de Ló é transformada em estátua de sal e ele fica somente com as duas filhas. Diante disso, as filhas de Ló decidem ter relações sexuais com o seu próprio pai para manter a linhagem da família. Para isso, elas incentivam que seu pai ingerisse vinho à noite até ficar bêbado e assim realizavam o ato sexual com ele (AGGRAWAL, 2009).

Compostos psicoativos que facilitam relações sexuais têm sido denominados droga de estupro ou droga facilitadora de abuso sexual (*rape drug, date rape drug* ou *drug-facilitated sexual assault*), onde a vítima é sujeita a atos sexuais não consensuais enquanto está incapacitada ou inconsciente devido ao efeito de álcool e/ou drogas (LEBEAU & MOZAYANI, 2001). Quando um indivíduo é vítima de roubo sob ação de algum agente químico, a nomenclatura geralmente utilizada nestas situações é droga facilitadora de roubo (*drug-facilitated robbery*) (SENOL *et al*., 2009).

Ao longo dos anos, verificou-se que essas drogas tinham várias finalidades criminais além do ato sexual, e o termo droga facilitadora de crime (DFC) começou a ser utilizado com maior frequência em artigos científicos a partir de meados dos anos 2000 (VILLAIN *et al*, 2004; CONCHEIRO *et al*., 2005; KINTZ, 2007; SHBAIR & LHERMITTE, 2010). Esta nomenclatura é recente, porém mais abrangente do que as denominações anteriores. Neste

sentido, as DFC são definidas como uma série de substâncias químicas que são administradas de forma voluntária ou involuntária à vítima, permitindo o estupro ou qualquer outro ato sexual, roubo, extorsão de dinheiro, bem como maus tratos a crianças ou idosos ou qualquer outro delito com pouca ou nenhuma resistência e sem o consentimento do indivíduo (UNODC, 2012; SHBAIR & LHERMITTE, 2010).

Estas substâncias são capazes de causar uma série de sintomas como sedação, relaxamento muscular, confusão, tonturas, problemas de julgamento, amnésia anterógrada, perda da consciência, inibição reduzida, náuseas, hipotensão e bradicardia (MARC, 2008). Em altas doses, consumida isoladamente ou misturada com outros compostos com propriedades depressivas, podem acarretar em depressão respiratória e até a morte (HALL & MOORE, 2008). No Brasil, este tipo de delinquência é popularmente conhecido como o golpe "Boa Noite, Cinderela". Os motivos para este dito popular são desconhecidos, mas basicamente tem por finalidade deixar a vítima incapacitada de reação, permitindo ao criminoso agir sem a interferência da vítima. Apesar dos danos que as DFC podem causar, não há leis específicas para crimes desta natureza no Brasil.

Neste caso, o meliante pode ser enquadrado no crime de roubo (artigo 157) caracterizado como a subtração de coisa móvel alheia mediante qualquer meio, reduzindo a possibilidade de resistência conforme artigo 157 (BRASIL, 2009a) ou indiciado por estupro em situações de conjunção carnal não consensual imposta por meio de violência, grave ameaça ou contra pessoas incapazes de consentir o sexo (artigo 213) (BRASIL 2009b). Porém, o uso de DFC não é um agravante na punição no Brasil, enquanto outros países (Itália, Alemanha, Reino Unido, alguns estados dos Estados Unidos, Nova Zelândia e México) apresentam legislações específicas perante crimes sob influência de substâncias psicoativas (DORANDEU *et al*,. 2006; MADEA & MUβHOFF, 2009; PAPADODIMA *et al*., 2007).

2.2. Perfil comportamental da vítima de DFC

O comportamento de uma vítima de DFC é descrito de duas diferentes maneiras conforme os efeitos da substância psicoativa. Alguns indivíduos perdem completamente a consciência e não se lembram de nada sobre o ocorrido (*mind rape*), enquanto outros apresentam inconsciência intermitente, como se fosse *flashbacks*, o que os possibilita descrever o delito e até o suposto agressor. Nas situações em que ocorre amnésia anterógrada, a vítima pode desabilitar a memória do trauma sofrido devido à ação da DFC (LEBEAU & MOZAYANI, 2001). Entretanto, o fato de não recordar do abuso sexual é assustador e de

difícil aceitação para a vítima, o que dificulta a reconstrução psicológica após esse trauma (MARC, 2008).

As vítimas de DFC descrevem seus traumas como um “duplo crime”, pois a pessoa que promove a sedação da vítima pode não ser a mesma que cometerá o estupro e/ou roubo, indicando que este é um delito que pode ser praticado por mais de uma pessoa (LEBEAU & MOZAYANI, 2001). As consequências deste delito podem levar a vítima a problemas ligados a sua autoimagem. Os resultados de um abuso sexual sob efeito de drogas em curto prazo é caracterizada por pesadelos, distúrbios do sono, medo, preocupação, angústia e dificuldade de envolvimento social. As sequelas em longo prazo surgem meses após o ataque, e incluem ansiedade, depressão profunda, agressividade e raiva. Pode ocorrer perda de autocontrole com frequente dependência a álcool e outras substâncias psicoativas, além de dificuldades comportamentais e sexuais (MARC, 2008).

Os profissionais de saúde têm enfrentado dificuldades em realizar os primeiros socorros e posterior tratamento para essas vítimas. Em muitos casos, confundem um típico caso de DFC com uma situação de intoxicação, seja acidental ou suicida. Consequentemente, a coleta de provas forenses fica prejudicada perante essa circunstância (JUHASCIK *et al*., 2004). As mulheres são as maiores vítimas do abuso sexual e estão expostas a diferentes riscos que podem comprometer sua saúde física e mental. Os traumas físicos podem variar de pequenos hematomas até lesões graves que podem resultar na morte da vítima, além da possibilidade de desenvolver doenças sexualmente transmissíveis (DSTs) e uma gravidez indesejada (CHOEN & MATSUDA, 1991; GOSTIN *et al*., 1994; CAMPOS & SCHOR, 2008). A gravidez é encarada como uma segunda violência, intolerável para a maioria das mulheres (DREZZETT *et al*., 1999). De acordo com um estudo realizado por Heinse e colaboradores (1994), os danos provocados por este delito causam enormes impactos na saúde da vítima, do qual é estimada uma perda de 9,5 anos saudáveis na vida deste indivíduo.

2.3. Dados relativos a estupros, roubos e DFC

Em 2006, o Brasil registrou respectivamente 15268 e 942036 casos de estupro e roubo, que correspondem a uma taxa de 16,33 e 511,50 casos para 100.000 habitantes (MINISTÉRIO DA JUSTIÇA, 2007). Em 2008, o estado de São Paulo foi responsável por 3387 casos de estupro (SECRETARIA DE SEGURANÇA PÚBLICA DO ESTADO DE SP, 2009). Entretanto, os dados referentes aos crimes sexuais no Brasil não são fidedignos. Estima-se que apenas 10 a 20% dos casos sejam registrado nas delegacias e institutos

médicos-legais (DREZZETT *et al.*, 1999; VIANNA *et al.*, 2006). Cerca de 23% destes delitos foram notificados para as autoridades responsáveis em 2011 (IPEA, 2014).

Isto se deve ao constrangimento e ao receio da falta de compreensão ou interpretação dúbia do parceiro, familiares, colegas, vizinhos e autoridades que não permitem o registro de queixa nos órgãos de defesa público. Existe um temor em relação ao interrogatório policial, o atendimento no Instituto Médico Legal (IML), a divulgação de sua imagem na imprensa e a ameaça de vingança do agressor, caso revelem o ocorrido (DREZZETT *et al.*, 1999; VIANNA *et al.*, 2006). As vítimas que foram roubadas sob efeito de substância psicoativa ainda demonstram dificuldades em prestar queixa às autoridades, por motivos semelhantes aos que ocorre em casos de estupro (BEATO *et al.*, 2004).

No Brasil, os dados relacionados ao uso de DFC para efetuar o abuso sexual ou qualquer outro delito não são relatados de forma específica pelo Serviço Nacional de Segurança Pública (SENASP) ou por qualquer outro órgão do Estado. Isto é um fato preocupante, pois dificulta a ação de profissionais da área da segurança pública na busca de respostas perante este crime, o que facilita a perpetuação desta ação criminosa. Em outros países, entidades governamentais e laboratórios forenses já realizam estatísticas específicas sobre esses casos, identificando o(s) agente(s) e sua proporção no referido delito.

O etanol é a DFC que está presente na maioria dos casos, seja de forma isolada ou concomitante com outras substâncias psicoativas conforme órgãos de segurança pública e artigos científicos (LEBEU & MOZAYANY, 2001). Os casos do uso de álcool que participaram em situações de estupro e/ou roubo variam muito, entre a 30-81% (SCOTT-HAM & BURTON, 2005; BECHTEL & HOLSTEGE, 2007; MADEA & MUβHOFF, 2009). A presença de etanol não é surpresa em situações de submissão química de um indivíduo, mas um estudo britânico revelou que mais de 60% dos casos apresentavam níveis maiores que 150 mg/dL (SCOTT-HAM & BURTON, 2006). Por se tratar de uma droga lícita, muitas vezes a mensuração de etanol e/ou etilglicuronídeo (analito alvo para esta substância) não se faz necessária, tendo em vista que a vítima frequentemente admite a administração de bebidas alcoólicas no local/momento do crime.

Em virtude da alta comercialização e de fácil obtenção dos benzodiazepínicos (BZD), estes fármacos têm sido utilizados como DFC em vários países (CHÈZE *et al.*, 2004; LEBEAU & MOZAYANI, 2001; DJEZZAR *et al.*, 2009). Na Inglaterra, o diazepam é a mais prevalente (SCOTT-HAM & BURTON, 2005). Na França, o clonazepam e o bromazepam estão envolvidos respectivamente em 17% e 11% dos casos positivos em casos de violência sexual (MARC, 2008), enquanto Djezzar e colaboradores (2009) identificaram flunitrazepam

em 7% das vítimas em um período de 2003 a 2007. Em um estudo norte-americano, este fármaco esteve presente em 3% dos casos durante um período de 26 meses (DORANDEU *et al*., 2006).

Dorandeu e colaboradores (2006) verificaram que 3% dos casos de violência sexual foram positivos para GHB. No Canadá, em um grupo de 184 pessoas, 1,1% das vítimas apresentou resultado positivo para esta droga (DU MONT *et al*., 2010). Embora os números europeus sejam semelhantes ao estudo americano, há sinais de alto consumo desta droga em determinados lugares da Europa, o que pode elevar de 3% para até 19% de casos positivos (ANDRESEN, 2008).

Apesar do uso ilícito de cetamina ter se tornado um fenômeno mundial e esse consumo varia de região para região e sua prevalência é inestimada (LI *et al*., 2011). No Brasil, o primeiro registro de apreensão ilegal ocorreu em 2004 (QUESADA *et al*, 2009). Na China, foi verificada uma alta proporção do impulso e/ou violência sexual (45,8%) devido ao uso deste fármaco (LI *et al*., 2011). Em relação ao seu uso para submissão química de um indivíduo, o número de vítimas desta droga está em torno de 2 a 3% (SCOTT-HAM & BURTON, 2005; DJEZZAR *et al.*, 2009; DU MONT *et al*., 2010).

Outras classes de medicamentos estão associadas ao estupro e/ou roubo como os anticolinérgicos, hipnóticos não-benzodiazepínicos e anti-histamínicos devido a sua capacidade de promover a submissão de um indivíduo. Neste aspecto, destaca-se zolpidem (hipnóticos não-benzodiazepínicos), a segunda DFC mais utilizada em situações de violência sexual com 15,5% dos casos conforme um estudo de 4 anos realizado pela França, apenas sendo ultrapassado pelo clonazepam (DJEZZAR *et al*., 2009). Entretanto, Bosman e colaboradores (2011) identificaram zolpidem em apenas 1% dos casos na Holanda. Apesar de não serem caracterizadas como típicas DFC, drogas ilícitas como maconha, cocaína e ecstasy podem estar presentes neste tipo de situação devido à diminuição da inibição da vítima e/ou da capacidade de raciocínio prejudicada (LEBEAU & MOZAYANY, 2001; BECHTEL & HOLSTEGE, 2007; HALL & MOORE, 2008; DU MONT *et al*., BOSMAN *et al.*, 2011; UNODC, 2012; SOFT, 2014).

Chama a atenção que na literatura há relatos do envolvimento de outras substâncias psicoativas que podem promover a submissão de um indivíduo como o uso de solventes aromáticos ou clorofórmio (GAILLARD *et al*., 2006; MARTÍNEZ & BALLESTEROS, 2006), ranitidina (CELINSKI *et al*., 2010), acepromazina (GAULIER *et al*., 2008), tetrahidrozolina (SPILLER *et al*., 2007) até sildenafil (Viagra®) devido a sua popularização como afrodisíaco (KINTZ *et al*., 2009).

Diante dessa amplitude de alternativas químicas, em 1998 um comitê internacional de DFC foi formado e em 2005, o Comitê de Drogas Facilitadoras de Abuso Sexual (DFAS) pertencente à Sociedade de Toxicologistas Forenses (SOFT) lançou um guia intitulado "Limites máximos recomendados para detecção de DFAS e metabólitos em amostras de urina". Contudo recomenda-se que cada laboratório selecione as drogas que são mais comumente utilizadas para estes fins em sua região/país (NEGRUSZ & GAENSSLEN, 2008; UNODC, 2012; SOFT, 2014).

Apesar dos esforços de entidades governamentais, laboratórios forenses e instituições de pesquisa para a coleta e divulgação de dados referentes à DFC, a real prevalência deste tipo de crime é desconhecida. O impacto que essas substâncias provocam no sistema nervoso central afeta a memória e/ou consciência e assim diminui o número de casos reportados para as autoridades se comparado a um crime sem a submissão química. Além disso, outros fatores dificultam as investigações que envolvem DFC como:

- Falta de comunicação entre os investigadores, profissionais de saúde, laboratórios e a promotoria.
- Atraso na notificação do incidente e da coleta de evidências.
- Ampla gama de substâncias que podem ser utilizadas para cometer o delito.
- Rápida eliminação de algumas drogas e seus respectivos produtos de biotransformação.
- Falta de laboratórios devidamente equipados com metodologias analíticas validadas.
- Não existência de um protocolo padrão internacional para facilitar a detecção e identificação de DFC, assim como não há um sistema uniforme definido para a coleta de dados estatísticos para DFC (LEBEAU & MOZAYANY, 2001; PAPADODIMA *et al.*, 2007; UNODC, 2012).

Diante dessas adversidades, a UNODC lançou um guia completo para DFC visando padronizar a identificação de DFC, abordando as principais drogas, seus limites máximos recomendados para detecção, preparação de amostras biológicas e instrumentação analítica para determinação dos princípios ativos e seus respectivos produtos de biotransformação (UNODC, 2012).

2.4. Aspectos analíticos envolvendo DFC

2.4.1. Matriz biológica

Diferentes técnicas podem ser utilizadas conforme a amostra disponível (urina, sangue, cabelo, saliva, vômitos, resíduos da cena do crime e roupas). As matrizes biológicas devem ser recolhidas idealmente antes que qualquer medicação seja administrada à vítima, mas se isso não for possível, todos esses medicamentos devem ser documentados. O material

coletado deve ser devidamente rotulado com a data e hora da coleta e as iniciais do coletor, selados e armazenados de forma segura (JUHASCIK *et al*., 2004). Embora cada caso tenha sua própria história e peculiaridades que podem justificar o uso de uma matriz em relação à outra, a urina é geralmente o espécime de escolha para um exame toxicológico para a investigação de DFC (JUHASCIK *et al*., 2004; UNODC, 2012).

A urina é a uma amostra biológica não invasiva e de fácil coleta, considerada a matriz biológica de escolha para análises em vítimas de estupro e/ou roubo com suspeita do uso de DFC. A maioria dos fármacos e produtos de biotransformação é excretada em altas concentrações na urina se comparado ao sangue, além de ser possível detectar a presença de xenobióticos por um período relativamente longo de tempo. Recomenda-se a coleta de 50 mL de urina sem a necessidade de adicionar conservantes, apenas mantendo-a sob refrigeração o mais rápido possível. Quanto mais cedo a amostra é obtida após o alegado evento, maior a chance de detectar a(s) substância(s) que são rapidamente eliminada do corpo (LEBEAU & MOZAYANI, 2001; UNODC, 2012).

A identificação positiva na urina é normalmente prova suficiente de que a vítima foi exposta a uma droga dentro de um período de um a cinco dias anteriores a coleta da amostra. Tem sido sugerido que 96 horas (pós-ingestão) seria o tempo máximo hábil para detecção de uma DFC e/ou produto de biotransformação (LEBEAU & MOZAYANI, 2001; UNODC, 2012). Entretanto, etanol e GHB apresentam uma curta janela de detecção para esta matriz. A determinação destas DFC deve ser realizada antes do prazo limite sugerido (SARKOLA *et al*., 2003; HALLER *et al*., 2006).

Recomenda-se armazenar a urina entre 2 a 8°C durante as primeiras 24 horas após a coleta da amostra. Caso não seja possível realizar a análise neste período, é aconselhável estocar essa matriz biológica em um freezer (-18°C) por até 12 meses (UNODC, 2012). Cada substância apresenta um período de detecção e conforme a dose administrada, o período de identificação do(s) composto(s) pode ser estendido (LEBEAU & MOZAYANI, 2001; PAPADODIMA *et al.*, 2007). A prática de correlacionar a concentração urinária a partir do momento da coleta com a dose e os efeitos da droga no tempo de exposição é desencorajado. Desta forma, qualquer composto identificado na urina deve ser procurado no sangue, se a amostra adequada estiver disponível (UNODC, 2012).

O sangue deve ser recolhido concomitantemente à urina, de preferência dentro de 48 horas do alegado incidente em virtude do tempo de meia vida de algumas drogas e produtos de biotransformação nesta matriz. Pelo menos duas amostras de 5 mL devem ser coletadas em tubos de sangue contendo fluoreto de sódio (NaF) ou oxalato de potássio (concentrações

recomendadas para NaF 2,5 g/L, e oxalato de potássio 2 g/L) para evitar a degradação e coagulação. As amostras sanguíneas devem ser refrigeradas (2-8°C) assim que possível e caso não for possível conduzir a análise dentro de 24 horas, é aconselhável preservar a amostra em um congelador (-18°C) após separação do plasma (LEBEAU & MOZAYANI, 2001; UNODC, 2012). A determinação de DFC no sangue pode ser usada para predizer e correlacionar os sintomas descritos pela vítima (NEGRUSZ & GAENSSLEN, 2008; UNODC, 2012). Entretanto, a amnésia anterógrada e/ou perda de consciência pode resultar em dificuldade para precisamente estimar o tempo do incidente suspeito. Outro aspecto é a pequeno período de detecção de uma suposta DFC nesta matriz, diminuindo a possibilidade de identificação do analito(s) no sangue (ELSOHLY & FENG, 2001; UNODC, 2012).

Nos casos de notificação tardia do suposto crime, o cabelo é a matriz de escolha (SCOTT, 2009). Isto é possível devido à capacidade de incorporação capilar de determinadas DFC e um substancial progresso de metodologias analíticas para benzodiazepínicos, GHB e outras substâncias de interesse forense em cabelo (NEGRUSZ & GAENSSLEN, 2008; LENDOIRO *et al*., 2012; PAUL *et al*., 2011). A amostra deve ser recolhida pelo menos quatro semanas após o delito, pois a velocidade média de crescimento de cabelo da cabeça é de 1,0 $\pm$ 0,2 centímetros por mês, podendo ocorrer variações (0,6 cm a 2 cm por mês). Para análise capilar de DFC, duas amostras de cabelo (espessurade um lápis) devem ser cortadas o mais próximo possível do couro cabeludo e armazenadas a temperatura ambiente na ausência de umidade e protegido da luz (UNODC, 2012). Em casos de alopecia ou cabelo curto, pêlos de outras regiões do corpo também podem ser recolhidos para exame laboratorial, embora se recomenda uma análise qualitativa para esta situação.

Desta forma, o cabelo apresenta maior período de detecção e estabilidade de amostra, além de baixo risco de adulteração (NEGRUSZ & GAENSSLEN, 2008). Entretanto, apresenta desvantagens como a necessidade de técnicas analíticas capazes de detectar baixas concentrações de analito. Além disso, ao administrar uma DFC, geralmente trata-se de uma dose única, o que pode dificultar sua incorporação no fio capilar. Em caso de resultado positivo, isso indica que a suposta vítima consumiu o composto em qualquer momento, mas não necessariamente no momento do ataque (LEBEAU & MOZAYANI, 2001; SCOTT, 2009).

2.4.2. Metodologias analíticas para DFC

A detecção de DFC e seus produtos de biotransformação exigem técnicas analíticas altamente sensíveis e seletivas. Questões práticas precisam ser estabelecidas como a triagem

para as amostras biológicas, a gama de substâncias a serem analisadas, o volume da matriz, a velocidade de análise, assim com sensibilidade e especificidade (PARKIN & BRAISLFORD, 2009; UNODC, 2012).

As metodologias utilizadas para determinação de DFC podem iniciar com a etapa da triagem que incluem testes qualitativos colorimétricos, imunoensaios e até cromatográficos (LEBEAU & MOZAYANI, 2001). Os métodos imunológicos podem ser empregados para a triagem preliminar, mas com cautela, pois um resultado negativo não significa ausência da droga e um caso positivo necessita de confirmação. Durante a triagem, a amostra não pode ser depletada, pois é necessário uma quantia suficiente para uma análise confirmatória (SHBAIR & LHERMITTE, 2010; UNODC, 2012).

Problemas como sensibilidade e seletividade estão presentes para o flunitrazepam e outros benzodiazepínicos por imunoensaios (JOURDIL *et al.*, 2002; UNODC, 2012) e verificou-se que após o processo de hidrólise enzimática na urina, há um aumento da detecção dos benzodiazepínicos, em especial oxazepam, com um acréscimo de 20% de sensibilidade para esta técnica. Entretanto, o procedimento apresentou 200 ng/mL como *cut-off*, o que é elevado para situações que envolvam DFC (BORREY *et al*., 2002). A insensibilidade de uma metodologia analítica pode levar a resultados falsos negativos, desencorajando a vítima de prosseguir com a acusação (UNODC, 2012).

Outro detalhe se refere à difenidramina, que tem a capacidade de promover reação cruzada para várias drogas quando analisadas por métodos imunológicos (SCHNEIDER & WENNING, 1999; BRAHM *et al*., 2010). Esta metodologia não permite determinar várias DFC como o GHB, o que levaria a resultados falso-negativos em relação ao uso dessas substâncias químicas na urina das vítimas (BETCHEL & HOLSTEGE, 2007).

Diante desses inconvenientes, técnicas cromatográficas como a LC-DAD, LC-MS, LC-MS/MS, GC-FID, GC-MS e GC-MS/MS devem ser empregadas sempre que possível. Em situação de confirmação, metodologias baseadas em espectrometria de massas como GC-MS, GC-MS/MS, LC-MS e LC-MS/MS são as ferramentas analíticas utilizadas pelos laboratórios forenses como métodos de referência. Caso estes equipamentos não estejam disponíveis, é recomendável estocar a -18°C até um laboratório especializado (SHBAIR & LHERMITTE, 2010; UNODC, 2012).

Técnicas cromatográficas exigem uma efetiva preparação da amostra com objetivo de eliminar interferentes e concentrar o(s) analito(s) de interesse. A complexidade da extração matricial depende da grandeza de medição da amostra, da natureza da droga a ser analisada (incluindo sua estabilidade e/ou biotransformação), assim como o processo cromatográfico e

o detector a serem usados. Todos esses fatores são fundamentais na determinação das DFC (LEBEAU & MOZAYANI, 2001; FLANAGAN *et al*., 2008; UNODC, 2012).

2.5. Tratamento da amostra biológica

2.5.1. Hidrólise

Muitas substâncias sofrem biotransformação de fase II, mais especificamente a glicuronidação, do qual ocorre a conjugação de uma molécula de ácido glicurônico com um grupo hidroxila da molécula a ser excretada. Isto forma a ligação glicosídica cujo resultante é O-glicuronídeo na tentativa do organismo em transformar a molécula mais polar para posterior excreção urinária. Esta reação também ocorre grupamento amina livre (N-glicuronidação) e tiol livre (S-glicuronidação) (**Figura** 1), porém em proporções muito menores (NGUYEN & NAU, 2000; OGA *et al*., 2008).

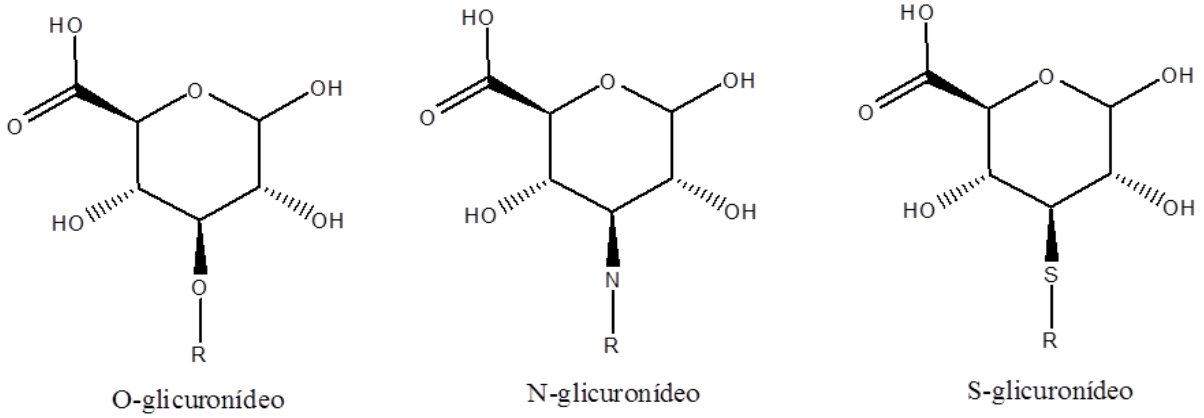


Figura 1- R-O-glicuronideo; R-N-glicuronideo; R-S-glicuronideo. R, molécula a ser excretada.

Diante disso, para identificação dos analitos de interesse como DFC, é necessário realizar um processo chamado hidrólise no intuito de detectar a droga e/ou seus produtos de biotransformação na forma livre sem estarem conjugados com o glicuronídeo (MEATHERALL, 1994). A determinação do xenobiótico livre após hidrólise enzimática apresenta maior sensibilidade se comparada com o xenobiótco conjugado, o que pode ser interessante para situações do qual envolvem submissão química (TURFUS *et al*., 2011).

A técnica de hidrólise pode ser química ou enzimática, sendo que a hidrólise química ocorre sob ação de uma base ou ácido sob determinada condição, porém pode promover a degradação dos compostos de interesse (ex.: benzodiazepínicos podem converter-se em benzofenonas). A hidrólise enzimática é a mais utilizada devido a sua capacidade de promover a liberação da droga e/ou seus produtos de biotransformação sem ocorrer à

degradação das moléculas alvo (PETERS *et al.*, 2009). Os microorganismos *Escherichia coli*, *Patela vulgata* e *Helix pomatia* são as principais fontes de obtenção da enzima beta-glicuronidase, que geralmente é comercializada em combinação com a enzima arisulfatase (MEATHERALL, 1994; ADAMOWICZ & KALA, 2010; UNODC, 2012).

Todavia, há relatos na literatura sobre a real necessidade da hidrólise enzimática para determinadas moléculas, em especial para os nitrobenzodiazepínicos (nitrazepam, clonazepam e flunitrazepam). Estas moléculas sofrem nitrorredução formando 7-aminobenzodiazepínicos (seus principais produtos de biotransformação) e assim excretados na urina. Como N-glicuronídeo tem baixa expressividade na biotransformação destas moléculas, a hidrólise enzimática para estas não seria necessária, como foi demonstrado para 7-aminoflunitrazepam (NGUYEN & NAU, 2000). De maneira similar, cetamina, norcetamina e diidronorcetamina também são excretados em abundância pela urina na ausência de conjugação (KIM *et al.*, 2008; THUNIG *et al.*, 2011). Além disso, o processo de hidrólise enzimática apresenta cromatogramas com maior número de interferentes se comparado com uma extração sem hidrólise (NGUYEN & NAU, 2000). Outros benzodiazepínicos como oxazepam, lorazepam, temazepam e outras moléculas classificadas como DFC que sofrem conjugação (O-glicuronídeo) deverão passar pelo processo de hidrólise enzimática.

O procedimento para hidrólise enzimática é variável conforme o analito a ser investigado. No caso dos benzodiazepínicos, averiguou-se que a enzima beta-glicuronidase oriunda de *Helix pomatia* (5000 unidades/mL de urina) após incubação de 2 horas seria a melhor opção (MEATHERALL, 1994). Devido a gama de substâncias envolvidas como potenciais DFC, o guia da UNODC lançou um exemplo de procedimento de hidrólise enzimática para amostras de urina. Utiliza-se 1 mL de urina com adição de padrão interno e 1 a 2 mL de tampão pH-5,2. Posteriormente, adiciona-se a enzima beta-glicuronidase (1000 a 20000 unidades/mL) e necessário a enzima arilsulfatase. Depois, incuba-se a matriz biológica a 37°C por 16 horas ou 50°C por 90 minutos. Após incubação, ajusta-se o pH da amostra e a extração pode ser realizada.

2.5.2. Técnicas de extração de DFC em matrizes biológicas

Os procedimentos extrativos predominantes em relação aos trabalhos que envolvem DFC são a extração líquido-líquido (LLE) e a extração em fase sólida (SPE) (KIM *et al.*, 2008; ADAMOWICZ & KALA, 2010; LANGEL *et al.*, 2011; ARNHARD *et al.*, 2012), sendo estes procedimentos recomendados pelo guia da UNODC (UNODC, 2012). Para a análise de compostos voláteis, em especial etanol, a utilização de GC-FID ou GC-MS com auxílio do

headspace e/ou uso da microextração em fase sólida (SPME) é recomendado. Apesar da SPME exigir a experiência do laboratorista, esta técnica permite a análise simultânea de solventes em diferentes amostras biológicas, demonstrando resultados reprodutíveis e confiáveis (KOVATSI *et al.*, 2011; UNODC, 2012).

Nos últimos anos, tem sido observado como tendência em análises toxicológicas, o emprego de técnicas mais recentes de preparação de amostras que valorizem a simplicidade e praticidade, a menor manipulação da amostra e a diminuição do volume de solventes orgânicos, características da microextração em fase líquida (LPME) (PEDERSEN-BJERGAARD & RASMUSSEN, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2008).

2.5.2.1. Microextração em fase líquida (LPME)

A minituarização da tradicional técnica de LLE tem como objetivo reduzir o volume de matriz (aquosa) e do solvente orgânico com intuito de favorecer a transferência dos analitos da fase aquosa para a fase orgânica, promovendo um elevado fator de enriquecimento. Isto pode ser obtido usando tanto fases líquidas imiscíveis (microextração em gota suspensa) quanto em membranas (extração líquido-líquido em membrana microporosa, extração em fase líquida suportada em membranas e a microextração em fase líquida com fibra oca) (PSILLAKIS & KALOGERAKIS, 2002).

A microextração em gota suspensa, também conhecido como *single drop microextraction* (SDME) consiste em uma microgota de solvente orgânico imiscível em água (50 µL) fixada na parte final de um dispositivo de politetrafluoretileno (PTFE) ou microsseringa e que é imersa na amostra. Após agitação, o suporte de solvente é retirado da matriz e a fase orgânica contendo o(s) analito(s) é injetada no sistema cromatográfico (JEANNOT & CANTWELL, 1996). Apesar da alta capacidade extrativa para analitos de elevado coeficiente de partição, esta técnica apresenta uma baixa robustez, pois pode ocorrer perda de solvente durante a agitação para acelerar o processo de extração. Além disso, a presença de material particulado pode levar a uma possível colisão com a microgota e amostras viscosas necessitam de pré-tratamento diferenciado para que os analitos possam ser extraídos por SDME (PEDERSEN-BJERGAARD & RASMUSSEN, 2005).

Diante da instabilidade da SDME, a microextração líquida utilizando membranas demonstrou maior estabilidade. A extração líquido-líquido em membrana microporosa (MMLLE) tem os mesmos fundamentos da LLE, o qual o solvente orgânico preenche os poros da membrana sob um fluxo constante. A MMLLE é mais adequada para compostos

altamente hidrofóbicos, os quais encontrariam dificuldades de serem extraídos em uma fase aceptora aquosa (OLIVEIRA *et al*., 2008).

A técnica denominada extração com fase líquida suportada em membranas (SLM) pode ser considerada uma extração líquido-líquido em duas etapas. A fase orgânica é imobilizada em uma membrana hidrofóbica porosa, a qual forma uma barreira entre as fases aquosas. Os analitos presentes na fase doadora são mantidos na sua forma não ionizada através de ajustes no pH e, dessa forma, são transferidos através da membrana impregnada de solvente orgânico para a fase aceptora aquosa que apresenta um pH contrário àquele da fase doadora, o que favorece a formação de moléculas ionizadas do analito, impedindo seu regresso para a fase orgânica. Os compostos neutros não terão alta taxa de concentração e a extração de macromoléculas será baixa devido ao tamanho dos poros da membrana (OLIVEIRA *et al*., 2008).

Diante das desvantagens das técnicas de SLM e MMLLE que incluem problemas de estabilidade da membrana e possibilidade de efeito memória, uma nova técnica foi desenvolvida por Pedersen-Bjergaard e Rasmussen, do qual consistia na combinação do conceito da extração de membranas (SLM e MMLLE) com o uso reduzido de solvente visto na SDME (PEDERSEN-BJERGAARD & RASMUSSEN, 2000). Desta forma, surgiu a microextração em fase líquida com fibra oca (LPME), uma técnica que tem ganhado destaque se comparado às demais microextrações líquidas devido a sua robustez, simplicidade e campo de aplicação (PEDERSEN-BJERGAARD & RASMUSSEN, 2005; FLANAGAN *et al*., 2006; PEDERSEN-BJERGAARD & RASMUSSEN, 2008). Este método extrativo apresenta um excelente tratamento de amostra, inclusive em matrizes complexas, alta capacidade de concentração de analitos, significativa redução no consumo de solventes orgânicos. Além disso, o baixo custo de cada unidade de extração possibilita o seu uso uma única vez, evitando problemas de efeito memória, que é observado em outras técnicas de extração com membranas (OLIVEIRA *et al*., 2008; ALMEIDA *et al*., 2012).

Na LPME, a matriz é descrita como a fase doadora, enquanto que o solvente ou solução iônica em que o analito será retido é considerado fase aceptora. Os analitos de interesse presente na fase doadora são mantidos na sua forma não-ionizada através de ajustes no pH e após agitação são transferidos para a fase aceptora por meio da fibra impregnada de solvente (PEDERSEN-BJERGAARD & RASMUSSEN, 2002; PEDERSEN-BJERGAARD & RASMUSSEN, 2005; PEDERSEN-BJERGAARD & RASMUSSEN, 2008). Esta técnica pode ser utilizada de duas maneiras distintas caracterizadas como sistema bifásico e trifásico, conforme as características do analito. O sistema bifásico (**Figura 2**) apresenta como fase

aceptora o solvente extrator que está impregnado na fibra oca e que também preenche o lúmen da fibra. No sistema trifásico, o diferencial se refere ao lúmen da fibra oca, que é preenchido com uma solução que permite a ionização do(s) analito(s) de interesse (**Figura 3**). Em ambos os casos, o volume de fase aceptora é extremamente pequeno, na ordem de µL (PEDERSEN-BJERGAARD & RASMUSSEN, 2002).

O sistema bifásico apresenta uma reprodutibilidade menor se comparado ao sistema trifásico, pois há livre passagem do(s) analito(s) não-ionizado(s) entre a fase aceptora e a fase doadora (**Figura 2**). Diante disso, o sistema trifásico é mais eficiente e reprodutível, pois a fase aceptora inserida no lúmen da fibra é uma solução com um pH contrário àquele da fase doadora, o que favorece a formação de moléculas ionizadas do analito, impedindo seu regresso para a fase doadora (**Figura 3**) (PEDERSEN-BJERGAARD & RASMUSSEN, 2002; OLIVEIRA *et al*., 2008).

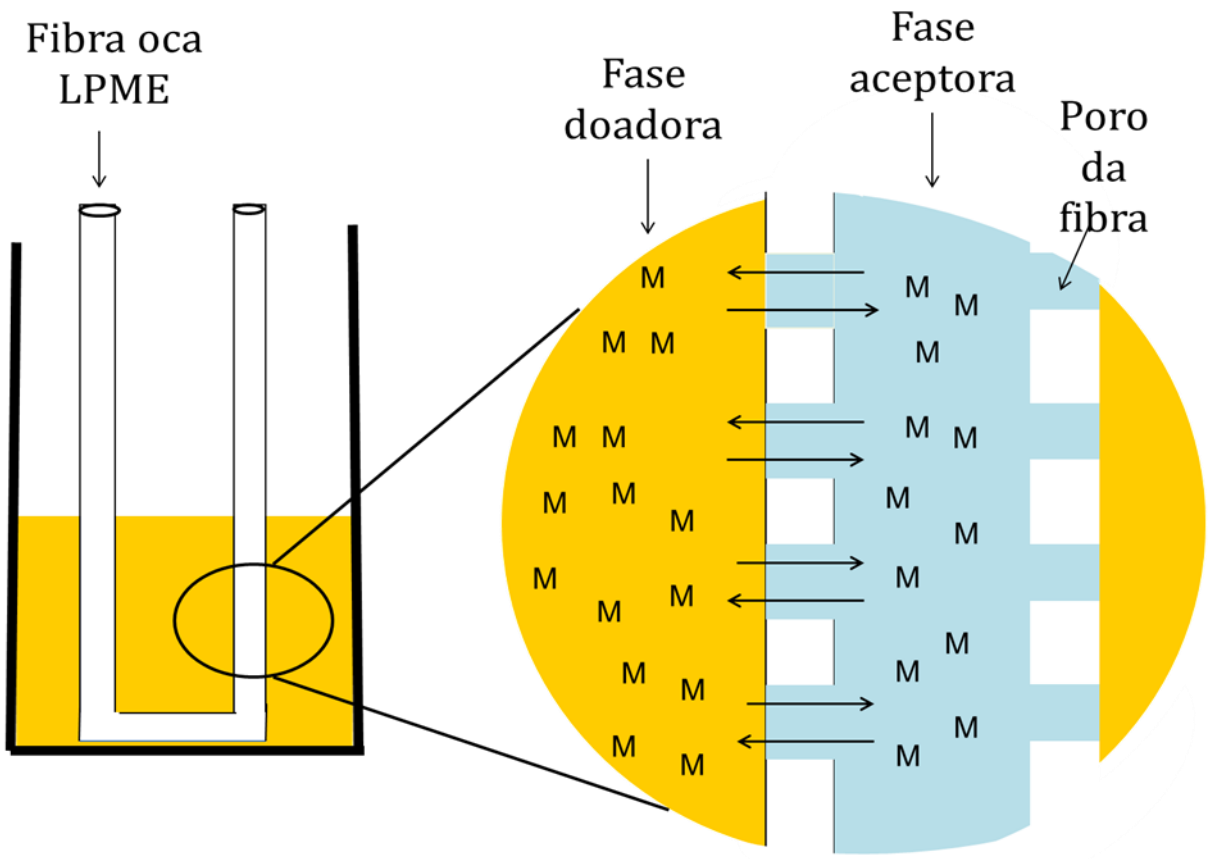


Figura 2 - Sistema bifásico da LPME e seu principio de funcionamento

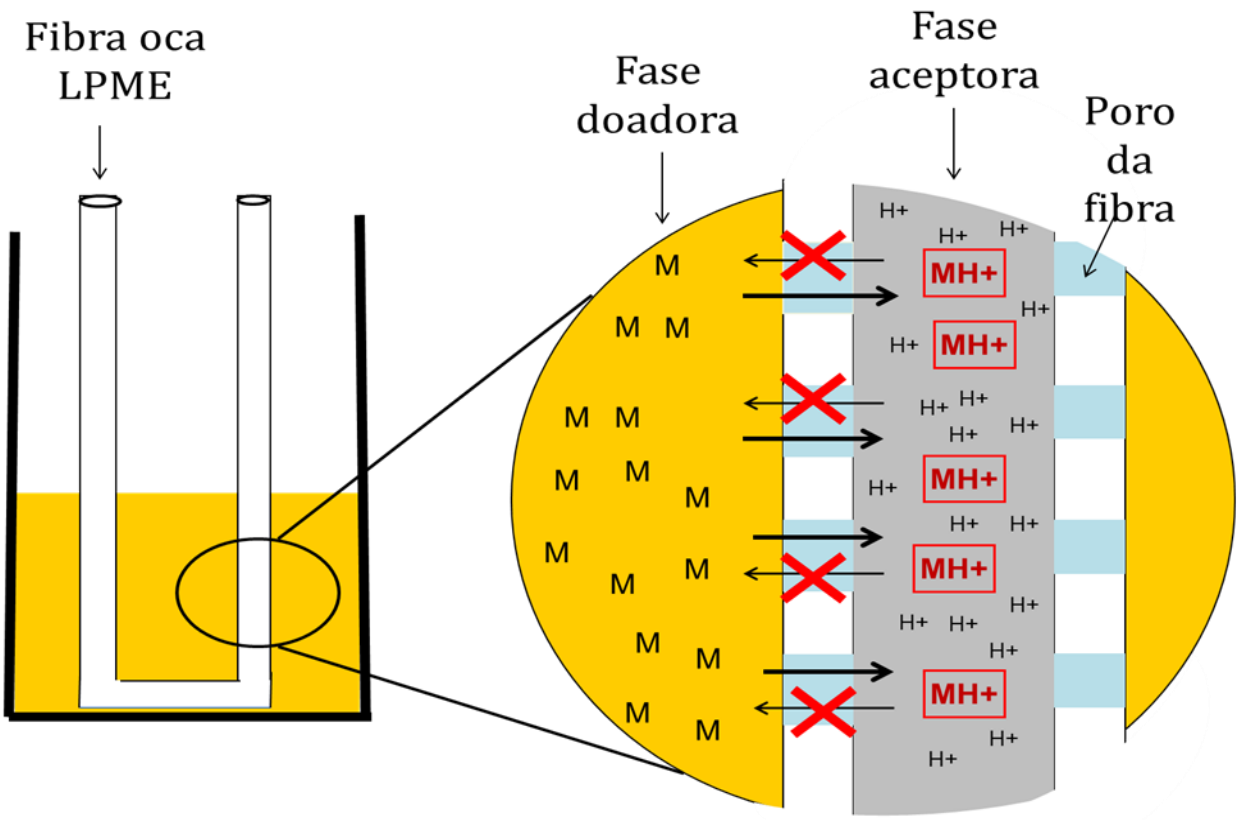


Figura 3 - Sistema trifásico da LPME e seu príncipio de funcionamento

Para analitos altamente hidrofílicos que não seriam extraídos na membrana orgânica pelo processo de difusão, a adição de reagente iônico relativamente hidrofóbico à fase doadora ou orgânica, permite a formação de par iônico com o analito de interesse, ocorrendo então à extração (OLIVEIRA *et al*., 2008). Após a extração, a fase aceptora é transferida para o instrumento analítico (LC ou eletroforese capilar). A príncipio, este processo extrativo é mais compatível com a LC, porém isto não impede a sua utilização na GC após evaporação e ressuspensão com um solvente compatível para este aparelho (PEDERSEN-BJERGAARD & RASMUSSEN, 2008).

A LPME apresenta uma série de parâmetros que podem afetar a extração de um analito, como tipo de membrana, solvente orgânico, tempo de extração, agitação, temperatura, pH da fase doadora, pH da fase aceptora (sistema trifásico), modificadores orgânicos e adição de sal (PEDERSEN-BJERGAARD & RASMUSSEN, 2008; OLIVEIRA *et al*., 2008). Diante disso, verifica-se que:

- As membranas são hidrofóbicas e porosas com diferentes tamanhos em relação ao diâmetro interno e porosidade, feitas de polipropileno e são distribuídas comercialmente

pela empresa Membrana® (Wuppertal, Alemanha) (OLIVEIRA *et al*., 2008). Apesar do polipropileno ser o material mais utilizado nas fibras de LPME, difluoreto de polivinilideno (PVDF) também está sendo estudada em processos microextrativos (CUI *et al*., 2009).

- Em relação ao solvente orgânico, este necessita apresentar baixa solubilidade e volatilidade, fácil impregnação à fibra, imiscível com a matriz a ser trabalhada e compatível com os analitos a serem extraídos. Os solventes mais usados são hidrocarbonetos de cadeia longa, como *n*-undecano, ou ainda mais polares como octanol (PSILLAKIS & KALOGERAKIS, 2003).
- É fundamental avaliar o tempo de extração, pois um determinado tempo é necessário para que se atinja o equilíbrio e a distribuição de massas entre a fase doadora e aceptora permaneça constante. Caso o tempo para extração seja muito longo, pode-se alterar a agitação do sistema (RASMUSSEN & PEDERSEN-BJERGAARD, 2008).
- A agitação permite aumentar a energia cinética das moléculas, facilitando a difusão dos analitos e assim diminuindo o tempo de extração, porém este parâmetro não é universal para todos analitos a serem extraídos pela LPME (PEDERSEN-BJERGAARD & RASMUSSEN, 2008).
- A temperatura influencia diretamente na solubilidade dos analitos, do qual o aumento da temperatura diminui a viscosidade do solvente e consequentemente o tempo para o equilíbrio é diminuído. Porém, a LPME é realizada a temperatura ambiente para evitar bolhas e evaporação do solvente durante extração (RASMUSSEN & PEDERSEN-BJERGAARD, 2002; PEDERSEN-BJERGAARD & RASMUSSEN, 2008).
- O pH da fase doadora permite a forma não-iônica do analito de interesse através de um ajuste por meio de solução ácida ou básica, conforme característica do analito de interesse. Isso garante uma maior razão de distribuição entre as fases e garante elevados fatores de enriquecimento e recuperação do analito (PEDERSEN-BJERGAARD *et al*., 2002).
- O pH da fase aceptora em um sistema trifásico garante a ionização do analito de interesse, impedindo que ele regresse a fase doadora. A solução aquosa de pH contrário ao da fase doadora garante a integridade da molécula alvo e assim promover uma efetiva extração. Para fármacos básicos, soluções com ácidos fortes apresentam melhores índices de recuperação se comparado com soluções de ácidos fracos. Isto se deve a uma eficaz protonação dos analitos obtidos no emprego dessas soluções (PEDERSEN-BJERGAARD

et al., 2002). Para extração de compostos ácidos, soluções de hidróxido de sódio tem se mostrado eficazes. Além disso, pode-se utilizar fases aceptoras constituídas por soluções-tampão ajustadas no pH de interesse (PEDERSEN-BJERGAARD *et al*., 2002; PEDERSEN-BJERGAARD *et al*., 2008).

- A adição de modificadores orgânicos (metanol ou etanol) permite uma melhora na solubilidade do analito na solução aquosa, promovendo então aumento na extração, mas pode haver evaporação do modificador ou dissolução com o solvente extrator e consequente prejuízo na extração (PEDERSEN-BJERGAARD *et al*., 2002).
- A adição de sal aumenta a eficiência de extração devido ao efeito *salting out*, do qual ocorre um aumento da força iônica da fase doadora, permitindo uma maior afinidade da molécula não-ionizada frente ao solvente (ULRICH, 2000; PSIKALLIS & KALOGERAKIS, 2003).

Apesar dos excelentes resultados descritos na literatura com a LPME, esta técnica apresenta algumas limitações como a dificuldade de extração de moléculas extremamente polares assim como substâncias de caráter anfótero. No caso da última, a ionização dos diferentes grupos funcionais do analito de interesse perante correção do pH na fase doadora impede a sua captação para o lúmen da fibra. Em relação à prática laboratorial, a técnica demonstra uma relativa perda de precisão ocasionada pela operação manual (apesar de tentativas de automação) do procedimento incluindo a preparação, impregnação e acomodação da fibra no sistema, além do fato de se trabalhar com um pequeno volume de fase aceptora (PAWLISZYN & PEDERSEN-BJERGAARD, 2006; CUI *et al*., 2012). Logo, é fundamental o emprego de padrão interno para realizar a validação e quantificação das amostras.

