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

Redistribuição da cocaína e sua influência na neuroquímica *post mortem*

Virgínia Martins Carvalho

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Profª Dra. Alice Aparecida da Matta Chasin

São Paulo
2011

Virgínia Martins Carvalho

Redistribuição da cocaína e sua influência na neuroquímica *post mortem*

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Alice Aparecida da Matta Chasin
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, janeiro de 2011.

Silêncio... Fim... Morte... Ninguém precisa possuir qualidades ou qualificações especiais para prever este destino inevitável. Todos sabem do fato, mas difícil entender este complexo processo. Diante deste simples e misterioso fenômeno da natureza, me permito o delírio de recorrer à astrofísica e fazer um paralelo na idéia do processo de colapso de uma estrela, descrito por Fritjof Capra em seu livro O Tao da Física: "...toda estrela, em determinado estágio de sua evolução entra em colapso devido à atração gravitacional mútua de suas partículas, à medida que este processo se desdobra, a estrela se torna cada vez mais densa, a força da gravidade em sua superfície torna-se cada vez mais poderosa e, conseqüentemente, o espaço-tempo ao seu redor torna-se cada vez mais curvo. Em razão da crescente força da gravidade na superfície estelar, torna-se cada vez mais difícil fugir dela e, eventualmente, a estrela alcança um estágio no qual coisa alguma, nem mesmo a luz, pode escapar de sua superfície. Nesse estágio, dizemos que um "horizonte de eventos" se forma em torno da estrela uma vez que nenhum sinal pode dela evadir-se para comunicar qualquer evento ao mundo exterior. O espaço em torno da estrela fica tão fortemente curvo que toda a luz fica presa nesse espaço e não consegue escapar. Não podemos ver tal estrela simplesmente porque sua luz jamais nos alcançará; por essa razão ela é denominada buraco negro..."

Seria o ser humano uma estrela dotada de consciência? Consciência esta que faz com que cada um seja o seu centro do universo?

Esta tese é especialmente dedicada a cada ser humano que compôs a população de estudo, tanto aos indivíduos controle como àqueles que alteraram o seu centro do universo através da cocaína. Essas estrelas perderam a consciência de forma definitiva nesta existência, mas permitiram a iluminação de nosso pensamento e a continuidade do infinito processo de questionamento acerca dos fenômenos tóxico-tanatológicos.

Espero que este trabalho estimule a interpretações divergentes das que foram aqui propostas, pois são os paradoxos que auxiliam a compreensão do mundo.

*"Lógica: a arte de pensar e raciocinar em total concordância com as
limitações e incapacidades da má interpretação humana"*
Ambrose Bierce

*Com todo respeito, reconhecimento e admiração,
ao Prof. Dr. Jorge Camilo Flório pela carinhosa orientação,
por fornecer todas as condições para a
realização desta investigação, por acreditar
e apoiar minha idéia de estudar a
neuroquímica post mortem*

*À minha mãe, Iracema, por me ensinar que quando
acreditamos e persistimos com entusiasmo
a natureza conspira em nosso favor*

*Ao meu amado marido e brilhante químico,
Ernesto, por me mostrar que a paciência
e a reflexão serena são as bases
para o sucesso de qualquer investigação*

*Ao amigo André por ter me dito inúmeras vezes
"estamos juntos neste trabalho e vamos até o final,
ao sucesso ou ao fracasso", pelos incontáveis momentos de conforto e
apoio para ascender os "árdusos degraus" desta jornada*

AGRADECIMENTOS

.....

Ao Instituto Médico Legal de São Paulo (IML/SP), especialmente aos médicos legistas Dr. Luiz Roberto de Oliveira Fontes, Dra. Daniela Fuzinatto, Dr. Paulo Tieppo, Dra. Alba Blasotti e Dr. Hideaki Kawata, pela excelente parceria, e ao técnico Maurício Tomita pelo treinamento na coleta de humor vítreo.

Ao Núcleo de Toxicologia Forense do IML/SP, representado pela Dra. Neide S. F. de Oliveira, Dra. Débora Gonçalves de Carvalho e Dra. Sueli Aparecida de Moraes pela contribuição analítica.

Ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP) por ter fornecido condições laboratoriais para a realização deste trabalho e especialmente pela competente orientação do Prof. Dr. Jorge Camilo Flório em todas as etapas deste trabalho.

À Prof^a Dra. Alice Aparecida da Matta Chasin pela orientação na elaboração do projeto sobre redistribuição *post mortem* e pelas valiosas sugestões na realização desta obra.

À Prof^a Dra. Maria Amélia Zogno e ao Departamento de Reprodução Animal da FMVZ/USP pela concessão de uso do equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos.

À banca de qualificação, composta pelos Professores Doutores Irene Videira de Lima, Regina Lúcia de Moraes Moreau e Luís Roberto de Oliveira Fontes pelas importantes críticas e sugestões.

À Prof^a Dra. Marina F. M. Tavares do Instituto de Química da USP por permitir a realização dos testes em eletroforese capilar na etapa de seleção do método analítico para identificação e quantificação de cocaína e benzoilecgonina.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Técnico do Ensino Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

À Organização dos Estados Americanos (OEA) pelo auxílio financeiro concedido.

RESUMO

CARVALHO, V.M. **Redistribuição da cocaína e sua influência na neuroquímica *post mortem***. Tese de Doutorado, 2011, 181p. [Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].

A interpretação dos achados laboratoriais no estabelecimento da *causa mortis* consiste na integração dos conhecimentos sobre a toxicocinética e toxicodinâmica do agente, conhecimentos de sua redistribuição *post mortem* (RPM) e achados necroscópicos que possibilitem onexo causal entre o tóxico e o efeito letal. Neste sentido, é importante considerar que somente as concentrações de cocaína (COC) e seus metabólitos podem não ser determinantes na interpretação da causa de morte, podendo ser útil o cotejamento com outros parâmetros, como os níveis de neurotransmissores que representem o mecanismo de ação do fármaco. Assim, este trabalho teve por objetivo investigar a RPM da COC e seu metabólito benzoilecgonina (BE) em três segmentos do tecido encefálico (TE), no humor vítreo (HV) e sangue (SG), bem como determinar as concentrações de catecolaminas e indolaminas no encéfalo para avaliar a aplicação da neuroquímica *post mortem* (NPM) na toxicologia forense. No estudo de RPM foram quantificados os níveis de COC e BE em três segmentos do TE (córtex frontal, núcleos da base e cerebelo), no HV e no SG através de método por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada ao detector de arranjo de diodos. Os estudos de neuroquímica foram realizados empregando-se HPLC acoplada ao detector eletroquímico. Os resultados indicaram que as concentrações médias de COC foram maiores no TE, seguido por SG e HV (3,09, 2,92 e 1,71 µg/mL, respectivamente), enquanto para BE foram maiores em SG, seguido por HV e TE (6,12, 1,39 e 0,87 µg/mL, respectivamente). As concentrações de COC se apresentaram distribuídas uniformemente nos três segmentos de TE e apresentaram alta correlação com o HV. Adicionalmente, a média de concentrações de dopamina total foi maior no grupo de indivíduos com amostras positivas para COC, sendo verificada diferença significativa entre este grupo e o de indivíduos com amostras negativas para o fármaco de interesse. Os resultados demonstraram que o estudo de RPM e da NPM constituem ferramentas aplicáveis na interpretação da causa e maneira de morte.

UNITERMOS: Cocaína. Redistribuição. Matrizes cadavéricas. Neuroquímica *post mortem*

ABSTRACT

CARVALHO, V.M. **Cocaine redistribution and their implication in *post mortem* neurochemistry**. Tese de Doutorado, 2010, 181p. [Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].

In case of intoxication, the interpretation of analytical results to assess the cause and process of death requires knowledge about toxicokinetics, toxicodynamic, postmortem redistribution, and autopsy elements. Cocaine-related deaths occur mainly after prolonged drugs use and the presence of cocaine (COC) in fluids or tissues does not prove that death was due to COC consumption, and the interpretation of postmortem concentrations is even more complicated than attempts at making such correlations in the living. The objectives of this study were to investigate the *post mortem* redistribution (PMR) of COC and its metabolite benzoylecgonine (BE) in three segments of brain (frontal cortex, base nucleous, and cerebellum), vitreous humor, and blood. In additional, catecholamines and indolamines were quantified in brain in order to evaluate the usefulness of *post mortem* neurochemistry (PMN) in forensic toxicology. In PMR studies were quantified the COC and BE levels in three brain (BR) segments, in vitreous humor (VH), and blood (BL) by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with diode array detection, and for neurochemistry studies the neurotransmitters were quantified by HPLC with electrochemical detection. A homogenous distribution of COC and BE within frontal cortex, base nucleous, and cerebellum was found. The COC media concentrations were 3.09, 2.92 e 1.71 µg/mL in BR, BL and VH, respectively, and the BE media concentrations were 6.12, 1.39 e 0.87 µg/mL in BL, VH, and BR, respectively. The COC concentrations in VH show high correlation with brain. The media total dopamine concentration was significant higher in COC positive group. These findings suggest that the studies of PMR and PMN by neurotransmitters levels may be useful to assess the cause and process of death.

KEYWORDS: Cocaine. Redistribution. Cadaveric samples. *Post mortem* neurochemistry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Produtos de biotransformação, combustão e transesterificação da cocaína	25
Figura 2 - Produtos de biotransformação e transesterificação do éster metilanidroecgonina	26
Figura 3 - Ilustração das vias dopaminérgicas no encéfalo.....	28
Figura 4 - Estruturas químicas da dopamina, serotonina e respectivos metabólitos.	36
Figura 5 - Esquema ilustrando a anatomia do olho com a localização do humor vítreo e o humor aquoso	46
Figura 6 - Encéfalo retirado da caixa craniana.....	55
Figura 7 - Coleta do córtex frontal.....	55
Figura 8 - Coleta do cerebelo.....	56
Figura 9 - Coleta do córtex próximo ao ventrículo.....	56
Figura 10 - Coleta dos núcleos da base.....	57
Figura 11 - Procedimento de extração de cocaína e benzoilecgonina das amostras de humor vítreo, tecido encefálico e sangue.....	63
Figura 12 - Fluxograma da técnica de preparação do tecido cerebral	70
Figura 13 - Perfil cromatográfico das soluções-padrão de cocaína e benzoilecgonina nas concentrações de 50ppm.....	77
Figura 14 - Perfil eletroferográfico das soluções-padrão de cocaína e benzoilecgonina	78
Figura 15 - Perfil eletroferográfico dos analitos submetidos à técnica de separação por eletroforese capilar de zona.	79
Figura 16 - Perfil eletroferográfico e espectro ultravioleta da amostra de urina referência negativa adicionada de benzimidazol como padrão interno (30 ppm), cocaína (20 ppm) e benzoilecgonina (20 ppm).	80
Figura 17 - Perfil eletroferográfico e espectro ultravioleta de extrato de urina de indivíduo vítima de <i>overdose</i> , positiva para cocaína na concentração de 4ppm.....	80
Figura 18 - Perfil cromatográfico da amostra referência negativa de humor vítreo...	81

Figura 19 - Perfil cromatográfico da amostra referência negativa de humor vítreo adicionada de padrão interno (prilocaína) na concentração de 3,0 µg/mL	82
Figura 20 - Perfil cromatográfico da amostra referência negativa de humor vítreo adicionada de benzoilecgonina e cocaína, ambos analitos nas concentrações de 1,0 µg/mL, e padrão interno na concentração de 3,0 µg/mL	82
Figura 21 - Perfil cromatográfico da amostra referência negativa de tecido encefálico	83
Figura 22 - Perfil cromatográfico da amostra referência negativa de tecido encefálico adicionada de padrão interno (prilocaína), concentração de 5,0 µg/g.....	83
Figura 23 - Perfil cromatográfico da amostra referência negativa de tecido encefálico adicionada de benzoilecgonina e cocaína, ambos analitos nas concentrações de 1,0 µg/g, e padrão interno na concentração de 5,0 µg/g.....	84
Figura 24 - Perfil cromatográfico da amostra referência negativa de sangue	85
Figura 25 - Perfil cromatográfico da amostra referência negativa de sangue adicionada de padrão interno (prilocaína), concentração de 3,0 µg/mL	85
Figura 26 - Perfil cromatográfico da amostra referência negativa de sangue adicionada de benzoilecgonina e cocaína, ambos analitos nas concentrações de 1,0 µg/mL, e padrão interno na concentração de 3,0 µg/mL	86
Figura 27 - Representação gráfica da curva analítica da benzoilecgonina em humor vítreo nas concentrações entre 0,25 e 5,00 µg/mL	87
Figura 28 - Representação gráfica da curva analítica da cocaína em humor vítreo nas concentrações entre 0,50 e 5,00 µg/mL	87
Figura 29 - Representação gráfica da curva analítica da benzoilecgonina em tecido encefálico nas concentrações entre 0,50 e 5,00 µg/g.....	88
Figura 30 - Representação gráfica da curva analítica da cocaína em tecido encefálico nas concentrações entre 0,50 e 5,00 µg/g	89
Figura 31 - Representação gráfica da curva analítica da benzoilecgonina em sangue nas concentrações entre 0,50 e 6,00 µg/mL.....	89
Figura 32 - Representação gráfica da curva analítica da cocaína em sangue nas concentrações entre 0,25 e 6,00 µg/mL	90

Figura 33 - Perfil cromatográfico de amostra de humor vítreo ID 33, com concentrações de 2,80 e 6,09 µg/mL para benzoilecgonina e cocaína, respectivamente	95
Figura 34 - Perfil cromatográfico de amostra de tecido encefálico correspondente aos núcleos da base, ID 33, com concentração de 0,36 e 3,97 µg/g para benzoilecgonina e cocaína, respectivamente	95
Figura 35 - Perfil cromatográfico de amostra de sangue, ID 33, com concentração de 3,25 e 2,57 µg/mL para benzoilecgonina e cocaína, respectivamente	96
Figura 36 - Perfil cromatográfico de amostra de humor vítreo ID 34, com concentrações de 3,19 e 1,26 µg/mL para BE e COC, respectivamente	97
Figura 37 - Perfil cromatográfico de amostra de tecido encefálico correspondente aos núcleos da base, ID 34, com concentração de 1,60 e 2,71 µg/g para BE e COC, respectivamente	97
Figura 38 - Perfil cromatográfico de amostra de sangue, ID 34, com concentração de 4,43 e 1,62 µg/mL para BE e COC, respectivamente	98
Figura 39 - Perfil cromatográfico de amostra de humor vítreo ID 32, com concentrações de 1,28 e 4,66 µg/mL para benzoilecgonina e cocaína, respectivamente	99
Figura 40 - Perfil cromatográfico de amostra de tecido encefálico correspondente aos núcleos da base, ID 32, com concentração de 2,90 e 17,61 µg/g para benzoilecgonina e cocaína, respectivamente	99
Figura 41 - Perfil cromatográfico de amostra de sangue, ID 32, com concentração de 15,03 e 13,15 µg/mL para benzoilecgonina e cocaína, respectivamente	100
Figura 42 - Perfil cromatográfico de amostra de humor vítreo ID 35, com concentrações de 5,91 e 10,97 µg/mL para BE e COC, respectivamente	101
Figura 43 - Perfil cromatográfico de amostra de tecido encefálico correspondente aos núcleos da base, ID 35, com concentração de 2,47 e 13,71 µg/g para BE e COC, respectivamente	101
Figura 44 - Perfil cromatográfico de amostra de sangue, ID 35, com concentração de 34,74 e 24,43 µg/mL para BE e COC, respectivamente	102

Figura 45 – Gráfico de comparação das médias de concentração de cocaína nos três segmentos de tecido encefálico e erros padrão (N=18)	106
Figura 46 - Comparação das médias de concentração de benzoilecgonina nos três segmentos de tecido encefálico e erros padrão (N=18)	107
Figura 47 - Comparação das médias de concentração de cocaína total nos três segmentos de tecido encefálico e erros padrão (N=18)	109
Figura 48 - Comparação das médias de concentração de cocaína nas três matrizes biológicas e erros padrão (N=18)	112
Figura 49 - Comparação das médias de concentração de cocaína total nas três matrizes biológicas e erros padrão (N=18)	115
Figura 50 - Comparação das médias dos valores de temperatura hepática na população de estudo e erros padrão (N=39)	120
Figura 51 - Comparação das médias de concentração de dopamina total no segmento núcleos da base e erros padrão (N=18)	131
Figura 52 - Comparação das médias de concentração de dopamina total no segmento córtex próximo aos ventrículos e erros padrão (N=18)	132

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentrações de cocaína e benzoilecgonina em matrizes biológicas cadavéricas	34
Tabela 2 - Otimização das condições em cromatografia eletrocínética micelar	59
Tabela 3 - Otimização das condições em eletroforese capilar de zona	59
Tabela 4 - Perfil demográfico da população selecionada para o estudo e tipo de morte segundo o histórico	74
Tabela 5 - Distribuição de frequência da população de estudo segundo sexo e faixa etária	75
Tabela 6 - Distribuição de frequência da população de estudo segundo compleição corporal, sexo e raça	75
Tabela 7 - Distribuição da população segundo o tipo de morte.....	75
Tabela 8 - Distribuição dos históricos referidos no gênero masculino segundo a idade.....	76
Tabela 9 - Parâmetros de segurança do método proposto para determinação de benzoilecgonina em humor vítreo	91
Tabela 10 - Parâmetros de segurança do método proposto para determinação de cocaína em humor vítreo.....	91
Tabela 11 - Parâmetros de segurança do método proposto para determinação de benzoilecgonina em tecido encefálico	92
Tabela 12 - Parâmetros de segurança do método proposto para determinação de cocaína em tecido encefálico	92
Tabela 13 - Parâmetros de segurança do método proposto para determinação de benzoilecgonina em sangue.....	93
Tabela 14 - Parâmetros de segurança do método proposto para determinação de cocaína em sangue	93
Tabela 15 - Distribuição dos casos positivos e negativos para cocaína e/ou benzoilecgonina segundo a faixa etária	102
Tabela 16 - Distribuição dos casos positivos e negativos para cocaína e/ou benzoilecgonina segundo o gênero.....	103

Tabela 17 - Distribuição dos casos positivos e negativos para cocaína e/ou benzoilecgonina segundo o histórico	103
Tabela 18 - Distribuição das concentrações de BE e COC nas matrizes biológicas dos casos positivos	104
Tabela 19 - Estatística descritiva e testes de normalidade para as concentrações de COC nos três segmentos encefálicos	105
Tabela 20 - Estatística descritiva e testes de normalidade para as concentrações de BE nos três segmentos encefálicos	107
Tabela 21 - Estatística descritiva e testes de normalidade para as concentrações de cocaína total nos três segmentos encefálicos	108
Tabela 22 - Distribuição das concentrações de benzoilecgonina e cocaína nas matrizes biológicas.....	110
Tabela 23 - Estatística descritiva e testes de normalidade para as concentrações de cocaína nas matrizes selecionadas.....	111
Tabela 24 - Estatística descritiva e testes de normalidade para as concentrações de benzoilecgonina no sangue e no humor vítreo.....	113
Tabela 25 - Estatística descritiva e testes de normalidade para as concentrações de cocaína total nas matrizes biológicas.....	114
Tabela 26 – Distribuição das concentrações de etanol em sangue na população de estudo.....	116
Tabela 27 - Distribuição da população segundo a positividade para cocaína e alcoolemia	117
Tabela 28 – Distribuição das concentrações de etanol e cocaína na população	118
Tabela 29 - Valores dos intervalos <i>post mortem</i> (IPM) e das médias de temperatura hepática (MTH) no grupo com amostras negativas para cocaína	119
Tabela 30 - Valores dos intervalos <i>post mortem</i> (IPM) e das médias de temperatura hepática (MTH) no grupo com amostras positivas para COC	120
Tabela 31 - Distribuição das concentrações de dopamina em três segmentos cerebrais da população que apresentou resultado negativo para cocaína.....	122
Tabela 32 - Distribuição das concentrações de dopamina em três segmentos cerebrais da população que apresentou resultado positivo para cocaína.....	123

Tabela 33 - Distribuição das concentrações de DOPAC em três segmentos cerebrais da população que apresentou resultado negativo para cocaína	124
Tabela 34 - Distribuição das concentrações de DOPAC em três segmentos cerebrais da população que apresentou resultado positivo para cocaína.....	125
Tabela 35 - Distribuição das concentrações de HVA em três segmentos cerebrais da população que apresentou resultado negativo para cocaína	126
Tabela 36 - Distribuição das concentrações de HVA em três segmentos cerebrais da população que apresentou resultado positivo para cocaína.....	127
Tabela 37 - Distribuição das concentrações de dopamina total em três segmentos cerebrais da população que apresentou resultado negativo para cocaína.....	128
Tabela 38 - Distribuição das concentrações de dopamina total em três segmentos cerebrais da população que apresentou resultado positivo para cocaína.....	129
Tabela 39 - Teste de <i>Mann-Whitney</i> comparando as médias de concentrações de DA, DOPAC, HVA e dopamina total nos segmentos de tecido cerebral selecionados para o estudo	130
Tabela 40 - Distribuição das médias de concentração das catecolaminas no grupo negativo para COC, segundo a ocorrência de procedimento médico hospitalar (PMH)	133
Tabela 41 - Teste de <i>Mann Whitney</i> comparando as médias de concentração de DA, DOPAC, HVA e dopamina total nos segmentos de tecido cerebral no grupo negativo para COC, separados em dois subgrupos, de acordo com a ocorrência de procedimento médico hospitalar.....	133
Tabela 42 - Distribuição das concentrações de 5-HT em três segmentos cerebrais da população que apresentou amostras negativas para cocaína	135
Tabela 43 - Distribuição das concentrações de 5-HT em três segmentos cerebrais da população que apresentou amostras positivas para cocaína.....	136
Tabela 44 - Distribuição das concentrações de 5-HIAA em três segmentos cerebrais da população que apresentou amostras negativas para cocaína	137
Tabela 45 - Distribuição das concentrações de 5-HIAA em três segmentos cerebrais da população que apresentou amostras positivas para cocaína.....	138

Tabela 46 - Distribuição das concentrações de serotonina total em três segmentos cerebrais da população que apresentou amostras negativas para cocaína.....	139
Tabela 47 - Distribuição das concentrações de serotonina total em três segmentos cerebrais da população que apresentou amostras positivas para cocaína	140

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 GENERALIDADES	6
2.1 Tanatologia médico-legal.....	6
2.1.2 Fenômenos e intervalo pós-mortal	9
2.2 Aspectos toxicológicos da cocaína	17
2.2.1 Propriedades e padrões de uso	17
2.2.2 Toxicocinética.....	20
2.2.3 Toxicodinâmica e efeitos tóxicos.....	27
2.2.4 Redistribuição <i>post mortem</i> da cocaína	30
2.3 Neuroquímica <i>post mortem</i>	35
2.4 Aspectos analíticos	39
2.4.1 Ferramentas analíticas para análise de cocaína e seus metabólitos	39
2.4.2 Ferramentas analíticas para análise de neurotransmissores	47
3 JUSTIFICATIVA	49
4 HIPÓTESES.....	51
5 OBJETIVOS E PLANO DE TRABALHO.....	52
6 MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
6.1 População de estudo e procedimento de coleta	53
6.2 Verificação dos fenômenos pós-mortais	58
6.4 Preparação das amostras, identificação e quantificação de cocaína e benzoilecgonina.....	60
6.4.1 Equipamentos, materiais e reagentes	60
6.4.2 Preparação das amostras	61
6.5 Validação dos métodos de quantificação de cocaína e benzoilecgonina em nas matrizes biológicas	64
6.5.1 Especificidade	64

6.5.2	Curvas analíticas de benzoilecgonina e cocaína.....	65
6.5.3	Recuperação.....	66
6.5.4	Limite de detecção e limite de quantificação.....	67
6.5.5	Precisão.....	68
6.6	Determinação da alcoolemia.....	68
6.7	Preparação das amostras e quantificação dos neurotransmissores.....	69
6.7.1	Extração dos neurotransmissores das amostras de tecido cerebral.....	69
6.7.2	Quantificação dos neurotransmissores por HPLC-ED.....	71
6.8	Forma de apresentação e tratamento dos resultados.....	72
7	RESULTADOS.....	73
7.1	Caracterização da população.....	73
7.3	Padronização do método de análise de cocaína e benzoilecgonina nas matrizes biológicas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD).....	81
7.4	Validação dos métodos de quantificação de cocaína e benzoilecgonina nas matrizes biológicas.....	86
7.5	Quantificação de cocaína e benzoilecgonina nas amostras selecionadas para o estudo.....	94
7.6	Comparação das concentrações de cocaína e benzoilecgonina nas matrizes biológicas.....	109
7.7	Determinação da alcoolemia.....	116
7.8	Verificação da influência da temperatura hepática nos casos positivos e negativos para cocaína.....	118
7.9	Quantificação das catecolaminas nas amostras de tecido cerebral.....	121
7.10	Verificação da influência do procedimento médico-hospitalar nas concentrações de catecolaminas.....	132
7.11	Comparação entre as concentrações de cocaína total e dopamina total.....	134
7.12	Quantificação das indolaminas nas amostras de tecido cerebral.....	134
8	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	141
8.1	Perfil da população de estudo.....	141
8.2	Seleção do método analítico para quantificação de cocaína e benzoilecgonina.....	142
8.3	Validação dos métodos de análise de cocaína e benzoilecgonina nas matrizes biológicas.....	146

8.4 Aplicação do método e quantificação de cocaína e benzoilecgonina nas matrizes selecionadas para o estudo.....	148
8.5 Determinação da alcoolemia	154
8.6 Verificação da influência da temperatura nos casos positivos e negativos para cocaína	155
8.7 Quantificação das catecolaminas nas amostras de tecido cerebral	156
8.8 Verificação da influência do procedimento médico-hospitalar nas concentrações de catecolaminas.....	158
8.9 Comparação entre as concentrações de cocaína total e dopamina total.....	158
8.10 Quantificação das indolaminas nas amostras de tecido cerebral	159
8.11 Perspectivas da neuroquímica <i>post mortem</i>	160
 9 CONCLUSÕES	 162
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 163
 APÊNDICE A.....	 180

1 INTRODUÇÃO

A história da medicina nos revela que o conhecimento e o uso de substâncias psicoativas capazes de aliviar a dor, reduzir os sintomas de mal-estar e produzir sensações agradáveis, hoje popularmente rotuladas de *tóxicos* ou *drogas*, vêm desde tempos imemoriais. Com o desenvolvimento de pesquisas científicas e com o advento de fármacos semi-sintéticos e sintéticos aumentou a disponibilidade destas drogas, e o uso abusivo ou indevido emergiu como um problema de saúde pública (ROCHA, 1985), sendo que a partir do século vinte esta questão se tornou um problema internacional. O *United States Office on Drug and Crime* (UNODC-Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crimes) estimou que em 2008 entre 155 e 250 milhões de pessoas (3,5 a 5,7% da população mundial entre 15 e 64 anos) consumiram drogas ilícitas por pelo menos uma vez. Apesar de estas altas cifras incluírem muitos consumidores ocasionais que talvez tenham provado a droga somente uma vez durante todo o ano, é importante considerar nesta estimativa o número de pessoas que são consumidores “problemáticos” ou grandes consumidores representando entre 10 e 15% (16 a 38 milhões) do grupo pesquisado, que representa expressivas conseqüências à saúde e à ordem pública (UNODC, 2010). Mesmo considerando que a metodologia empregada no relatório se baseia nos registros de busca por tratamento, o que representa a minoria dos usuários, é possível se ter uma idéia do grau de envolvimento das drogas com os problemas sociais. É sabido que a demarcação de uma linha divisória entre o uso e o tráfico é praticamente impossível, visto que muitas vezes o usuário acaba por se tornar um traficante para atender às próprias necessidades.

De forma geral a possibilidade de uso abusivo de uma substância é aumentada pela rapidez do início de sua ação, já que os efeitos que ocorrem logo após a administração mais provavelmente desencadearão a série de eventos que levam à perda de controle sobre o uso da substância. Assim, os fatores que determinam a dependência são complexos e influenciados pelas características do indivíduo, da droga, dose e freqüência de uso. Apesar de qualquer tentativa de

determinar um perfil do usuário incorrer no risco de estigmatização do indivíduo, ou mesmo em interpretações errôneas, é fato que existe uma relação entre as drogas e a delinquência organizada, principalmente quando o fármaco de abuso constitui um estimulante do sistema nervoso central (SNC) e apresenta alto potencial de abuso, como é o caso da cocaína.

A cocaína (COC) cujas formas mais comuns de apresentação são sais (cloridrato ou sulfato) normalmente administrados por via intranasal e intravenosa, pedra ou pasta, estas últimas sendo consumidas por via respiratória (fumada) é classificada farmacologicamente como estimulante do SNC apresentando alto potencial de abuso. Esta droga é uma das mais consumidas havendo a referência de que entre 15 e 19 milhões de pessoas em 2008 com prevalência anual de 0,3 a 0,4% da população mundial entre 15 e 64 anos fez uso, empatando com os opiáceos (entre 13 e 22 milhões, prevalência anual entre 0,3 e 0,5%) e ficando atrás da *maconha* (entre 129 e 191 milhões, prevalência anual entre 2,9 e 4,3%) (UNODC, 2010).

O intenso efeito estimulante no SNC faz da COC uma droga bastante relacionada aos episódios de agressividade, podendo culminar em paranóia e em estado persecutório, neste caso o usuário pode se tornar uma ameaça à sociedade (FOLTIN; FISCHMAN, 1997; NAPPO, 1996). Apesar de haver poucos estudos relacionados com a morte provocada, foi observado que o homicídio parece ser a causa jurídica mais comum entre os usuários de COC fumada (RIBEIRO et al., 2004). Desta forma, é possível assumir que as inúmeras possibilidades do envolvimento da COC com situações delituosas justificam os exames toxicológicos nos cadáveres com o intuito de auxiliar no estabelecimento da causa de morte, de se entender a maneira em que se deu o óbito e todos os elementos envolvidos, considerando que o fármaco em questão pode atuar como o agente primário ou estar relacionado com o evento.

A realização das análises toxicológicas em fluidos biológicos com finalidade forense é realizada, oficialmente no Brasil, em laboratórios pertencentes às Secretarias de Segurança Pública no âmbito estadual e, em vários casos, nos Institutos Médico-Legais constituindo instrumento de averiguação de uso de substâncias classicamente relacionadas com crimes, estes exames são realizados *in*

vivo e em amostras *post mortem* em casos de morte violenta decorrente de acidente, homicídio ou suicídio, ou ainda quando se trata de averiguação de intoxicação exógena que contribua para o diagnóstico na Clínica Médica (clínica médico-legal) (CHASIN, 2004). A requisição dos exames pode ser realizada por autoridades policiais, judiciárias ou militares, quando na presidência de inquéritos ou processos, em matéria criminal de sua competência (BENFICA et al., 2004).

O resultado analítico obtido no exame toxicológico muitas vezes não é o suficiente para esclarecer a ocorrência, portanto a interpretação dos achados laboratoriais quer em situações *in vivo* ou no estabelecimento da causa de morte é a integração dos conhecimentos sobre a toxicocinética (absorção, distribuição, biotransformação e excreção), toxicodinâmica (mecanismo de ação e reatividade dos receptores) e achados necroscópicos que evidenciem ser o toxicante o responsável pelo efeito letal (CHASIN; MÍDIO, 1997). Além disso, em análise toxicológica forense é importante a correlação entre a concentração do analito na amostra biológica e a concentração que havia no momento do fato, o que permite a interpretação do dado gerado. No entanto, as concentrações dos analitos em matrizes provenientes de cadáveres nem sempre se referem às concentrações que havia no momento da morte devido ao processo de redistribuição *post mortem* (ALICOT et al., 2003).

Os mecanismos envolvidos na redistribuição *post mortem* envolvem a transferência passiva aos compartimentos como trato gastrintestinal, fígado, pulmões e miocárdio podendo ocorrer imediatamente após a morte e mais tarde devido à autólise das células e ao processo de putrefação. Observa-se atividade das esterases em fígado, rins, pulmões e cérebro, que promovem a hidrólise da cocaína (COC) (FANDIÑO; TOENNES; KAUERT, 2002), mesmo após a interrupção da vida (MORIYA; HASHIMOTO, 1996; WARNER; NORMAN, 2000), desta forma o fármaco continua a ser degradado após a morte dificultando a determinação de potencial intoxicação.

A adoção de estudos que caracterizem a prevalência dos analitos em investigações pós-mortais relacionadas com a COC pode contribuir para que os investigadores forenses determinem a causa e a maneira da morte (JENKINS; GOLDBERGER, 1997).

Outra problemática relacionada à prática forense é a escolha da matriz na determinação das concentrações de COC. De fato, uma grande variedade de matrizes pode ser empregada sendo que o sangue é o mais freqüentemente utilizado devido à possibilidade de correlação com as concentrações no sítio de ação de maneira temporal. No entanto, considerando que o corpo não é um compartimento único e que a relação entre o sangue e o local de ação pode não ser proporcional devido a processos cadavéricos não esclarecidos, as concentrações de fármacos no sangue apresentam um valor limitado na determinação da causa de morte. Adicionalmente, a interpretação das concentrações no sangue pode se apresentar prejudicada devido ao fenômeno de redistribuição *post mortem* ser mais pronunciado nesta matriz. Desta forma, o tecido encefálico apresenta vantagens em relação a outras amostras quando o fármaco de interesse é um psicoativo, constituindo uma matriz que se encontra em compartimento isolado demorando, de forma geral, maior tempo para sofrer os processos putrefativos e apresenta menor atividade enzimática favorecendo a estabilidade dos fármacos de abuso. Adicionalmente, as concentrações determinadas nesta matriz apresentam íntima relação com as concentrações *peri mortem* neste sítio de ação (STIMPFL; REICHEL, 2007).

Adotando-se o encéfalo como matriz de escolha para a quantificação de COC, se faz necessário um estudo mais aprofundado em relação à distribuição deste fármaco neste compartimento que se apresenta bastante heterogêneo. Neste sentido, a quantificação em regiões distintas do encéfalo permitiria a avaliação da distribuição nesta matriz, visto que nem sempre os fármacos se distribuem em consonância com os conhecimentos farmacológicos estabelecidos em relação ao sítio de ação. Em estudo recente foram encontradas maiores concentrações pós-mortais de morfina em cerebelo do que em medula oblongata, sendo que esta última apresenta alta densidade de receptores μ -opiídeos, ainda em dois casos foi determinada benzoilecgonina (produto de hidrólise da COC) em concentrações mais altas no cerebelo (STIMPFL; REICHEL, 2007), apesar do tamanho da amostra ter sido pequeno (apenas sete indivíduos) este achado pode ser um indício de que a situação pós-mortal é um universo independente em que os conhecimentos

adquiridos para um modelo vivo, pode não explicar este novo cenário biológico, a morte.

Além da redistribuição *post mortem* outra avaliação pode ser aplicável na interpretação da causa de morte relacionada com substâncias psicoativas, a **neuroquímica *post mortem***. O interesse na interpretação das concentrações pós-mortais de catecolaminas vem aumentando (WILKE et al., 2007; ZHU et al., 2007) pelo fato destes neurotransmissores comporem o principal fator humoral relacionado às respostas ao estresse. Apesar da variabilidade teórica em relação à maneira de morte, às alterações pós-mortais e aos procedimentos médicos hospitalares, estes marcadores bioquímicos podem contribuir para a interpretação dos achados toxicológicos, principalmente no caso de uso de substâncias que interferem em seu metabolismo. Neste sentido, relacionar a presença de COC com as concentrações dos neurotransmissores em tecido cerebral, principalmente a dopamina (DA) e seus metabólitos, ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA), se justifica pelo fato do fármaco ser um potente inibidor da recaptação de DA aumentando sua concentração no sistema nervoso central.

Em síntese, constitui interesse desta investigação o estudo da morte de forma abrangente relacionando-a com a ciência toxicológica forense e, mais especificamente, quando houve envolvimento com o fármaco COC. Para tanto serão abordados temas como tanatologia, ciência jurídica, aspectos toxicológicos e analíticos da COC, neuroquímica *post mortem* e alterações pós-mortais que possam representar ferramentas úteis ou variáveis de confusão na interpretação dos resultados toxicológicos de interesse forense.

2 GENERALIDADES

2.1 Tanatologia médico-legal

A tanatologia médico-legal, do latim *tanathos* (morte) mais *logus* (estudo), é a parte da medicina legal que estuda a morte e suas repercussões na esfera jurídico-social. Geralmente este estudo é realizado através das observações do cadáver, palavra de origem no latim “*caro data vermis*” que quer dizer carne dada aos vermes (FRANÇA, 2001).

A prática da tanatologia médico-legal envolve a realização da autópsia, termo originado do grego composto por *auto* (por si mesmo) e *opsis* (ver), significando exame por si próprio. Este procedimento médico também denominado necropsia, consiste em examinar o cadáver para determinar a causa e modo de morte, além de avaliar qualquer doença ou ferimento que possam contribuir para o esclarecimento da morte. Há três tipos de necropsia: a verificação de óbito, realizada em casos de morte não violenta de pessoas sem acompanhamento médico, geralmente procedida nos Serviços de Verificação de Óbito (SVO); a necropsia hospitalar, realizada por patologistas em pacientes internados que vieram a óbito em decorrência de doenças e, finalmente a necropsia médico-legal ou forense, destinada a identificar o processo de morte em casos de violência ou que se tenha suspeita de que a morte esteja de alguma forma envolvida com ato delituoso.

As mortes de **causas naturais** compreendem os resultados de fenômenos biológicos quase sempre explicados e comprovados pela medicina, enquanto as mortes de **causas violentas** imediatas ou tardias (homicídios, suicídios, acidentes de trânsito, trabalho ou doméstico) estão bem definidas e ordenadas em lei, estando tutelado pelo Estado o corpo do falecido, até que a perícia médico-legal seja realizada. As mortes de **causa suspeita** compreendem parte das mortes violentas, até que se prove o contrário. Para que haja a suspeição deve existir o interesse ativo de quem suspeita, que tem a obrigação de comunicá-la a uma autoridade policial ou ao Ministério Público, os quais solicitarão a perícia médico-legal. As mortes de

causas desconhecidas, mesmo que súbitas, diferem das mortes de causa suspeita por ser um tipo de morte natural, em que as possibilidades de homicídio, suicídio, acidente ou erro médico não são vislumbrados pelos comemorativos do caso, sendo que neste tipo de morte natural a determinação da causa do óbito necessita de uma avaliação necroscópica e anátomo-patológica, porém nunca uma perícia médico-legal (BENFICA et al., 2004).

O termo “forense” é derivado do latim, *forensis*, e significa pertencente ao mercado ou fórum. Na Roma antiga o “fórum” ou lugar de encontro público era o centro onde os casos legais eram tratados e julgados (OGUZ; CEM, 2009).

Na história da jurisprudência turca, o termo “perito médico” foi inicialmente definido por Ceza Kanunname-i Humayun em 1858, constituindo uma lei na qual se definia que o médico deveria, quando questionado, declarar suas considerações sobre um determinado crime. Além dos médicos, enfermeiros e outros profissionais da saúde deveriam tecer considerações sobre crimes quando questionados por um promotor público. Mas em 1879 a lei foi alterada e ficou definido que em casos de assassinato, agressão ou espancamento, o promotor deveria ouvir apenas a opinião de um médico, que seria chamado de perito (*expert*), podendo ser um cirurgião ou um clínico. Neste mesmo ano, o Departamento de Jurisprudência Médica (Zabita Tababet-i Adilye) foi instituído pelo Departamento de Justiça de Istambul e órgãos públicos e privados e, ainda outros profissionais de saúde poderiam ser requisitados a servir à medicina forense, ficando restrito ao médico o procedimento de autópsia (OGUZ; CEM, 2009).

No dias atuais o esclarecimento de crimes conta com o apoio de diversas áreas que praticam as ciências forenses, como a química, a biologia, a bioquímica, a toxicologia, entre outras. Assim, a busca no esclarecimento do fato é multidisciplinar, sendo que nos casos que envolvem a morte, a toxicologia pode fornecer ferramentas valiosas na determinação da causa e/ou maneira do óbito. Para haver o melhor aproveitamento na interpretação dos achados é de suma importância a interação entre a medicina legal e a toxicologia, sendo preferencial que estas duas áreas promovam um intercâmbio do conhecimento a respeito de seus objetos de estudo.

Para se compreender uma determinada intoxicação é necessário avaliar todos os elementos que possam influenciar nos achados toxicológicos e, neste contexto o próprio fenômeno da morte pode gerar variáveis que influenciam na interpretação da presença ou concentração de um determinado fármaco.

