**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TOXICOLOGIA E
ANÁLISES TOXICOLÓGICAS**

**Pesquisa dos indicadores de uso do *crack* em amostras de
urina de indivíduos submetidos a exame médico-legal**

Virgínia Martins Carvalho

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof^a Dra. Alice Aparecida da Matta Chasin

São Paulo
2006

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

Pesquisa dos indicadores de uso do *crack* em amostras de
urina de indivíduos submetidos a exame médico-legal

Virgínia Martins Carvalho

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Profª Dra. Alice Aparecida da Matta Chasin

São Paulo
2006

Virgínia Martins Carvalho

Pesquisa dos indicadores de uso do *crack* em amostras de urina de indivíduos submetidos a exame médico-legal

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

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

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, 2006.

À minha mãe,
Iracema Aparecida de Souza e Martins, por compreender
a minha ausência durante a elaboração deste trabalho,
pelo apoio constante, por ter me incentivado a ir em
busca dos meus sonhos e me ensinar o significado
das palavras integridade, respeito, persistência,
coragem e entusiasmo.

Aos meus irmãos, **Viviane e Washington**
por todo carinho e amizade.

Ao meu companheiro de todas as horas,
Edson Kenji Iwamoto, pela valorosa contribuição,
por ter compartilhado cada momento de acerto e
erro no decorrer deste trabalho.

À Profª Dra. **Alice Aparecida da Matta Chasin**
pela orientação, por ter acreditado no meu
potencial, pelo exemplo de perseverança
e por ter despertado em mim um
grande amor pela pesquisa.

À Dra. **Débora Gonçalves de Carvalho**
pela amizade conquistada, por ter participado ativamente
deste trabalho, por contribuir de forma tão carinhosa,
pelo constante apoio e pela zelosa
orientação no laboratório.

“As drogas têm profundas repercussões nas pessoas e nas sociedades de todo o mundo. Em relação às pessoas, as drogas põem em perigo a saúde, os meios de subsistência e a segurança. Em nível nacional, sua relação osmótica com o delito pode ser convertida na causa e consequência de conflitos e na debilidade da gestão pública. Os países pobres são particularmente vulneráveis e precisam de ajuda visto que carecem dos recursos necessários para romper o círculo vicioso. A dimensão mundial do problema das drogas é igualmente importante: os mercados de drogas ilícitas não conhecem fronteiras e sua natureza transnacional se situa fora do alcance de qualquer governo, seja rico ou pobre.

Ainda que a dimensão global do tráfico de drogas seja bem conhecida desde há muito tempo e seja adotado um sistema muito desenvolvido de cooperação internacional, a abertura de mercados mundiais nos últimos anos tem acentuado essa característica. Agora torna-se mais necessário do que nunca dar uma resposta multilateral e coordenada.

O caminho para um mundo menos atormentado pelas drogas ilícitas não carece de tantas dificuldades, mas se queremos por um fim a tanto sofrimento podemos concentrar nosso esforços para fazer muito mais do que tem sido feito até agora como:

- Abordar o problema das drogas num contexto mais amplo da segurança humana e de desenvolvimento sustentável. Deve ser feito mais do que operações de luta contra os narcóticos (por mais necessária que seja). Para por fim a este problema: toda a sociedade deve participar;
- As respostas do vínculo entre as drogas e o delito devem ser mais integradas.
- Os programas de fiscalização de drogas devem se adequar melhor à dinâmica dos mercados de drogas: um melhor entendimento das tendências subjacentes, dados mais sólidos, um incremento da investigação e um enfoque científico mais profundo do problema são elementos necessários.”

Antônio Maria Costa

Diretor Executivo

Escritório das Nações Unidas contra Drogas e Crimes

Trecho do prefácio do Relatório Mundial sobre Drogas, 2005

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa-FAPESP pelo auxílio financeiro concedido.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa-CNPQ pela bolsa concedida.

Ao João Paulo dos Santos Fernandes pelo apoio e amizade.

À banca de qualificação composta pela Prof^a Dra. Irene Videira de Lima e pelo Prof^o Dr. Maurício Yonamine pelas importantes sugestões, acatadas em sua maioria.

À Prof^a Dra. Maria de Fátima Pedroso pelas importantes sugestões apontadas no trabalho de qualificação.

Ao Dr. Hideaki Kawata, diretor do Instituto Médico Legal e à Dra. Neide S. F. de Oliveira, diretora no Núcleo de Toxicologia Forense, pela gentil permissão no uso das instalações e equipamentos, pelo fornecimento das amostras selecionadas para o estudo e pela confiança em mim depositada.

Aos amigos do Núcleo de Toxicologia Forense do Instituto Médico Legal, em especial à Dra. Marta Cristina de Souza, ao Dr. Erasmo S. Silva, à Dra. Maria das Graças de Jesus, à Dra. Maria Heloisa A. Loureiro e à Dra. Lílian B. de Oliveira pela amizade conquistada e pela colaboração neste trabalho.

Aos professores do Programa de Toxicologia e Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas pelas inúmeras sugestões e apoio técnico, especialmente ao Prof. Dr. Ernani Pinto e à Prof^a Dra. Regina Lúcia de Moraes Moreau.

À Prof^a Dra. Silvia Berlanga de Moraes Barros e à Prof^a Dra. Sandra Helena P. Farsky pela orientação na obtenção do auxílio FAPESP.

Aos funcionários do Programa de Toxicologia e Análises Toxicológicas, Helena, Roseli, Luzia, Dalva e Ângelo pela colaboração constante.

Aos amigos do Programa de Pós Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas Renata, Tiago, Fabriciano, Rodrigo, Danielle, Daniela, Simone, Vânia, Paula e José Luis, pelo apoio e amizade conquistada.

RESUMO

Pesquisa dos indicadores de uso do crack em amostras de urina de indivíduos submetidos a exame médico-legal.

Virgínia Martins Carvalho, Alice Aparecida da Matta Chasin - Mestrado

Atualmente os dados epidemiológicos sobre a exposição ao *crack* no Brasil são preocupantes, principalmente entre crianças e adolescentes na capital de São Paulo. É sabido que o *crack* apresenta um potencial maior que o correspondente a outras formas de uso da cocaína para causar dependência. Apesar de haver numerosos estudos e métodos validados para identificação e quantificação de cocaína em fluidos biológicos, o mesmo não ocorre para a caracterização de seu uso na forma de *crack*. Todos os métodos descritos para diferenciação de exposição ao *crack* empregam equipamentos de alto custo e que nem sempre são viáveis para a realidade econômica dos laboratórios públicos brasileiros. Este trabalho objetivou desenvolver e aplicar um método eficiente e viável economicamente para identificação e quantificação dos indicadores de uso do *crack* em amostras de urina provenientes do Núcleo de Toxicologia Forense do Instituto Médico-Legal de São Paulo. O método mostrou-se linear na faixa de interesse (intervalo dinâmico de 0,2 a 20 µg/mL) para éster metilanidroecgonina. Os limites de detecção e quantificação foram de 0,1 e 0,2 µg/mL respectivamente e os testes de estabilidade mostraram-se satisfatórios (degradação menor que 10% após 30 dias). Foram analisadas trinta e sete amostras de urina sendo que onze foram positivas para o indicador escolhido mostrando a utilidade do método no esclarecimento de ocorrências no âmbito forense, no sentido de indicar se a intoxicação da cocaína se deu por esta forma de exposição (utilização de *crack*).

UNITERMOS

Éster metilanidroecgonina; cocaína; benzoilecgonina; *crack*; indicador de *crack*

e-mail: vmcar@usp.br

SUMMARY

Research on crack biomarkers in urine samples of individuals who underwent medical-legal exams

Virgínia Martins Carvalho, Alice Ap. da Matta Chasin - Master

At the present time, epidemiologic data on the prevalence of crack in Brazil is alarming, principally as it concerns young children and teenagers in the capital city of São Paulo of São Paulo State. It is known that with crack there is a greater potential for dependency than that corresponding to other forms of cocaine use in causing dependency. Although numerous studies and methods have been validated for the identification and quantification of cocaine in biological fluids, the same is not true for the characterization of its use in the form of crack. All the methods described for differentiating the exposure to *crack* employ very expensive equipment, which is not always viable to the economic reality of the Brazilian public laboratories. This study had as its objective the development and application of a method that is efficient and economically viable for the identification and quantification of products of *crack* biomarkers in urine samples from the Forensic Toxicology Lab of the Legal Medicine Institute of São Paulo. The method showed to be linear in the interest range (dynamic range from 0.2 to 20 µg/mL) for anhydroecgonine methyl ester. The limits of detection and quantification were 0.1 and 0.2 µg/mL respectively, and the stability tests proved to be satisfactory (less than 10% lost after 30 days). Thirty seven urine samples were analyzed such that these 11 were positive for the chosen biomarker, showing the usefulness of the method for clarification purposes in the forensic environment, in the sense of indicating whether the intoxication from cocaine was of this form of exposition (*crack* use).

Keywords

Anhydroecgonine methyl ester; cocaine; benzoylecgonine; *crack*; biomarker of *crack* use

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fluxograma do método de obtenção do cloridrato de cocaína e do <i>crack</i>	4
Figura 2 - Panorama do uso de drogas no mundo baseado na procura por tratamento, 2004 ou último ano avaliado	6
Figura 3 - Alterações no consumo de cocaína no mundo em 2004 ou último ano avaliado	7
Figura 4 - Produtos de biotransformação, pirólise e transesterificação da cocaína	17
Figura 5 - Produtos de biotransformação e transesterificação do éster metilanidroecgonina	18
Figura 6 - Degradação da cocaína em processos de extração e análise por cromatografia gasosa	28
Figura 7 - Fluxograma da técnica de extração dos analitos	39
Figura 8 - Fluxograma da técnica de derivação com PFPA e PFPOH	40
Figura 9 - Cromatograma do branco de urina adicionado de 150 µL de padrão interno submetido ao método	49
Figura 10 - Cromatograma do branco de urina adicionado de EMA, BEC e COC nas concentrações de 3,0 µg/mL submetido ao método	50
Figura 11 - Representação da reação de derivação da benzoilecgonina com PFPA e PFPOH	51
Figura 12 – Representação gráfica da estabilidade da benzoilecgonina derivada com PFPA e PFPOH	52
Figura 13 - Cromatograma do branco de urina, obtido no estudo de degradação térmica, adicionado de COC com concentração urinária de 100 µg/mL	53
Figura 14 – Representação gráfica da curva analítica do EMA nas concentrações urinárias de 0,1 a 5,0 µg/mL	57

Figura 15 – Representação gráfica da curva analítica da BEC nas concentrações urinárias de 0,1 a 3,0 µg/mL	57
Figura 16 – Representação gráfica da curva analítica da COC nas concentrações urinárias de 0,1 a 5,0 µg/mL	58
Figura 17 - Curva analítica representando o intervalo dinâmico do EMA, concentrações entre 0,1 e 20 µg/mL	59
Figura 18 - Curva analítica representando o intervalo dinâmico da BEC, concentrações entre 0,1 e 50 µg/mL	59
Figura 19 - Curva analítica representando o intervalo dinâmico da COC, concentrações entre 0,1 e 100 µg/mL	60
Figura 20 - Representação gráfica dos resultados obtidos nos estudos de estabilidade após armazenamento sob refrigeração	69
Figura 21 - Representação gráfica dos resultados obtidos nos estudos de estabilidade após armazenamento em <i>freezer</i>	69
Figura 22 – Representação gráfica de pontos que expressam os resultados obtidos de amostras enriquecidas com EMA mantidas em geladeira e <i>freezer</i> durante quinze dias	70
Figura 23 – Representação gráfica de pontos que expressam os resultados obtidos de amostras enriquecidas com EMA mantidas em geladeira e <i>freezer</i> durante trinta dias	71
Figura 24 - Cromatograma de amostra autêntica submetida ao método proposto positiva para EMA, BEC e COC com concentrações urinárias de 6,38; 16,28 e 9,31 µg/mL, respectivamente	73
Figura 25 - Distribuição de óbitos por histórico. Casos registrados no Núcleo de Toxicologia do Instituto Médico Legal nos anos de 2003 e 2004	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Prevalência anual de uso de cocaína nos anos de 2004/2005	5
Tabela 2 - Resultados dos estudos de degradação térmica da COC referidos na literatura	27
Tabela 3 - Métodos analíticos utilizados na determinação de indicadores de uso de <i>crack</i> em diferentes matrizes biológicas, referidos na literatura	30
Tabela 4 - Intervalo de confiança dos tempos de retenção relativos dos analitos em urina	54
Tabela 5 - Áreas relativas utilizadas para elaboração das curvas analíticas dos analitos em urina	56
Tabela 6 - Recuperação do método proposto para análise de EMA, BEC e COC em amostras de urina	61
Tabela 7 - Coeficientes de variação obtidos dos QCs de EMA, BEC e COC obtidos nos ensaios de precisão intra e interensaio	63
Tabela 8 - Concentrações urinárias médias obtidas nas análises dos QCs em seis determinações, em seis dias diferentes para cálculo de exatidão	64
Tabela 9 - Parâmetros de segurança do método proposto para determinação de EMA em urina	65
Tabela 10 - Parâmetros de segurança do método proposto para determinação de BEC em urina	66
Tabela 11 - Parâmetros de segurança do método proposto para determinação de BEC em urina	66
Tabela 12 - Resultados do estudo de estabilidade dos analitos adicionados na matriz com concentração urinária de 1,0 µg/mL de EMA, BEC e COC	68
Tabela 13 - Concentrações dos analitos determinados e informações referentes às amostras de urina <i>post mortem</i> selecionadas para estudo	74

Tabela 14 - Concentrações dos analitos determinados

e informações referentes às amostras de urina provenientes de

indivíduos vivos selecionadas para estudo 75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT = serotonina
AE = anidroecgonina
AUC = área sob a curva
BEC = benzoilecgonina
CE = cocaetileno
GC-FID = cromatógrafo a gás acoplado ao detector por ionização em chama
GC-MS = cromatógrafo a gás acoplado ao detector de espectrometria de massas
CH₂Cl₂ = diclorometano
COC = cocaína
COC HCl = cloridrato de cocaína
Di H₂O = água deionizada
EEA = éster etilanidroecgonina
EMA = éster metilanidroecgonina
EME = éster metilecgonina
HCl = ácido clorídrico
HV = humor vítreo
IN = intranasal
IV = intravenosa
LD = limite de detecção
LQ = limite de quantificação
MeOH = metanol
NE = noradrenalina
NORCOC = norcocaetileno
NORBEC = norbenzoilecgonina
NTF-IML = Núcleo de Toxicologia Forense do Instituto Médico Legal
ONU = Organização das Nações Unidas
PFPA = anidrido pentafluoropropiônico
PFPOH = pentafluoropropanol
PI = padrão interno (isopropilbenzoilecgonina)
SC = sangue cardíaco
SF = sangue femoral
SNC = sistema nervoso central
SPE = extração em fase sólida

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	8
2.1 Aspectos toxicológicos do crack.....	8
2.1.1 Propriedades e padrões de uso	8
2.1.2 Toxicocinética	11
2.1.3 Toxicodinâmica.....	19
2.2 Aspectos analíticos	22
2.2.1 Emprego de urina como matriz.....	22
2.2.2 Bioindicadores específicos de uso do crack.....	24
3 OBJETIVO E PLANO DE TRABALHO	32
4 MATERIAL E MÉTODO.....	33
4.1 Material	33
4.1.1 Aparelhos e acessórios.....	33
4.1.2 Soluções-padrão	34
4.1.3 Solventes e soluções-reagente (utilizados na técnica de derivação e extração)...	35
4.1.4 Amostras de urina.....	35
4.2. Método	36
4.2.1 Conduta analítica para identificação de éster metilanidroecgonina, benzoilecgonina e cocaína em urina por cromatografia gasosa acoplada ao detector por ionização em chama.....	36
4.2.1.1 Preparação das amostras	36
4.2.1.2 Extração em fase sólida	36
4.2.1.3 Procedimento de derivação	37
4.2.1.4 Condições cromatográficas.....	41
4.2.2 Estudo da estabilidade da BEC derivada	41
4.2.3 Estudo da degradação térmica da COC	41
4.2.4 Preparo das amostras de controle - QCs.....	42
4.2.5 Validação do Método.....	42
4.2.5.1 Critério de positividade	42
4.2.5.2 Especificidade	43

4.2.5.3 Curvas analíticas de EMA, BEC e COC	44
4.2.5.4 Verificação do intervalo dinâmico	44
4.2.5.5 Figuras analíticas de mérito (parâmetros de segurança analítica)	45
4.2.5.5.a Recuperação	45
4.2.5.5.b Limite de detecção e limite de quantificação	45
4.2.5.5.c Imprecisão do método	46
4.2.5.5.d Exatidão	47
4.2.5.6 Estudo da estabilidade dos analitos na matriz biológica.....	47
4.3 Determinação de EMA, BEC e COC em amostras de urina selecionadas para estudo	48
5 RESULTADOS	49
5.1 Identificação cromatográfica dos analitos extraídos da urina	49
5.2 Derivação da BEC	50
5.3 Estudo da degradação térmica da COC.....	53
5.4 Validação do método	54
5.4.1 Critério de positividade.....	54
5.4.2 Especificidade.....	54
5.4.3 Linearidade	55
5.4.4 Intervalo dinâmico	58
5.4.5 Figuras analíticas de mérito (parâmetros de segurança analítica).....	61
5.4.5.1 Recuperação	61
5.4.5.2 Limite de detecção e limite de quantificação	62
5.4.5.3 Imprecisão intra-ensaio e interensaio	62
5.4.5.4 Exatidão	64
5.4.6 Estabilidade.....	67
5.4.7 Determinação de EMA, BEC e COC em amostras de urina selecionadas para estudo	72
6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	78
7 CONCLUSÕES	97

1 INTRODUÇÃO

O *crack* vendido a um preço relativamente baixo nas ruas é a forma básica da cocaína-COC, chamada de “base livre” ou cocaína alcaloidal, podendo ser obtido do cloridrato de cocaína ou da pasta de cocaína, ambos produtos de extração da coca.

A obtenção do *crack* é realizada através da dissolução do pó em água, adição de agente alcalinizante (hidróxido de sódio ou bicarbonato de sódio) e aquecimento. Uma película fina surgida no sobrenadante é retirada, seca em papel e colocada em cachimbos caseiros para ser fumada. O nome de rua parece derivar do som de crepitação devido ao aquecimento do bicarbonato ou do cloreto de sódio (impurezas provenientes do processo de extração) (Figura 1) (FISHER, RASKIN, UHLENHUTH, 1987; REDDA, 1990; SCHWARTZ, LUXENBERG, HOFFMANN, 1991; NAPPO, 1996).

A base livre de cocaína é resistente à degradação térmica e solúvel em lipídios, conseqüentemente pode ser fumada e é rapidamente absorvida pelos pulmões. Essa propriedade confere efeitos intensos e instantâneos equivalentes à cocaína administrada por via intravenosa-IV (KLEERUP et al., 2002).

O uso de COC na América do Norte apresenta prevalência anual de 2,3%, mais da metade de todos os usuários no mundo. A Europa central e ocidental representa o segundo lugar em consumo com taxa de prevalência de 1,1%, em média, cerca de 3,3 milhões de usuários ou um quarto dos usuários no mundo (Tabela 1).

Cerca de duzentos milhões de pessoas, 5 % da população mundial com idade entre 15 e 64 anos são usuários de drogas ilícitas. Cerca de 13 milhões desta população, 0,3% da população mundial, são usuários de cocaína. A grande procura por tratamento por usuários de COC no continente americano (Figura 2) reflete que esta substância apresenta maior incidência nesta região. (UNITED NATIONS, 2006)

Apesar de o continente americano continuar ocupando o primeiro lugar em relação aos usuários de COC as taxas de prevalência sofreram pequeno declínio no ano de 2004, cerca de 20% menor quando comparada com o ano de 1998. Adversamente ocorreu aumento nas taxas de prevalência na Europa e Oceania

(Figura 3) (UNITED NATIONS, 2006) indicando que o uso de COC é um problema para todas as nações.

A principal rota do tráfico de COC é da região andina, principalmente Colômbia, para os Estados Unidos, via México e da região andina para a Europa, via Caribe e principalmente via África (UNITED NATIONS, 2006).