2.5.3. Derivatização para cromatografia gasosa

A derivatização é uma reação química que modifica a estrutura molecular do analito de interesse, sendo muito utilizada pela cromatografia gasosa (GC), permitindo a separação cromatográfica, além do aumento da volatilidade, seletividade, resolução e sensibilidade do analito. Além disso, é capaz de ampliar a gama de substâncias analisadas por este equipamento (SEGURA *et al.*, 1998). Para isso, ocorre uma reação química entre o analito e o agente derivatizante, que pode ser:

- Sililantes
- Acilantes

- Alquilantes

Os sililantes são os reagentes mais usados para promover a derivatização de um analito para posterior análise em GC. Na sililação, um hidrogênio ativo é substituído por um grupo alquilsilil, tais como trimetilsilil (TMS) ou *t*-butil-dimetilsilil (*t*-BDMS). Os derivados sililantes são mais voláteis, menos polares e termicamente estáveis, além de aumentar a resolução e sensibilidades da molécula de interesse. Os sililantes são sensíveis a umidade, em especial os TMS. Em virtude disso, *t*-BDMS foram introduzidos no mercado e são capazes de formar moléculas mais estáveis a hidrólise se comparado aos TMS (GUNNAR *et al*., 2005). Além disso, alguns desses reagentes apresentam concomitantemente outro composto com o objetivo de catalizar a reação de grupos funcionais de alcoóis e aminas dos analitos alvos (SEGURA *et al*., 1998; LITTLE, 1999; REGIS, 2008). Os principais agentes sililantes estão definidos na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Principais agentes sililantes utilizados em reações de derivatização

Sililantes	**Sigla**
N,O-Bis(trimetilsilil)acetamida	BSA
N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida	BSTFA
N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida + Trimetilclorosilano (1, 10%)	BSTFA + TMCS (1 ou 10%)
Hexametildisilazano	HMDS
N-Metiltrimetilsililtrifluoroacetamida	MSTFA
N-metil-*N*-(*t*-butildimetilsilil)trifluoroacetamida	MTBSTFA
N-metil-*N*-(t-butildimetilsilil)trifluoroacetamida + 1% *t*-butildimetilclorosilano	MTBSTFA + *t*-BDMCS

*OBS.: Tanto *N*-metil-*N*-(*t*-butildimetilsilil)trifluoroacetamida quanto *N*-metil-*N*-(t-butildimetilsilil)trifluoroacetamida + 1% *t*-butildimetilclorosilano podem ser chamados apenas de MTBSTFA.

A acilação oferece vantagens semelhantes aos sililantes, porém atingem mais facilmente alvos altamente polares, compostos multifuncionais como carboidratos e aminoácidos. Geralmente, estes reagentes são comercializados como ácidos anidros, acil derivados ou acil halogênios. Acil derivados e acil halogênios são altamente reativos e indicados quando uma molécula alvo apresenta impedimento estérico. Os ácidos anidros são fornecidos em um número de configurações de fluorados, do qual aumenta detecção. Esses agentes são utilizados como derivatizantes para confirmar o uso de drogas de abuso. Devido a sua natureza ácida, é necessário a remoção do excesso desses produtos para evitar a deterioração

da coluna cromatográfica (SEGURA *et al*., 1998; LIN & LUA, 2006; REGIS, 2008). Os principais agentes acilantes estão descritos na **Tabela 2**.

Tabela 2 – Principais agentes acilantes utilizados para reações de derivatização

Anidridos fluorados	**Sigla**
Ácido heptafluorobutírico anidrido	HFBA
Ácido pentafluoropropionico anidrido	PFPA
N-metil-*N*-bis(trifluoroacetamida)	MBTFA
Ácido trifluoroacético anidrido	TFAA

São derivatizantes mais usados para detector eletroquímico (ECD), reagindo com alcoóis, fenóis e aminas. HFBA demonstrou que é mais sensível se analisado por ECD, enquanto PFPA necessita de baixas temperaturas para promover a derivatização. O MBTFA reage em condições brandas com aminas primárias e secundárias, e de forma lenta com alcoóis, fenóis e tióis (REGIS, 2008). O TFAA é considerado o agente mais reativo e volátil dentre os anidridos (REGIS, 2008), e demonstrou uma alta capacidade de derivatização de grupos aminos que apresentam forte impedimento estérico que são protegidos por outros grupos vizinhos (HUANG *et al*.,2005).

Os reagentes de alquilação reduzem a polaridade da molécula através da substituição de hidrogênios ativos com um grupo alquila. Estes reagentes são utilizados para modificar compostos possuindo hidrogênios ácidos, tais como ácidos carboxílicos e fenóis. Os reagentes de alquilação podem ser utilizados isoladamente para ésteres, éteres e amidas ou podem ser usados em conjunção com reagentes de acilação ou de sililação (REGIS, 2008). Devido à disponibilidade dos reagentes e da sua facilidade de utilização de esterificação, (a reação de um ácido com um álcool na presença de um catalisador para formar um éster) transforma esse método o mais popular de alquilação. Os ésteres de alquila são estáveis, e podem ser formados rapidamente. Ao alterar o comprimento do grupo alquila substituído, a retenção do derivado pode ser variada. Em adição à formação de ésteres simples, os alquilantes podem ser usados durante os processos de extração em que as matrizes biológicas podem estar presentes (REGIS, 2008; SEGURA *et al*., 1998; BENEITO-CAMBRA *et al*., 2011). A **Tabela 3** indica um resumo das derivatizações com os principais grupos funcionais (Adaptado de REGIS, 2008):

Tabela 3 – Principais agentes derivatizantes e seus respectivos sítios de ação

Grupo funcional	**Sililação**	**Acilação**	**Alquilação**

Hidrogênio ativos	BSTFA, BSTFA/TMCS,MSTFA, MTBSTFA	PFPA	Dialquilacetais
Ácidos carboxílicos	BSTFA, MTBSTFA	PFPA	BF_3/metanol, BF_3/n-butanol, dialquilacetais
Alcoois e fenóis *Leve impedimento estérico*	BSA, BSTFA/TMCS, HMDS, MTBSTFA/t-BDMCS	HFBI, TFAA, PFPA, HFBA, MBTFA	TBA, TBH, dialquilacetais
Alcoois e fenóis *Forte impedimento estérico*	BSTFA/TMCS	TFAA, PFPA, HFBA, HFBI	Dialquilacetais, TBH
Aminas *Primárias e secundárias*	BSTFA, MTBSTFA/t-BDMCS	TFAA, HFBA, PFPA, MBTFA, HFBI	TBH, dialquilacetais
Amidas	BSA, BSTFA, BSTFA/TMCS	HFBI	Dialaquilacetais

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Desenvolvimento e validação de métodos analíticos inovadores para identificação para drogas facilitadoras de crime como a classe dos benzodiazepínicos, cetamina, gama-hidroxibutirato e seus respectivos produtos de biotransformação utilizando urina como matriz biológica.

3.2. Objetivos específicos

- Desenvolvimento e validação de um método analítico para detecção de drogas da classe dos benzodiazepínicos e seus respectivos produtos de biotransformação (flunitrazepam, 7-aminoflunitrazepam, medazepam, clordiazepóxido, diazepam, lorazepam, nordiazepam, oxazepam, clonazepam, 7-aminoclonazepam e nitrazepam) em amostras de urina.
- Desenvolvimento e validação de um método analítico para cetamina, norcetamina e deidronorcetamina em amostras de urina.

- Desenvolvimento e validação de um método analítico para gama-hidroxibutirato em amostras de urina.

4. MATERIAL

4.1. Equipamentos

- Equipamento de cromatografia em fase gasosa modelo 6850 acoplado a espectrometria de massa com analisador de massa tipo quadrupolo modelo 5975 da marca Agilent Technologies® (Wilmington, DE, USA).
- Coluna capilar de sílica fundida HP-5MS nas dimensões de 30m x 0,25m x 0,1µm.
- Fibra oca de LPME modelo Q3/2 Accurel feita de polipropileno nas dimensões de 600µm x 200 µm x 0,2µm de porosidade oriundos da marca Membrana® (Wuppertal, Alemanha).
- Ponteira de eletroforese em gel modelo Round CC 4853 nas dimensões de 0,5mm com capacidade de 1-200µL obtidos da empresa Costar® (Corning, NY, USA).
- Vials âmbar de 2mL nas dimensões 9mm x 12x32mm e inserts cônicos de 300 µL com spring obtidos da empresa Flow supply® (São Paulo, SP, Brasil).
- Agitador estilo vortex multi-tubo modelo VX-2500 da empresa VWR® (Thorofare, NJ, USA).
- Concentrador com fluxo de nitrogênio obtido da empresa Tecnal® (Piracicaba, SP, Brasil)
- Banho seco Digi-Block oriundo da empresa Laboratoy Devices® (Holliston, MA, USA)

4.2. Reagentes e soluções

- Soluções de padrões certificados de gama-hidroxibutirato, cetamina, norcetamina, deidronorcetamina, medazepam, diazepam, nordiazepam, clordiazepóxido, oxazepam, lorazepam, temazepam, nitrazepam, flunitrazepam, 7-aminoflunitrazepam, clonazepam e 7-aminoclonazepam obtidos da Cerilliant® (Round Rock, TX, USA).
- Soluções de padrões deuterados de cetamina-D_4, norcetamina-D_4, diazepam-D_5, clordiazepóxido-D_5, oxazepam-D_5, flunitrazepam-D_7, 7-aminoflunitrazepam-D_7, clonazepam-D_4, 7-aminoclonazepam-D_4 obtidos da Cerilliant® (Round Rock, TX, USA).

- Hidróxido de sódio e cloreto de sódio oriundo da empresa Synth® (Diadema, SP, Brasil), enquanto ácido clorídrico, metanol, acetonitrila e acetato de etila foram obtidos da empresa Vetec Química Fina® (Duque de Caxias, RJ, Brasil)
- Éter dihexílico, 1-nonanol, decanol, undecano, 1-octanol, xilol, TFAA, enzima beta-glicuronidase *Helix pomatia* tipo 2 em solução aquosa 100.000 unidades/mL e MTBSTFA foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich® (Steinheim, Alemanha).
- Óleos essenciais de eucalipto, canola, cravo e menta foram adquiridos da empresa Mapric® e Natural Pharma Ltda® (São Paulo, SP, Brasil). Óleos de soja e de oliva são oriundos da empresa Bunge Brasil® (São Paulo, SP, Brasil) comprados em um mercado local.

4.3. Amostras

As amostras de urina de referência negativa foram obtidas de voluntários que não fizeram uso de nenhuma das substâncias em estudo. As amostras de urina são coletadas de voluntários internados no Centro de Tratamento para Dependência Química Vila Serena. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP conforme parecer nº CEP 98156 (ANEXO 3).

4.4. Métodos

4.4.1. Aplicação do questionário

Todos voluntários que participaram da pesquisa responderam ao formulário conforme descrito no termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

4.4.2. Coleta das amostras

A coleta de urina é realizada de acordo com recomendações internacionais sob aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP. Os voluntários são selecionados conforme seu histórico e/ou atual consumo das respectivas substâncias alvo deste projeto de pesquisa. Se confirmada a exposição e a concordância do voluntário em participar do estudo, coleta-se uma amostra de urina (volume mínimo 10 mL) através do TCLE conforme o parecer nº CEP 98156.

CAPÍTULO I

CETAMINA

1. INTRODUÇÃO

A cetamina (KT) é um composto derivado do cloridrato de fenciclidina (PCP) e é um potente antagonista não-competitivo do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), importante na neuroquímica do comportamento e informação sensorial e atua no sitio de ligação do PCP. Trata-se de um analgésico e anestésico geral capaz de produzir uma rápida ação dissociativa e atualmente é utilizada na medicina veterinária e em emergências médicas, com restrições devido a efeitos psicodélicos (VASCONCELOS *et al.*, 2005).

A cetamina tem o pKa em torno de 7,5 e pode ser comercializada na forma líquida ou em pó, além de ser administrada pela via intramuscular, intravenosa, intranasal, oral e retal. Também pode ser fumada isoladamente ou concomitantemente com tabaco ou maconha. A ingestão desta substância pode ser realizada após sua dissolução em água, sucos e demais líquidos (ADAMOWICZ & KALA, 2005). Este fármaco apresenta fraca ligação proteica e tem uma distribuição altamente perfundida devido a sua elevada lipossolubilidade, atingindo o coração, pulmão e cérebro, além do tecido periférico e adiposo. Sua meia vida de eliminação é em torno de 2 a 3 horas e cerca de 90% da dose é excretada na urina em 72 h. A biotransformação desta molécula ocorre principalmente no fígado através de enzimas hepáticas do citocromo P-450, porém esse processo também ocorre nos pulmões, intestinos e rins (BECHTEL & HOLSTEGE, 2007; GARCIA, 2007; KIM *et al.*, 2008).

Cerca de 2% deste fármaco é eliminado inalterado, outros 2% é excretada como norcetamina (NK) (pKa 6,7), 16% sob a forma de deidronorcetamina (DHNK) (pKa 7,4 calculado pelo software ACD/Labs®) e o restante como conjugados de produtos de biotransformação hidroxilados conforme demonstrado na **Figura 4** (KIM *et al.*, 2008). O seu principal produto de biotransformação para análises toxicológicas é a norcetamina, sendo possível sua detecção entre 3 a 14 dias por GC-MS (WILLIAMS & WAINER, 2002; ADAMOWICZ & KALA, 2005a; KIM *et al.*, 2008). Porém, estudos demonstram que a abundância urinária de deidronorcetamina é superior à cetamina e norcetamina, indicando este composto deveria ser considerado um biomarcador do consumo desta droga (HUANG *et al.*, 2005; CHENG *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2007; KIM *et al.*; 2008).

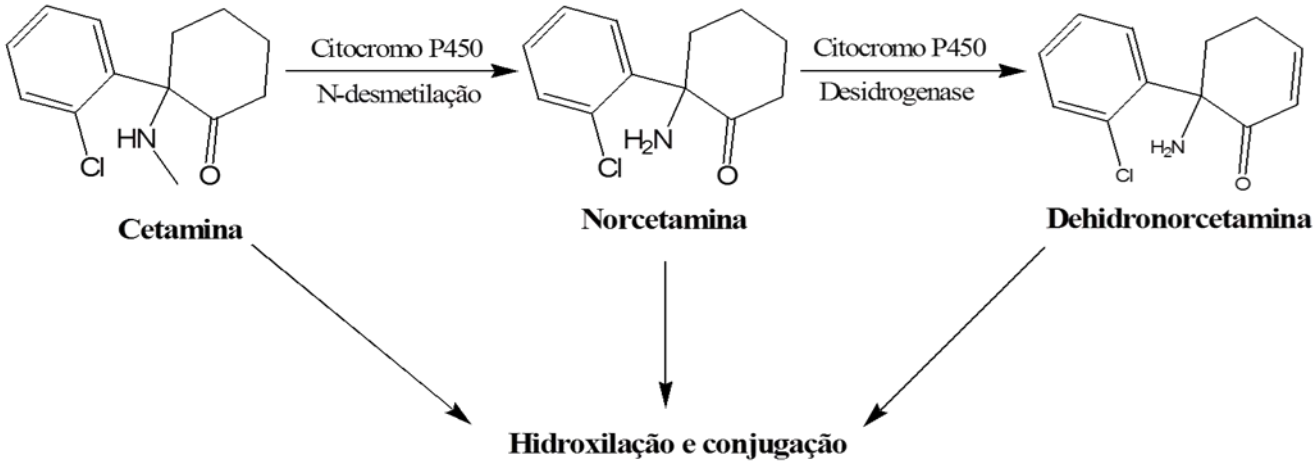


Figura 4 - Estrutura química da cetamina e sua biotransformação

Em virtude de seus efeitos como fala prejudicada, déficit de atenção, dificuldade de raciocínio, amnésia anterógrada e até *flashbacks*, a cetamina tem sido usada como droga de abuso e tem chamado a atenção das autoridades. Sua utilização em casos de estupro começou no fim da década de 80 e durante os anos seguintes observou-se um aumento de seu uso até 1999 nos EUA (BECHTEL & HOLSTEGE, 2007). Por isso, no fim dos anos 90 foi considerada uma tradicional DFC (LEBEAU & MOZAYANI, 2001) e foi enquadrada na Lista III de Substâncias Controladas pelo Governo Americano em Agosto de 1999 (CSA, 1999).

Desde 2002, a cetamina foi classificada no Anexo III pelo governo de Taiwan, porém devido ao aumento de casos na Ásia, há possibilidade de mudança de classificação para Anexo I ou II. Em Hong Kong, está na classificada no Anexo I sobre drogas desde 2000 (LI *et al*., 2011). De acordo com a lei do Reino Unido, esta substância está regulamentada como medicamento controlado conforme o *Misuse of Drug Act* 1971, do qual está definida como droga de Classe C desde janeiro de 2006, junto com GHB e outros tranqüilizantes. A posse e o fornecimento ilegal prevê respectivamente até 2 e 14 anos de prisão mais fiança (*Misuse Drugs Act*, 2006). No Brasil, a ANVISA enquadrou este fármaco à Lista-C1 de Substâncias Sujeitas a Controle Especial (receita de controle especial em 2 vias) (ANVISA, 2011). Contudo, esta droga tem sido vendida em estabelecimentos veterinários, sendo esta a forma mais comum de se obter ilicitamente (QUESADA *et al*., 2009).

2. Desenvolvimento de método para determinação de cetamina, norcetamina e deidronorcetamina em amostras de urina

2.1. Otimização da derivatização de cetamina, norcetamina e deidronorcetamina

A otimização da derivatização de cetamina, norcetamina e deidronorcetamina levou em consideração o uso do TFAA. Os parâmetros estudados foram:

- A temperatura e o tempo de incubação para cetamina, norcetamina e deidronorcetamina com TFAA

Um resumo do procedimento deste estudo está descrito na **Tabela 4**.

Tabela 4 – Estudo da derivatização de cetamina, norcetamina e deidronorcetamina com TFAA

Secagem	TFAA	Acetato de etila	Incubação/ tempo	Secagem	Acetato de etila
40ºC / N_2	50 µL	50 µL	60ºC / 30min	40ºC / N_2	35 µL
40ºC / N_2	50 µL	50 µL	90ºC / 30min	40ºC / N_2	35 µL

2.2. Condições cromatográficas para análise de cetamina, norcetamina e deidronorcetamina por GC-MS

As injeções no GC-MS foram feitas no modo de splitless e a separação cromatográfica foi obtida com uma coluna HP-5MS capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm x 0,1 espessura de filme), utilizando hélio como gás portador a 1,0 mL / min, em um modo de fluxo constante. O programa de temperatura do forno da coluna foi o seguinte:

1) Temperatura inicial de 100°C com uma rampa de 10°C / min até 200°C mantendo por 1 min.
2) Em seguida, 5°C / min até 210°C mantendo por 1 min.
3) 40°C / min até 300°C mantendo por 1 min.

O tempo total de análise foi de 17,25 min. A temperatura na porta de injeção e na linha de transferência foi de 260°C e 280°C, respectivamente. A análise dos analitos pelo MS foi através da ionização eletrônica (EI) (70 eV) com o monitoramento seletivo de íons (SIM) conforme indicado pela **Tabela 5**.

2.3. Otimização da LPME para cetamina, norcetamina e deidronorcetamina

O estudo de optimização do método foi feito tomando em consideração a escolha do solvente extrator, pH da fase doadora, a influência da fase receptora, o tempo de extração, a intensidade da agitação e da adição de sal sobre o rendimento da extração. Amostras de urina foram adicionadas a uma concentração de 15 ng/mL de cada analito foram submetidas ao método anteriormente descrito (tópico 8.3.2). A eficiência da extração foi avaliada através da

área total produzido por cada analito em todas as condições testadas. Os seguintes parâmetros foram estudados:

- Solventes extratores (éter diexílico, xilol, 1-nonanol, decanol, 1-octanol, undecano, óleo essencial de cravo, de eucalipto, de hortelã, de canola, além de óleo de soja e de oliva)
- pH da fase doadora (pH 9, 10, 11, 12 e 13)
- Fase aceptora (10, 25, 50, 75, 100 e 1000 mol/L de HCl)
- Tempo de extração (5, 10, 15, 20, 30 e 45 min)
- Agitação (800, 1200, 1600, 2000 e 2400 rpm).
- O efeito *salting out* também foi testada pela adição de 0, 5, 10 e 20% de NaCl (m/v) na amostra antes do procedimento extrativo.

2.4. Determinação de cetamina, norcetamina e deidronorcetamina para LPME

Utiliza-se 2 mL de urina contendo cetamina, norcetamina e deidronorcetamina colocado em um tubo de vidro e adiciona-se 20µL (1 µg/mL) de padrão interno cetamina-D_4 (cetamina) e norcetamina- D_4 (norcetamina e deidronorcetamina). A amostra é alcalinizada com uma solução de NaOH 2 mol/L até o pH 10 e então acrescenta-se 10% de NaCl (v/m). Uma fibra oca de LPME com 7,5 cm de comprimento é imersa em óleo essencial de eucalipto por 30 segundos para impregnação dos poros deste material e posteriormente sonificadas em água destilada por 10 segundos para retirar o excesso de solvente. O lúmen da fibra é preenchido com uma solução de 1 mol/L de HCl através 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 aceptora durante a agitação.

Então a fibra é introduzida no tubo na forma de U e submetida a agitação por 30 minutos. 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 40ºC sob fluxo de N_2. Após secagem, adiciona-se 50 µL de TFAA e 50 µL de acetato de etila, agita-se em vórtex e incuba-se por 30 minutos a 60 ºC. Passado esse tempo, o vial novamente é secado a 40ºC sob fluxo de N_2 e acrescenta-se 35 µL de acetato de etila com posterior agitação em vórtex. Uma alíquota de 2 µL do extrato é injetada no GC-MS. A **Figura 5** ilustra os passos (1 a 13) deste procedimento extrativo.

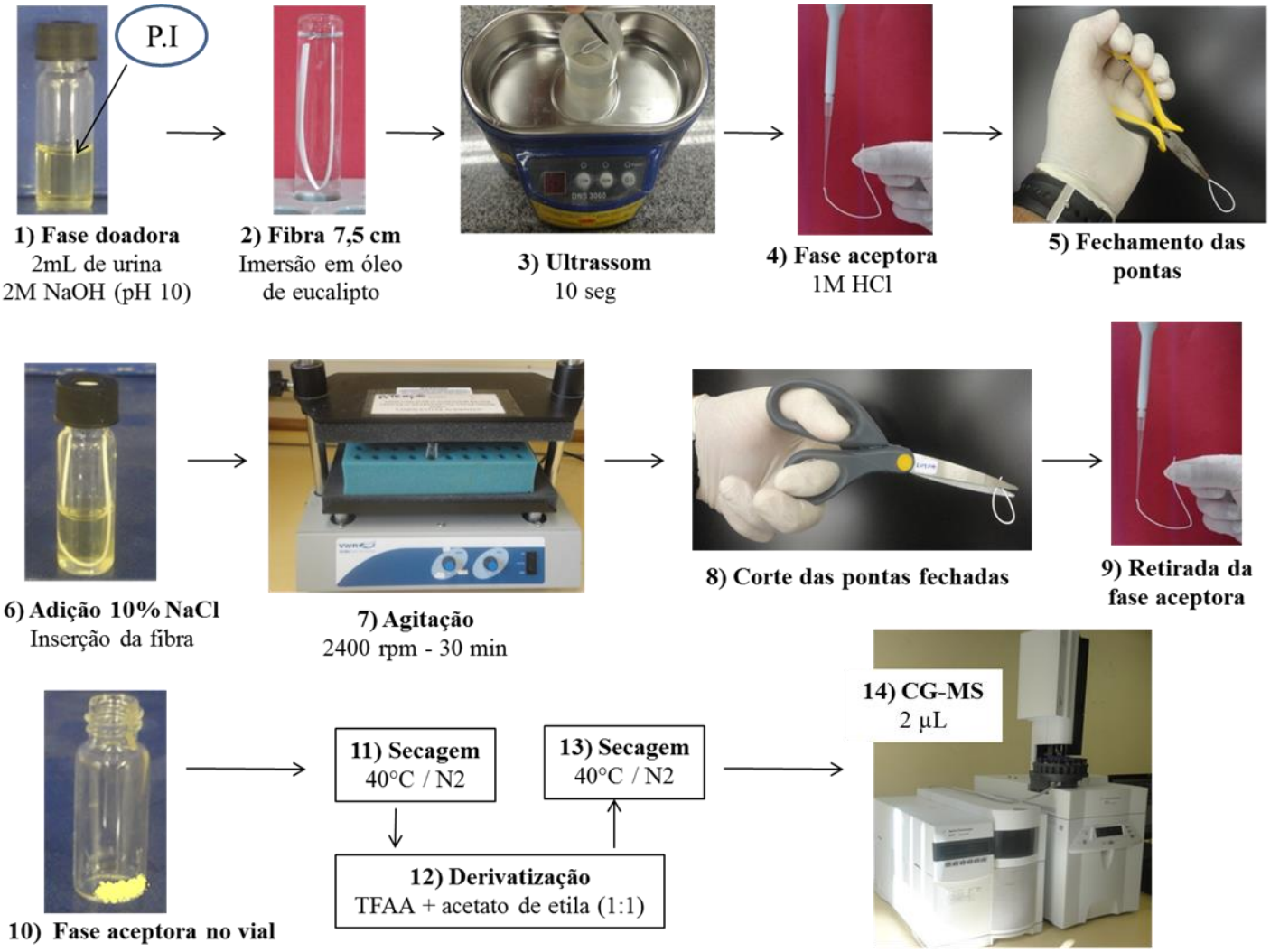


Figura 5 – Etapas de extração de cetamina, norcetamina e deidronorcetamina por LPME.

2.5. Validação do método para determinação de cetamina, norcetamina e deidronorcetamina por LPME

A validação dos métodos analíticos é um aspecto importante da qualidade dos processos em laboratórios analíticos (UNODC, 2009). Ela é essencial para assegurar que os parâmetros analíticos estão de acordo com uma especificação pré-determinada, para tanto, os métodos devem ser testados a fim de demonstrar seu adequado funcionamento, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias (UNODC, 2009). A validação do método ocorre após otimização e foram avaliados os seguintes parâmetros:

- Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ), linearidade, recuperação, seletividade, robustez, precisão intra e interensaio e exatidão.

Em primeiro lugar, o limite do branco (LB) foi estabelecido para garantir um LD confiável. O LB é maior concentração aparente devem ser encontrados quando 60 replicatas de 20 diferentes amostras isentas de analito são testados. Os dados são baseadas em uma equação descrita como LB = média da matriz isenta de analito + 1,645 multiplicada pelo desvio padrão dos brancos.

O LD pode ser definido como a menor concentração de analito em uma amostra do qual pode ser distinguida de forma viável a partir do LB. O procedimento para definir LD é similar ao LB, utilizando baixas concentrações do analito e é expressa na equação LD = LB + 1,645 multiplicada pelo desvio padrão da concentração mais baixa distinguível. Quando usado 1,645 de desvio padrão, não mais do que 5% dos valores devem ser menores do que o LB. O LD é definido quando observado que os valores de LD da amostra se encontram neste critério.

O LQ pode ser definido como a menor concentração de uma amostra que pode ainda ser quantificado com precisão e exatidão aceitável. Os critérios de aceitação para estes dois parâmetros em LQ foram de 20% (RSD) para precisão e 80-100% de exatidão (PETERS *et al*., 2007; ARMBRUSTER *et al*., 2008).

A linearidade foi estabelecida por meio da análise de amostras de urina em seis replicatas contendo todos os analitos de interesse. Neste aspecto, cetamina, norcetamina e deidronorcetamina foram avaliados nas concentrações de 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 25 e 50 ng/mL.

A seletividade/especificidade foi avaliada utilizando 10 diferentes urinas livres de drogas e 14 potenciais compostos que podem interferir na análise. As urinas passarão pelo processo de extração conforme descrito no tópico 2.4 para avaliação de substâncias endógenas. O tempo de retenção dos picos de interesse foi comparado com aqueles oriundos da matriz biológica que sofreu a adição dos analitos na concentração do LQ. O método também avaliou potenciais interferentes através da análise de urinas fortificadas com 1000 ng/mL de anfetamina, metanfetamina, benzoilecgonina, 11-nor-9-carboxi-tetrahidrocanabinol, diazepam, morfina, codeína, ácido acetilsalicílico, nafazolina e cafeína. O critério de aceitação deste ensaio foi a ausência de substâncias interferentes no tempo de retenção dos analitos de interesse e seus respectivos padrões internos.

A robustez é uma medida que avalia a capacidade do método em permanecer intacto através de pequenas alterações que podem ocorrer durante análises. Neste caso, possíveis diferenças utilizando óleo essencial de eucalipto oriundo de diferentes fabricantes foram avaliados. Dois grupos de urina contendo concentrações de 1.5, 12.5 e 40 ng/mL de todos os analitos (seis replicatas cada concentração) foram analisados de acordo com o método descrito na seção 2.4. Em um lote de amostra utilizou-se óleo essencial de eucalipto oriundo

da empresa Mapric® (São Paulo, SP, Brasil) como solvente extrator, enquanto outro lote utilizou material vindo da empresa Natural Pharma Ltda® (São Paulo, SP, Brasil).

A precisão e exatidão dos estudos foram realizadas através da análise de amostras de urina contendo concentrações conhecidas (1,5; 12,5 e 40 ng/mL de cetamina, norcetamina e deidronorcetamina) em três dias consecutivos. As análises foram realizadas em seis replicatas para cada dia. Precisão, definida como o desvio-padrão relativo (CV%), foi determinada por repetições intra e inter-dia. As concentrações experimentais foram obtidas a partir da curva de calibração padrão. Os valores de coeficiente de variação entre as replicatas menores que 20% para as amostras na concentração mais baixa e de 15% para as concentrações mais elevadas foram considerados satisfatórios. A exatidão foi expressa como uma percentagem da concentração conhecida, ou seja, a média de concentração mensurado / concentração nominal × 100. Similar a precisão, os valores de desvio para as amostras na concentração mais baixa é 20% enquanto 15% é indicada para as concentrações mais elevadas.

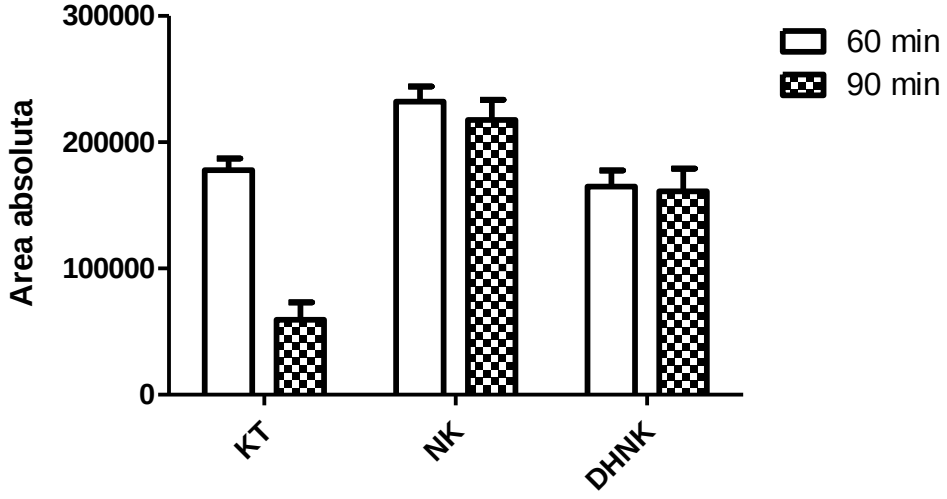
Os estudos de recuperação foram realizados através da preparação de dois conjuntos de amostras de urina. Um conjunto de amostras (conjunto A), que consiste em três concentrações (1,5; 12,5 e 40 ng/mL de cetamina, norcetamina e deidronorcetamina), que foram analisadas em seis replicatas para cada concentração de acordo com o método descrito na seção 2.4. O segundo conjunto (conjunto B), as amostras também são compostas por seis réplicas para cada concentração de (1,5; 12,5 e 40 ng/mL de cetamina, norcetamina e deidronorcetamina). No entanto, para o conjunto B, os analitos foram adicionados nas amostras após o procedimento da LPME. A recuperação absoluta foi avaliada por comparação da resposta média obtida para o conjunto A e a resposta do conjunto B (100%). Baseando-se no Guia de Validação de Métodos Analíticos da UNODC (UNODC, 2009), a quantidade de analito recuperada não é fator crítico para aprovação do teste, desde que os demais parâmetros da validação alcancem os propósitos desejados.

3. RESULTADOS

3.1. Otimização da derivatização de cetamina, norcetamina e deidronorcetamina

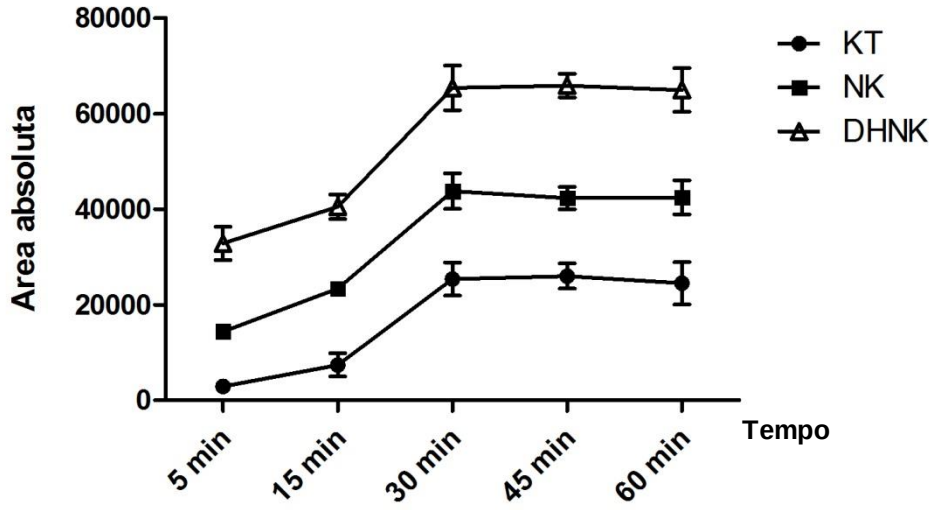
Os resultados indicam que a melhor temperatura e tempo para derivatizar cetamina, norcetamina e deidronorcetamina foram a 60°C durante 30 minutos conforme **Gráfico 1 e 2**.

Gráfico 1 – Temperatura para derivatização de cetamina, norcetamina e deidronorcetamina com TFAA.



KT, cetamina; NK, norcetamina; DHNK, deidronorcetamina

Gráfico 2 – Tempo de derivatização para cetamina, norcetamina e deidronorcetamina com TFAA.

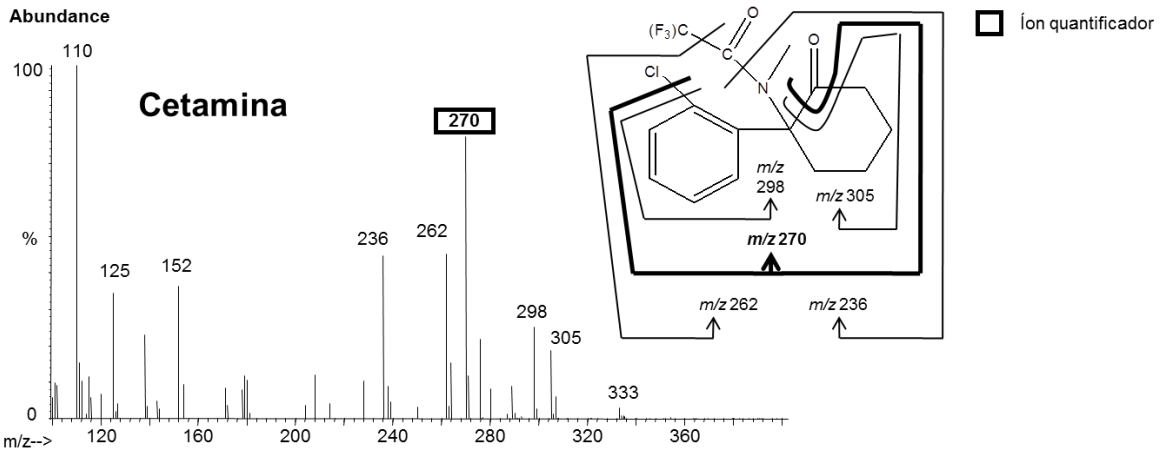


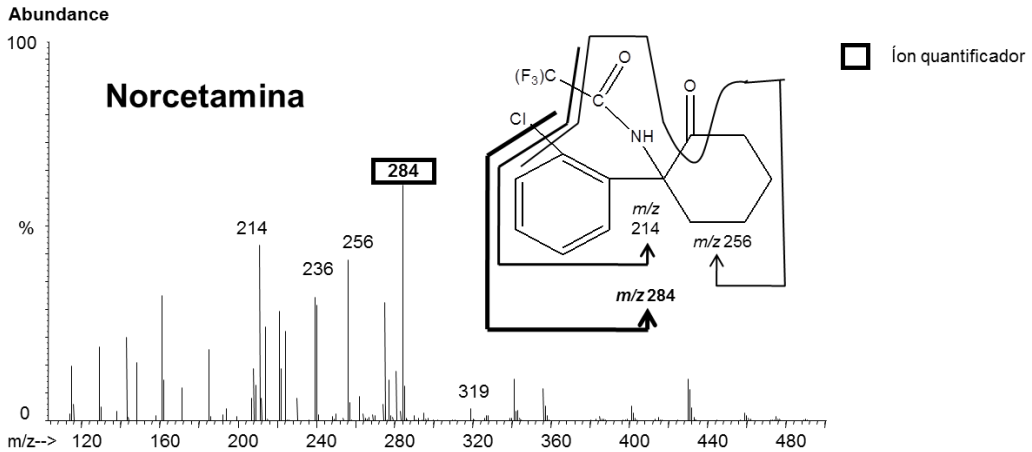
KT, cetamina; NK, norcetamina; DHNK, deidronorcetamina

Os analitos obtiveram maiores áreas e picos com melhores resoluções e os íons a serem monitorados estão na **Tabela 5**, enquanto a fragmentação de massas das moléculas está demonstrada na **Figura 6**.

Tabela 5 – Íons qualificadores e quantificadores de cetamina, norcetamina e deidronorcetamina e seus respectivos padrões internos deuterados (*m/z*) obtidos após derivatização com TFAA

Analito	Íons qualificadores	Íons quantificadores
Cetamina	262, 305	270
Norcetamina	256, 214	284
Deidronorcetamina	317, 282	214
Cetamina-D_4	266, 309	274
Norcetamina-D_4	288, 260	288





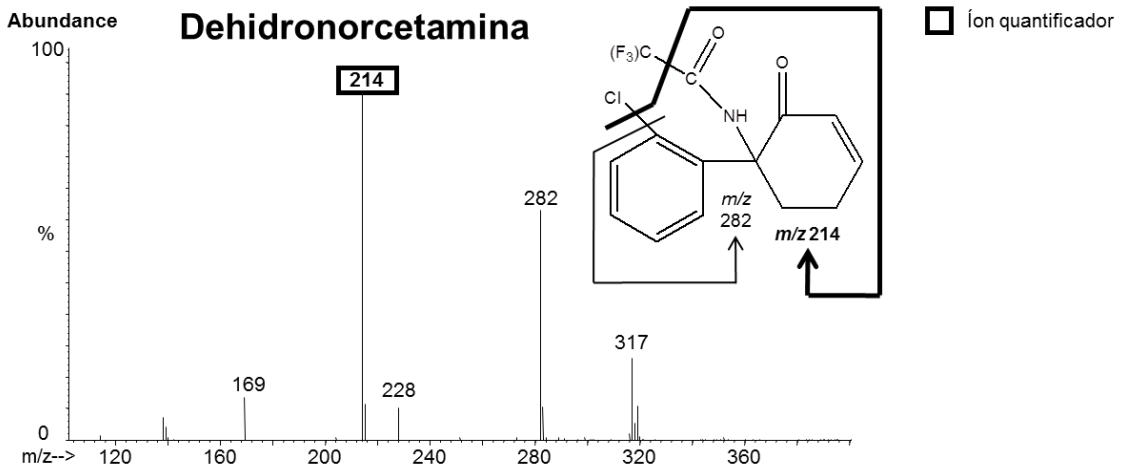


Figura 6 – Fragmentação de massas de cetamina, norcetamina e deidronorcetamina após derivatização com TFAA.

3.2. Otimização do método proposto para cetamina, norcetamina e deidronorcetamina

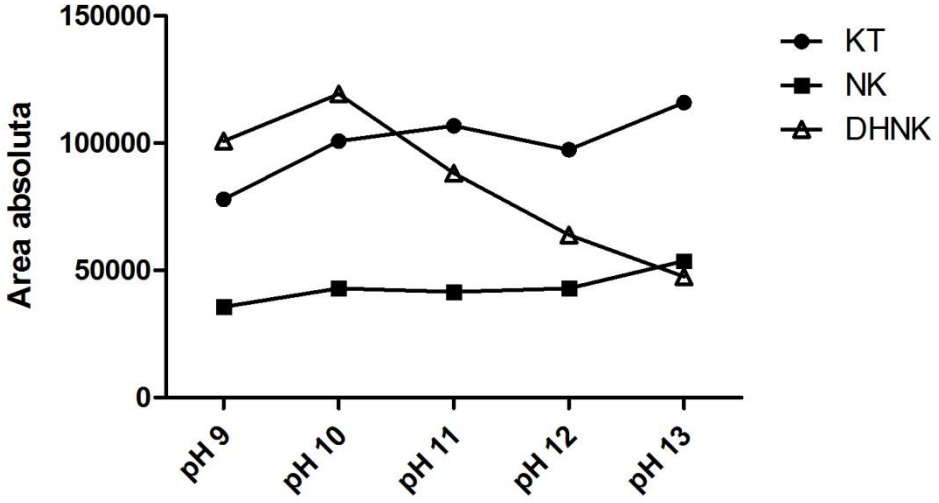
3.2.1. Fase doadora, fase aceptora, efeito *salting out*, solventes, óleos naturais, frequência e tempo de agitação

O estudo do comportamento de cetamina, norcetamina e deidronorcetamina em relação ao pH da fase doadora (urina), partiu de pH 9 ao 13, indicando que o pH 10 foi o melhor para os analitos (**Gráfico 3**). Como o experimento enfatizou a LPME-trifásica, avaliou-se de 0,01 a 1 mol/L de HCl. A concentração de 1 mol/L de HCl permitiu um alto grau de extração para os analitos de interesse.Verificou-se que a partir de uma solução de 2 mol/L de HCl, cetamina apresenta drástica redução de sua area/altura (dado não apresentado). Os resultados estão demonstrados no **Gráfico 4**.

Para avaliação do efeito *salting out*, diferentes concentrações de NaCl foram analisadas (1 a 20%) e a adição de 10% NaCl proporcionou um aumento da áreas dos analitos (**Gráfico 5**). Entre os solventes, éter diexílico foi o melhor solvente (**Gráfico 6**). Após a definição de éter diexílico como melhor solvente orgânico, avaliou-se a capacidade extrativa de óleos naturais como eucalipto, menta, canola, soja, cravo e oliva em comparação ao éter dihexílico conforme demonstrado no **Gráfico 7**. Dentre estes, o óleo essencial de eucalipto apresentou melhores resultados e com homogenicidade entre os analitos analisados.

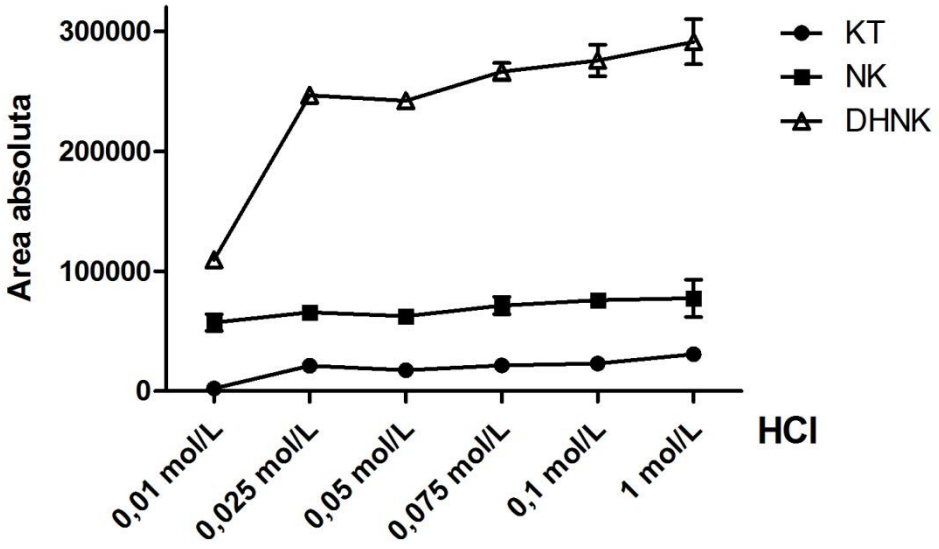
Entre as variações na agitação, 800 rpm foi avaliado em um agitador de eppendorff e o restante no multi-vortex modelo VWR VX-2500. A agitação com 2400 rpm é o melhor ponto para promover a extração (**Gráfico 8**) com um tempo de 30 minutos de extração conforme demonstrado no **Gráfico 9**.

Gráfico 3 – Fase doadora para cetamina, norcetamina e deidronorcetamina.



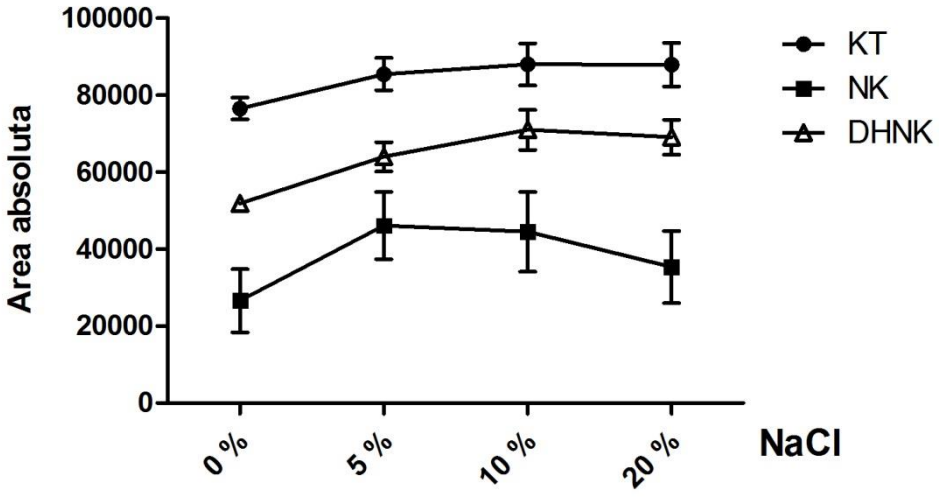
KT, cetamina; NK, norcetamina; DHNK, deidronorcetamina

Gráfico 4 – Fase aceptora para cetamina, norcetamina e deidronorcetamina.



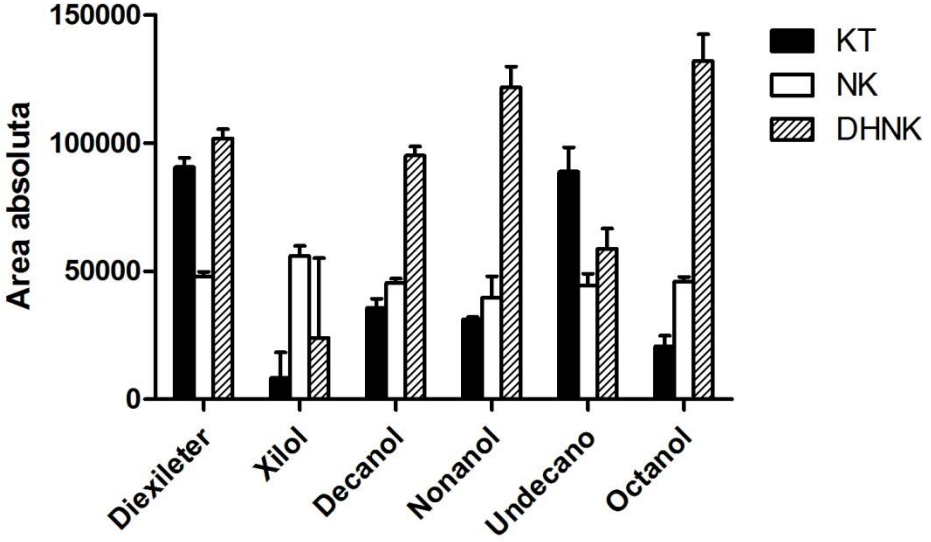
KT, cetamina; NK, norcetamina; DHNK, deidronorcetamina

Gráfico 5 – Efeito *salting out* para cetamina, norcetamina e deidronorcetamina.