A vida é regida por uma organização bioquímica complexa que mantém um equilíbrio biológico e físico-químico, quando a morte se processa ocorre a desorganização bioquímica ficando, o organismo, sujeito a diversos efeitos de ordem física, química e microbiana decorrente do meio ambiente e até do seu próprio meio interno. No entanto, esta desorganização bioquímica não se processa instantaneamente, nem todos os tecidos e células perdem sua vitalidade ao mesmo tempo. Assim, a morte do corpo não é um momento, mas antes um processo que se alonga no tempo no qual não se sabe quando inicia ou quando termina. Apesar de não haver um sinal patognomônico, até surgirem os fenômenos transformativos no cadáver, dentro dos padrões tradicionais, se conceitua a morte como a cessação dos fenômenos vitais, pela parada das funções encefálica, respiratória e circulatória (FRANÇA, 2001).

Para fins jurídico e social é preciso instituir um momento de morte tornando-a cronologicamente útil, desta forma a conceituação jurídica de morte ou também chamada morte clínica, implica que o indivíduo (sujeito de direito e obrigações) deixa de existir como unidade social. Esta definição jurídica implica na necessidade de que o médico fixe um momento que se considera finda a pessoa como ente jurídico, não sendo importante, neste contexto, que naquele organismo existam formas residuais de vida (MARLET, 1987).

O diagnóstico da causa médica da morte é o objetivo principal da necropsia e pode permitir a formulação das hipóteses de homicídio, suicídio ou acidente. O mecanismo de morte já pode orientar para uma determinada causa jurídica, como por exemplo, a esganadura para o homicídio e o enforcamento para o suicídio. No entanto, muitas vezes determinar o mecanismo da morte representa um desafio, portanto o perfil psicológico da vítima também deverá ser analisado com vistas a esclarecimentos de personalidades pré-suicidas, como seu estado emotivo atual e remoto, tratamento psiquiátrico, tentativas anteriores de auto-eliminação, acontecimentos afetivo-emocionais recentes, e consumo de fármacos de abuso

(FRANÇA, 2001). No caso de exposição aos fármacos de abuso, as informações referentes ao perfil psicológico podem direcionar as análises toxicológicas para um grupo específico de fármacos facilitando o processo de investigação.

2.1.2 Fenômenos e intervalo pós-mortal

O intervalo pós-mortal (IPM) definido como o período de tempo decorrido entre a morte do indivíduo e o exame médico-legal do cadáver, é um dado de grande importância em questão forense, por exemplo, se um suspeito é capaz de provar que se encontrava em local diverso quando a injúria fatal ocorreu, então ele possui um álibi e a inocência está implícita. Assim, em Direito Penal a fixação do momento da morte tem especial importância, pois pode ajudar a esclarecer os fatos e apontar autorias (MARLET, 1987).

Com a morte se iniciam os fenômenos biotanatólogicos que compreendem várias mudanças físico-químicas e progridem de forma relativamente ordenada até a desintegração do organismo. Apesar das mudanças terem um fator de tempo, pode haver variações por questões endógenas e ambientais que representam variáveis de confusão na estimativa do IPM, sendo que quanto maior o intervalo menor a precisão de estimativa (FRANÇA, 2001, HENSSGE; MADEA, 2004, VARETTO; CURTO, 2004).

O intervalo mínimo entre a morte e a necropsia será normalmente de 6 horas, pois o Código Processual Penal, em seu artigo 162, estabelece que a autópsia seja realizada pelo menos 6 horas após o óbito, salvo se os peritos, pela evidência dos sinais de morte, julgarem que possa ser feita antes daquele prazo.

Os fenômenos cadavéricos podem ser classificados em abióticos e transformativos, sendo úteis na estimativa do IPM. Os fenômenos abióticos consecutivos ou mediatos são a desidratação cadavérica, o esfriamento cadavérico, as manchas de hipóstase cutânea e a rigidez cadavérica (FRANÇA, 2001).

A desidratação cadavérica causada pela evaporação tegumentar resulta no pergaminhamento da pele, assim a pele se desseca, endurece e torna-se sonora à percussão, tomando um aspecto de pergaminho, a tonalidade adquire tonalidade pardacenta ou parda amarelada com estrias decorrentes de arborizações vasculares que se desenham na derme, este processo se inicia onde a pele é mais delgada como no saco escrotal. Além disso, ocorre o dessecamento das mucosas e dos lábios, sendo mais comum na porção mais externa da mucosa labial, sendo o conhecimento desta característica, muito importante para não se atribuir lesões traumáticas (FRANÇA, 2001).

Especialmente importante nesta investigação são as alterações do globo ocular, considerando que uma das matrizes estudadas na presente tese foi o humor vítreo.

As modificações dos globos oculares decorrentes da desidratação se manifestam por formação de tela viscosa, com aparecimento de um fino véu recobrando a superfície da córnea, perda da tensão do globo ocular que se mostra mole e depressível e o enrugamento da córnea, também chamado de sinal de *Berchut*. A mancha da esclerótica, conhecida por sinal de *Sommer* e *Larcher*, ou *livor sclerotinae nigrescentes* é caracterizada por uma mancha de cor enegrecida localizada no quadrante interno ou externo do olho de forma normalmente circular ou oval que apresenta tendência em se ampliar à medida que se aumenta o IPM, em decorrência da dessecação da esclerótica. Adicionalmente, a córnea, algumas horas depois da morte, perde sua transparência e se torna turva, sendo que após 8 horas da morte pode ocorrer deformação da íris e da pupila caso seja exercida uma pressão digital literalmente no globo ocular (sinal de *Ripault*) (FRANÇA, 2001). O tempo para que essas alterações se instalem dependem de diversos fatores, dentre eles o fato de as pálpebras do cadáver permanecer fechadas ou abertas no período que precede a necrópsia.

Além da desidratação cadavérica, temos o esfriamento cadavérico (*algor mortis*) como uma das principais mudanças pós-mortais. O *algor mortis* representa o decaimento da temperatura corporal constituindo um indicador bastante empregado na estimação do intervalo pós-mortal nas primeiras 24 horas.

A temperatura do cadáver é mensurada via retal, o mais rápido possível concomitantemente à temperatura do ambiente devendo ser considerado que em algumas condições o cadáver não apresenta temperatura considerada normal (entre 36,5 e 37,0 °C) no momento da morte, a mesma pode ser apresentar mais baixa (hipotermia) em casos de hemorragia massiva, falência cardíaca congestiva e choque, ou mais alta (hipertermia) em casos de intoxicações por anfetaminas e derivados, algumas infecções e hemorragia pontina (acidente vascular cerebral) (ALTHAUS; HENSSGE, 1999).

A estimação do intervalo pós-mortal (IPM) pela temperatura corporal foi baseada inicialmente na Lei de Newton de Resfriamento dos Corpos (HENSSGE; MADEA, 2004) a qual postula que quando um corpo de temperatura TC é exposto a um ambiente de temperatura TA, de forma que TC seja diferente de TA, após algum tempo o corpo atingirá o equilíbrio térmico com o ambiente, sendo que a taxa de resfriamento de um corpo depende de fatores como a diferença de temperatura entre o corpo e o meio externo, a superfície do corpo exposta, o calor específico da matéria que o constitui, as condições do ambiente no qual o corpo foi colocado e do tempo em que o mesmo permanece em contato com o ambiente (SIAS, 2008).

Esta Lei pode ser descrita matematicamente pela equação 1:

$$\Delta T/\Delta t = -K (TC - TA) \quad (1)$$

Onde:

$\Delta T/\Delta t$: rapidez de resfriamento do corpo (a variação de temperatura com o tempo)

K: coeficiente de proporcionalidade, que depende da superfície exposta, do calor específico do corpo e é função de características do meio ambiente

TC – TA: diferença entre a temperatura inicial do corpo e a temperatura ambiental

A equação matemática proposta pela Lei de Resfriamento dos Corpos indica que a rapidez de resfriamento será tanto maior quanto maior for a diferença entre **TC** e **TA**. Enquanto a contribuição de **K** depende da superfície exposta (quanto maior a superfície de contato entre o corpo e o meio ambiente maior a rapidez de resfriamento), do calor específico do corpo (quanto maior o valor do calor específico

de um corpo uma maior quantidade de energia será necessária para variar a sua temperatura de um determinado valor) e das características do meio em que está imerso (se está em contato com o ar, que é um bom isolante térmico, mais lento ocorrerão os processos de resfriamento ou aquecimento do que se estiver imerso em água que apresenta maior condutividade térmica, adicionalmente quanto maior a mobilidade do meio em que o corpo está imerso, mais rápida se darão as trocas térmicas entre o objeto e o meio em contato com o mesmo) (SIAS, 2008).

A explicação do *algor mortis* pela Lei de Newton de Resfriamento dos Corpos apresenta limitações, visto que no cadáver o decaimento da temperatura corporal em relação ao tempo é representado por uma curva sigmóide. No início a temperatura é mantida constante por um curto período, entre 0,5 e 5 horas, período chamado de “temperatura *plateau*”, seguido por um decaimento linear, sendo este decaimento mais rápido à medida que a temperatura se aproxima da correspondente ao ambiente. A medição da temperatura na estimação do IPM apresenta maior precisão no período de linearidade da curva sigmóide, adotando que o organismo apresentava uma temperatura normal no momento da morte (HENSSGE; MADEA, 2004).

Considerando as características próprias do resfriamento do cadáver, foram propostos artifícios matemáticos na estimação do IPM como o modelo bi-exponencial de Marchal e Hoare, que adotou dois termos exponenciais combinados, o primeiro para a temperatura pós-mortal *plateau* e o segundo para o resfriamento de Newton após o *plateau*, de acordo com a equação 2 (MARCHAL; HOARE, 1962 *apud* HENSSGE; MADEA, 2004, p. 169):

$$(T - T_U)/(T_0 - T_U) = \dots e^{-Zt} - \dots e^{-pt} = (p/p - Z) \times e^{-Zt} - (Z/Z - p) \times e^{-pt} \quad (2)$$

Onde:

T = temperatura retal (°C)

T₀ = Temperatura retal inicial, fixada em 37,2 °C

T_U = Temperatura do ambiente (°C)

t = intervalo pós-mortal em horas

p = -0,4

$Z = 0,059 - 0,00059 (0,8 A/M)$, sendo A a área de superfície corporal de acordo com DuBois e M o peso corporal

A fórmula de DuBois para a área de superfície corporal (A) é dada pela equação 3 (DUBOIS; DUBOIS, 1916).

$$A = (W^{0,425} \times H^{0,725}) \times 0,007184 \quad (3)$$

Onde:

W=peso em quilogramas

H=altura em centímetros

Simplificando a equação de Marchal e Hoare foi proposta a equação 4 que permite o emprego de um nomograma que permite a leitura do intervalo pós-mortal de forma simplificada (HENSSGE, 1988; ALTHAUS; HENSSGE, 1999).

$$(T - T_U)/(37,2 - T_U) = 1,25^{eZt} - 0,25^{e5Zt} \quad (4)$$

Onde:

T = temperatura retal (°C)

T_U = temperatura do ambiente (°C)

$Z = -1,2815 (f \times M - 0,625) + 0,0284$, sendo f o fator de correção para desvios nas condições de resfriamento padrão e M o peso corporal em quilogramas

t = intervalo pós-mortal em horas

Seja qual for a equação utilizada é necessário o conhecimento da massa corporal do cadáver. Ainda, a aplicação do nomograma de Henssge requer algumas condições como temperatura ambiente amena (não é válido se o corpo foi exposto a calor excessivo), temperatura relativamente constante no período entre a morte e sua mensuração e temperatura fisiológica no momento da morte, não sendo válido em casos de hipotermia e febre severa (HENSSGE, 1988). Adicionalmente, a imprecisão da estimativa do IPM se deve em grande parte ao desconhecimento da

temperatura no momento da morte e à dificuldade de identificação do período de “temperatura *plateau*”. Não menos importantes são os fatores ambientais e cadavéricos que afetam o período linear da curva de resfriamento, como a superfície de contato corporal em relação à sua massa, o movimento e a umidade relativa do ar. No caso da superfície de contato, quanto maior a superfície de contato mais rápido será o resfriamento, portanto os indivíduos obesos apresentam um resfriamento muito mais lento, assim como os indivíduos edemaciados, os quais apresentam um resfriamento mais lento devido ao grande volume de água. Adversamente, as crianças e idosos magros apresentam um resfriamento mais rápido, similarmente aos indivíduos desidratados. Enquanto o movimento do ar e sua umidade relativa influenciam favorecendo o resfriamento de forma diretamente proporcional (HENSSEGE; MADEA, 2004).

O conhecimento das variáveis necessárias à estimação do IPM representa um obstáculo. Por exemplo, a verificação da massa corporal do cadáver não compõe rotina nos serviços técnicos brasileiros, soma-se a isso o fato de os cadáveres serem transportados ao necrotério normalmente em carros sem controle de temperatura podendo ser submetidos ao calor excessivo.

Diante do exposto é possível concluir que a aplicação das equações propostas e do nomograma não constitui tarefa simples, sendo que este esforço pode não compensar os resultados devido às inúmeras variáveis de confusão relacionadas à exatidão do intervalo calculado.

O *livor mortis*, ou manchas de hipóstase cutâneas, também chamadas de manchas de posição ou livores cadavéricos, são encontradas, de preferência, na parte de declive dos cadáveres, variando com a posição do corpo. Elas se apresentam em forma de placas tendo importância no diagnóstico da realidade da morte, do intervalo pós-mortal e para o estudo da posição em que o cadáver permaneceu depois da morte. Estas manchas se formam pelo acúmulo de sangue, sob a ação da gravidade, apresentando coloração violácea, variando apenas nas asfixias por monóxido de carbono, quando se mostram vermelho-róseas ou carminadas ou, ainda de tonalidade marrom-escura quando a morte se deu por envenenamento por agentes metemoglobinizantes. Normalmente começam a aparecer em torno de 2 a 3 horas após a morte sendo que a intensidade varia de

acordo com a fluidez do sangue sendo, por isso, mais realçadas em casos de asfixia. Durante as primeiras 12 horas após a morte, estas manchas podem mudar de posição, para, depois se tornarem fixas, portanto hipóstases fixas indicam IPM maior que 12 horas. É importante notar que nos indivíduos da raça negra (que apresenta a cor da pele negra) os livores não são facilmente visualizados. Além das manchas externas, o *livor mortis* também pode ser visto em alguns órgãos internos sob a denominação de hipóstase visceral e têm as mesmas origens do *livor* cadavérico cutâneo (FRANÇA, 2001).

A última alteração abiótica consecutiva é a rigidez cadavérica ou *rigor mortis*, sendo este sinal provocado por uma alteração química dos músculos, causando o seu enrijecimento e dificuldade de movimentação. Tipicamente o *rigor mortis* ocorre várias horas após a morte clínica, apesar do tempo de início e duração depender da temperatura ambiente. Na média, presumindo-se temperatura amena, começa entre 3 e 4 horas após a morte, com total efeito do rigor em aproximadamente 12 horas e, finalmente o relaxamento em aproximadamente 36 horas (CURTO; VARETTO, 2004) .

A causa bioquímica do *rigor mortis* é a hidrólise de ATP (adenosina trifosfato) no tecido muscular. Com a cessação da circulação sanguínea ocorre o bloqueio do transporte de oxigênio e retirada dos produtos do metabolismo, apesar deste fato os sistemas enzimáticos continuam funcionando durante algum tempo após a morte e a glicólise continua de forma anaeróbia, gerando ácido láctico, que produz a diminuição do pH. Neste momento, actina e miosina se unem formando actomiosina, que contrai fortemente o músculo, esta contração extrema resulta da fadiga muscular tornando os mesmos incapazes de contrair ou relaxar, devido à falta de ATP nas fibras musculares. Os baixos níveis de ATP causam deficiência no transporte de íons Ca^{2+} para o retículo sarcoplasmático, acumulando-se cálcio no sarcoplasma e assim as pontes formadas não podem se desligar. O acúmulo de cálcio no sarcoplasma também se deve à degradação da membrana do retículo sarcoplasmático devido à morte celular. Adicionalmente, como o ATP não é mais produzido, as bombas de regulação iônicas não funcionam mais (bomba de cálcio ATPase) e os músculos permanecem rígidos porque as pontes de actina e miosina não se libertam (VETHARANIAM et al., 2010).

Conseqüentemente aos fenômenos abióticos, surgem os transformativos que podem ser destrutivos, compreendendo a autólise, putrefação e maceração, e conservadores representados pela mumificação, saponificação, calcificação e corificação.

Considerando que os fenômenos transformativos conservadores ocorrem mais tardiamente, não sendo a realidade de nosso estudo no qual foram incluídos indivíduos com IPM menores que 40 horas, focaremos nossa atenção nos fenômenos transformativos destrutivos de autólise e putrefação que podem influenciar na interpretação de nossos resultados.

A autólise é caracterizada por uma série de fenômenos fermentativos anaeróbios que se verifica na intimidade da célula, motivados pelas próprias enzimas celulares. Este processo ocorre sem nenhuma interferência bacteriana, como se a célula estivesse programada para agir assim em determinado momento. Quando cessa a circulação, as células deixam de receber novos elementos prejudicando sua nutrição e resultando em sua acidificação. A córnea, por não dispor de vasos, não sofre a ação inicial da autólise e, por isso pode ser usada para transplante até algumas horas após a morte (FRANÇA, 2001).

A putrefação cadavérica consiste na fermentação da matéria orgânica por ação de diversas bactérias que através de fenômenos bioquímicos decompõe o corpo. O intestino é o ponto de partida da putrefação, assim o aparecimento dos primeiros sinais de putrefação se dá no abdômen, correspondendo à mancha verde abdominal, sendo o primeiro sinal da putrefação surgindo 24 a 36 após o óbito. Além desta região, as bactérias atravessam a barreira gastrointestinal chegando ao sangue e aos vasos linfáticos migrando para outras regiões (ALICOT et al., 2003; FRANÇA, 2001).

A marcha normal da putrefação varia ainda conforme a ação de fatores intrínsecos (idade, *causa mortis*, constituição) e fatores extrínsecos (temperatura, aeração, higroscopia do ar). A putrefação é mais rápida nos recém-nascidos e nas crianças do que nos adultos. Quando mais obeso é o indivíduo, mais rapidamente progride a putrefação (FRANÇA, 2001).

A *causa mortis* e a temperatura têm notável influência na marcha deste processo. As vítimas de graves infecções e grandes mutilações sofrem putrefação

mais rapidamente. O arsênio, os praguicidas, os antibióticos e outros fármacos podem retardar a putrefação. Já a temperatura muito alta ou muito baixa retarda ou interrompe o processo (FRANÇA, 2001).

2.2 Aspectos toxicológicos da cocaína

2.2.1 Propriedades e padrões de uso

A COC é o principal alcalóide do arbusto *Erythroxylon coca* que é encontrado ao leste dos Andes e acima da Bacia Amazônica sendo cultivado em clima tropical em altitudes que variam entre 450 m e 1800 m (FERREIRA; MARTINI, 2001). A pasta de coca, do inglês “coca paste”, é o primeiro produto obtido no processo de extração do alcalóide das folhas de coca. Com o emprego de ácido sulfúrico, sais e querosene é obtido o sulfato de cocaína que se apresenta misturado com grande quantidade de resíduos orgânicos, pigmentos, taninos e outras substâncias químicas. A cocaína básica, do inglês “cocaine base”, é obtida pela dissolução do sulfato de cocaína num ácido, adição de agente oxidante (o permanganato de potássio é o agente oxidante mais utilizado na Colômbia) e de uma base, o precipitado obtido é filtrado (UNODC, 2008). A partir deste composto se obtém o cloridrato de cocaína que é um pó cristalino, obtido através do tratamento da pasta de coca purificada com ácido clorídrico. Em média são necessários aproximadamente 375 kg de folhas secas para obtenção de 1 kg de cloridrato de cocaína com pureza de 100% (UNODC, 2008). Na forma de base livre (COC-base), a COC apresenta baixo ponto de fusão (96°C a 98°C contra os 197°C do cloridrato); volatiliza-se a aproximadamente 90°C quando aquecida (CLARKE, 1978), permitindo que seus vapores sejam inalados no ato de fumar.

No Brasil, a COC era legalmente comercializada até o início do século XX, na forma pura ou fazendo parte de formulações farmacêuticas. A restrição de seu uso

ocorreu em 1921, através do Decreto-Lei 4292, provavelmente decorrente da proibição imposta nos Estados Unidos da América pelo chamado *Harrison Act*, conhecido por Lei Seca (CARLINI et al.,1996). A partir desta época podemos dizer que a COC passou a representar uma real ameaça à sociedade diante da criminalidade relacionada ao seu consumo e comércio.

Atualmente os maiores produtores mundiais de COC são Colômbia (161 mil toneladas, 60% da produção global), Equador (25 mil toneladas), Bolívia (18 mil toneladas) e Peru (14 mil toneladas) (UNODC, 2008). Neste cenário o Brasil representa um país de rota de tráfico, parte da cocaína que segue para a Europa e América do Norte permanece no país abastecendo o mercado ilícito interno, acarretando um grave problema de ordem social, relacionado à criminalidade direta (tráfico e delitos influenciados pelo uso) e indireta (lavagem de dinheiro, corrupção, tráfico de armas).

O que caracteriza o uso de drogas ou fármacos psicoativos é o fato deles, por qualquer que seja o motivo, trazer uma recompensa para o usuário, seja por produzir sensações de prazer, aliviar tensões ou, ainda alterar de uma forma considerada agradável, o humor e a percepção. Devido à recompensa, os efeitos das drogas ou fármacos podem funcionar como reforçadores, ou seja, motivar por si mesmo um comportamento de auto-administração repetida sem a necessidade de outros mecanismos externos de indução (personalidade, psicopatologia preexistente, situação sócio-econômica e pressão dos companheiros de grupo). Este potencial de reforço primário que atua no chamado sistema de recompensa - que apresenta uma distribuição anatômica no sistema nervoso central – aliado ao reforço secundário (neuroadaptação, tolerância metabólica, redução do efeito do fármaco decorrente do uso repetido e meio ambiente que estimula a busca pela sensação prazerosa) determina o potencial de abuso ou potencial para causar a farmacodependência. Adicionalmente, o potencial de abuso é influenciado pela velocidade e a intensidade do reforço (MOREAU, 2008).

Quando focamos a atenção às drogas ilícitas é importante considerar que elas, muitas vezes, não se encontram na forma pura e, neste caso é difícil se inferir todos os seus efeitos. Tanto a COC na forma de sal quanto na forma de base livre podem ser adulterados com várias substâncias para a obtenção da droga

comercializada nas ruas. Dentre os adulterantes mais comumente referidos no cloridrato e sulfato de COC encontram-se os anestésicos locais, principalmente a lidocaína e benzocaína, e os estimulantes, principalmente a cafeína (CARVALHO, 2000; CARTER; BREWER; ANGEL, 2000), e recentemente foi verificado na França que o adulterante de maior ocorrência foi a fenacetina (54%), analgésico não esteroidal, seguida de cafeína (17%) e paracetamol (14%) (EVRARD; LEGLEYE; TAÏROU, 2010).

A COC é consumida de diferentes formas, os ésteres, representados por sais de cloridrato ou sulfato normalmente são consumidos por via intravenosa e intranasal. A administração intranasal é conhecida entre os usuários como prática de “cafungar” e se baseia na disposição dos cristais da droga enfileirados sobre superfície, cada fileira contém cerca de 10 a 30 mg da droga, geralmente o consumo ocorre em grupos, em média de três vezes por reunião e em intervalos de 20 a 30 minutos, tempo que geralmente duram os efeitos relacionados à euforia (CHASIN, 1990).

A forma de consumo pela via respiratória, também chamada de inalatória, tem ganhado popularidade principalmente em grandes cidades. Diversas razões contribuem para este padrão de consumo, dentre elas podemos citar a oferta do mercado ilícito, o rápido efeito no SNC, a simplicidade dos instrumentos utilizados para o consumo e em muitos casos menor custo (CONE, 1998; CARVALHO, 2006; NAPPO et al., 2004). Este padrão de consumo, assim como pela via intravenosa, resulta em sensações de extremo prazer que é denominada *rush* ou *flash*, essas sensações são de intensa euforia, ilusão de onipotência e autoconfiança que duram cerca de 5 minutos (CONE, 1995; KLEERUP et al., 2002; NAPPO, 1996), esta curta duração do efeito leva a ciclos intermitentes de consumo repetido da droga (padrão *binge*) podendo durar dias, isto é explicado pelo fato de o indivíduo experimentar disforia, compulsão e fissura para a nova administração da droga (*craving*). Quando o indivíduo está na fase de *craving* pode se tornar agressivo e utilizar qualquer recurso para obter a droga como roubar, vender seus pertences e dos familiares e prestar favores sexuais (FOLTIN; FISCHMAN, 1997; NAPPO, 1996). Além da fissura, uma gama enorme de outros efeitos pode surgir, dentre eles agitação, disforia, paranóia, delírio e alucinações, sendo que os mesmos se intensificam com

o uso crônico. Destaca-se, dentre esses efeitos, a paranóia, que se caracteriza por um medo terrível de serem descobertos (principalmente pela polícia ou por algum parente), descrevendo o temor de serem apanhados fazendo uso da droga. Ainda sob esse estado persecutório, tornam-se muito desconfiados uns dos outros, chegando freqüentemente a um estado de violência e interpretam qualquer barulho como a chegada de alguém não desejado. Gradualmente os usuários desenvolvem tolerância e necessitam de doses cada vez maiores; por outro lado, apresentam maior freqüência e maior grau de ansiedade, paranóia e depressão com o uso crônico, assim como surgem pensamentos paranóides muito intensos. Essa dualidade de efeitos, que ocorre com o aumento da dose, provoca-lhes um sentimento muito intenso de angústia (INCIARDI, 1993; MILLER; GOLD; MILLMAN, 1989; NAPPO, 1996).

2.2.2 Toxicocinética

O estudo da toxicocinética fornece informações imprescindíveis para o planejamento e interpretação da análise toxicológica. Visto que o conhecimento da via de administração, distribuição e eliminação do fármaco permitem a eleição da matriz biológica, do método analítico e a interpretação do dado gerado.

A disposição do fármaco e seus metabólitos no local de ação é influenciada por diversos fatores, como a extensão de ligação com proteínas plasmáticas, grau de ionização e capacidade de atravessar membranas para alcançar diferentes compartimentos do organismo (CONE, 1998).

Absorção

A COC normalmente é administrada pelas vias intravenosa, intranasal e respiratória, a velocidade de absorção e a máxima concentração plasmática atingida são dependentes das vias de introdução pelas quais ocorre a auto-administração da droga. Considerando o pico máximo de concentração plasmática, a via respiratória é

comparável à via intravenosa oferecendo o meio mais rápido de penetração do fármaco no compartimento central através da absorção pelos alvéolos pulmonares e levando cerca de 8 segundos para produzir seus efeitos. Esse tempo contrasta com as outras vias que, em média, levam 3 a 5 minutos no caso da via intravenosa e de 10 a 15 minutos para a via intranasal (SCHWARTZ; LUXENBERG; HOFFMAN, 1991). Apesar da diferença no tempo para iniciar os efeitos, as vias intravenosa e respiratória apresentam padrões cinéticos similares. A duração dos efeitos é considerada curta para as duas vias, sendo consideravelmente maior na via intranasal (CONE, 1998).

Diferentes substâncias podem ser absorvidas na auto-administração, isto porque, a droga pode se apresentar adulterada por uma ampla gama de componentes. No caso da via respiratória o indivíduo, além dos adulterantes normalmente adicionados para aumentar o volume da droga (amidos, pó de mármore, etc.), também absorve solventes orgânicos, no caso da pasta base, e o produto de queima da COC, denominado éster metilanidroecgonina, pelo fato de esta ser submetida a altas temperaturas no ato de fumar. Neste caso, a disponibilidade química da COC, que em média é de 70%, depende de vários fatores, dentre eles, a temperatura empregada para vaporização, o recipiente onde a droga é aquecida, além da efetividade da tragada que depende da experiência do usuário (CONE; HILLSGROVE; DARWIN, 1994; CONE, 1995; JACOB et al., 1990; KINTZ et al., 1995; NAKAHARA; ISHIGAMI, 1991; NEUDORFL et al., 1997; SHIMOMURA; HODGE; PAUL, 2001).

Na via intranasal, a biodisponibilidade referida varia entre 49 a 94% apresentando absorção de baixa velocidade, e os teores plasmáticos, apesar de menores, são mantidos por período mais prolongado em razão da velocidade mais lenta de absorção. A concentração plasmática de pico ocorre, em média, após 30 minutos e está condicionada às diferenças na efetividade da técnica de aspiração (deglutição parcial da dose) e às características individuais do usuário. Doses de aproximadamente 0,4 mg/kg de peso corpóreo, aproximadamente 30 a 40 mg, são associadas a pico de concentração plasmática de 50 ng/mL, enquanto que aquelas correspondentes a 1-2 mg/kg estão associadas a 100-200 ng/mL (BARNETT; HAWKS; RESNICK, 1981; CONE, 1995; CONE, 1998).

Distribuição

A COC se liga às proteínas plasmáticas demonstrando alta afinidade pela α -glicoproteína ácida e baixa pela albumina, apresenta velocidade de distribuição relativamente rápida. A fração livre situa-se entre 67 e 68% da quantidade absorvida, na faixa de concentração de 300 a 1500 ng/mL e, embora independa da concentração, varia com a mudança de pH (77 a 49%, respectivamente em pH sanguíneo 7,0 e 7,8) (CHASIN; SILVA; CARVALHO, 2008).

Escobedo et al. (1991) referem que as concentrações de COC em sangue, no caso de overdose, são mais baixas quando esta foi consequência da utilização por via respiratória (base livre) em relação às outras vias (ésteres como cloridrato ou sulfato). Comparando este dado, Chasin (1996) determinou a média de concentração de COC em sangue levando em consideração o histórico para o uso na forma de base livre, seus resultados mostraram que a média de concentração de COC foi menor no grupo em que houve relato de uso por via respiratória (CHASIN, 1996; ESCOBEDO et al., 1991).

A partir do compartimento central, a COC é rapidamente distribuída para o sistema nervoso central (SNC) atingindo máxima captação na região do estriato, que possui alta densidade de transportadores de dopamina, com meia-vida biológica de 20 minutos, sendo também captada pelo cerebelo, região desprovida de receptores de dopamina. Adicionalmente, a norcocaína também é rapidamente captada pelo tecido encefálico apresentando depuração mais lenta provavelmente devido à maior lipossolubilidade (o coeficiente de partição octanol-água da norcocaína e da cocaína são 18,5 e 7,6, respectivamente). Além do SNC, foi observada a distribuição para órgãos periféricos com velocidades em ordem decrescente para coração, rins, glândulas adrenais e fígado (FOWLER et al., 2001).

Eliminação

A eliminação da cocaína (COC), também conhecida quimicamente como éster metilbenzoilecgonina, é predominantemente controlada pela sua biotransformação que, devido às características da molécula, é muito extensa, sendo apenas pequenas quantidades excretadas inalteradas na urina. Assim, a biotransformação

origina vários metabólitos, principalmente a benzoilecgonina (BE), cerca de 45%, e o éster metilecgonina, cerca de 40%, sendo produzidos em menor porcentagem norcocaína, ecgonina, benzoilnorcocaína e n-hidroxinorcocaína (METS et al., 1999).

A BE é originada através da hidrólise espontânea ou por reação catalisada pelas carboxilesterases (EC.3.1.1.1) (BRZEZINSKI et al., 1994) Enquanto o éster metilecgonina resulta da hidrólise do grupo benzoato da COC e ocorre por ação da butirilcolinesterase, (EC.3.1.1.8), também chamada de pseudocolinesterase (CARMONA et al., 1996; HOFFMAN et al., 1992).

Apesar da biotransformação da COC ocorrer em maior extensão no sangue, o fígado também apresenta papel importante na formação da norcocaína formada por N-demetilação oxidativa, através de enzimas específicas, presentes no complexo citocromo P-450. Este produto de biotransformação é uma hepatotóxina e também é distribuído para o cérebro, sendo farmacologicamente ativo (METS et al., 1999).

Quando a COC é administrada juntamente com etanol, é formado um produto de transesterificação, pela ação de carboxilesterases, denominado cocaetileno, etilcocaína ou éster etilbenzoilecgonina, que pode ser empregado como marcador de uso de COC concomitantemente ao etanol. Esta molécula apresenta ação farmacológica comparável à da COC, sendo mais apolar e, portanto permanece mais tempo no organismo (BRZEZINSKI et al., 1994; CHASIN, 1996). Estudo *in vitro* demonstrou que a formação do cocaetileno e a hidrólise da COC à benzoilecgonina (BE) ocorrem concomitantemente pela ação da mesma enzima, no entanto em altas concentrações de etanol (100mM) a velocidade de transesterificação é maior que a hidrólise (3,5 vezes mais rápido) (BRZEZINSKI et al., 1994).

No caso de uso da cocaína por via inalatória, haverá a absorção do produto de combustão, éster metilanidroecgonina, que pode ser empregado como marcador da via de introdução. A metabolização do éster metilanidroecgonina segue vias semelhantes ao demonstrado para COC, sendo hidrolisado a anidroecgonina devido à butirilcolinesterase e processos não enzimáticos. Pode sofrer N-oxidação e formar éster metilanidroecgonina-N-óxido e N-desmetilação para formar éster metilnoranidroecgonina. Semelhante à formação do cocaetileno, o éster metilanidroecgonina sofre etiltransesterificação, em presença de etanol, formando éster etilanidroecgonina (FANDIÑO; TOENNES; KAUERT, 2002), este pode ser

hidrolisado resultando no éster etilecgonina (JENKINS; GOLDBERGER, 1997). O éster etilanhidroecgonina permite estimar o consumo por via respiratória concomitante ao etanol (FANDIÑO; TOENNES; KAUERT, 2002; MYERS et al., 2005; PAUL et al., 2005). Apesar do metabolismo do éster metilanhidroecgonina ainda não estar bem esclarecido, é possível prever a extensão de sua biotransformação em cada compartimento, considerando a atividade enzimática que é maior no sangue e no fígado (FANDIÑO; TOENNES; KAUERT, 2002).

As reações de biotransformação da COC e do éster metilanhidroecgonina estão ilustradas nas Figuras 1 e 2, onde se podem visualizar as transformações moleculares citadas.

A meia-vida plasmática de eliminação da COC, considerando modelo bicompartimental, situa-se entre 2,7 e 7,3 horas para a via intranasal, e entre 2,7 – 6,3 horas e 2,4 – 5,8 minutos para a via respiratória e intravenosa, respectivamente (CONE, 1998).

A COC apresenta valores de volume de distribuição aparente situados entre 1,2 e 1,9 L/kg (BARNETT; HANKS; RESNICK, 1981) indicando que é passível de acumular em certos tecidos. De fato, estudo procedido em amostra proveniente de cadáver mostra concentrações muito maiores no encéfalo e no fígado em comparação com o sangue (TAKEKAWA, 2005). Adicionalmente, foi observado em tecido cerebral de ratos que a hidrólise enzimática da COC corresponde a $1,3 \pm 0,12\%$ em comparação com o sangue (GAO et al., 2008).

Figura 1 - Produtos de biotransformação, combustão e transesterificação da cocaína (PETERSON et al., 1995; PAUL et al., 2005)

Figura 2 - Produtos de biotransformação e transesterificação do éster metilanidroecgonina (FANDIÑO; TOENNES; KAUERT, 2002)

2.2.3 Toxicodinâmica e efeitos tóxicos

A cocaína (COC) é um potente estimulante do sistema nervoso central (SNC) que se liga aos transportadores de dopamina (DA), noradrenalina e serotonina (5-HT). O comportamento característico observado nos usuários, promovido por sensações de estímulo e euforia, em geral é atribuído ao bloqueio dos transportadores de dopamina (TDA) que resulta na elevação da concentração extracelular de DA na região do *nucleus accumbens* no núcleo da base, estando este mecanismo relacionado ao potencial de abuso deste fármaco (CARBONI et al., 2001; HOWS et al., 2004; RITZ et al., 1987). Foi verificado em estudo realizado *in vivo*, pela introdução de eletrodos em cérebro de ratos, o aumento da concentração de DA extracelular no *nucleus accumbens* 20 segundos após a infusão de COC com dose de 0,3 mg/kg, resultante da inibição dos TDA. Adicionalmente, a COC promoveu a acidez do tecido decorrente de sua propriedade vasoconstritora que diminuiu o fluxo sanguíneo e, conseqüentemente a remoção de CO₂ (HEIEN et al., 2005).

Aproximadamente 75% da DA no encéfalo encontra-se na via nigroestriatal, cujos corpos celulares se situam na substância negra e cujos axônios terminam no corpo estriado. A segunda via importante é a via mesolímbica/mesocortical (corpos celulares do mesencéfalo), cujos feixes se projetam para o sistema límbico (Figura 3). A terceira via é a do sistema túbero-hipofisário, um grupo de neurônios que seguem seu trajeto do núcleo arqueado do hipotálamo para a eminência mediana e a hipófise, cujas secreções são por ele controladas. Há também vários neurônios dopaminérgicos locais no córtex olfatório e bulbo, bem como na retina (CHASIN; SILVA; CARVALHO, 2008).

O acúmulo de DA nos receptores pós-sinápticos D1 e D2 parece ser o mecanismo farmacológico pelo qual ocorre a euforia. A conseqüência do acúmulo do neurotransmissor é a indução dos receptores pré-sinápticos decorrentes do mecanismo de auto-regulação e subsequente depleção do neurotransmissor. Da mesma forma, a estimulação adrenérgica parece ocorrer pelo mesmo mecanismo, sendo que no uso crônico, tanto noradrenalina quanto DA se tornam

significativamente reduzidas no cérebro. A diminuição da DA cerebral pode resultar em anormalidade das vias dopaminérgicas, levando a complicações psiquiátricas (CHASIN; SILVA; CARVALHO, 2008).

Várias regiões encefálicas apresentam sítios de ligação de cocaína (COC), mas quando classificado em termos de densidade de sítios de ligação o grupo formado por *putamen*, núcleo *accumbens* e caudato, apresenta maior densidade, seguido pelo grupo formado por tálamo, *precuneus*, giro cingulado posterior, amígdala, hipocampo e lobo temporal, com densidade moderada, sendo o terceiro grupo representado por córtex orbital, giro pré-central e cerebelo, com baixa densidade (FOWLER et al., 2001).

Figura 3 - Ilustração das vias dopaminérgicas no encéfalo
Fonte: CNSfórum.com. Nota: figura modificada

A rápida distribuição da COC para o tecido cardíaco parece estar relacionada com o efeito cardiotóxico (FOWLER et al., 2001). Infere-se que há um sinergismo da ação simpatomimética (inibição da recaptação de catecolaminas) e anestésica (bloqueio dos canais de sódio). A inibição do influxo de sódio nas células cardíacas prejudica a condução do impulso nervoso, criando substrato ideal para a ação da noradrenalina de gerar taquicardia e eventualmente fibrilação ventricular. Essa ação adrenérgica é corroborada pela estimulação central do hipotálamo e medula que, além da taquicardia, originam constrição vascular periférica e subsequente elevação da pressão arterial e velocidade do pulso verificado na intoxicação por COC (CHASIN; SILVA; CARVALHO, 2008). Adicionalmente, estudos demonstram que a COC inibe competitivamente os receptores muscarínicos M_2 no tecido cardíaco e cerebral, indicando que esta ação anticolinérgica tenha importante papel na cardiotoxicidade (FLYNN; VAISHNAV; MASH, 1992; MIAO; QUI; MORGAN, 1996; SHARKEY et al., 1988; SHANNON et al., 1993).

Além da ação adrenérgica, é referida a diminuição da produção de óxido nítrico (substância envolvida na vasodilatação) nas células endoteliais da artéria coronária, este mecanismo está envolvido com a mobilização de cálcio e com os níveis da proteína óxido nítrico sintetase (eNOS), sendo que cronicamente a cocaína foi capaz de diminuir a expressão desta proteína. Este efeito toxicodinâmico está relacionado com o vasoespasma coronário de forma aguda e a diminuição dos níveis de eNOS (*down-regulation*), com a progressão das patologias da artéria coronária (HE; YANG; ZHANG, 2005).

Os efeitos da cocaína no SNC são dose-dependentes, baixas doses aumentam a estimulação e a atividade motora, doses moderadas causam o aumento do débito cardíaco; a hipertensão é resultado do aumento da resistência periférica (devido à vasoconstrição) e do aumento do débito cardíaco; ocorre também hipertermia. O efeito cardiovascular da COC baseia-se na ação simpatomimética, a artéria coronária torna-se mais sensível às substâncias vasoativas, com isto ocorre vasoconstrição e diminui o fluxo sangüíneo na coronária, podendo ocorrer arritmia ventricular, isquemia e infarto agudo do miocárdio (HE; YANG; ZHANG, 2005; KIYATKIN; BROWN, 2005; VONGPATANASIN et al., 1999).