Segundo do *National Survey on Drug Use and Health* (NSDUH) havia 1,5 milhões de usuários de cocaína nos Estados Unidos da América (EUA). O uso desta substância como primeira droga aumentou de maneira constante na década de noventa, alcançando 1,2 milhões em 2001. De acordo com o estudo a faixa etária dos usuários estaria entre 18 e 25 anos, sendo que os homens apresentam uma prevalência maior de uso (SAMHSA, 2005).

A cocaína continua sendo um sério problema para os EUA. O NSDUH estimou que em 2003 havia cerca de 604.000 usuários de *crack* nesse país (SAMHSA, 2005).

De acordo com o IV Levantamento Sobre o Uso de Drogas entre Crianças e Adolescentes em Situação de Rua de Seis Capitais Brasileiras, nos anos de 1987, 1989, 1993 e 1997 do Centro Brasileiro de Informações Sobre Drogas-CEBRID, o abuso de *crack* relatado como uso na vida apresentado por tipo específico de droga concentrou-se em São Paulo, 46,5% (N=114) seguido de Porto Alegre, 9,3% (N=97) e Rio de Janeiro, 4,5% (N=89). Levando em consideração o uso recente entre crianças e adolescentes em São Paulo no ano de 1997 o *crack* representava 24,6% enquanto o COC HCL aspirado 2,6% (N=114), em relação ao uso diário na mesma capital o *crack* representava 5,3% e o COC HCL 0,9% (UNIFESP, 1997)

Em 2003 no Levantamento Nacional Sobre o Uso de Drogas entre Crianças e Adolescentes em Situação de Rua nas 27 Capitais Brasileiras, realizado pelo CEBRID foi relatado o uso recente de *crack* em 22 capitais sendo que os maiores índices registrados foram em São Paulo, Recife, Curitiba e Vitória (entre 15 e 26%), seguidas de Natal, João Pessoa, Fortaleza, Salvador e Belo Horizonte (entre 8 e 12%) (UNIFESP, 2003).

O uso de *crack*, referido pelo uso ao menos uma vez na vida, entre estudantes do ensino fundamental e médio da rede pública de ensino apresenta maiores porcentagens na região sul (1,1%) e sudeste (0,8 %). A porcentagem de

uso pesado, que é definido pelo uso diário, nas 27 capitais brasileiras esteve ao redor de 0,2% (UNIFESP, 2004).

A rede de relacionamentos *orkut* tem duas comunidades que fazem apologia ao uso de *crack*, como a “EU FUMO CRACK” com 41 membros, “QUANDO NÃO TEM CRACK...” com 26 membros. Isto é um indício de que o *crack* encontra-se presente entre os indivíduos que tem acesso à Internet não sendo um problema somente entre os jovens de baixa classe sócio-econômica.

Quando o *crack* é fumado forma-se o éster metilanidroecgonina (EMA) como produto de pirólise da COC, no organismo o EMA é convertido a anidroecgonina (AE), estas substâncias permitem diferenciar a forma de uso da cocaína-COC, no caso, evidenciando o uso de *crack*. Apesar de haver numerosos estudos e métodos validados para identificação e quantificação de COC em fluidos biológicos, o mesmo não ocorre para o estabelecimento do uso da cocaína na forma de *crack*.

A cocaína fumada apresenta maior potencial de abuso e maior capacidade de produzir dependência do que a cocaína administrada por via intravenosa (IV) ou intranasal (IN), no entanto pouco se conhece sobre a farmacologia e toxicidade do EMA e a sua presença poderia ter implicações relativas aos problemas associados ao abuso de *crack*. Os possíveis efeitos farmacológicos causados pelo EMA carecem de ser examinados. (JACOB et al., 1990; NAKAHARA,ISHIGAMI, 1991; KINTZ et al., 1995; CONE,1995).

Fica claro, portanto, que a diferenciação da forma de uso da cocaína é fundamental para se estimar o padrão de abuso abordado e conseqüentemente se estabelecer um diagnóstico da situação que sirva de elemento norteador de políticas de saúde e de segurança. Os dados sobre o crescente aumento do abuso de *crack* na sociedade torna imprescindível o desenvolvimento de mecanismos que elucidem e possibilitem que se quantifique esta situação. Dentre estes mecanismos estão os métodos analíticos que compõem as análises toxicológicas com finalidade forense. Assim, a perspectiva deste trabalho foi a de estabelecer o nexos causal entre o uso (do *crack*/ cocaína) e os fatos típicos relacionados aos eventos de interesse judicial.

Figura 1: Fluxograma do método de obtenção do cloridrato de cocaína e do *crack* (SCHWARTZ,LUXENBERG,HOFFMANN, 1991; NAPPO, 1996).

Tabela 1: Prevalência anual de uso de cocaína nos anos 2004/2005*.

	Número de usuários	% (população entre 15 e 64 anos)
Europa	3.524.000	0,7
Europa central e ocidental	3.333.000	1,1
Sudoeste da Europa	64.000	0,1
Leste europeu	127.000	0,1
Continente americano	8.440.000	1,5
América do Norte	6.459.000	2,3
América do Sul	1.981.000	0,7
Ásia	260.000	0,1
Oceania	175.000	0,9
África	959.000	0,2
Global	13.358.000	0,3

Abuso de cocaína acima da média global
Abuso de cocaína em torno da média global
Abuso de cocaína abaixo da média global

* Dados do questionário do relatório anual, relatórios de diferentes governos, relatórios de diferentes organismos regionais, estimativas do UNODC.

Fonte: *Global Illicit Drug Trends 2006- Office on Drugs and Crime*. UNITED NATIONS, 2006

Figura 2: Panorama do uso de drogas no mundo baseado na procura por tratamento, 2004 ou último ano avaliado.

Fonte: Dados do questionário do relatório anual/ DELTA e relatório do governo nacional. UNITED NATIONS, 2006.

Figura 3: Alterações no consumo de cocaína no mundo em 2004 ou último ano avaliado
Fonte: Global Illicit Drug Trends 2006 - Office on Drugs and Crime, UNITED NATIONS, 2006.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aspectos toxicológicos do *crack*

2.1.1 Propriedades e padrões de uso

A base livre de cocaína apresenta-se como fármaco cristalino, branco ou transparente, inodoro, levemente volátil e com ponto de fusão entre 96 e 98 °C. Não se decompõe à temperatura requerida para sua vaporização. É solúvel em etanol, acetona, éter etílico e praticamente insolúvel em água (CLARKE, 1978).

O baixo ponto de fusão e a alta volatilidade da base livre de COC permite que a substância seja fumada em cachimbos e outros dispositivos. Quando o indivíduo fuma o *crack* o calor aplicado faz com que a base-livre seja vaporizada, desta forma o vapor de COC é distribuído na boca e pulmões. A volatilização produz pequena quantidade de aerossol que é respirado e depositado na região alveolar e a absorção extremamente rápida é responsável pelo aumento dos efeitos subjetivos que ocorrem logo após o ato de fumar (REDDA, 1990; ELLENHORN et al., 1997).

O *crack* tem sido associado a aumento de risco de efeitos tóxicos, como problemas cardíacos, paralisia respiratória, psicose paranóide, disfunção pulmonar e com aumento da incidência de uma variedade de doenças sexualmente transmissíveis (NAPPO, 1996).

A partir de década de noventa ocorreu dramática mudança nos padrões de uso da COC, principalmente na via de administração. A via respiratória foi favorecida em relação à intravenosa-IV e intranasal-IN, devido a vários fatores como características farmacológicas (intensidade e rapidez de aparecimento de efeitos) e facilidade de administração. Comparando-se as vias respiratória e intravenosa os efeitos no comportamento como sensação de “bem-estar” e euforia são mais intensos quando da administração por via respiratória, mesmo quando as concentrações de COC no sangue são equivalentes para as duas vias. (CONE, HIILSGROVE, DARWIN, 1994; CONE, 1995; PAUL, MCWHORTER, SMITH, 1999). A explicação para este fato se deve a esta forma ser liberada na pequena

circulação e propiciar a absorção de base livre pronta para penetrar no SNC, assim as concentrações que atingem o cérebro são maiores e ainda, rapidamente atingem o sítio de ação. (CHASIN, 1996)

Segundo estudo realizado entre mulheres usuárias de *crack* denomina-se “cachimbo” qualquer aparato utilizado para fumar a pedra, em geral estes dispositivos são confeccionados artesanalmente. Neste estudo os tipos de cachimbo mais citados foram lata de cerveja ou refrigerante, copo de água, embalagem de *Yakult*, pedaço de cano de ferro ou PVC (cotovelo), pedaço de isqueiro ou torneira (NAPPO et al., 2004).

O material utilizado na confecção dos cachimbos não protegem do calor gerado para sublimação da droga sendo comum as queimaduras, estas não se restringem à boca, mas atingem também dedos e nariz tornando-se sinais característicos do usuário de *crack* (NAPPO et al., 2004).

As pedras de *crack* têm tamanhos e preços variados. Em geral, uma pedra com 1g de cocaína custa 10 reais e outra com menor quantidade custa 5 reais. Em estudo realizado com mulheres usuárias de *crack* referiu-se o consumo de 6 a 10 pedras por dia, sendo que as mesmas gastam em média, por dia, em torno de 50 a 100 reais (NAPPO et al., 2004). Como o consumo de crack representa um alto custo para o usuário, isto pode induzir às práticas delituosas e degradantes com graves implicações sociais como a prostituição e outras que com implicações legais.

O perfil de usuários de crack pode ser definido por indivíduos do sexo masculino, idade inferior a 25 anos e baixa escolaridade (NAPPO, 1996). O uso apresenta duas progressões diferentes: entre os mais jovens (< 30 anos), cuja escalada começou com o cigarro e/ou álcool e passou pela maconha e cocaína aspirada até o uso de *crack*; e os mais velhos (>30 anos), que iniciaram o uso de drogas pelo cigarro e/ou álcool, seguido de maconha, medicamentos endovenosos, cocaína aspirada, cocaína intravenosa e, por fim, o *crack* (SANCHEZ, NAPPO, 2002).

Apesar de haver poucos estudos relacionados com a letalidade, o homicídio parece ser a causa jurídica mais comum entre os usuários de *crack*. Além do alto risco de violência e morte entre o usuários, há o risco de contágio de doenças sexualmente transmissíveis-DSTs, principalmente o HIV (RIBEIRO et al., 2004).

Recentemente foi publicado um estudo sobre o uso de *crack* entre mulheres, residentes em São Paulo e São José do Rio Preto, que se prostituíam para a obtenção da droga. Neste trabalho verificou-se a direta relação entre o uso de *crack* e a possibilidade de contrair DSTs (NAPPO, 2004). O fato de o *crack* estar relacionado com a maior suscetibilidade de se contrair DSTs deve ser considerado e, o conhecimento aprofundado da disseminação desta forma de uso é preponderante para que se determine as reais implicações na sociedade.

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 a tomada da substância. A simples inalação dos vapores do *crack* produz níveis sangüíneos comparáveis aos resultantes da COC IV, desta forma a inalação do *crack* apresenta maior probabilidade de produzir dependência do que mascar, beber ou cheirar COC (FISHER, RASKIN, UHLENHUTH, 1987; GOODMAN, GILMAN, 1996).

Os efeitos farmacológicos resultantes da inalação da base livre de COC são altamente dependentes das condições de volatilização. A toxicidade associada com a inalação do *crack* depende em parte das condições que a COC é vaporizada (MARTIN, LUE, BONI, 1989).

O rápido aparecimento dos efeitos no centro do prazer mediado pelo neurotransmissor dopamina faz do *crack* uma droga extremamente “atraente” para o usuário (SCHWARTZ, LUXENBERG, HOFFMANN, 1991; NAPPO, 1996). No início o *crack* provoca sensações de extremo prazer que é denominada *rush* ou *flash*, essas sensações são de intensa euforia, ilusão de onipotência e autoconfiança. O *rush* só ocorre nas vias IV e inalatória e dura cerca de 5 minutos (CONE, 1995; NAPPO, 1996; KLEERUP et al., 2002)

Aos ciclos intermitentes de consumo repetido da droga denomina-se padrão *binge* e pode durar dias. O término do *rush* é caracterizado por disforia, compulsão e fissura para a nova administração da droga-*craving*. Quando o indivíduo está na fase de *craving* torna-se agressivo e utiliza qualquer recurso para obter a droga como roubar, vender seus pertences e dos familiares e prestar favores sexuais (NAPPO, 1996; FOLTIN, FISCHMAN, 1997).

Geralmente o usuário, nos ciclos intermitentes de consumo repetido da droga, não se alimenta, não dorme, não tem cuidados básicos de higiene, perde o

interesse por sua aparência física. Além da fissura, uma gama enorme de outros efeitos podem surgir, e que se intensificam com o uso crônico: agitação, disforia, paranóia, delírio e alucinações. 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 e de ansiedade, paranóia e depressão com o uso crônico (sensibilização), 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 (MILLER, GOLD, MILLMAN, 1989; INCIARDI, 1993; NAPPO, 1996).

2.1.2 Toxicocinética

ABSORÇÃO

Quando o indivíduo fuma o *crack* absorve, além da base livre de COC, o éster metilanidroecgonina-EMA, produto de pirólise da COC (PAUL et al., 2005). Além dessas substâncias chegam aos pulmões impurezas, como lactose, lidocaína, cafeína e outras que, eventualmente estejam contaminando a droga de rua (CARVALHO, 2000) (KLEERUP et al., 2002).

A eficiência de inalação de COC devido à pirólise do *crack* é de $73 \pm 9\%$ e $62 \pm 11\%$ à temperatura de $170\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $220\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Se o *crack* é aquecido à temperatura superior a $225\text{ }^{\circ}\text{C}$, a alta temperatura resulta em baixa eficiência de inalação de COC, isto é causado porque mais EMA é produzido. Portanto a temperatura do cachimbo ou do instrumento usado para fumar tem impacto significativo na quantidade de EMA produzido. Além disso a quantidade de EMA inalado depende também da efetividade da tragada e, portanto, varia com

a experiência do usuário (JACOB et al., 1990; NAKAHARA, ISHIGAMI, 1991; CONE, HILLSGROVE, DARWIN, 1994; KINTZ et al., 1995; NEUDORFL et al., 1997; SHIMOMURA, HODGE, PAUL, 2001).

A média de biodisponibilidade da COC para a via respiratória é de 70 % (25-110%), enquanto para a via IN fica em torno de 94% (49-131%)(CONE, 1995).

A base livre de COC apresenta rápida penetração e eficiente absorção pelos alvéolos pulmonares (CONE, 1995). O *crack* demora 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 nasal (SCHWARTZ, LUXENBERG, HOFFMAN, 1991).

DISTRIBUIÇÃO

A velocidade de absorção e o desenvolvimento da concentração máxima de pico da COC são altamente dependentes da via de administração do fármaco. A COC administrada por via respiratória resulta em rápida absorção e alta concentração plasmática em consequência da eficiente absorção nos alvéolos pulmonares (CONE, 1995; KLEERUP et al., 2002). A meia-vida de absorção pulmonar e intranasal para a cocaína foi de respectivamente 1,1 min e 12 min, nos experimentos de JEFFCOAT et al. (1989), e 9 e 17 min, respectivamente, para a via intranasal, nos experimentos de CONE (1995) e de McCANCE et al. (1995).

A cocaína é rapidamente distribuída para o sistema nervoso central-SNC, resultando em concentrações no cérebro equivalente às concentrações no sangue. A taxa de entrada de cocaína no SNC depende de sua concentração no sangue e, conseqüentemente da via de administração (CONE, 1995). A meia vida da COC no plasma é de aproximadamente 30 minutos (CONE, HILLSGROVE, DARWIN, 1994).

A comparação dos teores de COC no sangue após administração de 25 mg do cloridrato de cocaína-COC HCl por via IV e 42 mg da base livre de COC indica que as duas doses produzem concentrações equivalentes, 227 e 230 ng/mL, respectivamente, dentro de 5 minutos e declina rapidamente, aproximando-se de 1 ng/mL, dentro de 12 horas (CONE, 1995). A concentração plasmática após

administração IN de 32 mg de COC HCl apresenta valor de 63 ng/mL, após 37 minutos, em média (CONE, 1995).

Estudos farmacocinéticos realizados em indivíduos que utilizaram *crack* indicam que a distribuição da COC segue o modelo bicompartimental (CONE, 1995).

A concentração de COC e seus produtos de hidrólise presentes no humor vítreo e sangue femoral-SF apresentam alta correlação, isto também é observado entre humor vítreo-HV e sangue cardíaco-SC e entre SC e SF. No entanto as concentrações de COC e seus produtos de hidrólise presentes em urina e outras matrizes (SC, HV e SF) apresentam baixa correlação. A alta correlação pode indicar a rápida distribuição da COC e seus produtos de hidrólise no sangue periférico, cardíaco e no HV; a alta correlação entre sangue femoral e cardíaco indicam que a redistribuição *post mortem* não deve ser um fator significativo para interpretação dos resultados positivos para COC nestas matrizes (DUER, SPITZ, MACFARLAND, 2006).

Escobedo et al. (1991) referem que a concentrações de COC em sangue, no caso de overdose, são mais baixas quando esta foi consequência da utilização do *crack* em comparação com o COC-HCl. Segundo esta hipótese, Chasin (1996) determinou a média de concentração de COC em sangue levando em consideração o histórico para o uso de *crack*, seus resultados mostraram que a média de concentração de COC foi menor no grupo em que houve relato de uso de *crack* (ESCOBEDO et al., 1991; CHASIN, 1996).

A AE não atravessa barreira hematoencefálica devido à sua natureza hidrofílica, no entanto o EMA chega ao tecido cerebral e é convertido a AE via hidrólise enzimática numa extensão de 1-6 % (MARTIN, LUE, BONI, 1989; ISENSCHMID, LEVINE, CAPLAN, 1992; PAUL, MCWHORTER, SMITH, 1999; SCHEIDWEILER et al., 2000; SHIMOMURA, HODGE, PAUL, 2001; FANDIÑO et al., 2002).

A concentração máxima de EMA no plasma decai rapidamente após a administração IV. Amostras coletadas após 24 e 48 horas da administração não apresentaram concentrações de EMA detectáveis em estudo realizado com carneiros devido a rápida distribuição do sangue para os tecidos. A média do volume de distribuição do EMA, 8 L/kg, quando administrado 3 mg/kg, é maior que

o da COC, 3,11 L/kg quando administrado 4mg/kg, em carneiros (SHEIDWEILER et al., 2003).

A média da meia-vida quando da administração de 3 mg/kg de EMA é de 17 minutos, enquanto para a COC é de 10,6 minutos quando administrados 4 mg/kg do fármaco (SHEIDWEILER et al., 2003).

BIOTRANSFORMAÇÃO

A COC é suscetível à biotransformação muito extensa (Figura 4), a hidrólise das ligações ésteres ocorre espontânea e enzimaticamente (INABA, *in* CHASIN, 1990) (PETERSON et al., 1995). O fármaco é biotransformado a benzoilecgonina-BEC e éster metilecgonina-EME, e ainda, há formação de pequenas quantidades de norcocaína- NORCOC e norbenzoilecgonina- NORBEC (CONE, HILLSGROVE, DARWIN, 1994).

A BEC aparece no plasma 15 a 30 min após a administração de 25 mg de cloridrato de cocaína e 42 mg de base livre de cocaína, vias IV e respiratória, respectivamente. As concentrações máximas de pico para as doses citadas variam de 61-165 ng/mL e 47-169 ng/mL, no intervalo entre 1,10 - 2,64h e 1,27 - 2,52h para as vias IV e respiratória, respectivamente. Para a via intranasal a concentração máxima de pico no plasma situa-se entre 94-158 ng/mL no intervalo de 2,94 a 3,81 horas para dose de 32 mg de COC-HCl (CONE, 1995). Em geral, as concentrações de BEC no plasma são mais altas para a via IN e mais baixas para a via respiratória, a maior concentração de BEC e menor de COC observadas na via IN provavelmente é devida à perda de parte do fármaco durante a absorção na mucosa nasal e o *efeito de primeira passagem*. A menor concentração de COC após administração IN poderia explicar a preferência dos usuários pelas outras vias de administração (CONE, HILLSGROVE, DARWIN, 1994).

O EMA é convertido no organismo a anidroecgonina por hidrólise enzimática, pela via das butirilcolinesterases, e não enzimática (PAUL, MACWHORTER, SMITH, 1999; SCHEIDWEILER et al., 2000; SHIMOMURA, HODGE, PAUL, 2001; FANDIÑO, TOENNES, KAUERT, 2002; SCHEIDWEILER et al., 2003).