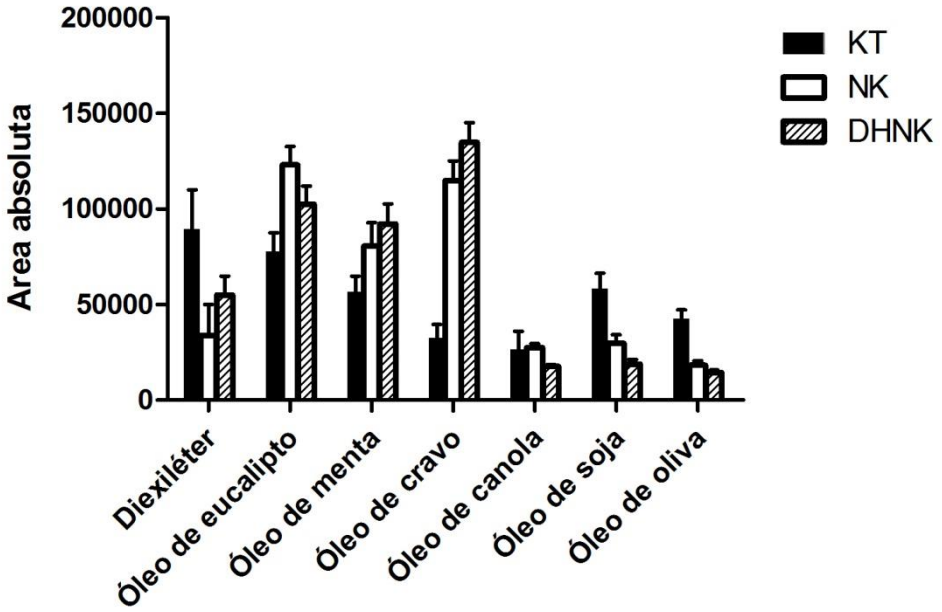
KT, cetamina; NK, norcetamina; DHNK, deidronorcetamina

Gráfico 6 – Solvente orgânico para cetamina, norcetamina e deidronorcetamina em LPME.



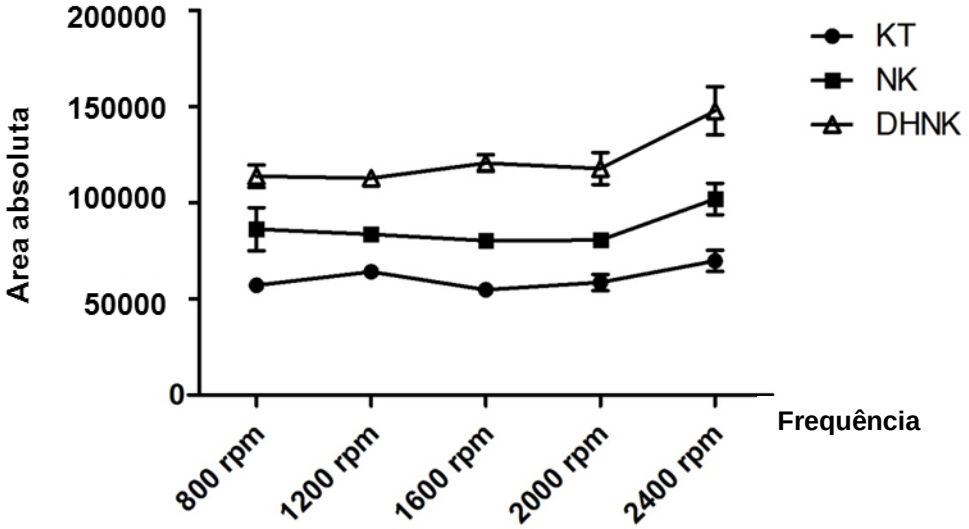
KT, cetamina; NK, norcetamina; DHNK, deidronorcetamina

Gráfico 7 – Óleo natural para cetamina, norcetamina e deidronorcetamina em LPME.



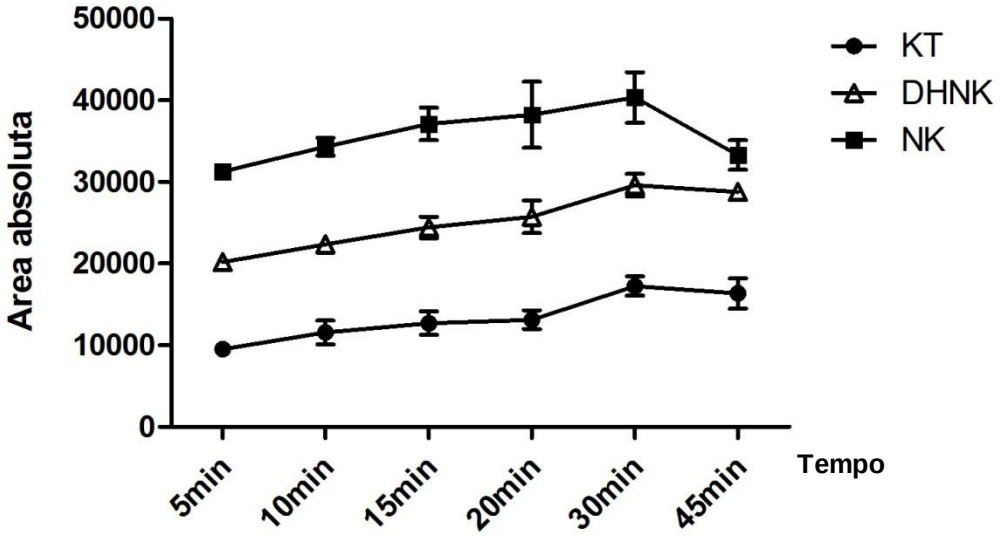
KT, cetamina; NK, norcetamina; DHNK, deidronorcetamina

Gráfico 8 – Frequência de agitação para cetamina, norcetamina e deidronorcetamina.



KT, cetamina; NK, norcetamina; DHNK, deidronorcetamina

Gráfico 9 – Tempo de agitação para cetamina, norcetamina e deidronorcetamina.



KT, cetamina; NK, norcetamina; DHNK, deidronorcetamina

3.3. Validação do método para cetamina, norcetamina e deidronorcetamina por LPME

A validação do método para cetamina e seus produtos de biotransformação foi realizada após otimização da extração dos analitos. O trabalho tem como foco a detecção e quantificação de baixos níveis de cetamina e seus produtos de biotransformação. Os resultados da validação estão na **Tabela 6.**

Tabela 6 - Paramêtros de confiança do método validado para determinação de cetamina, norcetamina e deidronorcetamina em amostra de urina.

Parametros de confiança	Cetamina	Norcetamina	Deidronorcetamina
Linearidade (ng/mL)	*Y*= 0,1103x+0,0032 (r^2= 0,9996)	*Y*= 0,1022x+0,0513 (r^2= 0,9985)	*Y*= 0,084x+0,1149 (r^2= 0,9936)
Recuperação (%)			
C1	101,0	94,3	69,7
C2	91,1	88,5	68,1
C3	85,2	86,9	64,6
LD (ng/mL)	0,25	0,10	0,10
LQ (ng/mL)	0,50	0,50	0,50
Precisão intra-dia (CV%)			
C1	7,5	9,2	9,3
C2	10,1	6,7	13,5

C3	2,9	4,7	9,9
Precisão inter-dia (CV%)			
C1	9,1	6,4	16,9
C2	7,3	5,9	9,8
C3	3,0	3,6	14,1
Exatidão (%)			
C1	108,0	105,4	118,9
C2	88,3	92,0	106,3
C3	99,0	94,9	111,7
Integridade da diluição			
Precisão (CV%)			
10 vezes	0,9	1,7	7,0
100 vezes	2,0	8,0	10,3
Exatidão (%)			
10 vezes	95,9	95,4	86,2
100 vezes	92,6	93,3	88,7

C1, 1,5 ng/mL; C2, 12,5 ng/mL; C3, 40 ng/mL; LD, limite de detecção; LQ, limite de quantificação; CV%, coeficiente de variação; 10 vezes, 350 ng/mL; 100 vezes, 3500 ng/mL;

O método demonstrou ser seletivo/específico para cetamina, norcetamina e deidronorcetamina, pois não houve picos interferentes de substâncias endógenas e/ou exógenas no tempo de retenção do composto de interesse. O teste de robustez demonstrou diferenças menores do que 20% (83,4-112,1%) que foram observados entre amostras analisadas de óleo essencial de eucalipto de 2 diferentes fornecedores em 3 concentrações diferentes para todos os analitos.

A linearidade foi realizada com sucesso em um intervalo de concentração de 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 25 e 50 ng/mL. Devido à possibilidade de obtermos amostras de urina com altas concentrações de cetamina e seus produtos de biotransformação, realizou-se a validação da diluição. Adicionou-se cetamina, norcetamina e deidronorcetamina nas concentrações de 3500 e 350 ng/mL em urina isenta de drogas de forma separada e diluem-se as amostras nas proporções de 1/100 e 1/10 com uma urina branca respectivamente para obter uma concentração final de 35 ng/mL para ambas as diluições. Posteriormente foi efetivado o

processo de extração com uma curva de calibração. Os resultados obtidos ficaram entre 86.20 to 95.90% de exatidão o CV% foi menor que 15% para todos analitos.

O método foi aplicado em amostras reais de indivíduos que administram cetamina ou suspeitam do uso deste agente. Um caso trata-se de uma tentativa de suicídio e um caso de golpe "Boa noite Cinderela". Todos apresentaram positividade para cetamina, norcetamina e deidronorcetamina na urina conforme **Tabela 7**.

Tabela 7 – Determinação de cetamina, norcetamina e deidronorcetamina em urina de casos reais

Amostra de urina	Cetamina (ng/mL)	Norcetamina (ng/mL)	Deidronorcetamina (ng/mL)
Suicídio	87,4	5805	8761
"Boa noite Cinderela"	7,3	5,3	6,8

Os cromatogramas da amostra de referência negativa com padrões internos, dos analitos juntos com os padrões internos, e a amostra real estão demonstrados na **Figura 7**.

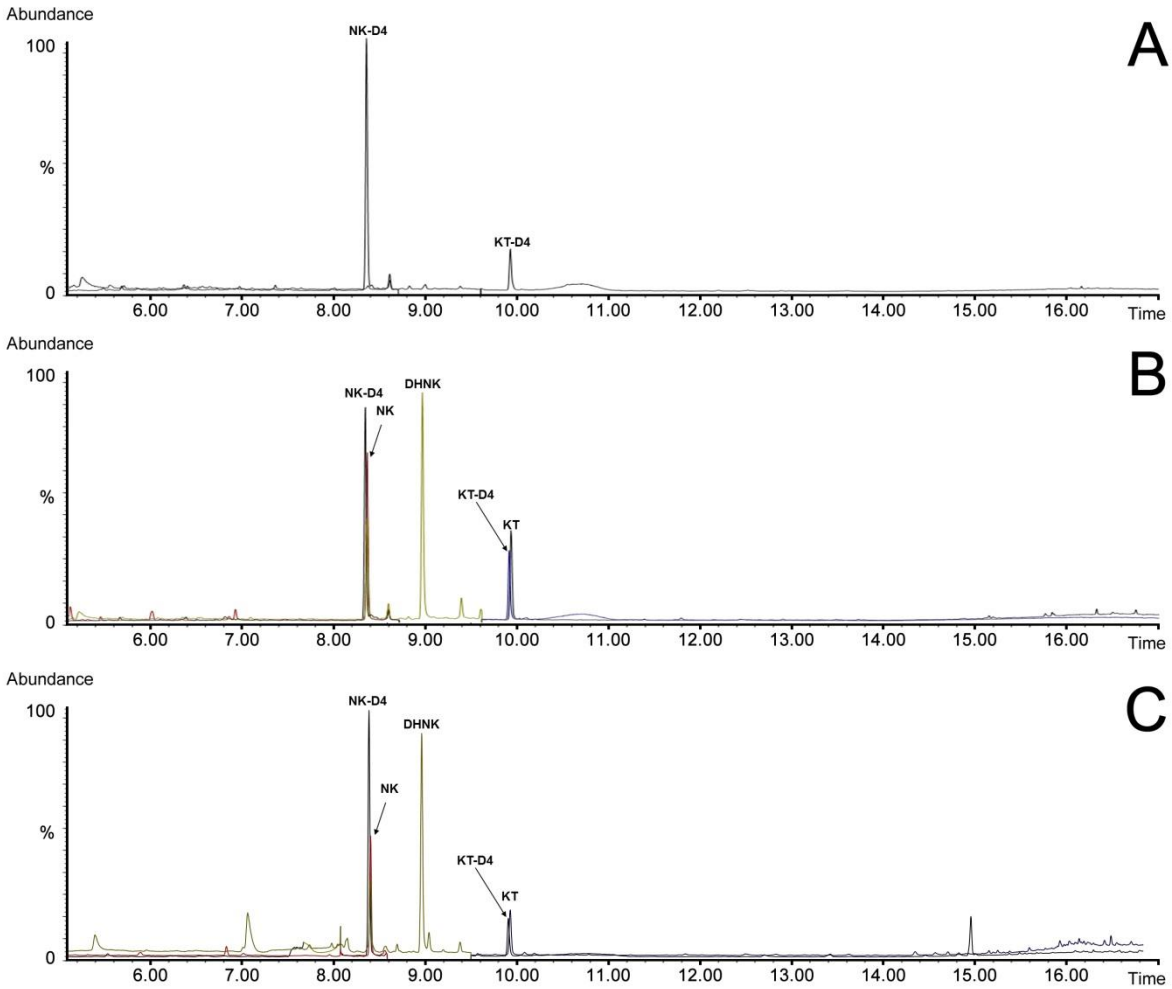


Figura 7 - Cromatograma obtido através da análise de cetamina, norcetamina e deidronorcetamina em urina usando LPME. (A) Urina branco; (B) Amostra de urina com adição de 10 ng/mL of KT, KT-D_4, NK, NK-D_4 e DHNK; (C) Amostra de urina de um caso real 7,3; 5,3; 6,8 ng/mL de KT, NK and DHNK respectivamente. KT, cetamina; NK, norcetamina; DHNK, deidronorcetamina.

4. DISCUSSÃO

Em relação à cetamina e seus principais produtos de biotransformação, a maior parte dos métodos compreende LLE ou SPE. Estas técnicas requerem volumes relativamente grandes de solventes orgânicos que podem ser tóxicos para o analista e ambiente. Na tentativa de diminuir os custos e danos ao laboratorista e meio ambiente, a minituarização de técnicas de extração é uma opção válida do qual a LPME está inserida, obtendo resultados similares se comparado a metodologias tradicionais. O procedimento extrativo fundamentado na SPME apresenta algumas desvantagens (preço, fragilidade da fibra, tempo limitado de uso e efeito memória), enquanto a LPME, de baixo custo e robusta, não apresenta o efeito *carry over*, uma vez que as fibras ocas podem ser descartadas após cada extração devido ao seu baixo custo (PEDERSEN-BJERGAARD & RASMUSSEN, 2008).

A derivatização foi necessária para este trabalho devido à necessidade de detectar baixas concentrações para cetamina dos seus produtos de biotransformação, bem como a sobreposição dos picos cromatográficos entre cetamina e deidronorcetamina. Assim, o TFAA mostrou ser a melhor escolha como agente derivatizante devido a sua capacidade de reação com esses analitos e seu baixo custo, além de ser um reagente comum em laboratórios de análises toxicológicas (LIN & LUA, 2006). Isto permitiu a determinação de baixos níveis de cetamina, norcetamina e deidronorcetamina com uma excelente separação cromatográfica através da incorporação de 97 daltons nos analitos. As fragmentações de massas após derivatização para os analitos (**Figura 6**), assim como os íons que foram monitorados pelo modo SIM já haviam sido descritos na literatura (LIN & LUA, 2006).

O procedimento LPME trifásico concebido neste trabalho para cetamina, norcetamina e deidronorcetamina apresentou respectivamente 0,25; 0,1 e 0,1 ng/mL como seus LDs. Estes dados indicam que o método proposto é superior as outras metodologias minituarizadas (BROWN *et al.*, 2007; XIONG *et al.*, 2010), assim como é capaz de determinar valores abaixo do estabelecido pela UNODC e SOFT (UNODC, 2012; SOFT, 2014). Dependendo da configuração utilizada, há um limite relacionado com o número de amostras que podem ser processadas no mesmo lote. No estudo aqui proposto, utilizou-se a configuração em forma de

U, sem qualquer suporte que ligue as extremidades de fibra oca. Devido à simplicidade da LPME, muitas amostras podem ser processadas ao mesmo tempo, proporcionando um elevado rendimento da amostra, semelhante a outros trabalhos (ALMEIDA *et al.*, 2012; PANTALEÃO *et al.*, 2012).

Devido ao caráter básico da cetamina, norcetamina e deidronorcetamina, as amostras de urina foram ajustados de pH 9 a 13 com uma solução de 2 mol/L de NaOH. Como pode ser visto no **Gráfico 3**, quando o pH da amostra de urina foi aumentada de 10 a 13, as respostas para deidronorcetamina diminuiu dramaticamente, enquanto que para cetamina e norcetamina a intensidade do sinal mantida quase constante. Este fenômeno pode ser explicado pelos valores de pKa de cetamina (7,8) e norcetamina (6,7). Por outro lado, foi observados sobre o sinal de diminuição de deidronorcetamina a partir do pH 11, semelhante aos achados de Sams e Pizzo (1987). Provavelmente isso ocorre devido à alfa-beta insaturação da cetona presente no anel ciclohexenona da deidronorcetamina. Nesta condição, NaOH atua como nucleófilo do qual reage no carbono beta e gera enolato, um íon intermediário estabilizado por ressonância entre a carga negativa do carbono alfa e o grupo carbonil (MC MURRY, 2005). Esta peculiar característica da deidronorcetamina poderia ter uma influência na baixa capacidade de extração desta molécula em um pH $\geq$ 11.

Tomando em consideração a fase aceptora, uma maior concentração que 0,025 mol/L de HCl aumentou ligeiramente a resposta até 1 mol/L (**Gráfico 4**), pois ocorre uma maior protonação do grupamento amina destas substâncias e consequentemente aprisionamento dos analitos na solução ácida. No entanto, concentrações superiores a 1 mol/L produziu uma redução dramática da área do pico de resposta e cetamina irregular para norcetamina e deidronorcetamina (dado não demonstrado). Provavelmente, a elevada concentração de solução de ácido causada pela degradação destas moléculas. Portanto, 1 mol/L de HCl foi escolhido como fase aceptora.

Diferentes solventes orgânicos foram testados para a LPME, sendo que o melhor resultado foi adquirido com éter dihexílico (**Gráfico 6**). Porém, compostos ecologicamente corretos têm ganhado destaque no meio cientifíco, inclusive na área analítica. Neste aspecto, a LPME, especialmente o sistema trifásico, permite que essa técnica extrativa possa substituir solventes orgânicos por óleos naturais em uma abordagem conhecida como *Green chemistry* (PEDERSEN-BJERGAARD & RASMUSSEN, 2004; PEDERSEN-BJERGAARD & RASMUSSEN, 2008). Assim, quando éter diexílico foi comparado com diversos óleos naturais, verificou-se que éter dihexílico foi o melhor solvente para cetamina, enquanto norcetamina e deidronorcetamina foram melhores extraídos usando óleo essencial de

eucalipto (**Gráfico 7**). Provavelmente, a menor viscosidade do óleo essencial de eucalipto permite uma maior difusão destes analitos em toda a fase orgânica quando sofrem o processo de agitação. Esta hipótese já havia sido descrita por Pedersen-Bjergaard e Rasmussen (2004). Desta forma, optamos pelo óleo essencial de eucalipto, que além de ter obtido melhores resultados, proporcionou um procedimento que não agride o laboratorista e o meio ambiente.

A partição de equilíbrio dos analitos entre fase doadora e aceptora pode ser estabelecida mais rapidamente com a agitação do sistema LPME (PEDERSEN-BJERGAARD & RASMUSSEN, 2004). No presente trabalho, o efeito da velocidade de agitação demostraram que as áreas de pico de cetamina, norcetamina e deidronorcetamina foram aumentadas a 2400 rpm (**Gráfico 8**). O **Gráfico 9** mostra o efeito do tempo de agitação que demonstrou um aumento da extração até 30 min. No tempo de 45 min, todos os analitos apresentaram uma diminuição na resposta. Alguns trabalhos relatam que a velocidade da agitação pode prejudicar a LPME, pois o solvente impregnado nos poros da fibra pode ser deslocado de seus sítios e assim não promover a extração do composto que está na matriz (OLIVEIRA *et al*., 2008; PEDERSEN-BJERGAARD & RASMUSSEN, 2008). Isto pode ter ocorrido no caso do óleo essencial de eucalipto, indicando que este é mais suscetíveis à fortes vibrações. Além disso, o efeito *salting out* indicou que a adição de 10% (m/v) de NaCl apresentou maior capacidade extrativa, semelhante ao trabalho de Xiong e colaboradores (2010), aumentando força iônica da fase doadora e consequentemente maior afinidade dos analitos pela fase orgânica.

Na literatura científica, apenas duas publicações recentes consideraram a utilização de técnicas minituarizadas (SPME e LPME) para análise de cetamina em urina (BROWN *et al*., 2007; XIONG *et al*., 2010). Contudo, ambos os trabalhos não analisaram norcetamina e deidronorcetamina, os principais produtos de biotransformação. O estudo de Brown e colaboradores (2007) baseou-se na determinação de drogas recreativas (GHB, cetamina, metanfetamina e metilenodioximetanfetamina) em urina através de SPME (SPME-GC-MS), enquanto Xiong e seu grupo (2010) extrairam anfetamina, metanfetamina, metilenodioxianfetamina, metilenodioximetanfetamina, cafeína e cetamina por meio de LPME bifásico e posterior análise por GC-FID. Os métodos relatados não apresentam um LD próximo ao estabelecido pela UNODC e SOFT (UNODC, 2012; SOFT, 2014), objetivo que foi alcançado no presente método validado.

Os resultados da validação do método para cetamina, norcetamina e deidronorcetamina estão descritos na **Tabela 6**. Os LDs e LQs obtidos para os analitos foram abaixo do limite de detecção máximo recomendado (10 e 1 ng/mL, respectivamente) estabelecido pela UNODC e

SOFT (UNODC, 2012; SOFT, 2014). A ausência de picos interferentes de composto endógenos e exógenos no tempo de retenção dos analitos de interesse garante o parâmetro seletividade/especificidade. Em relação ao teste de robustez, os resultados demonstram uma diferença menor que 20% (83,4-112,1%) entre amostras analisadas por óleos essenciais de eucalipto oriundo de 2 diferentes fornecedores em 3 niveis de concentração, o que denota permutação entre este tipo de solvente. Os valores de recuperação variaram entre 64,6-101%, o que pode ser considerado excelente. Esse resultado foi possível devido à fácil difusão dos analitos pelo óleo essencial de eucalipto e principalmente a ionização do único grupamento amina destes compostos, o que garantiria um eficiente aprisionamento das substâncias. Além disso, os demais parâmetros (precisão, exatidão e linearidade) estão dentro do estabelecido pelo guia da UNODC (UNODC, 2009).

A maioria dos trabalhos para determinação de cetamina, norcetamina e deidronorcetamina em urina não utilizam a etapa de hidrólise, sendo que poucos estudos empregam esse procedimento (LIN & LUA, 2004; MOADELL *et al.*, 2010). Neste sentido, Lin e Lua (2004) analisaram 24 amostras de urina (com e sem procedimento de hidrólise) e definiram uma razão entre a porção hidrolisada (H) e não hidrolisada (U) para cada analito. Seus achados demostram que a razão H/U foi 0,85-1,85; 1,05-2,22; 0,80-1,87 para cetamina, norcetamina e deidronorcetamina, respectivamente, indicando que a hidrólise seria necessária para melhorar a capacidade de detecção destes analitos na urina. No entanto, esse procedimento é mais uma etapa a ser efetuada no processo de extração e que pode ser demorada. Neste aspecto, o método desenvolvido por LPME-trifásico usando óleo essencial de eucalipto demostrou que a clivagem hidrolítica não é necessária para atingir o limite de detecção recomendado (1 e 10 ng/mL), conforme estipulado pela UNODC e SOFT e para os analitos alvo (cetamina e norcetamina) (UNODC, 2012; SOFT, 2014) e também para deidronorcetamina. Além disso, essa metodologia foi superior a muitos outros trabalhos que utilizam outras formas de extração de drogas demonstrando a eficácia do método conforme verificado na **Tabela 8**. Sob estas condições, pelo menos 40 amostras de urina podem ser concluídas em menos de 3 horas por apenas um analista, considerando-se todo o procedimento de preparação da amostra até a injecção no sistema cromatográfico.

Tabela 8 - Resumo das metodologias analíticas para determinação de cetamina, norcetamina e deidronorcetamina em urina.

Analitos	**Extração**	**Detecção**	**LQ (ng/mL)**	**Referência**
KT	SPME	LC-UV	21.30	FAN *et al.*, 2004

KT e NK	LLE	GC-MS	5 e 10	LIN & LUA, 2004
KT e NK	LLE	GC-MS	13 e 9	CHOU *et al.*, 2004
KT, NK e DHNK	SPE	GC-MS	1.5	HUANG *et al.*, 2005
KT, NK e DHNK	LLE	GC-MS	20, 20 e 30	LIN & LUA, 2006
KT e NK	SPE	MECK	5	JEN *et al.*, 2006
KT, NK e DHNK	PVDF	LC-APCI/MS	3.17, 1.60 e 1.10	CHEN *et al.*, 2007
KT, NK e DHNK	SPE	GC-MS	15, 10 e 20	CHENG *et al.*, 2007
KT e NK	SPE	LC-MS/MS	0.50 e 20	RAMIREZ *et al.*, 2007
KT	SPME	GC-MS	500	BROWN *et al.*, 2007
KT e NK	SPE	GC-PCI/MS	50	KIM *et al*, 2008
KT e NK	SPE	UPLC-MS/MS	0.10	PARKIN *et al.*, 2008
KT	LPME	GC-FID	30	XIONG *et al.*, 2010
KT, NK e DHNK	SPE	GC-MS	25, 30 e 50	LEE *et al.*, 2011
KT	SPE	LC-MS/MS	1.60	NEMA *et al.*, 2011
KT	LLE	GC-MS	10	LIAN *et al.*, 2012

SPME, microextração em fase sólida; LLE, extração líquido-líquido; SPE, extração em fase sólida; PVDF, difluoreto de polivinilideno; LPME, microextração em fase líquida-fibra oca; GC-MS, cromatografia gasosa-espectrometria de massa; PCI, ionização química positiva; LC-UV, cromatografia líquida-ultravioleta; FID, detector de ionização em chama; UPLC, cromatografia líquida de ultra performance; MECK, cromatografia eletrocinética micelar; KT, cetamina; NK, norcetamina; DHNK, deidronorcetamina.

5. CONCLUSÕES

O método LPME/GC-MS desenvolvido e validado dentro dos parâmetros estabelecidos pela UNODC (UNODC, 2009) para cetamina e seus principais produtos de biotransformação em amostras de urina demonstrou resultados satisfatórios. Se comparado a outros métodos, a presente metodologia revelou vantagens tais como simplicidade, baixo custo e alta sensibilidade. Além disso, nenhum solvente orgânico foi requisitado para a extração devido à utilização de óleo essencial de eucalipto como solvente extrator, indicando um método bioanalitico ecologicamente correto.

CAPÍTULO II

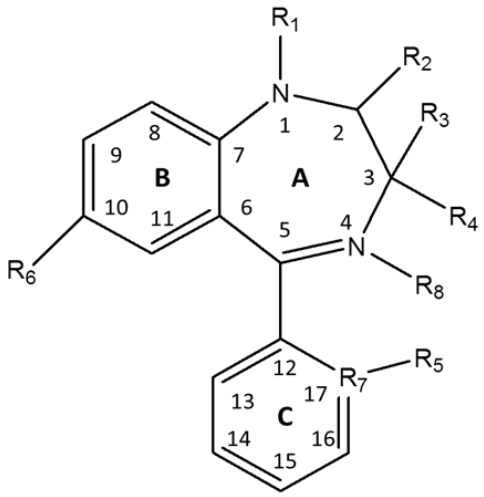
BENZODIAZEPÍNICOS

1. INTRODUÇÃO

Benzodiazepínicos (BDZ) são fármacos ansiolíticos utilizados como sedativos, hipnóticos, relaxantes musculares e apresentam atividade anticonvulsivante, sendo os medicamentos mais prescritos e consumidos do mundo (ALMEIDA & LIMA, 2008). O grande número de prescrições se dá em decorrência da sua relativa margem de segurança quando comparada a outros fármacos semelhantes (ex.: barbitúricos) (HEISHMAN, 1998). Clonazepam (CZ), bromazepam (BZ) e alprazolam (AZ) estão entre os cinco princípios ativos mais vendidos no Brasil (ANVISA, 2011), sendo que somente na cidade de São Paulo estima-se que 20% da população utilizem benzodiazepínicos (POYARES *et al.*, 2005).

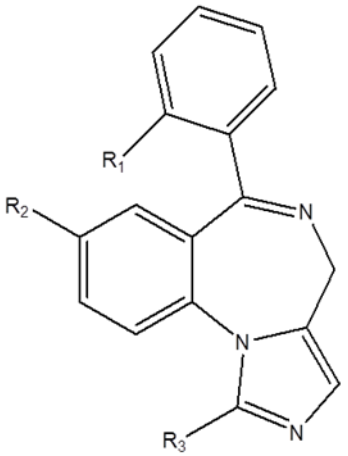
De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), estes medicamentos estão enquadrados na Lista-B1 de substâncias psicotrópicas sujeita a Notificação de Receita "B" conforme a Resolução de Diretoria Colegiada n° 36 de agosto de 2011 (RDC n° 36) (ANVISA, 2011). Estes fármacos são bases fracas, entretanto apresentam uma ampla faixa de pKa e são classificadas em 3 grupos: 1,4-benzodiazepínicos; triazolobenzodiazepínicos; 1,5-benzodiazepínicos, conforme a **Figura 8** (GREENBLATT *et al*, 1979; LEBEAU & MOZAYANI, 2001; CHÈZE *et al.*, 2004; KINTZ *et al*, 2004; LALOUP *et al.*, 2007; ALMEIDA & LIMA, 2008; LENNESTAL *et al.*, 2008).

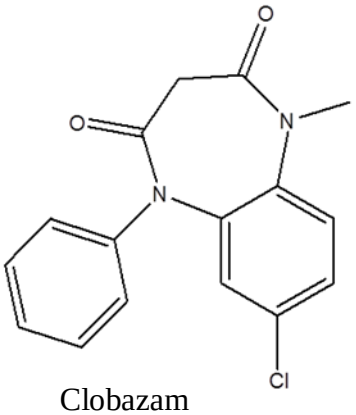
1,4-benzodiazepínicos



Benzodiazepínico	**R1**	**R2**	**R3**	**R4**	**R5**	**R6**	**R7**	**R8**
Bromazepam	-H	=O	-H	-H	-H	-Br	=N-	
Clorazepato	-H	=O	-COOH	-H	-H	-Cl	-H	
Clonazepam	-H	=O	-H	-H	-Cl	$-NO_2$	-H	
Clordiazepóxido	-H	$-NHCH_3$	-H	-H	-H	-Cl	-H	→ O
Diazepam	-CH3	=O	-H	-H	-H	-Cl	-H	
Flunitrazepam	-CH3	-H	-H	-H	-F	$-NO_2$	-H	
Flurazepam	$-(CH_2)_2-N(C_2H_5)_2$	=O	-H	-H	-F	-Cl	-H	
Lorazepam	-H	=O	-OH	-H	-Cl	-Cl	-H	
Medazepam	-CH3	-H	-H	-H	-H	-Cl	-H	
Nordiazepam	-H	=O	-H	-H	-H	-Cl	-H	
Nitrazepam	-H	=O	-H	-H	-H	$-NO_2$	-H	
Oxazepam	-H	=O	-OH	-H	-H	-Cl	-H	
Prazepam	$-CH_2-CH(CH_2)_2$	=O	-H	-H	-H	-Cl		
Temazepam	-CH	=O	-OH	-H	-H	-Cl	-H	

Triazolobenzodiazepínicos **1,5-Benzodiazepínicos**





Clobazam

Benzodiazepínico	R1	R2	R3
Alprazolam	-H	-Cl	$-CH_3$
Estazolam	-H	-Cl	-H
Midazolam	-F	-Cl	$-CH_3$
Triazolam	-Cl	-Cl	$-CH_3$

Figura 8 – Estrutura química de 1,4-benzodiazepínicos, triazolobenzodiazepínicos e 1,5-benzodiazepínicos

Os benzodiazepínicos exercem ação potencializadora sobre a atividade do GABA, considerado um neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central, permitindo o aumento da frequência de abertura do canal de cloreto resultando em hiperpolarização da membrana e conseqüentemente inibindo a excitação celular (ALMEIDA & LIMA, 2008; HOBBS *et al*., 1996). Todos os benzodiazepínicos podem induzir amnésia anterógrada, em maior ou menor grau, em doses terapêuticas, além de alterações negativas sobre a atividade sensorial, motora e sobre a atenção e aprendizado (GOULLÉ & ANGER, 2004). Em altas doses e associada com outros depressores do SNC, esta classe de substâncias psicoativas tem potencial de ocasionar o coma e até a morte (ALMEIDA & LIMA, 2008).

Os benzodiazepínicos apresentam diferentes valores de pKa da protonação (**Tabela 9**), sendo que em condições neutras e alcalinas, muitos desses medicamentos estão na forma não-ionizada, enquanto outros podem apresentar 2 valores de pKa. Nitrazepam (NZ) e clonazepam possuem substituinte NO_2, o que aumenta acidez do hidrogênio (R1) do N do anel benzodiazepina, demonstrando um segundo pKa em torno de 10,5.

Lorazepam (LZ) e oxazepam (OXZ) podem ser ionizados por meio de elevado pH e apresentam o segundo pKa em torno de 11,5 devido ao hidrogênio em R1 do N. Levando em consideração a formação de um grande número de benzodiazepínicos na forma não-ionizada em pH 8, o intestino é o principal sítio de absorção quando administrado via oral.

Tabela 9 – Valores de pKa e log P para benzodiazepínicos (DRUGBANK, 2008; CHEMICALIZE, 2012)

Benzodiazepínico	**pKa**	**Log P**
Alprazolam	1,4 / 8,20	2,37
Bromazepam	2,9 / 11	2,54
Clobazam	4,07	2,55
Clonazepam	1,5 / 10,5	2,41
Clorazepato	1,8 / 11,7	3,15
Clordiazepóxido	4,60	2,5
Cloxazolam	2,6 / 12,7	3,56
Diazepam	3,30	2,7
Estazolam	4,97	2,09
Flurazepam	1,9 / 8,2	2,3
Lorazepam	1,3 / 11,5	2,98
Medazepam	6,2	3,8
Midazolam	6,57	3,33
Nitrazepam	3,2 / 10,8	2,1
Nordiazepam	3,5 / 12	2,8
Oxazepam	1,7 / 11,6	2,2
Prazepam	2,7	3,7
Temazepam	10,68	2,19
Triazolam	4,32	2,89

Estes fármacos apresentam alta ligação proteica (acima de 70%), são bem distribuídos pelos tecidos orgânicos e possuem lipossolubilidade para atingir o cérebro. Estas substâncias sofrem biotransformação hepática envolvendo reações de fase I e fase II, sendo que os produtos formados podem ter atividade farmacológica similar ao composto original (CHÉZE, 2004; ALMEIDA & LIMA, 2008). Neste aspecto, destacamos o grupo dos 1,4-benzodiazepínicos, do qual se insere o diazepam, que

durante seu processo de biotransformação forma nordiazepam e oxazepam (produtos comuns a outros benzodiazepínicos). Em relação ao lorazepam, cerca de 13% do fármaco são excretados como metabólitos secundários e aproximadamente 75% deste fármaco é inativado ao conjugar-se no grupo 3-hidróxi de sua molécula com ácido glicurônico (TURFUS *et al*., 2011) (**Figura 9**).

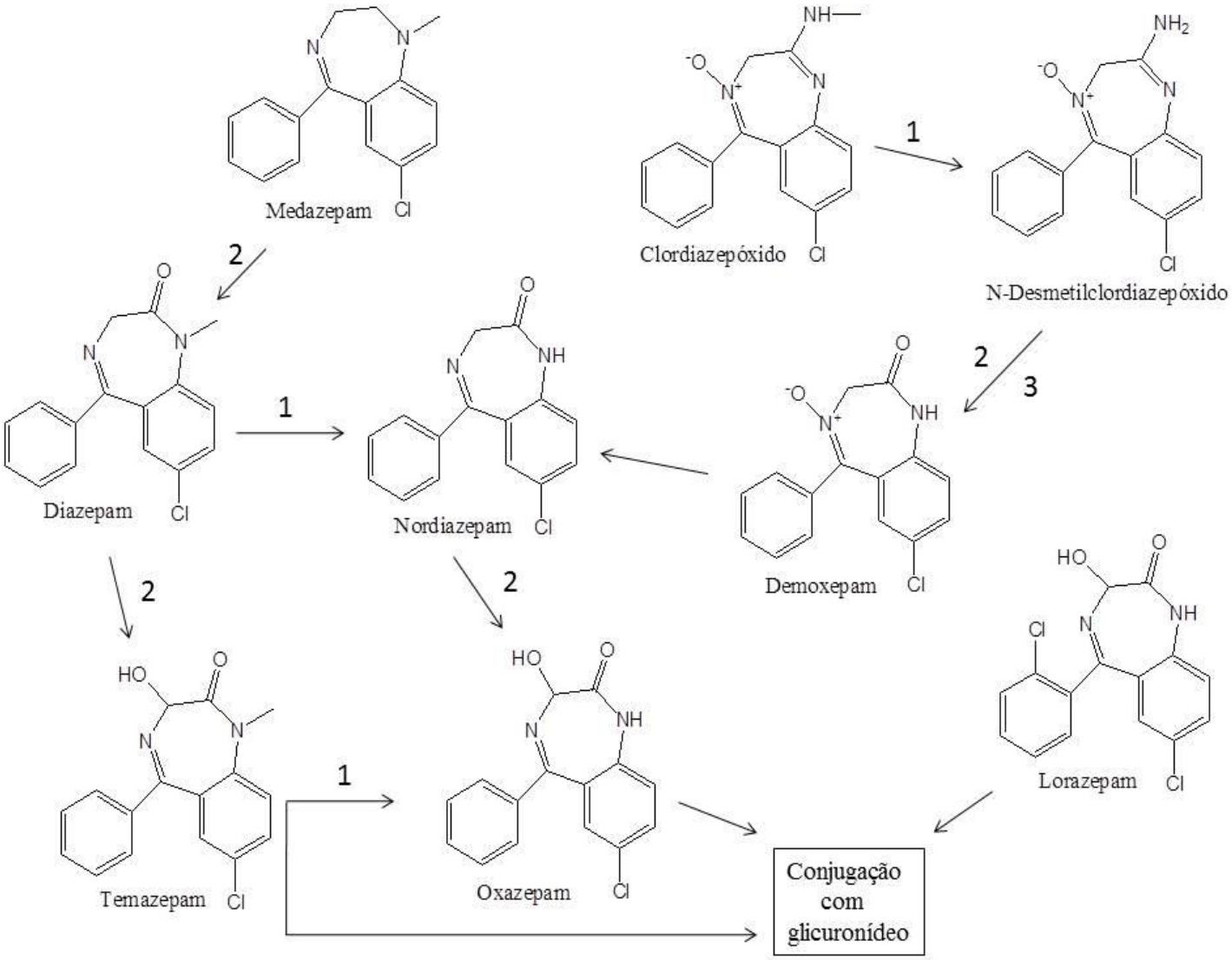


Figura 9 – Biotransformação de medazepam, diazepam, temazepam, clordiazepóxido, oxazepam e lorazepam. (1) Desmetilação (2) Oxidação (3) Desaminação

O bromazepam sofre processo de oxidação sendo biotransfomado em hidróxi-bromazepam e mesmo ocorre com midazolam (MIZ) e alprazolam (SPINELLI, 2002). Em relação à clonazepam e nitrazepam, estes sofrem ação de nitrorredutases e apresentam o grupamento 7-amino como os mais abundantes produtos de sua biotransformação (**Figura 10**).

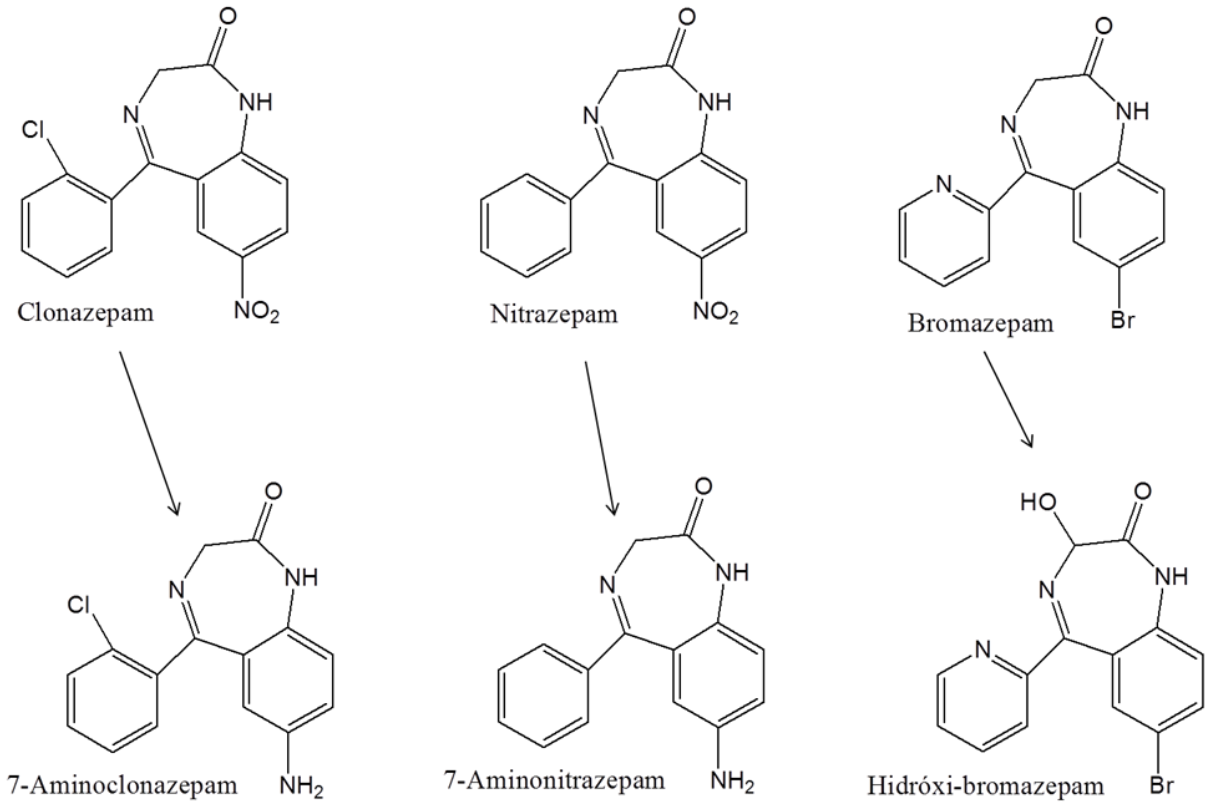


Figura 10 – Biotransformação de clonazepam, nitrazepam e bromazepam

O processo final de biotransformação do bromazepam é a conjugação com glicuronídeo e posterior excreção. De uma forma geral, em torno de 0,5% a 3% destes fármacos são eliminados inalterados na urina (STRAUGHAN *et al*., 1978; CHÈZE *et al*., 2004; ALMEIDA & LIMA, 2008). Apesar do potencial dos benzodiazepínicos como DFC, um medicamento desta classe recebe atenção especial das autoridades quando há o envolvimento de estupro e/ou roubo sob ação de alguma substância psicoativa. Trata-se do fármaco flunitrazepam (FZ), conhecido como Rohypnol®, e é considerado uma das clássicas DFC.

O flunitrazepam é um benzodiazepínico distribuído em vários países, sendo que no Brasil é comercializado sob a tutela da ANVISA conforme RDC n° 36 de agosto de 2011, que definiu que este fármaco pertence à Lista-B1 de substâncias psicotrópicas sujeita a Notificação de Receita "B" (ANVISA, 2011). Não é permitida a comercialização deste fármaco nos EUA e sua presença no território norte-americano deve-se ao contrabando dos países da América do Sul com destino à cidade de Miami (estado da Flórida) ou através da fronteira com o México (ELSOHLY & FENG, 2001).

O flunitrazepam é facilmente dissolvido na bebida, não apresenta cor ou gosto característico, rapidamente incapacita a vítima e dificilmente é detectado em exames de triagem (BECHTEL & HOLSTEGE, 2007). Em virtude dessas características e por ser considerada uma clássica DFC, a empresa farmacêutica Hoffman- La Roche Company, a fabricante do Rohypnol®, adicionou um corante azul na formulação de seus comprimidos, o que desencorajaria sua adição em uma bebida (LEBEAU & MOZAYANI, 2001). Este fármaco tem um pKa em torno de 1,8 e apresenta as mesmas características farmacodinâmicas da classe dos benzodiazepínicos, sendo 10 vezes mais potente que o diazepam devido a sua dissociação mais lenta ao receptor GABA. Seus efeitos sedativos levam de 20-30 minutos para manifestar-se, podendo durar de 8 a 24 horas (PAPADODIMA *et al.*, 2007).

Após absorção, o flunitrazepam apresenta uma meia-vida de eliminação em torno de 13-19 horas e é biotransformado no fígado conforme **Figura 11** (ELSOHLY & FENG, 2001).

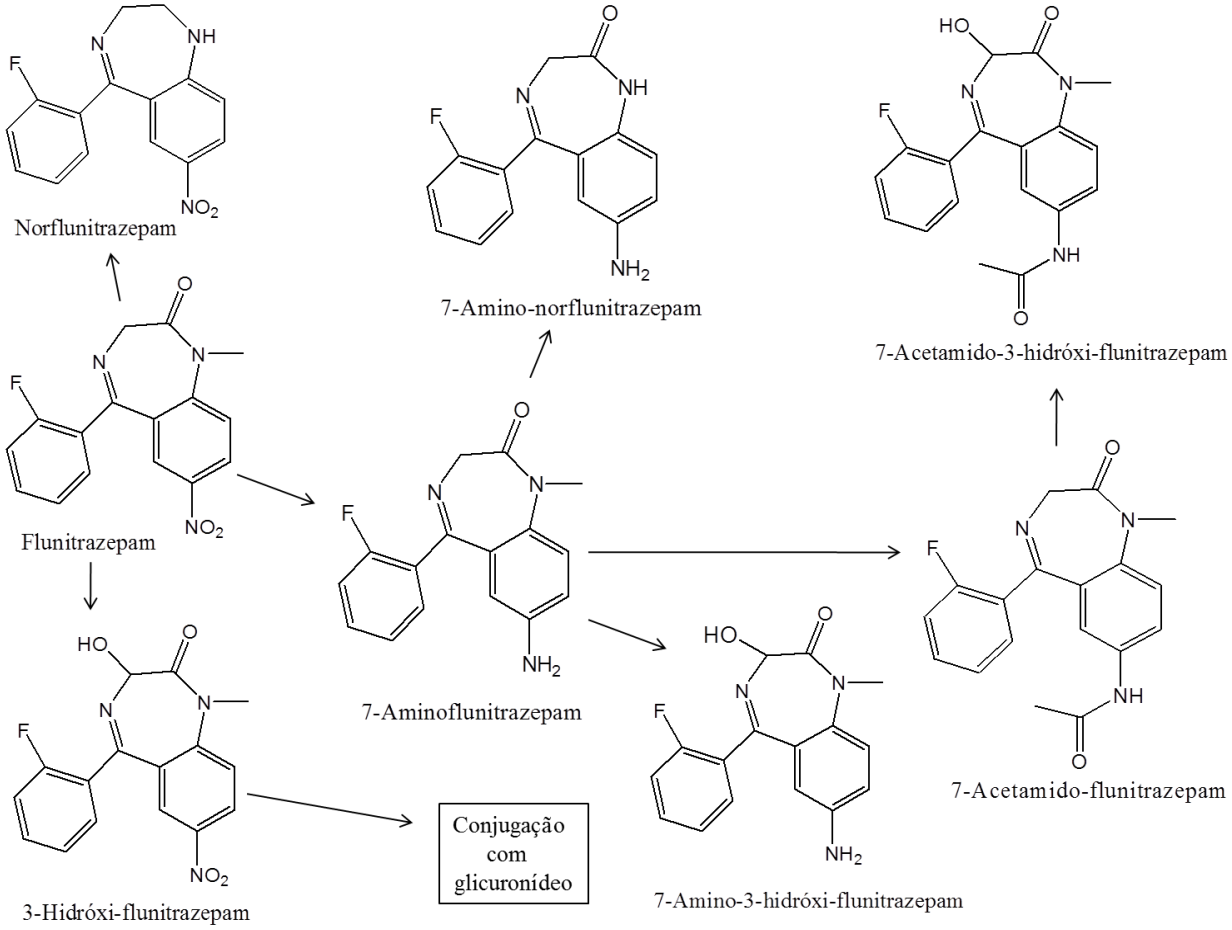


Figura 11 – Biotransformação do flunitrazepam.