Quando se aborda a via de administração respiratória da COC (fumada), é necessário considerar seu produto de queima, o éster metilanidroecgonina. Ainda pouco se conhece em relação à sua toxicodinâmica, mas foi proposto que apresenta efeito colinérgico no sistema nervoso periférico (SCHEIDWEILER et al., 2000), sendo observados hipotensão e efeito inotrópico negativo em miocárdio ventricular, decorrente da estimulação dos receptores muscarínicos ocorrendo, neste caso, a inibição da disponibilidade de cálcio durante o processo de excitação-contração, sugerindo que os efeitos cardiotóxicos da COC combinados com os efeitos do éster metilanidroecgonina, no caso da cocaína fumada, levam à complicação cardiopulmonar aguda mais intensa do que outras vias de administração (ERZOUKI et al., 1995).

Em indivíduos com polimorfismo genético, sensíveis à succinilcolina, a atividade da butirilcolinesterase plasmática é muito menor, o mesmo ocorrendo em fetos, crianças, idosos, gestantes e pessoas com doenças hepáticas ou que sofreram infarto do miocárdio. Potencialmente o efeito do fármaco poderá estar aumentado nessas populações (CARMONA et al., 1996; HOFFMAN et al., 1992). Adicionalmente a atividade enzimática vem sendo estudada como uma alternativa no tratamento da intoxicação da COC (CARMONA, 1999).

2.2.4 Redistribuição *post mortem* da cocaína

A redistribuição *post mortem* (RPM) se refere ao movimento do fármaco após a morte. Isto envolve a redistribuição do fármaco do sangue para os órgãos sólidos como pulmão, fígado e miocárdio (LEIKIN; WATSON, 2003; YAREMA; BECKER, 2005).

As concentrações dos fármacos nos compartimentos corporais variam de acordo com o intervalo pós-mortal (IPM) e com os fenômenos ocorridos em cada matriz biológica. Os fármacos básicos lipofílicos com grande volume de distribuição são particularmente suscetíveis à RPM (ALICOT et al., 2003; WATSON;

MACKINNEY, 2001). No entanto, os mecanismos de redistribuição ainda carecem de muitos estudos, visto o cenário obscuro e multivariado que é o fenômeno de morte.

Em toxicologia forense a severidade ou letalidade proveniente de intoxicação é geralmente avaliada de acordo com a concentração do xenobiótico no sangue, esta concentração é comparada com as concentrações terapêutica, tóxica ou letal referidas na literatura e com a farmacocinética em modelo vivo, no entanto esta mesma avaliação geralmente não é possível em caso de amostras provenientes de cadáveres.

A transferência passiva aos compartimentos como trato gastrointestinal, fígado, pulmões e miocárdio pode ocorrer imediatamente após a morte e mais tarde devido à autólise das células e ao processo de putrefação (ALICOT et al., 2003).

Sendo a respiração aeróbia das células interrompida ocorre perda na síntese de ATP por mecanismo aeróbio induzindo a taxa de glicólise anaeróbia para prover energia às células. O glicogênio é rapidamente depletado e este processo anaeróbio resulta na acumulação de ácido láctico e fosfatos inorgânicos que reduzem o pH intracelular e, provavelmente neste estágio ocorre indução e aumento na acumulação de drogas básicas para as células (ALICOT et al., 2003).

A segunda consequência na perda da produção de ATP e da atividade da ATPase é a falha na bomba de sódio energia-dependente resultando em acúmulo de sódio intracelular e difusão de potássio para fora da célula. Ocorre então edema celular devido à dilatação do retículo endoplasmático e os ribossomos são liberados deste compartimento, a matriz mitocondrial é destruída e a membrana lisossomal é rompida liberando enzimas para o citoplasma. Os componentes celulares são progressivamente degradados. A membrana é rompida e os componentes celulares são liberados para o espaço extracelular, sendo que o tempo para rompimento da célula depende do órgão envolvido. No miocárdio este processo ocorre 30 a 40 minutos após a isquemia, no fígado após 1 a 2 horas e no cérebro após 3 a 5 minutos (YAREMA; BECKER, 2005). Os fármacos básicos lipofílicos que se encontram em altas concentrações nas células são redistribuídos neste estágio para o espaço extracelular transferindo-se para o compartimento sanguíneo, enquanto fármacos ácidos e neutros são pouco afetados (ALICOT et al., 2003).

O movimento do sangue nas veias imediatamente após a morte é responsável pela redistribuição física dos fármacos entre os diferentes compartimentos vasculares. O *rigor mortis* que ocorre nas primeiras 24 horas após a morte induz contrações sistólica ventricular com pequeno movimento do sangue cardíaco para a veia cava superior e veias associadas. Com o aumento da pressão intra-abdominal ocorre refluxo de sangue da aorta abdominal para a aorta torácica, a partir da veia cava inferior para o átrio direito e da veia cava superior e das câmaras cardíacas esquerdas para as veias pulmonares. Mais tarde, com o processo putrefativo, os gases formados distendem as paredes abdominais e o diafragma induzindo o refluxo de sangue nas veias periféricas (ALICOT et al., 2003).

Considerando a RPM da COC, a diminuição do pH dos tecidos para valores abaixo de 7,0, poderia indicar que este fármaco seria mais estável em corpos putrefeitos devido às condições de acidez. Em contraste, é esperada queda na concentração sanguínea de COC após a morte devido à atividade residual da colinesterase. O tecido de escolha para determinação de COC seria o cérebro por ter maiores concentrações do fármaco devido à rápida distribuição para este tecido (MORIYA; HASHIMOTO, 1996).

In vivo, os pulmões recebem a entrada de fluxo sanguíneo do ventrículo direito e acumulam vários fármacos, principalmente bases lipofílicas com valor de pKa acima de 8 (o valor de pKa da cocaína é 8,6). A RPM a partir dos pulmões inicia nas primeiras duas horas após a morte causando o aumento da concentração de fármacos na câmara cardíaca e na circulação torácica. Já a RPM dos pulmões para o fígado ocorre através do diafragma que é a separação anatômica entre o tórax e as cavidades abdominais. A difusão nesta barreira é a única fonte da redistribuição, portanto são esperadas altas concentrações de fármacos nas partes do fígado que estão em contato com o diafragma. Além disso, o fígado também é o alvo da redistribuição a partir do estômago. Grande parte da superfície inferior do lobo hepático esquerdo está em contato com o estômago, o piloro e o duodeno proximal, assim os xenobióticos administrados por via oral restantes no momento do óbito pode entrar no parênquima hepático por difusão passiva ou através da veia portal (ALICOT et al., 2003).

A COC é mais estável em fluido cérebro-espinhal, ajustado pH 5,0 e adicionado de fluoreto de sódio (2% m/v) devido à baixa atividade enzimática em relação ao sangue (WARNER; NORMAN, 2000).

A concentração de COC e seus produtos de hidrólise presentes no humor vítreo e sangue femoral apresentam alta correlação, isto também é observado entre humor vítreo e sangue cardíaco e entre sangue cardíaco e sangue femoral. No entanto, as concentrações de COC e seus produtos de hidrólise presentes em urina e outras matrizes (sangue cardíaco, humor vítreo e sangue femoral) apresentam baixa correlação (DUEK; SPITZ; MACFARLAND, 2006).

As concentrações de cocaína e benzoilecgonina em matrizes cadavéricas descritas na literatura são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Concentrações de cocaína e benzoilecgonina em matrizes biológicas cadavéricas

Matriz biológica									
Referência	Sangue [µg/mL]		Humor vítreo [µg/mL]		Encéfalo [µg/g]		Urina [µg/mL]		Casuística
	COC	BE	COC	BE	COC	BE	COC	BE	
Peretti et al., 1990	330,00	50,00	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1
Patel, 1996	104,00	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1
Jenkins et al., 1999	0,03-3,40	0,024-9,10	NA	NA	NA	NA	0,04-150,00	0,37-330,00	13
Shimomura et al., 2001	0,00-0,01	0,03-2,07	NA	NA	0,00-1,40	0,05-5,15	0,04-28,06	0,92-116,43	15
Fineschi et al., 2002	98,10	86,10	NA	NA	99,10	86,10	10,00	3,30	1
Lewis et al., 2003	0,00 - 0,05	0,15-0,85	NA	NA	NA	NA	0,35-1,03	6,03-41,66	5
Darke et al., 2005	0,01-8,00	0,00-20,00	NA	NA	NA	NA	NA	NA	146
Paul et al., 2005	0,00-0,23	0,09-2,61	NA	NA	NA	NA	0,02-8,34	0,13-116,43	15
Takekawa, 2005	19,40	28,50	NA	NA	41,10	5,80	81,50	487,00	1
García-Repetto et al., 2008	0,02 - 7,24	0,01-140,40	NA	NA	NA	NA	NA	NA	76
Mash et al., 2009	2,56 - 4,04	3,53 - 4,47	NA	NA	3,76 - 5,24	1,07 - 1,35	NA	NA	100
Lucena et al., 2010	0,00-2,23	0,00-118,28	NA	NA	NA	NA	0,00-101,19	0,00-497,82	21

Legenda: COC=cocaína; BE=benzoilecgonina

Nota: as concentrações se referem à faixa determinada se casuística > 1

2.3 Neuroquímica *post mortem*

A transmissão de informação no sistema nervoso central (SNC) ocorre em regiões anatômicas denominadas sinapses que apresentam como principal característica a condução unidirecional dos sinais. As sinapses conduzem os sinais através de substâncias químicas, denominadas neurotransmissores. No neurônio pré-sináptico o neurotransmissor transmite o sinal ao neurônio pós-sináptico atuando em proteínas receptoras presentes em sua membrana. Dentre os neurotransmissores, a dopamina (DA), a serotonina (5-HT), a adrenalina e a noradrenalina, são classificadas como aminas biogênicas (GUYTON; HALL, 1998).

A DA, também denominada 3-dihidroxitiramina ou 3,4-dihidroxifenetilamina, é uma catecolamina metabolizada pelas enzimas monoaminoxidase e catecol-o-metiltransferase, resultando em ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA). Enquanto a 5-HT, também denominada 5-hidroxitriptamina, é uma indolamina metabolizada pela ação das enzimas monoaminoxidase e aldeído desidrogenase, formando o ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) (RANG; DALE; RITTER, 2001).

As estruturas químicas da DA, 5-HT e respectivos metabólitos são apresentadas da Figura 4.

Figura 4 - Estruturas químicas da dopamina, serotonina e respectivos metabólitos

O interesse na interpretação das concentrações pós-mortais de catecolaminas vem aumentando pelo fato destes neurotransmissores comporem o principal fator humoral relacionado às repostas ao *stress*. No entanto, a interpretação dos achados constitui verdadeiro desafio devido à variabilidade observada em relação à maneira de morte, às alterações pós-mortais e aos procedimentos médico-hospitalares. Apesar da variabilidade teórica relacionada às concentrações de catecolaminas, é necessário um estudo sistemático para estabelecer a aplicabilidade destes marcadores nas investigações pós-mortais.

Na tentativa de estabelecer alguma associação dos neurotransmissores, Zhu et al. (2007) realizaram estudo em 542 amostras de sangue cadavérico central e periférico proveniente de diferentes compartimentos e observaram níveis séricos de catecolaminas muito mais altos em amostras cadavéricas em comparação com os valores de referência clínica (adrenalina: < 0,1 ng/mL; noradrenalina: 0,1-0,45 ng/mL; dopamina: < 0,02 ng/mL), sendo que as concentrações foram acentuadamente mais altas no sangue da câmara cardíaca esquerda. Adicionalmente, foi observada pobre correlação entre as concentrações de adrenalina quando comparados os compartimentos câmara cardíaca esquerda, direita e sangue proveniente da veia subclávia; sangue proveniente da subclávia e veia ilíaca externa e câmara cardíaca esquerda e direita; câmara cardíaca esquerda,

direita e sangue proveniente da veia ilíaca externa, ou seja, quando comparados diferentes compartimentos de coleta do sangue central e periférico. Diferentemente da adrenalina e noradrenalina, as concentrações de dopamina apresentaram boa correlação entre sangue cardíaco e sangue proveniente da veia subclávia. Considerando o procedimento médico-hospitalar as concentrações de dopamina foram acentuadamente mais altas com diferença na média de valores maior que 100 ng/mL, $p < 0,001$). No entanto, foi observada apenas uma leve tendência ao aumento das concentrações em relação ao aumento do intervalo de morte e foi observado decréscimo de adrenalina e dopamina, conforme o aumento da idade em indivíduos que não receberam procedimento médico-hospitalar. Não houve diferença nas concentrações de catecolaminas em relação ao sexo. O fato de as concentrações de catecolaminas em sangue cadavérico se apresentarem acentuadamente mais altas que os valores de referência clínica sugerem um enorme estresse ou avançada desordem neuronal relacionada à morte com processo de agonia (ZHU et al., 2007).

Além de sangue, também é mencionada a utilização de humor vítreo para quantificação de catecolaminas, em estudo recente foi demonstrado que as concentrações de noradrenalina e dopamina foram significativamente diferentes em casos de ressuscitação cardiopulmonar, longo e curto período de agonia, sendo as concentrações decrescentes e proporcionais às três situações (WILKE et al., 2007).

A avaliação do perfil de catecolaminas também pode ser empregada no estudo de um fenômeno que vem sendo referido como *excited delirium*, *excited delirium syndrome* ou em português, *síndrome do delírio excitado*, termo este que vem sendo empregado para descrever uma síndrome caracterizada por delírio, agitação, hipertermia e um comportamento violento que geralmente culmina em uma morte súbita inexplicável. Apesar de não haver causa anatômica de morte em caso de *síndrome do delírio excitado*, foram mencionadas arritmias cardíacas induzidas por catecolaminas, asfixia por força ou posicional ou outros efeitos adversos cardiorrespiratórios causados por uso de armas de choque. Foi demonstrado que as vítimas da *síndrome do delírio excitado* apresentaram estado clínico instável com imediata piora e alto risco de óbito, mesmo em casos de intervenção médica ou quando a coerção física não foi utilizada na abordagem do indivíduo. O termo delírio pode ser definido como uma síndrome, ou grupo de sintomas causados por um

distúrbio de consciência durante o funcionamento normal do cérebro. No delírio hiperativo, ocorre uma mudança de consciência e resposta ao ambiente, que se manifestam como agitação, alucinações, delusões e psicoses (MASH et al., 2009).

A relação entre a *síndrome do delírio excitado* e mortes súbitas envolvidas com cocaína (COC) está baseada na capacidade do fármaco em causar descargas de dopamina no SNC. Como abordado, dentre as monoaminas cerebrais, a dopamina apresenta um papel importante nas propriedades de reforço dos fármacos de abuso e em particular da COC e da anfetamina, estes psicoestimulantes aumentam a concentração extracelular de dopamina por bloquear o transportador de dopamina nos neurônios terminais de dopamina (cocaína) e promovendo a liberação de dopamina intracelular (anfetamina). Em estudo realizado em camundongos geneticamente desprovidos de transportadores de dopamina (DAT-KO) e camundongos geneticamente normais (DAT⁺⁺) foi demonstrado que a COC e a anfetamina aumentaram a concentração de dopamina no núcleo *accumbens* das duas formas genéticas de camundongos. Em contraste com estes psicoestimulantes, GBR 12909, um bloqueador específico do transportador de dopamina, falhou em aumentar as concentrações de dopamina no núcleo *accumbens* em camundongos DAT-KO em doses que foram efetivas em camundongos DAT⁺⁺. O melhor candidato como substrato para os psicoestimulantes que aumentam a dopamina no núcleo *accumbens* de camundongos DAT-KO seria o transportador de noradrenalina, sendo mais eficiente que o transportador de dopamina em aumentar a concentrações de desta catecolamina. De fato, no córtex pré-frontal de ratos, no qual há mais inervações de noradrenalina, a dopamina é depurada do espaço extracelular mais por transportador de noradrenalina do que por transportador de dopamina. Sustentando esta hipótese, foi verificado, no mesmo estudo, que a reboxetina, bloqueador específico de transportador de noradrenalina, aumentou as concentrações de dopamina no núcleo *accumbens* de camundongos DAT-KO, mas não em camundongos DAT⁺⁺, sugerindo que camundongos DAT-KO apresentam uma expressão gênica maior de transportador de noradrenalina como alternativa pela ausência de transportador de dopamina. Adicionalmente, foi verificado que as concentrações de dopamina decorrente da administração de reboxetina não foram estatisticamente diferentes das concentrações decorrentes da

administração de COC (CARBONI et al., 2001). O que foi verificado em camundongos pode indicar uma direção numa possível comparação em humanos, nesta linha de raciocínio, seria possível haver indivíduos com menor expressão gênica de transportador de dopamina e maior expressão de transportador de noradrenalina, sendo este também um local alvo de ação da COC. Ainda em usuários crônicos poderia haver uma alteração em relação à expressão gênica sendo que a COC passaria a liberar mais dopamina por atuar tanto em transportador de dopamina como em transportador de noradrenalina, neste sentido pode existir a possibilidade de que no usuário crônico há maiores concentrações tanto de dopamina como de noradrenalina, assim a morte relacionada com a exposição à cocaína poderia ser causada por uma síndrome catecolaminérgica com concentrações variadas do fármaco dependendo da expressão gênica do indivíduo.

2.4 Aspectos analíticos

2.4.1 Ferramentas analíticas para análise de cocaína e seus metabólitos

A cocaína (COC) e seus metabólitos podem ser mensurados em diferentes matrizes biológicas e por diferentes métodos analíticos.

Considerando os métodos analíticos aplicáveis na identificação e quantificação de COC e metabólitos, a cromatografia gasosa (GC) é uma das mais referidas. Esta técnica está baseada na separação dos analitos de acordo com sua afinidade entre a fase estacionária, coluna capilar, e a fase móvel, um gás inerte. Esta técnica requer que os compostos a serem analisados sejam termooestáveis e voláteis ou volatilizáveis para que possam ser eluídos pela fase móvel e detectados adequadamente. A amostra é introduzida por injetor aquecido (com auxílio de uma micro-seringa), onde é vaporizada e transferida com o auxílio do gás de arraste (fase

móvel) à coluna cromatográfica colocada dentro de um forno pré-aquecido. Os componentes são eluídos e conduzidos ao detector conectado na saída da coluna. O detector emite um sinal elétrico que é registrado graficamente sob a forma de picos, cujas áreas são proporcionais às concentrações dos analitos (PENTEADO; MAGALHÃES; MASINI, 2008). Assim, é possível a análise de compostos mais apolares como a COC, sendo que no caso da benzoilecgonina é necessário realizar uma derivação para torná-la volatilizável, apesar da necessidade de derivação demandar maior trabalho e gerar maior custo de análise, esta técnica vem sendo bastante empregada acoplada a diferentes detectores, como o detector por ionização em chama (FID), detector de nitrogênio e fósforo (NPD) e espectrômetro de massas (MS).

O FID foi descrito em 1958, sendo um detector considerado universal (WcWILLIAM; DEWAR, 1958), apresentando baixo custo, alta robustez que é definida como a habilidade de um método permanecer inalterado mesmo em presença de mudanças sutis nos parâmetros operacionais e ambientais como diferentes analistas, temperatura do ambiente, pH e concentração de fase móvel, materiais de diferentes procedências, temperatura e volume de injeção (CHASIN et al., 1998). Este detector se baseia na combustão de compostos na chama. Os compostos não suscetíveis à combustão, como água, CO₂ e compostos inorgânicos em geral, não apresentam sinal mensurável neste detector (PENTEADO; MAGALHÃES; MASINI, 2008).

O NPD constitui uma modificação do FID, sendo altamente seletivo para compostos orgânicos nitrogenados e fosforados, aplicável a todos os compostos que contenham estes elementos em sua estrutura química. Apresenta melhor limite de detecção instrumental em relação ao FID, sendo que a principal limitação é a curta vida útil da pérola alcalina presente no detector (DE PAULA, 2007).

A espectrometria de massas é a técnica que apresenta melhor detectabilidade (capacidade de detectar baixas concentrações dos analitos), para a maior parte das substâncias, e especificidade. Este equipamento separa íons positivos ou negativos, produzidos a partir de átomos ou moléculas de acordo com a razão massa/carga. Os compostos são ionizados, por uma fonte de íons, perdendo ou ganhando elétrons, fragmentados e acelerados em direção ao analisador de massas, após serem

discriminados chegam ao coletor de íons que pode ser uma fotomultiplicadora que amplificará o sinal permitindo assim sua detecção (SMITH et al., 2007). Esta técnica tem sido aprimorada e bastante empregada na toxicologia forense, assim é possível dispor de equipamentos de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas quadrupolo (GC-QMS), cromatografia gasosa acoplada a dois espectrômetros de massa dispostos em seqüência (GC-MS-MS), cromatografia gasosa acoplado ao espectrômetro de massas do tipo *íon trap* (armadilha de íons) (GC-ITMS), além da cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas do tipo *íon trap* (LC-ITMS) e cromatografia líquida acoplada a dois espectrômetros de massas dispostos em seqüência (LC-MS-MS) (SMITH et al., 2007). Toda esta inovação busca a identificação inequívoca do toxicante, mesmo que em concentrações extremamente baixas e maior exatidão nas quantificações.

O GC-MS, pelas vantagens descritas, vem sendo muito empregado na análise de COC e metabólitos em diferentes matrizes biológicas (BARNETT; HAWKS; RESNICK, 1981; CONE, 1995; FANDIÑO et al., 2002; ISENSCHMID et al., 1992; JACOB et al., 1990; JENKINS; GOLDBERGER, 1997; MARTIN; LUE; BONI, 1989; MYERS et al., 2005; PAUL; MCWHORTER; SMITH, 1999; PAUL et al., 2005; SCHEIDWEILER et al., 2000; SHIMOMURA; HODGE; PAUL, 2001; XIA et al., 2000; YANG et al., 2006; ZHANG; FOLTZ, 1990). Esta técnica é a de eleição para confirmação, independentemente da matriz biológica enfocada, dada sua especificidade e, via de regra, é a de referência, considerada como sendo *padrão ouro* (CHASIN, 2004), devido ao MS que atualmente também vem sendo acoplado à cromatografia líquida. No entanto, o equipamento, assim como sua operação e manutenção representam um alto custo.

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) que se baseia na separação pela afinidade dos analitos entre a coluna preenchida de micro-partículas (fase estacionária) e a o solvente empregado na fase móvel sob alta pressão é uma técnica consagrada para a análise de fármacos e metabólitos apresentando a vantagem de ser adequada a análise de compostos polares (como é o caso do principal metabólito da cocaína, benzoilecgonina,) sem necessidade de derivação e termolábeis, considerando que não é necessária a vaporização dos analitos, sendo estes dissolvidos na fase móvel. Nesta técnica, a preparação da amostra é de suma

importância para a conservação da coluna cromatográfica. Em relação à reprodutibilidade, ela é menos robusta que a cromatografia gasosa, pois variáveis como o pH, viscosidade da fase móvel e outros fatores podem alterar sobremaneira o perfil dos picos cromatográficos dificultando a identificação e quantificação dos analitos. No entanto, quando padronizada, esta técnica é extremamente útil na análise de COC e metabólitos, podendo ser acoplada ao detector de arranjo de diodos (DAD) que identifica a substância por espectroscopia na região do visível (VIS) ou ultravioleta (UV), e ainda pode ser acoplada ao MS.

Devido à possibilidade de identificação da substância através de seu perfil espectral de absorção, escolha de mais de um comprimento de onda (λ) para aquisição dos dados (registro dos picos cromatográficos, sendo os mesmos proporcionais à absorção do analito em determinado λ) e menor custo que o MS, muitos trabalhos referem o emprego de HPLC-DAD para análise de COC e seus metabólitos (BRUNETTO et al., 2005; CLAUWAERT et al., 1996; FERNÁNDEZ et al., 2006; METS et al., 1999).

Outra técnica que vem sendo referida como aplicável nas análises de COC é a eletroforese capilar (CASLAVSKA, ALLEMANN; THORMANN, 1999; CABOVSKA; NORMAN; STALCUP, 2003; DAHLEN; ECKARDSTEIN, 2006; LURIE, 1998; TAGLIARO, 1993). Trata-se de uma técnica de separação baseada no transporte em solução eletrolítica de compostos carregados eletricamente sob a influência de um campo elétrico no qual a separação entre dois solutos ocorre de acordo com diferenças entre as suas mobilidades eletroforéticas, empregando capilares com diâmetros internos extremamente pequenos que permitem melhor dissipação do calor permitindo se obter uma alta eficiência de separação com tempo reduzido de análise (TAVARES, 1996).

É possível empregar diferentes modos de separação em eletroforese capilar, dentre eles a eletroforese capilar de zona, também chamada solução livre e a cromatografia eletrocinética micelar. A primeira consiste no preenchimento do capilar com um eletrólito que promove a ionização dos analitos de interesse permitindo a separação pelas diferenças nas mobilidades efetivas; enquanto o segundo consiste na adição de agentes tensoativos ao eletrólito de corrida permitindo à formação de micelas que atuarão como fase pseudoestacionária; a separação dos analitos na

forma neutra ocorre pela afinidade entre as duas fases, líquida representada pelo eletrólito e pseudoestacionária (TAVARES, 1997).

Seja qual for a técnica selecionada para identificação e quantificação dos analitos, a análise de matrizes biológicas requer um pré-tratamento da amostra devido à sua complexidade, como por exemplo, a presença de proteínas que são incompatíveis com as colunas cromatográficas e também devido às baixas concentrações das substâncias a serem analisadas. Assim, as técnicas de extração e/ou pré-concentração permitem que a análise dos componentes de interesse se torne possível, tendo como meta final a obtenção de uma sub-fração da amostra original enriquecida com substâncias de interesse analítico, de forma que se obtenha uma separação cromatográfica livre de interferentes, com detecção adequada e um tempo razoável de análise (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

As técnicas mais comumente utilizadas para extração e/ou pré-concentração dos analitos presentes na matriz biológica são extração líquido-líquido (LLE), extração em fase sólida (SPE), microextração em fase sólida (SPME), extração com fluido supercrítico e extração com membranas sólidas (diálise e ultrafiltração) ou líquidas (CHEN et al., 2008; QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

Atualmente a SPE é uma das ferramentas mais empregadas para a extração e/ou pré-concentração de analitos presentes em matrizes complexas. Esta técnica emprega adsorventes compactados em cartuchos, normalmente em forma de seringa, e os mecanismos de retenção são idênticos àqueles envolvidos em cromatografia líquida em coluna. Um cartucho típico é formado por um tubo de polipropileno contendo cerca de 50 a 500 mg de adsorvente, com 40-60 μm de tamanho de partícula, fixado no tubo através de dois filtros. Em geral, o procedimento de extração é dividido em cinco etapas: ativação do adsorvente para deixar os sítios ativos disponíveis; condicionamento do adsorvente com solvente adequado para ajustar as forças do solvente de eluição com o solvente da amostra; introdução da amostra, quando ocorre a retenção do analito e, eventualmente de alguns interferentes; limpeza da coluna para retirar os interferentes menos retidos que o analito e, por fim a eluição e coleção do analito (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

Estão disponíveis comercialmente vários adsorventes, dentre eles o carvão ativado, alumina, sílica gel, silicato de magnésio (Florisil), fase quimicamente ligada e polímeros. Os grupos mais freqüentemente empregados como adsorventes à base de sílica quimicamente ligada podem ser divididos em fase reversa (quando o adsorvente é menos polar que o solvente de eluição), fase normal (quando o solvente é menos polar que o adsorvente) e troca iônica (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001). Na análise de cocaína (COC) e benzoilecgonina (BE) é comum o emprego de cartuchos com adsorvente à base de sílica quimicamente ligada a um grupo apolar (C8) e outro de troca catiônica, representado pelo ácido benzenossulfônico, este tipo de adsorvente é indicado pelo fato das moléculas apresentarem grupo amina e polaridades diferentes, o valor de pKa da COC equivale a 8,6 e a BE é uma molécula anfótera, com valores de pKa correspondendo a 2,25 e 11,50. Assim, estes cartuchos são efetivos para reter ambos analitos, não polares e catiônicos. Os analitos são fortemente retidos no adsorvente em pH até 6 pela combinação de forças de Coulomb e interações não polares o que permite uma série de lavagens aquosas e com solventes orgânicos, por exemplo, a lavagem com água e metanol remove contaminantes apolares, polares e aniônicos da matriz (SCHEIDWEILER et al., 2000; SHIMOMURA; HODGE; PAUL, 2001; XIA et al., 2000).

Em se considerando as matrizes biológicas provenientes de cadáveres que podem ser empregadas na mensuração de COC e BE, é possível supor que todas que apresentam a distribuição do fármaco se prestam a esse fim. Desta forma, o sangue representa o primeiro local de distribuição sendo a cinética melhor conhecida, ao menos nos indivíduos vivos, e a urina contém maior quantidade de BE, tanto pela maior hidrossolubilidade do analito quanto por representar matriz de excreção do fármaco. Além dessas matrizes, o humor vítreo representa uma alternativa bastante interessante por se tratar de matriz mais limpa e apresentar concentrações de COC que se correlacionam com as do sangue (MACKEY-BOJACK; KLOSS; APPLE, 2000).

O olho humano é preenchido por um líquido intra-ocular, que mantém suficiente pressão dentro do globo ocular para que este fique distendido. Esse líquido pode ser dividido em duas porções, o humor aquoso, que fica em frente e a

cada lado do cristalino, e o líquido do humor vítreo, que fica entre o cristalino e a retina (Figura 5). O humor aquoso é um líquido que flui livremente, enquanto o humor vítreo, às vezes chamado de corpo vítreo, é uma massa gelatinosa mantida unida por delgada rede fibrilar composta primariamente por moléculas muito alongadas de proteoglicans. Apresenta densidade média de 0,99 g/mL e diversos íons e substâncias, como sódio, potássio, cálcio, cloreto, uréia, creatinina glicose, lactato, etc. As substâncias podem se difundir lentamente no humor vítreo, mas há pouco fluxo de líquido (BALASOORIYA; HIL; WILLIAMS, 1984; GUYTON; HALL, 1998; LIMA, 1996; THIERAUF; MUSSHOF; MADEA, 2009). Apesar de se apresentar como uma matriz de aspecto limpo, normalmente a sua análise requer um pré-tratamento que pode estar baseado em centrifugação, emprego de hialuronidase, banho de ultrassom, filtração ou congelamento (THIERAUF; MUSSHOF; MADEA, 2009).

O volume médio desta matriz em cada globo ocular foi referido como sendo de 2,28 mL (0,5 a 5,0 mL) para cadáveres não putrefeitos e 1,08 mL (0,25 a 3,0 mL) para cadáveres putrefeitos (LIMA, 1996).

O humor vítreo contempla vantagens em relação às outras matrizes, como disponibilidade, menor chance de contaminação decorrente dos fenômenos pós-mortais, boa estabilidade química, facilidade de coleta, facilidade de manuseio, o que faz deste fluido uma amostra biológica privilegiada, mormente para as análises toxicológicas forenses (LIMA, 1996).

Figura 5 - Esquema ilustrando a anatomia do olho com a localização do humor vítreo e o humor aquoso

Fonte: Centro médico da Universidade de Bonn, disponível em www.meb.uni-bonn.de/Cancernet

Nota: figura modificada

O tecido encefálico, por sua vez é uma matriz bastante complexa, apresenta característica lipídica, distribuição de vasos sanguíneos e fibras. No entanto apresenta a vantagem de representar um tecido onde fármacos apolares tendem a se acumular, principalmente no caso de psicoativos, como é o caso da COC.

O processo de extração do tecido deve ser cuidadoso de forma a obter o máximo de recuperação e o mínimo de interferentes. Normalmente se emprega uma etapa de separação dos lipídios e posterior extração, sendo a SPE a mais comumente empregada.

Na análise de COC, a etapa de separação pode ser realizada por precipitação de proteínas com ácidos ou bases, homogeneização com solução tampão (MORA; ARROYO; SÁNCHEZ, 2008) e, ainda lipases para digestão da gordura (MOORE et al., 1992). Considerando estes recursos de separação, a homogeneização com solução tampão demonstrou a melhor relação custo-eficiência (MORA; ARROYO; SÁNCHEZ, 2008).

Após o processo de separação, o homogenato deve ser centrifugado de forma a se obter uma solução aquosa que será submetida à técnica de extração.

2.4.2 Ferramentas analíticas para análise de neurotransmissores

A quantificação dos neurotransmissores e seus metabólitos constitui uma das formas de se avaliar a atividade do SNC. Os métodos empregados nas quantificações são normalmente realizados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector eletroquímico (HPLC-ED), pelo fato dos analitos apresentarem propriedades físico-químicas que permitem a identificação por meio eletroquímico, sendo esta técnica considerada consagrada nas análises de aminas biogênicas (VICKREY, 1983). Este sistema de detecção está baseado na mensuração, por um eletrodo apropriado, da corrente produzida pela oxidação ou redução do soluto após aplicação de um potencial controlado. Os materiais, geralmente empregados como eletrodo, são constituídos de platina, ouro, mercúrio, pasta e fibra de carbono (LURIE; WITTNER, 1983; VICKREY, 1983).

Apesar de o detector eletroquímico requerer que a fase móvel seja livre de oxigênio, haletos e metais, que podem aumentar a corrente de fundo resultando no acréscimo de ruído que piora o limite de detecção instrumental, quando as condições são controladas adequadamente, este detector oferece alta detectabilidade (10^{-12} g/mL), seletividade e baixo custo, sendo indicado às análises de moléculas eletroativas, ou seja, passível de ser eletro-oxidada ou eletro-reduzida. O sinal observado na forma de picos cromatográficos é produzido em decorrência da reação de oxi-redução que gera corrente após as moléculas eletroativas passarem pelo eletrodo, sendo a intensidade do sinal diretamente proporcional à concentração do analito. (LURIE; WITTNER, 1983; VICKREY, 1983).

O potencial aplicado na análise de aminas biogênicas é positivo, sendo que a corrente de fundo é proporcional ao potencial, sendo preferível empregar baixo potencial de forma a melhorar a detectabilidade, sendo que um potencial de 0,65 V gera uma corrente de fundo adequada para detecção de aproximadamente 0,5 ng de aminas biogênicas (FOTI et al., 1987).

A análise de aminas biogênicas pode ser realizada em várias matrizes, como plasma e urina, sendo requerida neste caso a extração e concentração dos analitos

que pode ser realizada por adsorção em alumina (FOTI et al., 1987). No entanto, a matriz mais analisada por HPLC-ED é o tecido encefálico, sendo referida técnica de extração relativamente simples, baseando-se na digestão do tecido com ácido perclórico, após a homogeneização e destruição das células por ultrassom e separação dos analitos por ultra-centrifugação. Diversos trabalhos empregam esta técnica na extração das aminas biogênicas do tecido cerebral, defendendo a efetividade da técnica e do emprego do HPLC-ED nesta aplicação (MARUYAMA; OSHIMA; NAKAJIMA, 1980; NENCIONI et al., 2009; PATTHY; GYENGÉ, 1984; PREDIGER et al., 2006; YIM et al., 2006).

Outras técnicas podem ser utilizadas na quantificação de catecolaminas, dentre elas a eletroforese capilar de zona acoplada ao detector eletroquímico (QIAN et al., 1999), a espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida (CHAN; HO, 2000; HOWS et al., 2004) e à cromatografia gasosa (HOLDINESS et al., 1980; CHANG et al., 1991), neste caso é necessário empregar a derivação das moléculas para torná-las volatilizáveis sem decomposição térmica.

Conforme exposto, várias técnicas estão disponíveis para as análises de catecolaminas sendo que sua eleição dependerá de fatores como concentração dos analitos na matriz, especificidade requerida, reprodutibilidade, disponibilidade técnica e custo.

3 JUSTIFICATIVA

Jenkins e Goldberger (1997) identificaram e quantificaram nove indicadores de uso de cocaína (COC) em amostras de sangue e urina provenientes de cadáveres. As concentrações sanguíneas determinadas não apresentaram relação com a causa da morte. Além disto, a prevalência e as concentrações de éster metilanidroecgonina, cocaetileno, norcocaetileno, norcocaína, norbenzoilecgonina e éster etilecgonina em sangue e urina não foram proporcionais às concentrações de COC, benzoilecgonina e éster metilecgonina (JENKINS; GOLDBERGER, 1997). Esta baixa correlação se apresenta como um obstáculo no estabelecimento da causa de morte.

A determinação da morte relacionada ao uso de COC apresenta dificuldade quando as concentrações do fármaco não são extremamente altas caracterizando a overdose clássica ($\geq 1 \mu\text{g/mL}$), isto pode ser ilustrado pelo caso de um indivíduo jovem que morreu subitamente e que o exame toxicológico apresentou cocaína no sangue apenas em nível de traços; a causa de morte determinada foi necrose causada por contração e colapamento dos vasos cardíacos “*contraction band necrosis*” mediada por catecolaminas que resultou em infarto do miocárdio (PILEGGI et al., 2004). De fato a COC é um eficiente inibidor de transportadores de monoaminas promovendo um quadro de *stress* pelo aumento da concentração de catecolaminas, e situações de *stress* repetidas ou prolongadas podem resultar em vários estados patológicos, como a hipertensão arterial, arritmias cardíacas, infarto do miocárdio e a morte súbita. Neste sentido a determinação das concentrações de catecolaminas pode representar uma ferramenta aplicável no diagnóstico provendo subsídios para a associação da maneira de morte.

Em relação à matriz de eleição para quantificação de COC, como já abordado, o encéfalo pode representar a melhor matriz por apresentar maiores concentrações do fármaco e apresentar menor atividade enzimática demorando maior tempo para biotransformação dos analitos. A Diretriz de Laboratórios de Toxicologia Forense (SOFT/AAFS, 2006) especifica a coleta de 50 gramas de tecido encefálico para as análises toxicológicas, no entanto este tecido apresenta grande

heterogeneidade em relação à constituição, cada região apresenta diferentes características histológicas, portanto é de se supor que o fármaco não estaria uniformemente distribuído no tecido encefálico e, neste sentido, o ideal seria uma amostragem de cada região do encéfalo, ao menos dos locais onde há receptores de recaptação de dopamina, local de atuação do fármaco. A mistura das regiões poderia ser uma amostra representativa, no entanto é necessário considerar que no momento da necropsia a coleta do encéfalo inteiro pode não ser viável, assim como a coleta de todas as regiões. Desta forma, a quantificação do fármaco de interesse em três regiões distintas do encéfalo (córtex frontal, núcleos da base e cerebelo) permitirá a caracterização de sua distribuição e proverá conhecimento para um modelo de coleta.

Na necropsia, a investigação sistemática para determinar a causa e o processo de morte fornece informações valiosas na interpretação de uma dada ocorrência. Em relação às análises bioquímicas, as catecolaminas podem representar bons marcadores para investigar várias respostas estressantes no processo de morte envolvido. Dentre as monoaminas cerebrais, a dopamina (DA) apresenta um papel importante nas propriedades de reforço dos fármacos de abuso e em particular da cocaína, este psicoestimulante aumenta a concentração extracelular de DA por bloquear o transportador de dopamina nos nervos terminais de DA. A cinética da DA envolve sua recaptação através do transportador de dopamina e metabolização por ação da monoaminoxidase e da catecol-o-metiltransferase resultando em ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA), respectivamente (CARBONI et al., 2001).

4 HIPÓTESES

Considerando o local de ação e o mecanismo farmacológico da cocaína duas hipóteses foram formuladas, conforme seguem:

- Existe diferença significativa nas concentrações de cocaína e benzoilecgonina presentes em tecido encefálico correspondente ao córtex frontal, núcleos da base e cerebelo.
- Existe diferença significativa nas concentrações de dopamina e seus metabólitos no tecido cerebral correspondente aos núcleos da base dos cadáveres com amostras biológicas positivas para cocaína.

5 OBJETIVOS E PLANO DE TRABALHO

O objetivo desta investigação foi verificar a distribuição das concentrações de cocaína (COC) e benzoilecgonina (BE) em três segmentos encefálicos, córtex frontal, núcleos da base e cerebelo, no humor vítreo e no sangue. Adicionalmente, foi alvo deste trabalho o estudo da neuroquímica *post mortem* e sua relação com positividade para cocaína.