Em estudo realizado com microsomas de ratos foi verificado que o EMA sofre N-oxidação formando éster metilanidroecgonina N-óxido. Na presença de etanol ocorre transesterificação sendo convertido em éster etilanidroecgonina. Ainda o éster metilnoranidroecgonina formado por desmetilação pode ser convertido, na presença de etanol, em éster metilnoranidroecgonina ou esta pode ser formada por N-desmetilação a partir do éster etilanidroecgonina. Este metabolismo ainda não está bem esclarecido o que se sabe é que a extensão da biotransformação do EMA depende da atividade enzimática nos órgãos e esta atividade diminui na seguinte ordem: fígado > pulmões > rins > cérebro (FANDIÑO, TOENNES, KAUERT, 2002).

É provável que o EMA apresente baixa afinidade por esterases microsomiais devido às baixas concentrações de noranidroecgonina, éter metilnoranidroecgonina e éster etilnoranidroecgonina determinadas em microsomas hepáticos de ratos. No entanto o processo de formação deste metabólitos é semelhante ao que ocorre com a COC onde a remoção do grupo N-metila, por atividade enzimática, diminui a afinidade da COC, BEC e CE pela enzima resultando nos derivados norcocaína, benzoilecgonina e norcocaetileno (FANDIÑO, TOENNES, KAUERT, 2002).

A biotransformação do EMA é apresentada na Figura 5.

ELIMINAÇÃO

A eliminação da COC, também quando o *crack* é utilizado, segue cinética de primeira ordem (CONE, 1995). Segundo estudo realizado por Shimomura, Hodge, Paul (2001), a AE é encontrada em maiores concentrações na urina, cerca de sete vezes acima em relação às concentrações de EMA (SHIMOMURA, HODGE, PAUL, 2001).

Em estudo realizado por Cone, Hillsgrove, Darwin (1994) o EMA foi detectado em baixas concentrações (5-27 ug/mL) em urina imediatamente após a administração de 42 mg de COC por via respiratória e manteve-se detectável por até 28 horas nesta matriz (CONE, HILLSGROVE, PAUL, 1994).

Jacob *et al.* (1990) determinaram a média de concentração urinária de EMA, após administrar base livre de cocaína da seguinte forma: foram colocadas 100 mg de base livre de cocaína finamente triturada em cachimbo e o mesmo

aquecido a 250°C, após três segundos de aquecimento, cada voluntário fumou duas vezes sendo que cada tragada durou de 10 a 45 segundos. A concentração média de EMA em quinze voluntários foi de 816 ng/mL (faixa de 51 a 2866) em urina coletada até duas horas subseqüentes à administração do fármaco. O tempo de meia vida de eliminação estimada foi de 1 hora (JACOB et al., 1990).

Figura 5: Produtos de biotransformação e transesterificação do éster metilendioecgonina (FANDIÑO, TOENNES, KAUERT, 2002)

2.1.3 Toxicodinâmica

Em 1990 foi proposto que o EMA poderia ter efeito colinérgico devido à similaridade de sua estrutura química com a arecolina e com a anatoxina (JACOB et al. 1990). A suposição pôde ser fortalecida por estudos realizados por Erzouki et al. (1995) em que a administração IV de EMA pareceu diminuir a pressão arterial média, os batimentos cardíacos e a taxa respiratória em coelhos (ERZOUKI et al., 1995). O EMA apresenta ação muscarínica *in vitro* (HUANG et al., 1997; WOOLF et al., 1997; YANG et al., 2001). Ainda o EMA induziu rápida hipotensão em carneiros sendo este efeito antagonizado competitivamente por metilbrometo de atropina sustentando a hipótese do efeito muscarínico *in vivo* (SCHEIDWEILER et al., 2003).

O efeito inotrópico negativo do EMA em miocárdio ventricular humano ocorre pela estimulação dos receptores muscarínicos que é concentração-dependente e é potenciado pelo óxido nítrico. A interação com receptores muscarínicos resulta em inibição da disponibilidade de cálcio durante o processo de excitação-contração. Isto sugere que os efeitos cardiotoxícos da COC combinados com os efeitos do EMA, no caso de uso de *crack*, levam à complicação cardiopulmonar aguda mais intensa do que outras vias de administração da COC (WOOLF et al., 1997).

A COC é um anestésico local com propriedades simpatomiméticas e potente estimulante do sistema nervoso central. Estudos demonstram que a COC inibe competitivamente os receptores muscarínicos M_2 nos tecidos cardíaco e cerebral, indicando que esta ação anticolinérgica tenha importante papel na cardiotoxicidade (SHARKEY et al., 1988; FLYNN, VAISHNAV, MASH, 1992; SHANOON et al., 1993; MIAO, QUI, MORGAN, 1996). O efeito estimulante cardiovascular da COC contrasta com o efeito agonista muscarínico do éster metilanidroecgonina *in vitro*, diminuindo a contratilidade e estimulando a produção de óxido nítrico na células cardíacas e tecidos (ERZOUKI et al., 1995; SCHEIDWEILER et al., 2003).

A administração de COC por via IV, respiratória e IN produz efeitos farmacológicos análogos, no entanto a via IN resulta em efeitos mais lentos e menos intensos. A administração IV e respiratória produz imediato aumento da

pressão arterial sistólica e diastólica, aumento do diâmetro da pupila e aumento da taxa de pulso, retornando a linha de base entre 30-45min, sendo que a taxa de pulso é maior na via IV, enquanto os outros efeitos são menores quando comparada com a via respiratória (CONE, 1995; TANDA et al., 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 sanguíneo na coronária, podendo ocorrer arritmia ventricular, isquemia e infarto agudo do miocárdio (VONGPATASIN et al., 1999; HE, YANG, ZHANG, 2005; KIYATKIN, BROWN, 2005).

Os efeitos reforçadores da COC correlacionam-se com sua eficácia no bloqueio do transportador dopamínico, que leva a um aumento da estimulação dopaminérgica dos neurônios mesocorticais e mesolímbicos. Entretanto, a COC também bloqueia tanto a recaptação de noradrenalina-NE quanto o da serotonina-5-HT e o seu uso crônico produz alterações nestes sistemas neurotransmissores (KUCHAR, RITZ, BOJA, 1991).

O bloqueio da recaptura pré-sináptica de dopamina causa acúmulo desse neurotransmissor nos receptores pós-sinápticos e conseqüentemente, euforia. Para compensar a intensificação da atividade dopamínica, o neurônio pré-sináptico diminui a liberação e a síntese do neurotransmissor. Há referências de que a sintomatologia relacionada à “síndrome de abstinência” – exaustão, irritabilidade, hipersonolência e depressão – deve-se à depleção aguda deste neurotransmissor. Foi comprovado que durante a abstinência há uma diminuição dos níveis de dopamina no corpo estriado em relação aos do cerebelo, à semelhança do que ocorre na doença de Parkinson. Isto indica que o uso abusivo de COC prejudica a atividade funcional nesta parte do SNC, o que pode estar relacionado com a toxicidade que se expressa em nível comportamental (BAXTER et al., in CHASIN, 1990; TELLA, 1995; CAREY et al., 2004; GERACITANO et al., 2004).

A paralisia muscular causada pela COC deve-se provavelmente à ação da COC nos receptores nicotínicos pós-sinápticos e não à inibição (que também ocorre) da permeabilidade da membrana celular aos íons sódio. Embora a ação anestésica local não seja responsável pela paralisia, sabe-se que essa ação ocorre e parece ser preponderante na presença de níveis sanguíneos altos. À semelhança de outras substâncias, usadas clinicamente como anestésicos locais, o bloqueio do potencial de ação das membranas excitáveis se dá por inibição da permeabilidade da membrana celular aos íons de sódio durante a despolarização, impedindo assim a iniciação e condução do impulso nervoso (JOHANSON, FISCHMAN, *in* CHASIN, 1990; TELLA, GOLDBERG, 1998; KNUEPFER, 2003).

A condutância do potássio só se altera com concentrações de anestésico local maiores do que as necessárias para o bloqueio da condução. É possível que o anestésico local desloque o cálcio dos locais em que este se une aos fosfolipídios da membrana para abrir os canais de sódio. Assim, o bloqueio dos poros seria “mecânico”, através da competição com o cálcio, o que evita o aparecimento do potencial de ação por diminuição da permeabilidade aos íons sódio. A COC interage com substâncias bloqueadoras dos canais de cálcio. O antagonismo a estas substâncias, sugere que um provável mecanismo de ação da COC seja o de aumentar o fluxo de cálcio através das membranas celulares. Esta constatação embasa a indicação destes fármacos, bloqueadores dos canais de cálcio, como antídotos na intoxicação aguda por cocaína (CAMARGO, *in* CHASIN, 1990; TROUVE, NAHAS, *in* CHASIN 1990; TELLA, GOLDBERG, 1998).

2.2 Aspectos analíticos

2.2.1 Emprego de urina como matriz

O rim é o principal órgão de excreção para a maioria dos xenobióticos. Desta forma a urina representa matriz adequada em análises toxicológicas, mormente nas análises toxicológicas com finalidade forense, apresentando vantagens como coleta não invasiva, alta concentração do toxicante e/ou seus metabólitos, menor custo na análise, etc. A identificação de EMA na urina indica a inalação recente de *crack*. Em estudo realizado por CONE et al, o EMA foi detectado em baixas concentrações (5-27 ug/mL) imediatamente após a administração de 42 mg de COC por via respiratória e manteve-se detectável por até 28 horas na urina (CONE, HILLSGROVE, DARWIN, 1994; KLASSEN, 2001).

A urina é uma matriz passível de adulteração, dentre as várias possibilidades, a mais grosseira é a diluição o que pode ser evidenciada pelo valor de densidade e pela concentração de creatinina, além destes parâmetros valores de pH 3 ou 11 podem indicar a adulteração. Dentre os mais sofisticados métodos de diluição inclui-se o consumo de diuréticos combinado com vitaminas e creatina em forma de infusão que simulam concentrações normais de creatinina quando se utiliza método enzimático para determinação desta. No entanto os adulterantes apresentam maior interferência em imunoensaios do que em métodos cromatográficos. (SHOLER, 2004).

A validade dos resultados obtidos na análise depende da integridade desta matriz. Espera-se, no caso de análise com finalidade forense, que a urina seja acondicionada em recipiente adequado, no entanto esta prática não impede a adulteração no exame médico legal *in vivo*, o indivíduo avaliado pode adulterar a própria urina com água ou substâncias que podem destruir os analitos. No entanto a coleta assistida e a observação da cadeia de custódia dirimem esta possibilidade.

Devido às conseqüências potencialmente adversas à sociedade e ao próprio indivíduo tem-se conduzido a análise de urina para detecção de drogas controladas ou ilícitas. Geralmente o teste é realizado rotineiramente em serviços militares, empresas oficiais de transporte, agências nucleares, sistemas de justiça

federal e estadual, entre outros. Significantes implicações ética e legal estão associadas ao teste; um resultado positivo pode resultar em marginalização, perda de emprego e outras conseqüências. Levando estes fatores em consideração estabeleceu-se *cut off* de concentrações de analitos, no caso de COC estabelece-se 300 ng/mL e 150 ng/mL de BEC no teste inicial e confirmatório, respectivamente (KLASSEN, 2001). No entanto não há *cut off* estabelecido para os indicadores de *crack* e nem consta que sejam identificados para estes outros fins forenses (SAMHSA, 2005).

Geralmente a análise de urina só pode indicar o uso do xenobiótico ocorrido dentro dos últimos 2 a 4 dias. Foram descobertos na urina de fumantes de *crack* vários produtos de pirólise, incluindo ácido benzóico, metilbenzoato, e isômeros do produto que é o resultado da eliminação de ácido benzóico de COC, como o EMA, este último é formado como resultado da degradação térmica de cocaína e não é produzido metabolicamente. Por conseguinte, parece provável que uma quantia significativa de EMA seria absorvida por fumantes de COC e, então, pode ser considerado como um marcador de pirólise de cocaína e o seu monitoramento na excreção urinária pode ser útil para distinguir se uso de cocaína ocorreu por via inalatória ou por outra via. A meia-vida de eliminação do EMA é curta, cerca de uma hora e a concentração urinária média é de 815,9 ng/mL em urina coletada nas primeiras duas horas após o crack ser fumado, quando 100 mg da droga é colocada no cachimbo e fumada por duas vezes com duração de 10 segundos em cada momento, a eficiência de inalação do fumante deve ser considerada, já que varia de acordo com a experiência do usuário (MARTIN, LUE, BONI, 1989; JACOB et al., 1990; CONE, HILLSGROVE, DARWIN, 1994; KINTZ et al., 1995; CONE, 1995; TOENNES et al., 1999; PAUL, MCWHORTER, SMITH, 1999; JAGER, ANDREWS, 2001; TOENNES et al., 2003).

2.2.2 Bioindicadores específicos de uso do *crack*

Éster metilanidroecgonina (EMA) e anidroecgonina (AE)

O EMA e AE são produzidos também como artefato durante a análise por cromatografia a gás-CG a partir da COC e seus metabólitos devido a alta temperatura usada para vaporização no injetor, geralmente isto ocorre quando a concentração do analito excede a 3000 ng/mL (JACOB et al., 1990; NAKAHARA, ISHIGAMI, 1991; KINTZ et al., 1995; NEUDORFL et al., 1997; PAUL, MCWHORTER, SMITH, 1999; SHIMOMURA, HODGE, PAUL, 2001). A AE também pode ser produzida como artefato na degradação térmica da BEC (DE LA TORRE et al., 1993; GONZÁLEZ et al., 1995), além da degradação da BEC, pode ocorrer degradação da norcocaína-NORCOC formando éster metilanidronorecgonina e degradação do cocaetileno-CE formando éster etilanidroecgonina.

A pirólise da BEC, COC, CE e NORCOC ocorre por transição cíclica mediada por *cis*-eliminação e por reações envolvendo debenzoilação (GONZÁLEZ et al., 1995).

O principal produto de pirólise do cloridrato de cocaína-COC HCL é uma mistura de α , β , γ e δ -carbometoxiciclo-heptatrienos, enquanto o do *crack* é o EMA que é resultado da eliminação térmica do ácido benzóico sob condições alcalinas. Desta forma é possível diferenciar a inalação das duas diferentes formas da COC (NAKAHARA, ISHIGAMI, 1991).

O EMA pode ser usado como bioindicador para detecção de uso recente de *crack* empregando-se a urina e ainda pode evidenciar exposições pregressas ou ainda o uso crônico de *crack*, empregando o cabelo como matriz. Em alguns casos não se detecta EMA em urina de usuários de *crack*, isto ocorre porque o EMA é sensível à hidrólise sendo convertido a AE por biotransformação ou nas condições de armazenamento e/ou transporte da amostra através de desmetilação (KINTZ et al., 1995) (JACOB et al., 1990) (PAUL, MCWHORTER, SMITH, 1999).

Segundo estudo realizado por SHIMOMURA et al., 2001 que empregou a técnica de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas - GC-MS

para identificação e quantificação e fase sólida para extração do analito, o bioindicador encontrado em maiores quantidades na urina é a AE, numa concentração cerca de sete vezes maior que o EMA, sendo os teores médios encontrados de 456 ng/mL (109-7452 ng/mL) e 62 ng/mL (0-2030 ng/mL) de AE e EMA, respectivamente, quando determinados em 15 urinas *post mortem*. As maiores concentrações de AE sugerem que este bioindicador seria um melhor marcador para identificar exposição ao *crack*. Pode-se ainda determinar na urina quando da utilização do *crack* bioindicadores não específicos, como a COC inalterada, EME e BEC (MARTIN, LUE, BONI, 1989; ZHANG, FOLTZ, 1990; JACOB et al., 1990; ISENSCHMID et al., 1992; CONE, 1995; PAUL, MCWHORTER, SMITH, 1999; SCHEIDWEILER et al., 2000; SHIMOMURA, HODGE, PAUL, 2001; FANDIÑO et al., 2002).

O EMA pode ser detectado em muitas matrizes biológicas como cabelo, sangue, saliva, urina, suor, fígado, pulmão, rins e cérebro (JACOB et al., 1990; CONE, HILLSGROVE, DARWIN, 1994; KINTZ et al., 1995; SCHEIDWEILER et al., 2000; SHIMOMURA, HODGE, PAUL, 2001; FANDIÑO et al., 2002). Na saliva, o analito é detectado logo após a administração, mas a concentração declina rapidamente alcançando um valor médio de 1ng/mL, decorrida uma hora do momento da administração (CONE, HILLSGROVE, DARWIN, 1994).

Em urina, o EMA pôde ser detectado em baixas concentrações (5-27 µg/L) imediatamente após a administração de 42 mg de *crack* e manteve-se detectável por 28 horas (CONE, 1995).

Em relação à estabilidade, EMA e seu produto de hidrólise, AE, foram analisados em soro através de métodos que usam cromatógrafo a gás acoplado a espectrometria de massa. Foi determinado que 50% de EMA em soro humano é hidrolisado a AE em 5 dias à temperatura ambiente e em 13 dias em temperatura de 4°C. A adição de inibidores de esterase como fluoreto de sódio reduz a hidrólise significativamente, chegando a inibir totalmente a desmetilação. A hidrólise de EMA também ocorreu em aparelhos com valores de pH acima de 5, mas a taxa de hidrólise era significativamente reduzida quando comparada com o soro e aumentada notadamente pela adição de esterase de butirilcolina. Os dados sugerem que o EMA é degradado por dois mecanismos: hidrólise química devido ao pH básico e hidrólise enzimático através de esterase de butirilcolina. Paul et

al., citam que 3,2, 10 e 23% de ME é hidrolisada a AE na urina em pH 8, 8,5 e 9, respectivamente (PAUL, MCWHORTER, SMITH, 1999; FANDIÑO et al., 2002).

A volatilização e pirólise da COC a partir da sua base depende da temperatura: conforme aumenta a temperatura, aumenta-se a produção de EMA e diminui a de COC. Na pirólise do *crack* a quantidade de COC é de aproximadamente 68 a 77% em temperatura de 230 °C e de cerca de 30% em temperatura de 255 °C (NAKAHARA, ISHIGAMI, 1991).

A técnica de cromatografia líquida permite a análise de compostos voláteis e termolábeis (BOCXLAER et al., 2000), portanto seria uma alternativa para análise de EMA e AE e eliminaria o a possibilidade de artefato de técnica. No entanto EMA e AE são moléculas desprovidas de grupos cromóforos e grupos fluorescentes o que impossibilita a detecção por fluorescência ou na região do UV/Visível.

A produção de EMA como artefato em análise por cromatografia gasosa ou na preparação da amostra deve ser considerada na identificação da COC e EMA. Alguns solventes promovem a degradação da COC, peróxido enriquecido com dietiléter promove a N-desmetilação da COC convertendo-a a norcocaína, metanol promove metilação em ácidos carboxílicos e o etanol promove a epimerização ou transesterificação de grupos ésteres. O éster etilanidroecgonina-EEA pode ser formado pela pirólise do cocaetileno-CE devido à reação de transesterificação. Além da formação de EMA, a degradação de COC pode resultar na formação de EME e ecgonina (Figura 6) (CASALE, 1992). A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos em estudos de degradação térmica da COC referidos na literatura consultada.

O emprego de dietiléter na ressuspensão de cocaína extraída para injeção em cromatografia gasosa facilita a formação de EMA como artefato, no entanto as quantidades de EMA formadas são menores do que quando se emprega metanol para a mesma finalidade (CASALE, 1992).

Tabela 2: Resultados dos estudos de degradação térmica da COC referidos na literatura.

Faixa de concentração da COC em ng/mL	Matriz	Taxa de degradação (%)	Temperatura do injetor (°C)	Referência
50-1000	soro	1,0 - 6,8	280	TOENNES et al., 2003
400	NA	2,5-2,7	280	GONZÁLES et al., 1995
2000		1,4-1,6		
400	NA	ND	100	GONZÁLES et al., 1995
2000		< 0,5		
10-1000	NA	< 1	250	TOENNES et al., 1999
50-5000	urina	< 0,3	260	JACOB et al., 1990
10-2000	urina	< 1	260	KINTZ et al., 1995
3,1-1000	urina	<1	250	CONE et al., 1994

Figura 6: Degradação da cocaína em processos de extração e análise por cromatografia gasosa (CASALE, 1992).