O resultado deste processo é a formação de 7-aminoflunitrazepam (7-NHFZ), produto de biotransformação predominante que é encontrado na urina e no sangue.

Além disso, a nitrorredução do grupo 7-nitro em 7-amino também ocorre *in vitro* e apenas uma pequena fração do fármaco é excretada inalterada (2%). O restante é eliminado na urina ou na forma conjugada por esta via, sendo que este comportamento também é característico para nitrazepam e clonazepam (DEINL *et al.*, 1998; LEBEAU & MOZAYANI, 2001).

Devido à baixa dosagem terapêutica (0,5 a 2mg), extensa biotransformação e alto volume de distribuição, as concentrações de flunitrazepam e seus produtos de biotransformação são relativamente baixos, o que dificulta sua determinação em matrizes biológicas em situações de roubo e/ou estupro (ELSOHLY & FENG, 2001). Apesar disso, é possível detectar o uso deste medicamento na urina de 5 a 10 dias (FORSMAN *et al.*, 2009).

2. Desenvolvimento de método para determinação de benzodiazepínicos e seus produtos de biotransformação em amostras de urina

2.1. Condições cromatográficas para análise dos benzodiazepínicos por GC-MS

As injecções no GC-MS foram feitas no modo de splitless e a separação cromatográfica foi obtida com uma coluna HP-5MS capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm x 0,1 espessura de filme), utilizando hélio como gás portador a 1.0 mL / min, em um modo de fluxo constante. O programa de temperatura do forno da coluna foi o seguinte:

1) Temperatura inicial de 150°C mantendo por 1 min.
2) Em seguida, 30°C / min até 220°C mantendo por 1 min.
3) 20°C / min até 300°C mantendo por 3 min.

O tempo total de análise estimado é 11,33 min. A temperatura na porta de injeção e na linha de transferência estabelecido foi 260°C e 280°C, respectivamente. A análise dos analitos pelo MS foi através da EI (70 eV) no modo SIM conforme indicado pela **Tabela 10**.

2.2. Otimização da derivatização dos benzodiazepínicos e seus produtos de biotransformação

A otimização da derivatização dos benzodiazepínicos e seus produtos de biotranformação levou em consideração o uso do TFAA e MTBSTFA. O procedimento inicial exigia um pool de benzodiazepínicos fossem colocados em um vial âmbar novo, secado sob fluxo de nitrogênio a 40°C. O resíduo seco recebeu 50 µL of TFAA e foi

incubado até a secagem a 60ºC por 10 minutos. Após retirada da incubação, imediatamente adicionava-se 35 µL de MTBSTFA e novamente o vial era levado para aquecimento por 45 minutos.

Os parâmetros estudados foram:

- Temperatura do TFAA (50, 60 e 70°C)
- Tempo de reação de TFAA (10, 20 e 30 minutos)
- Tempo de reação do MTBSTFA (30 e 45 minutos)
- Estabilidade de 7-aminoclonazepam e 7-aminoflunitrazepam após dupla derivatização

2.3. Otimização da hidrólise enzimática dos benzodiazepínicos e seus produtos de biotransformação

Uma das etapas do processo de identificação dos benzodiazepínicos é a hidrólise enzimática, um passo necessário quando se deseja analisar uma droga pela urina, tendo em vista que a grande maioria de fármacos apresenta uma reação de fase II com a anexação de glicuronideo em suas moléculas. Neste experimento, utilizou-se oxazepam-glicuronídeo como padrão na concentração de 500 ng/mL na matriz biológica e o procedimento estabelecido por Meatherall (1994):

- 2 mL de urina + 100 µL de uma solução de 2 mol/L de tampão acetato de sódio (pH 4,5)

- Adição de solução aquosa da enzima β-glicuronidase oriunda de *Helix pomatia* (fabricante alerta presença de arilsulfatase)

- Incubação de 55°C por 2 horas

A extração do analito foi realizada conforme o artigo de Fu e colaboradores (2010), com posterior secagem da fase orgânica (40°C / N_2) e derivatização com MTBSTFA por 1 hora a 90°C. Verificamos os seguintes parâmetros:

- Tempo de incubação (60, 90 e 120 minutos)
- Concentração de enzima (2500 e 5000 unidades de enzima β-glicuronidase)

2.4. Otimização dos benzodiazepínicos e seus produtos de biotransformação para LPME

As amostras de urina foram fortificadas a uma concentração de 50 ng/mL de cada analito foram submetidas ao método descrito no tópico 2.5. Similar a cetamina e seus

produtos de biotransformação, fizemos a otimização de vários pontos para os benzodiazepínicos. Porém, trata-se de um grupo com diferentes perfis físico-químicos e exigiu outras abordagens para sua determinação em urina por GC-MS.

Devido às altas variações entre os picos cromatográficos e suas respectivas áreas absolutas, a apresentação de dados referente à otimização dos benzodiazepínicos e produtos de biotransformação em LPME necessitou de adaptações para que pudessem ser demonstradas em gráficos. Diante disso, optou-se por transformar dados brutos (área absoluta) em dados relativos (percentagem %). Para isso, o valor de 100% foi indicado para o melhor ponto de um determinado fator e a partir dele comparou-se com os demais em uma regra de três.

Ex.: 3 mol/L foi o melhor ponto para o fator fase aceptora (100%), enquanto o valor de 0,1 mol/L apresenta 20% *(área absoluta de 0,1 mol/L é multiplicado por 100 e dividida pela área absoluta de 3mol/L)*. Tal procedimento foi utilizado para apresentação em gráficos dos seguintes parâmetros estudados como:

- Solventes extratores (éter dihexílico, xilol, 1-nonanol, decanol, 1-octanol e undecano e combinação de solventes)
- pH da fase doadora (pH 8; 9; 10; 11; 12 e 13)
- Fase aceptora (0,5; 0,1; 1; 3 e 5 mol/L)
- Tempo de extração (15; 30; 60; 90 e 120 min)
- Agitação (1200; 1560; 1800; 2040 e 2400 rpm).
- O efeito *salting out* também foi testada pela adição de 0, 5, 10 e 20% de NaCl (m/v) na amostra antes do procedimento extrativo.

*OBS.: A exceção foi apresentação dos resultados da estabilidade de 7-aminoclonazepam e 7-aminoflunitrazepam após dupla derivatização (**Gráfico 12**).

2.5. Determinação dos benzodiazepínicos e seus produtos de biotransformação para LPME

Utiliza-se 2 mL de urina em um tubo de vidro e adiciona-se 200 ng de um pool de padrão interno contendo diazepam-D_5, oxazepam-D_5, clonazepam-D_4, 7-aminoflunitrazepam-D_7 e 7-aminoclonazepam-D_4. Acrescenta-se 100µL de tampão acetato de sódio 2 mol/L pH 4,5 e posteriormente 25µL (2500 unidades) de enzima β-glicuronidase oriunda da *Helix pomatia* tipo II. Os frascos são fechados, agitados em vórtex e levados à incubação por 90 minutos a 55°C para realizar a etapa de hidrólise

enzimática. Durante esse processo, ocorre a preparação da fibra de LPME (9 cm), do qual é imersa no solvente extrator por 30 segundos para impregnação dos poros deste material e posteriormente sonicadas em água destilada por 10 segundos para retirar o excesso de solvente.

O lúmen da fibra é preenchido com uma solução de 3 mol/L de HCl através 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 aceptora durante a agitação. Passada a etapa de hidrólise enzimática, a amostra é alcalinizada com uma solução de 2 mol/L NaOH até o pH 10 e então acrescenta-se 10% de NaCl (v/m). Então a fibra é introduzida no tubo na forma de U e submetida a agitação por 90 minutos a 2400 rpm. Após agitação, 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 com grupos silanóis desativados para secagem a 40ºC sob fluxo de N_2. Após secagem, adiciona 50 µL de TFAA, agite em vórtex e incube por 10 minutos a 60ºC. Após os 10 minutos, 30 µL de MTBSTFA são acrescentados e agitados em vórtex. Em seguida, esse material é levado ao bloco de aquecimento a 90ºC por 50 minutos. Passado esse tempo, retira-se os vials da incubação e espere resfriar a temperatura ambiente. Retire o agente derivatizante e coloque-o em um insert que será inserido em um vial para posterior injeção cromatográfica. Uma alíquota de 2 µL do extrato é injetada no GC-MS. A **Figura 12** ilustra os passos (1 a 15) deste procedimento.

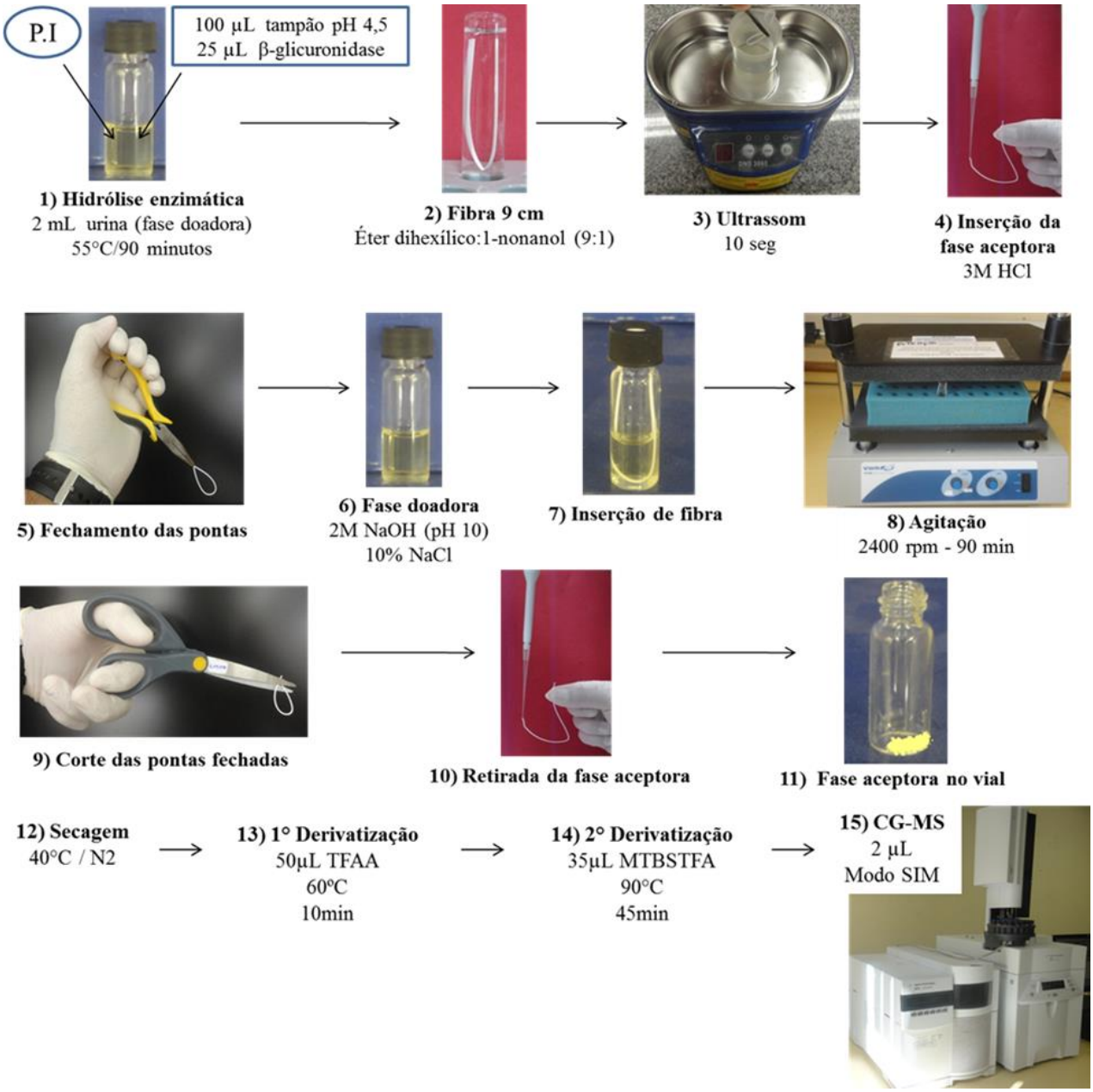


Figura 12 – Etapas de extração dos benzodiazepínicos e seus produtos de biotransformação por LPME.

2.6. Validação do método para determinação de benzodiazepínicos e seus produtos de biotransformação por LPME

A validação dos benzodiazepínicos e seus produtos de biotransformação segue a mesma linha estabelecida na metodologia da cetamina, norcetamina e deidronorcetamina (Capítulo I, tópico 2.5) com pequenas modificações inerentes a esta classe de drogas. Neste quesito, a linearidade foi estabelecida por meio da análise de

amostras de urina em seis replicatas contendo todos os analitos de interesse, onde o primeiro ponto tratava-se do LQ de cada analito (LQ de cada analito; 50; 100; 150; 200 e 250 ng/mL).

A seletividade/especificidade foi avaliada utilizando 10 diferentes urinas livres de drogas e 16 potenciais compostos que podem interferir na análise. As urinas passaram pelo processo de extração conforme descrito no tópico 2.5 para avaliação de substâncias endógenas. O tempo de retenção dos picos de interesse foi comparado com aqueles oriundos da matriz biológica que sofreu a adição dos analitos na concentração do LQ. O método também avaliou potenciais interferentes através da analise de urinas fortificadas com 1000 ng/mL de anfetamina, metanfetamina, 3,4-metilenodioximetanfetamina, 11-nor-9-carboxi-tetrahidrocanabinol, benzoilecgonina, norcetamina, morfina, codeína, ácido acetilsalicílico, fenobarbital, nicotina, furosemida, clomipramina, lidocaína, nafazolina e cafeína. O critério de aceitação deste ensaio foi ausência de substâncias interferentes no tempo de retenção dos analitos de interesse e seus respectivos padrões internos.

A precisão e exatidão dos estudos foram realizadas através da análise de amostras de urina contendo 3 concentrações conhecidas, sendo que o menor ponto era 3 vezes maior que o LQ de cada analito (3 x LQ; 130 e 235 ng/mL) em três dias consecutivos.

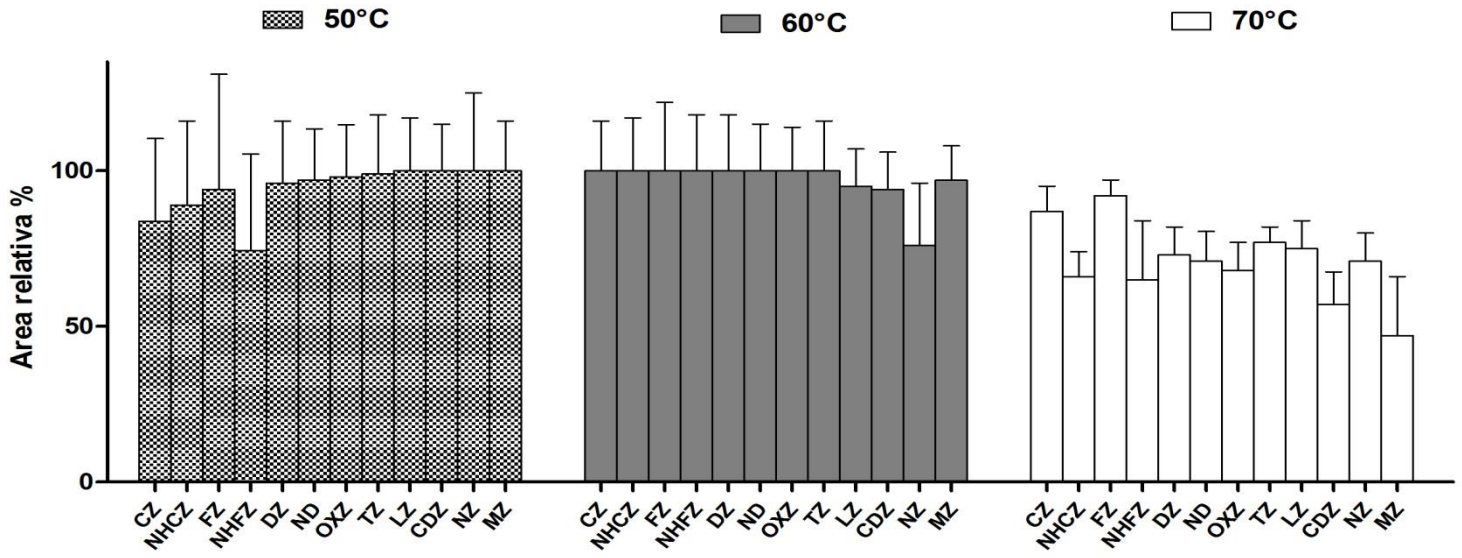
Os estudos de recuperação foram realizados através da preparação de dois conjuntos de urina. Um conjunto de amostras (conjunto A), que consiste em três concentrações, onde o primeiro ponto era 3 vezes maior que o LQ de cada analito (3 x LQ; 130 e 235 ng/mL). O segundo conjunto (conjunto B), analitos foram adicionados nas amostras com a mesma concentração do conjunto A após o procedimento da LPME. A recuperação absoluta foi avaliada por comparação da resposta média obtida para o conjunto A e a resposta do conjunto B (100%). Baseando-se no Guia de Validação de Métodos Analíticos da UNODC (UNODC, 2009), a quantidade de analito recuperada não é fator crítico para aprovação do teste, desde que os demais parâmetros da validação alcancem os propósitos desejados.

3. Resultados

3.1. Otimização da derivatização dos benzodiazepínicos e seus produtos de biotransformação

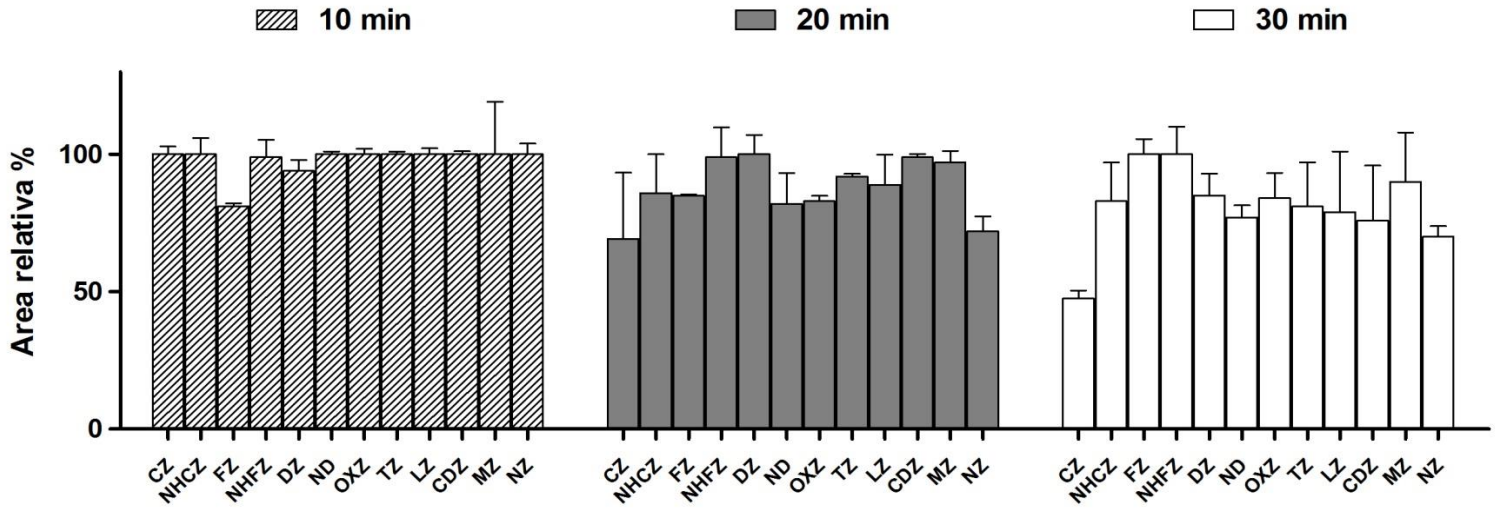
3.1.1. Temperatura e tempo para derivatização com TFAA

Gráfico 10 – Temperatura de reação do TFAA sobre benzodiazepínicos e produtos de biotransformação



CZ, clonazepam; 7-NHCZ, 7-aminoclonazepam; FZ, flunitrazepam; 7-NHFZ, 7-aminoflunitrazepam; DZ, diazepam; ND, nordiazepam; OXZ, oxazepam; TZ, temazepam; LZ, lorazepam; CDZ, clordiazepóxido; NZ, nitrazepam; MZ, medazepam

Gráfico 11 – Tempo de reação do TFAA sobre benzodiazepínicos e produtos de biotransformação



CZ, clonazepam; 7-NHCZ, 7-aminoclonazepam; FZ, flunitrazepam; 7-NHFZ, 7-aminoflunitrazepam; DZ, diazepam; ND, nordiazepam; OXZ, oxazepam; TZ, temazepam; LZ, lorazepam; CDZ, clordiazepóxido; NZ, nitrazepam; MZ, medazepam.

A temperatura de 60°C foi a condição estabelecida para derivatização com TFAA para esses analitos. Apenas 7-aminoflunitrazepam e 7-aminoclonazepam sofreram a reação, enquanto os demais do estudo não foram derivatizados com TFAA. O melhor resultado adquirido foi com 10 minutos de reação. Acima deste tempo, verificou-se que alguns analitos apresentam perda de sinal de suas respectivas áreas.

3.1.2. Derivatização com MTBSTFA

A derivatização dos benzodiazepínicos com MTBSTFA foi realizada conforme descrito por Pantaleão (2012) com pequenas modificações. O procedimento realizado por Pantaleão (2012) utiliza 90°C por 30 minutos. Diante disso, aumentamos o tempo para 45 minutos de incubação, permitindo um aumento da área absoluta de alguns benzodiazepínicos estudados (lorazepam, 7-aminoclonazepam e 7-aminoflunitrazepam). Desta forma, 90°C por 45 minutos foi o método escolhido.

Em ordem de confirmar a dupla derivatização dos aminobenzodiazepínicos, o espectro de massas e suas respectivas fragmentações foram obtidas em GC-MS com diferentes energias de ionização (5, 15 e 70 eV). Conforme a **Figura 13**, a diminuição da energia de colisão permite um aumento do sinal do íon molecular, confirmando a conversão de 7-aminoclonazepam [609 *m/z* (100.0%), 611 *m/z* (32.0%), 610 *m/z* (31,4%) and 612 *m/z* (10%)] e 7-aminoflunitrazepam [493 *m/z* (100%), 494 *m/z* (26%), 495 *m/z* (3,3%)] em derivados de trifluoroacetamidas/sililados. Além disso, estudou-se a estabilidade destas estruturas após dupla derivatização em temperatura ambiente (TA), 4°C e -20°C durante 48 horas. Os resultados estão apresentados no **Gráfico 12**.

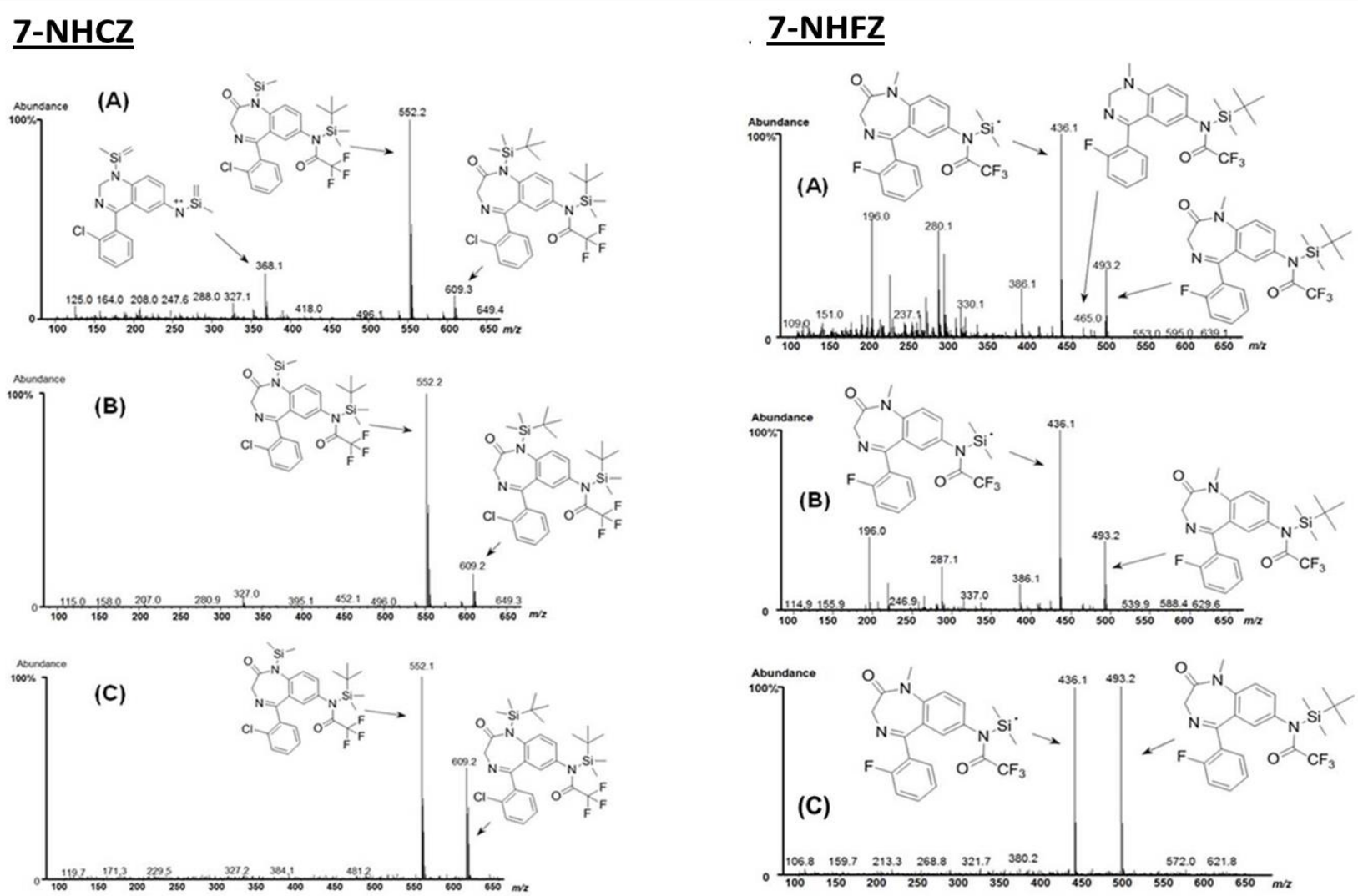
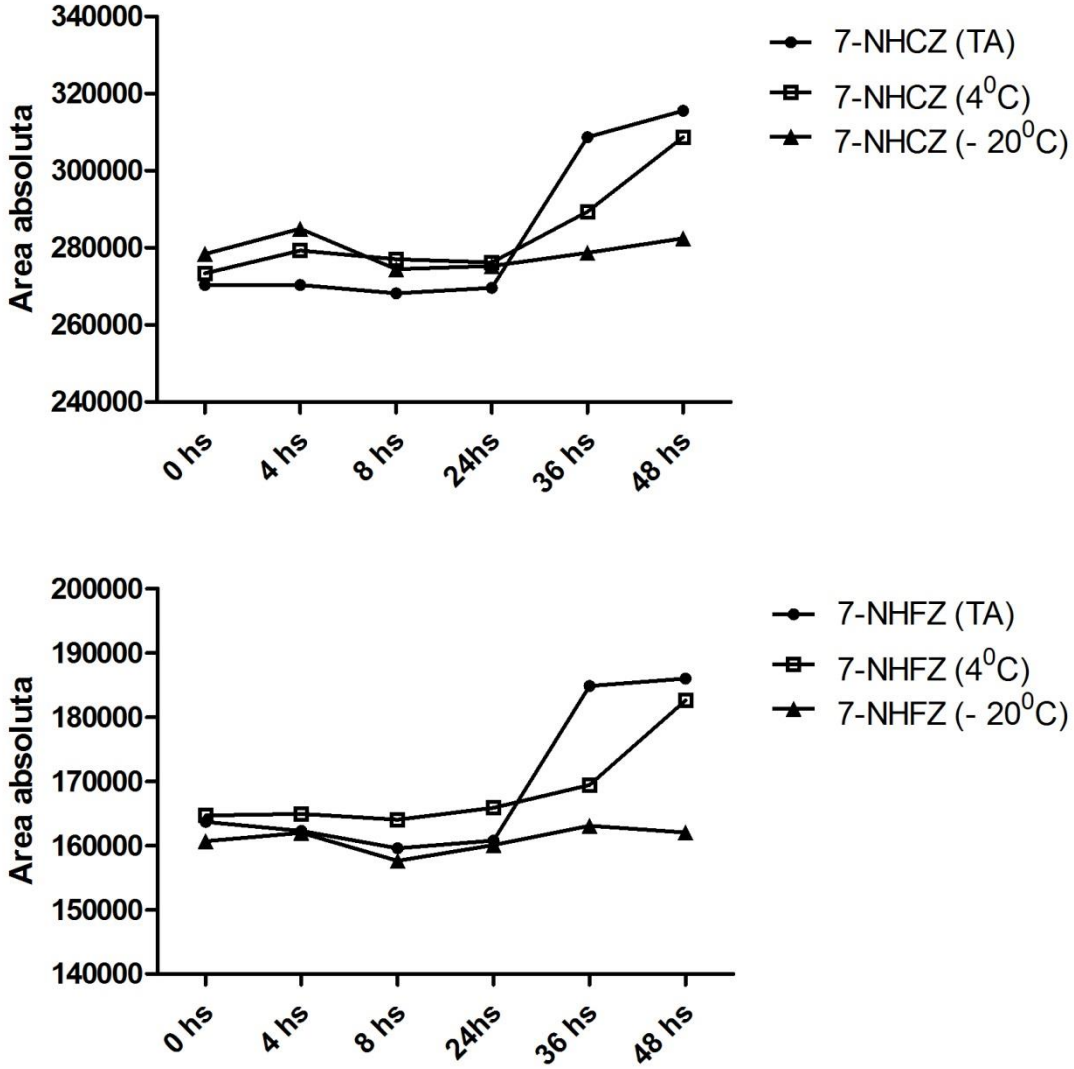


Figura 13 - Fragmentação de massa dos aminobenzodiazepínicos após dupla derivatização com diferentes energias de ionização. A) 70eV; B) 15eV; C) 5ev.

Gráfico 12 – Estabilidade de 7-aminoclonazepam e 7-aminoflunitrazepam após dupla derivatização.

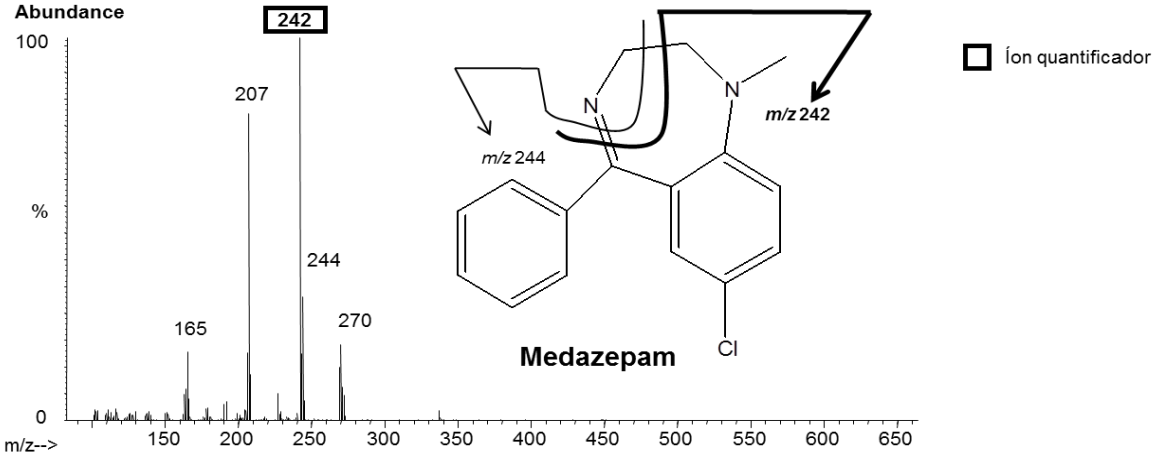


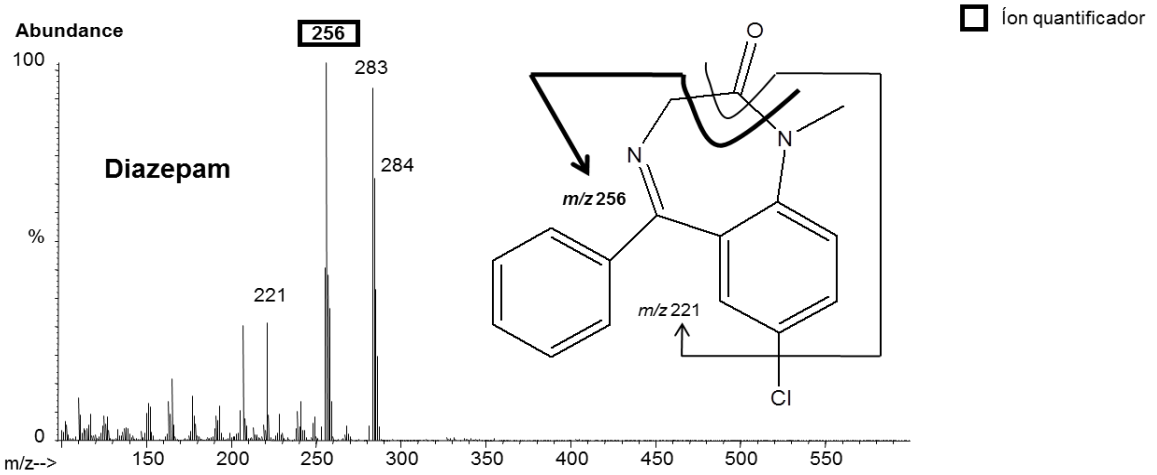
7-NHCZ, 7-aminoclonazepam; 7-NHFZ, 7-aminoflunitrazepam

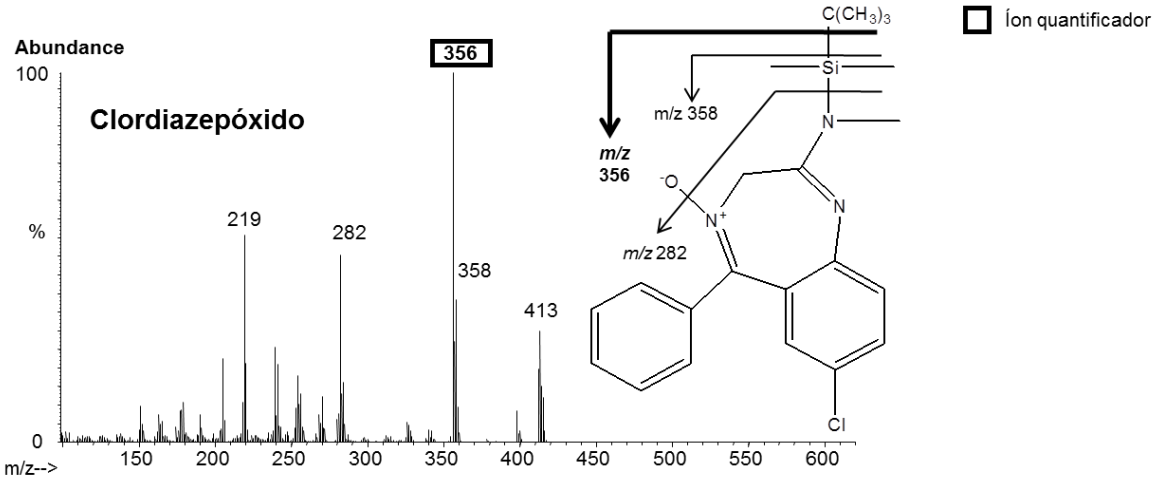
Medazepam, diazepam e flunitrazepam não sofrem ação de nenhuma agente derivatizante, apesar do aumento de suas áreas absolutas quando estão diluídas em MTBSTFA, enquanto nordiazepam, clordiazepóxido, lorazepam, oxazepam, temazepam, clonazepam e nitrazepam são derivatizadas somente com MTBSTFA. As fragmentações de massas dos analitos citados estão expostas na **Figura 14**. Os íons que foram utilizados para a otimização e validação do método para benzodiazepínicos e seus produtos de biotransformação estão expostos na **Tabela 10**.

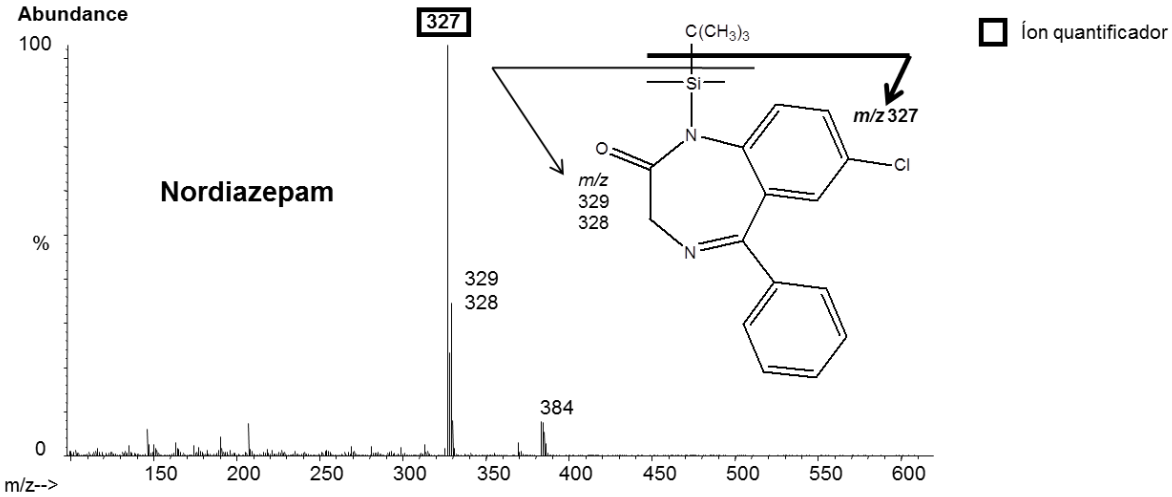
Tabela 10 - Íons qualificadores e quantificadores dos benzodiazepínicos e de seus respectivos produtos de biotransformação (*m/z*) obtidos após derivatização com TFAA e MTBSTFA

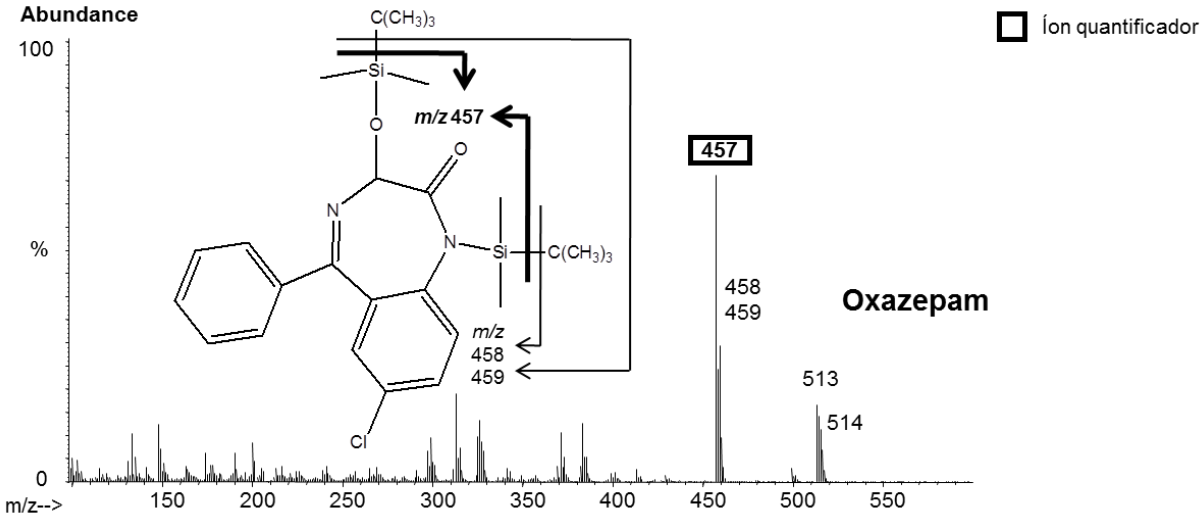
Analito	Íons qualificadores	Íon quantificador
Clonazepam	326, 374	372
Clordiazepóxido	282, 358	356
Diazepam	258, 284	256
Flunitrazepam	266, 286	312
Lorazepam	493, 515	491
Medazepam	244, 270	242
Nordiazepam	329, 384	327
Nitrazepam	292, 394	338
Oxazepam	459, 514	457
Temazepam	283, 359	357
7-aminoflunitrazepam	493, 280	436
7-aminoclonazepam	368, 554	552

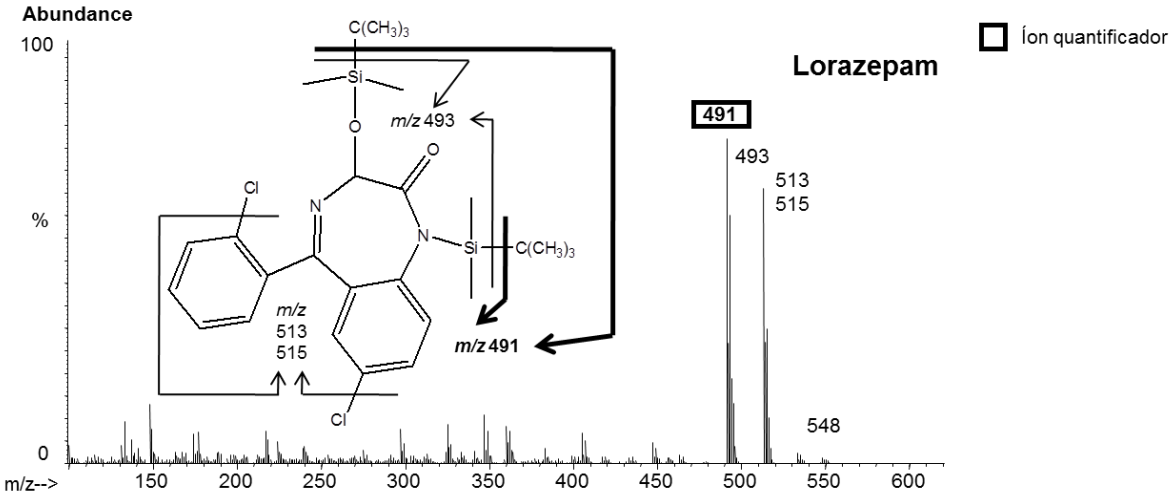


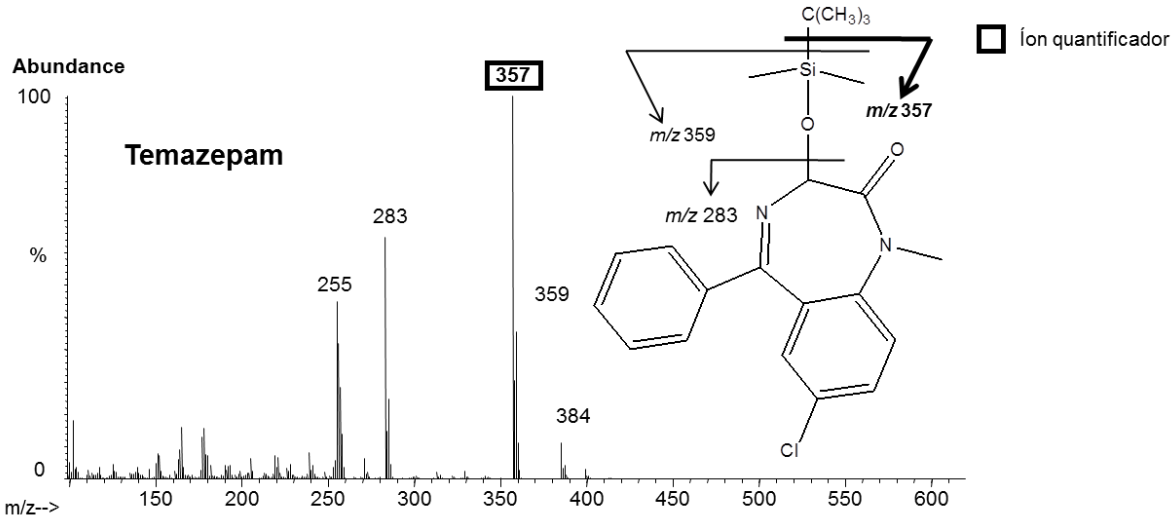


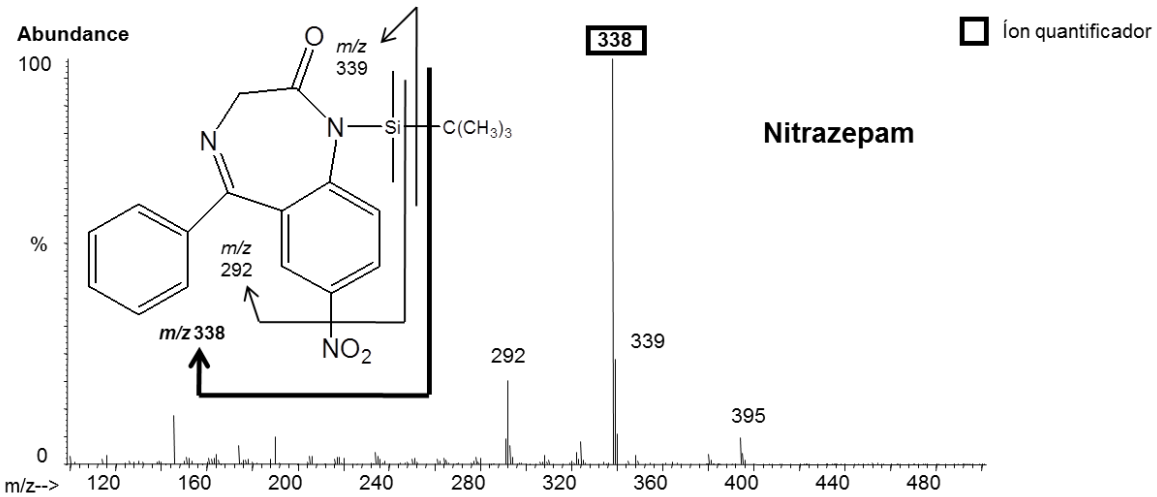

Abundance
100
%
0
m/z-->
Clordiazepóxido
356
219
282
358
413
150
200
250
300
350
400
450
500
550
600
C(CH3)3
Si
N
m/z 358
m/z 356
m/z 282
Cl
Íon quantificador


Abundance
100
%
0
m/z-->
Nordiazepam
327
329
328
384
150
200
250
300
350
400
450
500
550
600
C(CH3)3
Si
N
O
Cl
m/z 327
m/z
329
328
Íon quantificador


Abundance
100
%
0
m/z-->
Oxazepam
457
458
459
513
514
150
200
250
300
350
400
450
500
550
C(CH3)3
Si
O
N
Cl
m/z 457
m/z
458
459
Íon quantificador


Abundance
100
%
0
m/z-->
150
200
250
300
350
400
450
500
550
600
Lorazepam
Íon quantificador
491
493
513
515
548
m/z 493
m/z 513 515
m/z 491
C(CH3)3
Si
O
N
Cl


Abundance
100
%
0
m/z-->
150
200
250
300
350
400
450
500
550
600
Temazepam
Íon quantificador
357
283
255
359
384
m/z 359
m/z 357
m/z 283
C(CH3)3
Si
O
N
Cl


Abundance
100
%
0
m/z-->
120
160
200
240
280
320
360
400
440
480
Nitrazepam
Íon quantificador
338
339
292
395
m/z 339
m/z 292
m/z 338
C(CH3)3
Si
N
O
NO2

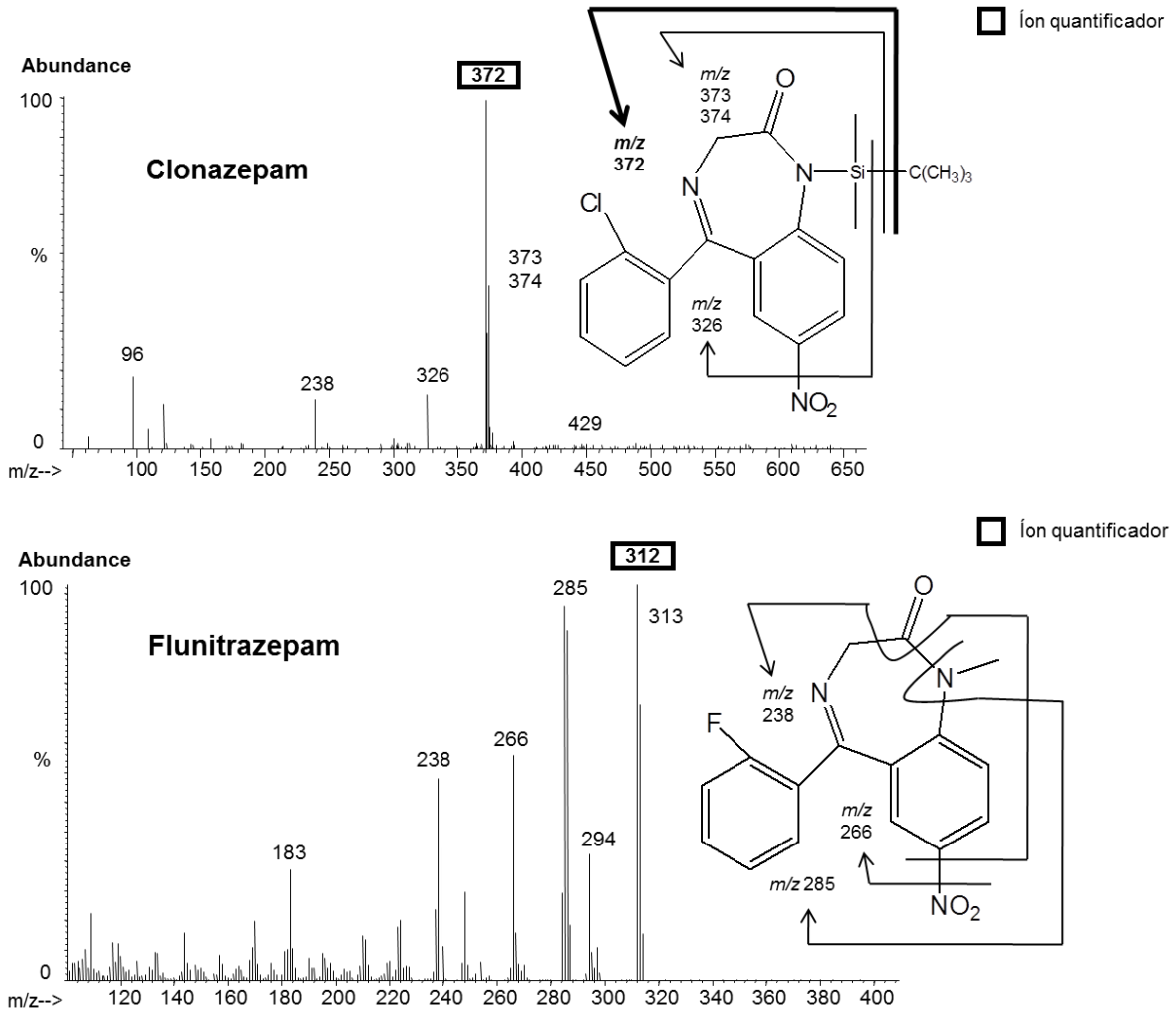


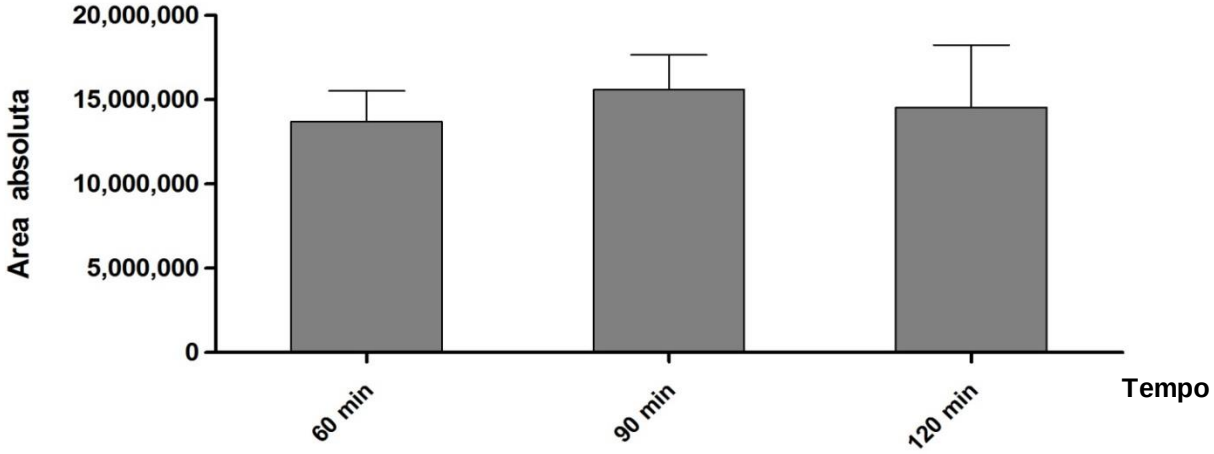
Figura 14 – Fragmentações de massas dos benzodiazepínicos e seus produtos de biotransformação após derivatização com TFAA e MTBSTFA (70 eV).