Para cumprir os objetivos propostos foi adotado o seguinte plano de trabalho:

- Seleção dos cadáveres e coleta das amostras biológicas no Instituto Médico Legal de São Paulo;
- Observação das características e fenômenos cadavéricos;
- Seleção, otimização e validação dos métodos de quantificação de COC e BE em amostras de tecido encefálico, humor vítreo e sangue;
- Quantificação de COC e BE em amostras de tecido encefálico provenientes de três regiões (córtex frontal, núcleos da base e cerebelo), amostras de humor vítreo e sangue;
- Quantificação das catecolaminas e indolaminas em três regiões do cérebro (córtex frontal, córtex próximo aos ventrículos e núcleos da base) por HPLC-ED (método preconizado pelo Laboratório de Farmacologia e Toxicologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo);
- Tratamento estatístico e interpretação dos resultados.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 População de estudo e procedimento de coleta

A população de estudo foi composta por 39 cadáveres sem distinção de gênero, com idades entre 15 e 55 anos e intervalo pós-mortal inferior a 40 horas, com diferentes maneiras de morte, amostrados no período entre abril de 2009 e maio de 2010 no Instituto Médico Legal de São Paulo da Região Centro.

Foram verificadas a compleição corporal, o comprimento, a raça, a presença de hipóstase fixa, rigidez cadavérica e os vestígios de procedimento médico-hospitalar. Além disso, foram anotados os achados necroscópicos, a causa de morte inferida pelo médico legista e todas as informações disponíveis referente ao caso, como depoimento da família, histórico, informações contidas no boletim de ocorrência, entre outras (Apêndice A, formulário de coleta).

Foi adotado como critério de exclusão cadáveres com encéfalos lacerados decorrentes de traumatismo craniano, doadores de córneas e os que foram submetidos à hospitalização por mais de 24 horas. A coleta de humor vítreo foi procedida nos dois olhos, sem diferenciação entre direito e esquerdo, com seringa de 20 mL e agulha de 0,80 mm de diâmetro e 25 mm de comprimento, a agulha foi inserida na esclerótica num ângulo de 45° em relação ao eixo da seringa e o líquido punccionado. As amostras foram transferidas para tubo cônico de polipropileno do tipo *Falcon* com tampa sem conservantes. Após a coleta as câmaras oculares foram preenchidas com água.

A coleta do tecido encefálico foi realizada através de secção transversal, pela abertura da calota craniana com auxílio de serra elétrica e coletados núcleos da base, cerebelo, córtex próximo aos ventrículos e córtex frontal, aproximadamente 50 g de cada segmento (Figuras 6, 7, 8, 9 e 10), as amostras foram acondicionadas em frascos de plásticos sem adição de conservantes.

As amostras de sangue foram coletadas diretamente da câmara cardíaca (sangue central) e/ou da veia femoral ou da subclávia (periférico) e da cavidade

torácica (apenas quando não foi possível a coleta dos outros locais), e acondicionadas em tubo cônico de polipropileno do tipo *Falcon* contendo cerca de 1g de fluoreto de sódio.

As amostras foram transportadas ao laboratório em temperatura de 4,0 °C e armazenadas em temperatura de -20°C.

O cadáver foi mantido em decúbito dorsal desde a chegada no necrotério até o término da necropsia.

Figura 6 - Encéfalo retirado da caixa craniana

Figura 7 - Coleta do córtex frontal

Figura 8 - Coleta do cerebelo

Figura 9 - Coleta do córtex próximo ao ventrículo

Figura 10 - Coleta dos núcleos da base

6.2 Verificação dos fenômenos pós-mortais

O *algor mortis* foi avaliado pela temperatura hepática e esta foi verificada pela introdução de termômetro tipo “espeto”, modelo TE-300, precisão $\pm 1^{\circ}\text{C}$ entre -20 e 120°C , resolução $0,1^{\circ}\text{C}$ entre $-19,9$ e 150°C , marca *Instrutherm*, diretamente no lobo direito do fígado sendo a temperatura mensurada em três tempos, compondo o intervalo de 0, 15 e 30 minutos. Adicionalmente, foram anotados os livores cadavéricos, o intervalo pós-mortal real, quando disponível, ou a estimativa inferida pelo médico legista (Apêndice A, formulário de coleta).

Os valores de temperatura hepática foram empregados na avaliação da possível hipertermia associada à cocaína.

6.3 Avaliação da eletroforese capilar acoplada ao detector de arranjo de diodos como ferramenta analítica na identificação e quantificação da cocaína e benzoilecgonina

No início deste trabalho foram realizados alguns experimentos a fim de se avaliar a possibilidade de emprego da eletroforese capilar acoplada ao detector de arranjo de diodos nesta investigação.

Foram estudados dois modos de separação (eletroforese capilar de zona e cromatografia eletrocínética micelar) nas seguintes condições:

- Equipamento de eletroforese capilar marca Beckman, modelo *PA 800* acoplado ao detector de arranjo de diodos, canais 200 e 230nm, faixa de 190 a 300 nm
- Capilar de sílica fundida de 50 cm (40 cm até o detector) e 50 μm de diâmetro interno, condicionada por lavagem com hidróxido de sódio 1M (30 min), água ultrapurificada (30 min) e eletrólito de corrida (30min). Entre as corridas o capilar foi lavado com eletrólito de corrida durante 5 min.
- Injeção por pressão hidrodinâmica a 0,5 psi por 10 segundos.

Na cromatografia eletrocinética micelar foi testado como eletrólito de corrida a mistura de dodecilsulfato de sódio (SDS), tampão tetraborato de sódio pH 9,2 (TBS) e metanol em diferentes proporções, neste experimento as tensões foram variadas, conforme a Tabela 2. Enquanto, na eletroforese capilar de zona foi testado como eletrólito de corrida tampão fosfato 20mM, pH 2,1 em dois valores de tensão para a separação e com aditivo, conforme Tabela 3.

Tabela 2 - Otimização das condições em cromatografia eletrocinética micelar

Condição	SDS (mM)	TBS (mM)	Metanol (%)	Tensão (kV)
1	30	10	5	15
2	30	10	5	25
3	30	10	20	25

Tabela 3 - Otimização das condições em eletroforese capilar de zona

Condição	Tampão fosfato pH 2,1 (mM)	TEA ¹ (%)	Tensão (kV)
1	20	-	15
2	20	1	30

¹Trietilamina

A eletroforese capilar de zona foi aplicada à amostra de urina referência negativa composta pela mistura de amostras de urina provenientes de sete indivíduos vivos, fumantes e não fumantes e às amostras de urina positivas para cocaína provenientes de cadáveres vítimas de *overdose*, coletadas no Núcleo de Toxicologia Forense do Instituto Médico-Legal de São Paulo e submetidas à extração em fase sólida (colunas de extração de troca catiônica, *Bond Elut Certify LRC*, 130 mg de adsorvente e volume de 10 mL, marca *Varian*).

6.4 Preparação das amostras, identificação e quantificação de cocaína e benzoilecgonina

6.4.1 Equipamentos, materiais e reagentes

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado ao detector de arranjo de diodos, marca *Agilent*, modelo *1100 Series*;
- Coluna cromatográfica C18, 25 cm x 4,6 mm de diâmetro interno e partícula de 5 µm, marca *Shimadzu*, modelo *Shim-pack CLC-ODS (M)*;
- Centrífuga, marca *Eppendorf*, modelo 5804 R;
- Colunas de extração em fase sólida de troca catiônica, *Bond Elut Certify LRC*, 130 mg de adsorvente e volume de 10 mL, marca *Varian*;
- Fita medidora de pH, marca *Merck*;
- Câmara de extração, marca *Varian*, e bomba de vácuo, marca *Fabbe Primar*, modelo 141;
- Metanol, grau HPLC, marca *Tedia*;
- Acetonitrila, grau HPLC, marca *Tedia*;
- Trietilamina, marca *Merck*;
- Ácido orto-fosfórico, 85%, marca *Merck*;
- Diclorometano, grau HPLC, marca *Tedia*;
- Ácido Clorídrico, 0,1 M, grau analítico, marca *Carlo Erba*;
- Hidróxido de Amônio, 14,8 M, grau analítico, marca *Merck*;
- Hidróxido de potássio marca *Producta*;
- Sulfato de Zinco, marca *Synth*;
- Diidrogenofosfato de potássio, KH_2PO_4 , marca *Hoechst* para preparação da solução tampão fosfato de potássio, pH $5,5 \pm 0,5$, 100 mM;
- Fosfato de potássio bibásico, K_2HPO_4 , marca *Química Moderna* para preparação da solução tampão fosfato de potássio, pH 6,00, 50 mM;

- Prilocaina , marca *Henrifarma*, teor 99,55%
- Solução-padrão de cocaína e benzoilecgonina, marca *Cerilliant*, 1 mg/mL
- Soluções de trabalho de prilocaina (padrão interno-PI), 20 µg/mL, benzoilecgonina e cocaína, 10 µg/mL;

Preparação da solução de precipitação de proteínas do sangue: foi preparada uma solução com água deionizada a 5% de sulfato de zinco. Esta solução foi misturada com metanol na proporção de 7:3 v/v.

Preparação da fase móvel: foram pesados 17,418g de fosfato de potássio bibásico e transferidos para balão volumétrico de 2,0 L, se adicionou cerca de 1,5 L de água ultrapura, 10 mL de trietilamina e completado o volume com água. O pH 6,00 foi ajustado com ácido orto-fosfórico.

Preparação da solução tampão fosfato de potássio 100 mM: foram pesados 27,219 g de dihidrogenofosfato de potássio e transferidos para balão volumétrico de 2,0L, se completou o volume com água ultrapura e o pH 5,50 – 6,00 foi ajustado com hidróxido de potássio 1M.

6.4.2 Preparação das amostras

Amostra de humor vítreo referência negativa: a amostra referência negativa foi obtida pela coleta de humor vítreo de porcos misturado com seis amostras negativas de humor vítreo humano para o analito de interesse.

Amostra de tecido encefálico referência negativa: a amostra referência negativa foi obtida pela mistura de três segmentos (córtex frontal, núcleos da base e

cerebelo) de tecidos encefálicos negativos para os analitos de interesse provenientes de seis cadáveres.

Amostra de sangue referência negativa: a amostra referência negativa foi composta pela mistura de sangues coletados de três compartimentos (câmara cardíaca, veia femoral e subclávia) provenientes de seis indivíduos com matrizes biológicas que resultaram negativas para os analitos de interesse.

Amostras de humor vítreo: o pH de cada amostra foi mensurado com fita medidora de pH e centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos. Foram aliquoteados 2 mL, adicionados 300 µL de padrão interno (prilocaína) e 5,0 mL tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 5,50 – 6,00. As amostras foram submetidas à extração em fase sólida (SPE), conforme apresentado na Figura 11.

Amostras de tecido encefálico: foram pesados 5,0 g de tecido, adicionado 1,25 mL de padrão interno (prilocaína) e 20,0 mL de solução tampão fosfato de potássio pH $5,5 \pm 0,5$, 100 mM. As amostras foram homogeneizadas com auxílio de pistilo e por agitação mecânica até dissolução do tecido para obtenção do homogenato. Os homogenatos foram centrifugados por 70 minutos a 4000 rpm em temperatura de 4°C. Os sobrenadantes foram submetidos à extração em fase sólida (SPE), conforme apresentado na Figura 11.

Amostras de sangue: as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos, quando necessária a separação de coágulos. Foram aliquoteados 3 mL, adicionados 450 µL de padrão interno (prilocaína) de forma a se obter concentração de 3 µg/mL, 6 mL de solução de precipitação de proteínas (solução de sulfato de zinco a 5% com metanol, 7:3 v/v) e procedida a agitação em *vórtex* durante 30 segundos. As amostras foram levadas ao banho de ultrassom durante 15 minutos, centrifugadas a 4000 rpm por 15 minutos e os sobrenadantes foram submetidos à extração em fase sólida (SPE), conforme apresentado na Figura 11.

Condições cromatográficas empregadas nas análises de cocaína e benzoilecgonina: a separação em fase reversa foi realizada empregando-se coluna C_{18} e fase móvel composta por tampão fosfato 50 mM com 0,5% de trietilamina, pH 6,0: acetonitrila (80:20 v/v), comprimento de onda de 235 nm, fluxo de 1,0 mL/min e temperatura de 40°C.

Figura 11 - Procedimento de extração de cocaína e benzoilecgonina das amostras de humor vítreo, tecido encefálico e sangue

6.5 Validação dos métodos de quantificação de cocaína e benzoilecgonina nas matrizes biológicas

Na validação dos métodos de quantificação de cocaína e benzoilecgonina em amostras de tecido encefálico e humor vítreo foram avaliados os seguintes parâmetros de segurança: especificidade, linearidade, recuperação, limite de detecção, limite de quantificação e precisão (repetibilidade e reprodutibilidade)

Para a avaliação da recuperação e precisão foram preparadas, para cocaína (COC) e benzoilecgonina (BE), amostras controle (controles de qualidade-QCs). Para tanto, amostras referência negativa de humor vítreo e de tecido encefálico foram adicionadas de BE e COC de forma a se obter concentrações de 0,50, 1,00 e 3,00 µg/mL (humor vítreo) e 0,50, 1,00 e 3,00 µg/g (tecido encefálico), correspondentes aos QC₁ (baixo), QC₂ (médio) e QC₃ (alto), respectivamente.

A recuperação dos analitos em amostras de sangue foi avaliada com auxílio de amostras controle (controles de qualidade-QCs). Os QCs foram preparados com amostras referência negativa adicionadas de BE e COC em concentrações de 0,50, 1,00 e 2,00 µg/mL, correspondentes aos QC₁ (baixo), QC₂ (médio) e QC₃ (alto), respectivamente.

Todos os cálculos utilizados na validação do método foram realizados com o auxílio do Microsoft Excel® do programa Microsoft Office XP Professional® 2007.

6.5.1 Especificidade

A especificidade, parâmetro relacionado com a capacidade do método analítico de medir e diferenciar os analitos de interesse de substâncias endógenas e exógenas que possam estar presentes na matriz (CAUSON, 1997; CHASIN et al., 1998; PETERS; MAURER, 2002, UNODC, 2009), foi avaliada pela análise de um *pool* de seis amostras independentes de tecido encefálico, composto de uma mistura de córtex frontal, núcleos da base e cerebelo, referência negativa.

A especificidade do método na matriz humor vítreo foi avaliada pela análise da mistura de seis amostras de humor vítreo humano, referência negativa para os analitos de interesse acrescentados de humor vítreo de porco.

A especificidade do método na matriz sangue foi avaliada pela análise da mistura de seis amostras independentes de sangue coletadas da câmara cardíaca e da veia femoral e subclávia, referência negativa.

6.5.2 Curvas analíticas de benzoilecgonina e cocaína

Humor Vítreo: o estudo da linearidade foi realizado pela análise de amostras referência negativa adicionadas de solução de trabalho dos analitos de forma a se obter concentrações de 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,50; 3,00 e 5,00 µg/mL para BE e 0,50; 0,75; 1,00; 1,50; 2,00; 2,50; 3,50; 4,00 e 5,00 µg/mL para COC.

Tecido encefálico: o estudo da linearidade foi realizado pela análise de amostras referência negativa adicionadas de solução de trabalho dos analitos de forma a se obter concentrações de 0,50; 1,00; 2,00; 3,00; 4,00 e 5,00 µg/g para ambos analitos (BE e COC).

Sangue: o estudo da linearidade foi realizado pela análise de amostras referência negativa adicionadas de solução de trabalho dos analitos de forma a se obter concentrações de 0,50; 1,00; 2,00; 4,00 e 6,00 µg/mL para BE e 0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 4,00 e 6,00 µg/mL para COC.

As amostras de humor vítreo, tecido encefálico e sangue foram submetidas ao procedimento apresentado no item 6.4.2 “*Preparação das amostras*” e na Figura 11.

As curvas analíticas foram obtidas através da projeção das concentrações dos analitos (µg/mL ou µg/g) no eixo das abscissas e das relações entre as áreas dos analitos e do padrão interno no eixo das ordenadas.

As equações de regressão linear foram estabelecidas pelo método dos mínimos quadrados e utilizadas na quantificação de BE e COC nas amostras selecionadas para o estudo.

A linearidade, definida como a capacidade do método gerar resultados proporcionais da espécie em estudo, foi avaliada pelo coeficiente de determinação- r^2 da curva analítica (CHASIN et al., 1998).

6.5.3 Recuperação

A recuperação do método mede a eficiência da técnica de extração dentro de um limite de variação (CAUSON, 1997; CHASIN et al., 1998).

A recuperação foi mensurada comparando-se a resposta de amostras de controle QC₁, QC₂ e QC₃, descritas no item 6.5, submetidas ao método proposto em duplicata, com a resposta de soluções de trabalho dos analitos, adicionadas aos extratos das amostras referência negativa, admitindo-se para estas 100% de recuperação. Os resultados foram expressos em porcentagem, de acordo com equação:

R = (RAM/RAP) x 100, onde:

R: recuperação

RAM: resposta do analito (padrão) adicionado à matriz antes do processo de extração

RAP: resposta do analito (padrão) adicionado à amostra referência negativa após o processo de extração

6.5.4 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD), definido como a menor concentração de um analito que o procedimento bioanalítico consegue diferenciar com confiança do ruído de fundo (DADGAR et al., 1995) ou, ainda, a menor concentração do analito presente na amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada com exatidão (PETERS; MAURER, 2002), foi determinado através da análise de quatro amostras referência negativa de humor vítreo e tecido encefálico que foram enriquecidas com soluções de trabalho dos analitos em concentrações decrescentes e considerou-se como LD aquele referente à menor concentração na qual foi possível obter picos integrados pelo equipamento que se diferenciaram do ruído, em quatro replicatas, nas condições especificadas e que apresentaram coeficiente de variação-CV $\leq 20\%$.

O limite de quantificação (LQ), definido como a menor concentração para medidas quantitativamente precisas, foi determinado através da análise de quatro amostras referência negativa de humor vítreo e de tecido encefálico enriquecidas com soluções de trabalho dos analitos em concentrações decrescentes e considerou-se como LQ aquele referente à menor concentração que apresentou CV $\leq 15\%$ (CHASIN et al., 1998; DADGAR et al., 1995).

Na impossibilidade de se avaliar o LD e LQ do método aplicado ao sangue, nas mesmas condições empregadas às amostras de tecido encefálico e humor vítreo optamos por considerar como LD a menor concentração na qual foi possível obter picos integrados pelo equipamento que se diferenciaram do ruído (PETERS; MAURER, 2002) e como LQ o valor correspondente a menor concentração (menor ponto) ensaiada na curva analítica.

6.5.5 Precisão

A precisão, avaliada pela imprecisão do método bioanalítico, é uma medida do erro aleatório e é definida como a concordância de resultados obtidos durante as análises de replicatas de amostras. Este parâmetro avalia as proximidades entre várias medidas efetuadas em uma mesma amostra (CAUSON, 1997; UNODC, 2009).

A precisão intra-ensaio ou repetibilidade é definida como a capacidade de repetição da mesma metodologia com o mesmo analista, usando o mesmo equipamento, os mesmos reagentes num curto intervalo de tempo (CAUSON, 1997; UNODC 2009).

A capacidade de repetição da mesma metodologia sob diferentes condições, por exemplo, diferentes analistas, reagentes, equipamentos ou em diferentes ocasiões, é denominada reprodutibilidade ou também chamada precisão interensaio (CAUSON, 1997).

Os ensaios para determinação da repetibilidade e reprodutibilidade foram realizados em amostras de controle (QCs) de 0,5; 1,0 e 3,0 µg/mL (humor vítreo) e de 0,5; 1,0 e 3,0 µg/g (tecido encefálico) em quatro determinações e expressos em termos de imprecisão, sendo esta calculada através do coeficiente de variação (CV).

Este parâmetro não foi avaliado no método aplicado às amostras de sangue

6.6 Determinação da alcoolemia

A dosagem alcoólica em sangue foi realizada por método preconizado pelo Núcleo de Toxicologia Forense do Instituto Médico Legal de São Paulo com extração por *Head Space* e identificação/quantificação em cromatografia gasosa acoplada ao detector por ionização em chama (GC-FID). As amostras foram preparadas adicionando-se em frasco de vidro 1,0 mL de n-propanol 1,6 g/L (padrão interno) e 1,0 mL de sangue. O frasco devidamente lacrado foi submetido ao aquecimento a

70°C durante 10 minutos em equipamento *Head Space* acoplado ao cromatógrafo gasoso equipado com detector por ionização em chama. A separação foi procedida em coluna Porapak Q 6 pés, 0,2 cm de diâmetro interno, temperatura de 200°C, o injetor e detector foram mantidos em temperatura de 220°C, o nitrogênio foi empregado como gás de arraste com fluxo de 60 mL/min.

6.7 Preparação das amostras e quantificação dos neurotransmissores

A análise dos neurotransmissores foi realizada de acordo com método preconizado pelo Laboratório de Farmacologia e Toxicologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, conforme descrição a seguir.

6.7.1 Extração dos neurotransmissores das amostras de tecido cerebral

- Processador ultrassônico (Sonics Vibra Cell), marca Sonics & *Materials INC*, modelo VC130PB;
- Centrífuga, marca Eppendorff, modelo 5804 R;
- Ácido perclórico 70% marca *Fluka*;
- Ácido etilenodiamino tetra-acético-EDTA, marca *Quimibrás*;
- Metabissulfito de sódio, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, marca *Synth*;
- Solução padrão de dihidroxibenzilamina (DHBA), padrão interno, concentração de 139 µg/mL).

Para preparação da solução para precipitação de proteínas foram pesados 200 mg de metabissulfito de sódio e 200 mg de EDTA, adicionados ao balão volumétrico, transferiu-se cerca de 700 mL de água ultrapura e 8,68 mL de ácido

perclórico concentrado, o volume foi completado com água ultrapura para 1,0 L, resultando na concentração de 0,1 M.

Foram transferidos 10 µL de DHBA (padrão interno-PI) para balão volumétrico de 50,0 mL e o volume completado com a solução para precipitação de proteínas (ácido perclórico 0,1 M), a concentração de DHBA nesta solução foi de 27,8 ng/mL.

As amostras de tecido cerebral foram preparadas de acordo com a Figura 12 e os analitos quantificados por HPLC-ED.

Figura 12 - Fluxograma da técnica de preparação do tecido cerebral

6.7.2 Quantificação dos neurotransmissores por HPLC-ED

- Ácido 1-heptanossulfônico, marca *Sigma*;
- Citrato de sódio, marca *Synth* para preparação de tampão citrato 0,02 M;
- Metanol, marca *Tedia*;
- Coluna cromatográfica, C-18, marca, *Shimpak*, modelo *ODS*.
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado ao detector eletroquímico (HPLC-ED), marca *Shimadzu*, modelo *6A*.
- Integrador, marca *Shimadzu*, modelo *6A Chromatopac*.

Condições cromatográficas: separação em fase reversa e fase móvel composta por tampão citrato 0,02M, metanol (92:8 v/v), 0,12 nM EDTA sódico e ácido 1-heptanossulfônico, pH 3,0, modo isocrático, fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20 µL, temperatura de 55°C; o detector foi mantido com um potencial de 0,8V no eletrodo de trabalho.

Limite de detecção igual a 10 ng/g e limite de quantificação igual a 20 ng/g de tecido cerebral para DA, DOPAC, HVA, 5-HT e 5-HIAA.

O equipamento foi padronizado diariamente, no início e ao término do trabalho, com uma solução de trabalho de neurotransmissores, seus metabólitos e PI (DHBA) empregando-se como diluente uma solução de ácido perclórico, 0,1M, contendo EDTA e metabissulfito de sódio (descrita em 6.7.1-solução para precipitação de proteínas).

Abaixo são arroladas as substâncias empregadas na padronização e suas respectivas concentrações:

- Dopamina (3-hidroxitiramina), 30,6 ng/mL.
- Ácido dihidroxifenilacético (DOPAC), 33,6 ng/mL.
- Ácido homovanílico (HVA), 36,4 ng/mL.
- Di-hidroxibenzilamina (DHBA), 27,8 ng/mL.
- 5-hidroxitriptamina (5-HT), 35,2 ng/mL.
- Ácido hidroxindolacético (5-HIAA), 38,2 ng/mL.

6.8 Forma de apresentação e tratamento dos resultados

Para apresentação e interpretação das concentrações de cocaína e benzoilecgonina nas amostras de tecido encefálico, humor vítreo e sangue foram empregadas tabelas, estatística descritiva, testes estatísticos de comparação de médias e testes de correlação.

Para análise dos resultados relacionados à neuroquímica *post mortem* a população de estudo foi dividida em dois grupos, o primeiro composto por cadáveres que apresentaram amostra biológica positiva para COC e o segundo composto por cadáveres que apresentaram amostra biológica negativa para COC. Os resultados foram apresentados com auxílio de tabelas e a interpretação foi feita com auxílio da estatística descritiva e teste estatístico de comparação de médias.

Todos os testes estatísticos foram procedidos com nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$).

7 RESULTADOS

7.1 Caracterização da população

As características da população incluída no estudo (39 indivíduos), amostradas no período compreendido entre abril de 2009 e maio de 2010 são apresentadas na Tabela 4. O histórico se refere às informações contidas no boletim de ocorrência e/ou à observação do médico legista.

O perfil demográfico da população de estudo foi caracterizado como sendo composto em sua maioria por jovens, com idades entre 15 e 24 anos (44%), e do sexo masculino (80%) (Tabela 5). Adicionalmente a maioria pertence à raça branca e apresenta compleição corporal mediana (Tabela 6), sendo estas características predominantes em ambos os gêneros.

Padronizando os históricos para uma classificação mais concisa em relação ao tipo de morte, observamos que dentre os 39 casos incluídos no estudo, o homicídio se situa em primeiro lugar (N=10, 26%), a morte súbita, com ou sem referência ao uso de drogas, em segundo (N=7, 18%), atropelamento em terceiro (N=6, 15%), seguido de suicídio (N=5, 13%) e morte natural (N=5, 13%) (Tabela 7).

Considerando o grupo do gênero feminino (N=8), 3 casos apresentaram histórico de morte súbita (2 relacionados ao uso de drogas), 2 casos de atropelamento, 1 envenenamento por carbamato e em 2 houve referência à morte natural (Tabela 4). Dentre os indivíduos do sexo masculino a maioria apresentou histórico de homicídio, seguido de suicídio e morte súbita, com ou sem referência ao uso de drogas (Tabela 8).

Tabela 4 - Perfil demográfico da população selecionada para o estudo e tipo de morte segundo o histórico

ID	Sexo	Raça	CP	Idade	Histórico
33	M	O	M	28	ACIDENTE-PRECIPITAÇÃO-USO DE DROGAS
1	F	B	M	15	ATROPELAMENTO
5	F	N	M	30	ATROPELAMENTO
15	M	B	F	35	ATROPELAMENTO
16	M	B	M	41	ATROPELAMENTO
20	M	B	F	30	ATROPELAMENTO
34	M	B	M	22	ATROPELAMENTO
31	M	N	F	16	CHOQUE ELÉTRICO
26	F	N	M	30	ENVENENAMENTO-CARBAMATO
4	M	B	M	46	ENVENENAMENTO-CARBAMATO
18	M	B	M	30	HOMICÍDIO-FAB
6	M	B	R	21	HOMICÍDIO-FAF
10	M	B	M	20	HOMICÍDIO-FAF
23	M	B	M	23	HOMICÍDIO-FAF
25	M	B	R	40	HOMICÍDIO-FAF
27	M	N	M	40	HOMICÍDIO-FAF
28	M	B	R	36	HOMICÍDIO-FAF
30	M	B	M	24	HOMICÍDIO-FAF
37	M	B	F	23	HOMICÍDIO-FAF
38	M	B	M	28	HOMICÍDIO-FAF-RESISTÊNCIA À PRISÃO
17	M	N	F	18	INDETERMINADO-CARDIOMEGALIA
2	M	B	F	16	MORTE SÚBITA
8	M	B	M	20	MORTE SÚBITA
9	M	B	M	32	MORTE SÚBITA
21	F	B	R	45	MORTE SÚBITA
13	F	B	M	24	MORTE SÚBITA-USO DE DROGAS
32	F	B	F	19	MORTE SÚBITA-USO DE DROGAS
35	M	N	R	38	MORTE SÚBITA-USO DE DROGAS
36	F	B	O	34	NATURAL - AVC SUBARACNOÍDE
11	M	B	R	26	NATURAL HEMORRAGIA PÂNCREAS
22	M	B	M	30	NATURAL-ANEURISMA CARDÍACO
19	M	N	F	40	NATURAL-BRONCOPNEUMONIA
24	F	B	N	55	NATURAL-ENFARTO FULMINANTE
14	M	N	F	24	OVERDOSE-INALANTES
3	M	N	M	24	SUICÍDIO-ENFORCAMENTO
7	M	B	M	49	SUICÍDIO-ENFORCAMENTO
39	M	N	M	23	SUICÍDIO-ENFORCAMENTO
12	M	B	M	40	SUICÍDIO-PRECIPITAÇÃO
29	M	B	M	24	SUICÍDIO-PRECIPITAÇÃO

ID=identificação do caso; CP=compleição corporal, sendo M=mediano, F=franzino, R=robusto, O=obeso; Raça, O=oriental, B=branca, N=negra; FAB=ferimento por arma branca; FAF=ferimento por arma de fogo

Tabela 5 - Distribuição de freqüência da população de estudo segundo sexo e faixa etária

Idade	Sexo					
	M		F		Total	
	N	%	N	%	N	%
15 I---- 25	14	35,9	3	7,7	17	43,6
25 I---- 35	7	17,9	3	7,7	10	25,6
35 I---- 55	10	25,6	2	5,1	12	30,8
Total	31	79,5	8	20,5	39	100,0

Sexo: M=masculino; F=feminino

Tabela 6 - Distribuição de freqüência da população de estudo segundo compleição corporal, sexo e raça

Corporal, Sexo e Raça														
Compleição corporal	Sexo												Total	
	Masculino						Feminino							
	Raça						Raça							
	Branca		Negra		Oriental		Branca		Negra		Oriental			
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
F	4	10,3	4	10,3	0	0,0	1	2,6	0	0,0	0	0,0	9	23,1
M	14	35,9	3	7,7	1	2,6	3	7,7	2	5,1	0	0,0	23	59,0
R	4	10,3	1	2,6	0	0,0	1	2,6	0	0,0	0	0,0	6	15,4
O	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	2,6	0	0,0	0	0,0	1	2,6
Total	22	56,4	8	20,5	1	2,6	5	15,4	2	5,1	0	0,0	39	100,0

Compleição corporal: F=franzino; M=mediano; O= obeso; R=robusto

Tabela 7 - Distribuição da população segundo o tipo de morte

HISTÓRICO	N	%
HOMICÍDIO	10	25,6
ATROPELAMENTO	6	15,4
NATURAL	5	12,8
SUICÍDIO	5	12,8
MORTE SÚBITA	4	10,3
MORTE SÚBITA - USO DE DROGAS	3	7,7
ENVENENAMENTO CARBAMATO	2	5,1
ACIDENTE-PRECIPITAÇÃO-USO DE DROGAS	1	2,6
CHOQUE ELÉTRICO	1	2,6
INDETERMINADO	1	2,6
OVERDOSE INALANTES	1	2,6
TOTAL	39	100,0

Tabela 8 - Distribuição dos históricos referidos no gênero masculino segundo a idade

Histórico	Idade			Total
	15 l---- 25	25 l---- 35	35 l---- 55	
	N	N	N	N
HOMICÍDIO – FAF	5	1	3	9
ATROPELAMENTO	1	1	2	4
MORTE SÚBITA	2	1	0	3
SUICÍDIO-ENFORCAMENTO	2	0	1	3
NATURAL	0	2	1	3
SUICÍDIO-QUEDA	1	0	1	2
CHOQUE ELÉTRICO	1	0	0	1
ENVENENAMENTO POR CARBAMATO	0	0	1	1
HOMICÍDIO – FAB	0	1	0	1
INDETERMINADO	1	0	0	1
MORTE SÚBITA-USO DE DROGAS	0	0	1	1
OVERDOSE POR INALANTES	1	0	0	1
ACIDENTE-PRECIPITAÇÃO-USO DE DROGAS	0	1	0	1
Total	14	7	10	31

FAB=ferimento por arma branca; FAF=ferimento por arma de fogo

7.2 Avaliação da eletroforese capilar acoplada ao detector de arranjo de diodos como ferramenta analítica na identificação e quantificação da cocaína e benzoilecgonina

Na otimização do método foi verificado que na cromatografia eletrocinética micelar se alcançou a separação adequada dos analitos de interesse utilizando-se como eletrólito de corrida SDS 30 mM, TBS 10mM e 5% de metanol, aplicando-se tensão de 25 kV gerando corrente de 30-35 μ A, conforme apresentado na Figura 13. A separação dos analitos ocorreu em 6 minutos, enquanto nas outras condições o tempo de separação correspondeu a 13 minutos (eletroferograma B) e 10 minutos (eletroferograma C).

Figura 13 - Perfil cromatográfico das soluções-padrão de cocaína e benzoilecgonina nas concentrações de 50ppm
 Legenda: [A]: metanol 5%, tensão 25 kV; [B]: tensão 15kV, metanol 5%; [C] metanol 20%, tensão 25kV. Detecção UV-230nm

As variáveis estudadas em cromatografia eletrocinética micelar foram tensão e concentração de metanol. Em relação à tensão foi observado que o valor de 25 kV permitiu rápida separação dos analitos e em relação à concentração de metanol 5% correspondeu ao valor ótimo, pois o aumento para 20% resultou em maior tempo de análise devido à alteração da afinidade dos analitos pela fase líquida.

Após a avaliação dos dois modos de separação, a separação por eletroforese capilar de zona foi adotada e a melhor condição foi obtida aplicando-se tensão de 30 kV e adição de 1% de trietilamina, conforme apresentado na Figura 14, onde se observa menor tempo para a separação e melhor simetria do pico referente à benzoilecgonina no eletroferograma [B], gerando corrente de 35-40 μ A. Adicionalmente, foi possível a separação de cinco analitos mais o padrão interno benzoilecgonina isopropilester (Figura 15).

Figura 14 - Perfil eletroferográfico das soluções-padrão de cocaína e benzoilecgonina

Legenda: [A]: tensão 15kV; [B] 30 kV adição de trietilamina e da benzoilecgonina isopropilester como padrão interno. Detecção UV-230nm

Figura 15 - Perfil eletroferográfico dos analitos submetidos à técnica de separação por eletroforese capilar de zona. Condições: tampão fosfato 20mM, pH 2,1 e TEA 1%, 30kV

Legenda: (1): creatinina (50 ppm), (2): metanfetamina (20 ppm), (3): cetamina (30 ppm), (4): cocaína (20ppm), (5): benzoilecgonina isopropilester (20 ppm), (6): benzoilecgonina (20ppm). Detecção UV-230nm

A técnica de separação por eletroforese capilar de zona se apresentou livre de interferentes quando aplicada à amostra de urina referência negativa (Figura 16). No entanto, quando aplicado às amostras de urina provenientes de cadáveres houve co-migração da COC com outro analito desconhecido sendo que a benzoilecgonina pôde ser identificada em 11,5 minutos livre de interferentes (Figura 17).

Figura 16 - Perfil eletroferográfico e espectro ultravioleta da amostra de urina referência negativa adicionada de benzimidazol como padrão interno (30 ppm), cocaína (20 ppm) e benzoilecgonina (20 ppm). Detecção UV-230nm

Figura 17 - Perfil eletroferográfico e espectro ultravioleta de extrato de urina de indivíduo vítima de overdose, positiva para cocaína na concentração de 4ppm. Detecção UV-230nm

7.3 Padronização do método de análise de cocaína e benzoilecgonina nas matrizes biológicas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD)

A amostra referência negativa de humor vítreo enriquecida com benzoilecgonina e cocaína, concentração de 1 µg/mL para ambos analitos, e submetida ao método proposto apresentou perfil cromatográfico com picos que se diferenciaram dos tempos de retenção referentes aos picos de interferentes presentes na amostra referência negativa de humor vítreo (Figura 18) e ao pico do padrão interno (prilocaína), concentração de 3 µg/mL (Figura 19), conforme o perfil cromatográfico apresentado na Figura 20.

Figura 18 - Perfil cromatográfico da amostra referência negativa de humor vítreo

Figura 19 - Perfil cromatográfico da amostra referência negativa de humor vítreo adicionada de padrão interno (prilocaina) na concentração de 3,0 µg/mL

Figura 20 - Perfil cromatográfico da amostra referência negativa de humor vítreo adicionada de benzoilecgonina e cocaína, ambos analitos nas concentrações de 1,0 µg/mL, e padrão interno na concentração de 3,0 µg/mL

A amostra referência negativa de tecido encefálico enriquecida com 1 µg/g dos analitos, benzoilecgonina e cocaína, submetida ao método proposto apresentou

perfil cromatográfico com picos que se diferenciaram dos tempos de retenção referentes aos picos de interferentes e ao pico do padrão interno (prilocaína), concentração de 5 $\mu\text{g/g}$, conforme apresentado nas Figuras 21, 22 e 23.

Figura 21 - Perfil cromatográfico da amostra referência negativa de tecido encefálico

Figura 22 - Perfil cromatográfico da amostra referência negativa de tecido encefálico adicionada de padrão interno (prilocaína), concentração de 5,0 $\mu\text{g/g}$

Figura 23 - Perfil cromatográfico da amostra referência negativa de tecido encefálico adicionada de benzoilecgonina e cocaína, ambos analitos nas concentrações de 1,0 $\mu\text{g/g}$, e padrão interno na concentração de 5,0 $\mu\text{g/g}$

A amostra referência negativa de sangue enriquecida com 1 $\mu\text{g/mL}$ dos analitos, benzoilecgonina e cocaína, submetida ao método proposto apresentou perfil cromatográfico com picos que se diferenciaram dos tempos de retenção referentes aos picos de interferentes e ao pico do padrão interno (prilocaína), concentração de 3 $\mu\text{g/mL}$, conforme apresentado nas Figuras 24, 25 e 26.

Figura 24 - Perfil cromatográfico da amostra referência negativa de sangue

Figura 25 - Perfil cromatográfico da amostra referência negativa de sangue adicionada de padrão interno (prilocaine), concentração de 3,0 µg/mL

Figura 26 - Perfil cromatográfico da amostra referência negativa de sangue adicionada de benzoilecgonina e cocaína, ambos analitos nas concentrações de 1,0 µg/mL, e padrão interno na concentração de 3,0 µg/mL

7.4 Validação dos métodos de quantificação de cocaína e benzoilecgonina nas matrizes biológicas

A linearidade, definida como a capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, apresentou curvas analíticas construídas em humor vítreo com coeficientes de determinação (r^2) no valor de 0,9963 (intervalo dinâmico compreendido entre 0,25 e 5,00 µg/mL) e 0,9934 (intervalo dinâmico compreendido entre 0,50 e 5,00 µg/mL) para benzoilecgonina e cocaína, respectivamente, conforme Figuras 27 e 28.

Figura 27 - Representação gráfica da curva analítica da benzoilecgonina em humor vítreo nas concentrações entre 0,25 e 5,00 µg/mL

Nota: RA=área relativa

Figura 28 - Representação gráfica da curva analítica da cocaína em humor vítreo nas concentrações entre 0,50 e 5,00 µg/mL

Nota: RA=área relativa

Em amostras de tecido encefálico as curvas analíticas empregadas na quantificação dos analitos apresentaram coeficientes de determinação (r^2) no valor de 0,9934 e 0,9966 para benzoilecgonina e cocaína, respectivamente, em intervalos dinâmicos compreendidos entre 0,50 e 5,00 $\mu\text{g/g}$ para ambos analitos (Figuras 29 e 30).

Figura 29 - Representação gráfica da curva analítica da benzoilecgonina em tecido encefálico nas concentrações entre 0,50 e 5,00 $\mu\text{g/g}$

Nota: RA=área relativa

Figura 30 - Representação gráfica da curva analítica da cocaína em tecido encefálico nas concentrações entre 0,50 e 5,00 µg/g

Nota: RA=área relativa

Em amostras de sangue as curvas analíticas empregadas na quantificação dos analitos apresentaram coeficientes de determinação (r^2) no valor de 0,9851 para benzoilecgonina, intervalo dinâmico entre 0,50 e 6,00 µg/mL, e 0,9919 para cocaína, intervalos dinâmico entre para 0,25 e 6,00 µg/mL para COC (Figuras 31 e 32).