Isenschmid, Levine, Caplan (1988) realizaram a derivação do EME empregando como agente derivatizante o cloreto de 4-fluorobenzoil. Neste método o EME é convertido a p-fluorococaína via modificação da reação de Schotten-Bauman. A reação envolve o uso de acil haletos altamente reativos na presença de um solvente aprótico (benzeno) e acceptor de prótons (piridina) para converter alcoóis em ésteres. Este método apresenta vantagens porque o derivado não é formado endogenamente e o processo de derivação não afeta a cocaína inicialmente presente na amostra (ISENSCHMID, LEVINE, CAPLAN, 1988). Entretanto a utilização do benzeno (agente carcinogênico) contra-indica tal método.

Estudos referem a derivação de BEC e outros metabólitos da COC com pentafluoropropanol (PFPOH) e anidrido pentafluoropropiônico (PFPA), estes reagentes tornam os derivados apolares sendo estes passíveis de serem separados por cromatografia gasosa e identificados na maioria dos detectores como captura de elétrons, ionização em chama e espectrometria de massas (ZHANG, FOLTZ, 1990; LILLSUNDE et al., 1996; XIA et al., 2000).

A Tabela 3 resume alguns métodos analíticos e parâmetros de validação para identificação e quantificação de EMA e AE em diferentes matrizes.

Tabela 3: Métodos analíticos utilizados na determinação de bioindicadores de uso de *crack* em diferentes matrizes biológicas, referidos na literatura.

Analito	Matriz	Extração	Equipamento	Coluna	LD (ng/mL)	Linearidade (ng/mL)	Recuperação (%)	Referência
EMA	urina	SPE/troca catiônica	CG-MS	HP-1 Metil Silicone	3-6	3,1 - 1000	78,3	Cone <i>et al.</i> , 1995
	sangue							
	saliva							
EMA	saliva	SPE/troca catiônica	CG-MS	HP-1 sílica fundida	1	1,5-500	>90	CONE <i>et al.</i> , 1994
EMA	urina	Líquido/líquido	CG-MS	HP-1 metilsilicone	10	50-5000		JACOB <i>et al.</i> , 1990
EMA	cabelo	Hidrólise, líquido/líquido	CG-MS	HP-5 metilsilicone	1	10-2000	79,3	KINTZ <i>et al.</i> , 1995
	urina	Líquido/líquido						
AE	urina	SPE/troca catiônica	CG-MS	DB-5MS (5:95 fenilmetilsilo xano)	7	7,0-2000	89-99%	PAUL <i>et al.</i> , 1999

LD - limite de detecção do método, EMA - éster metilanidroecgonina, AE - anidroecgonina, SPE - extração em fase sólida, analito - substância analisada

Continuação. Tabela 3: Métodos analíticos utilizados na determinação de bioindicadores de uso de crack em diferentes matrizes biológicas, referidos na literatura.

<i>Analito</i>	<i>Matriz</i>	<i>Extração</i>	<i>Equipamento</i>	<i>Coluna</i>	<i>LD (ng/mL)</i>	<i>Linearidade (ng/mL)</i>	<i>Recuperação (%)</i>	<i>Referência</i>
EMA	urina	SPE/troca catiônica	CG-MS	HP Ultra II 5% fenilmetilsil oxano	10	20-2500	93,45	SCHEIDWEI LER et al., 2000
	sangue				10	30-3000	73,49	
AE	sangue							
AE	urina	SPE/troca catiônica	CG-MS	DB- 5MS(fenilm etilsiloxano)	2	2,0-300	90	SHIMOMUR A et al., 2001
EMA					10	10,0-300	50-60	
EMA	sangue	SPE/troca catiônica	CG-MS	HP-5	1	2,5-250	86 ± 2	TOENNES et al., 1999
EMA	urina	Líquido/líqui do -	CG-MS	DB-1	-	-	-	ZHANG & FOLTZ, 1990
AE		hidrólise enzimática						

LD - limite de detecção do método, EMA - éster metilanidroecgonina, AE - anidroecgonina, SPE - extração em fase sólida, analito - substância analisada

3 OBJETIVO E PLANO DE TRABALHO

Tendo em vista que a identificação dos metabólitos de uso de *crack* é importante para estabelecer onexo causal entre *crack*/violência em exame com finalidade médico legal e que somente a identificação de COC e BEC na urina não pode ser usada para elucidar se o fármaco foi administrado por via IV, IN ou respiratória(CONE, HILLSGROVE, DARWIN,1994; PAUL, 1999), é mister que se realize a análise do EMA. Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver um método de análise eficiente e viável economicamente, para identificação e quantificação dos indicadores específico, EMA, e não específicos, COC e BEC, em urina, para estabelecer através de uma única marcha analítica se houve exposição à COC, na forma de sal (cloridrato ou sulfato) ou se esta ocorreu através do uso de *crack*.

Para cumprir o objetivo proposto, adotou-se o seguinte plano de trabalho:

- Revisão dos métodos analíticos existentes na literatura para identificação e quantificação dos bioindicadores de uso do *crack* em urina;
- Otimização da técnica de derivação da BEC;
- Desenvolvimento e validação de metodologia para identificação e quantificação EMA, BEC e COC por cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização de chama - GC-FID;
- Aplicação da metodologia desenvolvida às amostras de urina provenientes do Núcleo de Toxicologia Forense do Instituto Médico Legal de São Paulo - NTF-IML, coletadas durante o ano de 2005, adotando-se como critério de inclusão a positividade para cocaína em análise prévia realizada pela instituição.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Material

4.1.1 Aparelhos e acessórios

- Evaporador com fluxo de nitrogênio, *Pierce*;
- Cromatógrafo a gás , modelo 3300 – Intralab, equipado com detector de ionização em chama; injetor tipo “*split/splitless*”, com insensor do tipo *on-column*; coluna cromatográfica capilar DB5 (marca) 5% fenil, 95% metilsilicone com 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de fase;
- Software *Varian Star 5.0*;
- Gases especiais para cromatografia gasosa (CG): nitrogênio, oxigênio e hidrogênio *White Martins, DIG-SP*;
- Cromatógrafo a gás Finnigan®, modelo GCQ TM, acoplado ao detector seletivo de massas Finnigan® (sistema GC-MS), tecnologia *ion trap*, insensor do tipo splitless, coluna cromatográfica capilar DB5 (marca) 5% fenil, 95% metilsilicone com 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de fase; gás hélio *White Martins, DIG-SP*, fluxo de 1 mL/min, como gás de arraste;
- Software de aquisição de dados *Xcalibur*;
- Tubos de derivação, previamente silanizados, *Sigma Aldrich*;
- Bloco de aquecimento, *Pierce*;
- Colunas de extração em fase sólida de troca catiônica, *Bond Elut Certify I*, 130 mg de adsorvente e volume de 3 mL, *Varian*;
- Câmara de extração a vácuo;
- Bomba de vácuo;
- Equipamento medidor de pH;
- Agitador mecânico tipo *vórtex*.

4.1.2 Soluções-padrão

Soluções-estoque

As soluções-estoque utilizadas são provenientes da Radian®.

- Solução de cocaína em acetronitrila na concentração de 1mg/mL;
- solução de benzoilecgonina em metanol na concentração de 1mg/mL;
- solução de éster metilanidroecgonina em acetoneitrila na concentração de 1mg/mL;
- solução de benzoilecgonina isopropiléster, padrão interno-PI, em acetoneitrila na concentração de 1mg/mL;
- soluções das seguintes substâncias preparadas em metanol: cafeína, nicotina, lidocaína, propoxifeno e atropina nas concentrações de 1 mg/mL e delta-9-carboxitetrahydrocannabinol na concentração de 100 µg/mL.

Soluções de trabalho

- Solução de cocaína em acetoneitrila na concentração de 100µg/mL;
- solução de benzoilecgonina em metanol na concentração de 100µg/mL;
- solução de éster metilanidroecgonina em acetoneitrila na concentração de 100µg/mL;
- solução de benzoilecgonina isopropiléster, padrão internoPI, em acetoneitrila na concentração de 100µg/mL;
- soluções das seguintes substâncias preparadas em metanol: cafeína, nicotina, lidocaína, propoxifeno e atropina nas concentrações de 100 µg/mL e delta-9-carboxitetrahydrocannabinol na concentração de 10 µg/mL.

As soluções de trabalho foram preparadas a partir das soluções-estoque.

As soluções-estoque foram transferidas para balão volumétrico de 10mL e completado o volume com o metanol para benzoilecgonina, lidocaína, cafeína, nicotina e delta-9-carboxitetrahydrocannabinol e acetoneitrila para cocaína, éster metilanidroecgonina, benzoilecgonina isopropiléster, atropina e propoxifeno.

Todas as soluções (estoque e de trabalho) foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar e mantidas em congelador.

4.1.3 Solventes e soluções-reagente (utilizados na técnica de derivação e extração)

- Metanol-MeOH, grau HPLC, *Merck*;
- Água deionizada-DI H₂O;
- Anidrido pentafluoropropiônico - PFPA e pentafluoropropanol - PFPOH, *Sigma Aldrich*;
- Acetato de etila, *Merck*;
- Diclorometano, grau HPLC, *Merck*;
- Hidróxido de amônio-NH₄OH, *Synth*;
- Hidróxido de potássio-KOH 1,0 M, *Synth*;
- Ácido clorídrico-HCl 0,1N, *Synth*;
- Ácido clorídrico-HCl 0,2 N, *Synth*;
- Solução tampão fosfato de potássio, pH 6,0, 100 mM.

Preparo da solução tampão fosfato de potássio, pH 6,0, 100 mM: pesar 2,72 gramas de diidrogenofosfato de potássio-KH₂PO₄, dissolver em 400 mL de água ultrapurificada, ajustar o pH 5,5 ($\pm 0,1$) com KOH 1,0 M, completar o volume com água ultrapurificada, estocar a 5°C em vidro, estável por um mês.

4.1.4 Amostras de urina

Branco de urina referência negativa

Urina colhida de 6 voluntários não usuários de COC e/ou *crack*, não medicados pelo menos nas 48 horas precedentes à coleta. Ajustou-se o pH 5,5-6,0 com HCl 0,2N.

Amostras selecionadas para análise

Urina de indivíduos vivos e cadáveres humanos necropsiados nos postos médico-legais do interior do Estado de São Paulo e no Instituto Médico Legal -

Sede, cuja análise prévia realizada no Núcleo de Toxicologia Forense do Instituto Médico Legal-NTF-IML apresentou resultado prévio positivo para cocaína.

4.2. Método

4.2.1 Conduta analítica para identificação de éster metilanidroecgonina, benzoilecgonina e cocaína em urina por cromatografia gasosa acoplada ao detector por ionização em chama

4.2.1.1 Preparação das amostras

A solução de trabalho do PI-benzoilecgonina isopropil éster (150 µL) foi transferida para balão volumétrico de 5 mL, contendo 3 mL de urina branco de referência. Completou-se o volume para 5 mL com urina proveniente do mesmo *pool* e as amostras foram agitadas em *vórtex*.

As amostras foram transferida para tubos de vidro de 25 mL dotados de rolha esmerilhada contendo 2mL de solução tampão fosfato pH 5,5-6,0. Os tubos foram agitados em *vórtex* durante aproximadamente um minuto.

4.2.1.2 Extração em fase sólida

Extração da EMA, BEC e COC

Condicionamento da coluna

As colunas foram posicionadas no equipamento de extração acoplado à bomba de vácuo. Com fluxo menor que 2 mL/min verteu-se à coluna 3 mL de metanol e 3 mL de tampão fosfato pH 5,5-6,0, evitando o secamento da coluna, segundo especificações do fabricante.

Passagem da amostra

As amostras preparadas, conforme descrito em 4.2.1.1, foram vertidas para a coluna, mantendo o fluxo de escoamento menor que 2 mL/min, segundo especificações do fabricante.

Lavagem da coluna

Transferiu-se seqüencialmente 2mL de tampão fosfato pH 5,5-6,0, 6 mL de água deionizada, 2,0 mL de ácido clorídrico 0,1 N e promoveu-se a secagem da coluna por 5 min a 10 mmHg de pressão. A seguir procedeu-se a lavagem com 9 mL de metanol, segundo especificações do fabricante.

Eluição

Os analitos foram extraídos com 3 mL da mistura diclorometano:metanol:hidróxido de amônio (90:10:2) (v/v), utilizando apenas a força da gravidade. O eluato foi recolhido em tubos de derivação, previamente silanizados e evaporado à secura, em capela, a 40°C, sob fluxo de N₂.

O procedimento de extração é apresentado na Figura 7.

4.2.1.3 Procedimento de derivação

Alíquotas de 50 µL das soluções-estoque de BEC foram transferidas para tubos de derivação e evaporadas em fluxo de nitrogênio - N₂, adicionou-se 70 µL de PFPA e 40 µL de PFPOH, após agitação em *vórtex*, os tubos de derivação foram mantidos no bloco de aquecimento a 70 °C durante 10 minutos. Procedeu-se à evaporação em fluxo de N₂. Após a secura foram adicionados 200 µL de acetato de etila, agitou-se em *vórtex* e evaporou-se novamente.

O resíduo foi ressuspendido em 50 µL de acetato de etila e injetou-se 1 µL no CG-MS, nas seguintes condições cromatográficas: injetor operado a 250 °C, volume de injeção de 0,5 µL, hélio como gás de arraste com fluxo de 0,65 mL/min, temperatura do forno de: 100°C até 200°C a 20 °C/min; 200 °C até 280°C a 30 °C/min esta última temperatura foi mantida durante 3 min. A interface foi a 290°C. Injetou-se também 1 µL no CG-FID nas condições cromatográficas descritas no item 4.2.1.4.

O mesmo procedimento sofreram os resíduos resultantes das extrações das amostras, descritas no item 4.2.1.2.

O procedimento de derivação é apresentado na Figura 8.

Figura 7: Fluxograma da técnica de extração dos analitos.

Figura 8: Fluxograma da técnica de derivação com PFPA e PFPOH.

4.2.1.4 Condições cromatográficas

- Temperatura do detector: 250°C;
- Temperatura do injetor: 230°C;
- Temperatura do forno: 140°C por 4 minutos, 160°C à 30°C/min por 3 minutos, 220°C à 30°C/min por 5 minutos.

4.2.2 Estudo da estabilidade da BEC derivada

A solução padrão de trabalho de BEC foi submetida, em triplicata, ao processo de derivação descrito na Figura 8 e analisada após uma hora do término da derivação em GC-FID nas condições cromatográficas arroladas no item 4.2.1.4. O derivado foi injetado no equipamento a cada 30 minutos durante 6 horas e vinte minutos.

4.2.3 Estudo da degradação térmica da COC

O *liner* de injeção do equipamento foi limpo antes da avaliação da degradação térmica da cocaína e da validação do método.

Antes da validação do método, amostras de branco de urina foram enriquecidas com volumes de solução-estoque de cocaína de forma a se obter as concentrações de 0,5; 2,0; 4,0; 5,0 50 e 100 µg/mL e ensaiadas de acordo com o método descrito nas Figuras 7 e 8 em triplicata para cada concentração.

Antes da análise das amostras autênticas, amostras de branco de urina foram enriquecidas com volumes de solução-estoque de cocaína de forma a se obter as concentrações de 10 e 50 µg/mL e ensaiadas de acordo com o método descrito nas Figuras 7 e 8 em triplicata para cada concentração.

A formação de EMA como artefato pela degradação térmica da COC foi avaliada pela detecção de pico com tempo de retenção-rt de 2,88 minutos, sendo este rt referente ao EMA determinado em estudo prévio.

4.2.4 Preparo da amostras de controle - QCs

Amostras de branco de urina referência negativa foram adicionadas de COC, BEC e EMA de forma a se obter urina com concentrações de 0,5; 1,0 e 3,0 µg/mL, respectivamente QC1 (baixo), QC2 (médio) e QC3 (alto).

4.2.5 Validação do Método

Os cálculos utilizados na validação do método foram realizados através do programa Microsoft® Excel® no Microsoft Office XP Professional®.

4.2.5.1 Critério de positividade

Foram analisadas quinze amostras de branco de urina adicionadas de EMA, BEC e COC com concentrações urinárias de 3,0 µg/mL e submetidas ao método descrito no item 4.2.1. Foram determinados os tempos de retenção relativo (relação entre o tempo de retenção da substância e o tempo de retenção do PI) para cada analito, e calculou-se o intervalo de confiança para a média do tempo de retenção relativo com coeficiente de confiança de 95 e 99% (MAGALHÃES, LIMA, 2002). O intervalo correspondente ao coeficiente de confiança de 95% foi adotado com critério de positividade.

4.2.5.2 Especificidade

A especificidade; definida como a capacidade do método analítico de medir e diferenciar os analitos de componentes que possam estar presentes na amostra, tais como metabólitos, impurezas presentes na droga de rua, compostos de degradação ou componentes da matriz (CAUSON, 1997; CHASIN et al., 1998; PETERS, MAURER, 2002).

A especificidade em relação aos interferentes provenientes de substâncias endógenas presentes no fluido biológico foi avaliada pela análise de um *pool* de seis amostras independentes de urina referência negativa (DADGAR, *et al.*, 1995).

Para avaliar as prováveis substâncias que pudessem interferir na identificação e quantificação dos bioindicadores de uso do *crack* foi realizado o procedimento descrito abaixo:

Determinação do tempo de retenção de cada substância

Foram transferidos 100 µL das soluções de trabalho de lidocaína, cafeína, atropina, nicotina e propoxifeno e 500 µL da solução de trabalho de carboxi-delta-9-tetrahydrocannabinol para *vials* de derivação. As soluções foram evaporadas em fluxo de nitrogênio e submetidas à técnica de derivação descrita na figura 8. Os resíduos foram retomados em 50 µL de acetato de etila dos quais injetou-se 1 µL no cromatógrafo, verificou-se os tempos de retenção de cada substância.

Interferentes adicionados à amostra de urina

Foram transferidos volumes das soluções de trabalho das substâncias relacionadas no item 4.1.2 para balões volumétrico de 5 mL contendo aproximadamente 2 mL de branco de urina. Foi adicionado 150 µL de padrão interno e completado o volume com o branco de urina. A amostra foi submetida ao método proposto em 4.2.1.2 e 4.2.1.3.

4.2.5.3 Curvas analíticas de EMA, BEC e COC

O estudo de linearidade foi realizado pela análise de amostras de branco de urina adicionadas de solução-padrão de trabalho dos analitos de forma se obter concentrações urinárias de 0,2,0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 µg/mL para EMA; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 e 3,0 µg/mL para BEC e 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 µg/mL, para COC. As amostras foram submetidas ao método descrito no item 4.2.1, em triplicata para cada um dos calibradores.

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

A equação de regressão linear foi estabelecida pelo método dos mínimos quadrados e utilizada na quantificação de EMA, COC e BEC em amostras de urina selecionadas para análise.

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 (CHASIN et al., 1998).

4.2.5.4 Verificação do intervalo dinâmico

O intervalo dinâmico foi verificado pela análise de amostras de branco de urina adicionadas de solução-padrão de trabalho dos analitos de forma se obter concentrações urinárias de 5,0; 6,0; 8,0; 10,0 e 20,0 µg/mL para EMA; 4,0; 5,0; 6,0; 12,0; 24,0 e 50,0 µg/mL para BEC e 10,0; 50,0 e 100,0 µg/mL, para COC. As amostras foram submetidas ao método descrito no item 4.2.1 e considerou-se o intervalo dinâmico como sendo aquele com $r^2 \geq 0,98$ (CHASIN et al., 1998).

4.2.5.5 Figuras analíticas de mérito (parâmetros de segurança analítica)

4.2.5.5.a Recuperação

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

A recuperação absoluta foi mensurada comparando-se a resposta de amostras de controle QC1, QC2 e QC3, descritas no item 4.2.4, submetidas aos método proposto em triplicata, com a resposta de soluções-estoque dos analitos admitindo-se para estas 100% de recuperação. Os resultados foram expressos em porcentagem, de acordo com equação:

$$\text{Recuperação absoluta} = \frac{\text{resposta do analito adicionado à matriz}}{\text{resposta do analito do padrão puro}} \times 100$$

4.2.5.5.b 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 confiavelmente 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).

O LD foi determinado através da análise de amostras de urina referência negativa 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 seis replicatas, nas condições especificadas (CHASIN et al., 1998) e que apresentaram coeficiente de variação-CV 20%.

O limite de quantificação - LQ, definido como a menor concentração para medidas quantitativamente precisas (CV $\leq$ 20%), foi determinado através da análise de seis amostras de branco de urina enriquecidas com soluções de trabalho dos analitos em concentrações decrescentes e considerou-se como LQ aquele referente à menor concentração que apresentou CV $\leq$ 20% (CHASIN et al., 1998; DADGAR et al., 2002).