3.2. Otimização da hidrólise enzimática dos benzodiazepínicos e seus produtos de biotransformação

3.2.1. Tempo e unidades de enzima β-glicuronidase

A otimização do tempo de hidrólise enzimática foi averiguado em uma faixa de 60 a 120 minutos. O resultado está expresso no gráfico abaixo:

Gráfico 13 – Tempo de hidrólise enzimática para oxazepam-glicuronídeo



O melhor tempo de incubação apresentado foi de 90 minutos. Para este experimento, utilizou-se 5000 unidades de enzima que apresentou 98% de recuperação. Porém, um teste com 2500 unidade de enzima foi realizado com resultado próximo a 95% de recuperação. Diante dessa perspectiva, optamos por 2500 unidades de enzima para efetuar a hidrólise enzimática dos benzodiazepínicos em amostras de urina.

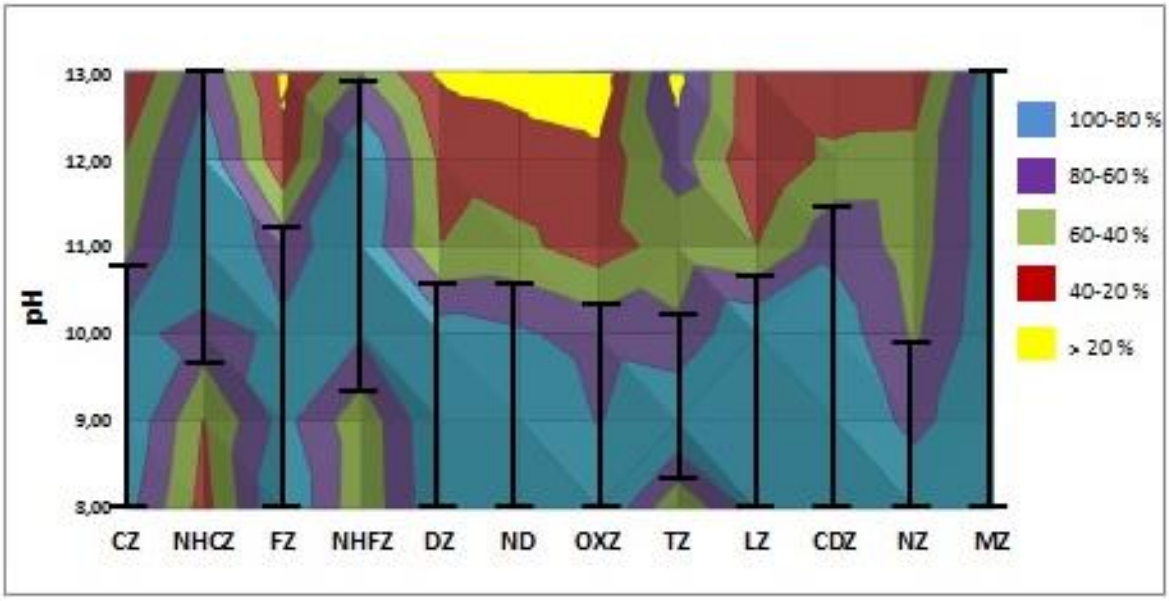
3.3. Otimização da LPME para benzodiazepínicos e seus produtos de biotransformação

3.3.1. Fase doadora, fase aceptora, solventes, combinação de solventes, efeito *salting out*, frequência e tempo de agitação

Avaliou-se o pH da matriz biológica (fase doadora) na faixa de 8 a 13, afim de estabelecer a melhor fase doadora para proceder com a extração por LPME. Os resultados da fase doadora estão demonstrados no **Gráfico 14**. O pH 10 foi escolhido devido a sua maior uniformidade perante todos os analitos avaliados. O estudo focou na LPME trifásica, avaliando soluções de HCl em uma faixa de 0,05-5 mol/L. Diante dos resultados, a melhor fase aceptora a ser utilizada no estudo refere-se a uma solução de 3 mol/L de HCl (**Gráfico 15**). Entre os solventes, destacam-se éter dihexílico e 1-nonanol como pode ser visualizado no **Gráfico 16**. O 1-nonanol obteve melhores resultados para 7-aminoclonazepam e 7-aminoflunitrazepam, enquanto éter dihexílico obteve melhores extrações para os demais analitos. Perante esses dados, verificamos o comportamento dos benzodiazepínicos frente a uma combinação de éter dihexílico:1-nonanol em diferentes proporções no intuito de estabelecer um sistema mais abrangente que permitisse extrair a maioria das substâncias até aos limites estabelecidos pela UNODC e SOFT (UNODC, 2012; SOFT, 2014). Desta forma, a mistura éter dihexílico:1-nonanol (9:1) foi a escolhida como solvente extrator (**Gráfico 17**).

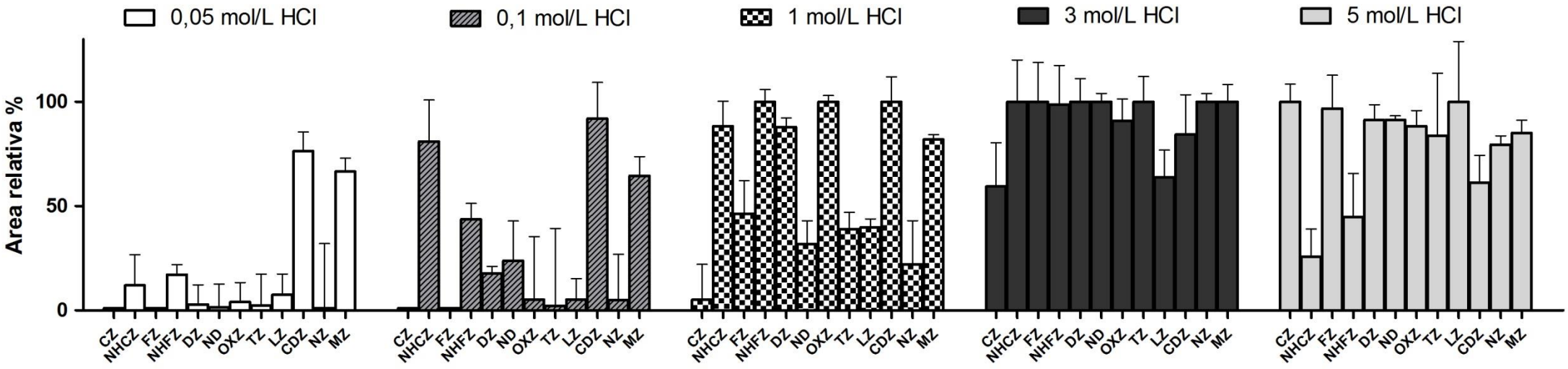
Para o efeito *salting out*, as concentrações de 0, 5, 10 e 20% de NaCl foram avaliadas na tentativa de incrementar o procedimento extrativo. Os resultados indicam que a concentração de 10% de NaCl na foi a melhor para a maioria dos analitos avaliados (**Gráfico 18**). A frequência de agitação entre 1200 a 2400 rpm no multi-vortex modelo VWR VX-2500 estão demonstradas no **Gráfico 19** e os dados mais homogêneos foram obtidos com a adoção de 2400 rpm. Além disso, o tempo necessário para contemplar todos analitos nesta extração foi de 90 minutos (**Gráfico 20**).

Gráfico 14 – Fase doadora para benzodiazepínicos e produtos de biotransformação



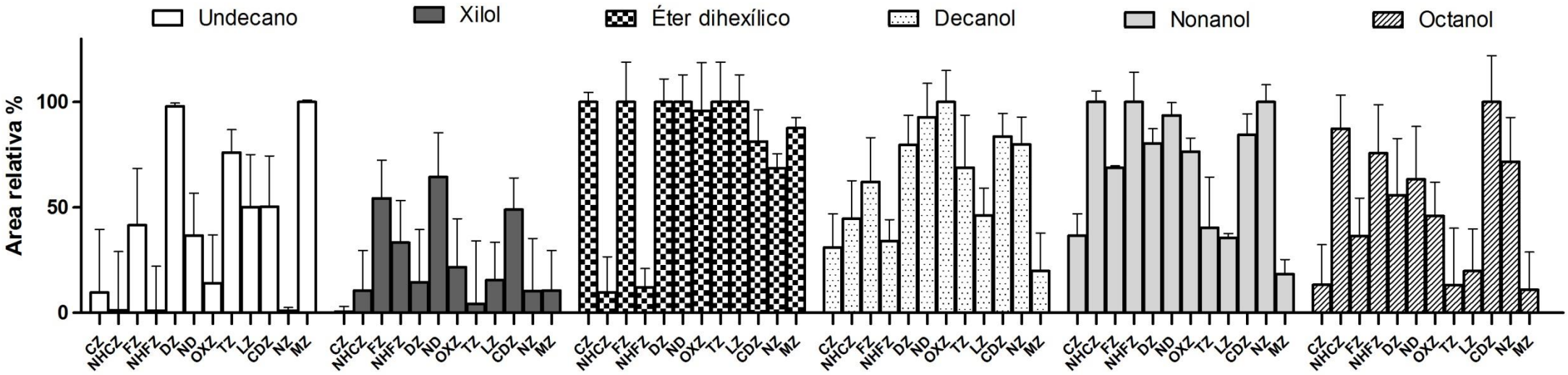
I indicam concentrações maiores que 60%. CZ, clonazepam; 7-NHCZ, 7-aminoclonazepam; FZ, flunitrazepam; 7-NHFZ, 7-aminoflunitrazepam; DZ, diazepam; ND, nordiazepam; OXZ, oxazepam; TZ, temazepam; LZ, lorazepam; CDZ, clordiazepóxido; NZ, nitrazepam; MZ, medazepam;

Gráfico 15 – Fase aceptora para benzodiazepínicos e produtos de biotransformação



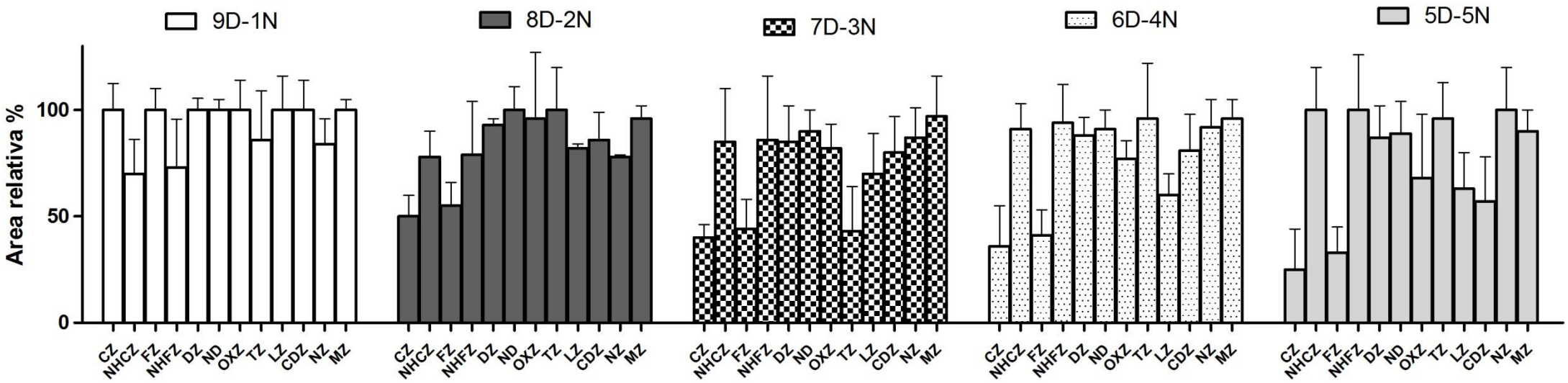
CZ, clonazepam; 7-NHCZ, 7-aminoclonazepam; FZ, flunitrazepam; 7-NHFZ, 7-aminoflunitrazepam; DZ, diazepam; ND, nordiazepam; OXZ, oxazepam; TZ, temazepam; LZ, lorazepam; CDZ, clordiazepóxido; NZ, nitrazepam; MZ, medazepam.

Gráfico 16 – Solventes orgânicos para benzodiazepínicos e produtos de biotransformação



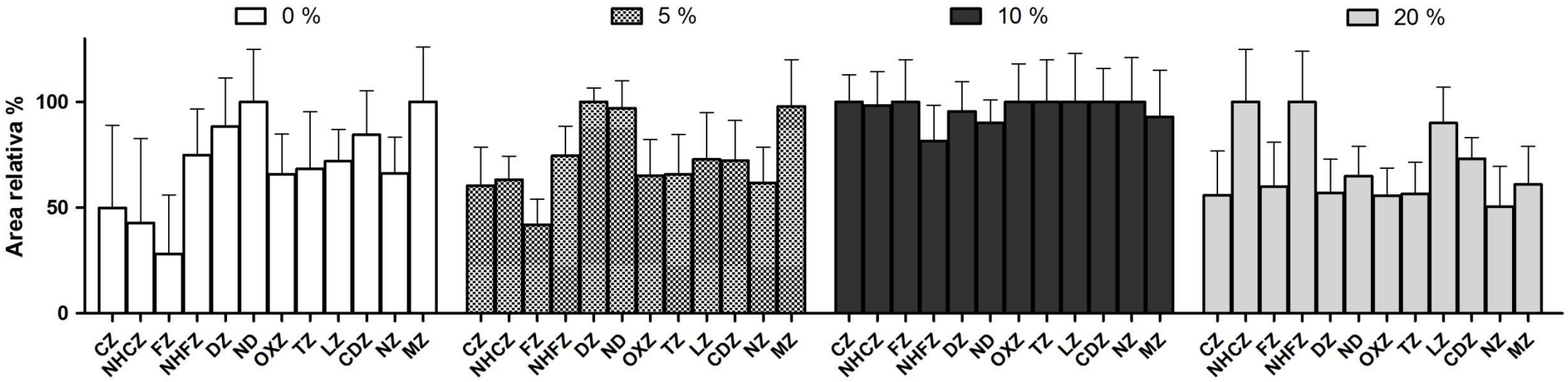
CZ, clonazepam; 7-NHCZ, 7-aminoclonazepam; FZ, flunitrazepam; 7-NHFZ, 7-aminoflunitrazepam; DZ, diazepam; ND, nordiazepam; OXZ, oxazepam; TZ, temazepam; LZ, lorazepam; CDZ, clordiazepóxido; NZ, nitrazepam; MZ, medazepam.

Gráfico 17 – Combinação entre éter dihexílico e 1-nonanol e suas diferentes proporções para benzodiazepínicos e seus produtos de biotransformação



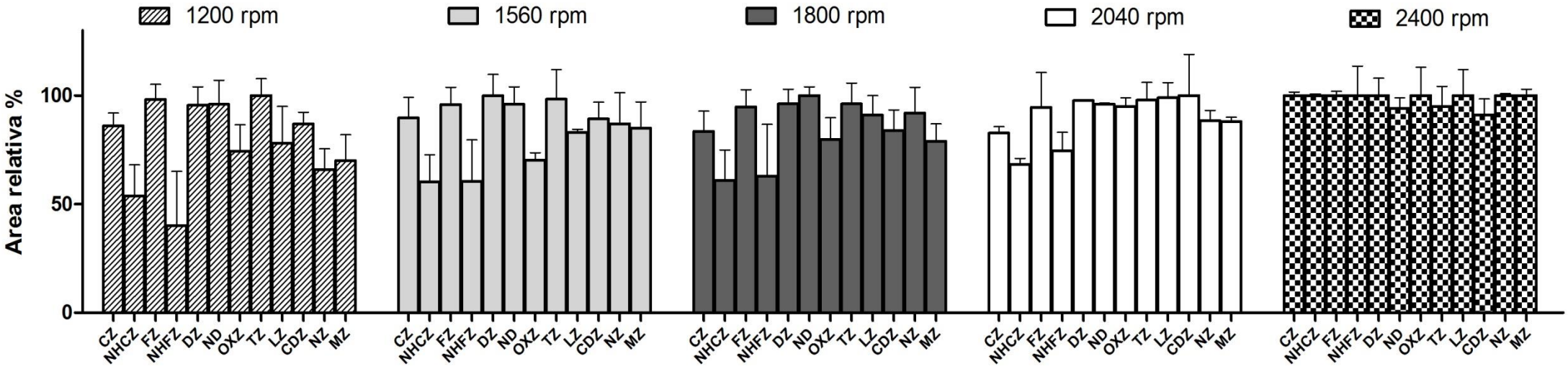
CZ, clonazepam; 7-NHCZ, 7-aminoclonazepam; FZ, flunitrazepam; 7-NHFZ, 7-aminoflunitrazepam; DZ, diazepam; ND, nordiazepam; OXZ, oxazepam; TZ, temazepam; LZ, lorazepam; CDZ, clordiazepóxido; NZ, nitrazepam; MZ, medazepam.

Gráfico 18 – Efeito *salting out* para benzodiazepínicos e produtos de biotransformação



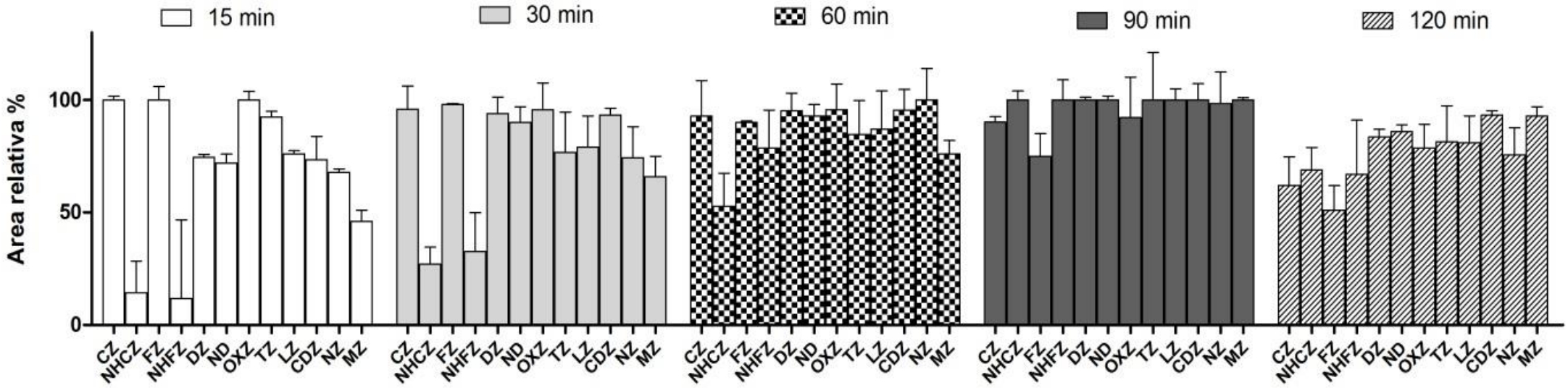
CZ, clonazepam; 7-NHCZ, 7-aminoclonazepam; FZ, flunitrazepam; 7-NHFZ, 7-aminoflunitrazepam; DZ, diazepam; ND, nordiazepam; OXZ, oxazepam; TZ, temazepam; LZ, lorazepam; CDZ, clordiazepóxido; NZ, nitrazepam; MZ, medazepam.

Gráfico 19 – Frequência de agitação para benzodiazepínicos e produtos de biotransformação



CZ, clonazepam; 7-NHCZ, 7-aminoclonazepam; FZ, flunitrazepam; 7-NHFZ, 7-aminoflunitrazepam; DZ, diazepam; ND, nordiazepam; OXZ, oxazepam; TZ, temazepam; LZ, lorazepam; CDZ, clordiazepóxido; NZ, nitrazepam; MZ, medazepam.

Gráfico 20 – Tempo de agitação para benzodiazepínicos e produtos de biotransformação



CZ, clonazepam; 7-NHCZ, 7-aminoclonazepam; FZ, flunitrazepam; 7-NHFZ, 7-aminoflunitrazepam; DZ, diazepam; ND, nordiazepam; OXZ, oxazepam; TZ, temazepam; LZ, lorazepam; CDZ, clordiazepóxido; NZ, nitrazepam; MZ, medazepam.

3.4. Validação do método para benzodiazepínicos e seus produtos de biotransformação

A validação do método para benzodiazepínicos e seus produtos de biotransformação foi realizada após otimização da extração desses analitos. O trabalho tem como foco a detecção e quantificação de baixos níveis destes fármacos e seus produtos de biotransformação, assim como a determinação de concentrações estabelecidas para estes analitos em situações de avaliação de drogas no ambiente de trabalho (*workplace drug testing*). Para isso, utilizaram-se os seguintes padrões internos para os respectivos analitos:

Diazepam-D_5..... Medazepam, diazepam, nordiazepam e clordiazepóxido

Oxazepam-D_5..... Oxazepam e lorazepam

Clonazepam-D_4..... Flunitrazepam, clonazepam e nitrazepam

7-aminoclonazepam-D_4..... 7-aminoclonazepam

7-aminoflunitrazepam-D_7..... 7-aminoflunitrazepam

A linearidade foi efetuada tendo o primeiro ponto o LQ de cada analito, 50, 100, 150, 200 e 250 ng/mL como último ponto. Diante da discrepância entre as grandezas de concentrações para a maioria dos analitos, isto possibilita a ocorrência de um fenômeno chamado heteroscedasticidade. Um método analítico pode ser heteroscedástico devido aos desvios presentes nas maiores concentrações, influenciando de forma mais acentuada na linha de regressão linear se comparado aos desvios dos pontos de menores concentrações. Consequentemente, a linearidade pode apresentar um $r^2 < 0.99$, enquanto que a exatidão nos menores pontos da curva/linearidade é prejudicada, ou seja, há discrepâncias entre os valores reais obtidos pela análise e os valores teóricos quando comparadas à curva do método empregado. Neste aspecto, a utilização da regressão linear ponderada é recomendada, estimando os desvios padrão referente a cada ponto da curva (ALMEIDA *et al*., 2002).

Para tal, utiliza-se o teste F (distribuição F de Snedecor) para averiguar se o método é homo ou heterocesdasticidade através dos desvios dos pontos da curva dentro de um intervalo de confiança de 99%. O cálculo para a realizar o teste F está explicito logo abaixo:

$F_{experimento} = S_2^2 / S_1^2$ $\qquad$ $F_{tabelado}$ (f_1, f_2; 0,01)

S_2^2 = variância entre as amostras dos pontos mais altos da curva

S_1^2 = variância entre as amostras dos pontos mais baixos da curva

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

Se $F_{calculado} > F_{tabelado}$ fica evidenciado que as variâncias não são uniformes ao longo de toda a curva podendo-se considerar o método heteroscedástico. Desta forma, os coeficientes de ponderação são utilizados para a construção da curva de calibração. Ao usufruir da regressão ponderada, atribui-se menor importância aos pontos que demonstram maior desvio

padrão, resultando no deslocamento do ponto centroide da curva com estreitamento dos intervalos de confiança em baixas concentrações e consequentemente alargamento dos intervalos de confiança nas altas concentrações (ALMEIDA *et al*., 2002).

Neste estudo o valor de $F_{tabelado}$ = 27,911; Os dados de $F_{calculado}$ estão descrito abaixo:

Medazepam.....	2406,87	Oxazepam.....	181,39
Diazepam	228,56	Nitrazepam.....	196981
Nordiazepam.....	2303,99	Flunitrazepam.....	69,22
Clordiazepóxido.....	2044,34	7-aminoflunitrazepam.	16,70
Lorazepam.....	26,69	7-aminoclonazepam....	21,79
Clonazepam.....	343,86		

Os resultados indicaram que 7-aminoflunitrazepam, 7-aminoclonazepam e lorazepam são homoscedásticos, enquanto o restante dos analitos são heteroscedásticos após aplicação do teste F.

Assim, para a heteroscedasticidade, aplicamos fatores de peso ($1/x$; $1/x^2$; $1/x^{1/2}$; $1/y$; $1/y^2$; $1/y^{1/2}$), verificando a % erro relativo (%RE) em toda faixa de concentração trabalhada, e verificou-se que o $1/x^{1/2}$ foi a melhor opção para correção da linearidade para os demais analitos, exceto flunitrazepam ($1/x^{1/2}$) e clordiazepóxido ($1/x^2$). O coeficiente de correlação (r^2) para os analitos foram maiores que 0,98 e suas respectivas linearidades estão representadas logo abaixo enquanto os demais resultados da validação estão na **Tabela 11**.

Medazepam	r^2 = 0,9970	y = 0,0252x + 0,00706
Diazepam	r^2 = 0,9973	y = 0,00855 x + 0,00023
Nordiazepam	r^2 = 0,9973	y = 0,03018 x + 0,010868
Clordiazepóxido	r^2 = 0,9907	y = 0,001093 x – 0,00201
Lorazepam	r^2 = 0,9998	y = 0,0001 x – 0,008
Oxazepam	r^2 = 0,9980	y = 0,00967 x – 0,00176
Nitrazepam	r^2 = 0,9915	y = 0,07866 x – 0, 34848
Flunitrazepam	r^2 = 0,9916	y = 0,001578 x + 0,004905
7-aminoflunitrazepam	r^2 = 0,9980	y = 0,014 x + 0,012
Clonazepam	r^2 = 0,9966	y = 0,00874 x + 0,008079
7-aminoclonazepam	r^2 = 0,9990	y = 0,009 x – 0,023

Tabela 11 - Paramêtros de confiança do método validado para determinação de benzodiazepínicos e seus produtos de biotransformação em amostra de urina.

Parâmetros	MZ	DZ	ND	CDZ	OXZ	LZ	FZ	CZ	NZ	7- NHFZ	7-NHCZ
Recuperação (%)											
C1	79,5	75,8	75,1	39,9	20,9	3,3	22,2	21,5	47,2	40,4	34,3
C2	79,2	75,6	81,0	35,1	25,1	3,5	23,4	22,5	51,2	43,8	37,2
C3	92,7	84,7	85,2	32,6	28,3	4,2	25,0	25,8	54,7	45,7	39,7
LD (ng/mL)	0,5	1,0	0,1	1,0	2,5	15	15	5,0	2,5	5,0	1,0
LQ (ng/mL)	2,5	5,0	0,5	5,0	5,0	30	30	10	5,0	10	5,0
Precisão intra-dia (CV%)											
C1	8,0	3,8	10,2	3,4	3,5	6,2	10,1	4,1	9,4	3,7	4,9
C2	9,4	2,0	5,3	11,5	2,4	8,9	11,0	2,2	5,4	6,5	5,6
C3	9,8	1,8	5,5	10,1	1,8	9,7	10,5	1,7	9,2	6,5	3,3
Precisão inter-dia (CV%)											
C1	8,0	2,7	7,8	19,4	3,0	7,6	9,6	4,1	6,8	20,5	5,2
C2	7,1	5,0	4,0	14,8	4,9	7,6	11,3	2,3	5,1	15,6	3,9
C3	14,1	5,5	5,3	11,2	5,8	11,9	10,7	4,4	7,4	15,9	6,2
Exatidão (%)											
C1	119,6	100,2	119,4	103,2	111,1	102,7	117,1	91,6	103,8	103,5	93,0
C2	97,9	102,5	99,2	88,0	97,3	102,9	105,0	88,4	95,8	106,3	100,9

C3	96,8	105,0	99,8	94,3	103,2	105,6	113,6	91,5	92,9	107,5	104,0
Integridade da diluição											
Precisão (CV%)											
10 vezes	8,3	8,7	9,4	12,3	7,6	6,6	10,5	6,3	5,8	9,8	4,2
Exatidão (%)											
10 vezes	111,6	102,2	111,4	113,2	105,1	99,7	89,1	97,6	102,8	103,5	97,0

C1, 3 vezes LQ; C2, 130 ng/mL; C3, 235 ng/mL; LD, limite de detecção; LQ, limite de quantificação; CV%, coeficiente de variação; 10 vezes, 1300 ng/mL; MZ, medazepam; DZ, diazepam, ND, nordiazepam; CDZ, clordiazepóxido; OXZ, oxazepam; LZ, lorazepam; FZ, flunitrazepam; CZ, clonazepam; NZ, nitrazepam; NHFZ, 7-aminoflunitrazepam; NHCZ, 7-aminoclonazepam.

Um cromatograma no modo SIM demonstrando o tempo de retenção dos analitos que foram validados está na **Figura 15**. A técnica foi aplicada em 4 voluntários (amostra 1-4) que reportaram o uso desta classe de drogas e em uma amostra de histórico desconhecido (amostra 5). As urinas foram coletadas pela manhã (8-9 horas a.m.) e o caso 1 e 2 admitiram a ingestão de 5 mg de diazepam na noite anterior a coleta urinária enquanto caso 3 e 4 ingeriram 2 e 0,5 mg de lorazepam e clonazepam, respectivamente. Não foi possível obter informações sobre o caso 5 em relação ao uso de benzodiazepínico. O item C e D do cromatograma apresenta o perfil cromatográfico de amostras reais (2 e 5). As concentrações de benzodiazepínicos e seus produtos de biotransformação encontrados nas amostras de urina dos voluntários estão descritos na **Tabela 12**.

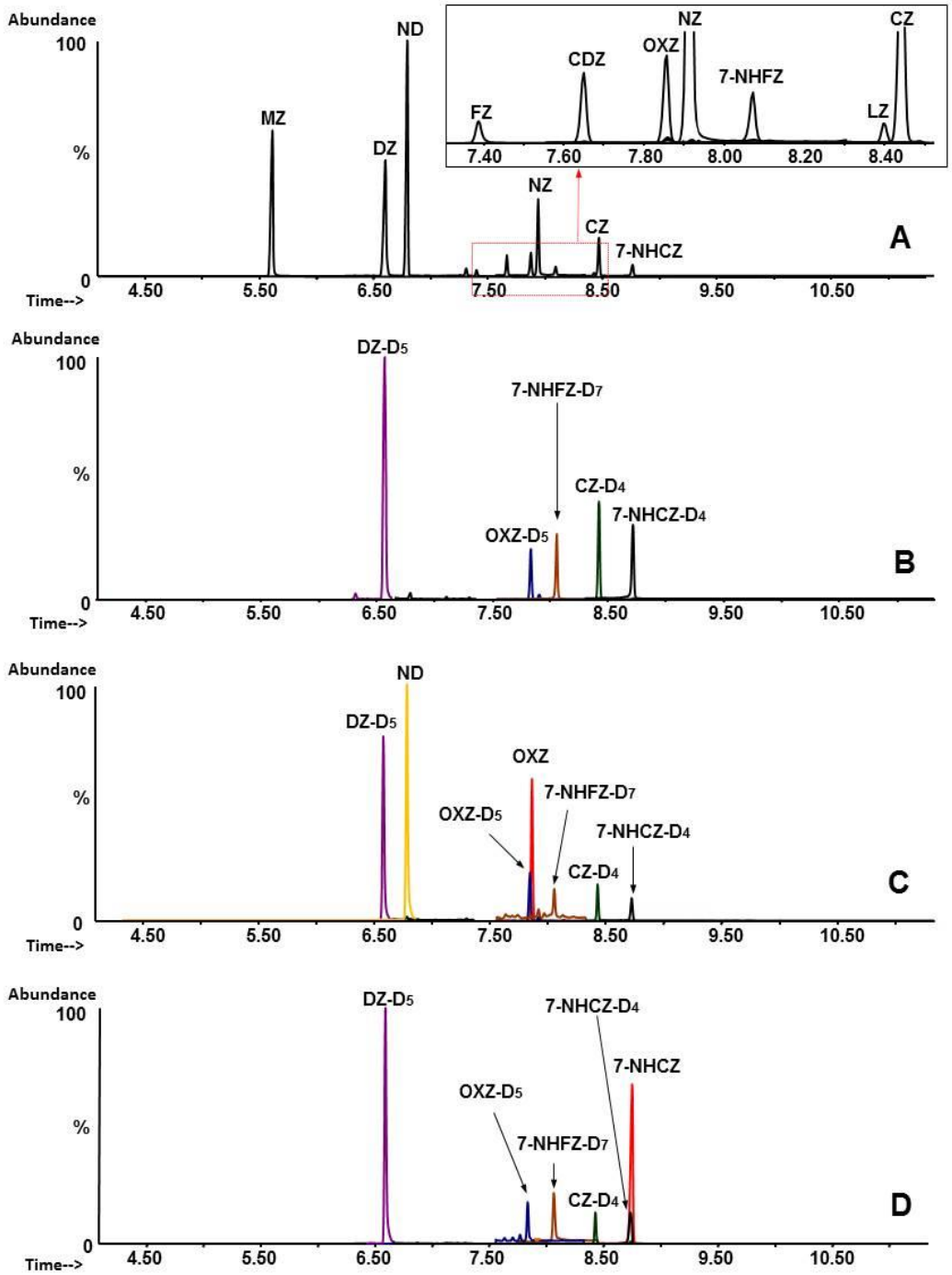


Figura 15 – Cromatograma obtido no modo SIM para benzodiazepínicos após LPME em amostras de urina. A) Amostra com adição de 100 ng/mL de todos analitos na ausência dos seus respectivos padrões internos deuterados; B) Amostra branco com adição de 100 ng/mL de padrões internos deuterados; C) Amostra de caso real 69,10 de ND e 307,9 ng/mL de OXZ; D) Amostra de caso real 224 ng/mL de 7-NHCZ. CZ, clonazepam; 7-NHCZ, 7-aminoclonazepam; FZ, flunitrazepam; 7-NHFZ, 7-aminoflunitrazepam; DZ, diazepam; ND, nordiazepam; OXZ, oxazepam; TZ, temazepam; LZ, lorazepam; CDZ, clordiazepóxido; NZ, nitrazepam; MZ, medazepam.

Tabela 12 – Valores de benzodiazepínicos e produtos de biotransformação em amostras de casos reais.

Amostra	Benzodiazepínico administrado	Analito	[ng/mL]
Urina 1	Diazepam	Oxazepam	109,6
Urina 2	Diazepam	Nordiazepam	69,1
		Oxazepam	307,9
Urina 3	Lorazepam	Lorazepam	151,1
Urina 4	Clonazepam	7-aminoclonazepam	23,5
*Urina 5	Desconhecido	7-aminoclonazepam	224,0

*Obs.: A urina 5 reflete o caso de uma amostra real cujo histórico era desconhecido.

4. DISCUSSÃO

A derivatização foi o primeiro passo a ser realizado para determinação dos benzodiazepínicos e seus produtos de biotransformação em virtude da necessidade de adquirir um método sensível e que permitisse uma boa separação cromatográfica entre os analitos. Inicialmente utilizou-se BSTFA, porém não foi possível derivatizar clordiazepóxido, 7-aminoclonazepam e 7-aminoflunitrazepam. Diante desse problema, optou-se pela utilização de MTBSTFA, um agente derivatizante que apresenta propriedades superiores em termos de sensibilidade, reprodutibilidade e estabilidade se comparado ao BSTFA (GUNNAR *et al*., 2005). O grupo tert-butildimetilsilil (*t*-BDMS) substitui o próton ativo do analito de interesse, promovendo uma adição de 114 daltons no peso molecular. Durante o processo de fragmentação da molécula por ionização eletrônica (EI), o íon *m/z* 57 é abundante e é originado do agente derivatizante, e por isso esse íon não pode ser utilizado para o modo SIM. O MTBSTFA conseguiu derivatizar clonazepam, clordiazepóxido e 7-aminoclonazepam, entretanto ainda não reagia perante 7-aminoflunitrazepam. Isto não seria um problema caso fosse atingido o LD e LQ desta molécula conforme indicado pelo guia da UNODC e SOFT (UNODC, 2012; SOFT, 2014).

Diante dessa dificuldade, há estudos que demonstram uma “dupla derivatização”, ou seja, ocorrem duas reações com diferentes derivatizantes com o intuito de alcançar seus objetivos analíticos como sensibilidade, separação cromatográfica e ampliação da gama de analitos a serem avaliados (ELIAN, 1999; PAPOUTSIS *et al*., 2010; CAVALCANTI *et al.*, 2010; SIMON-COLIN *et al*., 2012). Este tipo de reação foi realizado por Elian (1999) que derivatizou 7-aminoflunitrazepam com PFPA e

MTBSTFA, formando uma nova molécula para ser analisada no GC-MS. Em virtude da disponibilidade de PFPA e do custo deste material, procurou-se uma alternativa que pudesse suprir essas adversidades. Desta forma, optou-se por utilizar TFAA em lugar do PFPA, um reagente de menor custo, comercializado em diferentes volumes e largamente disponível em laboratórios de toxicologia. O uso isolado de TFAA para promover a derivatização de 7-aminoflunitrazepam já havia sido descrito na literatura por Terada e colaboradores (2003).

De acordo com a literatura, TFAA é capaz de reagir com uma série de grupos funcionais como alcoóis e aminas (SEGURA *et al.*, 1998; REGIS, 2008). Porém, este derivatizante apenas reagiu com grupos $–NH_2$ da posição R6 dos benzodiazepínicos, ou seja, 7-aminoclonazepam e 7-aminoflunitrazepam. No trabalho de Terada e colaboradores (2003), eles demonstraram um espectro de massa do 7-aminoflunitrazepam–TFAA cuja massa molecular deste composto era 379 daltons, sendo que *m/z* 351 era o íon quantificador após perda de CO do anel benzodiazepínico. O sucesso obtido para este aminobenzodiazepínico foi estendido para 7-aminoclonazepam.

O par de elétrons dos grupos aminos primários presentes nos aminobenzodiazepínicos atacam o grupamento carbonila do reagente acilante por uma via de adição-eliminação, originando os produtos monotrifluoroacetilados nas condições testadas. Provavelmente a formação de amida após reação com uma molécula de TFAA concebe um nucleófilo muito pior que amina devido à desativação causada pelo grupamento monotrifluoroacetilado formado. Esta condição impede que outra molécula deste derivatizante seja incorporada ao sítio passível de derivatização e por isso somente uma molécula de TFAA obtem sucesso nesta reação. Esse comportamento também é verificado para norcetamina e deidronorcetamina (LIN & LUA, 2006).

Uma nova abordagem foi dada ao adicionar MTBSTFA após derivatização de TFAA para 7-aminoflunitrazepam e 7-aminoclonazepam. O sílicio é um elemento que apresenta afinidade a átomos eletronegativos e isto explica porque não ocorre a reação na amina primária (CLAYDEN *et al.*, 2012). Provavelmente os produtos obtidos da reação com TFAA apresentam uma carbonila que sofre um forte efeito indutivo eletrorretirador oriundo do grupo $–CF_3$ do acilante. Com isso, o oxigênio da carbonila se liga ao silício, formando um complexo em uma primeira etapa e posteriormente ocorre um rearranjo eletrônico do qual o sílicio é atacado pelo nitrogênio da amida, similar a um mecanismo de substituição nucleofílica bimolecular (SN2) (CLAYDEN *et al.*,

2012). Esta condição permite que as reações de sililação possam ocorrer na ausência de uma base como catalisador, devido à natureza do grupo de saída na MTBSTFA conforme descrito na literatura (SEGURA *et al.*, 1998; GUNNAR *et al.*, 2005; KHAKIMOV *et al.*, 2013). Esta reação está descrita na **Figura 16**.

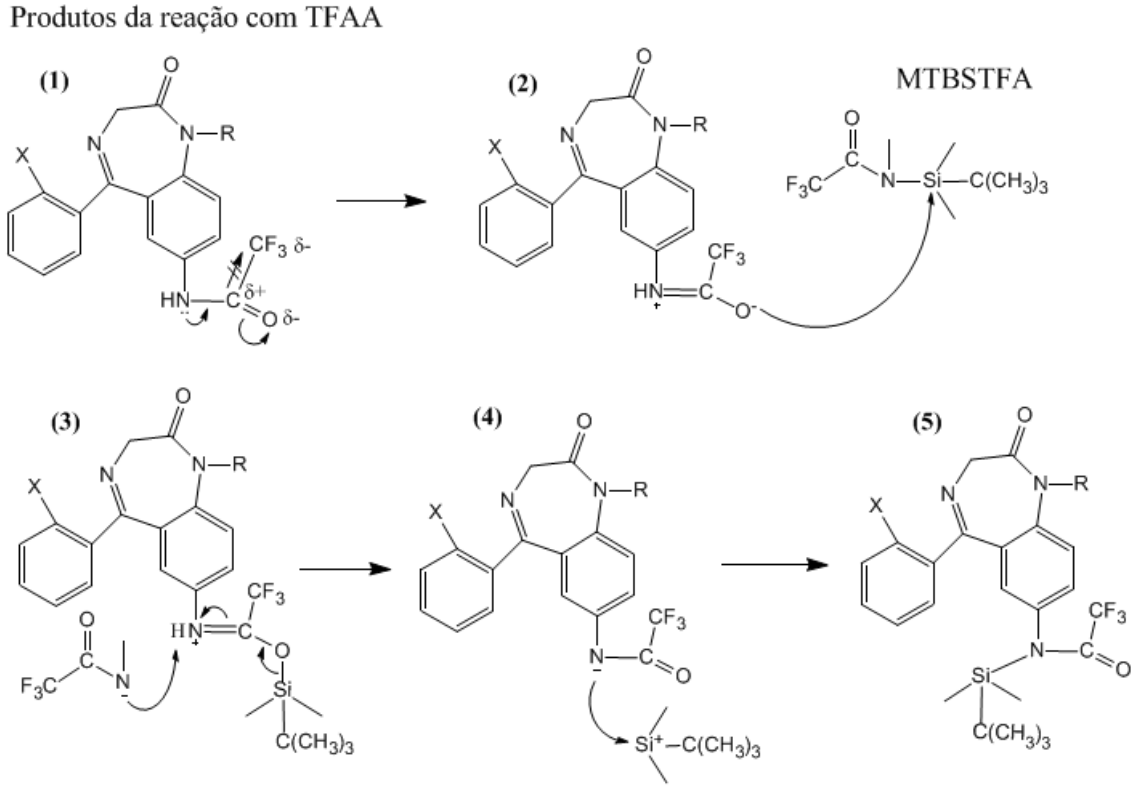


Figura 16 – Proposta para reação de MTBSTFA a partir de derivados de trifluoroacetamidas oriundos da primeira etapa de derivatização com TFAA. 1) Efeito indutivo eletrorretirador do grupo $–CF_3$; 2) Ataque do ânion da carbonila ao sílicio do MTBSTFA; 3) Rearranjo eletrônico para formação do ânion de nitrogênio da amida; 4) Ataque nucleofílico do ânion de nitrogênio da amida ao cátion de sílicio do agente sililante; 5) Produto da dupla derivatização. R = -H, X = -Cl (7-aminoclonazepam); R = $-CH_3$, X = -F (7-aminoflunitrazepam).