Figura 31 - Representação gráfica da curva analítica da benzoilecgonina em sangue nas concentrações entre 0,50 e 6,00 µg/mL

Nota: RA=área relativa

Figura 32 - Representação gráfica da curva analítica da cocaína em sangue nas concentrações entre 0,25 e 6,00 µg/mL

Nota: RA=área relativa

Os resultados dos parâmetros de segurança obtidos na validação do método de quantificação de benzoilecgonina e cocaína são apresentados nas Tabelas 9 e 10, para amostras de humor vítreo, Tabelas 11 e 12 para amostras de tecido encefálico e Tabelas 13 e 14 para amostras de sangue.

Tabela 9 - Parâmetros de segurança do método proposto para determinação de benzoilecgonina em humor vítreo

Parâmetro			
LQ (µg/mL)		0,20	
LD (µg/mL)		0,05	
Faixa linear (µg/mL)		0,25 – 5,00 $r^2 \geq 0,9963$	
	QC1	QC2	QC3
imprecisão intra-ensaio (CV %)	10,04	6,15	5,58
imprecisão interensaio (CV %)	14,27	9,64	6,26
recuperação (%)	74,93	78,81	91,58

LQ Limite de quantificação, LD Limite de detecção, r^2 coeficiente de determinação, CV coeficiente de variação QC1 0,50 µg/mL, QC2 1,00 µg/mL e QC3 3,00 µg/mL

Tabela 10 - Parâmetros de segurança do método proposto para determinação de cocaína em humor vítreo

Parâmetro			
LQ (µg/mL)		0,25	
LD (µg/mL)		0,10	
Faixa linear (µg/mL)		0,50 – 5,00 $r^2 \geq 0,9934$	
	QC1	QC2	QC3
imprecisão intra-ensaio (CV %)	11,61	8,91	4,17
imprecisão interensaio (CV %)	15,53	10,62	6,92
recuperação (%)	79,2	85,25	95,44

LQ Limite de quantificação, LD Limite de detecção, r^2 coeficiente de determinação, CV coeficiente de variação QC1 0,50 µg/mL, QC2 1,00 µg/mL e QC3 3,00 µg/mL

Tabela 11 - Parâmetros de segurança do método proposto para determinação de benzoilecgonina em tecido encefálico

Parâmetro			
LQ (µg/g)		0,50	
LD (µg/g)		0,25	
Faixa linear (µg/g)		0,50 – 5,00 $r^2 \geq 0,9934$	
	QC1	QC2	QC3
imprecisão intra-ensaio (CV %)	9,35	5,59	5,15
imprecisão interensaio (CV %)	15,75	8,14	7,55
recuperação (%)	63,08	64,26	71,92

LQ Limite de quantificação, LD Limite de detecção, r^2 coeficiente de determinação, CV coeficiente de variação QC1 0,50 µg/g, QC2 1,00 µg/g e QC3 3,00 µg/g

Tabela 12 - Parâmetros de segurança do método proposto para determinação de cocaína em tecido encefálico

Parâmetro			
LQ (µg/g)		0,25	
LD (µg/g)		0,10	
Faixa linear (µg/g)		0,50 – 5,00 $r^2 \geq 0,9966$	
	QC1	QC2	QC3
imprecisão intra-ensaio (CV %)	4,57	5,26	9,12
imprecisão interensaio (CV %)	8,81	9,67	12,21
recuperação (%)	67,18	71,38	80,64

LQ Limite de quantificação, LD Limite de detecção, r^2 coeficiente de determinação, CV coeficiente de variação QC1 0,50 µg/g, QC2 1,00 µg/g e QC3 3,00 µg/g

Tabela 13 - Parâmetros de segurança do método proposto para determinação de benzoilecgonina em sangue

Parâmetro			
LQ (µg/mL)	0,50		
LD (µg/mL)	0,25		
Faixa linear (µg/mL)	0,50 – 6,00 $r^2 \geq 0,9851$		
	QC1	QC2	QC3
imprecisão intra-ensaio (CV %)	NA	NA	NA
imprecisão interensaio (CV %)	NA	NA	NA
recuperação (%)	50,63	60,24	65,30

LQ Limite de quantificação, LD Limite de detecção, r^2 coeficiente de determinação, CV coeficiente de variação QC1 0,50 µg/mL, QC2 1,00 µg/mL e QC3 2,00 µg/mL, NA não avaliado

Tabela 14 - Parâmetros de segurança do método proposto para determinação de cocaína em sangue

Parâmetro			
LQ (µg/mL)	0,25		
LD (µg/mL)	0,10		
Faixa linear (µg/mL)	0,25 – 6,00 $r^2 \geq 0,9919$		
	QC1	QC2	QC3
imprecisão intra-ensaio (CV %)	NA	NA	NA
imprecisão interensaio (CV %)	NA	NA	NA
recuperação (%)	57,81	67,89	72,78

LQ Limite de quantificação, LD Limite de detecção, r^2 coeficiente de determinação, CV coeficiente de variação QC1 0,50 µg/mL, QC2 1,00 µg/mL e QC3 2,00 µg/mL, NA não avaliado

7.5 Quantificação de cocaína e benzoilecgonina nas amostras selecionadas para o estudo

O método otimizado e validado foi empregado na quantificação dos analitos nas amostras de humor vítreo e tecido cerebral selecionadas para o estudo. De forma a ilustrar a aplicação do método nas amostras autênticas serão apresentados os perfis cromatográficos obtidos nas análises das matrizes selecionadas (humor vítreo e tecido cerebral) e a descrição de alguns casos.

O caso de identificação 33 se refere a indivíduo do sexo masculino de raça oriental, 28 anos com histórico de ser usuário de drogas e que se atirou do prédio onde se encontrava após se encontrar trancado, apresentando politrauma como causa de morte. A quantificação dos analitos nas matrizes indicou concentrações de 2,80 e 6,09 µg/mL para benzoilecgonina (BE) e cocaína (COC), respectivamente, em humor vítreo (Figura 33) e concentrações de 0,36 e 3,97 µg/g para BE e COC, respectivamente, no tecido encefálico correspondente aos núcleos da base (Figura 34). Adicionalmente, as concentrações determinadas em sangue foram de 3,25 e 2,57 µg/mL para BE e COC, respectivamente (Figura 35).

Figura 33 - Perfil cromatográfico de amostra de humor vítreo ID 33, com concentrações de 2,80 e 6,09 $\mu\text{g/mL}$ para benzoilecgonina e cocaína, respectivamente

Figura 34 - Perfil cromatográfico de amostra de tecido encefálico correspondente aos núcleos da base, ID 33, com concentração de 0,36 e 3,97 $\mu\text{g/g}$ para benzoilecgonina e cocaína, respectivamente

Figura 35 - Perfil cromatográfico de amostra de sangue, ID 33, com concentração de 3,25 e 2,57 $\mu\text{g/mL}$ para benzoilecgonina e cocaína, respectivamente

O caso de identificação 34 se refere a indivíduo do sexo masculino, raça branca, 22 anos, vítima de atropelamento e apresentando politrauma como causa de morte. A quantificação dos analitos nas matrizes indicou concentrações de 3,19 e 1,26 $\mu\text{g/mL}$ para benzoilecgonina (BE) e cocaína (COC), respectivamente, em humor vítreo (Figura 36) e concentrações de 1,60 e 2,71 $\mu\text{g/g}$ para BE e COC, respectivamente, no tecido encefálico correspondente aos núcleos da base (Figura 37). Adicionalmente, as concentrações determinadas em sangue foram de 4,43 e 1,62 $\mu\text{g/mL}$ para BE e COC, respectivamente (Figura 38).

Figura 36 - Perfil cromatográfico de amostra de humor vítreo ID 34, com concentrações de 3,19 e 1,26 $\mu\text{g/mL}$ para BE e COC, respectivamente

Figura 37 - Perfil cromatográfico de amostra de tecido encefálico correspondente aos núcleos da base, ID 34, com concentração de 1,60 e 2,71 $\mu\text{g/g}$ para BE e COC, respectivamente

Figura 38 - Perfil cromatográfico de amostra de sangue, ID 34, com concentração de 4,43 e 1,62 $\mu\text{g/mL}$ para BE e COC, respectivamente

Os casos de identificação 32 e 35 apresentam em seu histórico a overdose por uso de cocaína, mas de maneiras diversas. O primeiro caso, ID 32, corresponde a indivíduo do sexo feminino, raça branca, 19 anos, morte súbita, apresentou rosto, pescoço e dedos cianóticos, e conjuntiva congesta.

O segundo caso, ID 35, se refere a indivíduo do sexo masculino, raça negra, 38 anos, de nacionalidade nigeriana, com histórico de intoxicação por cocaína. Os achados necroscópicos referidos foram face congesta, sangue no nariz, boca e ouvidos. No estômago (examinado no Núcleo de Toxicologia Forense do Instituto Médico Legal) foram encontradas duas cápsulas de cocaína na forma de sal.

Pelos históricos referidos e pelos achados necroscópicos os dois casos, ID 32 e 35, indicam a morte por intoxicação aguda à cocaína.

A quantificação dos analitos nas matrizes do caso de ID 32 ofereceu concentrações de 1,28 e 4,66 $\mu\text{g/mL}$ para benzoilecgonina (BE) e cocaína (COC), respectivamente, em humor vítreo (Figura 39) e concentrações de 2,90 e 17,61 $\mu\text{g/g}$ para BE e COC, respectivamente, no tecido encefálico correspondente aos núcleos da base (Figuras 40). Enquanto, a amostra de sangue apresentou concentrações de 15,03 e 13,15 $\mu\text{g/mL}$ para BE e COC, respectivamente (Figura 41).

Figura 39 - Perfil cromatográfico de amostra de humor vítreo ID 32, com concentrações de 1,28 e 4,66 $\mu\text{g/mL}$ para benzoilecgonina e cocaína, respectivamente

Figura 40 - Perfil cromatográfico de amostra de tecido encefálico correspondente aos núcleos da base, ID 32, com concentração de 2,90 e 17,61 $\mu\text{g/g}$ para benzoilecgonina e cocaína, respectivamente

Figura 41 - Perfil cromatográfico de amostra de sangue, ID 32, com concentração de 15,03 e 13,15 $\mu\text{g/mL}$ para benzoilecgonina e cocaína, respectivamente

No caso de ID 35, a quantificação dos analitos nas matrizes ofereceu concentrações de 5,91 e 10,97 $\mu\text{g/mL}$ para benzoilecgonina (BE) e cocaína (COC), respectivamente em humor vítreo (Figura 42) e concentrações de 2,47 e 13,71 $\mu\text{g/g}$ para BE e COC, respectivamente, no tecido encefálico correspondente aos núcleos da base (Figuras 43). Adicionalmente, a amostra de sangue apresentou concentrações de 34,74 e 24,43 $\mu\text{g/mL}$ para BE e COC, respectivamente (Figura 44).

Figura 42 - Perfil cromatográfico de amostra de humor vítreo ID 35, com concentrações de 5,91 e 10,97 $\mu\text{g/mL}$ para BE e COC, respectivamente

Figura 43 - Perfil cromatográfico de amostra de tecido encefálico correspondente aos núcleos da base, ID 35, com concentração de 2,47 e 13,71 $\mu\text{g/g}$ para BE e COC, respectivamente

Figura 44 - Perfil cromatográfico de amostra de sangue, ID 35, com concentração de 34,74 e 24,43 µg/mL para BE e COC, respectivamente

Dos 39 indivíduos que compuseram o estudo, 18 (46%) apresentaram resultados positivos para COC e/ou BE, sendo a maioria dos indivíduos do sexo masculino com idades entre 15 e 24 anos (Tabelas 15 e 16). Neste grupo (positivo para cocaína) o principal histórico relacionado foi morte súbita, com ou sem referência ao uso de drogas, e o segundo histórico mais relatado foi homicídio (Tabela 17).

Tabela 15 - Distribuição dos casos positivos e negativos para cocaína e/ou benzoilecgonina segundo a faixa etária

Idade	Resultado cocaína e/ou benzoilecgonia				Total	
	negativo		positivo			
	N	%	N	%	N	%
15 l---- 25	8	20,5	9	23,1	17	43,6
25 l---- 35	6	15,4	4	10,3	10	25,6
35 l---- 55	7	17,9	5	12,8	12	30,8
Total	21	53,8	18	46,2	39	100,0

Tabela 16 - Distribuição dos casos positivos e negativos para cocaína e/ou benzoilecgonina segundo o gênero

benzoilecgonina segundo o gênero						
Sexo	Resultado cocaína e/ou benzoilecgonia				Total	
	negativo		positivo			
	N	%	N	%	N	%
M	16	41,0	15	38,5	19	79,5
F	5	12,8	3	7,7	20	20,5
Total	21	53,8	18	46,2	39	100,0

Tabela 17 - Distribuição dos casos positivos e negativos para cocaína e/ou benzoilecgonina segundo o histórico

Histórico	Resultado cocaína e/ou benzoilecgonia				Total	
	negativo		positivo			
	N	%	N	%	N	%
MORTE SÚBITA	0	0,0	7	17,9	7	17,9
HOMICÍDIO	5	12,8	5	12,8	10	25,6
SUICÍDIO – PRECIPITAÇÃO	0	0,0	2	5,1	2	5,1
ATROPELAMENTO	4	10,3	2	5,1	6	15,4
ACIDENTE-QUEDA	0	0,0	1	2,6	1	2,6
INDETERMINADA	0	0,0	1	2,6	1	2,6
NATURAL	5	12,8	0	0,0	5	12,8
SUICÍDIO- ENFORCAMENTO	3	7,7	0	0,0	3	7,7
ENVENENAMENTO- CARBAMATO	2	5,1	0	0,0	2	5,1
CHOQUE ELÉTRICO	1	2,6	0	0,0	1	2,6
OVERDOSE-INALANTES	1	2,6	0	0,0	1	2,6
Total	21	53,8	18	46,2	39	100,0

A quantificação dos analitos nas amostras selecionadas demonstrou valores médios em humor vítreo de 1,39 µg/mL (faixa entre 0,21 e 5,91 µg/mL) e 1,71 µg/mL (faixa entre 0,00 e 10,97 µg/mL) para benzoilecgonina (BE) e cocaína (COC), respectivamente, sendo que o valor médio de pH desta matriz foi de 7,8, conforme apresentado na Tabela 18. Não foi verificada correlação entre os valores de pH e a razão entre as concentrações de BE e COC (BE/COC) determinadas nas amostras de HV, o valor de coeficiente de correlação (r) foi de 0,2031 ($IC_{95\%} = -0,2916-0,6120$), pelo teste de correlação de *Pearson* e quanto testado se r é

significativamente diferente de zero o p-valor foi igual a 0,4190, considerado não significativo.

Nas amostras de tecido cerebral os valores médios dos analitos foram de 0,72; 0,79 a 1,11 µg/g para BE nos segmentos córtex frontal, núcleos da base e cerebelo, respectivamente. Enquanto para COC os valores médios determinados foram 2,75; 3,33 e 3,18 µg/g nos segmentos córtex frontal, núcleos da base e cerebelo, respectivamente (Tabela 18).

Nas amostras de sangue as médias de concentração foram de 6,12 µg/mL (faixa de 0,28 a 34,74 µg/mL) para BE e de 2,92 µg/mL (faixa de 0,00 a 24,43 µg/mL) para COC (Tabela 18).

Tabela 18 - Distribuição das concentrações de BE e COC nas matrizes biológicas dos casos positivos

Casos positivos											
ID	HV [µg/mL]		pH	SG [µg/mL]		Segmento encefálico [µg/g]					
						Córtex frontal		Núcleos da base		Cerebelo	
	BE	COC	HV	BE	COC	BE	COC	BE	COC	BE	COC
2	1,07	0,58	8,0	3,26	0,11	0,24	0,61	0,33	0,82	0,25	0,52
8	0,35	1,56	7,5	0,28	0,63	0,26	0,64	0,32	0,77	0,36	0,82
9	1,04	0,59	7,5	0,97	0,31	0,26	0,30	0,00	0,47	0,26	0,57
12	1,36	0,48	8,5	0,54	0,00	0,21	0,25	0,29	0,49	0,34	0,39
13	0,21	0,12	8,0	0,63	1,04	0,00	0,10	0,00	0,26	0,00	0,00
16	1,19	0,64	7,5	0,68	0,00	0,25	0,85	0,32	1,00	0,25	0,82
17	1,51	0,81	6,5	33,95	6,95	0,71	3,78	0,72	4,36	2,59	4,85
18	0,91	0,54	7,0	2,44	0,59	0,46	1,00	0,50	0,88	0,59	0,83
21	0,37	0,50	6,5	0,89	0,00	0,30	0,46	0,31	0,64	0,27	0,58
23	0,73	0,44	8,5	0,34	0,00	0,54	0,36	0,95	0,50	0,89	0,53
27	0,71	0,00	8,5	0,62	0,00	0,32	0,22	0,22	0,28	0,37	0,31
29	0,55	0,00	8,5	0,48	0,00	0,63	0,11	0,60	0,16	0,85	0,21
32	1,28	4,66	8,5	15,03	13,15	3,21	19,61	2,90	17,61	5,84	24,44
33	2,80	6,09	8,0	3,25	2,57	0,71	5,55	0,36	3,97	0,45	4,59
34	3,19	1,26	8,0	4,43	1,62	1,59	1,79	1,60	2,71	1,69	2,43
35	5,91	10,97	7,0	34,74	24,43	2,38	12,56	2,81	23,43	2,47	13,71
37	1,39	0,36	9,0	7,21	0,83	0,93	0,25	1,98	0,47	2,48	0,45
38	0,41	1,10	7,5	0,38	0,30	0,00	0,99	0,00	1,20	0,00	1,14
Média	1,39	1,71	7,8	6,12	2,92	0,72	2,75	0,79	3,33	1,11	3,18
Faixa	0,21	0,00	6,5	0,28	0,00	0,00	0,10	0,00	0,16	0,00	0,00
	5,91	10,97	8,5	34,74	24,43	3,21	19,61	2,90	23,43	5,84	24,44

Legenda: ID=identificação do caso; HV=humor vítreo; SG=sangue

A estatística descritiva dos valores de concentrações de COC no tecido encefálico e os testes de normalidade são apresentados na Tabela 19. Como os valores de concentrações de COC não apresentam distribuição normal, foi aplicado teste de *Kruskal-Wallis* (ANOVA não paramétrico) e verificado que não existe diferença significativa nas médias dos valores de concentrações de COC nos três segmentos de tecido encefálico (p-valor=0,7350, considerado não significante). O gráfico de comparação das médias é apresentado na Figura 45.

Tabela 19 - Estatística descritiva e testes de normalidade para as concentrações de COC nos três segmentos encefálicos

Parâmetro	Concentração de COC [µg/g]		
	Córtex Frontal	Núcleos da base	Cerebelo
Média	2,750	3,330	3,180
Desvio padrão	5,196	6,449	6,225
Erro padrão	1,225	1,520	1,467
IC _{95%}	0,162-5,330	0,127-6,542	0,085-6,276
Mínimo	0,100	0,160	0,000
Mediana	0,625	0,795	0,700
Máximo	19,610	23,430	24,440
Teste de normalidade KS	0,3538	0,3519	0,3507
Teste normalidade p-valor	0,0221	0,0232	0,0239
Aprovado no teste de normalidade	Não	Não	Não

Nota: COC=cocaína

Figura 45 – Gráfico de comparação das médias de concentração de cocaína nos três segmentos de tecido encefálico e erros padrão (N=18)

A estatística descritiva dos valores de concentrações de BE no tecido encefálico e os testes de normalidade são apresentados na Tabela 20.

Os valores de concentrações de BE apresentam distribuição normal, portanto foi aplicada a análise de variância ANOVA (método paramétrico) e verificado que não existe diferença significativa nas médias dos valores de concentrações de BE nos três segmentos de tecido encefálico ($p\text{-valor}=0,5428$, considerado não significativo). O gráfico de comparação das médias é apresentado na Figura 46.

Tabela 20 - Estatística descritiva e testes de normalidade para as concentrações de BE nos três segmentos encefálicos

Parâmetro	Concentração de BE [µg/g]		
	Córtex Frontal	Núcleos da base	Cerebelo
Média	0,720	0,790	1,110
Desvio padrão	0,853	0,916	1,466
Erro padrão	0,201	0,216	0,346
IC _{95%}	0,298-1,147	0,334-1,245	0,379-1,837
Valor mínimo	0,000	0,000	0,000
Mediana	0,390	0,345	0,410
Valor máximo	3,210	2,900	5,840
Teste de normalidade KS	0,2835	0,2524	0,2814
Teste normalidade p-valor	>0,10	>0,10	>0,10
Aprovado no teste de normalidade	Sim	Sim	Sim

Nota: BE=benzoilecgonina

Figura 46 - Comparação das médias de concentração de benzoilecgonina nos três segmentos de tecido encefálico e erros padrão (N=18)

A estatística descritiva dos valores de concentrações de cocaína total (soma das concentrações de cocaína e benzoilecgonina) no tecido encefálico e os testes de normalidade são apresentados na Tabela 21. Como os valores de concentrações de COC total não apresentam distribuição normal, foi aplicado teste de *Kruskal-Wallis* (ANOVA não paramétrico) e verificado que não existe diferença significativa nas médias dos valores de concentrações de COC nos três segmentos de tecido encefálico (p-valor=0,6936, considerado não significativo). O gráfico de comparação das médias é apresentado na Figura 47.

Tabela 21 - Estatística descritiva e testes de normalidade para as concentrações de cocaína total nos três segmentos encefálicos

Parâmetro	Concentração de COC total [µg/g]		
	Córtex Frontal	Núcleos da base	Cerebelo
Média	3,480	4,160	4,300
Desvio padrão	5,974	7,198	7,534
Erro padrão	1,408	1,696	1,776
IC _{95%}	0,514-6,455	0,578-7,737	0,553-8,046
Mínimo	0,200	0,420	0,120
Mediana	1,005	1,350	1,240
Máximo	22,820	26,240	30,280
Teste de normalidade KS	0,3549	0,3373	0,3155
Teste normalidade p-valor	0,0215	0,0333	0,0556
Aprovado no teste de normalidade	Não	Não	Sim

Nota: COC=cocaína

Figura 47 - Comparação das médias de concentração de cocaína total nos três segmentos de tecido encefálico e erros padrão (N=18)

7.6 Comparação das concentrações de cocaína e benzoilecgonina nas matrizes biológicas

A comparação das concentrações dos analitos (cocaína e benzoilecgonina) nas matrizes biológicas foi realizada por comparação de médias e testes de correlação sendo empregada correlação de *Spearman*, quando os valores não apresentaram distribuição normal (correlação não paramétrica) e correlação de Pearson, quando os valores apresentaram distribuição normal.

A Tabela 22 apresenta os resultados relativos às concentrações dos analitos nas matrizes biológicas, a partir dos quais foram feitas as comparações. No tecido encefálico os valores equivalem às médias das concentrações nos três segmentos

(córtex frontal, núcleos da base e cerebelo), isto é, soma da concentração em cada segmento dividido por três.

Tabela 22 - Distribuição das concentrações de benzoilecgonina e cocaína nas matrizes biológicas

ID	Sangue[$\mu\text{g/mL}$]			Humor vítreo [$\mu\text{g/mL}$]			Encéfalo* [$\mu\text{g/g}$]		
	BE	COC	TOTAL	BE	COC	TOTAL	BE	COC	TOTAL
2	3,26	0,11	3,37	1,07	0,58	1,65	0,27	0,65	0,92
8	0,28	0,63	0,91	0,35	1,56	1,91	0,31	0,74	1,06
9	0,97	0,31	1,28	1,04	0,59	1,63	0,17	0,45	0,62
12	0,54	0,00	0,54	1,36	0,48	1,84	0,28	0,38	0,66
13	0,63	1,04	1,67	0,21	0,12	0,33	0,00	0,12	0,12
16	0,68	0,00	0,68	1,19	0,64	1,83	0,27	0,89	1,16
17	33,95	6,95	40,90	1,51	0,81	2,32	1,34	4,33	5,67
18	2,44	0,59	3,03	0,91	0,54	1,45	0,52	0,90	1,42
21	0,89	0,00	0,89	0,37	0,50	0,87	0,29	0,56	0,85
23	0,34	0,00	0,34	0,73	0,44	1,17	0,79	0,46	1,26
27	0,62	0,00	0,62	0,71	0,00	0,71	0,30	0,27	0,57
29	0,48	0,00	0,48	0,55	0,00	0,55	0,69	0,16	0,85
32	15,03	13,15	28,18	1,28	4,66	5,94	3,98	20,55	24,54
33	3,25	2,57	5,82	2,8	6,09	8,89	0,51	4,70	5,21
34	4,43	1,62	6,05	3,19	1,26	4,45	1,63	2,31	3,94
35	34,74	24,43	59,17	5,91	10,97	16,88	2,55	16,57	19,12
37	7,21	0,83	8,04	1,39	0,36	1,75	1,80	0,39	2,19
38	0,38	0,30	0,68	0,41	1,10	1,51	0,00	1,11	1,11
Média	6,12	2,92	9,04	1,39	1,71	3,09	0,87	3,09	3,96
Faixa	0,28	0,00	0,34	0,21	0,00	0,33	0,00	0,12	0,12
	34,74	24,43	59,17	5,91	10,97	16,88	3,98	20,55	24,54

Nota: Encéfalo* - as concentrações equivalem às médias dos três segmentos (córtex frontal, núcleos da base e cerebelo) analisados

COC=cocaína; BE=benzoilecgonina

Concentrações de cocaína

A estatística descritiva dos valores de concentrações de cocaína (COC) no sangue, humor vítreo e tecido encefálico e os testes de normalidade são apresentados na Tabela 23. Como os valores de concentrações COC não apresentam distribuição normal, as médias foram comparadas por teste de *Mann-Whitney* e verificado que não existe diferença significativa nas médias de concentrações de COC determinadas no sangue e no humor vítreo ($p\text{-valor}=0,5062$,

considerado não significativo). O mesmo foi observado quando comparadas as médias das concentrações nas três matrizes selecionadas por teste de *Kruskal-Wallis* (ANOVA não paramétrico), $p\text{-valor}=0,4577$, considerado não significativo. A Figura 48 apresenta o gráfico de comparação das médias nas três matrizes.

Tabela 23 - Estatística descritiva e testes de normalidade para as concentrações de cocaína nas matrizes selecionadas

Parâmetro	Cocaína [$\mu\text{g/mL}$ ou $\mu\text{g/g}$]		
	Sangue	Humor vítreo	Encéfalo
Média	2,920	1,710	3,090
Desvio padrão	6,309	2,817	5,824
Erro padrão	1,487	0,664	1,373
IC _{95%}	-0,219-6,056	0,305-3,106	0,189-5,982
Mínimo	0,000	0,000	0,120
Mediana	0,450	0,585	0,695
Máximo	24,430	10,970	20,550
Teste de normalidade KS	0,3593	0,3539	0,3550
Teste normalidade p-valor	0,0192	0,0220	0,0214
Aprovado no teste de normalidade	Não	Não	Não

Figura 48 - Comparação das médias de concentração de cocaína nas três matrizes biológicas e erros padrão (N=18)

Foi empregado o teste de correlação de *Spearman* na comparação das concentrações de cocaína presentes nas amostras e testada a hipótese de r ser significativamente diferente de zero. Assim, o teste apresentou $r=0,6636$ ($IC_{95\%}=0,2711-0,8669$), $p\text{-valor}=0,0027$, considerado muito significativo, quando comparado sangue e humor vítreo; $r=0,6517$ ($IC_{95\%}=0,2516-0,8616$), $p\text{-valor}=0,0034$, considerado muito significativo, quando comparado sangue e encéfalo e $r=0,9086$ ($IC_{95\%}=0,7609-0,9668$), $p\text{-valor}=0,0001$, considerado extremamente significativo, quando comparado humor vítreo e tecido encefálico.

Concentrações de benzoilecgonina

A estatística descritiva dos valores de concentrações de benzoilecgonina (BE) nas três matrizes selecionadas e os testes de normalidade são apresentados na Tabela 24. As médias foram comparadas por teste de *Mann-Whitney* e verificado

que não existe diferença significativa nas médias de concentrações de BE determinadas no sangue e no humor vítreo (p -valor=0,5584, considerado não significante).

Tabela 24 - Estatística descritiva e testes de normalidade para as concentrações de benzoilecgonina no sangue e no humor vítreo

Parâmetro	Benzoilecgonina [$\mu\text{g/mL}$ ou $\mu\text{g/g}$]		
	Sangue	Humor vítreo	Encéfalo
Média	6,120	1,390	0,870
Desvio padrão	10,885	1,378	1,043
Erro padrão	2,566	0,3247	0,2459
IC _{95%}	0,704-11,531	0,703-2,073	0,354-1,391
Mínimo	0,280	0,210	0,000
Mediana	0,930	1,055	0,410
Máximo	34,740	5,910	3,980
Teste de normalidade KS	0,3394	0,2980	0,2536
Teste normalidade p -valor	0,0316	0,0818	>0,10
Aprovado no teste de normalidade	Não	Sim	Sim

Foi aplicado o teste de correlação de *Spearman* e testada a hipótese de r ser significativamente diferente de zero. Na comparação entre sangue e humor vítreo obtivemos $r=0,7544$ (IC_{95%}=0,4316-0,9059) e p -valor= 0,0003, considerado extremamente significante, enquanto entre sangue e tecido encefálico foi obtido $r=0,5413$ (IC_{95%}=0,08467-0,8101) e p -valor= 0,0203, considerado significante.

A comparação entre os valores das concentrações mensuradas no humor vítreo e no encéfalo apresentou $r=0,5139$ (IC_{95%}=0,06176-0,7910), pelo teste de correlação de *Pearson* (p -valor= 0,0291, considerado significante).

Concentrações de cocaína total

As concentrações de cocaína total equivalem à soma das concentrações de cocaína e benzoilecgonina.

A estatística descritiva dos valores de concentrações de cocaína total no sangue e no humor vítreo e os testes de normalidade são apresentados na Tabela 25. Como os valores de concentrações cocaína total não apresentam distribuição normal, as médias foram comparadas por teste de *Mann-Whitney* e verificado que não existe diferença significativa nas médias de concentrações de cocaína total determinadas no sangue e no humor vítreo ($p\text{-valor}=0,9622$, considerado não significativo), resultado similar é obtido quando aplicado teste de *Kruskal-Wallis* (ANOVA não paramétrico) para comparação de médias entre as três matrizes (sangue, tecido encefálico e humor vítreo) $p\text{-valor}=0,6892$, considerado não significativo. O gráfico de comparação de médias é apresentado na Figura 49.

Tabela 25 - Estatística descritiva e testes de normalidade para as concentrações de cocaína total nas matrizes biológicas

Parâmetro	Cocaína total [$\mu\text{g/mL}$ ou $\mu\text{g/g}$]		
	Sangue	Humor vítreo	Encéfalo
Média	9,036	3,093	3,96
Desvio padrão	16,560	4,047	6,756
Erro padrão	3,903	0,954	1,592
IC _{95%}	0,800-17,272	1,081-5,106	0,599-7,319
Mínimo	0,340	0,330	0,120
Mediana	1,475	1,700	1,135
Máximo	59,170	16,880	24,540
Teste de normalidade KS	0,3593	0,3539	0,3613
Teste normalidade p-valor	0,0192	0,0220	0,182
Aprovado no teste de normalidade	Não	Não	Não

Figura 49 - Comparação das médias de concentração de cocaína total nas três matrizes biológicas e erros padrão (N=18)

Foi aplicado o teste de correlação de *Spearman* e testada a hipótese de r ser significativamente diferente de zero. Na comparação entre sangue e humor vítreo obtivemos $r=0,6577$ ($IC_{95\%}=0,2614-0,8643$) e $p\text{-valor}= 0,0030$, considerado muito significativo, enquanto entre sangue e tecido encefálico foi obtido $r=0,6808$ ($IC_{95\%}=0,2999-0,8745$) e $p\text{-valor}= 0,0019$, considerado muito significativo.

A comparação entre os valores das concentrações mensuradas no humor vítreo e tecido encefálico encéfalo apresentou $r=0,7589$ ($IC_{95\%}=0,4402-0,9078$), $p\text{-valor}= 0,0003$, considerado extremamente significativo.

7.7 Determinação da alcoolemia

Os resultados da dosagem alcoólica são apresentados na Tabela 26. Quase metade das amostras positivas para cocaína também foram positivas para alcoolemia, conforme apresentado na Tabela 27. Enquanto um terço das amostras do grupo controle (amostras negativas para cocaína) apresentou resultados positivos para etanol.

A Tabela 28 apresenta os resultados das concentrações de etanol em sangue em comparação com as concentrações de cocaína nas matrizes estudadas e o histórico do caso.

Tabela 26 – Distribuição das concentrações de etanol em sangue na população de estudo

ID	Etanol (g/L)	Histórico	Idade	Deteção de cocaína
1	0,00	ATROPELAMENTO	15	NEG
3	0,00	SUICÍDIO-ENFORCAMENTO	24	NEG
4	0,00	ENVENENAMENTO-CARBAMATO	46	NEG
5	0,00	ATROPELAMENTO	30	NEG
11	0,00	NATURAL HEMORRAGIA PÂNCREAS	26	NEG
19	0,00	NATURAL-BRONCOPNEUMONIA	40	NEG
22	0,00	NATURAL-ANEURISMA CARDÍACO	30	NEG
24	0,00	NATURAL-ENFARTO FULMINANTE	59	NEG
31	0,00	CHOQUE ELÉTRICO	16	NEG
36	0,00	NATURAL - AVC SUBARACNÓIDE	34	NEG
39	0,00	SUICÍDIO-ENFORCAMENTO	23	NEG
15	0,01	ATROPELAMENTO	35	NEG
14	0,03	OVERDOSE-INALANTES	24	NEG
10	0,19	HOMICÍDIO-FAF	20	NEG
26	2,07	ENVENENAMENTO-CARBAMATO	30	NEG
20	2,64	ATROPELAMENTO	30	NEG
6	NE	HOMICÍDIO-FAF	21	NEG
7	NE	SUICÍDIO-ENFORCAMENTO	49	NEG
25	NE	HOMICÍDIO-FAF	40	NEG
28	NE	HOMICÍDIO-FAF	36	NEG
30	NE	HOMICÍDIO-FAF	24	NEG

Legenda: DA=dosagem alcoólica; ID=identificação do caso; NE=não ensaiado; AVC=acidente vascular cerebral; FAB=ferimento por arma branca; FAF=ferimento por arma de fogo; NEG=negativo; POS=positivo

Tabela 26 - Distribuição das concentrações de etanol em sangue na população de estudo - continuação

ID	Etanol (g/L)	Histórico	Idade	Deteção de cocaína
2	0,00	MORTE SÚBITA	16	POS
9	0,00	MORTE SÚBITA	32	POS
21	0,00	MORTE SÚBITA	45	POS
23	0,00	HOMICÍDIO-FAF	23	POS
27	0,00	HOMICÍDIO-FAF	40	POS
32	0,00	MORTE SÚBITA-USO DE DROGAS	19	POS
33	0,00	ACIDENTE-PRECIPITAÇÃO-USO DE DROGAS	28	POS
34	0,00	ATROPELAMENTO	22	POS
35	0,00	MORTE SÚBITA-USO DE DROGAS	38	POS
37	0,00	HOMICÍDIO-FAF	23	POS
8	0,01	MORTE SÚBITA	20	POS
13	0,01	MORTE SÚBITA-USO DE DROGAS	24	POS
17	0,01	INDETERMINADA	18	POS
38	0,70	HOMICÍDIO-FAF	28	POS
18	1,06	HOMICÍDIO-FAB	30	POS
12	1,37	SUICÍDIO-PRECIPITAÇÃO	40	POS
29	1,37	SUICÍDIO-PRECIPITAÇÃO	24	POS
16	3,73	ATROPELAMENTO	41	POS

Legenda: DA=dosagem alcoólica; ID=identificação do caso; NE=não ensaiado; AVC=acidente vascular cerebral; FAB=ferimento por arma branca; FAF=ferimento por arma de fogo; NEG=negativo; POS=positivo

Tabela 27 - Distribuição da população segundo a positividade para cocaína e alcoolemia

COC						
DA	Positivo		Negativo		Total	
	N	%	N	%	N	%
Positivo	8	20,51	5	12,82	13	33,33
Negativo	10	25,64	11	28,21	21	53,85
NE	0	0,00	5	12,82	5	12,82
Total	18	46,15	21	53,85	39	100,00

Legenda: DA=dosagem alcoólica; NE=não ensaiado

Tabela 28 – Distribuição das concentrações de etanol e cocaína na população

ID	etanol [g/L]		Cocaína [µg/mL]		HISTÓRICO
	Sangue	Sangue	Humor vítreo	Encéfalo*	
2	0,00	0,11	0,58	0,65	MORTE SÚBITA
8	0,01	0,63	1,56	0,74	MORTE SÚBITA
9	0,00	0,31	0,59	0,45	MORTE SÚBITA
12	1,37	0,00	0,48	0,38	SUICÍDIO-PRECIPITAÇÃO
13	0,01	1,04	0,12	0,12	MORTE SÚBITA-USO DE DROGAS
16	3,73	0,00	0,64	0,89	ATROPELAMENTO
17	0,01	6,95	0,81	4,33	INDETERMINADO-CARDIOMEGALIA
18	1,06	0,59	0,54	0,90	HOMICÍDIO-FAB
21	0,00	0,00	0,50	0,56	MORTE SÚBITA
23	0,00	0,00	0,44	0,46	HOMICÍDIO-FAF
27	0,00	0,00	0,00	0,27	HOMICÍDIO-FAF
29	1,37	0,00	0,00	0,16	SUICÍDIO-PRECIPITAÇÃO
32	0,00	13,15	4,66	20,55	MORTE SÚBITA-USO DE DROGAS
33	0,00	2,57	6,09	4,70	ACIDENTE-PRECIPITAÇÃO-USO DE DROGAS
34	0,00	1,62	1,26	2,31	ATROPELAMENTO
35	0,00	24,43	10,97	16,57	MORTE SÚBITA-USO DE DROGAS
37	0,00	0,83	0,36	0,39	HOMICÍDIO-FAF
38	0,70	0,30	1,10	1,11	HOMICÍDIO-FAF

Legenda: ID=identificação do caso; FAB=ferimento por arma branca; FAF=ferimento por arma de fogo; Encéfalo*= as concentrações equivalem às médias dos três segmentos (córtex frontal, núcleos da base e cerebelo) analisados

7.8 Verificação da influência da temperatura hepática nos casos positivos e negativos para cocaína

A média do intervalo pós-mortal (IPM) (real ou estimado através dos fenômenos cadavéricos) foi de 13 e 11 horas para o grupo negativo e positivo para COC, respectivamente, e a média de temperatura hepática foi similar para ambos os grupos (29,7 e 30,4 °C, para o grupo negativo e positivo, respectivamente) (Tabelas 29 e 30). Adicionalmente foi verificado por teste de *T de Student*, pareado, nível de significância de 5%, que os dois grupos não apresentaram diferença significativa em relação às médias dos valores de IPM, p-valor=0,0978

(considerado não significativo), o mesmo ocorrendo para a temperatura hepática, p-valor=0,7697 (considerado não significativo) (Figura 50).