4.2.5.5.c Imprecisão do método

A 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 a proximidade entre várias medidas efetuadas em uma mesma amostra (CAUSON, 1997; GOLDBERG, HUESTIS, WILKINS, 1997).

A precisão intra-ensaio (no mesmo dia) 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).

A capacidade de repetição da mesma metodologia sob diferentes condições, por exemplo, troca de analista, reagentes, equipamentos ou em diferentes ocasiões, é denominada reprodutibilidade ou também chamada precisão intra-ensaio (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 $\mu\text{g/mL}$ em seis determinações e expressos em termos de imprecisão.

A imprecisão foi calculada através do coeficiente de variação - CV.

4.2.5.5.d Exatidão

A exatidão do método bioanalítico é a medida do erro sistemático e representa o grau de concordância entre os resultados individuais determinados pelo método em os valores aceitos como referência (CAUSON, 1997; PETERS, MAURER, 2002).

A exatidão do método foi determinada através do cálculo das concentrações médias dos QCs, em seis determinações e em seis ensaios realizados em dias diferentes. Os valores de área relativa foram convertidos em valores de concentração de analito através das respectivas equações de regressão linear obtidas das curvas analíticas.

Considerou-se a exatidão como a porcentagem do erro sistemático, expresso pela tendenciosidade (diferença entre o real e o valor obtido, sendo neste caso, considerando real, o valor adicionado ao branco de urina) (CHASIN et al., 1998).

O cálculo da tendenciosidade foi realizado através da equação:

$$\text{Tendenciosidade} = \frac{(\text{concentração obtida} - \text{concentração real})}{\text{concentração real}} \times 100$$

4.2.5.6 Estudo da estabilidade dos analitos na matriz biológica

A estabilidade é um parâmetro que visa determinar se um analito mantém-se quimicamente inalterado numa dada matriz sob condições específicas, em determinado intervalo de tempo (PETERS, MAURER, 2002). Para avaliação deste parâmetro é sugerido o armazenamento em duas condições e dois intervalos de tempo (CAUSON, 1997).

A estabilidade foi avaliada em *freezer* e em geladeira com períodos de armazenamento de quinze e trinta dias, conforme descrito abaixo:

Enriqueceu-se branco de urina referência negativa obtendo-se concentrações urinárias igual a 1,0 µg/mL de cada analito, para tanto foram

transferidos volumes das soluções de trabalho de EMA, BEC e COC para balão volumétrico de 100 mL contendo 50 mL de branco de urina, completou-se o volume com o branco de urina. Imediatamente após o enriquecimento foram separadas vinte alíquotas de 5 mL, quatro foram submetidas ao método descrito no item 4.2.1, sendo este definido como tempo zero, oito alíquotas foram guardadas em geladeira e oito em *freezer*.

Após quinze dias foram analisadas quatro alíquotas conservadas em geladeira e quatro conservadas em freezer, de acordo com o método descrito no item 4.2.1. Repetiu-se a análise das alíquotas restantes conservadas em *freezer* e em geladeira após trinta dias.

Os resultados foram comparados com os obtidos nas análises relativas ao tempo zero.

4.3 Determinação de EMA, BEC e COC em amostras de urina selecionadas para estudo

Antes da análise das amostras autênticas foi avaliada novamente a formação de EMA como artefato para tanto enriqueceu-se branco de urina referência negativa com volumes de solução-estoque de cocaína de forma a se obter as concentrações de 1,0; 10 e 100 µg/mL, as amostras foram ensaiadas em triplicata para cada concentração de acordo método descrito no item 4.2.1. A formação de EMA foi avaliada pela detecção de pico com tempo de retenção de 2,88 minutos.

Após avaliação da degradação térmica da cocaína as amostras de urina selecionadas para análise (item 4.1.4) foram submetidas ao método proposto conforme descrito no item 4.2.1.

5 RESULTADOS

5.1 Identificação cromatográfica dos analitos extraídos da urina

A amostra de urina enriquecida com 3,0 µg/mL dos analitos, EMA, BEC e COC, e submetida ao método proposto apresentaram picos com tempo de retenção de 2,88; 11,55 e 12,93 minutos, respectivamente que se diferenciaram dos tempos de retenção referentes aos picos do branco de referência e do PI, este último apresenta pico com tempo de retenção de 14,05 minutos, conforme os cromatogramas apresentados na Figura 9 e Figura 10.

Figura 9: Cromatograma do branco de urina adicionado de 150 µL de padrão interno submetido ao método.

Figura 10: Cromatograma do branco de urina adicionado de EMA, BEC e COC nas concentrações de 3,0 µg/mL submetido ao método.

5.2 Derivação da BEC

O espectro de massa da solução padrão de BEC submetida ao processo de derivação descrito em 4.2.1 apresentou íons significativos com m/z 82, 105 e 300 no tempo de retenção de 8,593 minutos, confirmando a derivação do analito segundo reação representada na Figura 11.

A benzoilecgonina derivada com PFPA/PFPOH apresentou moderada degradação nas primeira duas horas e trinta minutos, sendo que após este período permaneceu estável no restante do período analisado, cerca de três horas (Figura 12).

Figura 11: Representação da reação de derivação da benzoilecgonina com PFPA e PFPOH.

Figura 1 2: Representação gráfica da estabilidade da benzoilecgonina derivada com PFPA e PFPOH.

5.3 Estudo da degradação térmica da COC

As amostras preparadas e ensaiadas antes da validação do método, conforme descrito em 4.2.3, indicaram a não formação de EMA como artefato pela ausência de pico com tempo de retenção de 2,88 minutos.

Após a validação do método as quantidades de EMA formadas na análise do branco de urina adicionado de 100 µg/mL foram abaixo do limite de detecção do método apresentando valor médio das áreas relativas de 0,0153, apresentou também pico com tempo de retenção de 11,54 min que corresponde a formação de BEC em concentração de 3,0 µg/mL.

A Figura 13 apresenta um branco de urina adicionado de solução-padrão de cocaína na concentração de 100 µg/mL obtido no estudo de degradação pós validação do método e antes da análise das amostras selecionadas para estudo.

Figura 13: Cromatograma do branco de urina, obtido no estudo de degradação térmica, adicionado de COC com concentração urinária de 100 µg/mL.

5.4 Validação do método

5.4.1 Critério de positividade

O valores de intervalo para a média do tempo de retenção relativa com coeficiente de confiança de 95 e 99% variaram na terceira ou quarta casa decimal. Portanto o critério de positividade apresenta um estreito intervalo para todos os analitos, conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4: Intervalo de confiança dos tempos de retenção relativos para cada analito.

	EMA/PI	BEC/PI	COC/PI
média	0,2063	0,8237	0,9219
desvio padrão	0,0008	0,0016	0,0005
IC (μ; 95%)	(0,2059;0,2068)	(0,8228;0,8246)	(0,9216;0,9222)
IC (μ; 99%)	(0,2057;0,2070)	(0,8224;0,8249)	(0,9215;0,9223)

IC (μ ; 95%), IC (μ ; 99%) - intervalo com coeficiente de confiança de 95 e 99%; EMA/PI , BEC/PI, COC/PI - tempo de retenção relativo para cada analito.

5.4.2 Especificidade

A análise do pool de urina, composto de seis amostras independentes de urina referência negativa, não apresentou nenhum interferente, proveniente de substância endógena, capaz de influenciar na identificação dos analitos de interesse. O cromatograma proveniente da análise do pool de urina está apresentado na Figura 9.

Os tempos de retenção das substâncias selecionadas como prováveis interferentes foram de 7,26; 9,12; 9,67 e 12,66 minutos para nicotina, cafeína, lidocaína e propoxifeno, respectivamente. O cromatograma obtido na análise do

delta-9-carboxitetrahydrocannabinol apresentou inúmeros picos, mas nenhum com tempo de retenção de 2,88 minutos.

Dos interferentes adicionados à amostra de urina em concentrações de 3,0 µg/mL e após proceder-se o método proposto foram identificados a nicotina, cafeína lidocaína e propoxifeno, apesar do pico referente ao propoxifeno apresentar tempo de retenção próximo ao referente à COC (12,66 minutos para propoxifeno e 12,93 minutos para COC), os dois picos foram separados.

5.4.3 Linearidade

A linearidade, definida como a capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, apresentou coeficientes de correlação linear (r^2) no valor de 0,9979, 0,9934 e 0,9977 para EMA, BEC e COC, respectivamente. As curvas analíticas obtidas através dos dados apresentados na Tabela 5 estão representadas nas Figuras 14, 15 e 16.

Tabela 5: Áreas relativas obtidas para a elaboração das curvas analíticas dos analitos em urina.

<i>Concentração (µg/ml)</i>	<i>Área relativa dos analito</i>		
	EMA	COC	BEC
0,1	NE	0,0432	0,03914
0,2	0,0460	NE	0,0615
0,5	0,0911	0,1952	0,1386
1,0	0,1381	0,3202	0,2258
2,0	0,2240	0,6891	0,4644
3,0	0,3236	0,9281	0,6119
4,0	0,4118	1,2711	NE
5,0	NE	1,5322	NE

NE: não ensaiado.

Figura 14: Representação gráfica da curva analítica do EMA nas concentrações urinárias de 0,1 a 5,0 $\mu\text{g/mL}$

Figura 15: Representação gráfica da curva analítica da BEC nas concentrações urinárias de 0,1 a 3,0 $\mu\text{g/mL}$

Figura 16: Representação gráfica da curva analítica da COC nas concentrações urinárias de 0,1 a 5 $\mu\text{g/mL}$

5.4.4 Intervalo dinâmico

O r^2 manteve-se com valores acima de 0,98 para as faixas de concentração estudadas, 0,1 - 20,0 $\mu\text{g/mL}$ para EMA 0,1 - 50,0 $\mu\text{g/mL}$ para BEC e 0,1 - 100,0 $\mu\text{g/mL}$, para COC. As curvas analíticas com seus respectivos coeficientes de determinação para cada analito de interesse estão apresentadas nas Figuras 17, 18 e 19.

Figura 17: Curva analítica representando o intervalo dinâmico do EMA, concentrações entre 0,1 e 20 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 18: Curva analítica representando o intervalo dinâmico da BEC, concentrações entre 0,1 e 50 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 19: Curva analítica representando o intervalo dinâmico da COC, concentrações entre 0,1 e 100 $\mu\text{g/mL}$

5.4.5 Figuras analíticas de mérito (parâmetros de segurança analítica)

5.4.5.1 Recuperação

A recuperação dos analitos obtidos em diferentes concentrações urinárias, de acordo com o procedimento descrito em 4.2.5.5.a, estão expressos na Tabela 6.

Tabela 6: Recuperação do método proposto para análise de EMA, BEC e COC em amostras de urina.

	<i>Concentrações urinárias</i>		
	QC1	QC2	QC3
<i>Recuperação (%)</i>			
EMA	62,96	79,37	89,90
COC	96,30	97,98	99,23
BEC	72,73	81,90	85,32

QC1 0,5 µg/mL; QC2 1,0 µg/mL; QC3 3,0 µg/mL;

5.4.5.2 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção determinado de acordo com o procedimento descrito em 4.2.5.5.b apresentou valores de 0,05 µg/ml para cocaína e benzoilecgonina e de 0,1 µg/mL para éster metilanidroecgonina.

O limite de quantificação do método foi de 0,2 µg/mL, para EMA e 0,1µg/mL para COC e BEC.

5.4.5.3 Imprecisão intra-ensaio e interensaio

Os coeficientes de variação obtidos nas análises dos QCs obtidos conforme descrito em 4.2.5.5.c estão relacionados na Tabela 7.

Tabela 7: Coeficientes de variação obtidos dos QCs de EMA, COC e BEC obtidos nos ensaios de precisão intra e interensaio.

	Concentrações urinárias		
	QC1	QC2	QC3
<i>Imprecisão intra-ensaio</i>			
<i>CV (%)</i>			
EMA	13,59	11,34	10,26
BEC	13,78	8,52	13,10
COC	7,45	3,88	2,20
<i>Imprecisão interensaio</i>			
<i>CV (%)</i>			
EMA	16,66	13,79	14,45
BEC	14,53	13,31	11,73
COC	11,27	6,61	10,40

QC1 0,5 µg/mL; QC2 1,0 µg/mL; QC3 3,0 µg/mL

5.4.5.4 Exatidão

Os valores obtidos dos QCs nos ensaios, conforme descrito em 4.2.5.5.d, para avaliação da exatidão do método estão expressos na tabela 8.

Tabela 8: Concentrações urinárias médias obtidas das análises dos QCs em seis determinações em seis dias diferentes para cálculo de exatidão.

	<i>Concentrações urinárias</i>		
	QC1	QC2	QC3
<i>Exatidão(µg/mL)</i>			
EMA	0,750	1,351	2,500
BEC	0,669	1,272	2,670
COC	0,496	0,880	2,671

QC1 0,5 µg/mL; QC2 1,0 µg/mL; QC3 3,0 µg/mL;.

Os parâmetros de segurança analítica do método validado (LD, LQ, intervalo dinâmico, repetibilidade, reprodutibilidade e recuperação) para determinação dos analitos de interesse são apresentados nas Tabelas 9, 10 e 11, para EMA, BEC e COC, respectivamente.

Tabela 9: Parâmetros de segurança do método proposto para determinação de EMA em urina.

parâmetro			
LQ (µg/mL)		0,2	
LD (µg/mL)		0,1	
intervalo dinâmico (µg/mL)		0,2 - 20,0	
		r^2 0,9849	
	QC1	QC2	QC3
exatidão (%)	150	135	83
imprecisão intra-ensaio (CV %)	13,59	11,34	10,26
imprecisão interensaio (CV %)	16,66	13,79	14,45
recuperação (%)	63	79	90

LQ Limite de quantificação, LD Limite de detecção, r^2 coeficiente de determinação, CV coeficiente de variação QC1 0,5 µg/mL, QC2 1,0 µg/mL e QC3 3,0 µg/mL.

Tabela 10: Parâmetros de segurança do método proposto para determinação de BEC em urina.

parâmetro			
LQ (µg/mL)		0,1	
LD (µg/mL)		0,05	
intervalo dinâmico (µg/mL)		0,1 - 50,0	
		r^2 0,9807	
	QC1	QC2	QC3
exatidão (%)	134	127	89
imprecisão intra-ensaio (CV %)	13,78	8,52	13,10
imprecisão interensaio (CV %)	14,53	13,31	11,73
recuperação (%)	73	82	85

LQ Limite de quantificação, LD Limite de detecção, r^2 coeficiente de determinação, CV coeficiente de variação QC1 0,5 µg/mL, QC2 1,0 µg/mL e QC3 3,0 µg/mL.

Tabela 11: Parâmetros de segurança do método proposto para determinação de COC em urina.

parâmetro			
LQ (µg/mL)		0,1	
LD (µg/mL)		0,05	
intervalo dinâmico (µg/mL)		0,1 - 100,0	
		r^2 0,9970	
	QC1	QC2	QC3
exatidão (%)	99	88	89
imprecisão intra-ensaio (CV %)	7,45	3,88	2,20
imprecisão interensaio (CV %)	11,27	6,61	10,40
recuperação (%)	96	98	99

LQ Limite de quantificação, LD Limite de detecção, r^2 coeficiente de determinação, CV coeficiente de variação QC1 0,5 µg/mL, QC2 1,0 µg/mL e QC3 3,0 µg/mL.

5.4.6 Estabilidade

Comparando-se com a hora zero, a BEC apresentou aumento na média de área relativa de 23 e 66% após trinta dias de armazenamento em geladeira e *freezer*, respectivamente, enquanto a COC apresentou decréscimo na média de área relativa de 16 e 23% após trinta dias de armazenamento em *freezer* e geladeira, respectivamente. O EMA apresentou diminuição da média de área relativa, em relação à hora zero, de 10 e 11% após 30 dias de armazenamento em *freezer* e geladeira, respectivamente, conforme apresentado na Tabela 12.

O EMA apresentou boa estabilidade durante o período de estudo. No entanto a COC apresentou sensível degradação no mesmo período e a BEC apresentou aumento de suas concentrações.

As Figuras 20 e 21 ilustram os resultados obtidos durante o estudo de estabilidade dos analitos em amostras de branco de urina enriquecidas com os analitos de interesse, conforme descrito 4.2.5.4.

Foi verificado pelo teste de *Mann-Whitney* que as áreas relativas obtidas das amostras mantidas em geladeira e *freezer* não apresentaram diferença significativa tanto para quinze (p-valor = 0,4705) quanto para trinta dias (p-valor = 0,4705), conforme apresentado nas Figuras 22 e 23. As áreas relativas obtidas das amostras mantidas durante quinze e trinta dias também não apresentaram diferença significativa tanto para geladeira (p-valor = 0,3836) quanto para *freezer* (p-valor = 0,8839) (CONOVER, 1999).

Tabela 12: Resultados do estudo de estabilidade dos analitos adicionados na matriz com concentração urinária de 1,0 µg/mL de EMA, BEC e COC.

Média de área relativa (N=4)

	EMA	BEC	COC
Hora zero	0,165	0,302	0,334
CV%	14	15	4
Freezer			
15 dias	0,146	0,316	0,304
CV%	7	7	5
% de variação de área	-12	+5	+9
30 dias	0,149	0,401	0,280
CV%	9	3	15
% de variação de área	-10	+33	-16
Geladeira			
15 dias	0,153	0,433	0,259
CV%	5	2	4
% de variação de área	-7	+43	-23
30 dias	0,147	0,500	0,256
CV%	3	3	3
% de variação de área	-11	+66	-23

Figura 20: Representação gráfica dos resultados obtidos nos estudos de estabilidade após armazenamento sob refrigeração.

Figura 21: Representação gráfica dos resultados obtidos nos estudos de estabilidade após armazenamento em *freezer*.

Figura 22: Representação gráfica de pontos que expressam os resultados obtidos de amostras enriquecidas com EMA mantidas em geladeira e *freezer* durante quinze dias.

Figura 23: Representação gráfica de pontos que expressam os resultados obtidos de amostras enriquecidas com EMA mantidas em geladeira e *freezer* durante trinta dias.

5.4.7 Determinação de EMA, BEC e COC em amostras de urina selecionadas para estudo

Foram analisadas treze amostras de urina *post mortem* e vinte e quatro amostras de urina de indivíduos vivos. As amostras estavam armazenadas cerca de 12 meses, todas coletadas no ano de 2005 e mantidas congeladas. Das onze amostras positivas para EMA, 23% referem-se ao grupo *post mortem* e 33% ao grupo de indivíduos vivos. Do total de amostras analisadas (N=37) 30% apresentaram resultados positivos para EMA.

Dos grupo de indivíduos vivos houve dois históricos que referiam o uso de crack, mas não foi detectado o EMA.

Dos positivos, houve apenas um histórico que constava: tráfico de crack, indivíduo do sexo masculino, auxiliar de escritório, com idade de 25 anos e detido na região oeste de São Paulo, a urina deste indivíduo submetida ao método proposto apresentou concentrações de 0,308; 15,84 e 0,467 µg/mL, para EMA, BEC e COC, respectivamente.

Das amostras positivas para EMA, 64% não constavam nenhum histórico.

A Figura 24 apresenta uma amostra de urina *post mortem* positiva EMA com concentração de 6,38 µg/mL proveniente de um indivíduo do sexo masculino, eletricista que foi vítima de homicídio, ferimento por arma de fogo, com idade de 37 anos encontrado em São Caetano.

A Tabela 13 apresenta os resultados das análise de amostras de urina *post mortem* selecionadas para o estudo e as informações coletadas para cada amostra.

A Tabela 14 apresenta os resultados das análise de amostras de urina provenientes de indivíduos vivos selecionadas para o estudo e as informações coletadas para cada amostra.

Figura 24: Cromatograma de amostra autêntica submetida ao método proposto positiva para EMA, BEC e COC com concentrações urinárias de 6,38; 16,28 e 9,31 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Tabela 13: Concentrações dos analitos determinados e informações referentes às amostras de urina *post mortem* selecionadas para estudo.