Os demais analitos com sítios passíveis para derivatização (clonazepam, clordiazepóxido, lorazepam, nordiazepam, nitrazepam e oxazepam) reagiram com MTBSTFA substituindo o(s) próton(s) ativo(s) pelo grupo *t*-BDMS. Desta forma, conclui-se que a dupla derivatização (TFAA + MTBSTFA) apresentou ótimos resultados para 7-aminoclonazepam e 7-aminoflunitrazepam através da reação dos agentes derivatizantes com o grupamento $–NH_2$ presente nestas moléculas. Estas estruturas químicas após estas reações são estáveis por 24 horas independente da

temperatura. Porém, o aumento de suas áreas absolutas após este período pode ter sido causado pela volatilização do solvente, acarretando no aumento da concentração de analito (**Gráfico 12**).

O agente acilante não interage com grupamentos –OH e –NH do anel benzodiazepina tampouco perturbou a determinação cromatográfica e/ou a sensibilidade dos analitos. As diferentes energias de ionização (5, 15 e 70 eV) demonstraram que a dupla derivatização sobre 7-aminoclonazepam e 7-aminoflunitrazepam ocorreu perfeitamente, com a preservação do sinal do íon molecular em baixas colisões iônicas (**Figura 13**). O espectro de massas dos demais benzodiazepínicos e seus produtos de biotransformação após a dupla derivatização estão na **Figura 14**. O comportamento de fragmentação das moléculas foi baseado em outros trabalhos da literatura (SMYTH *et al.*, 2000; GUNNAR *et al.*, 2005; LIN & LUA, 2006; RISOLI *et al.*, 2007; NIELSEN, 2011).

A hidrólise enzimática foi uma etapa a ser avaliada, pois é necessária em análises de substâncias excretadas na forma conjugada. Este procedimento promove a liberação do composto conjugado para o estado livre, permitindo uma melhor extração e consequentemente sensibilidade do analito (DAWLING *et al.*, 2008). Conforme relatado por O´Neal e Poklis (2002), não há diferenças significativas entre os diferentes glicuronídeos que podem ser formados e excretados (oxazepam, lorazepam e temazepam) quando sofrem clivagem hidrolítica. Neste aspecto, oxazepam-glicuronídeo adquirido da Cerilliant® foi escolhido como padrão para os experimentos envolvendo hidrólise enzimática devido ao seu menor custo e por ser um produto de biotransformação de vários outros benzodiazepínicos que estão sendo determinados neste trabalho. Assim, o método descrito por Meatherall (1994) serviu de suporte para o experimento, sendo que dois pontos foram avaliados neste estudo: tempo de hidrólise e concentração de enzima. A temperatura de hidrólise ficou estabelecida em 55°C como descrito por Meatherall (1994), tendo em vista que a maioria dos trabalhos envolvendo hidrólise enzimática para benzodiazepínicos trabalham na faixa de 50 a 60°C (MEATHERALL, 1994; BORREY *et al.*, 2002 ADAMOWICZ & KALA, 2010; UNODC, 2012).

Em relação ao tempo de hidrólise, 90 minutos foi o tempo ideal, diferindo de Meatherall (1994), que havia estipulado 120 minutos de incubação. Provavelmente a disponibilidade de um padrão de oxazepam-glicuronídeo permitiu uma melhor avaliação do período necessário para clivagem hidrolítica. O trabalho de Meatherall

(1994) indicou 5000 unidades de enzima para promoção da hidrólise, enquanto o guia da UNODC (UNODC, 2012) permite uma variação entre 1000 a 20000 unidades de enzima. A partir desses dados, avaliaram-se as concentrações de 2500 e 5000 unidades de β-glicuronidase e não houve diferenças significativas entre os diferentes níveis relatados, optando por 2500 unidades de enzima.

Recentemente, há relatos de formação de outros benzodiazepínicos (diazepam, nordiazepam e delorazepam) após hidrólise enzimática em amostras de urina de pessoas que ingeriram oxazepam, temazepam e lorazepam (FU *et al*., 2010; FU *et al*, 2011). Contudo, essa redução foi verificada em situações de altas concentrações dos benzodiazepínicos glicuronados na matriz biológica (acima de 1000 ng/mL) e elevado tempo de incubação (2 a 24 horas). Além disso, Fu e colaboradores (2010) identificaram nordiazepam em amostras de urina que não passaram pela etapa hidrolítica, justificando que essa presença pode ter ocorrido devido à circulação enterohepática, que promove a redução de oxazepam por ação de bactérias presentes no trato gastrointestinal.

Durante a otimização da LPME-trifásica para benzodiazepínicos e seus produtos de biotransformação, os dados foram apresentados em percentagem (%) conforme explicado no tópico 2.4. A extração destas substâncias por LLE exige controle do pH da matriz biológica e uma ampla faixa pode ser utilizada (8-11), sendo possível focar conforme a droga(s) a serem determinadas (SPINELLI, 2002; SIMONSEN *et al.*,2010; SAUVE *et al.*, 2012; JANG *et al.*, 2013). Desta forma, para a análise da fase doadora foi estudado uma faixa de pH de 8-13, apesar de Ugland e colaboradores (2000) indicarem o pH 7 como ideal para extração de diazepam e nordiazepam por LPME, enquanto Cui e seu grupo (2009) aconselham um pH 9,5 para flunitrazepam . Diante da falta de dados na literatura para os demais compostos perante LPME, assim como a consideração de que essas substâncias são bases fracas, o trabalho focou-se em uma banda tipicamente alcalina para a extração.

O resultado adquirido indicou que o pH ideal da fase doadora (matriz biológica) foi 10 devido a sua homogenicidade perante todos os analitos (**Gráfico 14**). Medazepam não é afetado pelas variações de pH, pois as diferenças entre os sinais ao longo do estudo da fase doadora não foi significativo. O pH 8 e 9 favoreceu a forma não ionizada dos benzodiazepínicos de caráter mais ácido (flunitrazepam, clonazepam, nitrazepam, diazepam, nordiazepam, oxazepam e clordiazepóxido). À medida que o pH da matriz biológica foi aumentando, apenas 7-aminoclonazepam e 7-aminoflunitrazepam foram beneficiados, sendo que os demais analitos diminuíram seus sinais. O comportamento

das moléculas analisadas pode ser explicado pelo pKa dos analitos avaliados. Em soluções com pH mais elevados, provavelmente favoreceu a forma molecular do grupamento $–NH_2$ (posição R6) para 7-aminoclonazepam e 7-aminoflunitrazepam, enquanto que nestas condições ocorreu a ionização de grupos aminos que estão presentes nestas moléculas.

A escolha do solvente orgânico necessitou de outra abordagem para que pudesse contemplar o objetivo do trabalho. Éter dihexílico e 1-nonanol foram os solventes orgânicos que apresentaram melhores resultados (**Gráfico 16**), pois o primeiro foi considerado o solvente mais universal para os benzodiazepínicos e o segundo mais específico para nitrazepam, 7-aminoclonazepam e 7-aminoflunitrazepam. Isto pode ser explicado pelo coeficiente de partição dos solventes em relação aos analitos avaliados. Éter dihexílico apresenta um log P = 4,55, o que favorece a solubilidade de substâncias mais apolares. À medida que a polaridade dos analitos foi aumentando, outros solventes como o decanol (log P = 3,47) e 1-nonanol (log P = 3,03) (CHEMICALIZE, 2008) favoreceram a extração.

Em razão das baixas concentrações exigidas pela UNODC e SOFT (UNODC, 2012; SOFT, 2014), não foi possível atingir os valores estabelecidos por estes órgãos somente para 7-aminoclonazepam e 7-aminoflunitrazepam. Em uma extração com 1-nonanol nas mesmas condições, conseguiu-se extrair valores abaixo de 5 ng/mL para os aminobenzodiazepínicos, mas os demais analitos não alcançaram os níveis recomendados. Diante do desafio de contemplar todos os benzodiazepínicos e seus produtos de biotransformação, optou-se por fazer uma combinação de solventes.

A combinação de solventes é tradicionalmente descrita na literatura para LLE (MEATHERALL, 1994; CHOU *et al.*, 2004; FU *et al.*, 2010). Em 2000, Ugland e colaboradores (2000) descreveram o primeiro experimento deste tipo para LPME na tentativa de melhorar seu processo extrativo para diazepam e nordiazepam. Misturas de éter dihexílico e 1-nonanol em diferentes proporções foram estudadas na tentativa de obter o melhor resultado que contemplasse todos os analitos e seus respectivos níveis conforme recomendados pela UNODC e SOFT (UNODC, 2012; SOFT, 2014). A opção 9:1 (éter dihexílico:1-nonanol) apresentou um número maior de benzodiazepínicos extraídos até a concentração limite recomendada pelos guias forense para situações de DFC (UNODC, 2012; SOFT, 2014). Provavelmente a solubilidade desta combinação formou um sistema mais homogêneo para os analitos avaliados se comparado a éter dihexílico e 1-nonanol de forma isolada. Desta maneira foi possível atingir os objetivos

em relação à detectibilidade para a maioria dos analitos que estão sendo avaliados através de uma LPME-trifásica, uma técnica teoricamente mais reprodutível que o sistema bifásico e com poucos estudos.

Em 2000, Ugland e colaboradores (2000) desenvolveram a determinação de diazepam e nordiazepm por LPME-bifásico, enquanto Cui e seu grupo (2009) avaliaram flunitrazepam através de *p*-xileno como fase aceptora utilizando fibras de fluoreto de polivinilideno (PVDF). Em um processo de protonação para benzodiazepínicos, os íons H^+ que estão dentro do lúmen da fibra irão protonar o grupo =N- na posição 4 do anel benzodiazepina, porém variações da protonação ocorrem conforme o composto e seus grupamentos receptores de prótons (CARVALHO *et al*., 2010; CHEMICALIZE, 2012). De maneira geral, ácidos minerais demonstraram resultados mais efetivos no aprisionamento de um analito de caraterística alcalina se comparado a ácidos orgânicos. Neste aspecto, HCl é o mais indicado por ser mais seguro em sua manipulação em relação à outros ácidos minerais tradicionais (H_2SO_4, HNO_3 e $HClO_4$), além de sua eficiência em doar protons a uma molécula de caráter básico (PEDERSEN-BJERGAARD *et al*., 2002; PEDERSEN-BJERGAARD & RASMUSSEN, 2008).

Em 2003 foi descrita uma teoria baseada em dados obtidos de alprazolam, nitrazepam, diazepam e nordiazepam do qual a fase aceptora deve ser pelo menos 3,3 unidades de pH abaixo do pKa do analito para promover a ionização e consequentemente o aprisionamento da molécula em LPME-trifásica. Desta forma, 1 mol/L e 0,4 mol/L de HCl não apresentariam diferenças significativas na captura destes analitos no lúmen da fibra (UGLAND *et al*., 2003). Diante destes fatos, o delineamento do experimento tem como ponto de partida 0,1 mol/L e termina com 5 mol/L de HCl, sendo que o melhor resultado obtido indicou o uso de 3 mol/L de HCl como fase aceptora. Pedersen-Bjeargaard e colaboradores (2002) haviam relatado que a chave para melhorar a extração de diazepam por meio trifásico era diminuir o valor de pH da fase aceptora, o que de fato o **Gráfico 15** demonstrou isso. Porém, a partir de 5 mol/L de HCl, a maioria dos analitos demonstraram decréscimo de seus sinais. Provavelmente na concentração máxima testada pode ter ocorrido a degradação da estrutura molecular devido à força de acidez que está no lúmen da fibra.

A velocidade de agitação de uma LPME é necessária para aumentar a energia cinética das moléculas para promover a extração. Entretanto, alguns compostos não apresentam um comportamento linear dependente deste parâmetro e/ou a proposta do método é alcançada sem a necessidade de otimização deste parâmetro (RASMUSSEN

& PEDERSEN-BJERGAARD, 2004; PEDERSEN-BJERGAARD & RASMUSSEN, 2008) como já foi verificado com barbitúricos em sangue total (ALMEIDA *et al.*, 2012). Para os benzodiazepínicos, a frequência de agitação é fundamental na extração por LPME trifásico, pois 2400 rpm foi o melhor resultado para a maioria dos analitos. Neste aspecto, 7-aminoclonazepam, 7-aminoflunitrazepam, lorazepam, nitrazepam, medazepam e oxazepam são dependentes da energia de movimento para atingir o ápice de sua extração, ou seja, para que eles entrem em contato com a fase aceptora e sejam ionizados. Não foi presenciado prejuízo da extração pelo vigor do movimento, indicando que a combinação de solventes é robusta perante a velocidade de agitação.

Similar à velocidade de agitação, o tempo também é fundamental, pois este parâmetro é necessário para que se atinja o equilíbrio e a distribuição de massas entre a fase doadora e aceptora permaneça constante (RASMUSSEN & PEDERSEN-BJERGAARD, 2008). De acordo com o **Gráfico 20**, observa-se que é possível extrair com eficiência clonazepam, flunitrazepam, diazepam, nordiazepam, temazepam, oxazepam e clordiazepóxido em até 30 minutos de agitação a 2400 rpm. Contudo, 90 minutos é o tempo necessário para extrair todos os benzodiazepínicos e seus produtos de biotransformação, especialmente 7-aminoclonazepam e 7-aminoflunitrazepam, enquanto 120 minutos podem ocorrer perdas no processo extrativo para todos os compostos. O prejuízo causado pelo tempo de extração pode ter ocorrido devido ao deslocamento do solvente que estava impregnado no poro, tendo em vista a alta energia cinética imposta nesta situação. Além disso, o comportamento da combinação de éter dihexílico e 1-nonanol é desconhecido diante destas circunstâncias. Todos esses aspectos podem ter influenciado no desempenho da LPME em relação ao tempo.

Como a LPME é considerada uma minituarização da LLE (PSIKALLIS & KALOGERAKIS, 2002), a adição de sal é uma etapa a ser otimizado devido ao efeito *salting out* (ULRICH, 2000; PSIKALLIS & KALOGERAKIS, 2003). O **Gráfico 18** demonstrou que 10% de NaCl apresentou maiores áreas para a maioria dos compostos avaliados, enquanto a concentração máxima avaliada (20%) é apenas indicada para 7-aminoclonazepam e 7-aminoflunitrazepam. Isto demonstra que estas moléculas são influenciadas pelo aumento da força iônica da matriz biológica, aumentando a afinidade pelo solvente extrator.

Com a conclusão da derivatização, hidrólise enzimática e otimização da LPME, partiu-se para a validação do método seguindo o guia da UNODC (UNODC, 2009). Inicialmente, utilizamos diazepam-D_5 como padrão interno, porém ele não corrigiu a

precisão de vários benzodiazepínicos, exigindo a adição de outros padrões deuterados. Para isso, avaliamos clonazepam-D_4, clordiazepóxido-D_5, diazepam-D_5, flunitrazepam-D_7, oxazepam-D_5, 7-aminoclonazepam-D_4 e 7-aminoflunitrazepam-D_7 perante todos os compostos que foram analisados durante a otimização da LPME. Temazepam apresentou um CV% acima de 20% em todas as concentrações e padrões deuterados analisados e por isso esse fármaco não foi validado.

Os dados referentes à validação do método estão descritos na **Tabela 11**. Os limites de detecção recomendados pela UNODC e SOFT para os benzodiazepínicos analisados estão na faixa de 5 a 10 ng/mL (ANEXO 2) (UNODC, 2012; SOFT, 2014). A metodologia validada contempla 8 compostos (medazepam, diazepam, nordiazepam, clordiazepóxido, oxazepam, clonazepam, nitrazepam e 7-aminoclonazepam) que estão abaixo deste limite, sendo que 7-aminoflunitrazepam é detectado dentro do valor estabelecido e apenas lorazepam e flunitrazepam são detectados acima da concentração indicada por estes guias. Trata-se de um método sensível que determina 11 benzodiazepínicos e seus respectivos produtos de biotransformação demonstrando que esta nova técnica tem resultados similares a técnicas tradicionais de extração para várias substâncias desta classe de fármaco (MIKI *et al.*, 2002; ELSOHLY *et al.*, 2006; PAPOUTSIS *et al.*, 2010; ARNHARD *et al.*, 2012). Em relação às microextrações, o estudo desenvolvido é superior por contemplar um maior número de analitos e com uma sensibilidade semelhante se comparado a outros trabalhos conforme demonstrado na **Tabela 13**.

Tabela 13 – Resumo das técnicas minituarizadas para determinação de benzodiazepínicos e seus produtos de biotransformação em amostras de urina.

Analitos	Metodologia	Equipamento	LD (ng/mL)	Referência
CDZ, CZ, DZ, FZ, LZ, MZ, ND, 7-NHCZ, 7-NHFZ, NZ e OXZ	LPME	GC-MS	0,1-15	*Método desenvolvido*
DZ, MIZ e AZ	SPE-DLLME	GC-FID	0,1-0,2	GHOBADI *et al*., 2014
CDZ	DLLME	LC-UV	2,4	KHODADOUST *et al*., 2013
AZ, NZ, CZ, MIZ e DZ	VMME	LC-UV	2,0	REZAEI *et al*., 2013
AZ	MEPS	GC-MS	0,1	RANI & MALIK, 2012
FZ	LPME	GC-MS/MS	0,001	CUI *et al*., 2009
7-NHFZ	DLLME	LC-MS/MS	0,025	MELWANKI *et al*., 2009
7-NHFZ	SPME	LC-MS/MS	0.02	LORD *et al*., 2006
DLZ	SPME	LC-UV	5	ARESTA *et al*., 2002
DZ, ND, OXZ, TZ e CZ	SPME	LC-UV	46-600	MULLET & PAWLISZYN, 2002
DZ e ND	LPME	GC-NPD	5,7-31	UGLAND *et al*., 2000
DZ, ND, TZ, OXZ, 7-NHFZ, 7-NHDFZ e CZ	SPME	LC-MS	0,02-2,0	YUAN *et al*., 2000
BZ, CZ, DZ, FZ, HZ, NZ, NTZ	SPME	GC-ECD	2-20	GUAN *et al*., 1999
AZ, DZ, FZ, ND, PZ e OXZ	SPME	GC-NPD	2,85-148	. REUBSAET *et al*., 1998

AZ, alprazolam; CDZ, clordiazepóxido; CZ, clonazepam; DLZ, delorazepam; DZ, diazepam; FZ, flunitrazepam; HZ, haloxazolam; LZ, lorazepam; MIZ, midazolam; ND, nordiazepam; NHDFZ, 7-aminodesmetilflunitrazepam; NHFZ, 7-aminoflunitrazepam; NZ, nitrazepam; NTZ, nimetazepam; OXZ, oxazepam; PZ, Prazepam; TZ, temazepam. DLLME, microextração líquido-líquido dispersiva; GC-FID, gas chromatography with flame ionization detector; GC-ECD, cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons; GC-MS, cromatografia gasosa-espectrometria de massas; GC-NPD, cromatografia gasosa com detector de nitrogênio-fósforo; LPME, microextração em fase líquida;

VMME, microextração mediada por fibra oca vesicular; LC-MS, cromatografia líquida-espectrometria de massas; LC-UV, cromatografia líquida-ultravioleta; MEPS, microextração por sorvente empacotado; SPE, extração em fase sólida; SPME, microextração em fase sólida.

Os valores de recuperação apresentam ampla variação (3,30% para lorazepam até 92,77% para medazepam) e isto pode ter sido causado pela diferença existente no coeficiente de partição dos analitos envolvidos, assim como a ionização dos mesmos perante a solução de 3 mol/L de HCl. Lorazepam e oxazepam apresentam um grupo -OH na posição R3, e isto pode levar a uma rearranjo molecular causado pela desidratação quando os grupos –OH destas moléculas entram em contato com 3 mol/L de HCl (SOLOMONS, 1998), o que indicaria a baixa capacidade de recuperação destes analitos. Para clonazepam, nitrazepam e flunitrazepam, o grupamento NO_2 da posição R6 garante características mais ácidas, permitindo que essas moléculas não sejam facilmente ionizadas se comparada as demais, o que desfavorece a armadilha proposta na LPME-trifásica. Em relação a 7-aminoflunitrazepam e 7-aminoclonazepam, a redução do grupo NO_2 para NH_2 promoveu maior solubilidade na combinação de éter dihexílico e 1-nonanol. Além disso, os aminobenzodiazepínicos dispõe de maior capacidade de protonação no meio ácido, o que é mais difícil com seus precursores.

Os fármacos medazepam, diazepam e nordiazepam apresentaram os melhores resultados, com recuperações acima de 75%. Isto se deve solubilidade em relação aos solventes e a total protonação do grupo =N- da posição 4. Deve ser levado em consideração que existe apenas um único trabalho referente ao comportamento de benzodiazepínicos frente à LPME-trifásica, demonstrando recuperações que variavam entre 18 e 38% (UGLAND *et al*., 2003). Diante disso, os dados obtidos neste estudo podem ser considerados excelentes.

A exatidão do método encontra-se dentro do estabelecido pelo guia da UNODC (2009) e as variações estão em uma faixa de 88,03 a 119,57% para todos analitos conforme avaliado pelo estudo da heteroscedasticidade, indicando que esta metodologia desenvolvida é segura nas diferentes concentrações analisadas. Os dados adquiridos da precisão intra e intra-dia são considerados bons para os analitos avaliados (CV% entre 11,5 a 19,4%). Apenas 7-aminoflunitrazepam demonstrou valores maiores do que estabelecido pelo guia para precisão inter-dia (CV% 15,6 a 20,5).

Devido à possibilidade de obtermos amostras de urina com altas concentrações de benzodiazepínicos e seus produtos de biotransformação, realizou-se a validação da diluição. Adicionou-se os analitos em uma urina isenta de drogas até a concentração de 1300 ng/mL e dilui-se a amostra na proporção 1/10 com urina branca para obter uma concentração final de 130 ng/mL. Posteriormente foi efetivado o processo de extração com uma curva de calibração. Os resultados obtidos foram de 89,1 a 113,2 % de exatidão para os analitos envolvidos. O CV% foi menor que 15% para todos analitos.

Em relação às amostras, os casos 1 e 2 demonstraram que nordiazepam apresenta período de detecção mais curto que oxazepam, o produto final de vários benzodiazepínicos, incluindo diazepam (não detectado em ambos). Este achado está de acordo com a literatura (KINANI *et al*., 2007; LENNESTåL *et al*., 2008). Na amostra 1, a concentração de oxazepam está abaixo do limite de detecção de alguns imunoensaios utilizados em testes de triagem (200 ng/mL), do qual poderia levar a resultados falso negativo e consequentemente laudos toxicológicos errôneos. Os baixos níveis de recuperação de lorazepam (3,3-4,2%) observados durante a validação do método não foram relevantes para a mensuração deste analito na matriz urinária como apresentado na urina do voluntário 3.

Nos casos reais 4 e 5, clonazepam não foi detectado e apenas 7-aminoclonazepam foi determinado em ambas amostras. O voluntário 4 admitiu ingestão deste fármaco (0,5 mg) e encontrou-se 23,5 ng/mL do produto de biotransformação, o que sugere que pequenas doses promovem baixas excreções deste analito, considerando que se trata da primeira coleta urinária após administração da droga. Para a amostra 5 (histórico desconhecido), a metodologia analítica desenvolvida apresentou-se confiável e que a dupla derivatização permitiu determinar inequivocadamente 7-aminoclonazepam, demonstrando picos cromatográficos gaussianos e sem a formação de artefatos (**Figura 15**).

5. CONCLUSÃO

A técnica LPME-trifásica para benzodiazepínicos possibilitou determinar com confiabilidade baixos níveis de 11 compostos em uma amostra de urina na mesma corrida cromatográfica conforme estipulado pela UNODC e SOFT (UNODC, 2012; SOFT, 2014). Entretanto, os índices de recuperação obtidos por alguns analitos podem ser considerados baixos. Isto não é um problema, pois o guia de validação de métodos

da UNODC permite que se obtenham baixas recuperações, desde que precisão e exatidão estejam dentro dos padrões estipulados pelo guia (UNODC, 2009).

O método proposto oferece a maior faixa de benzodiazepínicos analisados por uma técnica minituarizada em urina. Comparado com algumas metodologias, vantagens como simplicidade, preço e sensibilidade são características do estudo desenvolvido. Este procedimento pode ser aplicado quando há necessidade de determinar estes analitos nesta matriz biológica.

CAPÍTULO III

GAMA-HIDROXIBUTIRATO

1. INTRODUÇÃO

Outra substância psicoativa que recebe atenção especial das autoridades é o gama-hidroxibutirato (GHB), também conhecido popularmente como "*ecstasy líquido*". Este fármaco apresenta uma estrutura molecular relativamente simples, com um pKa = 4,72 e é derivado do neurotransmissor GABA produzido naturalmente pelos mamíferos. Seu mecanismo de ação é baseado na sua ligação a um receptor específico do GABA, além de exercer alteração da recepção dopaminérgica (LEBEAU & MOZAYANI, 2001; MARI *et al*., 2009).

A administração desta substância pode ocorrer na forma intravenosa ou oral, sendo que neste caso, necessita-se diluir a droga. Também há disponibilidade de cápsulas de GHB, do qual está presente na forma de um sal de sódio (ANDRESEN *et al.*, 2008). Sua absorção é muito rápida quando administrado via oral, atingindo sua concentração plasmática máxima em torno de 25 a 45 minutos. Esta droga não se liga a proteínas plasmáticas, sua distribuição é rápida e seus efeitos duram em torno de 1 a 4 horas dependendo da dose (ANDRESEN *et al.*, 2008). A rapidez de sua biotransformação promove a formação de produtos de origem endógena que participam de vários processos bioquímicos (ácidos que participam do ciclo do ácido cítrico) e fisiológicos (GABA) (**Figura 17**), não apresentando acumulação mesmo após múltiplas doses. Sua excreção urinária na forma inalterada é pequena (1-5% da dose administrada), do qual pode ser determinada em até 12 horas (HALLER *et al*., 2006).

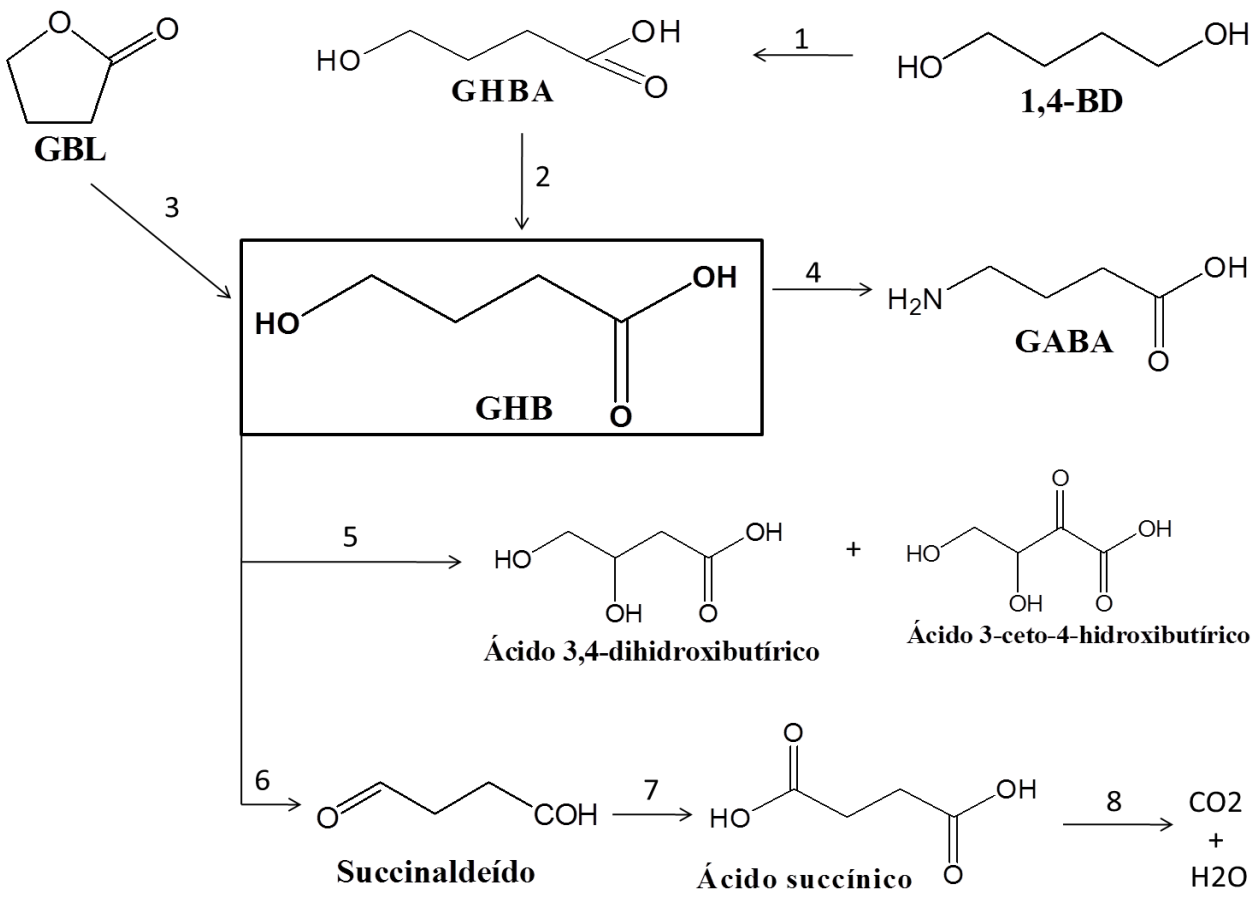


Figura 17 – Estrutura química do GHB e sua biotransformação

GBL= Gama-butirolactona; 1,4-BD= 1,4-Butanodiol; GHBA= Gama-hidroxibutiraldeído; GABA= Gama-aminobutirato; 1= álcool desidrogenase; 2= aldeído desidrogenase; 3= Lactonase; 4= GABA transaminase 5= Beta-oxidação; 6= Gama-hidroxibutirato desidrogenase; 7=Succinaldeído desidrogenase; 8= Ciclo de Krebs

Apesar do uso clínico do GHB nos anos 1960 como anestésico e agente hipnótico intravenoso (LEBEAU & MOZAYANI, 2001; ANDRESEN *et al.*, 2008), esta substância começou a ter seu uso indiscriminado através de fisiculturistas devido a sua capacidade de liberação de hormônio de crescimento (GH) (ANDRESEN *et al.*, 2008). A partir dos anos 1990, esta droga e seus precursores (gama-butirolactona e 1,4-butanediol) começaram a ser usadas em situações envolvendo abuso sexual devido à obtenção e manufatura relativamente fácil e rapidez dos seus efeitos (LEBEAU & MOZAYANI, 2001; NEGRUSZ & GAENSSLEN, 2008; ANDRESEN *et al.*, 2008).

A vítima de GHB relata que os sintomas são similares ao do etanol como desinibição e aumento da sociabilidade, além de promover amnésia anterógrada e até o aumento da libido (ELSOHLY & SALAMONE, 1999; DRASBEK & JENSEN, 2006; ANDRESEN *et al.*, 2008). Diante dos problemas causados por esta substância

psicoativa, vários países incluindo EUA, Reino Unido e Japão consideram a posse, venda e fabricação clandestina desta droga como atos ilegais perante suas legislações. Contudo, desde julho de 2002, este fármaco está aprovado pelo governo norte-americano para o tratamento da narcolepsia (NEGRUSZ & GAENSSLEN, 2008). No Brasil, o GHB está na lista Lista-B1 de substâncias psicotrópicas sujeita a Notificação de Receita "B" da ANVISA conforme RDC n° 36 de agosto de 2011 e seu uso terapêutico estão restritos a raros casos de distúrbios de sono e epilepsia (ANVISA, 2011).

Vários estudos avaliaram os níveis endógenos desta substância em uma série de voluntários para determinar um *cut off*, diferenciando o GHB endógeno em relação ao exógeno (LEBEAU *et al*., 2002; YEATMAN & REID, 2003; ELLIOT, 2003; BRAISLFORD *et al*., 2010). Diante dos dados obtidos, a concentração de 10 µg/mL ficou estabelecida do qual é utilizado pela UNODC e SOFT (UNODC, 2012; SOFT, 2014). A maioria dos trabalhos publicados com características forenses para determinação desta droga leva em consideração este nível urinário que hoje está em vigência. Porém, tal valor é alvo de discussões.

Uma questão levantada seria em relação à correção dos níveis de GHB em relação à creatinina. Braislford e colaboradores (2010) avaliaram a diferença entre volume urinário (µg/mL) em relação à correlação de creatinina (µg/g creatinina). Apesar da diferença de concentração desta substância entre os dois modos de quantificação, os resultados ainda sustentam um *cut off* de 10 µg/mL. O valor de corte a partir de 5 µg/mL já foi relatado como melhor índice a ser utilizado para situações de DFC baseado em observações de valores endógenos que são excretados na urina (ELIAN, 2002; LEBEAU *et al*., 2006). Recentemente, Andersen e seu grupo (2010) recomendam que a concentração de 6 µg/mL, ou seja, 40% menor do que é o atual (10 µg/mL) para evitar resultados falso negativos. Esses trabalhos estão resumidos na **Tabela 14**.

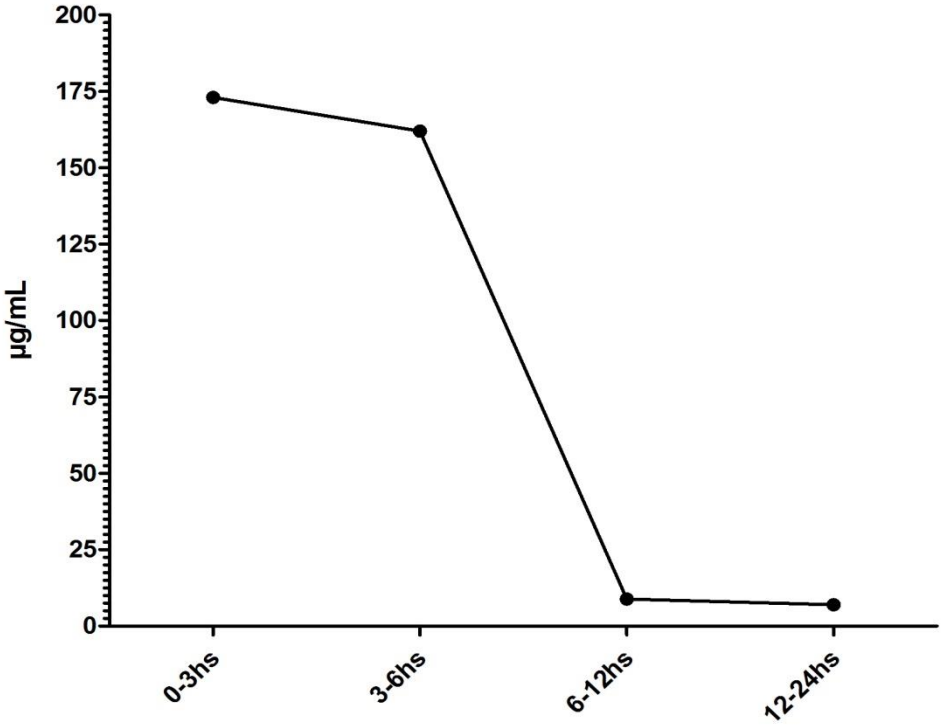
Tabela 14 – Resumo dos valores endógenos de GHB excretados em urina e os *cut offs* sugeridos.

Autor(s)	**N**	**Níveis médios de GHB (µg/mL)**	***Cut off* sugerido (µg/mL)**
ELIAN, 2002	670	3,08 (0,34-5,75)	5
LEBEAU *et al*., 2002	8	1,01 (0,00-6,63)	10
YEATMAN & REID, 2003	55	1,65 (0,90-3,50)	10
ELLIOT, 2003	144	0,73 (0,00-2,74)	10

CROOKES *et al*., 2004	50	0,53 (0,00-1,46)	10
SHIMA *et al*., 2005	30	0,54 (0,16-2,14)	10
LEBEAU *et al*., 2006	207	0,28 (0,00-2,70)	5
BRAISLFORD *et al*., 2010	1126	0,84 (0,00-5,50)	10
ANDRESEN *et al*., 2010	50	1,21 (0,64-4,20)	6

Contudo, todos os resultados são baseados em valores endógenos e não levam em consideração o período de detecção e/ou dose ingerida de GHB. Neste aspecto, apenas Haller e colaboradores (2006) determinaram a concentração urinária desta droga após a ingestão de uma dose desta substância em 16 voluntários, avaliando o tempo de excreção em diferentes horas. As amostras foram coletadas nos intervalos de 3, 6, 12, 24 e posterior 24 horas depois da ingestão de GHB (50mg/kg). Os resultados estão demonstrados no **Gráfico 21**.

Gráfico 21 - Excreção urinária após uma dose de 50 mg/kg de GHB



O **Gráfico 21** indica que a partir de 6 horas após consumo da GHB, os níveis excretados apresentam uma extensa faixa de concentração (não detectável a 35,9 µg/mL) cuja média encontrada foi de 3,8 µg/mL. A partir de 12 horas, a concentração desta substância foi menor que 5 µg/mL em todas as amostras. Isto indica que o período de detecção pode ser menor do que 12 horas caso o indivíduo fosse exposto a uma dose

desta droga (HALLER *et al*., 2006). Diante das bibliografias apresentadas, uma metodologia capaz de mensurar GHB nas concentrações propostas pelos estudos anteriores se faz necessária.

2. Desenvolvimento de método para determinação de GHB em amostras de urina

2.1. Condições cromatográficas para análise de GHB por GC-MS

As injeções no GC-MS foram feitas no modo de splitless e a separação cromatográfica foi obtida com uma coluna HP-5MS capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm x 0,1 espessura de filme), utilizando hélio como gás portador a 1,0 mL / min, em um modo de fluxo constante. O programa de temperatura do forno da coluna foi o seguinte:

1) Temperatura inicial de 50°C mantendo por 1 minuto.
2) 20°C/min até 120°C mantendo por 1 minuto.
3) 30°C/min até 300°C

O tempo total de análise foi de 11,50 min. A temperatura na porta de injeção e na linha de transferência foi de 280°C e 280°C, respectivamente. A análise dos analitos pelo MS foi através da ionização eletrônica (EI) (70 eV) com o monitoramento de seletivo de íons (SIM).

2.2. Otimização da derivatização do GHB

O estudo de otimização da derivatização do GHB foi realizado levando em consideração o tempo e a temperatura de incubação utilizando BSTFA como agente derivatizante. A eficiência da reação foi avaliada através da área total nas condições testadas. Os seguintes parâmetros foram estudados:

- Temperatura de reação (70, 80 e 90°C)
- Tempo de reação (5, 10, 20 e 30 minutos)

2.3. Otimização da extração líquido-líquido (LLE) para GHB

O estudo de otimização do método foi feita tomando em consideração a escolha do solvente extrator, pH da matriz biológica, o tempo de extração, a intensidade da agitação e da adição de sal sobre o rendimento da extração. Amostras de urina foram fortificadas a uma concentração de 10 µg/mL de GHB e foram submetidas ao método conforme descrito no tópico 2.4 deste capítulo. A eficiência da extração foi avaliada

através da área total produzido por cada analito em todas as condições testadas. Os seguintes parâmetros foram estudados:

- Solventes extratores (acetato de etila, acetonitrila, álcool isso-butílico, clorofórmio e uma mistura de metanol: diclorometano [20:80]).
- pH da matriz biológica (pH 0, 1, 2, 3, 4 e 5)
- Tempo de extração (10, 30, 60 e 600 segundos)
- Agitação (1200, 1600, 2000 e 2400 rpm).
- O efeito *salting out* também foi testada pela adição de 0, 5 e 10% de NaCl (m/v) na amostra antes do procedimento extrativo.

2.4. Determinação dos GHB para LLE

Utiliza-se 250 µL de urina colocado em um microtubo e adiciona-se 10 µL (250 µg/mL) de padrão interno GHB-D_6. A amostra deve ser acidificada com uma solução de 3 mol/L de HCl até o pH 2 e posterior adição de 500 µL de acetato de etila (fase orgânica). O microtubo é fechado e agitado por 10 segundos a 2400 rpm em um vórtex. Após agitação, o material é levado a microcentrífuga (1 minuto a 5000 rpm). 350 µL de fase orgânica são retirados e repassados para frascos contendo sulfato de sódio anidro. O sobrenadante resultante desta etapa é colocado em vial com grupos silanóis desativados para secagem a 40ºC sob fluxo de N_2. Após secagem, 35 µL de BSTFA são adicionados com agitação em vórtex e incubação por 10 minutos a 70ºC. Posteriormente, os recipientes são resfriados a temperatura ambiente e a ressuspensão é levada para injeção cromatográfica. Uma alíquota de 2 µL é injetada no GC-MS.

2.5. Validação de GHB para LLE em GC-MS

A validação dos GHB segue a mesma linha estabelecida no capítulo I e II com pequenas modificações. Para o limite de detecção, utilizou-se um pool de urina como branco, pois esta droga é uma substância endógena excretada pela via renal em relativa abundância. A partir deste pool é adicionado o padrão de GHB para descontar daquela que foi fortificada (triplicatas). A resposta equivalente a três vezes sinal:ruído delimitou este parâmetro (VILLAIN *et al*., 2003; UNODC, 2009). Os critérios de aceitação para limite de quantificação foram de coeficiente de variação $\leq$ 20% para precisão e 80-100% de exatidão (PETERS *et al*., 2007; ARMBRUSTER *et al*., 2008). A linearidade

em seis replicatas com adição de GHB em amostras de urina, sendo que o primeiro ponto tratava-se do LQ (0.5; 1.0; 2.5; 5; 10; 15 e 20 µg/mL).

A seletividade/especificidade foi avaliada utilizando 13 potenciais compostos que podem interferir na análise. As urinas passarão pelo processo de extração conforme descrito no tópico 2.4. O método avaliou potenciais substâncias interferentes através da análise de urinas fortificadas com 1000 ng/mL de 11-nor-9-carboxi-tetrahidrocanabinol, etanol, paracetamol, ácido acetilsalicílico, ácido metilmalônico, ácido succínico, beta-estradiol, cafeína, lorazepam, fenobarbital, benzocaína, fenilpropanolamina, carisoprodol. O critério de aceitação deste ensaio foi ausência de substâncias interferentes no tempo de retenção do analito de interesse e seu respectivo padrão interno.

A precisão e exatidão dos estudos foram realizadas através da análise de amostras de urina contendo três concentrações conhecidas, (1,5; 9,0 e 16 µg/mL) em três dias consecutivos. Os estudos de recuperação foram realizados através da preparação de dois conjuntos de amostras de urina. Um conjunto de amostras (conjunto A), que consiste em três concentrações, onde o primeiro ponto era 3 vezes maior que o LQ de cada analito (1,5; 9 e 16 µg /mL). O segundo conjunto (conjunto B), analitos foram adicionados nas amostras com a mesma concentração do conjunto A após o procedimento da LLE. A recuperação absoluta foi avaliada por comparação da resposta média obtida para o conjunto A e a resposta do conjunto B (100%). O Guia de Validação de Métodos Analíticos da UNODC (UNODC, 2009) não considera este fator como indicativo para reprovação do teste, desde que os demais parâmetros da validação alcancem os propósitos desejados.

3. RESULTADOS

3.1. Otimização da temperatura e do tempo de derivatização do GHB.

Gráfico 22 – Temperatura de derivatização para GHB

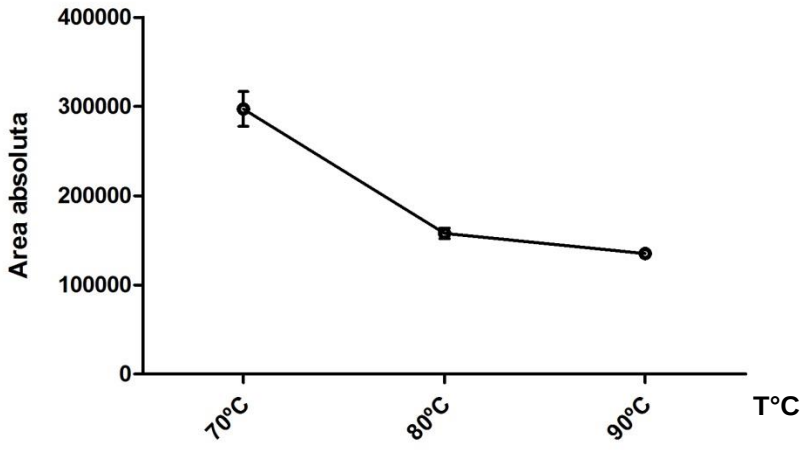
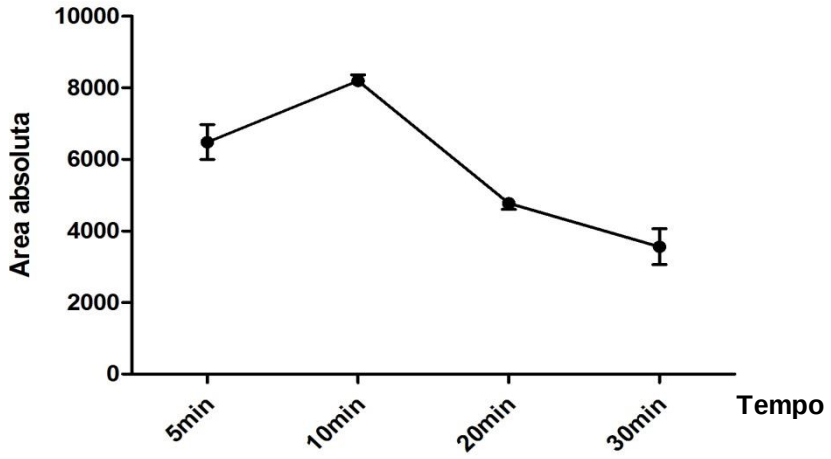


Gráfico 23 – Tempo de derivatização para GHB



O melhor resultado adquirido foi com 70°C durante o tempo de 10 minutos de incubação. A **Figura 18** demonstra a estrutura química e a fragmentação de massas do GHB derivatizado. Os íons monitorados foram 233 (quantificador), 204 and 117 *m/z*; 239 (quantificador), 210 and 123 *m/z* for GHB and GHB-D_6, respectivamente.

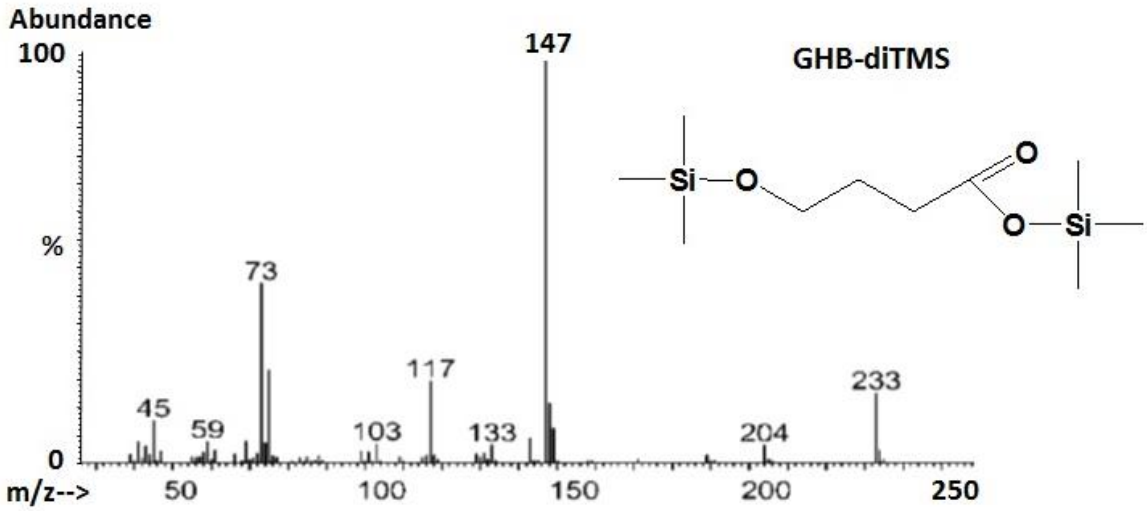


Figura 18 - GHB derivatizado com BSTFA e seu respectivo espectro de massas. GHB-diTMS, gama-hidroxibutirato ditrimetilsilil.

3.2. Otimização da LLE para GHB em amostra de urina

3.2.1. Solvente extrator, combinação de solventes, pH da matriz biológica, efeito *salting out* (%), frequência de agitação (rpm) e tempo de agitação (seg).