Tabela 29 - Valores dos intervalos *post mortem* (IPM) e das médias de temperatura hepática (MTH) no grupo com amostras negativas para cocaína

Identif.	Histórico	IPM (horas)	MTH (°C)
5	ATROPELAMENTO	9,5 ^R	24,6
15	ATROPELAMENTO	10 ^R	30,8
20	ATROPELAMENTO	10 ^E	30,0
1	ATROPELAMENTO	20 ^E	25,3
31	CHOQUE ELÉTRICO	18 ^E	33,0
4	ENVENENAMENTO-CARBAMATO	11 ^R	24,2
6	HOMICÍDIO-FAF	11,5 ^R	31,7
10	HOMICÍDIO-FAF	24 ^E	21,4
25	HOMICÍDIO-FAF	15 ^E	31,7
28	HOMICÍDIO-FAF	10 ^E	34,4
30	HOMICÍDIO-FAF	11 ^R	37,1
22	NATURAL-ANEURISMA CARDÍACO	20 ^E	32,4
36	NATURAL-AVC SUBARACNOÍDE	12 ^E	36,2
19	NATURAL-BRONCOPNEUMONIA	10 ^E	33,0
24	NATURAL-ENFARTO FULMINANTE	12 ^E	28,5
11	NATURAL-HEMORRAGIA DE PÂNCREAS	10 ^E	22,9
14	OVERDOSE-INALANTES	8 ^R	31,6
3	SUICÍDIO-ENFORCAMENTO	8 ^E	30,8
7	SUICÍDIO-ENFORCAMENTO	15 ^E	22,5
39	SUICÍDIO-ENFORCAMENTO	10 ^E	31,9
Média		13	29,7

Excluído caso de ID 26 pelo motivo de a temperatura hepática não ter sido avaliada. ^E=estimado; ^R=real

Tabela 30 - Valores dos intervalos *post mortem* (IPM) e das médias de temperatura hepática (MTH) no grupo com amostras positivas para COC

Identif.	Histórico	IPM (horas)	MTH (°C)
33	ACIDENTE-PRECIPITAÇÃO-USO DE DROGAS	6 ^R	33,1
16	ATROPELAMENTO	16 ^E	28,5
34	ATROPELAMENTO	10 ^R	24,7
18	HOMICÍDIO-FAB	12 ^E	33,6
23	HOMICÍDIO-FAF	12 ^E	26,8
27	HOMICÍDIO-FAF	10 ^E	31,3
37	HOMICÍDIO-FAF	5 ^R	32,7
38	HOMICÍDIO-FAF-RESISTÊNCIA À PRISÃO	20 ^E	33,4
17	INDETERMINADO-CARDIOMEGALIA	10 ^E	28,3
2	MORTE SÚBITA	16 ^E	32,0
8	MORTE SÚBITA	5 ^E	27,9
9	MORTE SÚBITA	8 ^E	23,9
21	MORTE SÚBITA	12 ^E	33,5
13	MORTE SÚBITA-USO DE DROGAS	10 ^E	31,9
32	MORTE SÚBITA-USO DE DROGAS	6 ^E	33,0
12	SUICÍDIO-QUEDA	16 ^R	28,9
29	SUICÍDIO-QUEDA	10 ^E	33,1
Média		11	30,4

Excluído caso de ID 35 pelo motivo de apresentar IPM de 37 h. ^E=estimado; ^R=real

Figura 50 - Comparação das médias dos valores de temperatura hepática na população de estudo e erros padrão (N=39)

7.9 Quantificação das catecolaminas nas amostras de tecido cerebral

A população de estudo foi dividida em dois grupos para apresentação dos resultados da quantificação dos neurotransmissores. O primeiro denominado negativo para cocaína (COC), representado pelo grupo que apresentou resultado negativo tanto para benzoilecgonina (BE) como para COC e o segundo denominado positivo para COC, composto pelo grupo que apresentou resultado positivo para COC e/ou BE.

Supondo que as concentrações dos neurotransmissores podem ser influenciadas pelos fármacos administrados, apresentamos a ocorrência de procedimento médico-hospitalar (PMH) recebido pelo indivíduo, baseado no histórico e/ou observação necroscópica. Dentre os casos negativos para COC, 12 indivíduos (N=21) foram submetidos a PMH nos momentos que precederam o óbito, enquanto dentre os indivíduos positivos para COC, somente 3 indivíduos (N=18) foram submetidos a PMH.

A média de concentrações de dopamina foram maiores nos tecidos correspondentes aos núcleos da base, tanto no grupo de negativo para COC, como no grupo de positivo (Tabelas 31 e 32). O mesmo perfil foi observado para os metabólitos ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA) (Tabelas 33, 34, 35 e 36).

Em geral, as concentrações de HVA foram maiores que as concentrações de dopamina (DA) e DOPAC, principalmente no segmento correspondente aos núcleos da base.

Considerando os dois grupos, negativo e positivo para COC, as concentrações de DA, DOPAC e HVA apresentaram média de valores maiores no grupo positivo, sendo a diferença mais expressiva nos segmentos de núcleos da base e córtex próximo aos ventrículos. Conseqüentemente, quando os valores são expressos em termos de dopamina total, isto é, a soma de DA, DOPAC e HAV, as médias das concentrações são maiores em todos os segmentos cerebrais no grupo positivo para COC (Tabelas 37 e 38).

Tabela 31 - Distribuição das concentrações de dopamina em três segmentos cerebrais da população que apresentou resultado negativo para cocaína

ID	Histórico	DOPAMINA [ng/g]			PMH
		Córtex frontal	Núcleos da base	Córtex ventricular	
5	ATROPELAMENTO	11,5	8,4	0,0	S
15	ATROPELAMENTO	0,0	0,0	0,0	S
20	ATROPELAMENTO	0,0	0,0	0,0	N
1	ATROPELAMENTO	0,0	0,0	0,0	S
31	CHOQUE ELÉTRICO	56,5	14,1	46,0	S
4	ENVENENAMENTO-CARBAMATO	0,0	0,0	0,0	N
26	ENVENENAMENTO-CARBAMATO	0,0	0,0	0,0	S
6	HOMICÍDIO-FAF	0,0	0,0	0,0	S
10	HOMICÍDIO-FAF	114,3	134,8	146,7	S
25	HOMICÍDIO-FAF	0,0	0,0	0,0	S
28	HOMICÍDIO-FAF	35,9	88,7	50,5	I
30	HOMICÍDIO-FAF	25,8	107,6	4,9	S
22	NATURAL-ANEURISMA CARDÍACO	0,0	0,0	26,0	S
36	NATURAL-AVC SUBARACNÓIDE	83,5	86,3	0,0	S
19	NATURAL-BRONCOPNEUMONIA	0,0	0,0	0,0	N
24	NATURAL-ENFARTO FULMINANTE	0,0	0,0	0,0	N
11	NATURAL-HEMORRAGIA DE PÂNCREAS	0,0	0,0	0,0	N
14	OVERDOSE-INALANTES	0,0	52,0	0,0	S
3	SUICÍDIO-ENFORCAMENTO	0,0	0,0	0,0	N
7	SUICÍDIO-ENFORCAMENTO	0,0	0,0	0,0	N
39	SUICÍDIO-ENFORCAMENTO	0,0	81,4	61,2	N
Média		15,6	27,3	16,0	

ID=identificação do caso; PMH=procedimento médico hospitalar; S=Sim; N=Não; I=Indeterminado; FAF=ferimento por arma de fogo; AVC=acidente vascular cerebral

Tabela 32 - Distribuição das concentrações de dopamina em três segmentos cerebrais da população que apresentou resultado positivo para cocaína

ID	Histórico	DOPAMINA [ng/g]			PMH
		Córtex frontal	Núcleos da base	Córtex ventricular	
33	ACIDENTE-PRECIPITAÇÃO- USO DE DROGAS	44,3	1329,5	0,0	S
16	ATROPELAMENTO	0,0	76,0	0,0	N
34	ATROPELAMENTO	39,5	68,5	54,1	N
18	HOMICÍDIO-FAB	0,0	0,0	0,0	N
23	HOMICÍDIO-FAF	0,0	0,0	0,0	N
27	HOMICÍDIO-FAF	25,0	251,1	0,0	N
37	HOMICÍDIO-FAF	37,2	33,8	20,8	N
38	HOMICÍDIO-FAF- RESISTÊNCIA À PRISÃO	54,9	543,5	94,7	S
17	INDETERMINADO- CARDIOMEGALIA	0,0	252,0	40,0	N
2	MORTE SÚBITA	0,0	0,0	0,0	N
8	MORTE SÚBITA	0,0	370,0	0,0	N
9	MORTE SÚBITA	0,0	0,0	62,0	N
21	MORTE SÚBITA	0,0	536,0	0,0	N
13	MORTE SÚBITA-USO DE DROGAS	0,0	228,0	0,0	N
32	MORTE SÚBITA-USO DE DROGAS	32,0	38,9	43,2	N
35	MORTE SÚBITA-USO DE DROGAS	39,0	956,6	22,1	S
12	SUICÍDIO-PRECIPITAÇÃO	0,0	0,0	0,0	N
29	SUICÍDIO-PRECIPITAÇÃO	39,3	103,2	32,1	N
Média		17,3	265,9	20,5	

ID=identificação do caso; PMH=procedimento médico hospitalar; S=Sim; N=Não; FAB=ferimento por arma branca; FAF=ferimento por arma de fogo

Tabela 33 - Distribuição das concentrações de DOPAC em três segmentos cerebrais da população que apresentou resultado negativo para cocaína

ID	Histórico	DOPAC [ng/g]			PMH
		Córtex frontal	Núcleos da base	Córtex ventricular	
5	ATROPELAMENTO	54,8	87,6	46,5	S
15	ATROPELAMENTO	0,0	162,6	0,0	S
20	ATROPELAMENTO	192,0	244,0	230,0	N
1	ATROPELAMENTO	0,0	70,0	0,0	S
31	CHOQUE ELÉTRICO	0,0	58,2	20,4	S
4	ENVENENAMENTO-CARBAMATO	57,0	121,3	68,7	N
26	ENVENENAMENTO-CARBAMATO	288,0	276,0	416,0	S
6	HOMICÍDIO-FAF	0,0	0,0	0,0	S
10	HOMICÍDIO-FAF	0,0	93,6	75,3	S
25	HOMICÍDIO-FAF	162,0	230,0	152,0	S
28	HOMICÍDIO-FAF	0,0	29,4	16,2	I
30	HOMICÍDIO-FAF	0,0	395,9	36,6	S
22	NATURAL-ANEURISMA CARDÍACO	0,0	0,0	0,0	S
36	NATURAL-AVC SUBARACNÓIDE	0,0	1326,3	101,4	S
19	NATURAL-BRONCOPNEUMONIA	0,0	0,0	0,0	N
24	NATURAL-ENFARTO FULMINANTE	0,0	0,0	0,0	N
11	NATURAL-HEMORRAGIA DE PÂNCREAS	0,0	0,0	0,0	N
14	OVERDOSE-INALANTES	0,0	64,0	0,0	S
3	SUICÍDIO-ENFORCAMENTO	0,0	56,0	0,0	N
7	SUICÍDIO-ENFORCAMENTO	0,0	0,0	0,0	N
39	SUICÍDIO-ENFORCAMENTO	0,0	0,0	0,0	N
Média		35,9	153,1	55,4	

ID=identificação do caso; PMH=procedimento médico hospitalar; S=Sim; N=Não; I=Indeterminado; FAF=ferimento por arma de fogo; AVC=acidente vascular cerebral; DOPAC= ácido 3,4-dihidroxifenilacético

Tabela 34 - Distribuição das concentrações de DOPAC em três segmentos cerebrais da população que apresentou resultado positivo para cocaína

ID	Histórico	DOPAC [ng/g]			PMH
		Córtex frontal	Núcleos da base	Córtex ventricular	
33	ACIDENTE-PRECIPITAÇÃO-USO DE DROGAS	0,0	4629,4	34,6	S
16	ATROPELAMENTO	172,0	308,0	232,0	N
34	ATROPELAMENTO	0,0	158,0	0,0	N
18	HOMICÍDIO-FAB	0,0	0,0	312,0	N
23	HOMICÍDIO-FAF	134,0	508,0	190,0	N
27	HOMICÍDIO-FAF	21,0	3775,6	14,9	N
37	HOMICÍDIO-FAF	0,0	141,0	13,2	N
38	HOMICÍDIO-FAF-RESISTÊNCIA À PRISÃO	33,5	3080,3	340,0	S
17	INDETERMINADO-CARDIOMEGALIA	0,0	0,0	0,0	N
2	MORTE SÚBITA	280,0	300,0	216,0	N
8	MORTE SÚBITA	180,0	308,0	296,0	N
9	MORTE SÚBITA	382,0	4696,0	0,0	N
21	MORTE SÚBITA	138,0	528,0	678,0	N
13	MORTE SÚBITA-USO DE DROGAS	0,0	736,0	0,0	N
32	MORTE SÚBITA-USO DE DROGAS	0,0	588,8	26,7	N
35	MORTE SÚBITA-USO DE DROGAS	0,0	925,5	21,2	S
12	SUICÍDIO-PRECIPITAÇÃO	62,6	66,4	84,0	N
29	SUICÍDIO-PRECIPITAÇÃO	0,0	92,2	21,5	N
Média		77,9	1157,8	118,9	

ID=identificação do caso; PMH=procedimento médico hospitalar; S=Sim; N=Não; FAB=ferimento por arma branca; FAF=ferimento por arma de fogo; DOPAC= ácido 3,4-dihidroxifenilacético

Tabela 35 - Distribuição das concentrações de HVA em três segmentos cerebrais da população que apresentou resultado negativo para cocaína

ID	Histórico	HVA [ng/g]			PMH
		Córtex frontal	Núcleos da base	Córtex ventricular	
5	ATROPELAMENTO	54,3	426,6	21,5	S
15	ATROPELAMENTO	74,3	2156,0	203,2	S
20	ATROPELAMENTO	80,0	236,0	280,0	N
1	ATROPELAMENTO	58,0	796,0	56,0	S
31	CHOQUE ELÉTRICO	152,3	3365,4	305,2	S
4	ENVENENAMENTO-CARBAMATO	105,2	504,0	248,5	N
26	ENVENENAMENTO-CARBAMATO	0,0	190,0	146,0	S
6	HOMICÍDIO-FAF	0,0	308,0	66,0	S
10	HOMICÍDIO-FAF	53,0	325,5	76,9	S
25	HOMICÍDIO-FAF	42,0	444,0	68,0	S
28	HOMICÍDIO-FAF	240,4	476,2	110,6	I
30	HOMICÍDIO-FAF	57,4	1614,7	389,8	S
22	NATURAL-ANEURISMA CARDÍACO	124,0	1506,0	108,0	S
36	NATURAL-AVC SUBARACNÓIDE	63,2	4404,5	99,6	S
19	NATURAL-BRONCOPNEUMONIA	86,0	1920,0	272,0	N
24	NATURAL-ENFARTO FULMINANTE	92,0	210,0	170,0	N
11	NATURAL-HEMORRAGIA DE PÂNCREAS	206,0	0,0	0,0	N
14	OVERDOSE-INALANTES	0,0	1380,0	270,0	S
3	SUICÍDIO-ENFORCAMENTO	0,0	1004,0	72,0	N
7	SUICÍDIO-ENFORCAMENTO	90,0	270,0	124,0	N
39	SUICÍDIO-ENFORCAMENTO	33,8	354,7	173,8	N
Média		76,8	1042,5	155,3	

ID=identificação do caso; PMH: procedimento médico hospitalar; S=Sim; N=Não; I=Indeterminado; FAF=ferimento por arma de fogo; AVC=acidente vascular cerebral; HVA=ácido homovanílico

Tabela 36 - Distribuição das concentrações de HVA em três segmentos cerebrais da população que apresentou resultado positivo para cocaína

ID	Histórico	HVA [ng/g]			PMH
		Córtex frontal	Núcleos da base	Córtex ventricular	
33	ACIDENTE-PRECIPITAÇÃO-USO DE DROGAS	116,2	6185,9	481,4	S
16	ATROPELAMENTO	88,0	6236,0	454,0	N
34	ATROPELAMENTO	98,0	481,6	180,0	N
18	HOMICÍDIO-FAB	100,0	589,0	220,0	N
23	HOMICÍDIO-FAF	50,0	288,0	278,0	N
27	HOMICÍDIO-FAF	61,2	7337,0	234,3	N
37	HOMICÍDIO-FAF	152,7	2311,3	91,8	N
38	HOMICÍDIO-FAF-RESISTÊNCIA À PRISÃO	79,0	15294,7	464,1	S
17	INDETERMINADO-CARDIOMEGALIA	70,0	1388,0	216,0	N
2	MORTE SÚBITA	60,0	2456,0	122,0	N
8	MORTE SÚBITA	112,0	5786,0	1118,0	N
9	MORTE SÚBITA	54,0	4080,0	302,0	N
21	MORTE SÚBITA	866,0	3494,0	1006,0	N
13	MORTE SÚBITA-USO DE DROGAS	74,0	3118,0	516,0	N
32	MORTE SÚBITA-USO DE DROGAS	55,7	5730,3	487,0	N
35	MORTE SÚBITA-USO DE DROGAS	139,8	14685,1	358,9	S
12	SUICÍDIO-PRECIPITAÇÃO	0,0	1380,3	270,0	N
29	SUICÍDIO-PRECIPITAÇÃO	33,2	1006,6	198,1	N
Média		122,8	4547,1	388,8	

ID=identificação do caso; PMH=procedimento médico hospitalar; S=Sim; N=Não; FAB=ferimento por arma branca; FAF=ferimento por arma de fogo; HVA=ácido homovanílico

Tabela 37 - Distribuição das concentrações de dopamina total em três segmentos cerebrais da população que apresentou resultado negativo para cocaína

ID	Histórico	Dopamina Total – ($\Sigma_{DA, DOPAC, HVA}$) [ng/g]			
		Córtex Frontal	Núcleos da base	Córtex ventricular	Soma (3 segmentos)
5	ATROPELAMENTO	120,6	522,6	68,0	711,2
15	ATROPELAMENTO	74,3	2318,6	203,2	2596,1
20	ATROPELAMENTO	272,0	480,0	510,0	1262,0
1	ATROPELAMENTO	58,0	866,0	56,0	980,0
31	CHOQUE ELÉTRICO	208,8	3437,7	371,6	4018,1
4	ENVENENAMENTO-CARBAMATO	162,1	625,3	317,2	1104,7
26	ENVENENAMENTO-CARBAMATO	288,0	466,0	562,0	1316,0
6	HOMICÍDIO-FAF	0,0	308,0	66,0	374,0
10	HOMICÍDIO-FAF	167,2	553,9	298,9	1020,1
25	HOMICÍDIO-FAF	204,0	674,0	220,0	1098,0
28	HOMICÍDIO-FAF	276,3	594,3	177,3	1047,9
30	HOMICÍDIO-FAF	83,2	2118,2	431,3	2632,7
22	NATURAL-ANEURISMA CARDÍACO	124,0	1506,0	134,0	1764,0
36	NATURAL-AVC SUBARACNOÍDE	146,8	5817,1	201,1	6164,9
19	NATURAL-BRONCOPNEUMONIA	86,0	1920,0	272,0	2278,0
24	NATURAL-ENFARTO FULMINANTE	92,0	210,0	170,0	472,0
11	NATURAL-HEMORRAGIA DE PÂNCREAS	206,0	0,0	0,0	206,0
14	OVERDOSE-INALANTES	0,0	1496,0	270,0	1766,0
3	SUICÍDIO-ENFORCAMENTO	0,0	1060,0	72,0	1132,0
7	SUICÍDIO-ENFORCAMENTO	90,0	270,0	124,0	484,0
39	SUICÍDIO-ENFORCAMENTO	33,8	436,1	235,0	704,9
Média		128,2	1222,8	226,6	1577,7

ID=identificação do caso; FAF=ferimento por arma de fogo; AVC=acidente vascular cerebral; DA=dopamina; DOPAC= ácido 3,4-dihidroxifenilacético; HVA=ácido homovanílico

Tabela 38 - Distribuição das concentrações de dopamina total em três segmentos cerebrais da população que apresentou resultado positivo para cocaína

ID	Histórico	Dopamina Total – ($\Sigma_{DA, DOPAC, HVA}$) [ng/g]			
		Córtex Frontal	Núcleos da base	Córtex ventricular	Soma (3 segmentos)
33	ACIDENTE-PRECIPITAÇÃO-USO DE DROGAS	160,5	12144,8	516,0	12821,3
16	ATROPELAMENTO	260,0	6620,0	686,0	7566,0
34	ATROPELAMENTO	137,5	708,1	234,1	1079,7
18	HOMICÍDIO-FAB	100,0	589,0	532,0	1221,0
23	HOMICÍDIO-FAF	184,0	796,0	468,0	1448,0
27	HOMICÍDIO-FAF	107,2	11363,7	249,3	11720,1
37	HOMICÍDIO-FAF	189,9	2486,1	125,8	2801,8
38	HOMICÍDIO-FAF-RESISTÊNCIA À PRISÃO	167,4	18918,6	898,8	19984,8
17	INDETERMINADO-CARDIOMEGALIA	70,0	1640,0	256,0	1966,0
2	MORTE SÚBITA	340,0	2756,0	338,0	3434,0
8	MORTE SÚBITA	292,0	6464,0	1414,0	8170,0
9	MORTE SÚBITA	436,0	8776,0	364,0	9576,0
21	MORTE SÚBITA	1004,0	4558,0	1684,0	7246,0
13	MORTE SÚBITA-USO DE DROGAS	74,0	4082,0	516,0	4672,0
32	MORTE SÚBITA-USO DE DROGAS	87,7	6358,0	556,9	7002,6
35	MORTE SÚBITA-USO DE DROGAS	178,8	16567,2	402,2	17148,2
12	SUICÍDIO-PRECIPITAÇÃO	62,6	1446,7	354,0	1863,3
29	SUICÍDIO-PRECIPITAÇÃO	72,5	1202,0	251,6	1526,1
Média		218,0	5970,9	547,0	6735,9

ID=identificação do caso; FAB=ferimento por arma branca; FAF=ferimento por arma de fogo; DA=dopamina; DOPAC= ácido 3,4-dihidroxifenilacético; HVA=ácido homovanílico

As médias de concentrações para as três catecolaminas (DA, DOPAC e HVA) são maiores no grupo positivo para COC em todos os segmentos de tecido cerebral.

O teste estatístico não paramétrico de *Mann-Whitney* demonstrou que existe diferença significativa nas médias de concentração de DA apenas no segmento correspondentes aos núcleos da base (p-valor=0,0093, considerado muito significativo). De forma semelhante, foi verificado que existe diferença significativa nas médias de concentração de DOPAC somente em núcleos da base (p-valor=0,0015, considerado muito significativo).

Em relação ao HVA, foi verificado pelo mesmo teste (*Mann-Whitney*) que existe diferença significativa nas médias de concentração em núcleos da base (p-valor=0,0004, considerado extremamente significativo) e córtex próximo aos ventrículos (p-valor=0,0007, considerado extremamente significativo), respectivamente. Quando o teste estatístico foi aplicado às médias das concentrações de dopamina total (soma de DA, DOPAC e HVA) foi verificada diferença significativa nos segmentos correspondentes aos núcleos da base (p-valor=0,0002, considerado extremamente significativo) e córtex próximo aos ventrículos (p-valor=0,0008, considerado extremamente significativo), conforme apresentado na Tabela 39 e nas Figuras 51 e 52.

Tabela 39 - Teste de *Mann-Whitney* comparando as médias de concentrações de DA, DOPAC, HVA e dopamina total nos segmentos de tecido cerebral selecionados para o estudo

Neurotransmissor	p-valor		
	CF x CF	N x N	CV x CV
DA	0,4484	0,0093	0,4315
DOPAC	0,1750	0,0015	0,0777
HVA	0,4059	0,0004	0,0007
Dopamina total	0,2000	0,0002	0,0008

DA=dopamina; DOPAC= ácido 3,4-dihidroxifenilacético; HVA=ácido homovanílico; CF=córtex frontal; N=núcleos da base; CV=córtex próximo aos ventrículos

Figura 51 - Comparação das médias de concentração de dopamina total no segmento núcleos da base e erros padrão (N=18)

Figura 52 - Comparação das médias de concentração de dopamina total no segmento córtex próximo aos ventrículos e erros padrão (N=18)

7.10 Verificação da influência do procedimento médico-hospitalar nas concentrações de catecolaminas

Com o intuito de verificar se a ocorrência de procedimento médico-hospitalar (PMH) recebido pelo grupo de indivíduos com amostras biológicas negativas para COC influenciou nos resultados obtidos nas análises das catecolaminas elegidas, aumentando ou mesmo diminuindo suas concentrações, resultando na diferença significativa observada nos dois grupos, separamos o grupo negativo em dois subgrupos, sendo o primeiro composto pelos indivíduos que foram submetidos a PMH (N=12) e o segundo representados por aqueles que não foram submetidos a tal procedimento (N=8), sendo que um caso foi excluído pelo fato de o PMH constar como indeterminado. Foi verificado

que todas as médias de concentração das três catecolaminas, dopamina (DA), ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA), assim como dopamina total foram maiores no grupo que foi submetido a PMH em todos os segmentos cerebrais. Apesar das médias serem maiores, existe diferença significativa, segundo o teste de *Mann Whitney*, somente para dopamina total em núcleos da base (p -valor=0,0387, considerado significativo), conforme apresentado na Tabela 40 e 41.

Tabela 40 - Distribuição das médias de concentração das catecolaminas no grupo negativo para COC, segundo a ocorrência de procedimento médico hospitalar (PMH)

Catecolamina	Média [ng/g]		
	Córtex Frontal	Núcleos da base	Córtex ventricular
PMH – NÃO			
DA	0,0	10,2	7,6
DOPAC	31,1	52,7	37,3
HVA	86,6	562,3	167,5
Dopamina Total	117,7	625,2	212,5
PMH – SIM			
DA	24,3	33,6	18,6
DOPAC	42,1	230,3	70,7
HVA	56,5	1409,7	150,9
Dopamina Total	122,9	1673,7	240,2

DA=dopamina; DOPAC= ácido 3,4-dihidroxifenilacético; HVA=ácido homovanílico

Tabela 41 - Teste de *Mann Whitney* comparando as médias de concentração de DA, DOPAC, HVA e dopamina total nos segmentos de tecido cerebral no grupo negativo para COC, separados em dois subgrupos, de acordo com a ocorrência de procedimento médico hospitalar

Neurotransmissor	p-valor		
	CF x CF	N x N	CV x CV
DA	NT ¹	0,1678	0,4965
DOPAC	0,9680	0,0582	0,2912
HVA	0,1646	0,0979	0,5714
Dopamina total	0,9692	0,0387	0,8506

DA=dopamina; DOPAC= ácido 3,4-dihidroxifenilacético; HVA=ácido homovanílico ; CF=córtex frontal; N=núcleos da base; CV=córtex próximo aos ventrículos; 1=não testado, média zero no grupo controle (negativo para PMH)

7.11 Comparação entre as concentrações de cocaína total e dopamina total

Foram comparadas as concentrações de cocaína (COC) total em sangue e dopamina total em núcleos da base por teste de correlação de *Spearman*, obtendo-se $r=0,09499$ (probabilidade de r ser significativamente diferente de zero, p -valor= $0,7077$, considerado não significante). A inexistência de correlação também foi observada pelo mesmo teste quando comparadas as concentrações de COC total em núcleos da base e dopamina total no mesmo segmento de tecido, $r=-0,01342$ (p -valor= $0,9579$, considerado não significante).

7.12 Quantificação das indolaminas nas amostras de tecido cerebral

As indolaminas avaliadas neste estudo foram a serotonina (5-HT) e ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), produto final da metabolização da serotonina. Foi observado que a região dos núcleos da base apresenta maior média de concentração de 5-HIAA em relação aos outros segmentos cerebrais.

As concentrações de 5-HT nos três segmentos cerebrais da população de estudo foram desprezíveis, com médias de 2,4, 119,2 e 4,2 ng/g, para córtex frontal, núcleos da base e córtex próximo aos ventrículos, respectivamente, para o grupo negativo e valores ainda menores para o grupo positivo (Tabela 42 e 43). No entanto as concentrações de 5-HIAA foram expressivas, com médias entre 157,0 e 1167,8 ng/g, considerando os três segmentos, para o grupo negativo, e médias entre 126,2 e 1477,1 ng/g, considerando os três segmentos, para o grupo positivo (Tabelas 44 e 45). Nos dois grupos as médias de concentrações foram maiores nos segmentos dos núcleos da base, seguido por córtex próximo aos ventrículos.

As Tabelas 46 e 47 expressam os resultados em termos de serotonina total, ou seja, a soma das concentrações de 5-HT e 5-HIAA. Assim, é possível observar que a soma de serotonina total resultante dos três segmentos apresenta média maior no grupo positivo para cocaína.

Tabela 42 - Distribuição das concentrações de 5-HT em três segmentos cerebrais da população que apresentou amostras negativas para cocaína

ID	Histórico	5-HT [ng/g]			PMH
		Córtex frontal	Núcleos da base	Córtex ventricular	
5	ATROPELAMENTO	18,7	240,3	40,7	S
15	ATROPELAMENTO	0,0	0,0	0,0	S
20	ATROPELAMENTO	0,0	0,0	0,0	N
1	ATROPELAMENTO	0,0	0,0	0,0	S
31	CHOQUE ELÉTRICO	0,0	2056,0	0,0	S
4	ENVENENAMENTO-CARBAMATO	32,6	100,7	34,6	N
26	ENVENENAMENTO-CARBAMATO	0,0	0,0	0,0	S
6	HOMICÍDIO-FAF	0,0	0,0	0,0	S
10	HOMICÍDIO-FAF	0,0	0,0	0,0	S
25	HOMICÍDIO-FAF	0,0	0,0	0,0	S
28	HOMICÍDIO-FAF	0,0	0,0	0,0	I
30	HOMICÍDIO-FAF	0,0	0,0	0,0	S
22	NATURAL-ANEURISMA CARDÍACO	0,0	0,0	0,0	S
36	NATURAL-AVC SUBARACNÓIDE	0,0	105,9	13,5	S
19	NATURAL-BRONCOPNEUMONIA	0,0	0,0	0,0	N
24	NATURAL-ENFARTO FULMINANTE	0,0	0,0	0,0	N
11	NATURAL-HEMORRAGIA DE PÂNCREAS	0,0	0,0	0,0	N
14	OVERDOSE-INALANTES	0,0	0,0	0,0	S
3	SUICÍDIO-ENFORCAMENTO	0,0	0,0	0,0	N
7	SUICÍDIO-ENFORCAMENTO	0,0	0,0	0,0	N
39	SUICÍDIO-ENFORCAMENTO	0,0	0,0	0,0	N
Média		2,4	119,2	4,2	

ID=identificação do caso; PMH=procedimento médico hospitalar; S=Sim; N=Não; I=Indeterminado; FAF=ferimento por arma de fogo; AVC=acidente vascular cerebral; 5-HT=serotonina

Tabela 43 - Distribuição das concentrações de 5-HT em três segmentos cerebrais da população que apresentou amostras positivas para cocaína

ID	Histórico	5-HT [ng/g]			PMH
		Córtex frontal	Núcleos da base	Córtex ventricular	
33	ACIDENTE-PRECIPITAÇÃO- USO DE DROGAS	0,0	0,0	0,0	S
16	ATROPELAMENTO	0,0	0,0	0,0	N
34	ATROPELAMENTO	0,0	24,9	0,0	N
18	HOMICÍDIO-FAB	0,0	84,0	0,0	N
23	HOMICÍDIO-FAF	0,0	0,0	0,0	N
27	HOMICÍDIO-FAF	0,0	0,0	0,0	N
37	HOMICÍDIO-FAF	0,0	15,6	0,0	N
38	HOMICÍDIO-FAF-RESISTÊNCIA À PRISÃO	0,0	0,0	0,0	S
17	INDETERMINADO-CARDIOMEGALIA	0,0	0,0	0,0	N
2	MORTE SÚBITA	0,0	0,0	0,0	N
8	MORTE SÚBITA	0,0	0,0	0,0	N
9	MORTE SÚBITA	0,0	0,0	0,0	N
21	MORTE SÚBITA	0,0	0,0	0,0	N
13	MORTE SÚBITA-USO DE DROGAS	0,0	0,0	0,0	N
32	MORTE SÚBITA-USO DE DROGAS	0,0	21,1	0,0	N
35	MORTE SÚBITA-USO DE DROGAS	0,0	113,6	11,3	S
12	SUICÍDIO-PRECIPITAÇÃO	0,0	0,0	0,0	N
29	SUICÍDIO-PRECIPITAÇÃO	0,0	0,0	0,0	N
Média		0,0	14,4	0,6	

ID=identificação do caso; PMH=procedimento médico hospitalar, S=Sim; N=Não; FAB=ferimento por arma branca; FAF=ferimento por arma de fogo; 5-HT=serotonina

Tabela 44 - Distribuição das concentrações de 5-HIAA em três segmentos cerebrais da população que apresentou amostras negativas para cocaína

ID	Histórico	5-HIAA [ng/g]			PMH
		Córtex frontal	Núcleos da base	Córtex ventricular	
5	ATROPELAMENTO	228,0	4536,3	335,5	S
15	ATROPELAMENTO	152,0	3316,0	274,0	S
20	ATROPELAMENTO	226,0	3534,0	332,0	N
1	ATROPELAMENTO	0,0	1138,0	0,0	S
31	CHOQUE ELÉTRICO	231,8	1397,7	324,6	S
4	ENVENENAMENTO-CARBAMATO	209,8	3332,5	343,6	N
26	ENVENENAMENTO-CARBAMATO	98,0	190,0	156,0	S
6	HOMICÍDIO-FAF	496,0	628,0	112,0	S
10	HOMICÍDIO-FAF	48,8	177,1	64,3	S
25	HOMICÍDIO-FAF	184,0	660,0	380,0	S
28	HOMICÍDIO-FAF	144,6	216,3	95,7	I
30	HOMICÍDIO-FAF	159,2	312,9	316,3	S
22	NATURAL-ANEURISMA CARDÍACO	506,0	690,0	248,0	S
36	NATURAL-AVC SUBARACNÓIDE	70,9	389,4	149,3	S
19	NATURAL-BRONCOPNEUMONIA	0,0	746,0	378,0	N
24	NATURAL-ENFARTO FULMINANTE	0,0	0,0	0,0	N
11	NATURAL-HEMORRAGIA DE PÂNCREAS	158,0	0,0	0,0	N
14	OVERDOSE-INALANTES	78,0	1024,0	168,0	S
3	SUICÍDIO-ENFORCAMENTO	0,0	268,0	0,0	N
7	SUICÍDIO-ENFORCAMENTO	216,0	1024,0	150,0	N
39	SUICÍDIO-ENFORCAMENTO	90,5	944,4	164,0	N
Média		157,0	1167,8	190,1	

ID=identificação do caso; PMH=procedimento médico hospitalar; S=Sim; N=Não; I=Indeterminado; FAF=ferimento por arma de fogo; AVC=acidente vascular cerebral; 5-HIAA=ácido 5-hidroxiindolacético

Tabela 45 - Distribuição das concentrações de 5-HIAA em três segmentos cerebrais da população que apresentou amostras positivas para cocaína

ID	Histórico	5-HIAA [ng/g]			PMH
		Córtex frontal	Núcleos da base	Córtex ventricular	
33	ACIDENTE-PRECIPITAÇÃO- USO DE DROGAS	91,7	657,2	260,4	S
16	ATROPELAMENTO	200,0	2920,0	282,0	N
34	ATROPELAMENTO	51,6	1135,5	100,7	N
18	HOMICÍDIO-FAB	406,0	5796,0	698,0	N
23	HOMICÍDIO-FAF	172,0	600,0	864,0	N
27	HOMICÍDIO-FAF	63,6	407,6	217,7	N
37	HOMICÍDIO-FAF	158,0	707,4	53,8	N
38	HOMICÍDIO-FAF-RESISTÊNCIA À PRISÃO	186,5	1507,4	384,1	S
17	INDETERMINADO-CARDIOMEGALIA	204,0	720,0	380,0	N
2	MORTE SÚBITA	128,0	1366,0	166,0	N
8	MORTE SÚBITA	112,0	1766,0	440,0	N
9	MORTE SÚBITA	88,0	1590,0	1098,0	N
21	MORTE SÚBITA	76,0	1592,0	782,0	N
13	MORTE SÚBITA-USO DE DROGAS	84,0	1756,0	430,0	N
32	MORTE SÚBITA-USO DE DROGAS	58,9	2234,4	231,4	N
35	MORTE SÚBITA-USO DE DROGAS	104,4	561,1	138,4	S
12	SUICÍDIO-PRECIPITAÇÃO	0,0	386,0	0,0	N
29	SUICÍDIO-PRECIPITAÇÃO	87,6	884,4	72,4	N
Média		126,2	1477,1	366,6	

ID=identificação do caso; PMH=procedimento médico hospitalar; S=Sim; N=Não; FAB=ferimento por arma branca; FAF=ferimento por arma de fogo; 5-HIAA=ácido 5-hidroxiindolacético

Tabela 46 - Distribuição das concentrações de serotonina total em três segmentos cerebrais da população que apresentou amostras negativas para cocaína

ID	Histórico	Serotonina Total – ($\Sigma_{5-HT, 5-HIAA}$) [ng/g]			
		Córtex Frontal	Núcleos da base	Córtex ventricular	Soma (3 segmentos)
5	ATROPELAMENTO	246,7	4776,6	376,2	5399,5
15	ATROPELAMENTO	152,0	3316,0	274,0	3742,0
20	ATROPELAMENTO	226,0	3534,0	332,0	4092,0
1	ATROPELAMENTO	0,0	1138,0	0,0	1138,0
31	CHOQUE ELÉTRICO	231,8	3453,7	324,6	4010,2
4	ENVENENAMENTO-CARBAMATO	242,4	3433,2	378,2	4053,8
26	ENVENENAMENTO-CARBAMATO	98,0	190,0	156,0	444,0
6	HOMICÍDIO-FAF	496,0	628,0	112,0	1236,0
10	HOMICÍDIO-FAF	48,8	177,1	64,3	290,2
25	HOMICÍDIO-FAF	184,0	660,0	380,0	1224,0
28	HOMICÍDIO-FAF	144,6	216,3	95,7	456,6
30	HOMICÍDIO-FAF	159,2	312,9	316,3	788,4
22	NATURAL-ANEURISMA CARDÍACO	506,0	690,0	248,0	1444,0
36	NATURAL-AVC SUBARACNÓIDE	70,9	495,3	162,8	729,0
19	NATURAL-BRONCOPNEUMONIA	0,0	746,0	378,0	1124,0
24	NATURAL-ENFARTO FULMINANTE	0,0	0,0	0,0	0,0
11	NATURAL-HEMORRAGIA DE PÂNCREAS	158,0	0,0	0,0	158,0
14	OVERDOSE-INALANTES	78,0	1024,0	168,0	1270,0
3	SUICÍDIO-ENFORCAMENTO	0,0	268,0	0,0	268,0
7	SUICÍDIO-ENFORCAMENTO	216,0	1024,0	150,0	1390,0
39	SUICÍDIO-ENFORCAMENTO	90,5	944,4	164,0	1198,9
Média		159,5	1287,0	194,3	1640,8

ID=identificação do caso; FAF=ferimento por arma de fogo; AVC=acidente vascular cerebral; 5-HT=serotonina; 5-HIAA=ácido 5-hidroxiindolacético

Tabela 47 - Distribuição das concentrações de serotonina total em três segmentos cerebrais da população que apresentou amostras positivas para cocaína

ID	Histórico	Serotonina Total – ($\Sigma_{5-HT, 5-HIAA}$) [ng/g]			
		Córtex Frontal	Núcleos da base	Córtex ventricular	Soma (3 segmentos)
33	ACIDENTE-PRECIPITAÇÃO-USO DE DROGAS	91,7	657,2	260,4	1009,4
16	ATROPELAMENTO	200,0	2920,0	282,0	3402,0
34	ATROPELAMENTO	51,6	1160,4	100,7	1312,7
18	HOMICÍDIO-FAB	406,0	5880,0	698,0	6984,0
23	HOMICÍDIO-FAF	172,0	600,0	864,0	1636,0
27	HOMICÍDIO-FAF	63,6	407,6	217,7	688,9
37	HOMICÍDIO-FAF	158,0	723,0	53,8	934,8
38	HOMICÍDIO-FAF-RESISTÊNCIA À PRISÃO	186,5	1507,4	384,1	2078,0
17	INDETERMINADO-CARDIOMEGALIA	204,0	720,0	380,0	1304,0
2	MORTE SÚBITA	128,0	1366,0	166,0	1660,0
8	MORTE SÚBITA	112,0	1766,0	440,0	2318,0
9	MORTE SÚBITA	88,0	1590,0	1098,0	2776,0
21	MORTE SÚBITA	76,0	1592,0	782,0	2450,0
13	MORTE SÚBITA-USO DE DROGAS	84,0	1756,0	430,0	2270,0
32	MORTE SÚBITA-USO DE DROGAS	58,9	2255,4	231,4	2545,8
35	MORTE SÚBITA-USO DE DROGAS	104,4	674,7	149,7	928,7
12	SUICÍDIO-PRECIPITAÇÃO	0,0	386,0	0,0	386,0
29	SUICÍDIO-PRECIPITAÇÃO	87,6	884,4	72,4	1044,3
Média		126,2	1491,5	367,2	1984,9

ID=identificação do caso; FAB=ferimento por arma branca; FAF=ferimento por arma de fogo; 5-HT=serotonina; 5-HIAA=ácido 5-hidroxiindolacético

Retomando os resultados em referência ao 5-HIAA, observamos que as médias de concentrações foram maiores nos segmentos cerebrais referentes aos núcleos da base e córtex próximo aos ventrículos do grupo com amostras positivas para COC, 1477,1 e 366,6 ng/g, respectivamente, contra 1167,8 e 190,1 ng/g para núcleos da base e córtex próximo aos ventrículos, respectivamente, no grupo com amostras negativas para COC (Tabelas 44 e 45). No entanto, foi verificado por teste de *Mann Whitney* que não existe diferença significativa nas médias de concentração nos dois grupos, em relação ao córtex frontal (p-valor=0,4989, considerado não significativo), aos núcleos da base (p-valor=0,1180, considerado não significativo) e córtex próximo aos ventrículos (p-valor= 0,0714, considerado não significativo).