Informações relatadas nos laudos						Concentração dos analitos encontrados em $\mu\text{g/mL}$				pH
Identificação da amostra	histórico	profissão	região	sexo	idade	EMA	BEC	COC	COC determinada previamente	
A2	Homicídio-FAF	NI	NI	M	30	ND	6,05	0,04	0,94	9,0
A3	Homicídio-FAF	ajudante de pedreiro	central	M	38	ND	2,66	1,8	6,6	7,5
A6	Homicídio-FAF	eletricista	São Caetano	M	37	6,38	16,28	9,31	18,37	6,0
A13	NI	NI	NI	M	NI	0,23	38,48	21,10	25,18	5,0
A18	homicídio	NI	centro	NI	22	ND	15,68	ND	0,44	9,5
A20	Homicídio -FAF	NI	leste	M	19	ND	0,22	ND	0,31	5,0
A26	Morte a esclarecer	NI	Guarulhos	M	31	ND	4,91	0,65	0,95	8,0
A27	Homicídio-FAF	NI	leste	M	25	ND	14,56	0,56	2,88	9,0
A31	Homicídio-FAF	NI	oeste	M	35	ND	11,30	0,06	16,59	10,0
A34	Overdose de cocaína	NI	oeste	M	37	ND	3,79	4,55	5,82	5,5
A38	Homicídio-FAF-	NI	oeste	M	20	ND	23,48	0,58	4,57	9,0
A39	Morte a esclarecer	NI	centro	M	26	ND	29,66	ND	ND	7,0
A40	NI	NI	centro	M	14	0,17	0,97	ND	1,02	6,0

NI-não informado, FAF-ferimento por arma de fogo.

Tabela 14: Concentrações dos analitos determinados e informações referentes às amostras provenientes de indivíduos vivos selecionadas para estudo.

Informações relatadas nos laudos						Concentração dos analitos encontrados em $\mu\text{g/mL}$				
Identificação da amostra	histórico	profissão	região	sexo	idade	EMA	BEC	COC	COC determinada previamente	pH
A1	NI	NI	centro	M	25	ND	31,36	0,79	1,19	7,0
A4	NI	NI	NI	M	24	0,74	119,11	0,32	4,11	9,5
A7	Usuária crack	NI	leste	F	NI	ND	14,74	ND	0,57	9,5
A8	NI	NI	centro	M	57	0,1	33,03	7,13	45,25	8,0
A9	Roubo e ac. trânsito	NI	centro	M	NI	ND	26,01	0,87	1,57	7,0
A10	NI	NI	centro	M	NI	0,5	37,17	3,7	12,81	7,0
A12	NI	NI	leste	M	19	ND	10,11	0,18	0,51	8,0
A14	NI	NI	oeste	M	47	ND	6,64	ND	ND	9,0
A15	Roubo, refere uso de maconha	desocupado	Guaratinguetá	M	18	0,14	25,56	9,84	5,49	5,5
A16	Refere uso de crack/maconha	NI	leste	M	NI	ND	4,257	0,05	0,60	8,0
A17	NI	NI	oeste	M	25	ND	8,11	0,16	0,73	5,0

NI-não informado, FAF-ferimento por arma de fogo.

Continuação. Tabela 14: Concentrações dos analitos determinados e informações referentes às amostras provenientes de indivíduos vivos selecionadas para estudo

Informações relatadas nos laudos						Concentração dos analitos encontrados em $\mu\text{g/mL}$				pH
Identificação da amostra	histórico	profissão	região	sexo	idade	EMA	BEC	COC	COC determinada previamente	
A21	NI	NI	NI	M	32	2,89	50,81	6,28	6,14	6,0
A22	NI	NI	oeste	M	17	ND	15,88	1,3	2,79	7,0
A23	uso de drogas	NI	leste	M	NI	ND	31,48	1,04	0,618	6,5
A24	NI	NI	NI	M	29	ND	10,78	0,63	0,36	5,5
A25	perdido	estudante	leste	M	16	ND	46,02	1,73	3,71	7,5
A28	NI	NI	NI	M	31	ND	35,90	2,99	1,19	5,5
A29	Tráfico de crack	Auxiliar de escritório	oeste	M	25	0,308	15,84	0,467	1,08	5,0
A30	NI	NI	NI	M	NI	3,24	72,46	16,99	16,90	8,0
A32	NI	NI	oeste	M	23	ND	23,96	ND	0,73	9,0
A33	NI	NI	oeste	M	29	0,36	48,81	0,33	1,84	8,0
A35	desacato	mecânico	leste	M	23	ND	16,38	2,00	9,24	5,5

NI-não informado, FAF-ferimento por arma de fogo.

Continuação. Tabela 14: Concentrações dos analitos determinados e informações referentes às amostras provenientes de indivíduos vivos selecionadas para estudo.

Informações relatadas nos laudos						Concentração dos analitos encontrados em $\mu\text{g/mL}$				
Identificação da amostra	histórico	profissão	região	sexo	idade	EMA	BEC	COC	COC determinada previamente	pH
A36	Porte entorpecente	autônomo	barueri	M	26	ND	13,43	2,28	2,45	5,0
A37	NI	NI	oeste	M	32	ND	35,13	4,93	3,08	5,5

NI-não informado, FAF-ferimento por arma de fogo.

6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

O exame toxicológico forense é realizado *in vivo* e em amostras biológicas *post-mortem* em casos de morte violenta que podem se dar por acidentes, homicídios ou suicídios ou ainda quando se trata de averiguação de intoxicação exógena que contribua para o diagnóstico na Clínica Médica (clínica médico-legal). A Clínica Médica, integrante da estrutura dos Institutos Médico-Legais atende indivíduos vivos, pessoas que foram vítimas de acidentes de trânsito, agressões, acidentes de trabalho etc e também realiza exame naquelas pessoas acusadas de praticar delitos (CHASIN, 1994).

A realização das análises toxicológicas em fluidos biológicos com finalidade forense é realizada, oficialmente no Brasil, em laboratórios pertencentes às Secretarias de Segurança Pública, Estaduais e, em vários casos, como acontece no Estado de São Paulo, nos Institutos Médico-Legais e é um instrumento de averiguação de uso de substâncias classicamente relacionadas com crimes (CHASIN, 1994).

A importância da diferenciação do uso de *crack* em relação às outras formas de abuso de COC reside no fato de que a primeira apresenta características próprias, padrão de abuso diverso e fornece auxílio no estabelecimento do nexo causal.

Os fluidos biológicos mais comumente utilizados em análises de indivíduos vivos são sangue e urina, esta última é considerada matriz menos invasiva e de eleição para verificação de uso recente. Apesar de apresentar difícil correlação com os teores sanguíneos, informação esta que é, em muitos casos, absolutamente necessária para se estabelecer o nexo causal entre presença do analito e a causa da intoxicação (eventualmente *causa mortis*) (CHASIN, 1994), representa uma matriz mais adequada para verificação de uso recente *crack*, visto que as concentrações urinárias de EMA são maiores que as concentrações sanguíneas (JENKINS, GOLDBERGER, 1997; PAUL et al., 2005).

O cromatograma apresentado na Figura 10 indica a eficiente separação e identificação dos analitos de interesse, EMA, BEC e COC indicando que o método proposto é adequado para a análise destes analitos em urina.

O uso de *crack* pode ser determinado empregando o indicador EMA e seu produto de hidrólise AE, esta, por ser um produto de biotransformação é encontrada em maiores concentrações na urina (SHIMOMURA, HODGE, PAUL, 2001; PAUL et al., 2005).

As condições de extração do EMA, COC e BEC da urina não recuperam AE.

Alguns autores referem a extração em fase sólida de AE em pH 2-3 como etapa adicional para análise desse metabólito (SHIMOMURA, HODGE, PAUL, 2001; PAUL et al., 2005).

A AE é uma molécula dipolar e altamente solúvel em água, o fraco caráter lipofílico e o aumento da dissociação em pH $5,5 \pm 0,5$ contribui para sua baixa adsorção em fase sólida com grupos apolar e de troca catiônica. Alguns autores descrevem que o caráter lipofílico da AE pode ser melhorado por redução da dissociação do ácido carboxílico empregando-se solução ácida. Este procedimento, além de reduzir a dissociação do ácido carboxílico melhoraria o caráter catiônico da molécula permitindo sua extração. Os valores descritos de recuperação da AE são bastantes variados, 89-99% (PAUL, MCWHORTER, SMITH, 1999), 37-42% (XIA et al., 2000), 74% (SCHEIDWEILER et al., 2000), 50-60% (SHIMOMURA, HODGE, PAUL, 2001), 2-4% (LEWIS et al., 2004),

No presente trabalho tentou-se empregar a AE como marcador de uso de *crack*, adicionalmente ao EMA, para tanto empregou-se as técnicas de extração em fase sólida, descritas por Paul, Mcwhorter, Smith (1999), Scheidweiler et al. (2000) e Shimomura et al. (2001), seguida de derivação com PFPA e PFPOH (técnica de derivação descrita na Figura 8). No entanto não obtivemos sucesso na técnica de extração. Apesar de alguns autores referirem recuperação de até 99% do analito, nossos resultados indicaram que a AE apresenta baixa adsorção na fase sólida e é quase que totalmente perdida na etapa de lavagem da coluna.

Além da dificuldade de extração da AE, a falta de grupo lipofílico dificulta a separação por cromatografia gasosa, para este tipo de análise é necessária a derivação da molécula para torná-la volátil. A derivação da AE foi testada com a técnica descrita na Figura 8, para tanto foram empregados 200 μ L de uma solução-padrão de AE com concentração de 1 mg/mL. Após o procedimento de derivação o extrato foi submetido à análise por GC-MS marca HP - quadrupolo, detector seletivo de massa, injetor com controle de pressão eletrônica operado em

temperatura de 250° C, volume de injeção de 1 µL, coluna HP2, comprimento de 12 m, e 0,2 mm de diâmetro interno, utilizou-se como gás de arraste hélio com fluxo de 0,65 mL/min, temperatura da coluna inicial 60 °C aumentado 10 °C/min até 250° C tempo total de 30 minutos, interface operada a 290 °C; o espectrômetro de massas foi operado no modo ionização por impactação de elétrons (EI, 70 eV) e a monitorização seletiva de íons em modo de aquisição, Scan: 70 a 422. O espectro de massa da solução-padrão submetida ao processo de derivação apresentou íons significativos com m/z 82, 122, 150, 166 e 299 no tempo de retenção de 4,175. Os íons abundantes com m/z 299 (íon molecular), 270 (íon base) e 82 (fragmentação do anel bicíclico) confirmam a derivação da AE (LEWIS et al., 2004).

O cromatograma obtido da análise em GC-FID em condições cromatográficas arroladas em 4.2.1.4 da solução-padrão submetida ao processo de derivação descrita na Figura 8 apresentou pico com tempo de retenção de 2,47 minutos que se diferenciou do branco de derivatizantes. A solução-padrão de AE apresentou boa estabilidade durante cerca de seis horas e meia em temperatura ambiente.

A AE é um ácido planar α , β insaturado, dipolar e altamente solúvel em água, a falta de grupo lipofílico faz com que a substância seja quase insolúvel na fase sólida empregada na técnica (PAUL, 1999). A AE tem a dissociação do ácido carboxílico aumentada em pH $5,5 \pm 0,5$ que é a faixa de pH empregada no método proposto, o aumento da dissociação contribui para a fraca adsorção da AE na sílica baseada em C8 e adsorvente de troca catiônica (PAUL, MCWHORTER, SMITH, 1999) e, conseqüentemente sua perda no eluato, o qual é reservado para posterior extração.

A solução ácida reduz a dissociação do ácido carboxílico e melhora o caráter lipofílico e catiônico da AE. Em pH 2,0 o nitrogênio é o cátion quaternário e o ácido carboxílico quase não se dissocia, resultando em caráter lipofílico e aumento da adsorção (PAUL, MCWHORTER, SMITH, 1999; SHIMOMURA, HODGE, PAUL, 2001; PAUL et al., 2005). Apesar dos estudos referidos, a AE não foi extraída da urina quando submetida aos métodos descritos na literatura, para esclarecer este resultado e identificar em qual etapa a AE foi perdida, se no passo de lavagem ou na passagem da amostra, foi preparado um adicionado em DI H₂O (100 µL de AE e 150 µL de PI, solução de trabalho - 100 µg/mL em 5 mL de DI

H₂O) obtendo-se concentração final de 2 µg/mL de AE e realizada extração sem a etapa de lavagem para retirada de interferentes, o resultado mostrou que a AE foi extraída em água, apresentando recuperação muito reduzida. Provavelmente a AE adsorve parcamente na coluna e é perdida totalmente na etapa de lavagem. Além do exposto o padrão interno citado na literatura, éster etilanidroecgoninda, não está disponível comercialmente (JACOB et al., 1990; SHEIDWEILER et al., 2003) e é encontrado em urina nos casos onde houve o uso de etanol concomitante ao *crack*, sendo produto de transesterificação do EMA (MYERS et al., 2005; PAUL et al., 2005).

Apesar da AE derivada apresentar boa separação e detecção por GC-FID foi excluída do método proposto pela dificuldade de extração. Para avaliação do uso de *crack* foi identificado somente o EMA, sendo que para a finalidade do presente estudo não há comprometimento do objetivo, posto que as quantidades de EMA presente nas urinas de usuários de *crack*, mesmo em situações recreacionais, são suficientemente altas para indicar a exposição e ademais o EMA não parece nesta matriz quando a exposição à cocaína se dá através da forma de sal (cloridrato ou sulfato) e por outra via que não a inalatória..

A COC e seus metabólitos apresentam ampla faixa de polaridades, desde o componente não polar norcoacetileno até o composto anfótero benzoilecgonina. Em pH 5,5-6,0 o grupo amina de cada um dos componentes é protonado. Adicionalmente os grupos carboxílicos em compostos como a BEC devem ficar não carregados. Os cartuchos de fase mista utilizados na extração em fase sólida dos analitos contém grupos não polares, C8, e grupos trocadores catiônicos, ácido benzenossulfônico, este adsorvente é efetivo 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. A lavagem com água e metanol remove contaminantes apolares, polares e aniônicos da matriz (CHASIN, 1996; XIA, et al., 2000; SCHEIDWEILER et al., 2000; SHIMOMURA, HODGE, PAUL, 2001).

A etapa de ressuspensão do “Resíduo 2” em 200 µL de acetato de etila, descrito na técnica de derivação (Figura 8), foi realizada para remover o excesso de reagentes derivatizantes que não foram consumidos na reação (LEWIS et al., 2004).

O PI não sofre derivação o que dificulta a avaliação da eficiência de extração da BEC. No entanto não foi encontrado nenhum outro padrão interno que apresentasse semelhança estrutural com a BEC e os outros analitos de interesse que sofresse o mesmo processo de derivação.

O emprego de éster etilanidroecgonina como padrão interno foi citado por JACOB et al., 1990, no entanto não seria adequado, visto que não estava disponível comercialmente no período de desenvolvimento do método e recentemente foi verificado que esta substância é formada endogenamente pela interação entre etanol e EMA, conforme discutido anteriormente (PAUL et al., 2005; MYERS, WILLIAMS, KRANER, 2005).

Os íons abundantes com m/z 300 (íon base), 316 e 82 (anel bicíclico) confirmam a derivação da BEC (LEWIS et al., 2004).

O EMA também apresenta característica polar, no entanto a derivação não pôde ser empregada para esta molécula pelo fato da mesma ser um éster. Ésteres são derivados funcionais de ácidos carboxílicos e mantêm as mesmas propriedades do grupo funcional. A presença do grupo carbonila ($C=O$) confere característica polar à molécula e este grupo não sofre qualquer modificação permanente no decorrer da maioria das reações. No caso da BEC foi possível a derivação, pois a mesma apresenta um função ácido carboxílico e este sofre substituição nucleofílica, na qual a hidroxila é substituída por qualquer outro grupo básico (MORRISON, BOYD, SILVA, 1986).

A cocaína não possui grupos químicos funcionais na molécula para que possa ser derivada, mas o grupo ácido carboxílico presente na BEC é o alvo das reações de derivação (YONAMINE, 2000). A BEC pode ser derivada com diazometano que é o diazoalcano mais freqüentemente utilizado e na reação com BEC gera como produto a COC (YONAMINE, 2000) ou também poderia ser etilada com etanol e ácido sulfúrico (ISENSCHMID, LEVINE, CAPLAN, 1988). No entanto, os procedimentos citados são passíveis de gerar resultados questionáveis, pois a técnica de metilação com diazometano para formar COC poderia resultar em hiperestimação da BEC por causa da COC presente inicialmente e a técnica de etilação originaria CE que é formado endogenamente quando do uso concomitante de etanol e pela derivação da COC via transesterificação (ISENSCHMID, LEVINE, CAPLAN, 1988). Ressalte-se que nos casos de interesse forense, via de regra é necessário que se faça a diferenciação

se havia ou não o agente precursor (COC) no momento da coleta para que se possa proceder à inferência dos efeitos quando da ocorrência dos fatos, este dado é freqüentemente questionado em juízo quando se visa esclarecimento do fato de interesse médico legal. A derivação com PFPA/PFPOH representa melhor alternativa, já que o derivado não representa algum analito presente inicialmente na amostra e o processo de derivação não afeta a COC e conseqüentemente suas concentrações.

O resultado obtido na avaliação da estabilidade da BEC derivada (Figura 12) orienta que as análises cromatográficas sejam realizadas imediatamente após o processo de derivação ou após duas horas e até 6 horas. Neste trabalho, para fins de padronização, optou-se por analisar as amostras duas horas após o término da derivação.

A derivação da BEC com PFPA e PFPOH fornece grupos eletrofílicos à molécula tornando-a sensível ao detector de captura de elétrons, (ZHANG, FOLTZ, 1990; LILLSUNDE et al., 1996). Adicionalmente, a molécula derivada apresenta característica apolar permitindo análise em cromatografia gasosa. Portanto preferiu-se a derivação com PFPA e PFPOH pelo fato de o derivado ser passível de identificação por detectores de captura de elétrons, ionização em chama e fluorescência, isto é, torna possível o desenvolvimento de método de identificação e quantificação em diferentes equipamentos, a maioria deles passível de estar presente nos laboratórios de médio porte como é o caso de praticamente todos os laboratórios que integram aqueles pertencentes aos IMLs do Brasil.

Neste trabalho optou-se por desenvolver o método em GC-FID porque este equipamento apresenta um custo menor e está disponível na maioria dos laboratórios de toxicologia forense, apresentando boa relação custo-benefício.

A quantificação da BEC e EME permite informação completa para estudos *post-mortem*, a hidrólise enzimática de COC em EME em sangue e degradação de COC para BEC em urina continua após a morte (ISENSCHMID *et al.*, 1988). Isto explica o porquê da necessidade de se adicionar inibidor enzimático ao sangue tão logo seja feita a coleta. No caso de urina a conservação pode ser feita acidificando-se urina ou pela adição de conservante, pratica que não é rotineiramente realizada posto que, mesmo nas urinas que não são conservadas em condições adequadas, (ausência de refrigeração) há estabilidade da BEC pois o pH básico que promoveria a degradação de COC à BEC não é atingido

(CHASIN, 1996). Os principais metabólitos encontrados na urina em caso de uso de COC são BEC e EME (ZHANG, FOLTZ, 1990).

A quantidade de EMA formado como artefato devido à alta temperatura do injetor, temperatura esta, requerida para volatilizar os analitos, segue uma relação linear entre a quantidade de COC injetada e quantidade de artefato produzido (GONZÁLEZ et al., 1995; TOENNES, FANDIÑO, KAUERT, 1999; TOENNES et al., 2003). Preconiza-se que este artefato seja monitorado (CHASIN, 1996).

Foram realizados alguns ensaios para se verificar a produção do artefato. Com o *liner* limpo não foi observada a formação de EMA antes da validação do método. Após a validação as quantidades formadas, média de área relativa de 0,153, e estavam abaixo do LD o que não representaria uma interferência significativa nas análises. O identificação de pico em tempo de retenção de 2,88 minutos com média de área relativa de 0,153 obtida no estudo de degradação térmica da COC empregando-se o adicionado com concentrações urinárias de 100 µg/mL, indica uma relação entre a quantidade de EMA produzida como artefato e a quantidade de COC injetada, provavelmente após a validação do método o *liner* não se encontrava limpo como no início.

A reduzida formação de EMA pode ser devida ao *liner* de injeção estar limpo, pois antes da validação do método não foi observado pico em tempo de retenção de 2,88 minutos. O grau de pirólise depende do estado do *liner* de injeção, a utilização de um *liner* limpo minimiza a formação de artefato (TOENNES, FANDIÑO, KAUERT, 1999). Outra possibilidade que explica o resultado obtido seria o fato de termos usado o injetor na forma *splitless*, pois é referido que esta forma de programação do injetor reduz a degradação térmica da COC (DE LA TORRE et al., 1993).