Gráfico 24 – Solvente extrator para GHB

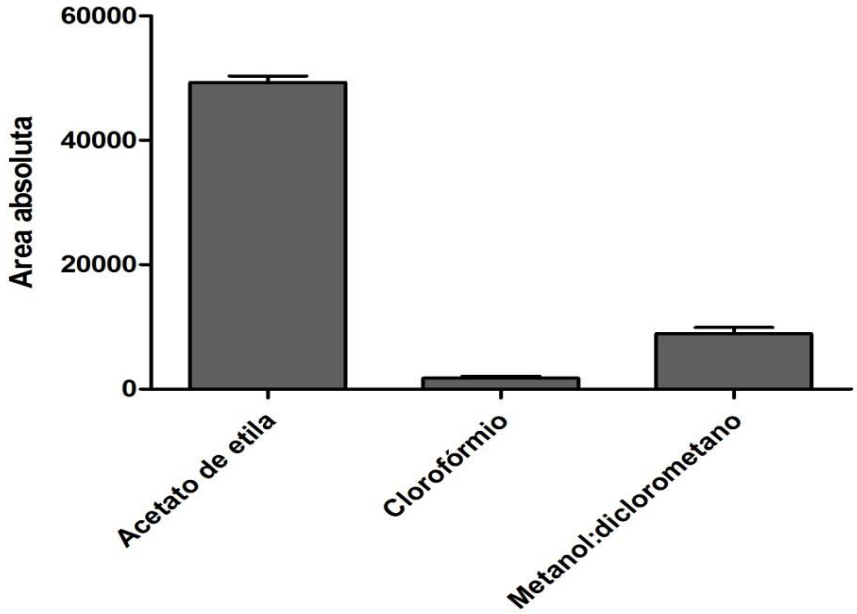


Gráfico 25 – Combinação de solventes acetato de etila:acetonitrila para GHB

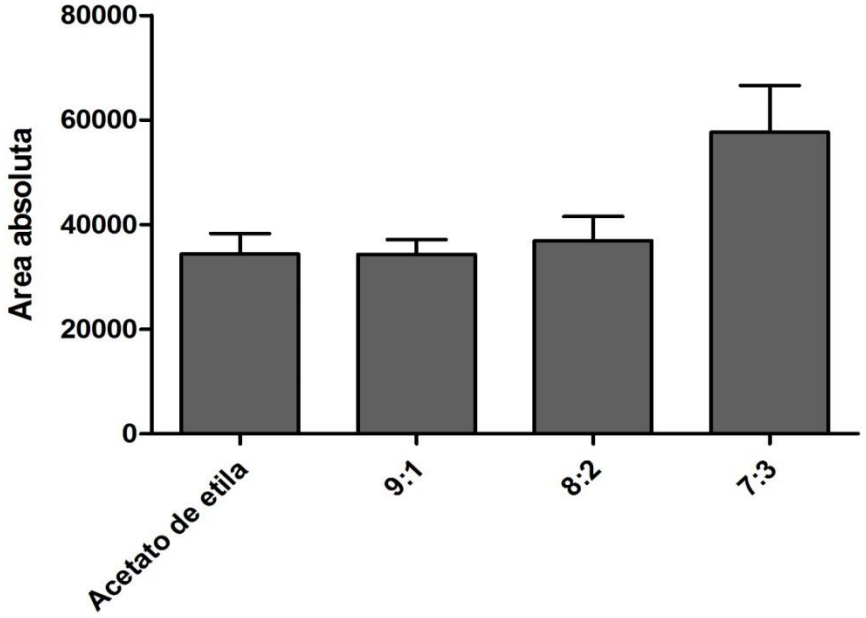


Gráfico 26 – pH da matriz biológica para GHB

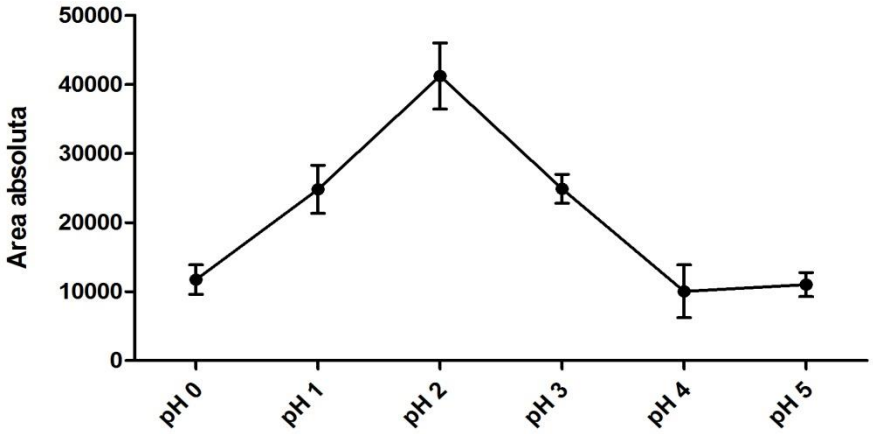


Gráfico 27 – Efeito *salting out* para GHB

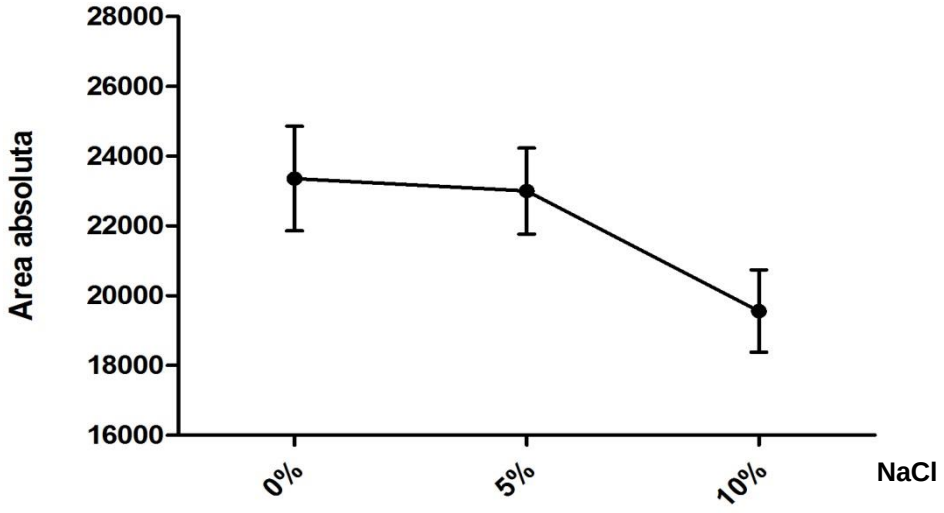


Gráfico 28 – Frequência de agitação para GHB

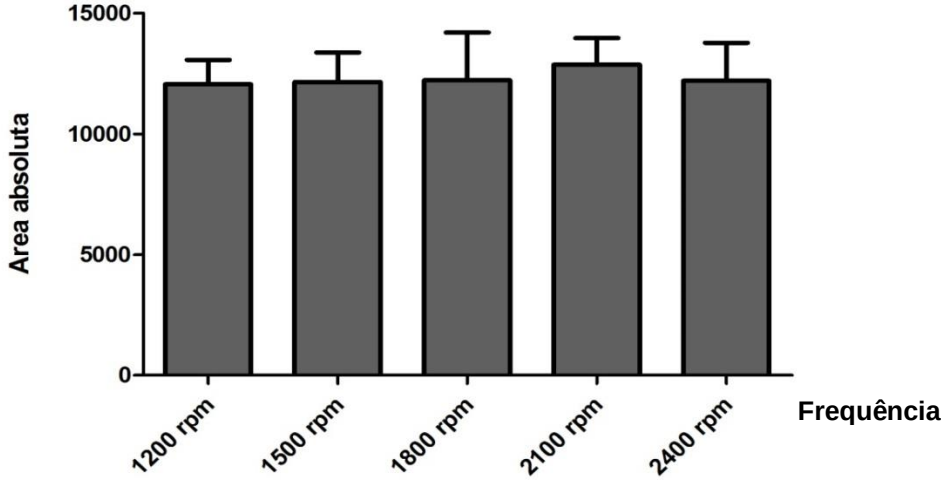
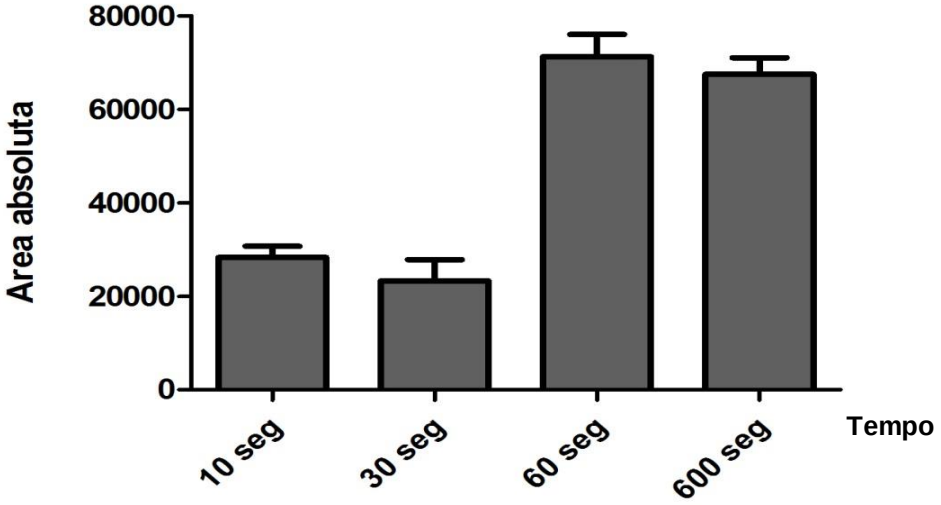


Gráfico 29 – Tempo de agitação para GHB



Os resultados indicam que o melhor solvente foi acetato de etila em um pH 2 na ausência de NaCl e que a frequência de agitação não influência na extração do analito. Apesar do tempo de 1 e 10 minutos terem sido os melhores dados obtidos, optamos por um procedimento rápido (10 segundos) para a validação do método, tendo em vista que os dados indicavam baixo coeficiente de variação com área absoluta.

3.3. Validação do método para determinação de GHB em urina por LLE

A validação do método para GHB foi realizada após otimização da extração dos analitos. O trabalho tem como foco a determinação de GHB em urina de forma rápida e simples. A linearidade demonstrou uma equação de y= 0,1144X – 0,1247 (R^2= 0,9932) e não foi observado o fenômeno heteroscedasticidade através do teste F (distribuição F de Snedecor) para averiguar se o método é homo ou heterocesdasticidade através dos desvios dos pontos da curva dentro de um intervalo de confiança de 99%. Nenhuma interferência cromatográfica foi verificada com as substâncias testadas, demonstrando a especificidade/seletividade da metodologia proposta. Os demais resultados da validação estão descritos na **Tabela 15**.

Tabela 15 - Parâmetros de confiança do método validado para a determinação de GHB em amostras de urina (sextuplicata para cada ponto)

Parâmetros de confiança	**GHB**
Recuperação (%)	
C1	23.9
C2	20.3
C3	20.0
LD (µg/mL)	0.25
LQ (µg/mL)	0.50
Precisão intra-dia (CV%)	
C1	13.7
C2	8.60
C3	9.80
Precisão inter-dia (CV%)	
C1	9.90
C2	11.6
C3	9.40

Exatidão (%)	
C1	93.2
C2	108.3
C3	111.9
Integridade da diluição	
Precisão (CV%)	
10 vezes	6.00
Exatidão (%)	
10 vezes	101.1

C1, 1.5 µg/mL; C2, 9 µg/mL; C3, 16 µg/mL; LD, limite de detecção; LQ, limite de quantificação; CV%, coeficiente de variação; GHB, gama hidroxibutirato; 10 vezes, 50 µg/mL.

Devido à possibilidade de obtermos amostras de urina com altas concentrações de GHB, realizou-se a validação da diluição. Adicionou-se GHB em uma urina até a concentração de 50 µg/mL e dilui-se a matriz na proporção 1/10 com água destilada para obter uma concentração final de 5 µg/mL. Posteriormente foi efetivado o processo de extração com uma curva de calibração. O resultado obtido foi de 5,05 µg/mL e o CV% foi menor que 15%.

Infelizmente, o método não foi aplicado em amostras reais de indivíduos até que tiveram contato com GHB, pois trata-se de uma droga ilícita de rápida excreção (12 horas), difícil identificação e com efeitos farmacológicos semelhantes a outros depressores centrais. Por isso, o cromatograma apresentado na **Figura 19** demonstra apenas uma urina branco com fortificação de padrão interno (A) enquanto outra amostra apresenta o GHB e seu respectivo padrão interno (B) do branco com padrões internos.

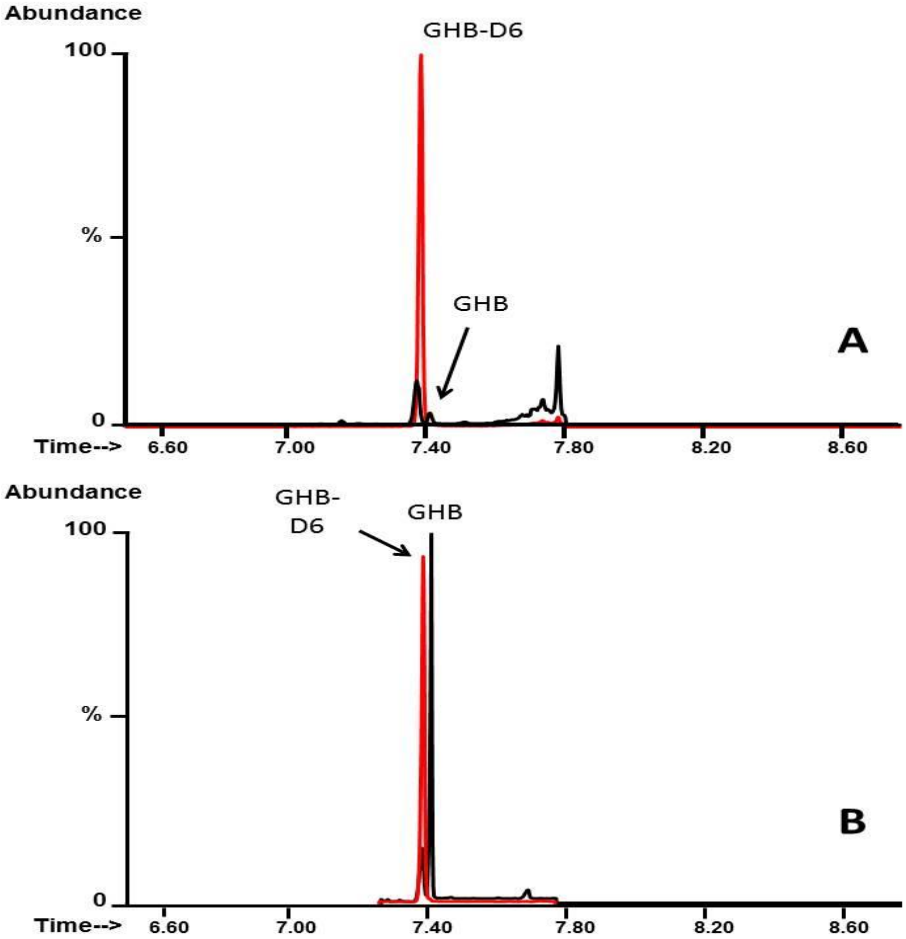


Figura 19 - Cromatograma obtido através da análise de GHB em urina após LLE. (A) Urina branco com adição de 10 µg/mL GHB-D6; (B) Urina branco com adição de 10 µg/mL GHB-D6 e GHB respectivamente.

4. DISCUSSÃO

A determinação de GHB é considerada um desafio forense por se tratar de um composto endógeno de baixo peso molecular, rápida excreção e que apresenta semelhança estrutural com outros ácidos orgânicos eliminados na urina. Além disso, sua alta polaridade dificulta a análise por GC-MS, fazendo-se necessário processo de derivatização (ELSOHLY & FENG, 2001b). Alguns autores optaram pela conversão de GHB em GLB para análise em GC-MS em virtude da possível interconversão *in vitro* (LETTIERE & FUNG, 1978; FERRARA *et al*., 1993; LEBEAU *et al*., 2000), porém a GBL ainda é de pequena tamanho e pode ser confundida com outras estruturas semelhantes.

Neste aspecto, a derivatização com BSTFA é considerada a melhor opção devido ao seu baixo custo, descrição do derivatizado em bibliotecas de espectrometria de

massas e facilidades de manuseio se comparado a outros derivatizantes (COUPER & LOGAN, 2000; ELIAN, 2001). Os resultados indicaram que 70°C por 10 minutos é o melhor processo de derivatização para este sililante, indicando menor tempo do que estabelecido pela literatura (COUPER & LOGAN, 2000; ELIAN, 2001; VILLAIN *et al*., 2003; CROOKES *et al*., 2004; PAOLI & BELL, 2008; ADAMOWICZ & KALA, 2010; PAUL *et al*., 2011).

Em relação à otimização da LLE de GHB em urina, começou-se com a determinação do solvente extrator adequado para este analito. Procurou-se solventes de caraterísiticas polares (Log P GHB = - 0,51) e entre os candidatos, acetato de etila foi obteve melhores resultados (**Gráfico 24 e 25**), o que confere com a literatura (ELIAN, 1999b). Acetonitrila e álcool isobutílico formam 2 fases com a amostra urinária, porém a fortificação com solução metanólica de GHB torna o sistema homogêneo, impossibilitando o desenvolvimento do experimento. Uma alternativa foi a utilização da mistura metanol:diclorometano (20:80), porém os resultados demonstraram ineficiência desta mistura.

De forma semelhante, diferentes misturas de acetato de etila e acetonitrila foram avaliadas (**Gráfico 25**) e não há foi verificado diferenças entre as combinações 9:1 e 8:2 quando confrontadas com extratos oriundos exclusivamente de acetato de etila. A composição acetato de etila:acetonitrila (7:3) apresentou maior capacidade extrativa, entretanto o surgimento de interferentes levaram ao descarte desse procedimento no experimento.

O GHB tem caraterísticas ácidas (pKa = 4,72) indicando que sua extração deve ser realizada em meio ácido. A faixa de pH utilizada (0-5) demonstrou que pH 2 foi o melhor para o procedimento (**Gráfico 26**), indicando que a molécula estará na forma não-ionizada. Valores de pH menores que 2 podem ter levado a conversão de GHB em GBL por meio de desidratação e consequentemente fechamento da estrutura alifática em cíclica, inclusive na ausência de temperatura (KIMURA *et al*., 2003; WASZKIELEWICZ & BOJARSKI, 2004). Em pH maior que 2, esta molécula apresenta maiores frações ionizadas (CHEMICALIZE, 2012), diminuindo a capacidade extrativa do solvente.

A adição de NaCl (efeito *salting out*) e a frequência de agitação (rpm) não influenciam na extração do GHB em amostras de urina (**Gráfico 27 e 28**), entretanto o tempo de agitação é fundamental conforme demonstrado no **Gráfico 29**. Apesar de 60 e 600 segundos apresentarem maior capacidade extrativa, um procedimento rápido que

consiga atingir os objetivos do estudo são interessantes para análises toxicológicas e por isso o tempo de 10 segundos foi selecionado. Este período foi utilizado durante a validação do método e demonstrou que os parâmetros de confiabilidade exigidos pelo guia da UNODC (UNODC, 2009) estavam dentro dos valores especificados.

Conforme demonstrado na **Tabela 14**, todos os parâmetros da validação do método estão de acordo com o guia da UNODC (UNODC, 2009). Contudo, estes valores somente foram possíveis trabalhando com SIM para esta matriz biológica, pois inúmeras moléculas de características semelhantes ao GHB são excretadas na urina e podem interferir na análise. Após revisão bibliográfica, a metodologia descrita por Villain e colaboradores (2003) é considerada a mais rápida para análise desta molécula em fluídos biológicos por GC-MS.

O método de Villain e colaboradores (2003) é considerado ultrarrápido, com tempo previamente estipulado para agitação e centrifugação (15 minutos) e derivatização (25 minutos). O procedimento que foi desenvolvido neste trabalho utilizou apenas 10 segundos de agitação seguida de 1 minuto de centrifugação e 10 minutos de reação com BSTFA. Desta forma, a metodologia proposta pode ser considerada extremamente veloz se comparada as demais e não impediu que os parâmetros de confiança para esta substância fossem alcançados. Chama atenção os valores atingindos como LD e LQ, do qual o último apresenta uma concentração de 0,5 µg/mL, 20 vezes menor do que o *cut off* estabelecido pela UNODC e SOFT (UNODC, 2012; SOFT, 2014).

O método desenvolvido neste trabalho é capaz de determinar de maneira inequívoca 10 µg/mL em amostra de urina, conforme estabelecido pela UNODC e SOFT (UNODC, 2012; SOFT, 2014). Alguns aspectos que por ventura podem interferir na determinação de GHB urinário já foram estudados por outros autores como idade, sexo, composição corporal, etanol e pH urinário. Esses fatores não interferem na excreção de GHB endógena/exógena nesta matriz biológica (HALLER *et al*., 2006; LEBEAU *et al*., 2006; BRAISLFORD *et al*., 2010).

Apesar das discussões acerca do *cut off* que deve ser estabelecido para diferenciar o GHB endógeno em relação ao exógeno (**Tabela 14**), o método proposto foi capaz de determinar inequivocadamente concentrações menores do que o valor mais baixo proposto (5 µg/mL). O trabalho de Haller e colaboradores (2006) indicam que a janela de detecção para esta molécula é menor do que o estipulado e as metodologias devem se enquadrar a níveis menores. De fato, mais de 80% das amostras urinárias apresentaram valores abaixo de 10 µg/mL entre 6-12 horas, em especial os caucasianos. Os autores

sugerem que o *cut off* deve ser menor que 5 µg/mL para este grupo étnico se comparado a outros. Além disso, o uso de etanol aumentaria a eliminação de GHB, reduzindo o tempo e limite demarcado pela UNODC e SOFT (HALLER *et al.*, 2006). Neste aspecto, o procedimento desenvolvido para determinação deste analito nesta matriz biológica apresenta uma faixa de trabalho compatível com menores concentrações propostas por outros estudos sem a necessidade de alterações.

5. CONCLUSÃO

O método de LLE desenvolvido para determinação de GHB em amostras de urina é simples e rápido, compatível com qualquer laboratório de toxicologia, sendo capaz de identificar inequívocadamente o analito, inclusive nas concentrações menores propostas por outros estudos assim como o *cut off* estabelecido pela UNODC e SOFT (10µg/mL) (UNODC, 2012; SOFT, 2014).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A problemática das DFC consiste em questões relacionados à vítima, legislação, estatísticas, logística, características intrínsecas das substâncias e metodologias analíticas sensíveis e confiáveis. Desta forma, os casos de submissão química são considerados um desafio para um toxicologista forense. A escolha das moléculas de interesse deste estudo foi respaldada pelos guias da UNODC, SOFT, artigos científicos e dados do Brasil em relação a substâncias psicoativas.

A maioria dos métodos desenvolvidos para análise de benzodiazepínicos, cetamina e seus produtos de biotransformação é baseada em extração líquido-líquido (LLE) e extração em fase sólida (SPE). Porém, estas técnicas exigem grandes volumes de solventes, materiais de maior custo (elevando o valor da análise) e maior exposição do laboratorista a solventes tóxicos.

Por isso, as técnicas baseadas em microextrações têm sido adotadas para procedimentos analíticos. A SPME, DLLME e a MEPS têm sido utilizadas para mensuração dos analitos em questão. Entretanto, estes métodos apresentam desvantagens como alto custo (SPME e MEPS), fragilidade da fibra (SPME), possibilidade de efeito memória (SPME e MEPS), múltiplas etapas e dificuldades com determinadas matrizes (MEPS), o uso excessivo de solventes halogenados (DLMME), interação inadequada entre matrizes complexas e solventes, o que acaba exigindo outras etapas de preparação de amostra (DLMME). Neste aspecto, a microextração em fase líquida (LPME) demonstrou ser uma alternativa de baixo custo, viável e pouco explorada para determinação de benzodiazepínicos, cetamina e seus respectivos produtos de biotransformação.

O trabalho desenvolvido com a LPME-trifásica para benzodiazepínicos e produtos de biotransformação eliminou o uso de solventes tóxicos, utilizando volumes reduzidos (microlitros) de agentes de baixa toxicidade. Para atingir o *cut off* exigido pelos guias (5 e 10 ng/mL), a etapa de otimização de solventes exigiu mais estudos devido as diferentes características físico-químicos destas moléculas na tentativa de obter uma maior homogeneidade em relação a capacidade extrativa. Por isso, a combinação de solventes demonstrou ser a melhor opção para atingir esse objetivo. Contudo, tal situação não foi suficiente para atingir os valores indicados para 7-aminoflunitrazepam

(5 ng/mL), o que exigiu outra estratégia baseada na dupla derivatização (primeiro TFAA e em seguida com MTBSTFA) para análise em GC-MS.

A partir do estabelecimento destes fatores, foi possível atingir os valores de corte para a maioria dos analitos alvos desta classe de drogas e a validação do método. De fato, a dupla derivatização é uma alternativa interessante como meio de mensurar analitos de baixa concentração para GC-MS. A metodologia validada apresenta o maior número de analitos que podem ser mensurados (11) para uma microextração, incluindo os aminobenzodiazepínicos, retratados por esta técnica pela primeira vez na literatura.

Em relação à cetamina, o método descrito para determinação desta droga e seus produtos de biotransformação (norcetamina e deidronorcetamina) é totalmente livre de solventes tóxicos, utilizando apenas óleo essencial de eucalipto como meio extrator. Somando-se a isso, o procedimento é extremamente sensível, atingindo valores abaixo do *cut off* estimado pela UNODC (1 ng/mL). Em uma amostra real de DFC, as concentrações encontradas foram abaixo dos níveis indicados pela SOFT (10 ng/mL), demonstrando que o índice conservador do guia da UNODC seria mais apropriado para estas situações. Além disso, a maior abundância urinária de deidronorcetamina indica que esta molécula deveria ser incorporada como um dos analitos alvos para esta DFC como já foi sugerido na literatura científica.

A LPME pode ser facilmente aplicada em um laboratório de toxicologia, apesar de suas limitações para moléculas extremamente hidrofílicas como GHB. Diante desse entrave, optou-se pela LLE reduzindo quantidade de solvente e principalmente o tempo de análise. De fato, o método desenvolvido pode ser considerado o mais rápido para determinação em GC-MS, capaz de identificar inequivocadamente este analito em urina em situações com baixas concentrações sem a necessidade de modificações. Desta forma, o procedimento relatado é compatível com as propostas de diminuição do *cut off* atual.

A conclusão final deste trabalho foi o desenvolvimento de métodos para identificação de DFC e respectivos produtos de biotransformação dentro dos *cut off* para a maioria dos analitos. Desta forma, a LLE desenvolvida para GHB pode ser considerada ultrarrápida e confiável com aplicação imediata em laboratórios forenses. A LPME demonstrou ser uma técnica de preparação de amostra eficiente, versátil, de baixo custo e passível de ser ampliada para outros analitos alvo de DFC com a sensibilidade requisitada.

REFERÊNCIAS

ADAMOWICZ, P. & KALA, M. Urinary excretion rates of ketamine and norketamine following therapeutic ketamine administration: Method and detection window considerations. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 28, p. 376-382, 2005a.

ADAMOWICZ, P. & KALA, M. Date rape drugs scene in Poland. *Prezglad Lekarski*, v. 62 (6), p.572-575, 2005b.

ADAMOWICZ, P. & KALA, M. Simultaneous screening for and determination of 128 date-rape drugs in urine by gas chromatography-electron ionization-mass spectrometry. *Forensic Science International*, v. 198, p. 39-45, 2010.

AGGRAWAL, A. References to the paraphilias and sexual crimes in the Bible. *Journal of Forensic and Legal Medicine*. v.16(3), p.109-114, 2009.

ALMEIDA, A.M.; CASTEL-BRANCO, M.M.; FALCÃO, A.C. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. *Journal of Chromatography B*, v. 774(2), p. 215-222, 2002.

ALMEIDA, M.G. & LIMA, I.V. Barbitúricos e Benzodiazepínicos. In: OGA & BATISTUZZO. *Fundamentos de Toxicologia*. São Paulo: Editora Atheneu, 3º edição p. 381-385, 2008.

ALMEIDA, R.M.; LIMA, D.S.; SEULIN, S.C.; LELYTON, V.; PASQUALUCCI C.A.; MUÑOZ D.R.; OSSELTON, M.D.; YONAMINE M. Hollow-fiber liquid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry of barbiturates in whole blood samples. *Journal of Separation Science*, v. 35, p. 3361-3368, 2012.

ANDRESEN, H.; STIMPFL, T.; SPRYS, N.; MÜLLER, A. Liquid ecstasy- a significant drug problem. *Deutsches Ärzteblatt International*, v. 105 (36), p. 599-603, 2008.

ANDRESEN, H.; SPRYS, N.; SCHMOLDT, A.; MUELLER, A.; IWERSEN-BERGMANN. Gamma-hydroxybutirate in urine and serum: Additional data supporting current cut-off recommendations. *Forensic Science International*, v. 200, p. 93-99, 2010.

ANVISA – Agência Brasileira de Vigilância Sanitária – RDC n° 36, 5 de agosto de 2011. http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/6db4200047f8b639bb80bf9f306e0947/RDC_36_2011.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em 12/03/2012.

ARESTA, A.; MONACI, L.; ZAMBONIN, C.G. Determination of delorazepam in urine by solid-phase microextraction coupled to high performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 28, p. 965-972, 2002.

ARMBRUSTER, D.A. & PRY, T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *The Clinical Biochemist Reviews*, v. 29, p. s49-52, 2008.

ARNHARD, K; SCHMID, R.; KOBOLD, U.; THIELE, R. Rapid detection and quantification of 35 benzodiazepines in urine by GC-TOF-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403(3):755-768, 2012.

BEATO, C.F.; PEIXOTO, B.T.; ANDRADE, M.V. Crime, oportunidade e vitimização. *Revista Brasileira de Ciências Sociais*, v. 19 (55), p. 73-90, 2004.

BECHTEL, L.K. & HOLSTEGE, C.P. Criminal poisoning: Drug-facilitated sexual assault. *Emergency Medicine Clinics of North America*, v. 25, p. 499-525, 2007.

BENEITO-CAMBRA, M.; RIPOLL-SEGUER, L.; HERRERO-MARTÍNEZ, J.M.; SIMÓ-ALFONSO, E.F.; RAMIS-RAMOS, G. Determination of fatty alcohol ethoxylates and alkylether sulfates by anionic exchange separation, derivatization with a cyclic anhydride and liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1218, p. 8511-8518, 2011.

BITTENCOURT, C.R. In: CEZAR ROBERTO BITENCOURT. *Tratado de Direito Penal* – Parte Especial, p. 87 e 88, vol. 3, São Paulo, editora Saraiva, 2003.

BORREY, D; MEYER, E; DUCHATEAU, L; LAMBERT, W; PETEGHEM, C; De LEENHEER, A. Enzymatic hydrolysis improves the sensitivity of Emit screening for urinary benzodiazepines. *Clinical Chemistry*, v. 48 (11), p.2047-2049, 2002.

BOSMAN, IJ; VERSCHRAAGEN, M; LUSTHOF, KJ. Toxicological findings in cases of sexual assault in the Netherlands. *Journal of Forensic Science*, v. 56(6), p. 1562-1568, 2011.

BRAHM, N.C.; YEAGER, L.L.; FOX, M.D.; FARMER, K.C.; PALMER, T.A. Commonly prescribed medications and potential false-positive urine drug screens. *American Journal of Health-System Pharmacy*, v. 67 (16), p. 1344-1350, 2010.

BRAISLFORD, A.D.; COWAN, D.A.; KICMAN, A.T. Urinary Ɣ-hydroxybutyrate concentrations in 1126 female subjects. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 34, p.555-561, 2010.

BRASIL. *Código Penal Brasileiro*: artigo 157, lei nº 002.848, jurisprudência atualizada nº 32 de 15 junho de 2009. Disponível em http://www.dji.com.br/codigos/1940_dl_002848_cp/cp157a160.htm. Acesso em 22/07/2010a.

BRASIL. *Código Penal Brasileiro*: artigo 213, lei nº 012.015 de 7 de agosto de 2009. Disponível em http://www.dji.com.br/codigos/1940_dl_002848_cp/cp213a216.htm. Acesso em 07/04/2010b.

BRASIL. *Código Penal Brasileiro*: artigo 155, lei nº 002.848, jurisprudência atualizada nº 32 de 15 junho de 2009. Disponível em http://www.dji.com.br/codigos/1940_dl_002848_cp/cp157a160.htm. Acesso em 22/07/2010c.

BROWN, S.D.; RHODES, D.J.; PRITCHARD, B.J. A validated SPME-GC-MS method for simultaneous quantification of club drugs in human urine. *Forensic Science International*, v. 171, p. 142-150, 2007.

CAMPBELL, R.; AHRENS, C.E.; SEFT, T. The impact of rape on women´s sexual health risk behaviors. *Health Psychology*, v. 23(1), p. 67-74, 2004.

CARVALHO, L.M.; CORREIA, D.; GARCIA, S.C.; BAIRROS, A.V.; NASCIMENTO, P.C.; BOHRER, D. A new method for the simultaneous determination of 1,4-benzodiazepines and amfepramone as adulterants in phytotherapeutic formulations by voltammetry. *Forensic Science International*, v. 202, p. 75-81, 2010.

CAVALCANTI, G.A.; GARRIDO, B.C.; LEAL, F.D.; PADILHA, M.C.; DE LA TORRE, X.; PEREIRA, H.M.; DE AQUINO NETO, F.R. Analysis of exemestane and 17β-hydroxyexemestane in human urine by gas chromatography/mass spectrometry: development and validation of a method using MO-TMS derivatives. *Rapid Communications of Mass Spectrometry*, v. 24(22), p. 3297-3302, 2010.

CELINSKI, R; SKOWRONEK, R; CHOWANIEC, C. Unusual case of the criminal administration of ranitidine. *Archiwum medycyny sadowej i kryminologii*, v. 60(2-3), p. 159-163, 2010.

CHEMICALIZE. Disponível em http://www.chemicalize.org. Acesso em 22/02/2012.

CHEN, C.Y.; LEE, M.R.; CHENG, F.C.; WU, G.J. Determination of ketamine and metabolites in urine by liquid chromatography-mass spectrometry. *Talanta*, v. 72(3), p. 1217-1222, 2007.

CHENG, P.S.; FU, C.Y.; LEE, C.H.; LIU, C.; CHIEN, C.S. GC-MS quantification of ketamine, norketamine, and dehydronorketamine in urine specimens and comparative study using ELISA as the preliminary test methodology. *Journal of Chromatography B*, v. 852(1), p. 443-449, 2007.

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

CHOU, S.L.; YANG, M.H.; LING, Y.C.; GIANG, Y.S. Gas chromatography-isotope dilution mass spectrometry preceded by liquid-liquid extraction and chemical derivatization for the determination of ketamine and norketamine in urine. *Journal of Chromatography B*, v. 799(1), p. 37-50, 2004.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. Sulfur, silicon and phosphorus in organic chemistry. In: CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. *Organic Chemistry*. São Paulo: Editora Oxford University Press, 2ª edição p.656-693, 2012.

CONCHEIRO, M.; VILLAIN, M.; BOUCHET, S.; LUDES, B.; LÓPEZ-RIVADULLA, M.; KINTZ, P. Windows of detection of tetrazepam in urine, oral fluid, beard, and hair, with special focus on drug-facilitated crimes. *Therapeutic Drug Monitoring*, v. 27(5), p. 565-570, 2005.

CROOKES, C.E.; FAULDS, M.C.; FORREST, A.R.; GALLOWAY, J.H. A reference range for endogenous gamma-hydroxybutyrate in urine by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 28(8), p. 644–649, 2004.

CSA - CONTROLLED SUBSTANCE ACT - Placement of Ketamine into Schedule III. AGENCY: Drug Enforcement Administration, Department of Justice. ACTION: Final rule. July 13, 1999 (volume 64, Number 133), p.37673-37675.

CUI, S.; TAN, S.; OUYANG, G.; PAWLISZYN, J. Automated polyvinylidene difluoride hollow fiber liquid-phase microextraction of flunitrazepam in plasma and urine samples for gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1216 (12), p. 2241-2247, 2009.

CUI, S.; OUYANG, G; DUAN, G.; HOU, J.; LUAN, T.; ZHANG, X. The mass transfer dynamics of hollow fiber liquid-phase microextraction and its application for rapid analysis of biological samples. *Journal of Chromatography A*, v. 1266, p. 10-16, 2012.

DAWLING, S.; JICKELLS, S.; NEGRUSZ, A. Gas chromatography, p. 469-511. In: JICKELLS, S. & NEGRUSZ, A. *Clarke´s Analytical Forensic Toxicology*, 3º edição, Cambrigde: Pharmaceutical Press, 2008.

DEINL, I.; MAHR, G.; VON MEYER, L. Determination of flunitrazepam and its main metabolites in serum and urine by HPLC after mixed-mode solid-phase extraction. *Journal of Analitycal Toxicology*, v. 22 (3), p. 197-202, 1998.

DJEZZAR, S.; QUESTEL, F.; BURIN, E.; DALLY, S. Chemical submission: results of 4-year French inquiry. *International Journal of Legal Medicine*, v. 123, p. 213-219, 2009.

DORANDEU, A.H.; PAGÈS, C.A.; SORDINO, M-C.; PÉPIN, G.; BACCINO, E.; KINTZ, P. A case in soth-eastern France: A review of drug facilitated sexual assault in European and English- speaking countries. *Journal of Clinical Forensic Medicine*, v. 13, p. 253-261, 2006.

DREZZETT, J.; BALDACINI, I.; NISIDA, I.; NASSIF, V.; NÁPOLI, P. Estudo da adesão à quimioprofilaxia antiretroviral para a infecção por HIV em mulheres sexualmente vitimadas. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 21 (9), p. 539-544, 1999.

DRUGBANK DATABASE. DrugBank: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets. Wishart DS, Knox C, Guo AC, Cheng D, Shrivastava S, Tzur D, Gautam B, Hassanali M. Nucleic Acids Res. 2008 Jan; 36(Database issue):D901-906. Disponível em http://www.drugbank.ca/. Acesso em 22/02/2012.

DRUMMER, O.H. & ODELL, M. Ethanol, p. 274-309. In: DRUMMER, O.H. & ODELL, M. *The forensic pharmacology of drug of abuse*, 1° edição, London: Arnold Publishers, 2001.

DU MONT, J; MACDONALD, S; ROTBARD, N; BAINBRIDGE, D; ASLLANI, E; SMITH, N; COHEN, MM. Drug-facilitated sexual assault in Ontario: Toxicological and DNA findings. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, v. 17(6), p. 333-338, 2010.

ELIAN, A.A. Detection of low levels of flunitrazepam and its metabolites in blood and bloodstains. *Forensic Science International*, v. 101(2), p. 107-111, 1999.

ELIAN, A.A. A novel method for GHB detection in urine and its applications in drug-facilitated sexual assaults. *Forensic Science International*, v. 109, p. 183-187, 1999b.

ELIAN, A.A. GC-MS determination of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) in blood. *Forensic Science International*, v. 122, p. 43-47, 2001.

ELIAN, A.A. Determination of endogenous gamma-hydroxybutyric acid (GHB) levels in antemortem urine and blood. Forensic Science International, v.128(3), p.120–122 2002.

ELLIOTT, S.P. Gamma hydroxybutyric acid (GHB) concentrations in humans and factors affecting endogenous production. *Forensic Science International*, v. 133(1-2), p. 9–16, 2003.

ELSOHLY, MA & SALAMONE, SJ. Prevalence of drugs use in cases of alleged sexual assault. *Journal of Analytical Toxicology*, v.23, p.141-146, 1999.

ELSOHLY, M.A. & FENG, S. Analysis of flunitrazepam and its metabolites in biological specimens. In: SALAMONE, SJ. *Benzodiazepines and GHB – Detection and Pharmacology*. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., p. 33-49, 2001.

ELSOHLY, M.A. & FENG, S. Ɣ-hydroxybutyric acid and its analogs, Ɣ-butyrolactone and 1,4-butanediol. In: SALAMONE, SJ. *Benzodiazepines and GHB – Detection and Pharmacology*. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., p. 33-49, 2001b.

ELSOHLY, M.A.; GUL, W.; ELSOHLY, K.M.; AVULA, B.; KHAN, I.A. LC-MS-(TOF) analysis method for benzodiazepines in urine samples from alleged drug-facilitated sexual assault victims. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 30(8), p. 524-538, 2006.

FAN, Y.; FENG, Y.Q.; DA, S.L.;GAO, X.P. In-tube solid-phase microextraction with poly(methacrylic acid-ethylene glycol dimethacrylate) monolithic capillary for direct high-performance liquid chromatographic determination of ketamine in urine samples. *Analyst*, v. 129(11), p. 1065-1069, 2004.

FEELY, J.; KAVANAGH P.V.; MCNAMARA, S.M. The detection and quantitation of 7-aminoflunitrazepam, the major urinary metabolite of flunitrazepam, by gas chromatography/mass spectrometry. *Irish Journal of Medical Science*, v. 168(3), p. 189-192, 1999.

FERRARA, S.D.; TEDESCHI, L.; FRISON, G.;CASTAGNA, F.; GALLIMBERTI, L.; GIORGETTI, R.; GESSA, G.L.; PALATINI, R. Therapeutic gammahydroxybutyric acid monitoring in plasma and urine by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical Biochemical Analysis*, v. 11, p. 483-487, 1993.

FLANAGAN, R.J.; TAYLOR, A.; WATSON, I.D.; WHELPTON, R. Sample Preparation. In: FLANAGAN *et al*. *Fundamentals of Analytical Toxicology*. Chichester: Editora John Wiley & Sons Ltd, p.49-90, 2008.

FORSMAN, M.; NYSTRÖM, I.; ROMAN, M.; BERGLUND, L.; AHLNER, J.; KRONSTRAND, R. Urinary detection times and excretioin patterns of flunitrazepam and its metabolites after a single oral dose. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 33 (8), p. 491-501, 2009.

FU, S.; LEWIS, J.; WANG, H.; KEEGAN, J.; DAWSON, M. A novel reduction transformation of oxazepam to nordiazepam during enzymatic hidrolysis. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 34(5), p. 243-251, 2010.

FU, S.; MOLNAR, A.; BOWRON, P.; LEWIS, J.; WANG, H. Reduction of temazepam to diazepam and lorazepam to delorazepam during enzymatic hydrolysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 400, p. 153-164, 2011.

GARCIA, J.B.S. Cetamina–Uma Nova Leitura. *Prática Hospitalar*, ano XV (53), p. 214-216, 2007.

GAILLARD, Y.; MASSON-SEYER, M.F.; GIROUD, M.; ROUSSOT, J.F.; PREVOSTO, J.M. A case of drug-facilitated sexual assault leading to death by chloroform poisoning. *International Journal of Legal Medicine*, v. 120(4), p. 241-245, 2006.

GAULIER, J.M.; SAUVAGE, F.L.; PAUTHIER, H.; SAINT-MARCOUX, F.; MARQUET, P.; LACHÂTRE, G. Identification of acepromazine in hair: na illustration of the difficulties encoutered in investigating drug-facilitated crimes. *Journal of Forensic Science*, v. 53(3), p. 755-759, 2008.

GHOBADI, M.; YAMINI, Y.; EBRAHIMPOUR, B. SPE coupled with dispersive liquid-liquid microextraction followed by GC with flame ionization detection for determination of ultra-trace amounts of benzodiazepines. *Journal of Separation Science*, v. 37, p. 287-294, 2014.

GREENBLATT, D.J.; SHADER, R.I.; FRANKE, K.; MACLAUGHLIN, D.S.; HARMATZ, J.S.; ALLEN, M.D.; WERNER, A.; WOO, E. Pharmacokinetics and bioavailatibility of intravenous, intramuscular and oral lorazepam in humans. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 68(1), p. 57-63, 1979.

GUAN, F.; SENO, H.; ISHII, A.; WATANABE, K.; KUMAZAWA, T.; HATTORI, H.; SUZUKI O. Solid-phase microextraction and GC-ECD of benzophenones for detection of benzodiazepines in urine. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 23, p. 54-61, 1999.

GUNNAR, T.; ARINIEMI, K.; LILLSUNDE, P. Determination of 14 benzodiazepines and hydroxy metabolites, zaleplon and zolpidem as *tert*-butyldimethylsilyl derivates

compared with other common silylating reagents in whole blood by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, v. 818, p. 175-189, 2005.

HACKETT, J. & ELIAN, A.A. Extraction and analysis of flunitrazepam / 7-aminoflunitrazepam in blood and urine by LC-PDA and GC-MS using butyl SPE columns. *Forensic Science International*, v. 157 (2-3), p. 156-162, 2006.

HALL, J.; GOODALL, E.A.; MOORE, T. Alleged drug facilitated sexual assault (DFAS) in Northern Ireland from 1999 to 2005. A study of blood alcohol levels. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, v. 15(8), p. 497-504, 2008.

HALL, J.A. & MOORE, C.B.T. Drug facilitated sexual assault – A Review. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, v. 15, p. 291-297, 2008.

HALLER, C.; THAI, D.; JACOB III, P.; DYER, J.E. GHB urine concentrations after single-dose administration in humans. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 30 (6), p. 360-364, 2006.

HEINSE, L; PITANGUY, J.; GERMAIN, A. Violence against women: the hidden health burden. *The International Bank for Reconstruction and Development/The World Bank*, p. 255, 1994.

HUANG, M.-K.; LIU, C.; LI, J.-H.; HUANG, S.-D. Quantitative detection of ketamine, norketamine and dehydronorketamine in urine using chemical derivatization followed by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, v. 820, p. 165-173, 2005.

HURLEY, M.; PARKER, H.; WELLS, D. The epidemiology of drug facilitated sexual assault. *Journal of Clinical Forensic Medicine*, v. 13, p. 181-185, 2006.

IPEA – INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA. Estupro no Brasil: Uma radiografia segundos os dados da saúde. Disponível em

http://www.ipea.gov.br/portal/images/stories/PDFs/nota_tecnica/140327_notatecnicadiest11.pdf. Acesso em 26/12/2014.

JANG, M.; CHANG, H.; YANG, W.; CHOI, H.; KIM, E.; YU, B.H.; OH, Y.; CHUNG, H. Development of an LC-MS/MS method for the simultaneous determination of 25 benzodiazepines and zolpidem in oral fluid and its application to authentic samples from regular drug users. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 74, p. 213-222, 2013.

JEANNOT, M.A. & CANTWELL, F.F. Solvent microextraction into a single drop. *Analytical Chemistry*, v. 68, p. 2236-2240, 1996.

JEN, H.P.; TSAI, Y.C.; SU, H.L.; HSIEH, Y.Z. On-line preconcentration and determination of ketamine and norketamine by micellar electrokinetic chromatography. Complementary method to gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1111(2), p. 159-165, 2006.

JESUS D.E. In: DAMÁSIO E. JESUS. *Direito Penal*– Parte Especial, p. 341, 2º volume, 24ª edição, São Paulo, editora Saraiva, 2001.

JUHASCIK, M.; LE, N.L.; TOMLINSON, K.; MOORE, C.; GAENSSLEN, R.E.; NEGRUSZ, A. Development of an analytical approach to the specimens collected from victims of sexual assault. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 28, p. 400-406, 2004.

JUHASCIK, M.P.; NEGRUSZ, A.; FAUGNO, D.; LEDRAY, L, GREENE, P, LINDNER, A.; HANER, B.; GAENSSLEN, R.E. An estimate of the proportion of drug-facilitation of sexual assault in four U.S. localities. *Journal of Forensic Science*, v. 52, p. 1396-1400, 2007.

KHAKIMOV, B.; MOTAWIA, M.S.; BAK, S.; ENGELSEN, S.B. The use of trimethylsilyl cyanide derivatization for robust and broad-spectrum high-throughput gas chromatography-mass spectrometry based metabolomics. Analytical and Bioanalytical Chemistry, v. 405, p. 9193, 2013.

KHODADOUST, S. & GHAEDI, M. Optimization of dispersive liquid-liquid microextraction with central composite design for preconcentration of chlordiazepoxide drug and its determination by HPLC-UV. *Journal of Separation Science*, v. 36, p. 1734-1742, 2013.

KIM, E-M.; LEE, J-S.; CHOI, S-K.; LIM, M-A.; CHUNG, H-S. Analysis of ketamine and norketamine in urine by automatic solid-phase extraction (SPE) and positive ion chemical ionization-gas chromatography-mass spectrometry (PCI-GC-MS). *Forensic Science International*, v. 174, p. 197-202, 2008.

KIMURA, M.; HASEGAWA, Y.; NAKAGAWA, K.; KAJITA, M.; WATANABE, K.; YAMAGUCHI, S. A sensitive method for 4-hydroxybutyric acid in urine using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, v. 792, p. 141-144, 2003.