8 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

8.1 Perfil da população de estudo

A população de estudo caracterizada representa cerca de 1 % das necropsias realizadas no período de coleta, compreendido entre abril de 2009 e maio de 2010. O perfil demográfico representado em sua maioria por indivíduos jovens, do sexo masculino, corrobora com estudo que demonstra este gênero e faixa etária como sendo a população mais vulnerável ao envolvimento com morte violenta (PAULA, RUZZENE, MARTINIS, 2008). Além da idade e gênero, a raça e a complexão dos indivíduos foram observadas pelo fato de representarem variáveis importantes nos fenômenos pós-mortais e na toxicocinética da cocaína (COC), como por exemplo, a dificuldade de observação das hipóstases em indivíduos da raça negra e as alterações na metabolização em indivíduos obesos.

A maioria dos indivíduos que compôs o estudo pertencia à raça branca e apresentou complexão corporal mediana. Assim, é provável que estes fatores não representaram variáveis de confusão na interpretação dos achados, ressalvado o fato da classificação quanto à raça ser complexa, principalmente em nosso país, onde a miscigenação predomina gerando grande dificuldade neste tipo de classificação.

O mesmo perfil demográfico (maioria jovem, do sexo masculino e raça branca) foi demonstrado em estudo realizado na mesma instituição (Instituto Médico Legal de São Paulo – região central) em 1996, indicando que provavelmente este perfil perdure até os dias atuais (LIMA, 1996).

A classificação dos históricos pode ser realizada de duas formas, quanto à causa jurídica, por exemplo, homicídio por ferimento por arma de fogo e quanto à causa médica, por exemplo, hemorragia interna ou trauma crânio encefálico. Optamos por classificar de acordo com a causa jurídica baseado na observação do médico legista combinado com as informações contidas no boletim de ocorrência, no caso das mortes classificadas como “causa natural”, o boletim de ocorrência

constava como morte súbita, no entanto a causa natural foi determinada pelos achados necroscópicos. Assim deixamos como morte súbita, somente aquelas onde não foi possível determinar de forma inequívoca sua causa no momento da necropsia.

Apesar da ampla distribuição de causa *mortis*, o homicídio apresentou a maior prevalência (25,6%) seguida por atropelamento (15,4%), desta forma o homicídio representou a principal causa jurídica de morte na população de estudo selecionada. Apesar do tamanho da amostra ser reduzido dificultando a extrapolação para a população submetida à necropsia no Estado de São Paulo, este resultado corrobora estudo recente que estimou 2042 vítimas de homicídio no ano de 2005 demonstrando que esta foi a principal causa jurídica de morte (ANDREUCCETTI et al., 2009).

8.2 Seleção do método analítico para quantificação de cocaína e benzoilecgonina

A eletroforese capilar foi estudada como possível técnica analítica a ser empregada na identificação e quantificação da cocaína e da benzoilecgonina.

Os dois modos de separação (eletroforese capilar de zona e cromatografia eletrocínética micelar) foram adequados para a separação de cocaína e benzoilecgonina, no entanto a eletroforese capilar de zona foi selecionada para o aprofundamento do estudo da técnica devido à maior robustez e à possibilidade de inclusão de outros fármacos estimulantes do sistema nervoso central que apresentam aminas protonáveis e, portanto passíveis de serem analisados como cátions. A inclusão de outros estimulantes no método permitiria a avaliação de possíveis interferentes e, ainda abrangeria a aplicação do mesmo em análise toxicológica forense.

O pH 2,1 empregado na eletroforese capilar de zona, foi escolhido considerando a constante de dissociação (pKa) da benzoilecgonina e da cocaína, a primeira possui dois valores de pKa 2,25 e 11,50, enquanto a segunda apresenta

valor de 8,59, assim no valor de pH escolhido os analitos apresentaram amina protonada permitindo a separação como cátions. A adição de trietilamina ao eletrólito de corrida concorre com os analitos protonados na adsorção à parede do capilar melhorando a simetria do pico. A adsorção dos analitos na ausência de trietilamina se deve ao fato de a parede do capilar apresentar grupos silanóis de caráter ácido, em meio aquoso alguns desses grupos se tornam ionizados interagindo com os analitos carregados positivamente. Portanto, o condicionamento com o eletrólito de corrida que contém trietilamina bloqueia os grupos silanóis livres e conseqüentemente impede a interação dos analitos protonados diminuindo o alargamento e assimetria dos picos. O aumento da voltagem de 15 para 30 kV aumentou a velocidade de migração dos analitos, como resultado se obteve um menor tempo de análise.

Neste estudo de aplicação da técnica foi empregada urina como matriz biológica, pois neste período ainda não havíamos iniciado a coleta de humor vítreo, tecido encefálico e sangue no Instituto Médico Legal. Além disso, esta matriz foi selecionada por apresentar maiores concentrações dos analitos de interesse e ser relativamente simples o processo de preparação da amostra.

Nas amostras de urina foi empregado como padrão interno o benzimidazol devido à disponibilidade técnica do laboratório, não comprometendo o método pelo fato de esta substância apresentar amina protonável e ser extraída juntamente com os outros analitos.

Todas as amostras autênticas de urina provenientes de cadáveres apresentaram co-migração da cocaína com outro analito, apesar de a identificação ter sido possível com o emprego do detector de arranjo de diodos a quantificação da cocaína estaria comprometida. O pico referente ao analito desconhecido provavelmente corresponde ao cocaetileno, pois todas as amostras eram positivas para etanol e o cocaetileno apresenta estrutura bastante similar à cocaína. No entanto, como não dispúnhamos da solução-padrão de referência de cocaetileno esta hipótese não pôde ser comprovada. Outra limitação observada foi a dificuldade de reproduzir os resultados nas mesmas condições de análise, ou seja, observamos que a técnica apresentou baixa robustez e reprodutibilidade inadequada ao nosso

objetivo. Assim, buscamos a cromatografia líquida de alta eficiência como alternativa factível para esta investigação.

É importante enfatizar que a metodologia a ser utilizada depende das condições do laboratório, sendo prerrogativa do analista a escolha do método que deve sempre ser realizado à luz das normas que regem cientificamente esta questão e observar os princípios que norteiam as análises toxicológicas com finalidade forense, qual seja: metodologia que propicie resultado inequívoco e laudo irrefutável (CHASIN, 2004). Assim, optamos pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector por arranjo de diodos (HPLC-DAD) por se apresentar aplicável aos nossos objetivos, constituindo técnica consagrada na análise de fármacos e metabólitos, e por sua disponibilidade técnica e logística (equipamento disponível na mesma instituição onde foi realizado os estudos de neuroquímica *post mortem*). Desta forma, desenvolvemos e validamos os métodos de análise de cocaína e benzoilecgonina nas três matrizes selecionadas para o estudo por HPLC-DAD, sendo que os resultados indicam a adequabilidade da técnica à finalidade desta investigação.

Para o desenvolvimento do método em humor vítreo foi necessário encontrar uma alternativa para o emprego da amostra referência negativa, visto que as quantidades obtidas nas coletas em cadáver equivalem em média a 5 mL (somando-se os dois olhos), dificultando perfazer uma quantidade adequada de matriz para as várias repetições que requerem o desenvolvimento e a validação do método analítico. Assim, a matriz empregada como referência negativa foi humor vítreo de porco misturado às amostras de humor vítreo humano.

Verificamos que o humor vítreo de porco apresenta aspecto diferente do observado em humanos, com consistência mais viscosa, provavelmente por apresentar maior concentração de ácido hialurônico e, por vezes, turvo. Ainda, a coleta é mais trabalhosa devido ao fato de a esclerótica apresentar maior resistência na introdução da agulha. No entanto, os porcos foram empregados em estudo de farmacocinética de drogas de abuso, apresentando boa correlação com os achados em humanos, representando boa alternativa quando não se é possível desenvolver a investigação em modelo humano (BRUNET et al., 2006).

Após o procedimento de extração da amostra de humor vítreo foi verificado que o perfil cromatográfico mostrou-se livre de interferentes nos tempos de retenção dos analitos de interesse demonstrando que a preparação da amostra referência negativa foi adequada para emprego na validação do método.

Apesar da relativa dificuldade em se padronizar uma amostra referência negativa no desenvolvimento do método analítico, o humor vítreo apresenta vantagens por constituir matriz “limpa”, anatomicamente isolada e que demora maior tempo para sofrer os processos putrefativos decorrentes da cessação do metabolismo energético em comparação com o sangue. Além disso, é uma matriz de fácil coleta e potencial para concentrar os analitos, visto que o compartimento ocular perderá água por difusão pelo fenômeno de desidratação pós-mortal (LIMA, 1996; MADEA; MUSSHOFF, 2007).

Ao contrário do humor vítreo, o tecido encefálico é matriz complexa e o tratamento da amostra deve ser cuidadoso de forma a remover possíveis interferentes que dificultarão a quantificação dos analitos. Assim, foi necessário homogeneizar as amostras de tecido encefálico com solução tampão fosfato de sódio, pH 5,0-6,0, e subsequente centrifugação durante 70 minutos em temperatura de 4°C para separação do sobrenadante. A refrigeração se apresentou efetiva na separação, pois este tecido tem característica lipídica apresentando menor solubilidade em baixas temperaturas. Adicionalmente o pH ácido do tampão garantiu a migração dos analitos ao sobrenadante aquoso por se apresentarem ionizados neste valor de pH. Posteriormente, o sobrenadante contendo os analitos foi submetido à extração em fase sólida, resultando num extrato limpo, livre de interferentes nos tempos de retenção das substâncias de interesse, indicando que o procedimento foi efetivo.

A extração dos analitos de amostras de sangue requer a separação de proteínas que entopem a coluna de extração em fase sólida. Vários reagentes poderiam ser empregados na precipitação de proteínas, dentre eles a acetonitrila, o metanol e as soluções resultantes destes solventes com sulfato de zinco. Em nosso método escolhemos a mistura metanol/sulfato de zinco por que esta solução foi referida como sendo a mais eficiente no processo de precipitação de proteínas (BOUZAS et al., 2009). A solução resultante da mistura do agente precipitante com a

matriz apresenta pH próximo a 6,0 que favorece a ionização e solvatação dos analitos no sobrenadante (COLLINS; MUTO; SPIEHLER, 1992). O perfil cromatográfico demonstrou que o procedimento de separação e extração dos analitos do sangue cadavérico foi eficaz.

A amostra de sangue referência negativa foi composta por uma mistura de sangues coletados de três compartimentos com o objetivo de padronizar uma matriz que representasse as amostras provenientes de qualquer um dos locais, câmara cardíaca (sangue central), da veia femoral e da subclávia (periférico) mimetizando, desta forma, a prática. Dependendo do tipo de morte é impossível a coleta de determinados locais, como exemplo, citamos um caso incluído neste trabalho em que o cadáver vítima de atropelamento apresentou trauma de bacia e a coleta de sangue na veia femoral foi impossível, também observamos que a coleta de sangue da subclávia constitui tarefa difícil havendo casos que o colapso da veia impossibilita o procedimento. Em alguns casos a coleta de sangue cardíaco também é inviável, havendo apenas a opção do emprego de sangue proveniente da cavidade torácica. Em relação ao sangue cadavérico é importante ressaltar que se trata de matriz extremamente complexa, visto que sua composição sofre influência do tipo e maneira de morte.

8.3 Validação dos métodos de análise de cocaína e benzoilecgonina nas matrizes biológicas

Os métodos desenvolvidos em humor vítreo, tecido encefálico e sangue para determinação de cocaína e benzoilecgonina apresentaram valor de coeficiente de determinação adequado ($r^2 \geq 0,98$) indicando linearidade satisfatória, estando de acordo com as recomendações aplicadas aos métodos bioanalíticos. Adicionalmente, os outros parâmetros de confiança, como especificidade, precisão intra e interensaio, recuperação, limite de detecção e quantificação atenderam às especificações normalmente recomendadas para matrizes biológicas (ANVISA, 2003; CAUSON, 1997; CHASIN et al., 1998; PETERS, MAURER, 2002; PETERS,

DRUMMER, MUSSHOFF, 2007; UNODC, 2009), além de serem aplicáveis às amostras autênticas selecionadas e ao objetivo desta investigação.

Nas amostras de sangue não foi realizada a avaliação do parâmetro de precisão, pois a quantificação nesta matriz foi sugestão da banca de qualificação nos restando pouco tempo e recursos técnicos limitados para a conclusão desta etapa. Desta forma, contemplamos os parâmetros de confiança linearidade, recuperação, limite de detecção e quantificação na impossibilidade de se avaliar todos.

Preconiza-se que a exatidão do método bioanalítico, definida como a medida do erro sistemático representando o grau de concordância entre os resultados individuais determinados pelo método e os valores aceitos como referência, expressa pela tendenciosidade (diferença entre a concentração obtida e a concentração real dividida pela concentração real) (CAUSON, 1997; PETERS, MAURER, 2002), seja realizada por meio de análise de amostra de referência certificada (UNODC, 2009). No entanto, este tipo de amostra não está disponível para venda pelos órgãos competentes, de forma que não foi possível avaliar este parâmetro.

Apesar do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia ou *National Institute of Standards and Technology* (NIST) dispor de amostras de referência certificada com concentrações certificadas de benzoilecgonina em urina, cabelo (WELCH, 1995) e em soro humano (TAI, 2010), o mesmo não ocorre para humor vítreo, tecido encefálico e sangue total (cadavérico). Como estes tipos de amostras raramente estão disponíveis quando os analitos de interesse constituem drogas de abuso, muitos laboratórios forenses empregam amostras controle em três concentrações diferentes e ensaiam da mesma forma que o estudo de precisão, adotando como critério de aceitação o mesmo aplicado neste parâmetro (precisão) (UNODC, 2009). No entanto, consideramos que este critério, aplicado na ausência de amostras de referência certificada, não avalia adequadamente a exatidão e não justifica o custo de material analítico (padrões, colunas de extração em fase sólida, reagentes), considerando que enfrentamos dificuldades na aquisição dos padrões certificados de cocaína e benzoilecgonina em decorrência de uma atualização (RDC 79 de Novembro/2008) na Portaria Nº 344 de 12 de maio de 1998 que trata sobre o

Regulamento Técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial em nosso país, que resultou em diminuição no número de empresas importadoras e custo praticamente proibitivo à realidade desta investigação.

Considerando que a escolha da técnica de extração e/ou concentração a ser utilizada deve levar em conta características como a simplicidade, rapidez, baixo custo, obtenção de extratos relativamente livres de interferentes, apresentando recuperações altas, com boa exatidão e precisão, para os analitos de interesse (QUEIROZ, COLLINS, JARDIM, 2001), concluímos que os valores de recuperação obtidos na extração das matrizes biológicas selecionadas para o estudo indicaram que a extração em fase sólida constituiu técnica adequada na análise de cocaína e benzoilecgonina. Da mesma forma, os parâmetros de confiança obtidos são absolutamente satisfatórios para a finalidade analítica, objeto deste trabalho.

8.4 Aplicação do método e quantificação de cocaína e benzoilecgonina nas matrizes selecionadas para o estudo

Os perfis cromatográficos de algumas amostras autênticas foram inseridos nos resultados juntamente com um breve histórico, de forma a demonstrar a aplicação dos métodos em diferentes condições de exposição à cocaína. Adicionalmente, alguns históricos foram cotejados na presente discussão com as concentrações de neurotransmissores determinadas na tentativa de interpretar os resultados da neuroquímica *post mortem*.

As amostras de tecido encefálico que apresentaram concentrações de cocaína (COC) acima de 6,00 µg/g, foram re-ensaidas pesando-se apenas 1 g do tecido, para que fosse possível a intrapolação à equação de reta obtida na curva analítica construída no intervalo dinâmico entre 0,50 e 5,00 µg/g, sendo a concentração obtida multiplicada por 5 de forma a corrigir a diferença da massa do tecido. De forma semelhante, foi realizada diluição das amostras de sangue que apresentaram concentrações acima de 6,00 µg/mL para cocaína e benzoilecgonina. No entanto, optamos por apresentar os perfis cromatográficos originais para melhor

visualização e comparação com os casos que apresentaram concentrações mais baixas.

Aproximadamente metade da população selecionada apresentou resultados positivos para COC, demonstrando uma prevalência expressiva de envolvimento desta substância com mortes violentas. Dentre os casos positivos, foi verificado que os principais históricos relacionados foram morte súbita (18%) e homicídio (13%). Este achado é semelhante ao verificado em levantamento realizado no Núcleo de Toxicologia Forense do Instituto Médico Legal de São Paulo entre os anos de 2003 e 2004, em que as principais causas jurídicas de morte foram homicídio e intoxicação aguda (CARVALHO, 2006). Além disso, a maior prevalência de positivos entre indivíduos jovens, do sexo masculino, confirma o demonstrado nos usuários da base livre de COC (RIBEIRO et al., 2004). Este resultado pode indicar que as políticas de controle ao uso de COC, cujos investimentos são mais voltados à repressão, não são efetivas para restringir o envolvimento desta droga de abuso com as mortes violentas e, conseqüentemente, com os delitos.

A ampla faixa de concentração obtida na quantificação dos analitos (de 0,21 a 5,91 $\mu\text{g/mL}$ e de 0,00 a 10,97 $\mu\text{g/mL}$ para BE e COC, respectivamente, em humor vítreo; de 0,28 a 34,74 $\mu\text{g/mL}$ e de 0,00 a 24,43 $\mu\text{g/mL}$ para BE e COC, respectivamente, em sangue) é justificada pela heterogeneidade da população de estudo, visto que houve diferentes maneiras de exposição à cocaína.

Apesar de ser esperada hidrólise química da cocaína em pH alcalino, não foi verificada correlação entre os valores de pH do humor vítreo e a razão de concentrações de BE e COC (BE/COC), a correlação foi procedida pela razão porque os dois analitos são interdependentes, assim a formação de BE é influenciada também pelo tempo transcorrido entre a exposição e a coleta da amostra, pelo intervalo pós-mortal e pela hidrólise enzimática e difusão da BE do sangue para o humor vítreo.

Considerando as concentrações determinadas em tecido encefálico, os resultados demonstram que não existe diferença significativa nas concentrações dos analitos nos três segmentos encefálicos. Este achado pós-mortal corrobora o achado *in vivo*, no qual foi demonstrado, através de tomografia por emissão de pósitrons, que a COC se distribui para regiões desprovidas de transportadores de

dopamina (DA), como é o caso do cerebelo, com perfil semelhante à distribuição no estriato (FOWLER et al., 2001). Assim, se o objetivo for apenas determinar a presença e concentração de cocaína e benzoilecgonina, podemos interpretar que qualquer um dos três segmentos pode ser proposto num modelo de coleta.

Comparando as concentrações do fármaco, verificamos que a média das concentrações de cocaína em sangue (2,92 µg/mL, DP=6,309) não apresentou diferença significativa (p-valor=0,5062) em relação à média das concentrações em humor vítreo (1,71 µg/mL, DP=2,817), o mesmo sendo observado quando comparadas as médias de concentrações nas três matrizes (sangue=2,92 µg/mL, DP=6,309; humor vítreo=1,71 µg/mL, DP=2,817; tecido encefálico=3,09 µg/g, DP=5,824) por teste ANOVA não paramétrico (p-valor= 0,4577). Ainda foi testada a diferença de médias para cocaína total em sangue e humor vítreo, soma das concentrações de cocaína e benzoilecgonina, na tentativa de minimizar os efeitos de metabolização pós-mortal do fármaco, e para este parâmetro também não houve diferença significativa (p-valor=0,9622), assim como quando testada a diferença de médias correspondentes às três matrizes (sangue=9,04 µg/mL, DP=16,560; humor vítreo=3,09 µg/mL, DP=4,047; tecido encefálico=3,96 µg/g, DP=6,756) por ANOVA não paramétrico (p-valor=0,6892). Estes resultados se assemelham com os achados publicados há cerca de uma década, onde foi demonstrado que as concentrações de COC e cocaetileno (CE) presentes em humor vítreo (HV) foram representativas das concentrações sanguíneas, sendo verificado que não há diferença significativa entre as concentrações médias de COC (0,613 µg/mL, DP=0,994) e CE (0,027 µg/mL, DP= 0,590) determinadas em HV e as concentrações médias determinadas em sangue (0,489 µg/mL, DP=1,204 e 0,022 µg/mL, DP= 0,055 µg/mL para COC e CE, respectivamente). Neste mesmo trabalho foi verificada diferença significativa para as médias de concentrações de benzoilecgonina (BE) em humor vítreo (0,989 µg/mL, DP=1,597) e sangue (1,941 µg/mL, DP=2,912) (MACKEY-BOJACK; KLOSS; APPLE, 2000) diferindo de nossos resultados, visto que, apesar da média de concentração de benzoilecgonina em sangue ser expressivamente maior (6,12 µg/mL, DP=10,885) em relação ao humor vítreo (1,39 µg/mL, DP=1,388), não houve diferença significativa nas médias das concentrações dos dois compartimentos (p-valor=0,5584).

Comparando as concentrações de cocaína (COC) em termos de correlação, verificamos moderada correlação entre sangue e humor vítreo ($r=0,6636$), sangue e tecido encefálico ($r=0,6517$) e forte correlação entre humor vítreo e encéfalo ($r=0,9086$). Resultados semelhantes foram observados nas comparações de cocaína total, com moderada correlação entre sangue e humor vítreo ($r=0,6577$), sangue e tecido encefálico ($r=0,6808$) e forte correlação entre humor vítreo e encéfalo ($r=0,7589$). Quando comparadas as concentrações apenas de benzoilecgonina (BE), o teste de diferença de médias (*Mann-Whitney*) indicou que não existe diferença significativa ($p\text{-valor}=0,5584$) entre as médias referentes ao sangue (6,12, DP=10,885) e ao humor vítreo (1,39, DP=1,378), ainda foi verificada forte correlação entre sangue e humor vítreo ($r=0,7544$), sendo que a comparação dos outros compartimentos indica fraca correlação, sangue e tecido encefálico ($r=0,5413$) e humor vítreo e tecido encefálico ($r=0,5139$). Nossos resultados de correlação se aproximam aos de outros autores que demonstraram que a concentração de COC e seus produtos de hidrólise presentes no humor vítreo e sangue femoral apresentaram alta correlação e isto também foi observado entre humor vítreo e sangue cardíaco e entre sangue cardíaco e sangue femoral (DUER; SPITZ; MACFARLAND, 2006) e ainda foi verificado que as concentrações do humor vítreo se correlacionam com o sangue, tanto para benzoilecgonina ($r=0,763$) como para cocaína ($r=0,854$) (MACKEY-BOJACK; KLOSS; APPLE, 2000).

As fracas correlações em relação ao sangue *versus* tecido encefálico e humor vítreo *versus* tecido encefálico, observadas em relação às concentrações de BE se justificam pela hidrossolubilidade deste metabólito que impede sua difusão através da barreira hemato-encefálica. Assim, as concentrações encefálicas de BE refletem às concentrações que havia nos momentos imediatamente anteriores à morte, visto que o encéfalo tem baixa atividade enzimática e demora maior tempo para sofrer às alterações pós-mortais (STIMPFL; REICHEL, 2007).

As maiores concentrações de BE presentes em sangue se justificam pela extensa degradação da COC por hidrólise espontânea e por ação das carboxilesterases hepáticas. Em comparação com o humor vítreo, a BE presente no sangue atingiria somente em pequenas proporções a câmara ocular por sua maior polaridade. Adicionalmente, após a morte a BE deve apresentar maior afinidade ao

sangue, devido ao fenômeno de autólise que resultaria em pH ácido. Menores concentrações de BE em humor vítreo também foram verificadas por Mackey-Bojack; Kloss; Apple (2000) e por estudo recente que avaliou 21 casos positivos para cocaína, sendo a média de concentração de BE igual a 1,39 µg/mL em humor vítreo contra 3,7 µg/mL em sangue (LUCENA et al., 2010).

A respeito das concentrações de BE (1,39 µg/mL, DP=1,39) determinadas em humor vítreo, inferimos que as mesmas estariam relacionadas com a hidrólise espontânea devido ao pH alcalino observado na maioria das amostras (média=7,8, DP=0,73) e também ao espaço temporal entre a administração da droga e a coleta da matriz, sendo que concentrações maiores em relação às de COC indicariam que o uso se deu há mais tempo quando comparado com indivíduos que apresentaram concentrações maiores de COC em relação à BE. Em resumo, as concentrações de BE poderiam estar mais relacionadas ao intervalo temporal de uso do que ao processo de redistribuição *post mortem* (RPM). Para testar esta inferência, entretanto, seria necessário um estudo de tempo-dependência em relação à RPM desse analito, considerando o fenômeno da desidratação pós-mortal em que o humor vítreo sofre a diminuição do conteúdo de água, podendo resultar na concentração dos analitos.

Em dois casos de intoxicação aguda (casos de identificação 32 e 35) foram observadas concentrações elevadas de COC em tecido encefálico (20,55 e 16,57 µg/g correspondente à média dos três segmentos analisados) e em sangue (13,15 e 24,43 µg/mL). Altas concentrações também foram determinadas em caso de intoxicação aguda envolvendo indivíduo de nacionalidade japonesa, onde foram reportadas concentrações de 41,1 µg/g de COC e 5,8 µg/g de BE em tecido encefálico e de 19,4 µg/mL de COC e 28,5 µg/mL de BE em sangue cardíaco (TAKEKAWA, 2005).

As altas concentrações de COC em tecido encefálico podem ser explicadas pela acumulação da COC neste tecido devido à sua polaridade e também pela COC promover a acidez do tecido, por sua propriedade vasoconstrictora, diminuindo assim o fluxo sanguíneo e, conseqüentemente a remoção de CO₂ (HEIEN et al., 2005). De qualquer forma, o fato do tecido encefálico representar o alvo de ação do fármaco e apresentar maiores concentrações médias de COC indicam que esta é

uma matriz a ser considerada no esclarecimento dos casos em que se suspeita o envolvimento desta substância.

É importante considerar que a dose letal do fármaco pode variar muito. É referida intoxicação aguda com dose de 30 mg por via nasal, enquanto são descritos usuários crônicos que utilizam até 5 g da droga diariamente, sendo referidas concentrações sanguíneas tóxicas entre 0,25 a 5,0 µg/mL, adotando-se como concentração fatal clássica valores $\geq 1,0$ µg/mL de sangue (TAKEKAWA, 2005). Desta forma, estabelecer uma determinada concentração na matriz biológica que comprove que a morte se deu pela intoxicação aguda constitui um grande desafio à toxicologia forense sendo que qualquer concentração de cocaína (COC) pode ser potencialmente tóxica devido ao fato de muitos indivíduos apresentarem resposta farmacológica intensa com baixas doses, enquanto outros toleram altas doses sem consequência graves (LUCENA et al., 2010). Para ilustrar este fato citamos o caso de Identificação 13 que se refere a indivíduo do sexo feminino, 24 anos. O histórico do caso constava o uso de COC com amigos quando morreu subitamente, ou seja, o histórico se referia à morte súbita por *overdose*, sendo que o cadáver apresentou dedos cianóticos, pulmão *bolhoso* e congesto, face e conjuntiva congesta. Apesar dos elementos sugerirem a intoxicação aguda e as concentrações sanguíneas de COC e BE corresponderem a 1,04 e 0,63 µg/mL, confirmarem a suspeita, as concentrações determinadas em humor vítreo foram de 0,12 e 0,21 µg/mL de COC e BE, respectivamente, e 0,26 µg/g de COC em tecido encefálico correspondente aos núcleos da base. A comparação deste caso com o de identificação 32, em que as características do indivíduo (sexo feminino, jovem, compleição mediana), os achados necroscópicos e as condições de óbito foram semelhantes, mas com concentrações de COC muito diferentes (13,15 µg/mL de sangue, 4,66 µg/mL de humor vítreo e 17,61 µg/g de tecido correspondente aos núcleos da base), fortalece o argumento de que em muitas situações, a avaliação das concentrações dos analitos em uma única matriz não é suficiente para comprovar a causa ou a maneira do óbito. Ainda, cotejando os casos citados (Identificação 13 e 32) é possível aventar a possibilidade de que o primeiro se referiu ao uso eventual, enquanto o segundo ao uso crônico com o fenômeno farmacológico de neuroadaptação.

Seguindo a linha de pensamento apresentada acima, comparamos os casos de Identificação 8 e 13, o primeiro se refere a indivíduo do sexo masculino, 20 anos, encontrado sem vida em casa, apresentou como características necroscópicas cabeça e dedos cianóticos, sangue no nariz e conjuntiva congesta, com intervalo pós-mortal (IPM) de aproximadamente 6 horas; o segundo caso (Identificação 13) detalhado acima (jovem, sexo feminino, 24 anos) apresentou IPM <10 horas, o que torna estes dois casos particularmente similares é o fato de as concentrações de cocaína em sangue apresentar valores maiores que as concentrações de benzoilecgonina, esta relação COC/BE > 1 em sangue só foi verificada nestes dois casos. Apesar de o caso de Identificação 32 apresentar altas concentrações de COC em sangue (13,15 µg/mL), as concentrações de BE são ainda maiores (15,03 µg/mL) e as concentrações de dopamina total em núcleos da base são semelhantes nos três casos (6464, 4082 e 6358 ng/g para os casos de Identificação 8, 13 e 32, respectivamente). Assim, poder-se-ia inferir que os dois primeiros casos (8 e 13) se referem à *overdose* em situação de uso eventual onde a tolerância toxicocinética (indução enzimática) e toxicodinâmica (neuroadaptação) ainda não se instalou e o terceiro caso (32) se refere à *overdose* em caso de usuário crônico. Esta inferência ilustra que a investigação de um caso de intoxicação deve ser pautada na avaliação de diferentes parâmetros como concentrações dos analitos em diferentes matrizes, histórico, achados necroscópicos e parâmetros bioquímicos, sendo que a interpretação de dada concentração do analito verificada em apenas um compartimento é por vezes insuficiente no estabelecimento da maneira de morte ou mesmo na determinação de sua causa.

8.5 Determinação da alcoolemia

A quantificação de etanol em sangue foi procedida para melhor caracterização da população de estudo e avaliar uma possível interdependência com a causa e/ou maneira de morte, assim como com o perfil toxicológico (em relação à positividade para cocaína) e neuroquímico.

Cerca de metade dos indivíduos, no grupo que apresentou amostras positivas para cocaína, também apresentou alcoolemia positiva, concentrações entre 0,01 e 3,73 g/L sugerindo que o uso de cocaína concomitante ao etanol é um padrão de consumo nesta população.

Dois casos (Nº de identificação 12 e 29, ambos do sexo masculino, idades 40 e 24 anos, ambos da raça branca e compleição corporal mediana) apresentaram os mesmos valores de concentrações de etanol (1,37 g/L), ambos com amostras de sangue negativas para COC, o Nº 12 com concentração de COC de 0,48 µg/mL de humor vítreo e 1,18 µg/g de tecido encefálico; enquanto o Nº 29 apresentou amostra de humor vítreo negativa para COC e concentração de 0,31 µg/g de tecido encefálico. Esses dois casos são aqui cotejados, pois apresentaram o mesmo histórico (suicídio por precipitação) e concentrações de dopamina total semelhantes, sendo 62,6; 1446,7 e 354 ng/g, correspondentes ao córtex frontal, núcleos da base e córtex próximo aos ventrículos para o caso Nº 12 e 75,5; 1202,0 e 251,6 ng/g, correspondentes ao córtex frontal, núcleos da base e córtex próximo aos ventrículos para o caso Nº 29. Assim, os dois casos parecem que experimentaram uma alteração psíquica similar que pode ter sido influenciada pela formação do cocaetileno, produto de interação da COC com o etanol que apresenta maior afinidade ao tecido encefálico, por sua maior lipossolubilidade e maior toxicidade que o precursor, DL_{50} camundongo=60,7 mg/kg (fêmea) e 63,8 mg/kg (macho) para cocaetileno contra DL_{50} camundongo=93,0 mg/kg (ambos os sexos) para cocaína (HEARN et al., 1991). No entanto, seriam necessários mais experimentos para melhor interpretação da influência do cocaetileno na neuroquímica *post mortem*.

8.6 Verificação da influência da temperatura nos casos positivos e negativos para cocaína

A cocaína (COC) pode causar hipertermia sendo que a alta temperatura corporal tem forte correlação com as desordens que ocorrem nos processos regulatórios do sistema nervoso central (STEPHENS et al., 2004). Assim, tabulamos

as médias de temperatura hepática observadas no grupo negativo e positivo para COC e verificamos que as mesmas apresentaram valores similares nos dois grupos (29,7 °C, média de IPM=13 horas, e 30,4 °C, média de IPM=11 horas, para o primeiro e segundo grupos, respectivamente). Adicionalmente, foi verificado que não existe diferença significativa entre o intervalo pós-mortal (IPM) dos dois grupos o mesmo ocorrendo para a temperatura hepática, indicando que este parâmetro (temperatura hepática) não constituiu variável aplicável nas interpretações relacionadas ao grupo positivo para COC e provavelmente não interferiu nos resultados referentes às catecolaminas que serão apresentados adiante.

8.7 Quantificação das catecolaminas nas amostras de tecido cerebral

Nas análises toxicológicas é possível empregar diferentes estratégias para o estabelecimento de um diagnóstico ou mesmo no esclarecimento de diversas questões relacionadas à exposição aos toxicantes. Assim, além da análise química do toxicante e/ou seu metabólito, é possível empregar a análise de parâmetros bioquímicos relacionados à toxicodinâmica do agente. É comum a análise de neurotransmissores em encéfalos de animais não humanos para o entendimento de mecanismos cinéticos e dinâmicos de fármacos psicoativos que influenciam no comportamento.

Os estudos de neurotransmissores em encéfalo não humano, envolvendo a cocaína, são realizados em situações extremamente controladas, sendo realizados *in vivo*, através da introdução de eletrodos nas regiões dopaminérgicas (HEIEN et al., 2005) ou por introdução de cânulas para coleta de dialisado (CARBONI et al., 2001; QIAN et al., 1999) e, ainda em encéfalos coletados imediatamente após o sacrifício por decapitação (MARUYAMA; OSHIMA; NAKAJIMA, 1980; NENCIONI et al., 2009; PATTHY; GYENGE, 1984; PREDIGER et al., 2006; YIM et al., 2006). No caso de humanos, o estudo de neurotransmissores e distribuição de fármacos no sistema nervoso central é possível *in vivo* empregando técnica de imagem funcional como a tomografia por emissão de pósitrons ou através da quantificação das

substâncias em tecido pós-mortal, sendo que neste último caso não é possível adotar condições controladas, como dose, intervalo pós-mortal e maneira de morte. Assim, no presente estudo os resultados obtidos na quantificação de neurotransmissores refletem um universo amplo, repleto de condições que podem representar variáveis de confusão, sendo que as informações tabuladas, como histórico, intervalo pós-mortal, idade e descrição de casos individuais constituem uma tentativa de padronizar a amostra populacional de forma a permitir as inferências.

A maior concentração de dopamina (DA) total nos núcleos da base observada na população de estudo indica que o padrão de distribuição estabelecido fisiologicamente (região de alta densidade de receptores dopaminérgicos) persiste após a morte.

Neste estudo, consideramos mais adequado a adoção da DA total, representada pela soma de DA e seus metabólitos, para corrigir as variações que possam estar relacionadas com o intervalo pós-mortal e com uma possível degradação dos analitos. Em estudo recente não foram observadas diferenças significativas nas concentrações de catecolaminas em amostras de sangue cadavérico mantidas a 25°C durante dois dias e o armazenamento a -80°C garantiu boa reprodutibilidade das concentrações mensuradas durante seis meses (ZHU et al., 2007).

A concentração basal de dopamina (DA) no núcleo *accumbens* em ratos vivos foi referida como sendo de aproximadamente 0,8 ng/g e aumentou para valores acima de 110 ng/g quando a cocaína (COC) foi administrada por via intravenosa (HEIEN et al., 2005). Apesar da impossibilidade de se extrapolar este achado à espécie humana, no que tange à comparação das concentrações, é fato que a COC aumenta consideravelmente a concentração de DA também em humanos. Desta forma, a diferença significativa nas concentrações de DA total observada entre os grupos positivo e negativo para COC direcionam que os cadáveres podem manter este perfil, como uma *memória toxicodinâmica* refletindo o processo toxicológico experimentado em vida.

8.8 Verificação da influência do procedimento médico-hospitalar nas concentrações de catecolaminas

O procedimento médico-hospitalar (PMH) é uma variável que poderia influenciar nos resultados das concentrações de dopamina (DA) total, visto que outros fármacos psicoativos poderiam ser administrados no período que precedeu o óbito alterando o perfil dos neurotransmissores. No grupo positivo esta variável teve pouca influência no resultado pelo fato de apenas três indivíduos terem recebido PMH, no entanto no grupo negativo aproximadamente metade recebeu PMH (12 indivíduos, N=21). Assim, dividimos o grupo negativo em dois subgrupos e verificamos que na região dos núcleos da base a média de DA total foi expressivamente maior no grupo que recebeu PMH, 1673 ng/g contra 625 ng/g no grupo que não recebeu PMH, havendo diferença significativa somente nas médias de concentrações de dopamina total em núcleos da base. Diante deste resultado, supomos que a diferença significativa observada nas médias de concentrações de DA total entre os grupos positivo e negativo para cocaína (COC), 5970,9 ng/g contra 1222,8 ng/g em núcleos da base, é mais expressiva, pois mesmo em condições em que houve PMH a exposição à COC seria capaz de produzir grande alteração no perfil de DA total nesta população de estudo.

8.9 Comparação entre as concentrações de cocaína total e dopamina total

Apesar de ter sido verificada uma dependência entre a positividade para cocaína e maiores concentrações de dopamina total, os resultados mostram que não houve correlação entre as concentrações de COC total em sangue e dopamina total em núcleos da base ($r=0,09499$), o mesmo sendo observado para concentrações de COC total em núcleos da base e dopamina total no mesmo segmento de tecido ($r=-0,01342$), através do teste de correlação de *Spearman*. Assim, as concentrações de COC podem não refletir a alteração dopaminérgica relacionada à sua toxicidade,

indicando à necessidade de se considerar a avaliação de outros parâmetros na investigação da causa e/ou maneira de morte.

A ausência de correlação observada pode refletir a neuroadaptação, diferenças genéticas e patologias pré-existentes que são responsáveis por reações variáveis do organismo frente a diferentes doses administradas.

8.10 Quantificação das indolaminas nas amostras de tecido cerebral

Em comparação com as catecolaminas, pouco se conhece sobre os efeitos fisiológicos e toxicodinâmicos da serotonina (5-HT), porém é sabido que este neurotransmissor está envolvido com diversos processos fisiológicos. No sistema nervoso central apresenta ação relacionada à regulação do sono, controle do apetite, atividade sexual, agressividade e às reações instintivas. As anormalidades nos níveis de 5-HT podem resultar em diversos eventos patológicos, como esquizofrenia, depressão, ansiedade e anorexia (KEMA; VRIES; MUSKIET, 2000).

Além da atuação no sistema dopaminérgico, a cocaína também apresenta efeito no sistema serotoninérgico (RITZ et al., 1987; CARBONI et al., 2001), justificando a inclusão desta indolamina no estudo de neuroquímica *post mortem*.

Uma das possibilidades para as baixas concentrações de 5-HT observadas nos dois grupos nos três segmentos cerebrais seria a degradação desta indolamina que apresenta baixa estabilidade, podendo sofrer degradação por ação da luz e do oxigênio (KEMA; VRIES; MUSKIET, 2000). Como não nos era possível controlar a coleta do tecido cerebral no necrotério de forma a homogeneizar as amostras, imediatamente após a coleta, com antioxidantes (metabissulfito de sódio) é possível que o analito tenha degradado. Desta forma, inferimos que este não representa um bom marcador a ser empregado na neuroquímica *post mortem*. No encéfalo a 5-HT sofre desaminação por ação da monoamino-oxidase e posterior oxidação pela ação da enzima aldeído desidrogenase resultando no ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) (KEMA; VRIES; MUSKIET, 2000). Este metabólito apresentou média de

concentrações maiores na região dos núcleos da base indicando que o padrão fisiológico observado *in vivo* permanece após a morte.

Comparando os dois grupos (positivo e negativo para cocaína), apesar das médias de concentrações de 5-HIAA apresentarem valores maiores nos segmentos cerebrais referentes aos núcleos da base e córtex próximo aos ventrículos do grupo positivo para cocaína (COC), 1477,1 e 366,6 ng/g, respectivamente, contra 1167,8 e 190,1 ng/g para núcleos da base e córtex próximo aos ventrículos, respectivamente, no grupo negativo para COC, foi verificado ausência de diferença significativa nos dois grupos em todos os segmentos cerebrais. Assim, parece não haver relação entre este marcador bioquímico com a positividade para COC.