Apesar de o EMA ser formado como artefato na técnica de identificação da COC em cromatografia gasosa pela alta temperatura do injetor quando esta está presente em altas concentrações é possível estabelecer a quantidade de COC pirolizada através do perfil de degradação da COC, para tanto é necessário fazer um estudo de degradação térmica em que adiciona-se quantidades determinadas de COC e calcula-se a quantidade de EMA produzida como artefato, os valores obtidos podem ser subtraídos daqueles obtidos nas análises das amostras autênticas, desde que as concentrações de COC nas mesmas estejam dentro dos valores empregados no estudo (TOENNES et al., 2003).

A limpeza contínua do *liner* de injeção não é prática rotineira em laboratórios de toxicologia forense, devido à demanda de trabalho, portanto seria indicado a realização do estudo de degradação térmica periodicamente e os valores determinados seriam usados para se estabelecer um *cut-off* para a positividade de uso de *crack*, ou seja, seria utilizado um *cut-off* como parâmetro de segurança do resultado positivo.

A utilização de *liner* empacotado favorece a degradação térmica da COC e seus derivados, pois substâncias com alto ponto de fusão ficam mais tempo no injetor, há baixa difusão para a coluna resultando em maior *stress* térmico. O CE e a NORCOC apresentam maior degradação quando comparados com éster metil ecgonina (substância com menor ponto de fusão), BEC e COC. Diversamente o emprego de *liner* aberto diminui a degradação térmica devido à baixa superfície de contato. Além da utilização do *liner* aberto, a baixa temperatura do injetor, 100°C, minimiza a degradação térmica, no entanto essa temperatura impede a volatilização da COC (GONZÁLES et al., 1995).

No presente trabalho não foi possível empregar *liner* aberto devido ao equipamento ser utilizado na rotina do laboratório o que poderia haver alterações dos outros métodos validados. O *liner* pôde ser limpo para a realização deste trabalho, devido o início da validação coincidir com o período de manutenção anual, onde o detector foi limpo, a coluna trocada e o *liner* substituído. A limpeza do *liner*, entretanto é processo simples e pode ser realizada mais amiúde que a manutenção geral do equipamento (limpeza da fonte, redução de coluna etc.) e pode dirimir a formação do artefato.

O cromatograma obtido no estudo de degradação térmica da COC na concentração de 100 µg/mL (Figura 13) indicou a formação de BEC com concentração de 3,0 µg/mL. Provavelmente este analito foi formado devido à hidrólise química da COC na etapa de preparação da amostra, pois o eluente utilizado na extração dos analitos da coluna apresenta pH em torno de 10 e a solução obtida após eluição dos analitos foi evaporada em capela sob temperatura ambiente. A formação da BEC devido ao processo de extração provavelmente é reduzido quando utiliza-se evaporação sob fluxo de N₂, já que o mesmo não foi observado nas outras amostras em que foi empregado este tipo de evaporação.

A confiança dos achados analíticos é um fator crucial em toxicologia forense, é pré-requisito para a correta interpretação toxicológica dos resultados gerados (PETERS, MAURER, 2002). O significado das concentrações *post mortem* de COC (e demais produtos a ela relacionados necessitam de investigações que possibilitem a interpretação irrefutável do achado). Nesse sentido, a metodologia a ser utilizada para a realização deve ser inequívoca e apresentar parâmetros de segurança em níveis aceitáveis para a finalidade a que se presta, qual seja, a prova pericial que possibilite o estabelecimento do nexo-causal (CHASIN, 2001).

Um dos instrumentos utilizados para se alcançar a confiança dos achados analíticos é a validação, esta deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atende às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade, linearidade, faixa dinâmica, recuperação, LD, LQ, imprecisão intra e interensaio e exatidão adequadas à análise proposta (CAUSON, 1997; CHASIN et al., 1998; PETERS, MAURER, 2002).

Os resultados obtidos no estudo referente ao critério de positividade indicam uma excelente seletividade, visto que apresentou um estreito intervalo para a média do tempo de retenção relativo com coeficiente de confiança de 95% (intervalo de confiança-IC: 0,2059;0,2068; 0,8228;0,8246 e 0,9216;0,9222, para EMA, BEC e COC, respectivamente) e de 99% (IC: 0,2057;0,2070; 0,8228;0,8246 e 0,9216;0,9222, para EMA, BEC e COC, respectivamente). A partir dos valores apresentados observa-se que ocorre variação na terceira ou quarta casa decimal, adicionalmente foram obtidos valores baixos de desvio padrão sustentando a seletividade do método.

A especificidade do método proposto mostrou-se adequada visto que a análise do *pool* de urina referência negativa não apresentou interferente capaz de influenciar na identificação dos analitos (Figura 9). Em toxicologia forense, a especificidade de um método figura dentre os parâmetros mais importantes e deve ser avaliado com rigoroso critério durante a etapa de validação (SOFT AAFS, 2002). Isto porque o material biológico disponível para execução dos exames não recebe os mesmos cuidados e critérios utilizados durante a coleta de material para realização de exames clínicos e podem não receber o devido cuidado durante seu armazenamento e transporte, o que pode aumentar ainda

mais a quantidade de possíveis interferentes endógenos em virtude da decomposição da matriz biológica. Soma-se a estes problemas o fato de que quando se realiza a verificação do uso de drogas de abuso é preciso sempre considerar os possíveis adulterantes presentes na droga de rua e que estarão sendo administrados concomitantemente ao usuário (COSTA, 2004).

A lidocaína foi incluída nos estudos de interferentes por ser freqüentemente encontrada como adulterante no COC HCl (CARVALHO, 1997; MIDIO et al., 2000), e no *crack* (CARTER et al., 2000). Além deste fármaco foram selecionados o propoxifeno que geralmente apresenta comportamento analítico semelhante, quando não idêntico à COC, quando submetido à análise por cromatografia gasosa (CHASIN, 1996); a nicotina e cafeína foram estudadas, devido à possibilidade da presença das mesmas em urina, provenientes dos usuários de COC.

A metodologia proposta apresentou especificidade adequada para aplicação em toxicologia forense, uma vez que os picos dos possíveis interferentes apresentaram tempo de retenção diferente dos analitos de interesse.

Os tempos de retenção das substâncias selecionadas como prováveis interferentes foram de 7,26; 9,12; 9,67 e 12,66 minutos para nicotina, cafeína, lidocaína e propoxifeno, respectivamente. O cromatograma obtido na análise do delta-9-carboxitetrahydrocannabinol indicou que este não foi recuperado pelo procedimento de extração. Ademais por se tratar de substância química com característica polar, não seria realmente esperado que se constituísse num interferente importante. Foi, entretanto, estudado posto ser muito comum a associação das duas drogas (maconha e *crack*) como mistura em cachimbos. Dos interferentes adicionados à amostra de urina em concentrações de 3,0 µg/mL e após proceder-se o método proposto foram identificados a nicotina, cafeína lidocaína e propoxifeno, apesar do pico referente ao propoxifeno apresentar tempo de retenção próximo ao referente à COC (12,66 minutos para propoxifeno e 12,93 minutos para COC), os dois picos foram separados. Desta forma a metodologia proposta apresentou boa especificidade na presença dos interferentes testados. Acresça-se ainda que o método proposto deve integrar metodologia que siga os princípios que norteiam as análises forenses, a saber, pelo menos duas técnicas e em duas matrizes diferentes (SOFT AFFS, 2002).

O parâmetro linearidade, envolve o estabelecimento da curva de calibração, equação da regressão linear, coeficiente de determinação- r^2 e intervalo dinâmico. O intervalo dinâmico é a região da curva onde a linearidade pode ser atestada (CHASIN, 2001). A metodologia proposta apresentou excelente linearidade dentro de uma ampla faixa dinâmica, conforme apresentado nas Tabelas 9, 10 e 11.

De acordo com a literatura consultada há grande variabilidade nas concentrações urinárias de EMA encontradas em análises de amostras autênticas; em análises *post mortem* foram determinadas concentrações de 0,6 $\mu\text{g/mL}$ (PAUL et al., 2005) até 2,0 $\mu\text{g/mL}$ (SHIMOMURA, HODGE, PAUL, 2001), e *in vivo* concentrações de 0,22 $\mu\text{g/mL}$ (PAUL et al., 2005) até 3 $\mu\text{g/mL}$, nos casos em que a urina foi coletada até duas horas subseqüentes ao uso de *crack* (JACOB et al., 1990). Há poucas informações a respeito da toxicocinética e da redistribuição *post mortem* do EMA, assim optou-se por verificar a linearidade dentro de um amplo intervalo dinâmico (concentrações urinárias de até 20 $\mu\text{g/mL}$).

Devido à hidrólise da COC é comum encontrar-se quantidades extremamente altas de BEC, Paul et al. (2005) determinaram concentrações de até 524 $\mu\text{g/mL}$ *in vivo* e até 116 $\mu\text{g/mL}$ de urinas *post mortem*, esta última também foi determinada como sendo a concentração máxima encontrada em urina *post mortem* por Shimomura, Hodge, Paul (2001).

Pelo fato de ser encontrada altas concentrações de BEC foi determinada a linearidade dentro de uma faixa dinâmica de até 50 $\mu\text{g/mL}$. Não se empregou concentrações ainda maiores devido ao alto custo das soluções-padrão e ao fato de a quantificação dos analitos em urina servirem apenas à verificação de quanto o valor se afasta do limite de detecção e, conseqüentemente, qual a segurança atribuída ao resultado.

O intervalo dinâmico da COC chegou à concentração de até 100 $\mu\text{g/mL}$ porque foram aproveitados os resultados do estudo de degradação térmica realizados na matriz.

Altas concentrações de COC foram determinadas em amostras autênticas, chegando a 8 $\mu\text{g/mL}$ (PAUL et al., 2005) e 28 $\mu\text{g/mL}$ (SHIMOMURA, HODGE, PAUL, 2001) em urinas *post mortem*.

A recuperação do EMA de 63, 79 e 93% para os QCs 1, 2 e 3, respectivamente, é adequada indicando a eficiência do procedimento de extração, valores semelhantes (recuperação maior que 83%) foram obtidos por Paul et al. (2005) que empregaram a mesma técnica de extração descrita neste trabalho.

A técnica de extração apresentou excelente recuperação para COC, 96, 98 e 99% para o QC1, QC2 e QC3, respectivamente.

Apesar da BEC apresentar boa recuperação, 73, 82 e 85 para QC1, QC2 e QC3, respectivamente, torna-se difícil a avaliação deste parâmetro devido ao padrão interno não sofrer derivação, conforme explicado anteriormente não foi encontrado outro padrão interno que apresentasse semelhança estrutural com a BEC e os outros analitos de interesse que sofresse o mesmo processo de derivação.

Valores abaixo do LQ não são aceitáveis como precisamente medidos, no entanto o LD pode representar resultado semi-quantitativo ou qualitativo (PETERS, MAURER, 2002). O LD obtido na validação do método proposto está acima dos obtidos na literatura consultada, isto pode ser explicado pelo sistema de detecção, o FID apresenta menor detecção que o MS (CHASIN, 2001), no entanto é adequado à finalidade da análise, devido às altas concentrações dos analitos normalmente encontradas em urina. Valores mais altos de LD poderiam gerar um falso resultado negativo, no entanto não comprometeria a finalidade do método em análise toxicológica forense, visto que é doutrinário o critério clássico adotado pela Justiça do *in dubio pro reu*, no qual havendo dúvida decide-se em favor do réu (NUCCI, 2002), considerar-se-ia inaceitável um falso positivo (SOFT AAFS, 2002).

Apesar de o GC-FID ser menos sensível que o GC-MS, apresenta maior robustez que pode ser definida como a habilidade de um método permanecer inalterado por pequenas mudanças de 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). Em estudo comparativo entre duas metodologias para identificação de COC e metabólitos por GC-FID e GC-MS foi verificado que o método GC-FID mostrou-se mais robusto que o GC-MS, ainda foi concluído que os parâmetros de segurança analítica para os dois métodos permitem que ambos sejam utilizados com finalidade forense (CHASIN, 2001).

A determinação de EMA por GC-FID constitui uma inovação, pois na literatura consultada não foi encontrado trabalho que utilize este equipamento para a identificação e quantificação de EMA. Os equipamentos descritos são GC-MS e cromatografia líquida de alta performance acoplada ao detector por espectrometria de massas-HPLC-MS.

A técnica de GC/MS 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 100% específica (*padrão ouro*). Se não houver a possibilidade de se utilizar métodos que utilizem GC/MS, outros podem ser empregados, desde que devidamente validados quanto aos seus parâmetros de segurança analítica. A metodologia a ser utilizada depende das condições do laboratório e é prerrogativa do analista a escolha do método, que deve sempre ser realizado à luz das normas que regem cientificamente esta questão. Deve-se, entretanto, observar os princípios que norteiam as análises toxicológicas com finalidade forense, qual seja: metodologia que propicie resultado inequívoco e laudo irrefutável (CHASIN, 2004).

Apesar de a quantificação em urina não ser indicada pela dificuldade de correlacionar com os teores sanguíneos (CHASIN, 2004), determinou-se o LQ para verificar o quanto se afasta do LD sendo esta informação um parâmetro de segurança para a positividade.

A precisão, parâmetro que avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas em uma mesma amostra, é dependente de erros indeterminados, aleatórios e impossíveis de serem eliminados (CHASIN *et al.*, 1998). Este parâmetro foi avaliado através da imprecisão e calculada como coeficiente de variação-CV resultando em valores <15% para EMA e BEC e <9% para COC nas determinações intra-ensaio e valores 17% para EMA, 15% para BEC e 11% para EMA nas determinações interensaio. São aceitáveis valores de CV 20% para a menor concentração (QC1) e 15% para concentrações maiores (QC2 e QC3) (GOLDBERGER, HUESTIS, WILKINS, 1997; PETERS, MAURER, 2002), portanto a precisão intra-ensaio e interensaio é adequada para análises forenses.

A exatidão do método bioanalítico é a medida do erro sistemático e representa o grau de concordância entre os resultados individuais determinados pelo método em os valores aceitos como referência (CAUSON, 1997; PETERS, MAURER, 2002). É recomendado que a exatidão do método seja avaliada

utilizando amostras certificadas que são amostras cuja concentração dos analitos no material é garantida por instituições normatizadoras ou responsáveis por programas de garantia da qualidade laboratorial. Quando este tipo de material não é disponível, é aceitável que a exatidão do método bioanalítico seja avaliada através do enriquecimento de amostras referência negativa, comparando os valores encontrados com a concentração nominal adicionada (CAUSON, 1997; GOLDBERGER, HUESTIS, WILKINS, 1997; CHASIN et al., 1998).

Os valores de exatidão para EMA dos QCs 1 e 2, foram 50 e 35%, respectivamente, acima do valor adicionado, o mesmo ocorreu com a BEC que apresentou valores de exatidão 34% (QC1) e 27% (QC2) acima do valor adicionado, estando em desacordo com a variação recomendada, $\pm 15\%$, por CAUSON, 1997. No entanto o método é desenvolvido e validado para aplicação em urina e, portanto são requeridos valores exatos, já que a quantificação é realizada apenas como critério de positividade conforme explicado anteriormente.

A estabilidade dos analitos presentes na matriz é pré-requisito para que a quantificação seja confiável (PETERS, MAURER, 2002) e está relacionada ao transporte e armazenamento, estes constituem elementos importantes posto que amostras originalmente positivas podem se tornar “negativas” por acondicionamento inadequado (CHASIN, 1994).

Via de regra, todo o material deve ser encaminhado ao laboratório sem adição de qualquer tipo de conservante. Caso não sejam enviados de imediato ao laboratório devem ser conservados sob refrigeração, mantendo-se obviamente, a devida cadeia de custódia.

A alta estabilidade, isoladamente, não assegura a confiabilidade do dado gerado, as matrizes selecionadas para análise devem ser mantidas em procedimentos rígidos de custódia pois neste campo de atuação a garantia de que a amostra analisada corresponde ao doador ou vítima, não é apenas conduta de boas práticas de laboratório, mas sim envolve condutas administrativas que efetivamente possam atestar (provar) através de documentação que todos os processos foram seguros, rastreáveis e podem ser provados (CHASIN, 1994).

No estudo de estabilidade realizado neste trabalho foi observada a diminuição das concentrações de COC e aumento das concentrações de BEC. É bem sabido que a COC é hidrolisada espontaneamente formando BEC sob condições alcalinas (BASELT, 1983; HIPPENSTIEL, GERSON, 1994;

PETERSON, LOGAN, CHRISTIAN, 1995; MORIYA, HASHIMOTO, 1996; WARNER, NORMAN, 2000). Neste trabalho foi empregado branco de urina referência negativa com pH 5,5-6,0 com HCl 0,2N, no entanto verificamos que este procedimento não impediu a degradação da COC, principalmente após 30 dias de armazenamento, provavelmente o uso de tampão seria melhor alternativa para garantir a estabilidade da COC.

Além da estabilidade de armazenamento deve-se considerar a estabilidade na etapa de preparação da amostra como temperatura do ambiente e solventes utilizados no processo de extração (PETERS, MAURER, 2002), como exemplo pode ser citada a hidrólise da COC formando BEC em condições alcalinas.

O efeito do fluoreto de sódio na estabilidade de COC presente em urina é insignificante (BASELT, 1983). A urina armazenada em local protegido da luz, em temperatura menor que -15°C e pH 5, ajustado preferencialmente com ácido ascórbico, preveniu a degradação da BEC e COC por 110 dias (HIPPENSTIEL, GERSON, 1994). No entanto este procedimento poderia ser evitado se utilizarmos somente a BEC como marcador urinário para verificação do uso de COC, isto seria aceitável em urina.

O EMA apresentou estabilidade satisfatória durante o período avaliado, havendo relativa perda nos valores de área relativa, 10% em média (menor que a imprecisão). Os valores obtidos no armazenamento em *freezer* e em geladeira durante os períodos de quinze e trinta dias não apresentaram diferença significativa sugerindo semelhança no padrão de estabilidade de amostras mantidas nos dois compartimentos. Em relação ao tempo de armazenamento os resultados indicam que não há grande variação entre quinze e trinta dias.

A taxa de degradação do EMA obtida em urina foi semelhante ao valor encontrado em estudo anterior, no qual obteve-se baixa degradação (<10%) em plasma de carneiros durante 48 h de incubação a 1°C sem adição de fluoreto de sódio, o analito apresentou reduzida degradação em pH 6,0 mesmo quando o plasma foi incubado a 37°C sem adição de fluoreto de sódio; no estudo referido foi concluído que condições de baixas temperaturas e reduzido pH previnem a degradação de EMA em plasma de carneiros (SCHEIDWEILER et al., 2000).

O EMA apresenta maior estabilidade em soro quando comparado com BEC, COC e EME, amostras de soro armazenadas por mais de três meses em temperatura de 4°C apresentaram considerável queda nas concentrações de

BEC, COC e EME, no entanto o EMA manteve-se estável. A maior estabilidade do EMA em relação aos outros analitos deve-se ao grupo metiléster do EMA apresentar maior estabilidade de ressonância o que o torna mais estável à hidrólise (TOENNES et al., 1999), além disso conversão *in vitro* de EMA em AE ocorre predominantemente via hidrólise enzimática, ao contrário da conversão de COC em BEC que ocorre principalmente por hidrólise química (SHEIDWEILER et al., 2000).

Neste trabalho foi verificado que condições de baixo pH e baixa temperatura são efetivas para garantir boa estabilidade do EMA em urina durante 30 dias.

As maiores concentrações urinárias de BEC, em relação à COC, determinadas nas amostras selecionadas para análise corroboram com estudos anteriores (JACOB et al., 1990; JENKINS, GOLDBERGER, 1997) e pode ser explicada pela hidrólise química da COC em pH alcalino. Verifica-se que concentrações de BEC extremamente altas e baixas concentrações ou ausência de COC nas amostras autênticas ocorrem naquelas com valores mais altos de pH.