KINANI, S.; BOUCHONNET, S.; MILAN, N.; RICORDEL, I. A sensitive and selective method for the detection of diazepam and its main metabolites in urine by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1141, p. 131-137, 2007.

KINTZ, P.; VILLAIN, M.; CIRIMELE, V.; PÉPIN, G.; LUDES, B. Window of detection of lorazepam in urine, oral fluid and hair, with a special focus on drug-facilitated crimes. *Forensic Science International*, v. 145(2-3), p.131-135, 2004.

KINTZ, P. Bioanalytical procedures for detection of chemical agents in hair in the case of drug-facilited crimes. *Analitycal Bioanalitycal Chemistry*, v. 388, p. 1467-1474, 2007.

KINTZ, P.; EVANS, J.; VILLAIN, M.; CHATTERTON, C.; CIRIMELE, V. Hair analysis to demonstrate administration of sildenafil to a woman in case of drug-facilitated sexual assault. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 33(8), p. 553-556, 2009.

KOVATSI, L; GIANNAKIS, D; ARZOGLOU, V; SAMANIDOU, V. Development and validation of a direct headspace GC-FID method of sevoflurane, desflurane, and

other volatile compounds of forensic interest in biological fluids: Applications on clinical and post-mortem samples. *Journal of Separation Science*, v. 34(9), p. 1004-1010, 2011.

LALOUP, M.; FERNANDEZ, M.M.R.; WOOD, M.; MAES, V.; BOECK, G.; VANBECKEVOORT, Y.; SAMYN, N. Detection of diazepam in urine, hair and preserved oral fluid samples with LC-MS-MS after single and repeated administration of Myolastan® and Valium®. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, v. 388, p. 1545-1556, 2007.

LANGEL, K.; GUNNAR, T.; ARINIEMI, K.; RAJAMÄKI, O.; LILLSUNDE, P. A validated method for the detection and quantitation of 50 drugs of abuse and medicinal drugs in oral fluid by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, v. 879, p. 859-870, 2011.

LEBEAU, M.A.; MONTGOMERY, M.A.; MILLER, M.L.; BURNEISTER, S.G. Analysis of biofluids for gamma-hydroxybutyrate (GHB) and gamma-butyrolactone (GBL) by headspace GC-FID and GC-MS. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 24, p. 421-428, 2000.

LEBEAU, M.A. & MOZAYANI, A. *Drug-Facilitated Sexual Assault: A Forensic Handbook*. San Diego: Academic Press, 2001.

LEBEAU, M.A.; CHRISTENSON, R.H.; LEVINE, B.; DARWIN, W.D.; HUESTIS, M.A. Intra- and interindividual variations in urinary concentrations of endogenous gamma-hydroxybutyrate. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 26(6), p. 340–346, 2002.

LEBEAU, M.A.; MONTGOMERY, M.A.; MORRIS-KUKOSKI, C.; SCHAFF, J.E.; DEAKIN, A.; LEVINE, B. A comprehensive study on the variations in urinary concentrations of endogenous gamma-hydroxybutyrate (GHB). *Journal of Analytical Toxicology*, v. 30(2), p. 98–105, 2006.

LEE, H.H.; LEE, J.F.; LIN, S.Y.; CHEN, P.H.; CHEN, B.H. Simultaneous determination of HFBA-derivatized amphetamines and ketamines in urine by gas

chromatography-mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 35(3), p. 162-169, 2011.

LENDOIRO, E.; QUINTELA, O.; CASTRO, A.; LÓPEZ-RIVADULLA, M.; CONCHEIRO, M. Target screening and confirmation of 35 licit and illicit drugs and metabolites in hair by LC-MS/MS. *Forensic Science International*, v. 217(1-3), p. 207-215, 2012.

LENNESTAL, R.; LAKSO, H.-A.; NILSSON, M.; MJÖRNDAL, T. Urine monitoring of diazepam abuse – New intake or not? *Journal of Analytical Toxicology*, v. 32(6), p. 402-407, 2008.

LETTIERI, J.T. & FUNG, H.-L. Evaluation and development of gas chromatographic procedures for the determination of γ-hydroxybutyric acid and 7-butyrolactone in plasma. *Biochemical Medicine*, v. 20, p. 70-80, 1978.

LI, J.-H.; VICKNASIGAM, B.; CHEUNG, Y.-W.; ZHOU, W.; NURHIDAYAT, A.W.; JARLAIS, D.C.D.; SCHOTTENFELD, R. To use or not to use: an update on licit and illicit ketamine use. *Substance Abuse and Rehabilitation*, v. 2, p. 11-20, 2011.

LIAN, K.; ZHANG, P.; NIU, L.; BI, S.; LIU, S.; JIANG, L.; KANG, W. A novel derivatization approach for determination of ketamine in urine and plasma by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1264, p. 104-109, 2012.

LIN, H.R. & LUA, A.C. Detection of acid-labile conjugates of ketamine and its metabolites in urine samples collected from pub participants. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 28, p. 181-186, 2004.

LIN, H.R. & LUA, A.C. Simultaneous determination of amphetamines and ketamines in urine by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications of Mass Spectrometry*, v. 20, p. 1724-1730, 2006.

LITTLE, J.L. Artifacts in trimethylsilyl derivatization reactions and ways to avoid them. *Journal of Chromatography A*, v. 844, p. 1-22, 1999.

LORD, H.L.; RAJABI, M.; SAFARI, S.; PAWLISZYN, J. Development of immunoaffinity solid phase microextraction probes for analysis of sub ng/mL concentrations of 7-aminoflunitrazepam in urine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 40, p. 769-780, 2009.

MADEA, B.; PLIEGER, S.; MUSSHOFF, F. Begutachtung in Fällen von drogenassoziierten Sexualdelikten. In: PRAGST F, ADERJAN R, GTFCh-Symposium, p. 116-124, Bad Vilbel, 2008.

MADEA, B. & MUβHOFF, F. Knock-out drugs: Their prevalence, modes of action, and means of detection. *Deutsches Ärzteblatt International*, v. 106 (20), p. 341-347, 2009.

MARC, B. Current clinical aspects of drug-facilitated sexual assaults in sexually abused victims examined in a forensic emergency unit. *Therapy Drug Monitoring*, v. 30 (2), p. 218-224, 2008.

MARI, F.; POLITI, L.; TRIGNANO, C.; DI MILIA, M.G.; DI PADUA, M.; BERTOL, E. What constitutes a normal ante-mortem urine GHB concentration? *Journal of Forensic and Legal Medicine*, v. 16(3), p. 148-151, 2009.

MARIN, A.V. & MOREAU, R.L.M. Verificação da janela de detecção de etilglicuronídeo urinário entre usuários crônicos de etanol e bebedores sociais por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa. *Dissertação de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Toxicologia da Universidade de São Paulo*, 2006.

MARTÍNEZ, M.A. & BALLESTEROS, S. An unusual case of drug-facilitated sexual assault using aromatic solvents. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 30(7), p. 449-453, 2006.

MC MURRY, J. Aldeídos e cetonas: reações de adições nucleofílicas. In: J. MC MURRY. *Química Orgânica*. Stamford: Editora Cengage Learning, 6° edição p.704-705, 2005.

MEATHERALL, R. Optimal enzymatic hydrolysis of urinary benzodiazepine conjugates. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 18, p. 382-384, 1994.

MEATHERALL, R. GC-MS confirmation of urinary benzodiazepine. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 18, p. 369-380, 1994b.

MELWANKI, M.B.; CHEN, W.S.; BAI, H.Y.; LIN, T.Y.; FUH, M.R. Determination of 7-aminoflunitrazepam in urine by dispersive liquid-liquid microextraction with liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Talanta*, v. 78, p. 618-622, 2009.

MIKI, A.; TATSUNO, M.; KATAGI, M.; NISHIKAWA, M.; TSUCHIHASHI, H. Simultaneous determination of eleven benzodiazepine hypnotics and eleven relevant metabolites in urine by column-switching liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 26(2), p. 87-93, 2002.

MINISTÉRIO DA JUSTIÇA. Secretária Nacional de Segurança. *Relatório de Gestão_SENASP*, p. 60, 2006.

MISUSE DRUGS ACT. Drug Laws. Ketamine- Class C. January, 2006. Disponível em http://www.drugscope.org.uk/resources/drugsearch/drugsearchpages/laws. Acesso em 05/03/13.

MOADELL, R.; VENKATA, S.L.; TANGA, M.J.; BUPP, J.E.; GREEN C.E.; IYER, L.; FURIMSKY, A.; GOLDBERG, M.E.; TORJMAN, M.C.; WAINER, I.W. A parallel chiral-achiral liquid chromatographic method for the determination of the stereoisomers of ketamine and ketamine metabolites in the plasma and urine of patients with complex regional pain syndrome. *Talanta*, v. 82, p. 1892-1904, 2010.

MULLETT, W.M. & PAWLISZYN, J. Direct determination of benzodiazepines in biological fluids by restricted-access solid-phase microextraction. *Analytical Chemistry*, v. 74, p. 1081-1087, 2002.

NEEDLEMAN, S.B. & PORVAZNIK, M. Identification of parent benzodiazepine by gas chromatography/mass spectrometry from urinary extracts treated with B-glucuronidase. *Forensic Science International*, v. 73, p. 49-60, 1995.

NEGRUSZ, A & GAENSSLEN, RE. Drug-facilitated sexual assault. In: Sue Jickells and Adam Negrusz. *Clarke´s Analytical Forensic Toxicology*. Cambrigde, United Kingdom: Pharmaceutical Press, p. 287-298, 2008.

NEMA, T.; CHAN, E.C.; HO, P.C. Extraction of ketamine from urine using a miniature silica monolithic cartridge followed by quantification with liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Journal of Separation Science*, v. 34(9), p. 1041-1046, 2011.

NIELSEN, W.M.A. Fragmentation of toxicologically revelant drugs in positive-ion liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, v. 30(4), p. 626-663, 2011.

NGUYEN, H. & NAU, D.R. Rapid method for the solid-phase extraction and GC-MS analysis of flunitrazepam and its major metabolite in urine. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 24, p. 37-45, 2000.

OGA S., FARSKY S.H., MARCOURAKIS T. Toxicocinética, p. 18-19. In: OGA S., CAMARGO M.M.A., BATISTUZZO J.A.O. *Fundamentos de Toxicologia*, 3º edição, São Paulo: Atheneu Editora, 2008.

O´NEAL, C.L. & POKLIS, A. Comparison of rates of hydrolysis of lorazepam-glucuronide, oxazepam-glucuronide and temazepam-glucuronide catalyzed by E.coli beta-glucuronidase using on-line benzodiazepine screening immunoassay on the Roche/Hitachi 917 analyzer. *Journal of Forensic Science*, v. 47(2), p. 427-428.

OLIVEIRA, A.R.M.; MAGALHÃES, I.R.S.; SANTANA, F.J.M.; 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.

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

PANTALEÃO, L.N. *Análise toxicológica simultânea de anfetaminas e benzodiazepínicos em amostras de cabelo por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas*. São Paulo, 2012. 83p. Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

PAOLLI, G. & BELL, S. A rapid GC-MS determination of gamma-hydroxybutyrate in saliva. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 32, p. 298-302, 2008.

PAPADODIMA, S.A.; ATHANASELIS, S.A.; SPILIOPOULOU, C. Toxicological investigation of drug-facilitated sexual assaults. *International Journal of Clinical Practice*, v. 61(2), p. 259-264, 2007.

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

PARKIN, M.C.; TURFUS, S.C.; Smith, N.W.; Halket, J.M.; Braithwaite, R.A.; Elliott, S.P.; Osselton, M.D.; Cowan, D.A.; Kicman, A.T. Detection of ketamine and its metabolites in urine by ultra high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, v. 876, p. 137-142, 2008.

PARKIN, M.C. & BRAILSFORD, A.D. Retrospective drug detection in cases of drug-facilitated sexual assault: challenges, and perspectives for the forensic toxicologist. *Bioanalysis*, v. 1(5), p. 1001-1013, 2009.

PAUL, R.; TSANACLIS, L.; KINGSTON, R.; BERRY, A.; GUWY, A. Simultaneous determination of GHB and EtG in hair using GC-MS/MS. *Drug Testing and Analysis*, v. 3(4), p. 201-205, 2011.

PAWLISZYN, J. & PEDERSEN-BJERGAARD, S. Analytical microextraction: current staturs and future trends. *Journal of Chromatography Science*, v. 44, p. 291-307, 2006.

PEDERSEN-BJERGAARD, S. & RASMUSSEN, K.E. Development of a simple in-vial liquid-phase microextraction device for drug analysis compatible with capillary gas chromatography, capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 873, p. 3-11, 2000.

PEDERSEN-BJERGAARD, S.; HO, T.S.; RASMUSSEN, K.E. Fundamental studies on selectivity in 3-phase liquid-phase microextraction (LPME) of basic drugs. *Journal of Separation Science*, v. 25, p. 141-146, 2002.

PEDERSEN-BJERGAARD, S. & RASMUSSEN, K.E. Liquid-phase microextraction utilising plant oils as intermediate extraction medium--towards elimination of synthetic organic solvents in sample preparation. *Journal of Separation Science*, v. 27, p. 1511-1516, 2004.

PEDERSEN-BJERGAARD, S. & RASMUSSEN, K.E. Bioanalysis of drugs by liquid-phase microextration coupled to separation techniques. *Journal of Chromatography B*, v. 817, 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.

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

PETERS, F.T.; DRVAROV, O.; LOTTNER, S.; SPELLMEIER, A.; RIEGGER, K.; HAEFELI, W.E.; MAURER, H.H. A systematic comparison of four different workup procedures for systematic toxicological analysis of urine samples using gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, v. 393, p. 735-745, 2009.

POYARES, D.; PINTO JR., L.R.; TAVARES, S.; BARROS-VIEIRA, S. Hipnoindutores e insônia. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v. 27(1), p. 2-7, 2005.

PSILLAKIS, E. & KALOGERAKIS, N. Developments in liquid-phase microextraction. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 22, p.565-574, 2002.

QUESADA, A.M.; SILVA, A.M.M.; DRUMOND, K.O.; SOUZA, J.M.; RODRIGUES, M.C.; ALMENDRA, S.R.S. Comercialização de cetamina em estabelecimentos veterinários em Teresina-PI. *Revista UNOPAR Científica-Ciências Biológicas e da Saúde*, v. 11, p. 51-52, 2009.

RAIKOS, N.; GEORGIOS, T.; ALEXIADOU, E.; GIKA, H.; ARGIRIADOU, H.; PARLAPANI, H.; TSOUKALI, H. Analysis of anaesthesics and analgesics in human urine by headspace SPME and GC. *Journal of Separation Science*, v. 32(7), p. 1018-1026, 2009.

Ramirez F.M.M.; Laloup, M.; Wood, M.; De Boeck, G.; Lopez-Rivadulla, M.; Wallemacq, P.; Samyn, N. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous analysis of multiple hallucinogens, chlorpheniramine, ketamine, ritalinic acid, and metabolites, in urine. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 31(8), p. 497-504, 2007.

RANI, S. & MALIK, J. A novel microextraction by packed sorbent-gas chromatography procedure for the simultaneous analysis of antiepileptic drugs in human plasma and urine. *Journal of Separation Sciences*, v.35, p. 2970-2977, 2012.

RASMUSSEN, K.E. & PEDERSEN-BJERGAARD, S. Developments in hollow fibre-based, liquid phase microextraction. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 23, p.1-10, 2004.

REGIS TECHNOLOGIES, *Disponível em*: http://www.registech.com/Library/Catalog/GC_Derivatization_2008.pdf. Acessado em 20 de janeiro, 2013.

REUBSAET, K.J.; RAGNAR NORLI H.; HEMMERSBACH, P.; RASMUSSEN, K.E. Determination of benzodiazepines in human urine and plasma with solvent modified solid phase micro extraction and gas chromatography; rationalisation of method development using experimental design strategies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 18, p. 667-680, 1998.

REZAEI, F.; YAMINI, Y.; MORADI, M.; DARAEI, B. Supramolecular solvent-based hollow fiber liquid phase microextraction of benzodiazepines. *Analytica Chimica Acta*, v. 804, p.135-142, 2013.

RISOLI, A.; CHENG, J.B.; VERKERK, U.H.; ZHAO, J.; RAGNO, G.; HOPKINSON, A.C.; SIU, K.W. Gas-phase fragmentation of protonated benzodiazepines. *Rapid Communications of Mass Spectrometry*, v. 21(14), p. 2273-2281, 2007.

SAUVE, E.N.; LANGØDEGÅRD, M.; EKEBERG, D.; ØIESTAD, A.M. Determination of benzodiazepines in ante-mortem and post-mortem whole blood by solid-supported liquid-liquid extraction and UPLC-MS/MS. *Journal of Chromatography B*, v. 883-884, p. 177-188, 2012.

SAMS, R. & PIZZO, P. Detection and identification of ketamine and its metabolites in horse urine. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 11, p. 58-62, 1987.

SARKOLA, T.; DAHL, H.; ERIKSSON, C.J.P.; HELANDER, A. Urinary ethyl glicuronide and 5-hydroxytryptophol levels during repeated ethanol ingestion in healthy human subjects. *Alcohol & Alcoholism*, v. 38(4), p. 347-351, 2003.

SCHNEIDER,S. & WENNING, R. Interference of diphenhydramine with the EMIT II immunoassay for propoxyphene. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 23(7), p. 637-638.

SCOTT-HAM, M. & BURTON, F.C. Toxicological findings in cases of alleged drug-facilitated sexual assault in the United Kingdom over a 3-year period. *Journal of Clinical Forensic Medicine*, v. 12(4), p. 175-186, 2005.

SCOTT-HAM, M & BURTON, FC. A study of blood and urine alcohol concentrations in cases of alleged drug-facilitated sexual assault in the United Kingdom over a 3-year period. *Journal of Clinical Forensic Medicine*, v. 13(3), p. 107-111, 2006.

SCOTT, K.S. The use of hair as a toxicological tool in DFC casework. *Science & Justice*, v. 49(4), p. 250-253, 2009.

SECRETARIA DE SEGURANÇA PÚBLICA DO ESTADO DE SP. Estupros. *Apresentação de Resultados – 2008*, p. 4, 2009. Disponível em http://www.ssp.sp.gov.br/estatistica/downloads/apresentacao2008.pdf. Acesso em 07/04/2010.

SEGURA, J.; VENTURA, R.; JURADO, C. Derivatization procedures for gas chromatographic-mass spectrometric determination of xenobiotics in biological samples, with special attention to drugs of abuse and doping agents. *Journal of Chromatography B*, v. 713, p. 61-90, 1998.

SENOL, E.; KAYA, A.; KOCAK, A.; AKTAS, E.O.; ERBAS, K.; ISLAM, M. Watch out for nuts in your travels: an unusual case of drug-facilitated robbery. *Journal of Travel Medicine*, v. 16(6), p. 431-431, 2009.

SHBAIR, M.K. & LHERMITTE, M. Drug-facilitated crimes: definitions, prevalence, difficulties and recommendations. A review. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, v. 68(3), p. 136-147, 2010.

SHIMA, N.; MIKI, A.; KAMATA, T.; KATAGI, M.; TSUCHIHASI, H. Urinary endogenous concentrations of GHB and its isomers in healthy humans and diabetics, *Forensic Science International*, v. 149, p. 171–179, 2005.

SIMON-COLIN, C.; GOUIN, C.; LEMECHKO, P.; KERVAREC, N.; GUEZENNEC, J. Development of a three-steps derivatization assay for the localization of double bond in monounsaturated monomers of poly-beta-hydroxyalkanoates by GC-MS. *Journal of Chromatography B*, v. 900, p. 64-70, 2012.

SIMONSEN, K.W.; HERMANSSON, S.; STEENTOFT, A.; LINNET, K. A validated method for simultaneous screening and quantification of twenty-three benzodiazepines and metabolites plus zopiclone and zaleplone in whole blood by liquid-liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 34, p. 332-341, 2010.

SMYTH, W.F.; MCCLEAN, S.; RAMACHANDRAN, V.N. A study of the electrospray ionisation of pharmacologically significant 1,4-benzodiazepines and their subsequent fragmentation using an ion-trap mass spectrometer. *Rapid Communications of Mass Spectrometry*, v. 14(21), p. 2061-2069, 2000.

SOFT- SOCIETY OF FORENSIC TOXICOLOGISTS. SOFT´s Drug Facilitated Sexual Assault- Drug list and cutoffs. Disponível em http://soft-tox.org/sites/default/files/SOFT%20DFC%20Rec%20Det%20Limits%201-2014.pdf. Acesso em 31/05/2014.

SOLOMONS, G. Alkenes and alkynes – Properties and synthesis. In: *Fundamentals of Organic Chemistry*. 5° Edição. New York: Editora John Wiley & Sons Ltd, p.22, 1998.

SPILLER, H.A.; ROGERS, J.; SAWYER, T.S. Drug facilitated sexual assault using an over-the-counter ocular solution containing tetrahydrozoline (Visine). *Legal Medicine*, v. 9(4), p. 192-195, 2007.

SPINELLI, E. & AQUINO NETO, F.R. Análise multiresíduo de benzodiazepínicos em urina: triage imunológica e otimização de um método de confirmação por CGAR/EM.

Dissertação de Doutorado do Programa de Pós Graduação em Ciências da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2002.

STRAUGHAN, J.L.; CATHCART-RAKE, W.F.; SHOEMAN, D.W.; AZARNOFF, D.L. Quantification of chlordiazepoxide and its metabolites in biological fluids by thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography*, v. 146(3), p. 473-480, 1978.

TERADA, M.; MASUI, S.; HAYASHI, T.; WATANABE, R.; INOUE, H.; IINO, M.; NAKATOME, M.; MATOBA, R.; SHINOZUKA, T.; MURAI, T.; TANAKA, E.; HONDA, K. Simultaneous determination of flunitrazepam and 7-aminoflunitrazepam in human serum by ion trap gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Legal Medicine*, v. 5(1), p. S96-S100, 2003.

THUNIG, J.; FLO, L.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; HANSEN, S.H.; JANFELT, C. Liquid-phase microextraction and desorption electrospray ionization mass spectrometry for identification and quantification of basic drugs in human urine. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 26, p. 133-140, 2011.

TURFUS, S.C.; BRAITHWAITE, R.A.; COWAN, D.A.; PARKIN, M.C.; SMITH, N.W.; KICMAN, A.T. Metabolites of lorazepam: Relevance of past findings to present day use of LC-MS/MS in analytical toxicology. *Drug Testing and Analysis*, v. 3, p. 695-674, 2011.

UGLAND, H.G.; KROGH, M.; RASMUSSEN, K.E. Liquid-phase microextraction as a sample preparation technique prior to capillary gas chromatographic-determination of benzodiazepines in biological matrices. *Journal of Chromatography B*, v. 749(1), p. 85-92, 2000.

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, p. 127-135, 2003.

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

UNODC - UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. Guidance for de validation of analytical methodology and calibration of equipment used for testing of illicit drugs in seized materials and biological specimens. Disponível em http://www.unodc.org/unodc/en/scientists/guidance-for-the-validation-of-analytical-methodology.html. Acesso em 07/04/2010.

UNODC - UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. Guidance for the forensic analysis of drugs facilitating sexual assault and other criminal acts. Disponível em http://www.unodc.org/unodc/en/scientists/guidelines-for-the-forensic-analysis-of-drugs-facilitating-sexual-assault-and-other-criminal-acts.html. Acesso em 13/03/2012.

VASCONCELOS, S.M.M.; ANDRADE, M.M.; SOARES, P.M.; CHAVES, B.G.; PATROCÍNIO, M.C.A.; SOUZA, F.C.F.; MACEDO, D.S. Cetamina: aspectos gerais e relação com esquizofrenia. *Revista de Psiquiatria Clínica*, v. 32(1), p. 10-16, 2005.

VIANNA, L.A.C.; BONFIM, G.F.T.; CHICONE, G. Auto-estima de mulheres que sofreram violência. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, v. 14 (5), p. 695-701, 2006.

VILLAIN, M.; CIRIMELE, V.; LUDES, B.; KINTZ, P. Ultra-rapid procedure to test for Ɣ-hydroxybutyric acid in blood and urine by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, v. 792, p. 83-87, 2003.

VILLAIN, M.; CHÈZE, M.; TRACQUI, A.; LUDES, B.; KINTZ, P. Testing for zopliclone in hair application to drug-facilitated crimes. *Forensic Science International*, v. 145(2-3), p. 157-161, 2004.

WALSHAM, NE & SHERWOOD, RA. Ethyl glucuronide. *Annals of Clinical Chemistry*, v. 49 (Pt 2), p.110-117, 2012.

WASZKIELEWICZ, A. & BOJARSKI, J. Ɣ-Hydroxybutyric acid (GHB) and its chemical modifications: A review of the GHBergic system. *Polish Journal of Pharmacology*, v. 56, p. 43-49, 2004.

WILLIAMS, M.L. & WAINER, I.W. Role of chiral chromatography in therapeutic drug monitoring and in clinical and forensic toxicology. *Therapeutic Drug Monitoring*, v. 24 (2), p. 290-296, 2002.

YEATMAN, D.T. & REID, K. A study of urinary endogenous gamma-hydroxybutyrate (GHB) levels. *Journal Analytical Toxicology*, v. 27(1), p. 40–42, 2003.

YUAN, H.; MESTER, Z.; LORD, H.; PAWLISZYN, J. Automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry for the determination of selected benzodiazepines. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 24, p. 718725, 2000.

ANEXOS

ANEXO 1 - Manuscrito aceito no periódico científico internacional **Forensic Science International** publicado em abril de 2014.

Forensic Science International 243 (2014) 47–54

Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International

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

Determination of ketamine, norketamine and dehydronorketamine in urine by hollow-fiber liquid-phase microextraction using an essential oil as supported liquid membrane☆

André Valle de Bairros [a,*], Rafael Lanaro [b], Rafael Menck de Almeida [a], Mauricio Yonamine [a]

[a] Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil
[b] Campinas Poison Control Center, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Campinas, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Available online 18 April 2014

Keywords:
Essential oils
Gas chromatography–mass spectrometry
Hollow fiber–liquid phase microextraction
Ketamine
Urine

ABSTRACT

Here, we present a method for the determination of ketamine (KT) and its main metabolites, norketamine (NK) and dehydronorketamine (DHNK) in urine samples by using hollow-fiber liquid-phase microextraction (HF–LPME) in the three-phase mode. The fiber pores were filled with eucalyptus essential oil and a solution of 1.0 mol/L of HCl was introduced into the lumen of the fiber (acceptor phase). The fiber was submersed in the alkalinized urine containing 10% NaCl, and the system was submitted to lateral shaking (2400 rpm) during 30 min. Acceptor phase was withdrawn from the fiber, dried and the residue was then derivatized with trifluoroacetic anhydride (TFAA) for further determination by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). The calibration curves were linear over the specified range and limits of detection (LoDs) obtained for KT, NK and DHNK were below the cut-off value (1.0 ng/mL) recommended by the United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). A totally "green chemistry" approach of the sample extraction was obtained by using essential oil as a supported liquid membrane in HF–LPME. The developed method was successfully validated and applied to urine samples collected from two clinical cases in which KT was suspected to be involved.
© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Ketamine (KT) is a *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist used as anesthesic in both animals and humans [1]. It was initially abused by medical personnel due to its hallucinogenic properties, and gradually became popular among young user population at dance and rave parties, being one of the recreational drugs known as "club drugs" [2,3]. KT is an odorless, tasteless and colorless drug and it can be added to beverages, without being perceived by the victim, promoting stupor and sedation together with amnesia. Because of its pharmacological properties, this drug is also misused by offenders in cases of drug-facilitated crimes (DFC) [4–6].

After administration of KT in humans, this substance is broken down into norketamine (NK), an active metabolite. NK is then dehydrogenated generating dehydronorketamine (DHNK). KT and its main metabolites (NK and DHNK) are further transformed by hydroxylation and conjugation prior to elimination (Fig. 1). Approximately 2% is excreted as parent drug, 2% as NK, 16% as DHNK and the rest as conjugates of hydroxylated metabolites [4,7]. According to the Society of Forensic Toxicologists (SOFT) and United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC), KT and NK are the target analytes in toxicological analysis with suspected involvement of this drug using urine as biological matrix [6,8]. In spite of the absence of DHNK in the SOFT and UNODC list of targeted analytes, this metabolite has also been indicated as a biomarker of administration of KT in the scientific literature [4,9–11]. In fact, following the administration of a single oral dose of KT (50 mg) in six volunteers, KT and NK were detected in urine up to 5 and 6 days, respectively, and DHNK could be detected for up to 10 days [12].

Urine samples continue to be widely used as a biological matrix for the analysis of psychoactive substances in forensic cases because of the large sample volume that can be collected for

☆ This paper is part of the special issue entitled "The 51st Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT)". September 2–3, 2013, Funchal, Medeira, Portugal. Guest edited by Professor Helena Teixeira, Professor Duarte Nuno Vieira and Professor Francisco Corte Real.

* Corresponding author. Tel.: +55 11 30912194; fax: +55 11 30319055.
E-mail addresses: andrebairros@yahoo.com.br, andrebairros@usp.br (A.V.d. Bairros).

http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.04.016
0379-0738/© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

ANEXO 2 - Manuscrito aceito no periódico científico internacional **Journal of Chromatography B** com publicação para janeiro de 2015.

Journal of Chromatography B, 975 (2015) 24–33

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography B

Journal homepage: www.elsevier.com/locate/chromb

Determination of low levels of benzodiazepines and their metabolites in urine by hollow-fiber liquid-phase microextraction (LPME) and gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS)

André Valle de Bairros[a,b,*], Rafael Menck de Almeida[a], Lorena Pantaleão[a], Thiago Barcellos[c], Sidnei Moura e Silva[c], Mauricio Yonamine[a]

[a] Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Brazil
[b] Center of Chemical, Pharmaceutical and Food Sciences, Federal University of Pelotas, Brazil
[c] Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 15 May 2014
Accepted 29 October 2014
Available online 6 November 2014

Keywords:
Benzodiazepines
Gas chromatography
Mass spectrometry
Urine
Liquid phase microextraction
Double derivatization

ABSTRACT

In this study, it is shown a method for the determination of benzodiazepines and their main metabolites in urine samples by hollow-fiber liquid-phase microextraction (LPME) in the three-phase mode. Initially, the hydrolysis step was performed using 100 μL of sodium acetate 2.0 mol/L buffer solution (pH 4.5), 25 μL of β-glucuronidase enzyme and incubation for 90 min at 55 °C. In parallel with hydrolysis, the LPME fiber (9 cm) was prepared. Its pores were filled with a mixture of dihexyl ether: 1-nonanol (9:1). Afterwards, a solution of 3.0 mol/L of HCl was introduced into the lumen of the fiber (acceptor phase). After hydrolysis, the fiber was submersed in the alkalinized urine (pH 10) containing 10% NaCl. Samples were then submitted to orbital shaking (2400 rpm) for 90 min. The acceptor phase was later withdrawn from the fiber, dried and the residue derivatized with trifluoroacetic anhydride (TFAA) for 10 min at 60 °C with further addition of *N*-methyl-*N*-tert-butyldimethylsilyltrifluoroacetamide containing 1% tert-butyldimethylchlorosilane (MTBSTFA) for 45 min at 90 °C followed by determination by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). The calibration curves obtained showed linearity over the specified range, with a similar sensitivity to traditional techniques and a higher detection capability compared to most of the miniaturized methods described in the literature. The method has been developed and successfully validated and applied to urine samples from real cases of benzodiazepines intake.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Benzodiazepines are central nervous system (CNS) depressant drugs often prescribed for the treatment of insomnia, anxiety, and epilepsy. However, this class of drugs can promote both tolerance and dependence and may also have an impact on the performance of given situations such as driving a vehicle or the ability to remain focused at work [1,2]. Despite the distribution control of benzodiazepines in many countries, this class of drugs has been used in suicide attempts [3,4]. Because of its pharmacological effects, high commercialization and relative ease in obtaining such substances, they are also used in many countries in drug-facilitated crimes (DFC). Diazepam, clonazepam and flunitrazepam were the most frequently benzodiazepines found in biological samples of DFC victims [5–8]. In these cases, benzodiazepines and their metabolites are the target analytes according to the Society of Forensic Toxicologists (SOFT) and United National Office on Drugs and Crime (UNODC) [9,10]. One of the analytical features required by these organizations is the sensitivity to determine very low concentrations of benzodiazepines and its metabolites in biological fluids when DFC is suspected.

A number of studies have been reported in the literature on the determination of benzodiazepines and their metabolites in biological fluids. Liquid and gas chromatography (LC and GC, respectively) are the main techniques to determinate these molecules, while liquid–liquid extraction (LLE) and solid phase extraction (SPE) are the most frequently used sample preparation techniques [11–15]. However, LLE and SPE require costly consumables such as solvents and cartridges. Having this in mind, miniaturized methods such as hollow-fiber liquid-phase microextraction (LPME) could be an interesting alternative for the extraction of benzodiazepines.

* Corresponding author at: Av. Professor Lineu Prestes, 580, bloco 13B CEP: 05508-900 São Paulo, SP, Brazil. Tel.: +55 11 3091 2194; fax: +55 11 3091 9055.
E-mail address: andrebairros@usp.br (A.V. de Bairros).

http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.10.040
1570-0232/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

ANEXO 3 - Lista adaptada da SOFT e UNODC contendo os limites recomendados para detecção dos analitos alvos em amostras de urina.

Droga precursora	Analito(s) alvo(s)	Limite de detecção mínimo requisitado	Lista
GHB e percursores			
GBL, 1,4-BD e GHB	GHB GBL e 1,4-BD	10 µg/mL	UNODC e SOFT SOFT
Etanol			
Etanol	Etanol Etilglicuronídeo	100 µg/mL 100 ng/mL	UNODC e SOFT UNODC
Benzodiazepínicos			
Alprazolam	Alprazolam e alfa-hidroxi-alprazolam	10 ng/mL	UNODC e SOFT
Bromazepam	Bromazepam e hidróxi-bromazepam	10 ng/mL	UNODC e SOFT
Clobazam	Clobazam	10 ng/mL	UNODC
Clordiazepóxido	Clordiazepóxido, nordiazepam e oxazepam	10 ng/mL	UNODC e SOFT
Clonazepam	Clonazepam e 7-aminoclonazepam	5 ng/mL	UNODC e SOFT
Clotiazepam	Clotiazepam	10 ng/mL	UNODC
Diazepam	Diazepam, nordiazepam, oxazepam e temazepam	10 ng/mL	UNODC e SOFT
Estazolam	Estazolam	10 ng/mL	UNODC
Fenazepam	Fenazepam	5 ng/mL	UNODC
Flunitrazepam	Flunitrazepam e 7-aminoflunitrazepam	5 ng/mL	UNODC e SOFT
Loprazolam	Loprazolam	10 ng/mL	UNODC
Lorazepam	Lorazepam	10 ng/mL	UNODC e SOFT
Lormetazepam	Lormetazepam	10 ng/mL	UNODC
Midazolam	Midazolam	10 ng/mL	UNODC e SOFT
Nitrazepam	Nitrazepam e 7-aminonitrazepam	5 ng/mL	UNODC e SOFT
Nordiazepam	Nordiazepam e oxazepam	10 ng/mL	UNODC e SOFT
Oxazepam	Oxazepam	10 ng/mL	UNODC e SOFT
Prazepam	Prazepam	10 ng/mL	UNODC
Temazepam	Temazepam	10 ng/mL	UNODC e SOFT
Tetrazepam	Tetrazepam	10 ng/mL	UNODC
Triazolam	Triazolam e 4-hidróxi-triazolam	5 ng/mL	UNODC e SOFT
Hipnóticos não-benzodiazepinicos			
Zaleplon	Zaleplon	10 ng/mL	UNODC e SOFT
Zolpidem	Zolpidem e metabólito	10 ng/mL	UNODC e SOFT
Zopiclone	Zopiclone e metabólito Zopiclone e eszopiclone	10 ng/mL	UNODC SOFT
Barbitúricos			

Amobarbital	Amobarbital	25 ng/mL	UNODC e SOFT
Butalbital	Butalbital	25 ng/mL	UNODC e SOFT
Fenobarbital	Fenobarbital Tiopental	25 ng/mL	UNODC e SOFT SOFT
Pentobarbital	Pentobarbital Primidona	25 ng/mL	UNODC e SOFT SOFT
Secobarbital	Secobarbital	25 ng/mL 20 ng/mL	UNODC SOFT
Anti-histamínicos e outros			
Bronfeniramina	Bronfeniramina Bronfeniramina e desmetil-bronfeniramina	10 ng/mL	SOFT UNODC
Carisoprodol	Carisoprodol e meprobamato	50 ng/mL	UNODC e SOFT
Cetirizina	Cetirizina	10 ng/mL	UNODC
Ciclobenzaprina	Ciclobenzaprina Ciclobenzaprina e norciclobenzaprina	10 ng/mL	UNODC SOFT
Clonidina	Clonidina	10 ng/mL 1 ng/mL	UNODC SOFT
Clorfeniramina	Clorfeniramina Clorfeniramina e desmetil-clorfeniramina	10 ng/mL	SOFT UNODC e SOFT
Dextrometorfano	Dextrometorfano	10 ng/mL	UNODC e SOFT
Difenidramina	Difenidramina	10 ng/mL	UNODC e SOFT
Doxilamina	Doxilamina Doxilamina e desmetildoxilamina	10 ng/mL	SOFT UNODC
Hidroxizina	Hidroxizina	10 ng/mL	UNODC e SOFT
Meprobamato	Carisoprodol e meprobamato	50 ng/mL	UNODC e SOFT
Prometazina	Prometazina	10 ng/mL	SOFT
Antidepressivos e antipsicóticos			
Aceprometazina	Aceprometazina	10 ng/mL	UNODC
Alimemazina	Alimemazina	10 ng/mL	UNODC
Amitriptilina	Amitriptilina e nortriptilina	10 ng/mL	UNODC e SOFT
Ciamemazina	Ciamemazina	10 ng/mL	UNODC
Citalopram	Citalopram e desmetil-citalopram	10 ng/mL	UNODC e SOFT
Clozapina	Clozapina e norclozapina	10 ng/mL	SOFT
Desipramina	Desipramina Desipramina e imipramina	10 ng/mL	UNODC SOFT
Doxepina	Doxepina e nordoxepina	10 ng/mL	UNODC e SOFT
Fluoxetina	Fluoxetina e norfluoxetina	10 ng/mL	UNODC e SOFT
Haloperidol	Haloperidol	10 ng/mL	UNODC
Imipramina	Imiprimina	10 ng/mL	UNODC e SOFT

Niaprazina	Niaprazina	10 ng/mL	UNODC
Oxomemazina	Oxomemazina	20 ng/mL	UNODC
Paroxetina	Paroxetina	10 ng/mL	UNODC e SOFT
Quetiapina	Quetiapina, norquetiapina e 7-hidroxiquetiapina	10 ng/mL	SOFT
Sertralina	Sertralina e norsertralina	10 ng/mL	UNODC e SOFT
Venlafaxina	Venlafaxina e norvenlafaxina	10 ng/mL	SOFT
Ziprasidona	Ziprasidona	10 ng/mL	SOFT
Narcóticos e não-narcóticos			
Buprenorfina	Buprenorfina e norbuprenorfina	1 ng/mL	SOFT
Codeína	Codeína Codeína e morfina	10 ng/mL	UNODC SOFT
Dextrometorfano	Dextrometorfano	10 ng/mL	UNODC
Diidrocodeína	Diidrocodeína	10 ng/mL	UNODC e SOFT
Fentanil	Fentanil Fentanil e norfentanil	10 ng/mL 1 ng/mL	UNODC e SOFT SOFT
Heroína	6-acetil-morfina e morfina	10 ng/mL	UNODC
Hidrocodona	Hidrocodona Hidrocodona, hidromorfona, hidrocodol e diidrocodeinona	10 ng/mL	UNODC SOFT
Hidromorfona	Hidromorfona	10 ng/mL	UNODC e SOFT
Meperidina	Meperidina Meperidina e normeperidina	10 ng/mL	UNODC SOFT
Metadona	Metadona Metadona e EDDP	10 ng/mL	UNODC SOFT
Morfina	Morfina Morfina e hidromorfona	10 ng/mL	UNODC SOFT
Oxicodona	Oxicodona Oxicodona e oximorfona	10 ng/mL	UNODC SOFT
Oximorfona	Oximorfona	10 ng/mL	SOFT
Petidina	Petidina	10 ng/mL	UNODC
Propoxifeno	Propoxifeno e norpropoxifeno	10 ng/mL	UNODC e SOFT
Tramadol	Tramadol	10 ng/mL	SOFT
Trazadona	Trazadona	10 ng/mL	SOFT
Canabinóides			
Tetrahidrocanabinol	Carboxi-tetrahidrocanabinol	10 ng/mL	UNODC e SOFT
Estimulantes			
Anfetamina	Anfetamina e metanfetamina	50 ng/mL 10 ng/mL	SOFT UNODC

Cocaína	Cocaína e benzoilecgonina Cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno e metilecgonina	50 ng/ml	SOFT UNODC
Metanfetamina	Anfetamina e metanfetamina	50 ng/mL 10 ng/mL	SOFT UNODC
Metilenodioxianfetamina (MDA, MDE)	Metilenodioxianfetamina	10 ng/mL	UNODC e SOFT
Metilenodioximetanfetamina (MDMA)	Metilenodioximetanfetamina	10 ng/mL	UNODC e SOFT
Metilbenzodioxilbutanamina (MBDB)	Metilbenzodioxilbutanamina	10 ng/mL	UNODC
Drogas Diversas			
Ácido lisérgico (LSD)	Ácido lisérgico	1 ng/mL	UNODC
Ácido valpróico	Ácido valpróico	50 ng/mL	UNODC e SOFT
Cetamina	Cetamina e norcetamina	1 ng/mL 10 ng/mL	UNODC SOFT
Escopolamina	Escopolamina	10 ng/mL	UNODC e SOFT
Fenciclidina	Fenciclidina	10 ng/mL	UNODC e SOFT
Fenitoína	Fenitoína	25 ng/mL	SOFT
Grupo piperazina	Derivados da piperazina	10 ng/mL	UNODC
Tetrahidrozolina	Tetrahidrozolina	10 ng/mL	SOFT

ANEXO 4 - Parecer consubstanciado do projeto

FACULDADE DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

PROJETO DE PESQUISA

Título: Desenvolvimento de métodos analíticos para a identificação de drogas facilitadoras de crime em amostras de urina

Área Temática:

Área 9. A critério do CEP.

Versão: 2

CAAE: 03661312.7.0000.0067

Pesquisador: Mauricio Yonamine

Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 98.156

Data da Relatoria: 24/09/2012

Apresentação do Projeto:

O projeto visa melhorar as condições analíticas de testes periciais para comprovação de uso de substâncias (DFC) capazes de atuar na vítima, deixando-a sem condições de ação e/ou reação em situações criminais de estupro ou roubo. Os testes serão ralizados com urina (25mL) de pacientes usuários das substâncias de interesse, utilizando metodologias cromatográficas a partir de reações específicas para cada grupo de substâncias estudadas.

Objetivo da Pesquisa:

Desenvolver novos métodos para determinação de benzodiazepínicos (flunitrazepam, 7-aminoflunitrazepam, diazepam, nordiazepam, oxazepam, bromazepam, clonazepam, 7-aminoclonazepam), difenidramina, cetamina, norcetamina, dehidronorcetamina, gama-hidroxibutirato (GHB), etanol e etilglicuronídeo em amostras de urina.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A urina é a amostra preferencial para determinação de DFC, pois se trata de uma matriz de fácil manipulação e obtenção, que apresenta uma maior janela de detecção se comparada ao sangue assim como concentrações maiores dos analitos de interesse em relação ao cabelo. Esta amostra biológica também apresenta um baixíssimo risco à saúde do indivíduo que a manipula.
Em relação aos benefícios, este projeto contribuirá para a determinação de DFC nos casos suspeitos do golpe ¿Boa noite, Cinderela¿ através de amostras de urina. Após término da pesquisa, toda tecnologia desenvolvida no Laboratório de Análises Toxicológicas (LAT-USP) referente ao projeto será publicada na forma de artigos científicos e transferida aos órgãos de segurança pública para aplicação de sua rotina laboratorial.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa tem aspectos bastante interessantes e atuais, relacionada aos aspectos periciais de casos de estupro ou rouba e visa a utilização de uma metodologia precisa e sensível para auxiliar na identificação de DFC usadas nestes caso. É relevante no aspecto de poder ser aplicada em laboratórios de perícia criminal aumentando o arsenal de testes para elucidação e compate a crimes por vezes de difícil caracterização.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O pesquisador apresentou um projeto bem estruturado e embasado em literatura da área. Os objetivos, justificativas, cronogramas e metodologias estão deacordo com as necessidades sendo

Endereço: Av.Prof° Lineu Prestes, n° 580 - Bloco 17 -
Bairro: superior - Butantã **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3785 **Fax:** (11)3091-3677 **E-mail:** cepfcf@usp.br

descritas de forma clara e coerente. O TCLE está correto foram modificadas as palavras anteriomente indicadas, ficando o texto mais claro e sem provocar qualquer inconveniente ao sujeito da pesquisa.

Recomendações:

considero o projeto adequado as normas.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

projeto aprovado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto aprovado 'ad referendum' do Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP em 14/9/12.

SAO PAULO, 14 de Setembro de 2012

Assinado por:
Cristina Helena dos Reis Serra

Endereço: Av.Profº Lineu Prestes, nº 580 - Bloco 17 -
Bairro: superior - Butantã **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3785 **Fax:** (11)3091-3677 **E-mail:** cepfcf@usp.br

ANEXO 5 – Ficha do aluno

Janus – Sistema Administrativo da Pós-Graduação

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

9141 - 7313415/2 - André Valle de Bairros

Email:	andrebairros@usp.br
Data de Nascimento:	02/07/1983
Cédula de Identidade:	RG - 1058565688 - RS
Local de Nascimento:	Estado do Rio Grande do Sul
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Farmacêutico - Universidade Federal de Santa Maria - Rio Grande do Sul - Brasil - 2008
Mestrado:	Mestre em Ciências Biológicas (1) - Universidade Federal de Santa Maria - Rio Grande do Sul - Brasil - 2009

Curso:	Doutorado
Programa:	Toxicologia e Análises Toxicológicas
Data de Matrícula:	09/02/2011
Início da Contagem de Prazo:	09/02/2011
Data Limite para o Depósito:	09/02/2015
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Maurício Yonamine - 09/02/2011 até o presente. E.Mail: yonamine@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 09/02/2011
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 19/04/2013
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Ingressou no Doutorado em 09/02/2011 Matrícula de Acompanhamento em 14/07/2014

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013)
Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 14/07/2014
Impresso em: 03/09/14 16:09:44

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

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

9141 - 7313415/2 - André Valle de Bairros

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBF5797-1/1	Desenvolvimento e Validação de Métodos Bioanalíticos	15/03/2011	25/04/2011	60	4	100	A	N	Concluída
EDM5791-5/6	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	16/03/2011	30/06/2011	120	8	75	A	N	Concluída
FBC5752-2/3	Danos em Biomoléculas e o seu Papel no Monitoramento da Exposição a Agentes Tóxicos	27/05/2011	01/07/2011	45	3	100	A	N	Concluída
FBC5784-2/6	Tópicos Avançados em Toxicologia II	09/08/2011	29/11/2011	30	2	85	A	N	Concluída
FBC5813-3/1	Aplicações de Cromatografia em Análises Toxicológicas	27/02/2012	04/04/2012	60	4	80	A	N	Concluída
FBC5803-2/1	Sistemas da Garantia da Qualidade em Laboratórios Analíticos	05/03/2012	18/03/2012	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5728-3/1	Aspectos Toxicológicos da Dopagem no Esporte	16/05/2012	19/06/2012	45	3	90	A	N	Concluída
FBC5741-6/1	Análise Toxicológica de Fármacos e Drogas que Causam Dependência	25/06/2012	29/07/2012	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5729-7/1	Fundamentos Básicos da Avaliação do Risco Oferecido por Substâncias Químicas	23/08/2012	19/09/2012	60	4	85	A	N	Concluída
FBC5802-3/2	Tópicos Avançados em Toxicologia I	05/03/2013	17/06/2013	15	1	80	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	10	20	35
Estágios:			
Total:	10	20	35

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

1) Curso com validade nacional, de acordo com o disposto na Portaria nº 524, de 29.04.2008.

Conceito a partir de 02/01/1997:

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

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

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 14/07/2014

Impresso em: 03/09/14 16:09:44