8.11 Perspectivas da neuroquímica *post mortem*

O emprego de marcadores bioquímicos na medicina legal constitui uma inovação que vem ganhando interesse por parte da comunidade acadêmica e, ao mesmo tempo, incredulidade em relação à sua aplicabilidade, provavelmente pela dificuldade de se interpretar os resultados, considerando que as alterações pós-mortais são ainda obscuras dificultando o estabelecimento de valores de referência dos marcadores (MAEDA et al., 2009). Assim, tais inferências ainda têm pouco valor na materialidade da prova pericial.

Apesar da vinculação da perícia com a polícia, como ocorre no Brasil atualmente, tornar frágil a credibilidade do ato pericial, a Medicina Legal constitui núcleo de ciência a serviço da Justiça, e o médico legista nestas condições é sempre um analista do juiz, e não um preposto da autoridade policial. Nem se pode admitir polícia como ciência nem medicina legal como polícia, sendo que a medicina legal tem outra missão, mais ampla e mais decisiva dentro da esfera do judiciário, no sentido de estabelecer a verdade dos fatos, na mais justa aspiração do direito. Assim, os órgãos de perícia são de importância significativa na prevenção, repressão e reparação dos delitos, porque a prova técnico-científica prevalece sobre as demais provas ditas racionais, notadamente nas questões criminais (FRANÇA,

2002). Portanto, os órgãos de perícia precisam estar receptivos à inclusão de novas técnicas e marcadores estando em comunhão com os avanços das pesquisas e, neste sentido não se pode ignorar o fato de que a química clínica pode contribuir muito para os casos em que a causa *mortis* não deixa vestígios morfológicos (MADEA; MUSSHOF, 2007).

A morte classificada como suspeita, quando súbita apresenta grande complexidade na determinação da causa e do mecanismo de morte. Quando não se evidenciam lesões orgânicas significativas e incompatíveis com a continuidade da vida e as alterações morfológicas não se mostram totalmente suficientes para explicar a morte, determinar a causa do óbito constitui verdadeiro desafio resultando na maior parte das vezes na conclusão de “causa indeterminada” (FRANÇA, 2002). Neste contexto, acreditamos que os resultados obtidos neste trabalho possam contribuir no esclarecimento da causa *mortis*, quando há o envolvimento do fármaco cocaína. Adicionalmente, este estudo assinala perspectivas na interação entre a toxicologia e a medicina legal introduzindo um universo de possibilidades investigativas dentro de um campo inovador que é a neuroquímica *post mortem*.

9 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos na presente investigação permitiram concluir que:

- O tecido encefálico representa a matriz mais adequada para o estabelecimento do uso de cocaína.
- Não existe diferença significativa nas concentrações de cocaína e benzoilecgonina nas regiões dos núcleos da base, córtex frontal e cerebelo, sendo que qualquer um dos três segmentos pode ser empregado na análise do fármaco. Desta forma, rejeitamos a primeira hipótese formulada (existe diferença significativa nas concentrações dos analitos presentes em tecido encefálico correspondente ao córtex frontal, núcleos da base e cerebelo).
- As concentrações de cocaína em humor vítreo se correlacionam com as concentrações presentes em tecido encefálico.
- A serotonina não representa um bom marcador a ser empregado na neuroquímica *post mortem*.
- Existe diferença significativa nas concentrações de dopamina total na região dos núcleos da base entre os grupos de indivíduos positivo e negativo para cocaína. Assim, não rejeitamos a segunda hipótese formulada.
- As concentrações de cocaína não apresentam correlação com as concentrações de dopamina total em núcleos da base.
- O tecido encefálico correspondente aos núcleos da base constitui matriz mais adequada a ser coletada durante a necropsia quando se objetiva a realização da neuroquímica *post mortem* juntamente com a identificação e quantificação de COC e BE.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ¹

ALICOT, A.L.P.; GAULIER, J.M.; CHAMPSAUR, P.; MARQUET, P. Mechanisms Underlying Postmortem Redistribution. *Journal of Analytical Toxicology*, vol.27, 2003.

ALTHAUS, L.; HENSSGE, C. Rectal temperature time of death nomogram: sudden change of ambient temperature. *Forensic Science International*, v.99, p.171-178, 1999.

¹

ANDREUCCETTI, G.; CARVALHO, H.B.; PONCE, J.C.; CARVALHO, D.G.; KAHN, T.; MUÑOZ, D.R.; LEYTON, V. Alcohol consumption in homicide victims in the city of São Paulo. *Addiction*, v.104, p.1998-2006, 2009.

ANVISA, Resolução – RE Nº 899, Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. *Agência Nacional de Vigilância Sanitária*, 2003.

BALASOORIYA, B.A.W.; HILL, C.A.S.; WILLIAMS, A.R. The biochemistry of vitreous humor. A comparative study of the potassium, sodium and urate concentrations in the eyes at identical time intervals after death. *Forensic Science International*, v.26, n.2, p.85-91, 1984.

BARNETT, G.; HAWKS, R.; RESNICK, R. Cocaine pharmacokinetics in humans. *Journal of Ethnopharmacology*, v.3, p.353-366, 1981.

BENFICA, F.S.; VAZ, M.; ROVINSKI, M.; COSTA, M.S.T.B. *Rotinas do Departamento Médico Legal do Estado do Rio Grande do Sul, Instituto Médico Legal do Rio Grande do Sul*, 2004.

BOUZAS, N.F.; DRESEN, S.; MUNZ, B.; WEINMANN, W. Determination of basic drugs of abuse in human serum by online extraction and LC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v.395, p.2499-2507, 2009.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

BRZEZINSKI, M.R.; ABRAHAM, T.L.; STONE, C.L.; DEAN, R.A.; BOSRON, W.F. Purification and characterization of a human liver cocaine carboxylesterase that catalyzes the production of benzoylecgonine and the formation of cocaethylene from alcohol and cocaine. *Biochemical Pharmacology*, vol. 48, n.9, p.1747-1755, 1994.

BRUNET, B.; DOUCET, C.; VENISSE, N.; HAUET, T.; HÉBRARD, W.; PAPET, Y.; MAUCO, G.; MURA, P. Validation of Large White Pig as an animal model for the study of cannabinoids metabolism: Application to the study of THC distribution in tissues. *Forensic Science International*, v.161, p.169-174, 2006.

BRUNETTO, M.R.; CAYAMA, D.Y.; GARCÍA, L.G.; GALLIGNANI, M.; OBANDO, M.A. Determination of cocaine and benzoylecgonine by direct of human urine into a column-switching liquid chromatography system with diode-array-detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.37, n.1, p.115-120, 2005.

CABOVSKA, B.; NORMAN, A.B.; STALCUP, A.M. Separation of cocaine stereoisomers by capillary electrophoresis using sulfated cyclodextrins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v.376, p.134-137, 2003.

CARMONA, G.N.; BAUM, I.; SCHINDLER, C.W.; GOLDBERG, S.R.; JUFER, R.A.; CONE, E.J.; BELENDIUK, G.W.; GORELICK, D.A. Plasma butyrylcholinesterase activity differs significantly in rhesus and squirrel monkeys. *Life Science*, v.59, p.939-943, 1996.

CARMONA, G.N.; JUFER, R.A.; GOLDBERG, S.R.; GORELICK, D.A.; GREIG, Q.Y.; CONE, E.J.; SCHINDLER, C.W. Butyrylcholinesterase accelerates cocaine metabolism: in vitro and in vivo effects in nonhuman primates and humans. *Drug Metabolism and Disposition*, v.28, n.367-371, 1999.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis viewpoint and discussion. *Journal of Chromatography B*, v.689, p.175-180, 1997.

CARBONI, E.; SPIELEWOY, C.; VACCA, C.; NOSTEN-BERTRAND, C.; GIROS, M.; DI CHIARA, G. Cocaine and Amphetamine Increase Extracellular Dopamine in the Nucleus Accumbens of Mice Lacking The Dopamine Transporter Gene. *Journal of Neuroscience*, v.21, n.141, p.1-4, 2001.

CASLAVSKA, J.; ALLEMANN, D.; THORMANN, W. Analysis of urinary drugs of abuse by a multianalyte capillary electrophoretic immunoassay. *Journal of Chromatography A*, v.838, p.197-211, 1999.

CARTER, J.C.; BREWER, W.E.; ANGEL, S.M. Raman spectroscopy for the in situ identification of cocaine and selected adulterants. *Applied Spectroscopy*, v.54, n.12, p.1876-1881, 2000.

CARVALHO, D.G. **Determinação dos componentes de cloridrato de cocaína ilegalmente comercializado na região metropolitana de São Paulo no ano de 1997.** São Paulo, 2000, 86p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

CARVALHO, V.M. **Pesquisa dos indicadores de uso do crack em amostras de urina de indivíduos submetidos a exame médico-legal.** São Paulo, 2006, 125p. Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

CARLINI, E.A.; NOTO, A.R.; GALDURÓZ, J.C.F.; NAPPO, S.A. Visão histórica sobre o uso de drogas: passado e presente; Rio de Janeiro e São Paulo. *Jornal Brasileiro de Psiquiatria*, v. 45, n.4, p.227-236, 1996.

CHAN, E.C.Y.; HO, P.C. High-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric method for the analysis of catecholamines and metanephrines in human urine. *Mass Spectrometry*, v.14, p.1959-1964, 2000.

CHANG, S.Y.; MOORE, T.A.; DEVAUD, L.L.; TAYLOR, L.C.; HOLLINGSWORTH, E.B. Analysis of rat brain microdialysate by gas chromatography-high-resolution selected-ion monitoring mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, v.562, p.111-118, 1991.

CHASIN, A.A.M. **Diagnóstico Laboratorial da Intoxicação Aguda por Cocaína: Aspecto Forense.** São Paulo, 1990. 109p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

CHASIN, A.A.M. **Cocaína e cocaetileno: influência do etanol nas concentrações de cocaína em sangue humano *post mortem*.** São Paulo, 1996. 141p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

CHASIN, A. A. M.; MIDIO, A.F. Cocaína como agente de *causa mortis*. *Revista Saúde, Ética e Justiça*, v.2, n.1, p. 47-59, 1997.

CHASIN, A.A.M.; NASCIMENTO, E.S.; RIBEIRO-NETO, L.M.; SIQUEIRA, M.E.P.B.; ANDRAUS, M.H.; SALVADORI, M.C.; FERNÍCOLA, N.A.G., GORNI, R., SALCEDO, S. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. *Revista Brasileira de Toxicologia*, v.11, n.1, p.1–6, 1998.

CHASIN, A.A.M. Parâmetros de confiança analítica e irrefutabilidade do laudo pericial em toxicologia forense. *Revista Brasileira de Toxicologia*, v.14, n.1, p.15-21, 2001.

CHASIN, A.A.M. **Toxicologia forense: aspectos técnicos e jurídicos**. São Paulo, 2004. 82 p. Dissertação apresentada à Academia de Polícia “Dr. Coriolano Nogueira Cobra” para prova de ingresso. Seleção de professor temporário de toxicologia forense - proc. n.554/2004.

CHASIN, A.A.M.; SILVA, E.S.; CARVALHO, V.M. Estimulantes do Sistema Nervoso Central. In OGA, S., CAMARGO, M.M.A., BATISTUZZO, J.A.O. **Fundamentos de Toxicologia**. 3 ed. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo, 2008, cap.4, p.353.

CHEN, Y.; GUO, Z.; WANG, X.; QIU, C. Sample preparation. *Journal of Chromatography A*, v.1184, p.191-219, 2008.

CLARKE, E.G.C. **Isolation and Identification of Drugs**. London: Pharmaceutical Press, 1978, p.489.

CLAUWAERT, K.M.; BOCXLAER, J.F.; LAMBERT, W.E.; DE LEENHEER, A.P. Analysis of Cocaine, Benzoyllecgonine, and Cocaethylene in Urine by HPLC with Diode Array Detection. *Analytical Chemistry*, v.68, n.17, p.3021-3028, 1996.

COLLINS, C.; MUTO, J.; SPIEHLER, V. Whole Blood Deproteinization for Drug Screening Using Automatic Pipettors. *Journal of Analytical Toxicology*, v.16, September/October, p.340-342, 1992.

CONE, E.J.; HILLSGROVE, M.; DARWIN, W.D. Simultaneous measurement of cocaine, cocaethylene, their metabolites, and “crack” pyrolysis products by gas chromatography-mass spectrometry. *Clinical Chemistry*, v.40, p.1299-1305, 1994.

CONE, E.J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cocaine. *Journal of Analytical Toxicology*, v.19, p.459-477, 1995.

CONE, E.J. Recent discoveries in pharmacokinetics of drugs of abuse. *Toxicology Letters*, v.102, n.103, p.97-101, 1998.

DADGAR, D.; BURNETT, P.E.; CHOC, M.G.; GALLICANO, K.; HOOPER, J.W. Application issues in bioanalytical method validation, sample analysis and data reporting. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, v.13, n.2, p.89-97, 1995.

DAHLEN, J.; ECKARDSTEIN, S. Development of a capillary zone electrophoresis method including a factorial design and simplex optimization for analysis of amphetamine, amphetamine analogues, cocaine, and heroin. *Forensic Science International*, v.157, p.93-105, 2006.

DARKE, S.; KAYE, S.; DUFLOU, J. Cocaine-related fatalities in New South Wales, Australia 1993-2002. *Drug and alcohol Dependence*, v.77, n.2, p.107-114, 2005.

DE PAULA, D.M.L. **Análise Toxicológica de antidepressivos em sangue total por cromatografia em fase gasosa com detector de nitrogênio e fósforo**. São Paulo, 2007, 122p. Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

DUER, W.C.; SPITZ, D.J.; MCFARLAND, S. Relationships between concentrations of cocaine and its hydrolysates in peripheral blood, heart blood, vitreous humor and urine. *Journal of Forensic Sciences*, v.51, n.2, p.421-425, 2006.

DUBOIS, D.; DUBOIS, E.F. A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known. *Archives of Internal Medicine*, v.17, p.863-871, 1916.

ERZOUKI, H.K.; ALLEN, A.C.; NEWMAN, A.H.; GOLDBERG, S.R.; SCHINDLER, C.W. Effects of cocaine, cocaine metabolites and cocaine pyrolysis products on the hindbrain cardiac and respiratory centers of the rabbit. *Life Sciences*, v.57, p.1861-1868, 1995.

ESCOBEDO, L.G.; RUTTENBER, A.J.; AGOCS, M.M.; ANDA, R.F.; WETLI, C.V. Emerging patterns of cocaine use and the epidemic of cocaine overdose deaths in Date-County, Florida. *Archives Pathology & Laboratory Medicine*, v.115, p.900-905, 1991.

EVARD, I.; LEGLEYE, S.; TAÏROU, A.C. Composition, purity and perceived quality of street cocaine in France. *International Journal of Drug Policy*, 2010, doi: 10.1016/j.drugpo.2010.03.004.

FANDIÑO, A.S.; TOENNES, S.W.; KAUERT, G.F. Studies on hydrolytic and oxidative metabolic pathways of anhydroecgonine methyl ester (methylecgonidine) using microsomal preparations from rat organs. *Chemical Research in Toxicology*, v.15, p.1543-1548, 2002.

FERNÁNDEZ, P.; MORALES, L.; VÁZQUEZ, C.; BERMEJO, A.M.; TABERNERO, M.J. HPLC-DAD determination of opioids, cocaine and their metabolites in plasma. *Forensic Science International*, v.161, n.1., p.31-35, 2006.

FRANÇA, G.V. **Medicina Legal**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 6.ed., 2001, p.308-361.

FRANÇA, G.V. A perícia em casos de tortura. *Revista Jurídica Escola Superior do Ministério Público*, n.3, p.9-28, 2002.

FERREIRA, P.E.M.; MARTINI, R.K. Cocaína: lendas, história e abuso. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v.23, n.2, p.96-99, 2001.

FLYNN, D.D.; VAISHNAV, A.A.; MASH, D.C. Interactions of cocaine with primary and secondary recognition sites on muscarinic receptors. *Molecular Pharmacology*, v.41, p.736-742, 1992.

FINESCHI, V.; CENTINI, F.; MONCIOTTI, F.; TURILLAZZI, E. The cocaine "body stuffer" syndrome: a fatal case. *Forensic Science International*, v.126, n.1, p.7-10, 2002.

FOLTIN, R.W.; FISCHMAN, M.W. Residual effects of repeated cocaine smoking in humans. *Drug and Alcohol Dependence*, v.47, p.117-124, 1997.

FOTI, A.; KIMURA, S.; DEQUATTRO, V.; LEE, D. Liquid-Chromatographic Measurement of Catecholamines and Metabolites in Plasma and Urine. *Clinical Chemistry*, v.33, n.12, p.2209-2213, 1987.

FOWLER, J.S.; VOLKOW, N.D.; WANG, G.J.; GATLEY, S.J.; LOGAN, J. [11]Cocaine: PET studies of cocaine pharmacokinetics, dopamine transporter availability and dopamine transporter occupancy. *Nuclear Medicine and Biology*, v.28, p.561-572, 2001.

GAO, Y.; LaFLEUR, D.; SHAH, R.; ZHAO, Q.; SINGH, M.; BRIMIJOIN, S. An albumin-butyrylcholinesterase for cocaine toxicity and addiction: Catalytic and pharmacokinetic properties. *Chemico-Biological Interactions*, v.175, p.83-87, 2008.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11.ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998, p.338-356.

HE, J.; YANG, S.; ZHANG, L. Effect of cocaine on nitric oxide production in bovine coronary artery endothelial cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.314, n.3, p.380-386, 2005.

HEARN, W.L.; ROSE, S.; WAGNER, J.; CIARLEGLIO, A.; MASH, D.C. Cocaethylene is more potent than cocaine in mediating lethality. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v.39, n.2, p.531-533, 1991.

HENSSGE, C. Death time estimation in case work. I. The rectal temperature time of death nomogram. *Forensic Science International*, v.38(3-4), p.209-236, 1988.

HENSSGE, C.; MADEA, B. Estimation of the time since death in the early post-mortem period. *Forensic Science International*, v.144, p.167-175, 2004.

HEIEN, M.L.A.V.; KHAN, A.S.; ARIANSEN, J.L.; CHEER, J.F.; PHILLIPS, P.E.M.; WASSUM, K.M.; WIGHTMAN, R.M. Real-time measurement of dopamine fluctuations after cocaine in the brain of behaving rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.102, n.29, p.10023-10028, 2005.

HOFFMAN, R.S.; HENRY, G.C.; WAX, P.M.; WEISMAN, R.S.; HOWLAND, M.A.; GOLDFRANK, L.R. Decreased plasma cholinesterase activity enhances cocaine toxicity in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 263, p.698-702, 1992.

HOLDINESS, M.R.; ROSEN, M.T.; JUSTICE, J.B.; NEILL, D.B. Gas chromatographic-mass spectrometric determination of dopamine in subregions of rat brain. *Journal of Chromatography*, v.198, p.329-336, 1980.

HOWS, M.E.P.; LACROIX, L.; HEIDBREDER, C.; ORGAN, A.J.; SHAH, A.J. High-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric assay for the simultaneous measurement of dopamine, norepinephrine, 5-hydroxytryptamine and cocaine in biological samples. *Journal of Neuroscience Methods*, v.138, p.123-132, 2004.

INCIARDI, J.A. Crack, Crack house sex, and HIV risk. *Archives of Sexual Behavior*, vol.24, n.3, p.249-269, 1995.

ISENSCHMID, D.S.; FISCHMAN, M.W.; FOLTIN, R.W.; CAPLAN, Y.H. Concentration of cocaine and metabolites in plasma of humans following intravenous administration and smoking of cocaine. *Journal of Analytical Toxicology*, v.16, p.311-314, 1992.

JACOB, P.III.; LEWIS, E.R.; ELIAS-BAKER, B.A.; JONES, R.T. A pyrolysis product, anhydroecgonine Methyl ester (methylecgonidine), is in the urine of cocaine smokers. *Journal of Analytical Toxicology*, v.14, p.353-357, 1990.

JENKINS, A.J.; GOLDBERGER, B.A. Identification of unique cocaine metabolites and smoking by-products in postmortem blood and urina specimens. *Journal Forensic Sciences*, v.42, n.5, p.824-827, 1997.

KEMA, I.P.; VRIES, E.G.E.; MUSKIET, F.A.J. Clinical chemistry of serotonin and metabolites. *Journal of Chromatography B*, v.747, p.33-48, 2000.

KINTZ, P.; CIRIMELE, V.; SENGLER, C.; MANGIN, P. Testing human hair and urine for anhydroecgonine methyl ester, a pyrolysis product of cocaine. *Journal of Analytical Toxicology*, v.19, p.478-482, 1995.

KIYATKIN, E.A.; BROWN, P.L. Dopamine-dependent and dopamine-independent actions of cocaine as revealed by brain thermorecording in freely moving rats. *European Journal of Neuroscience*, v.22, p.930-938, 2005.

KLEERUP, E.C.; KOYAL, S.N.; MAGALLANES J.A.M.; GOLDMAN, M.D.; TASHKIN, D. P. Chronic and acute effects of "Crack" cocaine on diffusing capacity, membrane diffusion, and pulmonary capillary blood volume in the lung. *CHEST*, v.122, n.2, p.629-638, 2002.

LEIKIN, J.B.; WATSON, W.A. Post-mortem Toxicology: What the Dead Can and Cannot Tell Us? *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, v.41, n.1, p.47-56, 2003.

LIMA, I.V. **Humor vítreo em toxicologia forense – determinação de álcool etílico em cadáveres de morte traumática e em estado de putrefação.** São Paulo, 1996. 96p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

LUCENA, J.; BLANCO, M.; JURADO, C.; RICO, A.; SALGUERO, M.; VAZQUEZ, R.; THIENE, G.; BASSO, C. Cocaine-related sudden death: a prospective investigation in south-west Spain. *European Heart Journal*, doi:10.1093/eurheart/ehp557, 2010.

LURIE, I.S.; WITTEWER, J.D. **High-performance liquid chromatography in forensic chemistry.** New York: Marcel Dekker, 1983, p.45-46.

LURIE, I.S. Capillary electrophoresis of illicit drug seizures. *Forensic Science International*, v.92, p.125-136, 1998.

McWILLIAM, I.G.; DEWAR, R.A. Flame Ionization Detector for Gas Chromatography. *Nature*, v.181, p.760, 1958.

MADEA, B.; MUSSHOF, F. Postmortem biochemistry. *Forensic Science International*, v.165, n.2-3, p.165-171, 2007.

MACKEY-BOJACK, S.; KLOSS, J.; APPLE, F. Cocaine, cocaine metabolite, and ethanol concentrations in postmortem blood and vitreous humor. *Journal of Analytical Toxicology*, v.24, n1, p.59-65, 2000.

MAEDA, H.; ZHU, B.L.; ISHIKAWA, T.; QUAN, L.; MICHIEUE, T. Significance of postmortem biochemistry in determining the cause of death. *Legal Medicine*, v.11, p.46-49, 2009.

MARUYAMA, Y.; OSHIMA, T.; NAKAJIMA, E. Simultaneous determination of catecholamines in rat brain by reversed-phase liquid chromatography with electrochemical detection. *Life Sciences*, v.24, n.14, p.115-1120, 1980.

MARLET, J.M. Conceitos médico-legal e jurídico de morte. *Justitia*, v.49, n.138, p.43-48, 1987.

MARTIN, B. R.; LUE, L.P.; BONI, J. P. Pyrolysis and volatilization of cocaine. *Journal of Analytical Toxicology*, v.13, p.158-162, 1989.

MASH, D.C.; DUQUE, L.; PABLO, J.; QIN, Y.; ADI, N.; HEARN, W.L.; HYMAB, B.A.; KARCH, S.B.; DRUID, H.; WETLI, C.V. Brain biomarkers for identifying excited delirium as a cause of sudden death. *Forensic Science International*, v.190, p.13-19, 2009.

MYERS, A.L.; WILLIAMS, H.E.; KRANER, J.C. Identification of anhydroecgonine ethyl ester in the urine of a drug overdose victim. *Journal Forensic Science*, v.50, n.6, p.1481-1485, 2005.

METS, B.; DIAZ, J.; SOO, E.; JAMDAR, S. Cocaine, norcocaine, ecgonine methylester and benzoylecgonine pharmacokinetics in the rat. *Life Sciences*, v.65, n.12, p.1317-1328, 1999.

MIAO, L.; QUI, Z.; MORGAN, J.P. Cholinergic stimulation modulates negative inotropic effect of cocaine on ferret ventricular myocardium. *American Journal of Physiology*, v.270, p.H678-H684, 1996.

MILLER, N.S.; GOLD, M.S.; MILLMAN, R.B. Cocaine: general characteristics, abuse and addiction. *New York States Journal of Medicine*, vol.29, p.390-395, 1989.

MOORE, C.; BROWNE, S.; TEBBETT, I.; NEGRUSZ, A. Determination of cocaine and its metabolites in brain tissue using high-flow solid-phase extraction columns and high-performance liquid chromatography. *Forensic Science International*, v.53, n.2, p.215-219, 1992.

MORA, A.; ARROYO, A.; SÁNCHEZ, M. Toxicología Postmortem: estudio analítico de cocaína en cerebro. *Revista de Toxicología*, v.25, p.42-47, 2008.

MOREAU, R.L.M. Fármacos e Drogas que Causam Dependência. In OGA, S., CAMARGO, M.M.A.; BATISTUZZO, J.A.O. **Fundamentos de Toxicologia**, 3.ed. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo, 2008, cap.4, p.325.

MORIYA, F.; HASHIMOTO, Y. Postmortem stability of cocaine and cocaethylene in blood and tissues of humans and rabbits. *Journal of Forensic Sciences*, v.41, n.4, p.612-616, 1996.

NAPPO, S.A. *Baqueros e Craqueros. Um estudo etnográfico sobre o consumo de cocaína na cidade de São Paulo*. São Paulo, 1996. 304p. Tese de Doutorado - Universidade Federal de São Paulo.

NAPPO, A.A.; SANCHEZ, Z.M.; OLIVEIRA, L.G.; SANTOS, S. A.; CORADETE, J.Jr.; PACCA, J.C.B.; LACKS, V. **Comportamento de risco de mulheres usuárias de crack em relação às DST/AIDS**. 1ed. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo - Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas, v.1, 125p., 2004.

NAKAHARA, Y.; ISHIGAMI, A. Inhalation efficiency of free-base cocaine by pyrolysis of "Crack" and cocaine hydrochloride. *Journal of Analytical Toxicology*, v.15, p.105-109, 1991.

NEUDORFL, P.; HUPE, M.; PILON, P.; LAWRENCE, A.H. Determination of ecgonidine methyl ester vapour pressure using a dynamic gas blending system and gas chromatographic analysis. *Analytical Chemistry*, v.69, n.20, p.4283-4285, 1997.

NENCIONI, A.L.A.; BARRETO, S.A.; LEBRUN, I.; FLORIO, J.C.; LOURENÇO, G.A.; DORCE, V.A.C. Neurotransmitter evaluation in the hippocampus of rats after intracerebral injection of TsTX scorpion toxin. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v.15, n.2, p.236-254, 2009.

OGUZ, P.; CEM, U. History of forensic medicine in Turkey. *Legal Medicine*, v.11, p.107-110, 2009.

PATEL, F. A high fatal postmortem blood concentration of cocaine in a drug courier. *Forensic Science International*, v.79, n.3, p.167-174, 1996.

PATTHY, M.; GYENGE, R. Simultaneous determination of serotonin and catecholamines in rat brain by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection: Comparison of the most efficient techniques. *Journal of Chromatography A*, v.286, p.217-221, 1984.

PAUL, B.D.; MCWHORTER, L.K.; SMITH, M.L. Electron ionization mass fragmentometric detection of urinary ecgonidine, a hydrolytic product of methylecgonidine, as an indicator of smoking cocaine. *Journal of Mass Spectrometry*, v.34, p.651-660, 1999.

PAUL, B.D.; LALANI, S.; BOSY, T.; JACOBS, A.J.; HUESTIS, M.A. Concentrations profiles of cocaine, pyrolytic methyl ecgonidine and thirteen metabolites in human blood and urine: determinations by gas chromatography-mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, v.19, p.677-688, 2005.

PAULA, C.M.C; RUZZENE, M.AM.; MARTINIS, B.S. Alcoolemia e mortes de causas violentas. *Medicina (Ribeirão Preto)*, v.41, n.1, p.24-29, 2008.

PENTEADO, J.C.P.; MAGALHÃES, D.; MASINI, J.C. Experimento didático sobre cromatografia gasosa: uma abordagem analítica e ambiental. *Química Nova*, v.31, n.8, p.2190-2193, 2008.

PERETTI, F.J.; ISENSCHMID, D.S.; LEVINE, B.; CAPLAN, Y.H.; SMIALEK, J.E. Cocaine fatality: An unexplained blood concentration in a fatal overdose. *Forensic Science International*, v.48, n.2, p.135-138, 1990.

PETERS, F.T.; MAURER, H.H. Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology - a review. *Accreditation and Quality Assurance*, v.7, p.441-449, 2002.

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

PETERSON, K.L.; LOGAN, B.K.; CHRISTIAN, G. D. Detection of cocaine and its polar transformation products and metabolites in human urine. *Forensic Science International*, v.73, p.183-196, 1995.

PILEGGI, P.; TEATINO, A.; LA MARCA, A.; BARBARO, A. About a cocaine-associated sudden death casework. *Forensic Science International*, v.146, Supplement 1, p.S77-S78, 2004.

PREDIGER, R.D.S.; BATISTA, L.C.; MEDEIROS, R.; PANDOLFO, P.; FLORIO, J.C.; TAKAHASHI, R.N. The risk is in the air: Intranasal administration of MPTP to rats reproducing clinical features of Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, v.202, n.2, p.391-403, 2006.

QIAN, J.; WU, Y.; YANG, H.; MICHAEL, A.C. An integrated decoupler for capillary electrophoresis with electrochemical detection: application to analysis of brain microdialysate. *Analytical Chemistry*, v.71, n.20, p.4486-4492, 1999.

QUEIROZ, S.C.N.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. *Química Nova*, v.24, n.1, p.68-76, 2001.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. *Farmacologia*. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, p.405-410.

RIBEIRO, M.; DUNN, J.; LARANJEIRA, R.; SESSO, R. High mortality young crack cocaine users in Brazil: a 5-year follow-up study. *Addiction*, v.99, p.1133-1135, 2004.

RITZ, M.C.; LAMB, R.J.; GOLDBERG, S.R.; KUCHAR, M.J. Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine. *Science*, v.237, p.1219-1223, 1987.

ROCHA, L.C. **Tóxicos**. São Paulo: Editora Saraiva, 1985, p. 267.

SCHEIDWEILER, K.B.; SHOJAIE, J.; PLESSINGER, M.A.; WOOD, R.W.; KWONG, T.C. Stability of methylecgonidine and ecgonidine in sheep plasma in vitro. *Clinical Chemistry*, v.46, p.1787-1795, 2000.

SCHWARTZ, R.H.; LUXENBERG, M.G.; HOFFMANN, N.G. Crack use by american middle-class adolescent polidrug abusers. *The Journal of Pediatrics*, vol.1, p.150-155, 1991.

SHANNON, R.P.; STAMBLER, B.S.; KOMAMURA, K.; IHARA, T.; VATNER, S.F. Cholinergic modulation of the coronary vasoconstriction induced by cocaine in conscious dogs. *Circulation*, v.87, p.939-949, 1993.

SHARKEY, J.; RITZ, M.C.; SCHENDEN, J.A.; HANSON, R.C.; KUCHAR, M.J. Cocaine inhibits muscarinic cholinergic receptors in heart and brain. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.246, p.1048–1052, 1988.

SHIMOMURA, E.T.; HODGE, G.D.; PAUL, B.D. Examination of postmortem fluids and tissues for the presence of methylecgonidine, ecgonidine, cocaine, and benzoylecgonine using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Clinical Chemistry*, v.47, p.1040-1047, 2001.

SIAS, D.B. **Resfriamento de um corpo**. Apostila. CEFET - Centro Federal de Educação Tecnológica de Pelotas, CINAT - Ciências da Natureza, Matemática e suas Tecnologias. <http://www.cefetr.br/~denise/caloretemperatura/resf.pdf>. Acessado em julho de 2009, p.25.

SMITH, M.L.; VORCE, S.P.; HOLLER, J.M.; SHIMOMURA, E.; MAGLUILO, J.; JACOBS, A.J.; HUESTIS, M.A. Modern Instrumental Methods in Forensic Toxicology. *Journal of Analytical Toxicology*, v.31, p.237-255, 2007.

Society of Forensic Toxicologist & American Academy of Forensic Sciences. Forensic Toxicology Laboratory Guidelines, Society of Forensic Toxicologists & American Academy of Forensic Science, 24p, 2006.

STEPHENS, B.G.; JENTZEN, J.M.; KARCH, S.; MASH, D.C.; WETLI, C.V. Criteria for the Interpretation of Cocaine Levels in Human Biological Samples and Their Relation to the Cause of Death. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, v.25, n.1, p.1-10, 2004.

STIMPFL, T.; REICHEL, S. Distribution of drugs of abuse within specific regions of the human brain. *Forensic Science International*, v.170, p.179-182, 2007.

TAGLIARO, F.; POIESI, C.; AIELLO, R.; DORIZZI, R.; GHIELMI, S.; MARIGO, M. Capillary electrophoresis for the investigation of illicit drugs in hair: determination of cocaine and morphine. *Journal of Chromatography*, v.638, p.303-309, 1993.

TAKEKAWA, K. Cocaine and its metabolites. In SUZUKI, O.; WATANABE, K. **Drugs and Poisons in Humans a Handbook of Practical Analysis**. Heidelberg: Springer, 2005, cap.2.4, p.207-218.

TAVARES, M.F.M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. *Química Nova*, v.19, n.2, p.173-181, 1996.

TAVARES, M.F.M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. *Química Nova*, v.20, n.5, p.493-511, 1997.

TAI, S.S.C.; PRENDERGAST, J.L.; SNIEGOSK, L.T.; WELCH, M.J.; PHINNEY, K.W.; ZHANG, N.F. Certification of drugs of abuse in a human serum standard reference material: SRM 1959. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v.397, p.501-509, 2010.

THIERAUF, A.; MUSSHOFF, F.; MADEA, B. Post-mortem biochemical investigations of vitreous humor. *Forensic Science International*, n.192, p.78-82, 2009.

YANG, W.; BARNES, A.J.; RIPPLE, M.G.; FOWLER, D.R.; CONE, E.J.; MOOLCHAN, E.T.; CHUNG, H.; HUESTIS, M.A. Simultaneous quantification of methamphetamine, cocaine, codeine, and metabolites in skin by positive chemical ionization gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, v.833, p.210-218, 2006.

YAREMA, M.C.; BECKER, C.E. Key concepts in postmortem drug redistribution. *Clinical Toxicology*, v.43, n.4, p.235-241, 2005.

YIM, A.J.; MIRANDA-PAIVA, C.M.; FLÓRIO J.C.; OLIVEIRA, C.A.; NASELLO, A.G.; FELICIO, L.F. A comparative study of morphine treatment regimen prior to mating and during late pregnancy. *Brain Research Bulletin*, v.68, p.384-391, 2006.

UNITED NATIONS. Office on Drug and Crime. **Coca Cultivation in the Andean Region. A survey of Bolivia, Colombia and Peru**. Washington: United Nations Publications, 2008.

UNITED NATIONS. **Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens**. Washington: United Nations Publications, 2009.

UNITED NATIONS. Office on Drug and Crime. **World Drug Report**. Washington: United Nations Publications, 2010.

VARETTO, L.; CURTO, O. Long persistence of rigor mortis at constant low temperature. *Forensic Science International*, v.147, p.31-34, 2004.

VETHARANIAM, I.; THOMSON, R.A.; DEVINE, C.E.; DALY, C.C. Modelling muscle energy-metabolism in anaerobic muscle. *Meat Science*, v.85, n.1, p.134-148, 2010.

VICKREY, T.M. **Liquid chromatography detectors**. New York: Marcel Dekker, 1983, p.125-142.

VONGPATANASIN, W.; MANSOUR, Y.; CHAVOSHAN, B.; ARBIQUE, D.; VICTOR, R.G. Cocaine stimulates the human cardiovascular system via a central mechanism of action. *Circulation*, v.100, n.5, p.497-502, 1999.

WARNER, A.; NORMAN, A.B. Mechanisms of cocaine hydrolysis and metabolism in vitro and in vivo: a clarification. *Therapeutic Drug Monitoring*, v.22, n.3, p.266-270, 2000.

WATSON, W.A.; MACKINNEY, P.E. Necrokinetics: the practical aspects of interpreting postmortem drug concentrations. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, v.39, n.3, p.213, 2001.

WELCH, M.J.; ELLERBE, P.; TAI, S.S.C.; CHRISTENSEN, R.G.; SNIEGOSKI, L.T.; SANDER, L.C.; PHINNEY, C.S. NIST reference materials to support accuracy in drug testing. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, v.353, n.1-2, p.61-65, 1995.

WILKE, N.; JANSSEN, H.; FAHRENHORST, C.; HECKER, H.; MANNS, M.P.; BRABANT, E.G.; TRÖGER, H.D.; BREITMEIER, D. Postmortem determination of concentrations of stress hormones in various body fluids – is there a dependency between adrenaline/noradrenaline quotient, cause of death and agony time? *International Journal of Legal Medicine*, v.121, p.385-394, 2007.

XIA, Y.; WANG, P.P.; BARTLETT, M.G.; SOLOMON, H.M.; BUSCH, K.L. An LC-MS-MS Method for the comprehensive analysis of cocaine and cocaine metabolites in meconium. *Analytical Chemistry*, v.72, p.764-771, 2000.

ZHANG, J.Y.; FOLTZ, R.L. Cocaine metabolism in man: identification of four previously unreported cocaine metabolites in human urine. *Journal Analytical of Toxicology*, v.14, p. 201-205, 1990.

ZHU, B.L.; ISHIKAWA, T.; MICHIEUE, T.; LI, D.R.; ZHAO, D.; QUAN, L.; ORITANI, S.; BESSHO, Y.; MAEDA, H. Post mortem serum catecholamine levels in relation to the cause of death. *Forensic Science International*, n.173, p.122-129, 2007.

APÊNDICE A

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Formulário de coleta

Projeto de doutorado: Redistribuição da cocaína e sua influência na neuroquímica post mortem

Pesquisador: Virgínia Martins Carvalho – vmcar@usp.br

Orientador: Profª Dra. Alice A. da Matta Chasin - alimoily@usp.br

Médicos responsáveis pelo projeto no EPML: Dra. Alba Blasotti e Dra. Daniela Fusinatto

Critério de inclusão: indivíduos entre 15 a 55 anos

Nome do médico responsável pelo caso:

Data: _____ Hora de entrada: _____ Necropsia N°: _____ às _____

DP: _____ N° B.O: _____ hora: _____

Histórico: _____

Nome: _____

Procedimento médico-hospitalar: Sim ☐ Não ☐ Ignorado ☐

Raça aparente/cor da pele: Negra ☐ Oriental ☐ Branca/caucasiana ☐

Sexo: Masculino ☐ Feminino ☐

Idade: _____ ou aproximada: _____ Comprimento: _____ Peso aproximado: _____

Biótipo: normolíneo ☐ longilíneo ☐ brevelíneo ☐

Compleição corporal: Franzino ☐ Mediano ☐ Robusto ☐ Sobrepeso ☐ Obeso ☐

Causa de morte: _____

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Formulário de coleta

Projeto de doutorado: Redistribuição da cocaína e sua influência na neuroquímica *post mortem*

Pesquisador: Virgínia Martins Carvalho – vmcar@usp.br

Orientador: Prof^a Dra. Alice A. da Matta Chasin - alimoily@usp.br

Médicos responsáveis pelo projeto no EPML: Dra. Alba Blasotti e Dra. Daniela Fusinato

Opacidade da córnea? Sim ☐ Não ☐ Perda do turgor ocular? Sim ☐ Não ☐

Rigidez? Sim, generalizada ☐ Sim, parcial ☐ Não ☐Hipótese fixa Sim ☐ Não ☐

Houve algum sinal de uso de drogas lícitas (por exemplo o álcool) ou ilícitas? Sim ☐ Não ☐ ,
SE SIM, QUAL?

Preencher todos os sinais necroscópicos e informações que julgar relevante

[illegible]