No caso de amostras provenientes de cadáveres deve-se considerar a redistribuição *post mortem*. Após a morte o pH dos tecidos diminui rapidamente para valores abaixo de 7,0, portanto a COC poderia ser mais estável em corpos muitos putrefeitos devido às condições de acidez. Em contraste, é esperado queda na concentração de COC após a morte devido à atividade residual da pseudocolinesterase, isto pode ser minimizado pela adição de inibidores como o fluoreto de sódio. O tecido de escolha para determinação de COC seria o cérebro por ter maiores concentrações do fármaco devido a rápida distribuição para este tecido (MORIYA, HASHIMOTO, 1996). Além disso foi verificado que a COC é mais estável em fluido cérebro-espinal, ajustado pH 5 e adicionado de fluoreto de sódio (2% m/v) devido à baixa atividade enzimática em relação ao sangue (WARNER, NORMAN, 2000).

A interpretação dos achados laboratoriais quer em situações *in vivo* ou no estabelecimento da *causa mortis* é a integração dos conhecimentos sobre a toxicocinética do agente (absorção, distribuição, biotransformação e eliminação) e toxicodinâmica, (mecanismo de ação e reatividade dos receptores) e achados necroscópicos que evidenciem ser o toxicante o responsável pelo efeito letal (CHASIN, MÍDIO, 1997). A cinética de excreção e o fenômeno de reabsorção

renal do EMA e seus metabólitos ainda são poucos conhecidos o que dificulta a interpretação dos achados em urina (PAUL et al., 2005).

Em soros positivos para EMA (concentrações de até 34 ng/mL) foram encontrada altas concentrações de BEC (até 1890 ng/mL), no entanto a maioria dessas amostras foram negativas para COC. De vinte e nove amostras de soro selecionadas para estudo na Alemanha, 45 % foram positivas para EMA (N=29) (TOENNES, FANDIÑO, KAUERT, 1999).

Jenkins e Goldberger (1997) verificaram que maiores concentrações de EMA são encontradas em urina, de treze amostras autênticas, somente duas amostras de sangue foram positivas para EMA com concentrações de 44 e 63 ng/mL, enquanto dez amostras de urina apresentaram concentrações entre 41-4404 ng/mL de EMA. Portanto sugere-se que a urina seria a matriz de escolha para verificação de exposição ao *crack* (JENKINS, GOLDBERGER, 1997).

Neste trabalho foi verificado que 33% das amostras referentes ao grupo de indivíduos vivos e 23% das amostras referentes ao grupo *post mortem* apresentaram resultados positivos para EMA indicando que o uso de *crack* representa importante forma de abuso de COC na Região Metropolitana de São Paulo e Grande São Paulo.

A amostra “A39” apresentada na Tabela 13, apesar de não ter apresentado resultado positivo para COC em análise prévia realizada pelo NTF-IML foi referido no respectivo laudo que a concentração do analito estava abaixo do limite de detecção sugerindo dúvida a respeito da positividade. Por este motivo esta amostra foi selecionada e submetida ao método proposto resultando em concentrações urinárias de 29,66 µg/mL para BEC sustentando o fato de que este, juntamente com o EME são os melhores marcadores para a verificação de uso de COC em urina.

A inclusão dos indicadores não específicos de uso de *crack* justifica-se pela possibilidade do emprego do método para identificação simultânea de bioindicadores de *crack* e de cocaína na forma de sal.

No início deste trabalho foram levantados todas as requisições (N=129) referentes às amostras *post mortem* registrados no Núcleo de Toxicologia Forense do Instituto Médico Legal referentes aos anos de 2003 e 2004 adotando-se como critério de inclusão a positividade prévia para cocaína, verificada através de metodologia preconizada pelo laboratório. Os históricos dos casos foram

padronizados em homicídio, suicídio, *overdose*, uso de *crack* e *body packed*, no caso de indivíduos que a causa relacionada à morte foi intoxicação por COC devido ao rompimento de embalagens contendo o fármaco que se encontravam no estômago. Os históricos que relatavam morte decorrente de causas variadas (afogamento, acidente automobilístico, etc.) ou não traziam o histórico foram classificados como “não consta/outros”. O homicídio foi caracterizado quando o histórico o informava dessa forma ou continha informações de morte por perfuração por arma de fogo ou perfuração por arma branca.

Neste levantamento foi verificado que apenas três históricos referiram o uso de *crack*, conforme representado na Figura 25, indicando a utilidade de metodologia que propicie a verificação dos fatos através de indicadores em fluidos biológicos.

Figura 25: Distribuição de óbitos por histórico. Casos registrados no Núcleo de Toxicologia Forense do Instituto Médico Legal nos anos de 2003 e 2004.

A comparação dos resultados obtidos nas análises de amostras autênticas, pelo método proposto, com seus respectivos históricos e com o levantamento referente aos anos de 2003 e 2004 deixa claro que a diferenciação de uso de *crack* e COC na forma de sal ainda não é considerado um fator relevante, contradizendo todos os estudos referidos neste trabalho que afirmam que o *crack* apresenta maior potencial de abuso e características próprias no padrão de consumo, o que seria importante no estabelecimento donexo-causal.

O conhecimento da forma do agente ao qual se deu a exposição é crucial para orientar uma pesquisa e para determinar a busca do agente há que se monitorar o indicador, como na verificação de utilização do uso de *crack* deve-se procurar o EMA (CHASIN, 2004). Desta forma a importância do presente trabalho foi a diferenciação da via de administração por método analítico fornecendo subsídios para a caracterização, por exemplo, da relação entre *crack* e incidência de doenças ou uso de *crack* e violência. No caso dos estudos sobre a violência, no contexto da Criminologia, sabe-se que há diferentes variáveis a serem abordadas, portanto as ações para entender o vínculo entre as drogas e o delito devem ser mais integradas. Obviamente trata-se de assunto complexo onde são necessárias medidas interagentes no delineamento e tentativa de solução do problema e que devem ser realizadas no sentido de que sejam traçadas políticas públicas e de saúde que levem em consideração esta questão. Neste contexto o conhecimento da relação uso de *crack*/atos de violência é de fundamental importância. Acreditamos que este trabalho tenha contribuído para isto.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram concluir que:

- A BEC derivada com PFPA e PFPOH apresenta excelente separação e identificação por GC-FID;
- O EMA, BEC e COC apresentam boa separação e identificação por GC-FID;
- A linearidade, o intervalo dinâmico, o LD e o LQ determinados no processo de validação são compatíveis com os teores encontrado em urina;
- O método proposto apresentou especificidade, recuperação, repetibilidade e reprodutibilidade adequados à finalidade proposta;
- A baixa estabilidade da COC em urina indica que a BEC é o melhor marcador para identificação de uso de COC independente da via de administração;
- O EMA apresenta estabilidade adequada para sua correta identificação mesmo após trinta dias de armazenamento;
- O método desenvolvido e validado para identificação de EMA, BEC e COC em urina por GC-FID constitui instrumento inovador na diferenciação do uso de *crack* e cocaína na forma de sal;
- O método proposto mostrou-se satisfatório para elucidar se houve ou não o uso de *crack* em intoxicações por cocaína, nas amostras de interesse médico-legal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

BASELT, R.C. Stability of cocaine in biological fluids. **Journal of Chromatography A**, v.268, p.502-505, 1983.

BAXTER, L.R., SCHWARTZ, J.M., PHELPS, M.E., MAZZIONTTA, J.C., BARRIO, J., RAWSON, R.A., ENGEL, J., GUZE, B.H., SELIN, C., SUMIDA, R. Localization of neurochemical effects of cocaine and other stimulants in the human brain. **Journal of Clinical Psychiatry**, v.49, p.23-26, 1988.

BOCXLAER, J.F., CLAUWAERT, K.M., LAMBERT, W.E., DEFORCE, D.L., EECKHOUT, E. G., LEENHEER, A. P. Liquid chromatography-mass spectrometry in forensic toxicology. **Mass Spectrometry Reviews**, v.19, p.165-214, 2000.

BREMNER, J.B., SMITH, R.J., TARRANT, G.J. A meisenheimer rearrangement approach to brigehead hydroxylated tropane alkaloid derivatives. **Tetrahedron Letters**, v.37, p.97-100, 1996.

CAREY, R.J., DEPALMA, G., DAMIANOPOULOS, E., HOPKINS, A., SHANAHAN, A., MUELLER, C.P., HUSTON, J.P. Dopaminergic and serotonergic autoreceptor stimulation effects are equivalent and additive in the suppression of spontaneous and cocaine induced locomotor activity. **Brain Research**, v.1019, n.1-2, p.134-143, 2004.

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.

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 da USP].

CAMARGO, M.M.A. Cocaína: aspectos toxicológicos e analíticos. São Paulo, 1983. 128p. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP].

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

¹ De acordo co a NBR 6023/2002, preconizada pela Associação Brasileira de Normas técnicas (ABNT)

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

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

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]

CASALE, J.F. Methyl esters of ecgonine: injection-port produced artifacts from cocaine base (Crack) exhibits. **Journal of Forensic Sciences**, v.37, n.5, p.1295-1310, 1992.

CLARKE, E.G.C. **Isolations and identification of drugs**. London: Pharmaceutical Press, 1978. p.489.

CONE, E.J., HILLSGROVE, M., DARWIN, W.D. Simultaneous mensurement 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.

CONOVER, W.J. **Practical nonparametric statistics**. New York: Wiley, 1999, ed. p.272.

COSTA, J.L. Determinação de 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA - Ecstasy), 3,4-metilenodioxietilanfetamina (MDEA - Eve) e 3,4-metiledioxianfetamina (MDA) em fluidos biológicos por cromatografia líquida de alta eficiência: aspecto forense. São Paulo, 2004. 121p. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP].

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.

DE LA TORRE, R., GONZÁLEZ, M.L., ORTUÑO, J., CAMÍ, J., FARRÉ, M., SEGURA, J. A source of errors when interpreting metabolic results? **Therapeutic Drug Monitoring**, v.15, n.2, New York, 1993.

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.

ELLENHORN, M.J., SCHONWALD, S., ORDOG, G., WASSERBERGER J. **Ellenhorn's medical toxicology: diagnosis and treatment of human poisoning**. 2nd. Baltimore: Williams and Wilkins, 1997., p. 359.

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.

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.

FANDIÑO, A.S., KARAS, M., TOENNES, S.W., KAUERT, G.F. Identification of anhydroecgonine methyl ester N-oxide, a new metabolite of anhydroecgonine methyl ester, using electrospray mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v.37, p.525-532, 2002.

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.

FISHER, S.; RASKIN, A.; UHLENHUTH, E. H. **Cocaine: Clinical and Biobehavioral Aspects**. New York: Oxford University Press, p.175, 1987.

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.

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

GERACITANO, R., FAEERICI, M., PRISCO, S., BERNARDI, G., MERCURI, N.B. Inhibitory effects of trace amines on rat midbrain dopaminergic neurons **Neuropharmacology**, v.46, n.6, p.807-814, 2004.

GOLDBERGER, B.A., HUESTIS, M.A., WILKINS, D.G. Commonly practiced quality control and quality assurance procedures for gas chromatography/mass spectrometry analysis in forensic urine drug-testing laboratories. **Forensic Sciences Review**, v.9, n.2, p.60-79, 1997.

GONZÁLEZ, M.L., CARNICERO, M., de la TORRE, R., ORTUÑO, J., SEGURA, J. Influence of the injection technique on the thermal degradation of cocaine and its metabolites in gas chromatography. **Journal of Chromatography B**, v.664, p.317-327, 1995.

GOODMAN, L.S., GILMAN, A. G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: Mc Graw-Hill Interamericana Editores, 1996. p. 248-414-415.

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.

HIPPENSTIEL, M.J. & GERSON, B. Optimization of storage conditions for cocaine and benzoylecgonine in urine. A review. **Journal of Analytical Toxicology**, v.18, n.2, p.104-109, 1994.

HUANG, L., WOOLF, J.H., ISHIGURO, Y., MORGAN J.P. Effect of cocaine and methylecgonidine on intracellular Ca^{2+} and myocardial contraction in cardiac myocytes. **American Journal of Physiology**, v273, p.H893-H901, 1997.

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., LEVINE B.S., CAPLAN, Y.H. A Method for the simultaneous determination of cocaine, benzoylecgonine, and ecgonine methyl ester in blood and urine using CG/EIMS with derivatization to produce high mass molecular ions. **Journal of Analytical Toxicology**, v.12, p.242-245, 1988.

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.

JEFFCOAT, A.R., PEREZ-REYES, M., HILL, J.M., SADLER, B.M., COOK, C.E. Cocaine disposition in humans after intravenous injection, nasal insufflation (snorting), or smoking. **Drug Metab. Dispos.**, Baltimore, v.17, p.153-9, 1989. In: CHASIN, A.A.M. Cocaína e cocaetileno : influência do etanol nas concentrações de cocaína em sangue humano *post mortem*, 1996. 141p. [Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP].

JAGER, L.S & ANDREWS, A.R.J. Development of a screening method for cocaine and cocaine metabolites in urine using solvent microextraction in conjunction with gas chromatography. **Journal of Chromatography, A**, v.911, p.97-105, 2001.

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.

JOHANSON, C.E. & FISCHMAN, M.W. The pharmacology of cocaine related to its abuse. **Pharmacological Reviews**, v.41, p.3-52, 1989

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

KLASSEN, C.D. **Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons**. 6 th. New York: Mac Graw-Hill Companies, 2001, p.1095,1097,1100.

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.

KUHAR, M.J., RITZ, M.C., BOJA, J.W. The dopamine hypothesis of the reinforcing properties of cocaine. **Trends in Neurosciences**, v.14, n.7, p.299-302, 1991.

KNUPFER, M.M. Cardiovascular disorders associated with cocaine use: myths and truths. **Pharmacology & Therapeutics**, n.97, p.181-222.

LEWIS, R.J., JOHNSON, R.D., ANGIER, M.K., RITTER, R.M. Determination of cocaine, its metabolites, pyrolysis products, and ethanol adducts in postmortem fluids and tissues using Zymark® automated solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography, B**, v.806, p.141-150, 2004.

LILLSUNDE, P., MICHELSON, L., FORSSTRIIN, T., KORTE, T., SCHULTZ, E., ARINIEMI, K., PORTMAN, M., SIHVONENB, M.L., SEPP&Gb, T. Comprehensive drug screening in blood for detecting abused drugs or drugs potentially hazardous for traffic safety. **Forensic Science International**, v.77, p.191-210, 1996.

MAGALHÃES, M.N. & LIMA, A.C.P. Noções de probabilidade e estatística. São Paulo: EDUSP, 2002, p.260.

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

McCANCE, E.F., PRICE, L.H., KOSTEN, T.R., JATLOW, P.I. Cocaethylene: pharmacology, physiology and behavioral effects in humans. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v.274, p.215-23, 1995.

In: CHASIN, A.A.M. Cocaína e cocaetileno : influência do etanol nas concentrações de cocaína em sangue humano *post mortem*, 1996. 141p. [Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP].

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.

MÍDIO, A.F., SILVA, O. A., BEI, M.C., LIMA, I.V. Cocaine content and adulterants in street samples seized in the city of São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.36, n.2, p.249-251, 2000.

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.

MILLER, R.L. & DeVANE, C.L. Determination of cocaine, benzoylecgonine and ecgonine methyl ester in plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography, B**, v.570, p.412-418, 1991.

MOORE, J.M., CASALE, J.F., HAYS, P.A., KLEIN, F.X., COOPER, D. A. Hygrine, bona fide alkaloid or artifact: its chemical reduction, novel di-heptafluorobutyrylation and sensitive detection on South American coca leaves using capillary gas chromatography-electron capture detection. **Journal of Chromatography, A**, v.704, p.483-494, 1995.

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.

MORRISON, R.T., BOYD, R.N., SILVA, M.A. **Química Orgânica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, p.534-535, 1986.

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

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.

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. 1ª ed. São Paulo: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas, v.1, 125p., 2004.

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

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.

NUCCI, G.S. **Código de processo penal comentado**. São Paulo: Editora Revista dos Tribunais, p.608, 2002.

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.

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.

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.

HE, J., YANG, S., ZHANG, L. Effects of cocaine on nitric oxide production in bovine coronary artery endothelial cells. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.314, n.3, p.980-986, 2005.

REDDA, K.K. **Cocaine, marijuana, designer drugs: chemistry pharmacology, and behavior**. Boca Raton: CRC Press, p.43-72, 1989.

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.

[SAMHSA] SUBSTANCE ABUSE AND MENTAL HEALTH SERVICES ADMINISTRATION. U.S. Department of Health and Human Services – former NATIONAL INSTITUTE ON DRUG ABUSE. NIDA . **Cocaína: Abuso y Adicción**. NIH Publicación, n. 01-4324(S), 2005.

SANCHES, Z.M. & NAPPO, S.A. Sequência de drogas consumidas por usuários de crack e fatores interferentes. **Revista Saúde Pública**, v.36, n.4, p.420-430, 2002.

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.

SCHEIDWEILER, K. B., PLESSINGER, M.A., SHOJAIE, J., WOOD, R.W., KWONG, T.C. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of methylecgonidine, a crack cocaine pyrolyzate. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v.307, n.3, p.1179-1187, 2003.

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., KUJAR, 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.

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

SHOLER, A. The effect of urine manipulation on substance abuse testing. **T + K**, v.71, n.3, p.127-137.

SOFT/AAFS, **Forensic toxicology laboratory guidelines** Committee Report. Society of Forensic Toxicologists and Toxicology Section of the American Academy of Forensic Sciences, 2006.

TANAKA, S., LIO, R., CHINAKA, S., TAKAYAMA, N., HAYAKAWA, K. Analysis of reaction products of cocaine and hydrogen peroxide by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**, v.16, p.390-394, 2002.

TANDA, G., EBBS, A., NEWMAN, A.H., KATZ, J.L. Effects of 4'-chloro-3- α -(diphenylmethoxy)-tropane on mesostriatal, mesocortical, and mesolimbic dopamine transmission: comparison with effects of cocaine. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.313, n.2, p.613-620, 2005.

TELLA, R.S. Effects of monoamine reuptake inhibitors on cocaine self-administration in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 51, n.4, p.687-692, 1995.

TELLA, RS. & GOLDBERG, S.R. Monoamine transporter and sodium channel mechanisms in the rapid pressor response to cocaine. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.59, n.2, p.305–312, 1998.

TOENNES, S.W., FANDIÑO, A.S., KAUERT, G. Gas chromatographic-mass spectrometric detection of anhydroecgonine methyl ester (methylecgonidine) in human serum as evidence of recent smoking of crack. **Journal of Chromatography, B**, v.735, p.127-132, 1999.

TOENNES, S.W., FANDIÑO, A.S., HESSE, F.J., KAUERT, G.F. Artifact production in the assay of anhydroecgonine methyl ester in serum using gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography, B**, v.792, p.345-351, 2003.

TROUVE, R. & NAHAS, G. Nitrendipine: an antidote to cardiac and lethal toxicity of cocaine. **Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine**, v.183, p.392-397, 1986.

UNITED NATIONS. Office on Drug on Crime. World drug report. Washington: **United Nations Publications**, 2006, v.1, p.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO. Centro Brasileiro de Informações Sobre Drogas Psicotrópicas. IV Levantamento sobre o uso de drogas entre crianças e adolescentes em situação de rua de seis capitais brasileiras, nos anos de 1987, 1989, 1993 e 1997. São Paulo: UNIFESP, 1997.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO. Centro Brasileiro de Informações Sobre Drogas Psicotrópicas. Levantamento nacional sobre o uso de drogas entre crianças e adolescentes em situação de rua nas 27 capitais brasileiras. São Paulo: UNIFESP, 2003.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO. Centro Brasileiro de Informações Sobre Drogas Psicotrópicas. V Levantamento nacional sobre o consumo de drogas psicotrópicas entre estudantes do ensino fundamental e médio a rede pública de ensino nas 27 capitais brasileiras. São Paulo: UNIFESP, 2004.

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.

WANG, P.P & BARTLETT, M.G. Identification and quantification of cocaine n-oxide a thermally labile metabolite of cocaine. **Journal of Analytical Toxicology**, v.23, p.62-66, 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)

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.

YANG, Y., KE, Q., CAI, J., XIAO, Y.F., MORGAN, J.P. Evidence for cocaine and methylecgonidine stimulation of M(2) muscarinic receptors in cultured human embryonic lung cells. **British Journal of Pharmacology**, v.132, p.451-460, 2001.

YONAMINE, M. Derivação de benzoilecgonina urinária com diazometano para verificação da exposição à cocaína por técnicas cromatográficas. São Paulo, 2000. 96p. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP].

WOOLF, J.H., HUANG L., ISHIGURO Y., MORGAN J.P. Negative inotropic effect of methylecgonidine, a major product of cocaine base pyrolysis, on ferret human myocardium. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v.30, p.352-359, 1997.

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.